CLÉLIA FERREIRA

DIGESTÃO TERMINAL EM *Rhynchosciara americana*

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Departamento de Bioquímica do
Instituto de Química da Universidade
de São Paulo.

São Paulo
1979

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Durante a elaboração deste trabalho houve sempre a colaboração de inúmeras pessoas e instituições a quem expresso os meus sinceros agradecimentos.

Inicialmente desejo agradecer ao Dr. Walter Ribeiro Terra, que durante todos esses anos soube transmitir seu entusiasmo pela pesquisa científica, por sua constante orientação, assim como pela confiança, apoio e amizade que sempre nos dedicou.

Também gostaria de agradecer:

Ao Dr. Antonio G. de Bianchi, pela leitura do manuscrito desta dissertação e pelas contínuas sugestões e estímulo.

Ao Prof. Dr. F.J.S. Lara, pela amabilidade com que sempre me permitiu o uso das facilidades de seu laboratório.

À Mestre Ilza C.M. Terra, pelo auxílio em algumas partes experimentais e pela inestimável amizade.

Aos companheiros de laboratório: Arnaldo Zaha, Carlos A.S. Alvarenga, Dr. Carlos E. Winter, Jansen S. e Souza, Dr. Joaquim dos Santos Penoni, Lucile M.F. Winter, Dr. Manuel T. Pueyo, Dra. Marie Christine Okretic, Maria de Fátima Bonaldo ,

Dr. Roberto V. Santelli e Sonia Maria de Toledo pela amizade.

À Srta. Luiza Y. Nakabayashi pelo eficiente auxílio técnico e pelo cuidado constante na manutenção dos animais.

Ao Sr. João A. Rocha pelo auxílio técnico prestado.

Ao Sr. José Vito Netto responsável pela eficiente dactilografia desta dissertação.

À 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.	3
1.1 Digestão.	3
1.2 Anatomia do tubo digestivo de <u>Rhynchosciara ame-</u> <u>ricana</u>	7
1.3 Digestão em insetos.	9
1.4 Objetivos desse trabalho.	16
2. MATERIAL E MÉTODOS.	17
2.1 Materiais.	17
2.2 Animais.	17
2.3 Obtenção de células dos cecos gástricos.	17
2.4 Preparação de homogeneizados e fracionamento ce- lular padrão.	18
2.5 Preparação de microvilosidades dos cecos gástri- cos de <u>R. americana</u>	19
2.6 Preparação de membrana de microvilosidades dos cecos gástricos.	20
2.7 Enzimas solúveis envolvidas por membrana.	21
2.8 Purificação de núcleos das células dos cecos gástricos.	22
2.9 Enzimas solúveis no citoplasma aderido à membra- na plasmática.	23
2.10 Efeito do pH na atividade de aril- α -glicosida- ses e maltases presentes nas células dos cecos gástricos de <u>R. americana</u>	23

	Pág.
2.11	Preparação de amostras para eletroforese. 24
2.12	Eletroforese em placa fina de poliacrilamida. . 24
2.13	Fixação e coloração dos géis. 25
2.14	Determinação do peso molecular de polipeptídeos em um gel de concentração definida. 25
2.15	Determinação de proteínas. 25
2.16	Determinação de atividades enzimáticas. 26
2.17	Apresentação dos resultados obtidos por centrifugação diferencial. 28
3.	RESULTADOS. 29
3.1	Condições de homogeneização e fracionamento celular. 29
3.2	Centrifugação diferencial de homogeneizados dos cecos gástricos. 32
3.3	Preparação de microvilosidades. 41
3.4	Purificação de membrana plasmática dos cecos gástricos em gradiente de densidade. 45
3.5	Cadeias polipeptídicas das microvilosidades dos cecos gástricos. 48
3.6	Maltase e aril- α -glicosidase nas células dos cecos de <u>R. americana</u> 53
3.7	Fosfatase ácida nas células dos cecos de <u>R. americana</u> 56
4.	DISCUSSÃO. 64
4.1	Cadeias polipeptídicas das microvilosidades dos cecos gástricos. 64

	Pág.
4.2 Distribuição intracelular das hidrolases nas células dos cecos de <u>R. americana</u>	65
4.3 Digestão intermediária e final em mamíferos e em <u>R. americana</u>	70
5. RESUMO.	76
6. ABSTRACT.	78
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	79

ABREVIATURAS

cf.,	confrontar com
EDTA,	etilenodiaminotetraacetato de sódio
Gly-Gly,	glicil-glicina
LpNA,	L-leucina p-nitroanilida
α NA,	α -naftil acetato
NP α Gal,	p-nitrofenil- α -D-galactosídeo
NP β Gal,	o-nitrofenil- β -D-galactosídeo
NP α Gli,	p-nitrofenil- α -D-glicosídeo
NP β Gli,	p-nitrofenil- β -D-glicosídeo
NPP,	p-nitrofenil fosfato
p/v,	peso por volume
rpm,	rotações por minuto
SDS,	dodecil sulfato de sódio
TCA,	ácido tricloroacético
Tris,	tris-(hidroximetil) amino metano
ZGlyPhe,	carbобенzoxiglicil-L-fenilalanina

1. INTRODUÇÃO

1.1 Digestão

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 pode ser intracelular ou extracelular. Na digestão intracelular o alimento penetra na célula por fagocitose, dando origem a vacúolos que se fundem a lisossomos. As enzimas digestivas lisossômicas atuam sobre o alimento produzindo derivados que são transportados para o citoplasma, enquanto que o resíduo não digerido é eliminado da célula por exocitose (PITT, 1975). Este tipo de digestão é característico de protozoários e esponjas. Em todos os demais grupos de animais, a digestão intracelular não existe ou é apenas complementar à digestão extracelular.

A digestão extracelular ocorre em alguma cavidade do corpo do animal sob ação de enzimas secretadas (digestão luminal ou cavital), ou de enzimas ligadas à membrana das células que recobrem a superfície luminal do órgão onde se verifica a digestão (digestão em membrana).

A digestão de polímeros, tais como polissacarídeos e proteínas, que correspondem a maior massa do alimento usualmente consumido, pode ser dividida em três fases distintas. A primeira fase, a digestão primária, consiste no ataque as ligações internas dos polímeros por enzimas secretadas resultan-

do 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 por 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.

A natureza da digestão terminal, isto é, se ela é consequência de digestão luminal ou em membranas, foi desvendada há relativamente pouco tempo, através de estudo principalmente da digestão terminal de carboidratos em mamíferos. A história do desenvolvimento dos conceitos relativos à digestão terminal apresenta alguns aspectos interessantes que serão revistos resumidamente.

Na década de 30, foi estabelecido o fato de que as enzimas responsáveis pela digestão terminal de carboidratos em mamíferos eram restritas às células do intestino. Havia sido demonstrado (CAJORI, 1933; CAJORI, 1935) que a pequena quantidade de enzimas presentes no lúmen intestinal era in

capaz de explicar, por exemplo, a velocidade de desaparecimento de sacarose e lactose do tubo digestivo "in vivo". Assim, a maior parte da ação das enzimas digestivas intestinais deveria ocorrer intracelularmente ou em contato direto com a mucosa, que possuía grandes quantidades de sacarase e lactase. Entretanto, durante a década de 40, as enzimas digestivas passaram a ser todas consideradas como sendo secretadas para o lúmen do tubo digestivo (por exemplo BABKIM, 1950 citado em SEMENZA, 1968), e o conceito de "suco entérico", um fluido intestinal que conteria as dissacaridases e outras enzimas, desenvolveu-se. Este conceito perdurou, apesar das evidências anteriores que o desafiavam, até que foi mostrado, conclusivamente, por MILLER & CRANE (1961) e outros logo depois (Revisão SEMENZA, 1968) que as dissacaridases estão firmemente ligadas à membrana plasmática cobrindo as microvilosidades dos enterócitos. As dissacaridases encontradas no lúmen intestinal surgem ali devido a descamação de células do epitélio.

Além das carboidrases, outras enzimas estão ligadas à membrana das microvilosidades, como algumas peptidases, lipases e enteroquinase. Naquelas membranas encontram-se também carregadores envolvidos na absorção de algumas substâncias. Parece haver uma cooperação entre as enzimas hidrolíticas e os referidos carregadores, pois observa-se que a absorção de açúcares recém clivados é mais rápida que se os mesmos produtos forem adicionados ao lúmen intestinal (CRANE, 1968; BARNARD, 1973).

Resultados recentes indicam que as hidrolases podem ter uma função de translocação em adição à sua capacidade

hidrolítica. Por exemplo, o complexo sacarase-isomaltase, ligado à membrana das microvilosidades e responsável pela hidrólise de sacarose e isomaltose, está envolvido diretamente na translocação de frutose e glicose derivadas da sacarose, através de membranas naturais (MALATHI et al., 1973; RAMASWAMY et al., 1974) e artificiais (STORELLI et al., 1972).

Após os trabalhos comentados acima em mamíferos, e em alguns poucos outros organismos, tem sido proposto que a digestão terminal é usualmente realizada em membranas celulares (por exemplo, UGOLEV & De LAEY, 1973), embora sejam necessários muito mais estudos para assegurar a generalidade da proposição.

Devido ao fato da digestão terminal em mamíferos ocorrer nas membranas plasmáticas das microvilosidades dos enterócitos, a organização ao nível molecular dessas estruturas tem sido muito estudada.

As microvilosidades ocorrem em número de cerca de 1000 para cada enterócito e estão dispostas em sua porção apical formando uma estrutura especializada conhecida como bordo em escova (brush border). As microvilosidades são revestidas pela membrana plasmática e apresentam em seu interior um feixe ordenado de microfilamentos que percorrem toda a microvilosidade e inserem-se nos microfilamentos dispostos como rede da trama terminal (terminal web) (BRUNSER & LUFT, 1970). Os microfilamentos das microvilosidades são formados por polímeros de actina (β -actina e γ -actina) apresentando ligações cruzadas entre si aparentemente através de uma proteína de peso

molecular 95000. Proteínas usualmente associadas com microfilamentos como tropomiosina, filamina, miosina e α -actinina não foram encontradas associadas aos microfilamentos das microvilosidades (TILNEY & MOOSEKER, 1971; BRETSCHER & WEBER, 1978a; 1978b).

As microvilosidades são capazes de contrações dependentes de Ca^{++} e ATP mediadas por interações entre as extremidades basais dos microfilamentos das microvilosidades com uma miosina presente exclusivamente na trama terminal. A referida miosina parece ser similar a outras miosinas não musculares de vertebrados porque apresenta uma atividade de ATPase K^+ -EDTA (MOOSEKER, 1976; MOOSEKER et al., 1978). Além dos microfilamentos de actina e miosina, outras proteínas devem estar envolvidas no processo de sustentação e contração das microvilosidades. Nesse sentido é interessante o fato de ter sido encontrado na trama terminal, além de miosina e microfilamentos de actina, tropomiosina, filamina e α -actinina (BRETSCHER & WEBER, 1978a; 1978b).

1.2 Anatomia do tubo digestivo de Rhynchosciara americana*

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

* Rhynchosciara americana WIEDEMANN, 1821 (Diptera Nematocera Sciaridae), foi redescrita por NONATO & PAVAN (1951) como angelae e essa denominação foi usada em numerosas publicações até ser demonstrada sua sinonímia com americana por BREUER (1969).

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.

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.

O ventrículo de R. americana apresenta seis zonas de aspecto histológico diferente. Nessas seis regiões, com exceção da região cardíaca (porção mais anterior do ventrículo e de curta extensão) existem, em maior ou menor proporção, células com microvilosidades. Os cecos gástricos são compostos por células epiteliais, responsáveis pela maior parte da massa dos cecos, fibras musculares muito pequenas e algumas traquéias e filamentos de tecido conjuntivo. As células epiteliais são poliédricas com microvilosidades cobrindo todas as suas faces com exceção da basal (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 do todo o ventrículo até o intestino posterior onde se desintegra (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 (Figura 1).

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

Em R. americana o diâmetro da membrana peritrófica é maior que o do lúmen ventricular, formando-se numerosas dobras (MARQUES, 1976). Desse modo, o espaço ectoperitrófico 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 peritrófica.

