

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

11/03/2001
C. G. S.
R. B. B.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Universidade de São Paulo

t: 19.628

A MEMBRANA PERITRÓFICA DE *Spodoptera frugiperda*:
SECREÇÃO DE PERITROFINAS E PAPEL NA IMOBILIZAÇÃO
E NA RECICLAGEM DE ENZIMAS DIGESTIVAS

RENATA BOLOGNESI

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Orientadora: Dra. Clélia Ferreira Terra

São Paulo
8/03/2001

DEDALUS - Acervo - CQ



30100003895

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bolognesi, Renata
B693m A membrana peritrófica de *Spodoptera frugiperda* : secreção de peritrofinas e papel na imobilização e na reciclagem de enzimas digestivas / Renata Bolognesi. -- São Paulo, 2001.
97p.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Terra, Clélia Ferreira

I. Digestão : *Spodoptera frugiperda* : Fisiologia animal 2.
Digestão : Lepidoptera : Fisiologia animal I. T. II. Terra, Clélia Ferreira, orientador.

595.7804132 CDD

**“A Membrana Peritrófica de *Spodoptera frugiperda*:
Secreção de Peritrofinas e Papel na Imobilização e na
Reciclagem de Enzimas Digestivas”.**

RENATA BOLOGNESI

DISSERTAÇÃO DE Mestrado submetida ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Mestre em Ciências - Área: Bioquímica.

Aprovada por:

Profa. Dra. CLÉLIA FERREIRA TERRA
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. ANTONIO GILDO DE BIANCHI
IQ - USP

Profa. Dra. SIRLEI DAFFRE
ICB - USP

08 DE MARÇO DE 2001.

Abreviações utilizadas

BCA-ácido bicinchonínico

BSA-albumina sérica bovina

CAPS-(3[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid)

CHAPS-sulfonato de (3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-1-propano

EDTA-etilenodiaminotetracetato de sódio

EVA-epitélio do ventrículo anterior

EVM-epitélio do ventrículo médio

EVP-epitélio do ventrículo posterior

FTTC-fenilisotiocianato

FPLC-Fast Protein Liquid Chromatography

GPI-glicosil-fosfatidil-inositol

LpNa-L-leucina *p*-nitroanilida

MP-membrana peritrófica

mU-miliUnidades

p/v-peso/volume

PVDF-difluoreto de polivinilideno

P4-precipitado que contém as membranas microvilares

S_{SDS-Mercaptoetanol}-sobrenadante contendo as proteínas da MP extraídas com SDS e β-mercaptoetanol

S_{Chaps}-sobrenadante contendo as proteínas da MP extraídas com Chaps

SDS-Dodecil Sulfato de Sódio

SDS-PAGE-Eletroforese em placa de gel de poliacrilamida em presença de SDS

S_{uréia}-sobrenadante contendo as proteínas da MP extraídas com uréia

Tris-tris(hidroximetil)aminometano

v/v-volume/volume

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Considerações iniciais.....	1
1.2. Anatomia do tubo digestivo dos insetos.....	2
1.3. Estrutura da membrana peritrófica.....	4
1.3.1. Quitina.....	5
1.3.2. Proteínas da membrana peritrófica.....	7
1.4. Funções da membrana peritrófica.....	10
1.5. Secreção de enzimas em insetos.....	13
1.6. Objetivos desse trabalho.....	18
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.1. Material.....	19
2.2. Animais.....	19
2.3. Dissecção das larvas.....	20
2.4. Preparação das membranas microvilares intestinais de <i>S. frugiperda</i>	21
2.5. Preparação de vesículas e fração solúvel do fluido ectoperitrófico de <i>S. frugiperda</i>	23
2.6. Obtenção de frações do conteúdo alimentar e das frações fibrosa e gelatinosa da MP de <i>S. frugiperda</i>	24
2.7. Solubilização das proteínas da MP de <i>Spodoptera frugiperda</i>	24
2.8. Remoção de substâncias de baixo peso molecular.....	27
2.9. Dosagem de proteína.....	27
2.10. Cromatografia em coluna Mono Q das proteínas solubilizadas da MP por uréia.....	28
2.11. Purificação da amilase de <i>Tenebrio molitor</i>	28
2.12. Eletroforese em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	29
2.13. Coloração de proteínas nos géis.....	31
2.14. Transferência de proteína para membrana de PVDF.....	31
2.15. Preparação dos anticorpos contra a peritrofina de 33kDa.....	33
2.16. Preparação do anticorpo contra proteínas da membrana microvilar de <i>S. frugiperda</i>	35
2.17. Preparação do anticorpo anti-amilase de <i>Tenebrio molitor</i>	35