1.3 Digestão em insetos

Embora exista um grande número de trabalhos sobre

Figura 1 - Desenho esquemático do tubo digestivo de *R. americana*. O espaço ectoperitrófico ventricular é virtual. O esquema apresenta essa região ampliada.

enzimas digestivas em insetos, poucos estudam a distribuição dessas enzimas no canal alimentar (revisões em DADD, 1970 ; WIGGLESWORTH, 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 muito pouco conhecido. 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 luminiais devido a descamação e/ou rompimento celular durante a dissecação, e para separar enzimas que penetram daquelas que apenas se adsorvem na membrana peritrófica.

Nesse sentido, um dos estudos mais completos foi realizado recentemente com a larva de R. americana, ensaiando-se grande número de enzimas em diferentes segmentos do tubo digestivo e desenvolvendo-se critérios 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, aril- α - e β -glicosidase, aril- α - e β -galactosidase, glicil-glicina dipeptidase, carboxipeptidase, esterá

se e fosfatase ácida e 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.

Entre cerca de 50 trabalhos pesquisados que reportam a distribuição de enzimas ao longo do tubo digestivo de insetos, apenas os citados na Tabela I apresentam evidências seguras da ocorrência (ou ausência) de enzimas digestivas no lúmen do tubo digestivo. Nenhum trabalho, com exceção do realizado em R. americana, 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. Tabela I). Co

Tabela I - Distribuição no tubo digestivo de vários insetos de enzimas envolvidas na digestão terminal e/ou intermediária¹

Inseto	Carboxipeptidase	Amilopeptidase	Dipeptidase	Maltase	Sacarase	Amil- α -glucosidase	Celulase	Amil- β -glucosidase	Polibrase	Amil- α -galactosidase	Lactase	Amil- β -galactosidase	Trealase
<u>Locusta migratoria</u> (A)	CI		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Drost & Zebe (1974), Khan (1962)
(Orthoptera)	L	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Drost & Zebe (1974), Khan (1962)
	GS		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Drost & Zebe (1974), Khan (1962)
<u>Schistocerca gregaria</u> (A)													
(Orthoptera)	CI			+	+	+	+	+	+	+	+	+	Evans & Payne (1964)
	L			+	+	+	+	+	+	+	+	+	Evans & Payne (1964)
	GS			+	+	+	+	+	+	+	+	+	Evans & Payne (1964)
<u>Leptotriton deconlineata</u> (A)													
(Coleoptera)	CI			+	+	+	+	+	+	+	+	+	Fink (1932)
	(2) L			-	-	-	-	-	-	-	-	-	Fink (1932)
<u>Atta colombica versipes</u> (A)													
(Hymenoptera)	(4) L			+	+	+	+	+	+	+	+	+	Martin et al. (1975)
<u>Glossina morsitans</u> (A)													
(Diptera)	CI	+	+										Gooding & Rolseth (1976)
	(2) L	+	-										Gooding & Rolseth (1976)
	GS		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Kinglesworth (1929)
<u>Rhynchosciara americana</u> (L)													
(Diptera)	(6) CI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Terra et al. (1979)
	(5) L	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Terra et al. (1979)
	GS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Terra et al. (1979)

1. Os resultados referem-se a insetos adultos (A) ou larvas (L). Símbolos: + indica presença; - indica que a enzima foi procurada nas não foi encontrada; um vazio indica ausência de informação; CI, células intestinais; L, lúmen; GS, glândulas salivares.

2. Fluido entoperitritóico.

3. Glândulas salivares inexistentes.

4. Fluido fecal.

5. Enzimas encontradas apenas no fluido ectoperitritóico.

6. Detalhes na Tabela XIII.

mo não existe informação sobre a distribuição das enzimas luminiais entre os espaços ecto e endoperitróficos, não se pode saber se nestes insetos a maior parte da digestão intermediária e final ocorre nos espaços ectoperitróficos, como descrito em R. americana (cf. TERRA et al., 1979). 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, representados na Tabela I pelo besouro Leptinotarsa decemlineata, apresentam algumas semelhanças com os Orthoptera, desde que possuem algumas carboidrases secretadas pelo intestino.

A formiga cortadora de folhas Atta colombica tonsipes, embora apresente um amplo espectro de carboidrases no espaço endoperitrófico (coletado como fluido fecal) (Tabela I), 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 térmitas superiores (família Termitidae) adquirem as celulasas- C_1 críticas para iniciarem a digestão de celulose a partir de suas culturas de fungos (MARTIN & MARTIN, 1978, 1979).

Os Diptera, além de R. americana, foram muito pouco estudados e só se podem fazer comparações em relação à digestão terminal de proteínas. É interessante notar que Glossina morsitans possui uma grande quantidade de aminopeptidase solúvel de peso molecular superior a 100 000 e que não é encontrada no espaço endoperitrôfico (GOODING & ROLSETH, 1976). É razoável supor que esta aminopeptidase ocorra, além das células intestinais, também no espaço ectoperitrôfico e que não penetre no espaço endoperitrôfico, 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 Carboxipeptidase A e B, com pesos moleculares respectivamente de 30 200 e 22 000, são encontrados no espaço endoperitrôfico, as Carboxipeptidases de R. americana são restritas às células (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.

De qualquer forma, somente um estudo realizado com os

cuidados e extensão discutidos por TERRA et al. (1979), incluindo estudos sobre a distribuição intracelular das enzimas digestivas restritas às células, e abrangendo um grande número de insetos de várias ordens, poderá permitir separar o que é comum a todos os insetos, daquilo que é característico de ordem, família, gênero ou da adaptação a um tipo particular de alimentação.

1.4 Objetivos desse trabalho

Para se obter um conhecimento mais amplo sobre a digestão em R. americana, seria de grande interesse pesquisar os detalhes de sua digestão terminal, pois, embora os resultados de distribuição de enzimas no tubo digestivo de R. americana mostrem que aquela fase da digestão ocorre nas células do intestino médio (TERRA et al., 1979), não há dados sobre em que sítio celular esse processo acontece.

Devido a isto, propusemo-nos, com esta dissertação, a estudar a distribuição intracelular das hidrolases supostamente envolvidas em digestão terminal. Para isso foram escolhidos os cecos gástricos, onde as enzimas restritas às células do tubo digestivo de R. americana encontram-se presentes em maiores quantidades (TERRA et al., 1979). Além disso, esse tecido possui a vantagem de ser formado por um só tipo de célula epitelial, o que não ocorre com o ventrículo (MARQUES, 1976).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais

Glicose oxidase (tipo II), peroxidase (tipo II) , substratos sintéticos, albumina de soro bovina, lipoxigenase de soja, ovoalbumina, piruvato quinase de músculo e dissacarídeos foram adquiridos da Sigma. Todos os demais reagentes empregados foram produtos analíticos obtidos principalmente da B.D.H., E. Merck A.G. 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, Sciaridae) alimentam-se até o final do 2º período quase continuamente e são usualmente encontradas debaixo de plantas em decomposição em bananais na 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 células dos cecos gástricos

A obtenção dos cecos foi feita como se segue. 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 retirada, 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. Os cecos eram então retirados e lavados extensivamente em salina de forma a remover o fluido luminal antes de serem utilizados na preparação dos homogeneizados.

2.4 Preparação de homogeneizados e fracionamento celular padrão

Para verificação da distribuição subcelular da maioria das enzimas, células dos cecos gástricos eram homogeneizadas em meio isotônico consistindo de KCl 0,10M, EDTA 5mM, 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 à 15000 rpm por 20 s (condição vigorosa de homogeneização). Em ambos os casos, após homogeneização, o material era filtrado em malha de nylon de 45 μ m e o volume do filtrado elevado de modo a conter material correspondente a 10 animais por ml.

O mesmo procedimento era adotado para verificar a distribuição intracelular de enzimas sensíveis à EDTA, só que o meio de homogeneização continha apenas KCl 0,11M, pH 7,0.

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 resuspensão no meio de homogeneização e os sobrenadantes reunidos antes de prosseguir-se com as centrifugações.

As frações podiam ser armazenadas, por pelo menos um mês a -20°C , sem mudança na atividade das enzimas ensaiadas, desde que fosse assegurada a ausência de EDTA nas enzimas sensíveis a este quelante.

2.5 Preparação de microvilosidades dos cecos gástricos de R. americana

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

Células dos cecos gástricos eram homogeneizadas

em meio hipotônico constituído por Tris 2mM- Manitol 50 mM, pH 7,1, usando-se Omni-Mixer da Sorvall à 15000 rpm por 20s. O homogeneizado era filtrado em malha de nylon de 45 μ m e seu volume acertado de modo a conter 20 cecos por ml.

Cloreto de cálcio sólido foi então adicionado ao homogeneizado para concentração final de 10 mM. A suspensão resultante foi agitada eventualmente por 10 min, antes de proceder-se as seguintes centrifugações:

2.6 Preparação de membrana de microvilosidades do epitélio dos cecos gástricos

A preparação de membranas de microvilosidades foi feita essencialmente como descrito por SCHMITZ et al. (1973).

A fração P₂, obtida como descrito no item anterior foi reomogeneizada em homogeneizador tipo Dounce, no mesmo meio utilizado para homogeneização e em seguida uma solução de Tris, pH 7,0 recém preparada foi adicionada para ficar na concentração de 0,8M. A preparação permaneceu no gelo durante 1h, sendo agitada eventualmente. Ao final desse período, 0,5ml foi aplicado no topo de um gradiente descontínuo de

glicerol composto de cinco camadas (glicerol 60%, 45%, 42%, 40% e 37% p/v) com 2,2ml cada. Todas as soluções de glicerol continham MgSO_4 na concentração de 50mM.

O gradiente foi centrifugado à 63 000 x g por 15 min e a centrífuga parada sem auxílio de breque.

Iluminando-se por baixo o tubo contendo o gradiente, percebe-se, por efeito Tyndall, 4 regiões no líquido contendo materiais fracionados assim distribuídas:

- 1) fase glicerol 37%
- 2) interfase entre glicerol 40 e 42%
- 3) interfase entre glicerol 42 e 45%
- 4) interfase entre glicerol 45 e 60%

Observou-se também certa quantidade de material no fundo do tubo.

As zonas do gradiente correspondentes às frações 1 a 4 foram recolhidas, diluídas aproximadamente cinco vezes com água bidestilada e sedimentadas por centrifugação à 100000 x g por 2h.

2.7 Enzimas solúveis envolvidas por membrana

Para verificação da existência de enzimas solúveis, porém envolvidas por membranas, foi feito um fracionamento celular padrão das células dos cecos gástricos de R. americana, utilizando-se homogeneizados preparados em homogeneizador tipo Dounce em meio contendo EDTA. Após a centrifu-

gação diferencial, cada precipitado obtido foi ressuspendido no mesmo meio por reomogeneização e submetido várias vezes à congelamento e descongelamento.

Todas as frações foram então centrifugadas à 100000 xg por 1h. Atividades específicas de algumas enzimas foram determinadas em todos os precipitados e sobrenadantes obtidos, incluindo o sobrenadante final da centrifugação diferencial.

2.8 Purificação de núcleos das células dos cecos gástricos

Um sedimento P_1 foi obtido como descrito no ítem 2.4, a partir de um homogeneizado feito em condições brandas, com meio contendo EDTA. Essa fração foi suspensa no mesmo meio e uma alíquota de 3,5ml colocada sobre duas camadas (3,5ml cada) de Ficoll 400, preparado em KCl 0,10M-EDTA 5mM pH 7,0 (d 1,0597 e 1,1534). O tubo foi centrifugado à 90000 x g durante 90 min. Ao término da centrifugação observava-se material no fundo do tubo e nas duas interfases de líquido (Ficoll-Ficoll e Ficoll-água). O material presente nas interfases foi recolhido, diluído no meio de homogeneização e sedimentado (600 xg, 20 min). Esses sedimentos e aquele presente no fundo do tubo de gradiente foram observados ao microscópio com contraste de fase e utilizados para determinação de atividades específicas de algumas enzimas.

2.9 Enzimas solúveis no citoplasma aderido à membrana plasmática

Um fracionamento celular padrão foi realizado utilizando-se homogeneizados preparados em condições brandas e em meio sem EDTA. A fração P_1 recolhida foi reomogeneizada no mesmo meio, em Omni-Mixer da Sorvall à 15 000 rpm por 20 s e então centrifugada à 100 000 xg por 1h.

Atividades específicas de fosfatase ácida e alcalina foram determinadas no sedimento e sobrenadante dessa centrifugação.