2.18. Western blot e imunoenensaio.....	36
2.19. Microscopia eletrônica de transmissão.....	38
2.20. Microscopia de fluorescência em sistema Confocal.....	40
2.21. Ensaio enzimáticos.....	41
3. RESULTADOS.....	44
3.1. Determinação de proteínas nas preparações solubilizadas da MP.....	44
3.2. Solubilização das proteínas da MP de <i>S. frugiperda</i>	45
3.3. Tentativas de obtenção de uma pequena sequência de aminoácidos da peritrofina de 33kDa.....	47
3.4. Purificação da proteína de 33kDa.....	49
3.5. Especificidade do anticorpo anti-peritrofina.....	51
3.6. Imunocitocalização da peritrofina no intestino médio de <i>S. frugiperda</i>	52
3.7. Visualização de quitina com WGA.....	56
3.8. Imunocitocalização de amilase no intestino médio de <i>S. frugiperda</i>	60
3.9. Especificidade do anticorpo anti-proteínas microvilares do ventrículo anterior de <i>S. frugiperda</i>	64
3.10. Associação de enzimas digestivas com a MP de <i>S. frugiperda</i>	69
3.11. Efeito do calcoflúor na MP de <i>S. frugiperda</i>	71
4. DISCUSSÃO.....	77
4.1. A proteína de 33kDa da MP de <i>S. frugiperda</i>	77
4.2. Mecanismos de secreção de tripsina e amilase na região anterior do intestino médio de <i>S. frugiperda</i>	78
4.3. Secreção de peritrofinas e formação da MP de <i>S. frugiperda</i>	80
4.4. Papel da MP na imobilização de enzimas digestivas.....	82
4.5. Papel da MP na reciclagem de enzimas digestivas.....	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
8. <i>Curriculum Vitae</i>	96

Resumo

Os insetos possuem uma película que reveste o intestino médio (membrana peritrófica, MP), que é composta por quitina e proteínas (peritrofinas). Além de possuir as funções de proteção contra abrasão causada pela comida e contra microrganismos, a MP possui algumas funções específicas que dependem do fato de que essa estrutura compartimentaliza o lúmen do intestino médio em duas regiões denominadas espaço endoperitrófico e espaço ectoperitrófico. As funções específicas da MP são baseadas em evidências indiretas e incluem o impedimento da ligação não específica de comida na superfície celular, o decréscimo na excreção das enzimas digestivas através da sua reciclagem e, em insetos mais evoluídos, o impedimento de oligômero- e dímero-hidrolases de penetrarem no espaço endoperitrófico.

As proteínas da membrana microvilar intestinal e uma peritrofina (proteína da membrana peritrófica) de *Spodoptera frugiperda* foram isoladas e utilizadas para a produção de anticorpos em coelho. Esses anticorpos, juntamente com um anticorpo anti-amilase de *Tenebrio molitor* (que reconhece as amilases de *S. frugiperda*), foram utilizados em estudos de imunocitocalização realizados com a ajuda de anticorpos secundários acoplados a uma proteína fluorescente ou a partículas de ouro coloidal. Os resultados mostraram que a peritrofina de *S. frugiperda* é secretada pelas células colunares da região anterior do intestino médio através de vesículas que se destacam das microvilosidades (secreção microapócrina). As vesículas com dupla membrana (uma da própria vesícula e a outra da microvilosidade) tornam-se vesículas com membrana simples através da fusão entre membranas e, nesse processo, a peritrofina e parte da amilase e tripsina são liberadas. As membranas remanescentes das vesículas, ainda contendo proteínas microvillares, amilase e tripsina ligadas, são incorporadas a um material com consistência de gel que forma parte da MP.