2.10 Efeito do pH na atividade de aril- α -glicosidases e maltases presentes nas células dos cecos gástricos de R. americana

O efeito do pH sobre a atividade de aril- α -glicosidases foi determinado nas enzimas solúveis e nas ligadas à membrana plasmática. Como fonte de enzimas solúveis foi utilizado o sobrenadante final de um fracionamento feito em Omni-Mixer da Sorvall. Para ensaio de enzimas ligadas à membrana plasmática, utilizou-se a fração P_2 preparada segundo SCHMITZ et al. (1973). (Ítem 2.5)

Os ensaios foram feitos em tampão citrato-fosfato 50 mM, à 30°C usando-se maltose ou NP α Gli como substrato.

Quando se desejava verificar o efeito do pH nas enzimas de membrana, o ensaio era feito sem ou com pré-incuba

ção da preparação de enzima por 30 min a 40°C.

2.11 Preparação de amostras para eletroforese

A uma alíquota do material a ser separado eletroforeticamente era adicionado igual volume de TCA 30%. Após ficar 10 min no gelo a suspensão era centrifugada a 10000 xg por 10 min, o sobrenadante descartado e o sedimento lavado duas vezes, por centrifugação, com éter etílico. Essa lavagem é necessária para que todo TCA seja retirado da amostra. O material era então seco em estufa a 37°C e adicionava-se tampão de amostra composto de Tris-HCl 60mM pH 6,8, contendo SDS 2,5%; beta-mercapto etanol 0,36M; EDTA 0,5mM; glicerol 10% e azul de bromofenol 0,005%. Antes de realizar-se a eletroforese, o material em tampão de amostra era mantido por meia hora em banho à 50°C para que os polipeptídeos fossem solubilizados.

2.12 Eletroforese em placa fina de poliacrilamida

A Eletroforese foi feita em sistema de tampões descontínuos segundo LAEMMLI (1970), com uma cuba como a descrita por STUDIER (1973).

O gel de corrida era 7,5 ou 10% em poliacrilamida e o de empilhamento (Stacking gel), 3%, ambos contendo SDS 0,1%.

A corrida era feita a 7,8 volts/cm, até que o corante marcador (azul de bromofenol) estivesse a aproximadamente

te 1,5 cm da borda inferior da placa.

2.13 Fixação e coloração dos géis

Terminada a corrida eletroforética, as placas de poli(acrilamida) eram fixadas por 1h à 4°C em TCA 10%. Após lavagem em água, o gel era corado por uma noite com Coomassie Blue R 0,09%, em etanol-ácido acético-água (45:10:45) e descorado em etanol-ácido acético-água (25:8:65).

2.14 Determinação do peso molecular de polipeptídeos em um gel de concentração definida

A amostra e os padrões protéicos foram corridos em gel de acrilamida 10%, em placa fina contendo SDS. A migração das proteínas padrões foi medida e um plote de log de peso molecular versus R_m foi feito segundo SHAPIRO et al. (1967). A curva obtida foi utilizada na determinação dos pesos moleculares de alguns polipeptídeos presentes nas frações de membrana obtidas do gradiente de glicerol.

2.15 Determinação de proteínas

Um volume de HClO_4 1,0N gelado era adicionado à amostra de concentração protéica desconhecida. Após esperar 10 min no gelo, a suspensão era centrifugada à 100000 xg por 10 min e o sedimento resultante lavado com HClO_4 0,3N. Esse sedimento, após solubilização em NaOH 0,1N, era utilizado na determi-

nação de proteínas segundo LOWRY et al. (1951), empregando-se albumina de soro bovino como padrão.

2.16 Determinação de atividades enzimáticas

Os ensaios enzimáticos foram realizados como descrito na Tabela II.

Em cada determinação, a mistura de reação foi incubada por 30, 60, 90 e 120 min, com exceção de quando utilizava-se α NA como substrato (2, 5, 10 e 15 min). 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 nmoles de substrato hidrolisado (mUnidades, mU).

Os substratos derivados de nitrofenol foram ensaiados 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 de SDS desnatura todas as enzimas ensaiadas. Nessas condições, o coeficiente de extinção molar a 420nm do p-nitrofenolato é 18000 e do o-nitrofenolato é 4600.

É importante ressaltar que todos os sedimentos obtidos por centrifugação eram suspensos no meio utilizado para a obtenção do homogeneizado, por reomogeneização em homogeneizador tipo Dounce. Quando essa providência não é tomada antes de realizar-se os ensaios enzimáticos, a recuperação total das

Tabela II - Condições de ensaio e métodos de determinação da atividade de hidrolases nas células dos cecos gástricos de R. americana.*

Enzima	EC	Substrato	Concentração (mM)	pH	T (°C)	Determinação realizada
Celobiase	3.2.1.21	Celobiose	7	6,0	37	glicose ¹
Trealase	3.2.1.28	Trealose	7	6,0	37	glicose ¹
Maltase	3.2.1.20	Maltose	7	6,0	30	glicose ¹
amil- α -glicosidase	3.2.1.20	NP α GLI	10	6,0	30	p-nitrofenol ²
amil- β -glicosidase	3.2.1.21	NP β GLI	10	6,0	37	p-nitrofenol ²
amil- α -galactosidase	3.2.1.22	NP α Gal	4	6,0	37	p-nitrofenol ²
amil- β -galactosidase	3.2.1.23	NP β Gal	10	6,0	37	O-nitrofenol ²
Fosfatase ácida	3.1.3.2.	NPP	4	5,0	30	p-nitrofenol ²
Fosfatase alcalina	3.1.3.1	NPP	4	10,4	37	p-nitrofenol ²
Esterase	3.1.1.1	α NA	0,5	8,0	37	α -naftol ³
Aminopeptidase	3.4.11.-	LpNA	1,67	8,0	37	p-nitroanilida ⁴
Dipeptidase	3.4.13.1	Gly-Gly	15	7,2	37	grupos amino ⁵
Carboxipeptidase	3.4.12.-	ZGlyPhe	15	8,0	37	grupos amino ⁵

* Os ensaios foram realizados nas temperaturas e pHs indicados. Os tampões utilizados (0,05M) foram: acetato (pH 5,0), citrato-fosfato (pH 6,0), fosfato (pH 8,0), Tris-HCl (pH 7,2) e glicina-NaOH (pH 10,4). A exceção foi pH 8,0 com ZGlyPhe (Tris-HCl). O meio de reação alcalino com NPP continha, além do tampão, $ZnCl_2$ 2,5 mM e $Mg SO_4$ 1mM e o meio com ZGlyPhe Na Cl 50mM, quando esse não continha cloretos.

1. Segundo DAHLQVIST (1968) 2. Ver item 2.16 3. Segundo HIPPS & NELSON (1974) 4. Segundo ERLANGER et al. (1961) 5. Segundo ROSEN (1957).

enzimas particuladas fica bastante diminuída.

2.17 Apresentação dos resultados obtidos por centrifugação diferencial

Os resultados obtidos por centrifugação diferencial são apresentados, na maioria das vezes, na forma de tabelas e figuras.

As figuras foram feitas segundo De DUVE et al. (1955). As atividades enzimáticas obtidas nas várias frações subcelulares foram somadas e a porcentagem de atividade presente em cada fração, calculada em relação à soma. O mesmo foi feito para a massa de proteína. A figura foi construída colocando-se atividade específica relativa (% de atividade/% de proteína) versus porcentagem de proteína. Cada fração é representada por um paralelogramo cuja área é proporcional à porcentagem de atividade recuperada naquela fração e cuja altura corresponde à purificação obtida.

3. RESULTADOS

3.1 Condições de homogeneização e fracionamento celular

O meio escolhido para a homogeneização do tecido consistia em uma solução salina isotônica. Sacarose ou glic_erol não foram utilizados no ajuste da osmolaridade do meio porque se pretendia verificar a recuperação das enzimas ensaiadas nas diferentes frações e sabia-se que essas substâncias são fortes inibidores de algumas carboidrases (EICHHOLZ & CRANE, 1965; TERRA et al., 1978). Além disso, o tecido apresenta atividade enzimática sobre sacarose, o que afetaria a determinação de outras carboidrases. EDTA foi utilizado no meio de homogeneização para impedir a aglutinação de partículas subcelulares (Mc KEEL & JARETT, 1970; DOUGLAS et al., 1972).

Utilizou-se como enzimas marcadoras a fosfatase alcalina, marcadora tradicional de membranas plasmáticas (De PIERRE & KARNOVSKY, 1973) e trealase, marcadora de citossol (TERRA et al., 1978).

A Figura 2 apresenta a distribuição da atividade de fosfatase alcalina em frações subcelulares dos cecos gástricos, obtidas a partir de homogeneizados preparados em diferentes condições.

Quando o tecido é homogeneizado em condições brandas a atividade de fosfatase alcalina é recuperada majoritariamente na fração nuclear (P_1) (Figura 2A). Esta fração foi

examinada ao microscópio com contraste de fase e observou-se grande quantidade de vesículas com microvilosidades, além de núcleos e material agregado não identificado. Em condições de homogeneização vigorosa a atividade de fosfatase alcalina é encontrada principalmente na fração P_3 e, mesmo nessas condições, a atividade recuperada na fração solúvel é desprezível (inferior a 5% da atividade total) (Figura 2b).

Esses resultados, aliados ao fato da atividade distribuir-se em todas as frações particuladas estão de acordo com a suposição de que a fosfatase alcalina está associada à membrana plasmática dos cecos, a qual está sendo fragmentada em tamanhos variados durante a homogeneização.

A utilização de um meio salino isotônico, porém sem EDTA (Figura 2c), leva a um aumento na recuperação da atividade de fosfatase em partículas maiores. Isto provavelmente se deve à aglutinação de partículas subcelulares e aumento de arraste de vesículas de membrana plasmática.

Baseando-se nos resultados acima, estabeleceu-se que as homogeneizações de rotina seriam feitas em KCl 0,10M-EDTA 5mM pH7,0. Nos casos em que a presença de EDTA acarretava inativação de enzimas, esse foi suprimido, uma vez que sua ausência causava alterações previsíveis no perfil do fracionamento celular, o que não introduz dificuldades maiores na interpretação dos resultados.

Figura 2 - Distribuição da atividade de fosfatase alcalina em frações subcelulares dos cecos gástricos de R. americana. A: Homogeneização em KCl 0,10M-EDTA 5mM, pH 7,0, usando um homogeneizador tipo Dounce (homogeneização branda). B: Homogeneização em KCl 0,10M-EDTA 5mM, pH 7,0 com Omni-Mixer da Sorvall a 15000 rpm por 20 s. (homogeneização vigorosa). C: Homogeneização em KCl 0,11M, pH 7,0 usando um homogeneizador tipo Dounce. Os resultados são apresentados segundo De Duve et al. (1955) (Ver item 2.17). As frações são representadas da esquerda para a direita na ordem em que foram obtidas (P₁, P₂, P₃, P₄ e S, respectivamente). P₁, sedimento 600 x g 10 min; P₂, sedimento 3300 x g, 10 min; P₃, 25000 x g 10 min; P₄ e S respectivamente sedimento e sobrenadante 100.000 x g, 1h.

3.2 Centrifugação diferencial de homogeneizados dos cecos gástricos

A Figura 3 (e Tabelas III e IV) apresenta a distribuição de várias enzimas não afetadas por EDTA nas frações obtidas por centrifugação diferencial de homogeneizados das células dos cecos gástricos, enquanto que a Figura 4 (e Tabelas V e VI) faz o mesmo para as enzimas inibidas por EDTA. Em ambos os casos, fosfatase alcalina foi usada como marcadora de membrana plasmática e trealase como marcadora de citosol.

As enzimas celobiase, aril- α e β -glicosidases, e aril- α - e β -galactosidases seguem a distribuição de fosfatase alcalina em condições brandas e vigorosas de homogeneização devendo, portanto, ocorrer majoritariamente ligadas à membrana plasmática. Deve-se notar, entretanto, que em todas elas uma pequena, embora significativa atividade (superior a 5% da atividade total) é encontrada no sobrenadante final após homogeneização em condições vigorosas (Figura 3, Tabelas III e IV).

Maltase é encontrada principalmente na fração P_3 , quando a homogeneização é branda e na fração solúvel e em P_3 , quando a homogeneização é vigorosa (Figura 3, Tabelas III e IV). Esses resultados sugerem que maltase ocorre ligada à membrana plasmática (cerca de 62% do total) e na forma solúvel, embora contida em partículas que se sedimentam principalmente em P_3 (38% do total) e que seriam rompidas durante a homoge -

neização vigorosa.

Comparando-se a distribuição de maltase nas frações obtidas em diferentes condições com aquela da aril- α -glicosidase (Figura 3, Tabelas III e IV), podemos concluir que devem existir pelo menos duas α -glicosidases. A aril- α -glicosidase seria principalmente ligada a membrana plasmática e a maltase ocorreria em duas formas: uma ligada à membrana plasmática (talvez a própria aril- α -glicosidase) e outra solúvel envolvida por membranas.

Aminopeptidase (Figura 4, Tabelas V e VI) ocorre principalmente em P_1 (que muda para P_3 após homogeneização vigorosa), embora também seja encontrada na fração solúvel. Os dados sugerem que aminopeptidase ocorra ligada à membrana plasmática e no citossol. As enzimas esterase (Figura 3, Tabelas III e IV), carboxipeptidase e dipeptidase (Figura 4, Tabelas V e VI) apresentam resultados semelhantes aos da aminopeptidase. Essas enzimas sempre apresentam esse tipo de distribuição, embora a relação de atividade recuperada no sobrenadante final e nas frações particuladas varie consideravelmente entre preparações diferentes.

Fosfatase ácida apresenta uma distribuição subcelular diferente das demais enzimas ensaiadas. Após homogeneização branda a atividade é recuperada principalmente na fração P_1 , havendo também uma quantidade significativa de atividade no sobrenadante final. Entretanto, quando a homogeneização é feita em condições vigorosas, a distribuição de atividade praticamente não se altera, notando-se apenas um aumento

Figura 3 - Distribuição de diferentes atividades enzimáticas em frações subcelulares dos cecos gástricos de *R. americana*. Meio de homogeneização: KCl 0,10M -EDTA 5mM, pH7,0. Coluna A: homogeneização feita em homogeneizador tipo Dounce com 10 movimentos de pistão. Coluna B: homogeneização em Omni-Mixer da Sorvall à 15.000 rpm por 20 s. Apresentação dos resultados e demais detalhes como na legenda da Figura 2.

Figura 3 - Distribuição de diferentes atividades enzimáticas em frações subcelulares dos cecos gástricos de *R. americana* (continuação).

Tabela III - Distribuição de atividades enzimáticas em frações subcelulares dos cecos gástricos de R. americana.
Homogeneização branda em meio KCa 0,10M-EDTA 5mM, pH 7,0¹.

Enzima ²	H		P ₁			P ₂			P ₃			P ₄			S		
	$\frac{\text{mU}}{\text{mg}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{animal}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{mg}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{animal}}$	mU (% soma)	$\frac{\text{mU}}{\text{mg}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{animal}}$	mU (% soma)	$\frac{\text{mU}}{\text{mg}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{animal}}$	mU (% soma)	$\frac{\text{mU}}{\text{mg}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{animal}}$	mU (% soma)	$\frac{\text{mU}}{\text{mg}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{animal}}$	mU (% soma)
Fosfatase alcalina	9,19	0,939	20,2	0,438	57,4	19,9	0,158	20,7	19,4	0,126	16,5	11,2	0,0291	3,8	0,225	0,0124	1,6
Galactase	78,5	8,02	141	3,05	57,3	102	0,813	15,3	141	0,918	17,2	109	0,284	5,3	4,72	0,259	4,9
α -glicosidase	132	13,5	182	3,94	50,4	187	1,49	19,0	240	1,56	19,9	170	0,440	5,6	7,21	0,395	5,0
β -glicosidase	27,7	2,83	88,7	1,92	63,5	67,2	0,534	17,6	55,3	0,360	11,9	34,3	0,0889	2,9	2,25	0,123	4,1
α -galactosidase	0,813	0,0831	1,42	0,0307	48,1	1,50	0,0119	18,6	1,76	0,0115	18,0	1,71	0,0044	6,9	0,10	0,0053	8,3
β -galactosidase	137	14,0	295	6,39	53,4	251	1,99	16,6	366	2,19	18,3	187	0,486	4,1	16,4	0,897	7,5
Esterase	515	52,6	503	10,9	28,5	360	2,85	7,4	464	3,02	7,9	254	0,659	1,7	379	20,8	54,4
Maltase	36,7	3,75	45,1	0,978	42,4	58,5	0,464	19,9	96,3	0,627	27,2	47,5	0,123	5,3	2,14	0,118	5,1
Fosfatase ácida	4,90	0,501	7,31	0,158	49,5	7,77	0,0299	9,4	2,57	0,0167	5,2	4,05	0,0105	3,3	1,90	0,104	32,6
Trealase	33,4	3,41	20,8	0,451	14,3	15,6	0,124	3,9	11,1	0,0720	2,3	5,99	0,0155	0,5	45,7	2,50	79,0

1. H, P₁, P₂, P₃, P₄, S e outros detalhes como na legenda da Figura 2.
2. As atividades de α -glicosidase, β -glicosidase, α -galactosidase e β -galactosidase referem-se a determinações efetuadas utilizando-se como substratos os aril-glicones correspondentes.

Tabela IV - Distribuição de atividades enzimáticas em frações subcelulares dos cecos gástricos de R. americana. Homogeneização vigorosa em meio KCl 0,10M-EDTA 5mM, pH 7,0¹.

Enzima ²	H			P ₁			P ₂			P ₃			P ₄			S		
	mU mg	mU animal	mU mg	mU animal	(% soma)	mU mg	mU animal	(% soma)	mU mg	mU animal	(% soma)	mU mg	mU animal	(% soma)	mU mg	mU animal	(% soma)	mU (% soma)
Fosfatase alcalina	10,3	1,55	11,2	0,209	15,4	25,9	0,442	32,6	39,2	0,598	44,1	14,4	0,0624	4,6	0,545	0,0447	3,3	
Celobiase	53,5	8,81	39,2	0,733	11,2	126	2,15	32,8	186	2,84	43,4	53,9	0,234	3,6	7,20	0,591	9,0	
α -glicosí- dase	42,8	6,45	20,8	0,389	11,2	73,2	1,25	36,0	81,3	1,24	35,8	10,8	0,0472	1,4	6,57	0,540	15,6	
β -glicosí- dase	41,5	6,26	27,4	0,513	10,4	76,2	1,30	26,4	149	2,27	46,1	29,4	0,130	2,6	8,61	0,707	14,4	
α -galacto- sídase	0,924	0,139	0,840	0,0157	14,1	1,97	0,0337	30,3	3,07	0,0468	42,1	0,788	0,0034	3,1	0,140	0,0115	10,3	
β -galacta- sídase	61,8	9,30	101	1,88	15,5	195	3,32	27,3	283	4,31	35,5	41,8	0,182	1,5	29,9	2,46	20,2	
Esterase	107	16,1	96,7	1,81	15,6	182	3,11	26,8	273	4,16	35,8	57,5	0,250	2,1	27,8	2,29	19,7	
Maltase	19,2	2,90	4,32	0,0808	6,5	12,6	0,215	17,3	30,8	0,469	37,6	0,458	0,0020	0,2	5,84	0,479	38,4	
Fosfatase ácida	7,65	1,15	13,2	0,246	25,8	5,58	0,0951	10,0	4,05	0,0617	6,5	1,61	0,0070	0,7	6,64	0,545	57,1	
Trealase	24,1	3,63	9,36	0,175	5,1	6,64	0,113	3,3	5,19	0,0792	2,3	3,66	0,0159	0,5	37,1	3,05	88,8	

1. H, P₁, P₂, P₃, P₄, S e outros detalhes como na legenda da Figura 2.

2. α - e β -glicosíases e α - e β -galactosíases como na legenda ds Tabela III.

Figura 4 - Distribuição de atividades enzimáticas em frações subcelulares dos cecos gástricos de *R. americana*. Meio de homogeneização: KCl 0,1M pH 7,0. Coluna A e B como na legenda da Figura 3. Apresentação dos resultados e de mais detalhes como na legenda da Figura 2.

Tabela V - Distribuição de atividades enzimáticas em frações subcelulares dos cecos gástricos de R. americana. Homogeneização branda em meio KCl 0,11M, pH 7,0¹.

Enzima	H		P ₁		P ₂		P ₃		P ₄		S						
	$\frac{\text{mU}}{\text{mg}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{animal}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{mg}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{animal}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{mg}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{animal}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{mg}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{animal}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{mg}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{animal}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{mg}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{animal}}$					
Fosfatase alcalina	25,9	2,69	60,8	1,56	71,4	38,0	0,254	11,6	27,4	0,265	12,1	22,0	0,0847	3,9	0,377	0,0204	0,9
	31,6	3,28	20,3	0,524	14,9	21,8	0,145	4,1	12,0	0,117	3,3	17,2	0,0661	1,9	49,5	2,67	75,8
Aminooxi- tidase	915	94,9	1213	31,1	38,3	1171	7,81	9,6	1244	12,0	14,8	989	3,80	4,7	488	26,5	32,6
Carboxi- peptidase	452	46,9	354	9,09	24,7	317	2,11	5,7	191	1,85	5,0	180	0,6'2	1,9	426	23,0	62,6
Dipeptidase	186	19,2	130	3,33	18,5	200	1,34	7,5	120	1,16	6,4	141	0,543	3,0	214	11,6	64,5

1. H, P₁, P₂, P₃, P₄ e S e outros detalhes como na legenda da Figura 2.

Tabela VI - Distribuição de atividades enzimáticas em frações subcelulares dos cecos gástricos de R. americana. Homogeneização vigorosa em meio KCl 0,11M pH 7,0¹.

Enzima	H			P ₁			P ₂			P ₃			P ₄			S		
	mU mg	mU animal	1,17	mU mg	mU animal	0,221	20,3	18,6	0,303	27,8	28,2	0,468	43,0	10,3	0,0741	6,8	0,388	0,0233
Fosfatase alcalina	9,11	1,17	8,00	0,221	20,3	18,6	0,303	27,8	28,2	0,468	43,0	10,3	0,0741	6,8	0,388	0,0233	2,1	
Trealase	78,8	20,1	12,0	0,332	2,6	14,8	0,241	1,9	15,6	0,259	2,0	12,9	0,0925	0,7	198	11,9	92,8	
Amino-pep- tidase	1432	183	261	7,23	4,1	1320	21,4	12,1	2507	41,6	23,5	557	4,00	2,3	1715	103	58,1	
Carboxipep- tidase	441	56,5	133	3,67	7,6	235	3,81	7,8	374	6,21	12,8	175	1,26	2,6	560	33,6	69,2	
Dipeptidase	173	22,2	90,2	2,50	9,8	144	2,34	9,2	192	3,19	12,5	184	1,32	5,2	268	16,1	63,3	

1. H, P₁, P₂, P₃, P₄ e S e outros detalhes como na legenda da Figura 2.

de atividade na fração solúvel (Figura 3, Tabelas III e IV).

3.3 Preparação de microvilosidades

Afim de se comprovar a ocorrência de enzimas ligadas à membrana plasmática dos cecos gástricos de R. americana, foram realizadas tentativas de purificação de microvilosidades de acordo com SCHMITZ et al. (1973). Esse método baseia-se no fato de Ca^{++} agregar mitocôndrias, parte do retículo endoplasmático e membranas basolaterais que passam a sedimentar-se à baixa rotação. O sobrenadante livre dessas estruturas é então centrifugado a uma rotação maior para sedimentar as microvilosidades, deixando no sobrenadante lisossomos e a maior parte do retículo endoplasmático. Utilizando-se esse procedimento, verifica-se que a fração que deveria conter as microvilosidades (P_2) apresenta uma atividade específica de 4 a 7 vezes maior que a do homogeneizado inicial para fosfatase alcalina, celobiase, aril- α - e β -glicosidase e aril- α - e β -galactosidase (Figura 5, Tabela VII). A recuperação dessas enzimas na fração de microvilosidades é de 25 a 35% do total.

Como as enzimas referidas acima ocorrem majoritariamente ligadas a membrana plasmática, baseando-se nos dados de centrifugação diferencial (Ítem 3.2), os presentes resultados indicam tanto que o método de SCHMITZ et al., (1973) aplica-se satisfatoriamente às células dos cecos gástricos de R. americana, como fortalecem a asserção de que as enzimas consideradas são ligadas à membrana plasmática.

A atividade específica de aminopeptidase, carboxi

Figura 5 - Distribuição de atividades enzimáticas em frações de células dos cecos gástricos de *R. americana* obtidas essencialmente como descrito por SCHMITZ et al (1973) (Ver item 2.5). Apresentação dos resultados como na legenda da Figura 2. Da esquerda para a direita são representadas, respectivamente, as frações P₁ (sedimento 3300 x g, 10 min), P₂ (sedimento 20.000 x g, 15 min) e S (sobrenadante 20.000 x g, 15 min). As atividades de α-glicosidase, β-glicosidase, α-galactosidase e β-galactosidase referem-se a determinações efetuadas utilizando-se como substratos os aril-glicones correspondentes.

Figura 5 - Distribuição de atividades enzimáticas em frações de células dos cecos gástricos de *R. americana* obtidas essencialmente como descrito por SCHMITZ et al (1973) (continuação).

Tabela VII - Distribuição de atividades enzimáticas em frações de células dos cecos gástricos de R. ameri-
cana obtidas segundo SCHMITZ et al (1973)¹

Enzima ²	H		P ₁			P ₂			S		
	$\frac{\text{mU}}{\text{mg}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{animal}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{mg}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{animal}}$	mU (% soma)	$\frac{\text{mU}}{\text{mg}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{animal}}$	mU (% soma)	$\frac{\text{mU}}{\text{mg}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{animal}}$	mU (% soma)
Fosfatase alcalina	37,5	8,78	32,0	3,94	53,8	230	2,15	29,4	18,7	1,23	16,8
Celobiase	57,2	13,4	53,0	6,53	54,7	399	3,72	31,2	25,9	1,69	14,1
α -glicosidase	83,7	19,6	56,1	6,92	64,6	399	3,73	34,8	0,956	0,0625	0,6
β -glicosidase	58,6	13,7	41,9	5,17	54,1	297	2,78	29,1	24,7	1,61	16,8
α -galactosidase	1,17	0,274	0,602	0,0742	47,0	6,17	0,0577	36,5	0,398	0,0261	16,5
β -galactosidase	232	54,3	213	26,1	60,0	1134	10,6	24,4	104	6,82	15,7
Esterase	477	112	528	66,6	68,4	1261	11,8	12,1	289	18,9	19,4
Maltase	16,3	3,81	13,1	1,62	70,9	59,7	0,558	24,4	1,64	0,107	4,7
Fosfatase ácida	5,77	1,35	2,01	0,248	42,4	4,43	0,0414	7,1	4,52	0,296	50,6
Trealase	36,7	8,61	6,00	0,740	8,7	15,7	0,147	1,7	116	7,61	89,6
Aminopeptidase	1584	371	562	71,0	24,1	4513	42,2	14,3	2766	161	61,5
Carboxipeptidase	349	81,8	150	19,0	37,9	469	4,38	8,7	409	26,7	53,3
Dipeptidase	114	26,7	33,2	4,09	27,6	250	2,34	15,8	128	8,40	56,6

1. H, homogeneizado; P₁ sedimento 3300 x g 10 min; P₂ e S, respectivamente sedimento e sobrenadante 20.000 x g 15 min.

2. α e β -glicosidases e α e β -galactosidases como na legenda da Tabela III.

peptidase, dipeptidase e esterase na fração P_2 é maior que no homogeneizado inicial, indicando que elas ocorrem na membrana plasmática (Figura 5, Tabela VII). O incremento observado de atividade específica (cerca de 1,5 a 3 vezes) é, entretanto, menor que o obtido para as enzimas citadas acima. Esse resultado não é inesperado, uma vez que parte considerável da atividade enzimática total é solúvel.

Os resultados obtidos para maltase são semelhantes aos de fosfatase alcalina, embora parte da maltase não esteja aparentemente presente na membrana plasmática. Isso deve ser consequência da maltase ser, apesar do descrito, predominantemente ligada à membrana plasmática.

Deve-se ressaltar que esse tipo de preparação não apresenta grande reprodutibilidade. Assim, o incremento em atividade específica observado em P_2 e a atividade que é recuperada nessa fração variam entre diferentes preparações.

3.4 Purificação de membranas plasmáticas dos cecos gástricos em gradiente de densidade

Submetendo-se microvilosidades de enterocitos de mamíferos a soluções hiperosmóticas de Tris, ocorre rompimento dessas estruturas liberando a membrana plasmática da porção filamentosa central. Essas duas frações podem ser recuperadas em separado e razoavelmente livres de contaminantes, utilizando-se um gradiente de glicerol (EICHHOLZ & CRANE, 1965; OVERTON et al., 1965; SCHMITZ et al., 1973).

Procedimento similar foi aplicado à preparação de microvilosidades dos cecos gástricos de R. americana, como descrito com detalhes no item 2.6.

Cerca de 60% da atividade de fosfatase alcalina de preparações de microvilosidades (P_2) é recuperada em frações de membrana (F_1 a F_4) de um gradiente de glicerol (Tabela VIII). A atividade específica dessas frações é cerca de duas vezes maior que aquela de P_2 . Um incremento dessa mesma ordem é observado na atividade específica de enzimas ligadas à membrana plasmática, quando essas membranas são purificadas em gradiente a partir de microvilosidades de enterocitos humanos (SCHMITZ et al., 1973). Os resultados obtidos para fosfatase alcalina confirmam os experimentos anteriores que sugeriam ser essa enzima ligada à membrana plasmática, além de indicar que o procedimento utilizado está sendo efetivo na purificação das referidas membranas em R. americana. O fato da atividade específica de fosfatase alcalina ser a mesma nas quatro frações de membrana, sugere que essas frações são, na realidade, fragmentos do mesmo tipo de membrana, cuja separação é consequência de seus diversos tamanhos. Deve-se lembrar que a centrifugação realizada não é isopícnica, isto é, não é feita até que as membranas atinjam um equilíbrio de densidade. A separação está sendo causada por velocidades de sedimentação diferentes. O material presente no fundo do tubo de gradiente (Fração F_5) contém 8,7% da atividade de fosfatase alcalina com uma atividade específica menor que aquela de P_2 . Isto sugere que a fração F_5 deve estar enriquecida com uma estrutura que não possui atividade de fosfatase alcalina. A

Tabela VIII - Distribuição de enzimas durante purificação de membrana de microvilosidades dos cecos gástricos de R. americana.

Fração ¹	Fosfatase alcalina				Celobiase				Carboxipeptidase			
	mU mg	mU animal	% H	mU % P ₂	mU mg	mU animal	% H	mU % P ₂	mU mg	mU animal	% H	mU % P ₂
H	19,8	3,37	100	-	57,8	9,81	100	-	379	64,4	100	-
P ₁	24,1	2,17	64,4	-	45,2	4,06	41,4	-	206	18,5	28,7	-
P ₂	69,8	0,906	26,9	100	169	2,20	22,4	100	265	3,44	5,3	100
S	7,04	0,364	10,8	-	16,4	0,847	8,6	-	613	31,7	42,9	-
F ₁	133	0,364	10,3	38,2	363	0,945	9,6	43,0	381	0,991	1,5	28,8
F ₂	150	0,126	3,7	14,0	362	0,306	3,1	13,9	397	0,320	0,5	9,3
F ₃	131	0,0392	1,2	4,3	469	0,140	1,4	6,4	443	0,133	0,2	3,9
F ₄	131	0,0269	0,8	3,0	361	0,0587	0,6	2,7	419	0,0682	0,1	2,0
F ₅	53,8	0,0519	1,5	5,7	114	0,110	1,1	5,0	140	0,135	0,2	3,9
recuperação no gradiente	-	-	17,5	65,2	-	-	15,8	71,0	-	-	2,5	47,9

1. H, homogeneizado; P₁, sedimento 3300 x g 10 min; P₂ e S, precipitado e sobrenadante, respectivamente 20.000 x g 15 min, segundo SCAMTZ et al. (1973). F₁ a F₅, material particulado recolhido após aplicar-se P₂ ao gradiente de glicerol. F₁, material presente na fase glicerol 37%; F₂, interfase glicerol 40-42%; F₃, interfase glicerol 42-45%; F₄, interfase glicerol 45-60%. F₅ material presente no fundo do tubo de gradiente. Para maiores detalhes ver Material e Métodos.

atividade recuperada nessa fração provavelmente é devida a presença de microvilosidades que não foram rompidas pelo tratamento com solução hiperosmótica de Tris.

Os resultados obtidos para celobiase são semelhantes aos da fosfatase alcalina (Tabela VIII), fornecendo nova evidência de que as referidas enzimas estão presentes no mesmo sítio celular.

Carboxipeptidase ocorre em grande quantidade no citossol das células dos cecos (Figura 3, Tabelas IV e V). Como as preparações de P_2 devem apresentar certa contaminação por citoplasma, é razoável esperar a ocorrência de carboxipeptidase solúvel nessas preparações. Devido a isso, não é inesperado o fato da recuperação de carboxipeptidase ser menor nas frações de membrana do gradiente, quando comparado com fosfatase alcalina e celobiase (Tabela VIII). Pelas mesmas considerações, é também razoável o fato da purificação de carboxipeptidase ser menor que o das demais enzimas, pois ao retirar-se citoplasma a carboxipeptidase solúvel contaminante deve ter sido também removida. Entretanto, o fato da atividade específica dessa enzima ser significativamente maior nas membranas purificadas em relação à P_2 não deixam dúvidas quanto à existência de uma carboxipeptidase ligada à membrana.

3.5 Cadeias polipeptídicas das microvilosidades dos cecos gástricos

As frações de membrana e o material presente no fundo do tubo de gradiente descontínuo de glicerol, obtidos a

partir de uma preparação de microvilosidades (fração P_2) (Tabela VIII), foram submetidas à eletroforese em placa, utilizando-se gel 7,5% em acrilamida.

A Figura 6 apresenta um eletroferograma dos polipeptídeos presentes nas referidas frações. As bandas numeradas são quantitativamente as mais importantes. A principal diferença observável entre o padrão polipeptídico de P_2 e F_1 é a grande diminuição relativa da banda 6 em F_1 . Comparando-se os eletroferogramas das frações F_1 a F_5 verifica-se que a banda 3 é proeminente apenas na fração P_2 e F_1 , e que a banda 7 é relativamente mais importante em F_4 e F_5 . É interessante notar que a fração F_5 é a única, além de P_2 , que apresenta-se enriquecida pelo material presente na banda 6.

O eletroferograma da Figura 7 foi obtido utilizando-se gel de poliacrilamida 10%. Além da fração F_1 , foram aplicadas à placa de poliacrilamida proteínas marcadoras de peso molecular. Baseando-se na migração desses marcadores, pode-se estabelecer os pesos moleculares dos polipeptídeos presentes nas bandas numeradas na Figura 7, que são apresentados na Tabela IX. No eletroferograma da Figura 7, observa-se a ocorrência de apenas quatro bandas com polipeptídeos de peso molecular maior que o da banda 1 ($8,8 \times 10^4$), sendo que a maioria dos polipeptídeos observados tem peso molecular menor que esse.

Figura 6 - Eletroforese em placa fina de poliacrilamida de polipeptídeos de preparações de microvilosidades dos cecos gástricos. Corrida em gel 7,5% em acrilamida P_2 , F_1 , F_2 , F_3 , F_4 e F_5 como na Tabela VIII. As amostras aplicadas não contém a mesma massa de proteínas.

Figura 7 - Eletroforese de polipeptídeos de preparação de membrana dos cecos gástricos e de marcadores de peso molecular em acrilamida 10%. OA, ovoalbumina; PQ, piruvato quinase de músculo; SA, soroalbumina bovina e L, Lipoxigenase de soja. F₁, como na Tabela VIII.

Tabela IX - Pesos moleculares das principais cadeias polipeptídicas presentes na membrana dos cecos de R. americana.

Banda ¹	Peso Molecular ² x 10 ⁻⁴
1	8,8
2	8,3
3	6,7
4	6,2
5	5,6
6	4,9
7	4,5

1. Os números correspondem às bandas indicadas na figura 6.
2. Determinado como descrito em Material e Métodos.

3.6 Maltase e aril- α -glicosidase nas células dos cecos de R. americana

Resultados obtidos por fracionamento celular comentados no ítem 3.2 sugeriram que a maltase poderia ter pelo menos uma forma molecular solúvel, porém contida em partículas que se sedimentam preferencialmente em frações pós-nucleares. A fim de se testar essa suposição foi realizado o experimento descrito no ítem 2.7, cujos resultados são apresentados na Figura 8 e Tabela X.

Os dados indicam que a maltase distribui-se nas frações particuladas de forma análoga à fosfatase alcalina, confirmando a ocorrência de uma maltase ligada à membrana plasmática. Os dados mostram também que a elevada quantidade de maltase nas frações particuladas pós-nucleares obtidas após homogeneização branda, em comparação com a fosfatase alcalina, é devido a uma maltase solúvel liberada das partículas por congelamento e descongelamento. Como a maior atividade específica da maltase solúvel presente em partículas ocorre na fração P_3 , é razoável supor que ela seja lisossômica. Isto porque os lisossomos de numerosos organismos se sedimentam em condições semelhantes à partículas de P_3 e são sensíveis a homogeneização vigorosa e a ciclos de congelamento e descongelamento (PITT, 1975). Baseando-se no exposto, é razoável supor que a atividade presente no sobrenadante final de centrifugação diferencial após homogeneização vigorosa, mas que está ausente no sobrenadante final de centrifugação após homogeneização branda, seja atividade lisossômica solúvel.

Figura 8 - Distribuição de atividades enzimáticas nas porções solúveis e particuladas das frações subcelulares dos céops gástricos de *R. americana*. Homogeneização feita em homogeneizador tipo Dounce, em KCl 0,1M-EDTA 5mM, pH 7,0. Após fracionamento celular (ver item 2.4) as frações foram rehomogeneizadas, subretidas à congelamentos sucessivos e recentrifugadas à 100.000 x g, 1h. Os sobrenadantes e sedimentos correspondentes a cada fração foram ensaiados. Áreas claras correspondem aos sobrenadantes e as áreas hachuradas, aos sedimentos dessa centrifugação. Apresentação dos resultados como na Figura 2.

Tabela X - Distribuição de atividades enzimáticas nas porções solúveis (s) e particuladas (p) das frações subcelulares dos cecos gástricos de R. americana¹.

fração	Maltase		Fosfatase alcalina		
	$\frac{\text{mU}}{\text{mg}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{animal}}$	mU (% soma)	$\frac{\text{mU}}{\text{animal}} \times 10^{-3}$	mU (% soma)
H	48,8	2,81	-	427	-
P _{1s}	69,5	0,249	13,7	6,19	2,2
P _{1p}	40,4	0,572	31,5	167	60,8
P _{2s}	102	0,187	10,3	2,71	1,0
P _{2p}	42,3	0,210	11,6	52,6	19,2
P _{3s}	210	0,324	17,9	0,0358	0,01
P _{3p}	52,2	0,146	8,0	31,5	11,5
P _{4s}	86,8	0,0389	2,1	0,128	0,05
P _{4p}	20,5	0,0313	1,7	8,42	3,1
S	2,14	0,0558	3,1	5,99	2,2

1. Homogeneizado preparado em KCl 0,10M-EDTA 5mM, pH 7,0, utilizando homogeneizador tipo Dounce, foi submetido às centrifugações indicadas no item 2.4. A seguir as frações obtidas foram reomogeneiza-
das, submetidas a ciclos sucessivos de congelamento e recentrifugadas a 100.000 x g por 1h. Desse
modo, cada fração subcelular foi subdividida em uma porção solúvel (s) e uma particulada (p).

A Figura 9 mostra que existem duas atividades sobre maltose na membrana plasmática. A principal delas (cerca de 90% da atividade maltásica total) possui um pH ótimo de 6,6 e é bastante termolábil, enquanto que a outra (cerca de 10% do total) apresenta um pH ótimo de 6,1 e é mais termoestável. A atividade sobre NPαGli possui um pH ótimo de 6,6, e, após 30 min a 40°C sofre cerca de 94% de inativação (Figura 10). A atividade remanescente apresenta o mesmo pH ótimo de 6,6 (Figura 10). Esses resultados sugerem que na membrana plasmática a principal maltase é uma α-glicosidase termolábil, com pH ótimo igual a 6,6, enquanto que a maltase minoritária parece não ter atividade sobre NPαGli.

As atividades solúveis sobre maltose e NPαGli, que devem ser lisossômicas (ver acima) parecem corresponder à mesma enzima cujo pH ótimo é 6,2 (Figura 11). O fato de ambas atividades decrescerem cerca de 40% após incubação a 40°C por 30 min (Resultados não apresentados) fortalece a hipótese de que correspondem à mesma enzima.

3.7 Fosfatase ácida nas células dos cecos de R. americana

Resultados obtidos no fracionamento celular (Figura 3) e em preparações de microvilosidades (Figura 5) não foram suficientes para determinar a localização da fosfatase ácida nos cecos de R. americana. Como os resultados sugeriam uma associação da fosfatase ácida com estruturas grandes, essa enzima foi ensaiada em sub-frações obtidas a partir da fra

Figura 9 - Efeito do pH na atividade de maltase ligada à membrana plasmática das células dos cecos gástricos de *R. americana* (○) ensaio a 30°C após pré-incubação da enzima por 30 min à 40°C; (●) ensaio à 30°C sem pré-incubação. Fonte de enzimas: fração P₂ preparada segundo SCHMITZ et al (1973).

Figura 10 - Efeito do pH na atividade de aril- α -glicosidase ligada à membrana das células dos cecos gástricos de *R. americana*. (O) ensaio a 30°C após pré-incubação da enzima por 30 min à 40°C; (●) ensaio à 30°C sem pré-incubação. Fonte de enzimas: vide Figura 9.

Figura 11 - Efeito pH na atividade de maltase (●) e aril- α -glicosidase (○) solúveis nas células dos cecos gástricos de R. americana. Os ensaios foram realizados à 30°C. Fonte das enzimas: fração solúvel (sobrenadante, 100.000 x g, 1h) de homogeneizado preparado em condições vigorosas.

ção P_1 preparada após homogeneização em condições brandas.

Para isso aplicou-se uma amostra da fração P_1 sobre duas camadas de Ficoll (ver item 2.8). Após centrifugação observou-se a presença de material nas duas interfases de líquido (água-Ficoll e Ficoll-Ficoll) e no fundo do tubo de gradiente. Essas três frações apresentavam aspectos diferentes quando observadas ao microscópio com contraste de fase. Na interface água-Ficoll, encontrou-se somente material agregado sem estrutura definida. A interface Ficoll-Ficoll apresentava várias vesículas de membrana plasmática com microvilosidades, além de certa quantidade de material agregado, enquanto que a fração presente no fundo do tubo continha grande número de núcleos e raras vesículas de membrana plasmática. A distribuição de fosfatase ácida e celobiase nessas frações foi praticamente a mesma (Tabela XI), embora a recuperação de fosfatase ácida (61,3% de P_1) tenha sido bem inferior aquela de celobiase (104% de P_1). É interessante ressaltar que praticamente toda a atividade de celobiase é recuperada na fração em que se observa, por microscopia, grande número de vesículas de membrana plasmática com microvilosidades.

Ainda dentro do enfoque de se estudar a distribuição de fosfatase associada a estruturas grandes, uma amostra de fração P_1 obtida de homogeneizado preparado em condições brandas foi submetida à homogeneização vigorosa seguida de centrifugação à 100 000xg por 1h. Atividade de fosfatase ácida e alcalina foi determinada no sobrenadante e sedimento dessa centrifugação (Tabela XII). O sobrenadante apresentava 27,3% da atividade total de fosfatase ácida, com atividade específi

Tabela XI - Distribuição de celobiase e fosfatase ácida durante purificação de núcleos das células dos cecos gástricos de R. ameri - cana¹.

Fração	Celobiase			Fosfatase ácida		
	$\frac{\text{mU}}{\text{mg}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{animal}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{soma}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{mg}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{animal}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{soma}}$
H	64,4	7,29	-	25,9	2,94	-
P ₁	94,0	3,06	-	58,7	1,91	-
I ₁	<11,3	<0,005	-	19,3	0,00791	0,7
I ₂	140	3,16	99,0	51,3	1,15	98,2
N	23,0	0,0314	1,0	9,41	0,0128	1,1
						0,7

1. H, homogeneizado em KCl 0,10M-EDTA.5mM, pH 7,0, com homogeneizador tipo Dounce. P₁ sedimento 600 x g, 10 min. I₁, I₂ e N, material particulado recolhido após aplicar-se P₁ a um gradiente descontinuo de Ficoll. I₁, material presente na interfase água-Ficoll; I₂, interfase Ficoll-Ficoll; N, material do fundo do tubo de gradiente. Maiores detalhes em Material e Métodos.

Tabela XII - Efeito de homogeneização vigorosa de fração P₁ obtida em condições brandas, sobre a atividade de fosfatases¹.

Fração	Fosfatase alcalina			Fosfatase ácida		
	$\frac{\text{mU}}{\text{mg}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{animal}}$	mU (% P _{1p} + P _{1s})	$\frac{\text{mU}}{\text{mg}}$	$\frac{\text{mU}}{\text{animal}}$	mU (% P _{1p} + P _{1s})
H	13,0	2,39	-	12,4	2,28	-
P _{1p}	23,8	0,799	98,3	19,0	0,640	72,6
P _{1s}	2,17	0,0140	1,7	37,6	0,242	27,4
P _{1p} + P _{1s}	20,3	0,813	100	22,0	0,882	100

1. Sedimento 600 x g 10 min (P₁) de homogeneizado preparado em Dounce em meio sem EDTA foi reomogeneizado vigorosamente durante 20 s e centrifugado à 100.000 x g, 1h. Atividade de fosfatases foram ensaiadas no sedimento (p) e sobrenadante (s) dessa centrifugação.

ca maior que a de P_1 . Por outro lado, somente 1,7% da atividade de fosfatase alcalina está presente nesta fração, com atividade específica cerca de 10 vezes menor que aquela em P_1 .

4. DISCUSSÃO

4.1 Cadeias polipeptídicas das microvilosidades dos cecos gástricos

As frações de membrana obtidas a partir de preparações de microvilosidades submetidas a tratamento hiperosmótico e separadas em gradiente de glicerol dispõem-se ali em função da constante de sedimentação. Assim, é provável que as distintas frações apresentem contaminantes em relações quantitativas diferentes entre si, o que tornaria característico o padrão polipeptídico de cada fração. Talvez isso possa explicar as diferenças notadas quanto à proeminência das bandas 3 e 7 nos diferentes eletroferogramas (Figura 6). Outra possibilidade, que não pode ser desconsiderada até o presente momento, é a de que as diferentes frações corresponderem a diferentes regiões da membrana plasmática tais como membrana basal, região apical, mediana ou basal das microvilosidades, etc...

As diferenças observadas em relação ao polipeptídeo da banda 6, entretanto, parece ter um significado maior. Este polipeptídeo, cujo peso molecular é 49000 (Tabela IX), está presente em P_2 , enriquecido em F_5 e quase ausente nas demais frações.

Nesse sentido é interessante recordar (Ítem 1.1) que os microfilamentos das microvilosidades de enterócitos de vertebrados apresentam actina (peso molecular: 43000-

46000) como componente majoritário (TILNEY & MOOSEKER, 1971; BRETSCHER & WEBER, 1978a; 1978b). Por outro lado, a aplicação de amostras de P_2 obtidas de enterocitos de vertebrados em gradiente de glicerol, após tratamento com Tris hiperosmótico, resulta em membranas de microvilosidades pouco contaminadas por microfilamentos (SCHMITZ et al., 1973).

As observações acima e os resultados de determinações de atividade enzimática nas frações do gradiente de glicerol (ítem 3.4) tornam razoável supor, por um lado, que a banda 6 referida corresponderia à actina e, por outro lado, que as preparações de membrana de microvilosidades dos cecos gástricos de R. americana devem estar razoavelmente livres de microfilamentos, que estariam sendo recuperados principalmente na fração F_5 .

4.2 Distribuição intracelular das hidrolases nas células dos cecos de R. americana

Fosfatase alcalina ocorre, como acontece em grande número de organismos (De PIERRE & KARNOVSKY, 1973), somente na membrana plasmática dos cecos gástricos de R. americana. Essa asserção é baseada nas seguintes evidências: a) a enzima é recuperada majoritariamente, quando os cecos são homogeneizados em condições brandas, na fração onde se vê ao microscópio de fase grande número de bordos em escova (ítem 3.1); b) após homogeneização branda e centrifugação a enzima é encontrada em todas as frações particuladas e está ausente da solúvel (Figura 3); c) homogeneização vigorosa seguida de

centrifugação mostra que a fosfatase é recuperada principalmente em frações particuladas pequenas, mas ainda continua ausente da fração solúvel (Figura 3); d) preparação de microvilosidades com a técnica de SCHMITZ et al. (1973) leva a um grande incremento em sua atividade específica (Figura 5); e) o tratamento de microvilosidades com solução hiperosmótica de Tris seguido de centrifugação em gradiente de densidade e coleta de fração de membrana, leva a outro incremento na atividade específica (Tabela VIII).

Nenhuma das outras enzimas estudadas por nós possui um comportamento idêntico ao da fosfatase alcalina, logo nenhuma delas deve ocorrer somente na membrana plasmática. Existe, entretanto, uma classe de enzimas representada pela celobiase que pode ser considerada como ocorrendo majoritariamente na membrana plasmática. A celobiase difere do comportamento da fosfatase alcalina somente no item c, porque uma pequena porção de sua atividade é recuperada na fração solúvel nessas condições (Figura 3). As enzimas aril- α -glicosidase (provavelmente α -glicosidase inespecífica), aril- β -glicosidase (provavelmente β -glicosidase inespecífica), aril- α -galactosidase (provavelmente α -galactosidase inespecífica), aril- β -galactosidase (provavelmente β -galactosidase inespecífica) não foram ensaiadas nas condições do item e comentado acima. Entretanto como o comportamento dessas enzimas é similar ao da celobiase elas podem ser consideradas como ocorrendo majoritariamente na membrana plasmática. Abaixo comentaremos que essas enzimas devem ocorrer em pequenas quantidades nos lisossomos.

Maltase ocorre na membrana plasmática e nos lisossomos.

somos baseando-se principalmente nos seguintes resultados: a) a homogeneização branda do tecido seguida de centrifugação, isolamento das frações, congelamentos sucessivos dessas frações seguida de nova centrifugação e separação de uma fração particulada e uma solúvel para cada fração mostra que maltase encontra-se em todas as frações particuladas (principalmente nas maiores), na fração solúvel de partículas pequenas e está ausente no citossol (Figura 8); b) homogeneização vigorosa leva a enzima a ser recuperada após centrifugação em frações particuladas pequenas e na fração solúvel (Figura 3); c) preparação de microvilosidades com a técnica de SCHMITZ et al. (1973) leva a um grande incremento de sua atividade específica (Figura 5). As maltases de membrana e as lisossômicas foram estudadas quanto a sua estabilidade térmica e seu comportamento em relação ao pH. Os resultados (Ítem 3.6) mostraram que devem existir pelo menos duas maltases na membrana plasmática, a principal delas seria uma α -glicosidade geral termolábil, enquanto que haveria apenas uma maltase nos lisossomos com atividade de α -glicosidade geral.

Os resultados comentados acima em relação às maltases mostram que uma homogeneização vigorosa é capaz de deslocar para a fração solúvel a maltase lisossômica. Assim, é razoável admitir que todas as enzimas que são encontradas em concentrações desprezíveis na fração solúvel quando condições brandas de homogeneização são empregadas, mas que aparecem ali significativamente no caso de se usar homogeneização vigorosa sejam lisossômicas. Se isto for verdade as carboidrases que ocorrem majoritariamente na membrana plasmática discutidas a

cima devem possuir isoenzimas em lisossomos. Entretanto, as suas atividades (com exceção da maltase) são muito pequenas em relação às ligadas à membrana para terem algum significado no processo de digestão. É mais provável que as hidrolases referidas participem dos processos de renovação das organelas celulares mediados por lisossomos, como proposto para a maioria dos organismos (PITT, 1975). Neste sentido é interessante considerar o fato de que os cecos armazenam consideráveis quantidades de glicogênio (TERRA et al., 1975) que poderiam ser envolvidos pelos lisossomos no processo comentado acima, justificando a ocorrência de elevada atividade de α -glicosidase nessas organelas.

Carboxipeptidase, aminopeptidase e dipeptidase parecem ocorrer ligadas à membrana plasmática e dispersas no citossol. Essa proposição é baseada nos seguintes resultados: a) as enzimas são recuperadas em todas as frações particuladas e na fração solúvel após homogeneização branda seguida de centrifugação (Figura 4); b) após homogeneização vigorosa as enzimas são encontradas principalmente nas frações particuladas pequenas e na fração solúvel (Figura 4); c) a preparação de microvilosidades seguindo a técnica de SCHMITZ et al. (1973) leva a um aumento na atividade específica das enzimas (Figura 5). Como carboxipeptidase ligada a membrana parece ser rara no mundo animal (cf. BARNARD, 1973; AURICCHIO et al., 1978), esta foi ensaiada nas preparações de membrana obtidas após tratamento hiperosmótico de microvilosidades. Os resultados mostraram que existe realmente uma carboxipeptidase ligada à membrana plasmática das células dos cecos de R. americana (Tabe-

la VIII).

Fosfatase ácida parece ocorrer no citossol e associada a estruturas grandes (Figura 3). Entretanto, a ausência de fosfatase ácida nos núcleos foi assegurada ensaiando-se núcleos purificados (Tabela XI), e ocorrência de fosfatase ácida ligada à membrana plasmática é improvável, uma vez que sua distribuição entre frações subcelulares não muda após homogeneização vigorosa (Figura 3), nem sua atividade específica aumenta na fração de microvilosidades (Tabela VII).

Os dados sugerem que fosfatase ácida é uma enzima solúvel ocorrendo principalmente no citoplasma adjacente à membrana plasmática, uma vez que fragmentos menores de membrana, que deveriam possuir menos contaminantes citoplasmáticos do que os maiores, possuem atividades específicas para fosfatase ácida menores (Figura 3). Esta hipótese é também apoiada pelo fato de que a homogeneização vigorosa de bordos em escova preparados em condições brandas liberam uma fosfatase ácida solúvel com atividade específica 1,7 vezes maior que a preparação inicial (Tabela XII).

Embora não tenhamos até o presente nenhuma evidência a respeito de qual seria a função da fosfatase ácida dos cecos gástricos de R. americana, algumas especulações podem ser feitas. Conforme foi comentado anteriormente (Ítem 1.1), as microvilosidades de enterocitos de vertebrados possuem, na trama terminal, moléculas de miosina que apresentam atividade ATPásica e que são envolvidas no processo de contração das microvilosidades. Considerando o fato de que a trama ter-

minal localiza-se no citoplasma adjacente à membrana plasmática e que a fosfatase ácida deve estar situada também nesta região, é uma hipótese atraente considerar que a fosfatase ácida seria uma atividade da miosina dos cecos gástricos de R. americana.

Afim de facilitar a discussão subsequente, os sítios de ocorrência majoritária das enzimas provavelmente envolvidas na digestão intermediária e/ou terminal presentes nos cecos gástricos de R. americana foram tabelados (Tabela XIII).

4.3 Digestão intermediária e final em mamíferos e em R. americana

Os dados existentes sobre a digestão intermediária e final em insetos são muito incompletos (ver ítem 1.3), não permitindo uma ampla discussão comparativa com os nossos resultados. Devido a isso, nossa discussão será feita em relação aos conhecimentos existentes sobre a digestão em mamíferos.

A digestão terminal nos mamíferos ocorre (conforme revisto no ítem 1.1) nas microvilosidades dos enterocitos sob ação de enzimas ligadas à membrana plasmática das microvilosidades. Essas microvilosidades possuem em seu interior microfilamentos de actina que se ligam à moléculas de miosina na trama terminal. Esse arranjo permite que as microvilosidades sofram contrações dependentes de Ca^{++} e ATP de forma a movimentar a sua vizinhança, tornando assim mais eficiente a

ação de enzimas presentes na superfície das microvilosidades. É interessante notar também que as enzimas envolvidas na digestão intermediária podem frequentemente estar adsorvidas no glicocálix abundante que é encontrado na superfície das microvilosidades (BARNARD, 1973). Isso aumenta a eficiência digestiva do sistema, pois o produto das enzimas adsorvidas será o substrato das ligadas à membrana.

Os dados existentes sobre a ultraestrutura das microvilosidades em insetos são poucos, mas indicativos de que elas não devam ser muito diferentes das observadas nos enterócitos, com exceção do fato de que são muito mais longas (SMITH, 1968). A existência de um glicocálix nas microvilosidades das células de insetos, está bem demonstrada (SMITH, 1968). No caso particular dos cecos gástricos de R. americana isso foi verificado ao nível de microscopia ótica (MARQUES, 1976), o que torna razoável supor que enzimas luminais estejam adsorvidas em sua superfície luminal. Os resultados obtidos com a purificação das membranas plasmáticas das microvilosidades das células dos cecos de R. americana, são indicativos, tanto da obtenção de membranas de boa qualidade, quanto da ocorrência de microfilamentos de actina no interior das microvilosidades (item 4.1). Esses resultados, aliados ao fato de ter sido encontrada uma fosfatase ácida na região da trama terminal das células do ceco, discutida no item anterior, permite-nos especular que as microvilosidades das células dos cecos de R. americana sejam capazes de se movimentar.

A Tabela XIII apresenta a distribuição intestinal

de enzimas envolvidas na digestão intermediária e final em mamíferos e em R. americana. A partir da Tabela XIII podem ser feitas algumas observações sobre o processo digestivo nesses dois tipos de organismo.

A digestão luminal de oligopeptídeos em mamíferos é feita pelas carboxipeptidases, enquanto que em R. americana as aminopeptidases são mais importantes; embora não esteja afastada a possibilidade de uma participação secundária das carboxipeptidases.

A digestão terminal de peptídeos em mamíferos ocorre ao nível da membrana plasmática e também no citossol do enterócito sob ação de aminopeptidases de especificidades diferentes. Nas células dos cecos gástricos de R. americana as evidências sugerem que os peptídeos são hidrolisados na membrana plasmática e no citossol por aminopeptidases e carboxipeptidases. Da mesma forma que na digestão luminal, as aminopeptidases celulares de R. americana são mais ativas que as carboxipeptidases celulares, pelo menos em relação aos substratos usados.

Os dipeptídeos são hidrolisados tanto em mamíferos quanto em R. americana no citossol das células intestinais, embora nesse último organismo parte da digestão possa ocorrer também ao nível da membrana plasmática.

A maioria dos dissacarídeos são hidrolisados em mamíferos e em R. americana ao nível da membrana plasmática das células intestinais. A exceção mais notável é a da trealose, cuja enzima hidrolítica, trealase, localiza-se na membra-

Tabela XIII - Distribuição intestinal de enzimas envolvidas na digestão intermediária e final em mamíferos e R. americana. Somente os sítios de ocorrência majoritária são considerados.

Enzimas	<u>Sítios de ocorrência</u>	
	Mamíferos	<u>R. americana</u>
Carboxipeptidase	lúmen (1)	citossol, membrana plasmática, (lúmen?)
Aminopectidase ativa sobre: oligopeptídeos di e tripeptídeos	membrana plasmática (2) citossol (2)	membrana plasmática, lúmen e citossol
Dipeptidase	citossol (3)	citossol e membrana plasmática
α -glicosidase	Várias enzimas com especificidades diferentes. Todas ligadas a membrana plasmática (1)	Enzimas com especificidades diferentes: membrana plasmática e lisossomos
Aril- β -glicosidase	membrana plasmática (4)	membrana plasmática
Celobiase	é a própria lactase (4)	membrana plasmática
α -galactosidase inespecífica	Sem dados seguros	membrana plasmática
β -galactosidase inespecífica	lisossomo (1)	membrana plasmática
Lactase	membrana plasmática (1)	Sem dados
Trealase	membrana plasmática (1)	lúmen, citossol

1. BARNARD (1973)
2. KIM et al (1974)
3. PETERS (1970)
4. MALATHI & CRANE (1969)

na plasmática dos enterocitos de mamíferos, enquanto que em R. americana é encontrada principalmente no lúmen do tubo digestivo e em pequena quantidade no citossol das células intestinais.

As α -glicosidases intestinais de mamíferos são todas ligadas à membrana. Elas compreendem uma glicoamilase, enzima que remove sequencialmente resíduos de glicose da extremidade não redutora de oligomaltodextrinas, e várias maltases que diferem entre si pela especificidade frente a α -glicosídeos diferentes de maltose como sacarose e isomaltose (BARNARD, 1973). Em R. americana, as α -glicosidases importantes do ponto de vista quantitativo são também ligadas à membrana plasmática. Os resultados sugerem que uma das α -glicosidases seria uma α -glicosidase geral, capaz talvez de hidrolisar oligomaltodextrinas, enquanto que a outra seria uma maltase.

A celobiase dos mamíferos é a própria lactase que é ligada à membrana plasmática de enterocitos e que se distingue da β -galactosidase inespecífica lisossômica. Os resultados obtidos em R. americana mostram que lactase é uma enzima pouco ativa (TERRA et al., 1979), enquanto que celobiase, aril- β -glicosidase e aril- β -galactosidase são muito ativas. Esses resultados não suportam a hipótese de que a lactase de R. americana tenha a mesma especificidade que em mamíferos, isto é, ser capaz de clivar celobiose.

Os resultados são, entretanto, insuficientes para se decidir qual seria o número de enzimas responsáveis pela hidrólise de β -glicosídeos e β -galactosídeos embora haja evidên-

cias que as referidas enzimas estejam todas localizadas na membrana plasmática.

Os dados discutidos acima mostram que existem muitas semelhanças entre mamíferos e R. americana em relação à digestão terminal. As diferenças principais existentes restringem-se a trealase e aminopeptidases que são secretadas em R. americana, enquanto que em mamíferos são ligadas à membrana, e as carboxipeptidases que são restritas às células em R. americana e que são secretadas nos mamíferos.

5. RESUMO

Um enfoque analítico, envolvendo centrifugação diferencial de homogeneizados de cecos gástricos de Rhynchosciara americana preparados em condições brandas e vigorosas, suporta a asserção de que existe uma classe principal de aril- α - e β -glicosidases, aril- α - e β -galactosidases e celobiasas que é ligada à membrana plasmática, e duas classes de maltases, aminopeptidases, carboxipeptidases e dipeptidases. Maltases ocorrem na membrana plasmática e no interior de lisossomos na forma solúvel, enquanto que as peptidases (amino-carboxi- e dipeptidase) são encontradas na membrana plasmática e citossol.

A ocorrência das enzimas citadas acima na membrana plasmática das células cecais, foi confirmada por resultados obtidos em preparações de microvilosidades realizadas com técnica desenvolvida para enterocito de mamíferos.

O tratamento de microvilosidades com solução hiperosmótica de Tris, seguido de centrifugação em gradiente de densidade, permitiu a separação de quatro frações de membrana e de uma fração que contém microvilosidades intactas e, provavelmente, microfilamentos isolados. Eletroferogramas do material recolhido do gradiente mostrou diferenças entre as frações de membrana e sugeriu a ocorrência de actina como componente majoritário dos microfilamentos das microvilosidades. Ensaios enzimáticos nas diferentes frações do gradiente confirmaram a ocorrência de celobiase e carboxipeptidase ligadas à membrana plasmática.

Os resultados de distribuição intracelular de hidrolases nos cecos de R. americana permitiram propor que a digestão terminal de proteínas ocorre na membrana plasmática e no citossol, por ação de amino-, carboxi- e dipeptidases, enquanto que a digestão de carboidratos, com exceção da trealose, ocorre somente na superfície das microvilosidades.

6. ABSTRACT

An analytical approach involving differential centrifugation of Rhynchosciara americana midgut caeca homogenates prepared in mild and in vigorous conditions support the assumption there are one main class of aryl- α - e β -glucosidases, aryl- α - e β -galactosidases and cellobiases, which are plasma membrane bound, and two classes of maltases, aminopeptidases, carboxypeptidases and dipeptidases. Maltases, occur in plasma membrane and in lysosomes (as a soluble enzyme) and the others are found in plasma membrane and cytosol.

A succesful purification of caeca cells brush-borders by techniques used for mammal enterocytes confirmed the assumptions based on differential centrifugation data.

Treatment of purified microvilli with a hyperosmotic solution of Tris, followed by density gradient centrifugation, resulted in the separation of four membrane fractions and one fraction containing intact microvilli and, probably, isolated microfilaments. Electropherograms of the material recovered from the gradient showed differences among the membrane fractions, and they permitted to propose that actin is a major component of microvilli microfilaments. Enzymatic assays in the different fractions from the gradient confirmed the occurence of cellobiase and carboxypeptidase plasma membrana bound.

The results permite to propose that the majority of the terminal digestion of proteins and carbohydrates, with the exception of trehalose, occurs on the surface of the insect midgut caeca cells microvilli.

7. Referências bibliográficas

- Auricchio S., Greco L., De Vizia B & Buonocore V. (1978) Dipeptidylaminopeptidase and Carboxypeptidase activities of the brush border of rabbit small intestine. *Gastroenterology* 75, 1073-1079.
- Barnard E.A. (1973) Digestion. In Comparative Animal Physiology (Ed. by Prosser C.L.). pp 133-139, Saunders, Philadelphia.
- Bretscher A. & Weber K. (1978a) Purification of microvilli and an analysis of the protein components of the microfilament core bundle. *Exp. Cell Res.* 116, 397-407.
- Bretscher A. & Weber K. (1978b) Localization of actin and microfilament-associated proteins in the microvilli and terminal web of the intestinal brush border by immunofluorescence microscopy. *J. Cell Biol.* 79, 839-845.
- Breuer (1969) Revision of the genus Rhynchosciara Rübsaamen (Diptera, Sciaridae) in the neotropical region. *Arch. Zool. S. Paulo* 17, 167-198.
- 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.
- Brunser O. & Luft J.H. (1970) Fine structure of the apex of

absorptive cells from rat small intestine. J. Ultrastruct .
Res. 31, 291-311.

Cajori F.A. (1933) The enzyme activity of dog's intestinal
juice and its relation to intestinal digestion. Am. J. Physiol. 104, 659-668.

Cajori F.A. (1935) The lactase activity of the intestinal mucosa of the dog and some characteristics of intestinal lactase. J. Biol. Chem. 109, 159-168.

Chippendale G.M. (1978) The function of carbohydrates in insect life process. In Biochemistry of Insects (Ed. by Rockestein M.), pp 1-55, Academic Press, New York.

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. and Scheer B.T.) Vol 5, Arthropoda Part A, pp 117-145, Academic Press, New York.

Dahlqvist A. (1968) Assay of intestinal disaccharidases. Anal. Biochem. 22, 99-107.

Douglas A.P., Kerley R. & Isselbacher K.J. (1972) Preparation and characterization of the lateral and basal plasma membrane

- branes of the rat intestinal epithelial cell. Biochem. J. 128, 1329-1338.
- Droste H.J. & Zebe E. (1974) Carbohydrasen und kohlenhydratverdauung im darmtrakt von Locusta migratōria J. Insect Physiol. 20, 1639-1657.
- De Duve C., Pressman B.C., Gianetto R., Wattiaux R. & Appelmans F. (1955) Tissue fractionation studies. 6. Intracellu lar distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. Biochem. J. 60, 604-617.
- Eichholz A. & Crane R.K. (1965) Studies on the organization of brush border in intestinal epithelial cells. I-Tris disruption of isolates hamster brush borders and density gradient separation of fractions. J. Cell Biol. 26, 687-691.
- 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.A.L. & Payne D.W. (1964) Carbohydrases of the alimentary tract of the desert locust, Schistocerca gregāria Forsk. J. Insect Physiol. 10, 657-674.
- 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 migratōria L. Comp. Biochem. Physiol. 20 , 1013-1015.
- 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 mortitans morsitans Westwood (Diptera, glossinidae) Can. J. Zool. 54, 1950-1959.
- Hipps P.P. & Nelson D.R. (1974) Esterases from the midgut and gastric caecum of the American cockroach, Periplaneta americana (L.). Isolation and characterization. Biochim. Biophys. Acta 341, 421-436.
- 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.
- Khan M.A. (1962) The distribution of dipeptidase activity in the digestive system of Locusta migratōria L. and Dysdercus fasciatus. Comp. Biochem. Physiol. 6, 169-170.
- 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.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during

the assembly of the head of bacteriophage T_4 . Nature 227, 680-685.

Lara F.J.S., Tamaki H. & Pavan C. (1965) Laboratory culture of R. angelae. Am. Nat. 99, 189-191.

Law J.H., Dunn P.E. & Kramer K.J. (1977) Insect proteases and peptidases. Adv. Enzymol. 45, 389-425.

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.

Malathi P. & Crane R.K. (1969) Phlorizin hydrolase: a glucosidase of hamster intestinal brush border membrane. Biochim. Biophys. Acta 173, 245-256.

Malathi P., Ramaswamy K., Caspary W.F. & Crane R.K. (1973) Studies on the transport of glucose from disaccharides by hamster small intestine in vitro. I. Evidence for a disaccharidase-related transport system. Biochim. Biophys. Acta 307, 613-626.

Mc Keel D.W. & Jarett L. (1970) Preparation and characterization of a plasma membrane fraction from isolated fat cells. J. Cell. Biol. 44, 417-432.

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.

Martin M.M., Boyd N.D., Gieselmann M.J. & Silver R.G. (1975) Activity of faecal fluid of a leaf-cutting ant toward plant cell wall polysaccharides. J. Insect. Physiol. 21, 1887-1892.

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.

Miller D. & Crane R.K. (1961) The digestive function of the epithelium of the small intestine. II. Localization of disaccharide hydrolysis in the isolated brush border portion of the intestinal epithelial cells. Biochim. Biophys. Acta 52, 293-298.

Mooseker M.S. (1976) Brush border motility. Microvillar contraction in Triton-treated brush borders isolated from intestinal epithelium. J. Cell Biol. 71, 417-433.

Mooseker M.S., Pollard T.D. & Fujiwara K. (1978) Characterization and localization of myosin in the brush border of

- intestinal epithelial cells. J. Cell Biol. 79, 444-453.
- Nonato E. & Pavan C. (1951) A new species of "Rhynchosciara" Rübsaamen, 1894 (Diptera, mycetophilidae). Rev. bras. Biol. 11, 435-437.
- Overton J., Eichholz A. & Crane R.K. (1965) Studies on the organization of brush border in intestinal epithelial Cells. II. Fine structure of fractions of Tris-disrupted hamster brush borders. J. Cell. Biol. 26, 693-706.
- Peters T.J. (1970) The subcellular localization of di- and tripeptide hydrolase activity in guinea-pig small intestine. Biochem. J. 120, 195-203.
- De Pierre F.W. & Karnovsky M.L. (1973) Plasma membranes of mammalian cells. A review of methods of their characterization and isolation. J. Cell. Biol. 56, 275-303.
- Pitt D. (1975) Lysosomes and cell function. Longman, London.
- Ramaswamy, K., Malathi, P., Caspary W.F. & Crane R.K. (1974) Studies on the transport of glucose from disaccharides by hamster small intestine in vitro II. Characteristics of disaccharidase-related transport system. Biochim. Biophys. Acta 345, 39-48.
- Richards A.G. & Richards P.A. (1977) The peritrophic membranes of insects. Ann. Rev. Entomol. 22, 219-240.

- Rosen H. (1957) A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. Arch. Biochem. Biophys. 67, 10-15.
- 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.
- Semenza G. (1968) Intestinal oligosaccharidases and disaccharidases. In Handbook of Physiology (Ed. by Code C.F.) Vol 5, Alimentary Canal Section 6, pp 2543-2566, Amer. Physiol. Soc. Washington.
- Shapiro A.L., Viñuela E. & Maizel J.V. Jr. (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 815-820.
- Smith D.S. (1968) Insect Cells. Their structure and function. Oliver & Boyd Ltd., Edinburgh.
- Storelli C., Vögeli H. & Semenza G. (1972) Reconstitution of a sucrase-mediated sugar transport system in lipid membranes. FEBS Lett. 24, 287-292.
- Studier F.W. (1973) Analysis of bacteriophage T₇ early RNAs and proteins on slab gels. J. Mol. Biol. 79, 237-248.
- 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. & 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. (1978) Physical properties and Tris inhibition of an insect trehalase and a thermodynamic approach of 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. (no prelo).
- Tilney L.G. & Mooseker M. (1971) Actin in the brush border of epithelial cells of the chicken intestine. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2611-2615.
- Ugolev A.M. & De Laey P. (1973) Membrane digestion. A concept of enzymic hydrolysis on cell membranes. Biochim. Biophys. Acta 300, 105-128.
- Wigglesworth V.B. (1929) Digestion in the tsetse fly: a study of structure and function. Parasitology 21, 288-321.

Wigglesworth V.B (1972) The principles of Insect Physiology.
7th ed. Chapman and Hall, London.