Larvas alimentadas com calcoflúor tiveram a sua MP desestruturada e, em razão disso, perderam o gradiente decrescente antero-posterior de tripsina e quimotripsina observado ao longo do intestino médio das larvas controle. Esse gradiente é presumivelmente formado por um contrafluxo de fluidos (no espaço entre a MP e o epitélio) que permite a reciclagem de enzimas.

Abstract

Insects have a film-like anatomical structure (peritrophic membrane, PM) which lines the midgut. It is composed of chitin and proteins (peritrophins). Besides the functions of protection against food abrasion and microorganisms, PM has specific functions that depend on the fact that this structure compartmentalizes the midgut lumen into an endoperitrophic and an ectoperitrophic space. Knowledge on these specific functions are based only in indirect evidence and include: prevention of non-specific food binding onto cell surface; prevention of enzyme excretion by allowing enzyme recycling and restriction of oligomer hydrolases to ectoperitrophic space.

A peritrophin from *Spodoptera frugiperda* PM, as well as microvillar proteins from *S. frugiperda* anterior midgut, were isolated and used to raise antibodies in a rabbit. These antibodies, a *Tenebrio molitor* anti-amylase antibody that cross-reacts with *S. frugiperda* amylases, and wheat-germ agglutinin were used in immunolocalization experiments performed with the aid of confocal fluorescence and immunogold techniques. The results showed that the peritrophin is secreted by anterior midgut columnar cells in vesicles that pinched-off the microvilli (microapocrine secretion). The resulting double membrane vesicles become single membrane vesicles by membrane fusion, releasing peritrophin and part of the amylase and trypsin. The remaining vesicle membranes (still containing microvillar proteins and membrane-bound amylase and trypsin) are incorporated into a jelly-like material associated with PM. Calcofluor-treated larvae lacking a PM were shown to lose the trypsin and chymotrypsin decreasing gradient observed along the midgut of control larvae. This gradient is thought to be formed by a countercurrent flux of fluid (in the space between PM and midgut cells) that powers enzyme recycling.

*Aos meus pais,
Humberto e Izilda*

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas e instituições que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

À Dra. Clélia Ferreira, pela orientação cuidadosa, pelos conselhos, exemplos, e pela amizade valiosa.

Ao Dr. Walter Ribeiro Terra, pelas discussões, orientação, e por transmitir o entusiasmo pela Bioquímica e pelo magistério.

Ao Dr. Alberto de Freitas Ribeiro, do Instituto de Biociências da USP, pelos dados de microscopia.

Aos amigos do laboratório: Ana Maria Fraga, Adriana Rios Lopes, Alcides Baptista Dias Jr., Alexandre Hamilton Pereira Ferreira, Dra. Beatriz Pacheco Jordão, Carmem Zerbo, Denise Tafarello, Érica Hotz Almeida, Fernando Ariel Genta, Lucas Blanes, Luciana Madeira da Silva, Luiz Alexander, Maria Cícera Pereira da Silva, Marisa Moura Momoli, Masayoshi Takahashi, Dr. Plinio Tadeu Cristofolletti Junior, Dra. Rita Heloísa Yoem, Rosana Regel, Dr. Sandro Roberto Marana e Tamara Rezende de Azevedo, pelas discussões e por tornarem o nosso ambiente de trabalho tão agradável.

À Luiza Nakabayashi, pela amizade e ajuda na dissecação dos insetos, e à Maria Ivanilde Marcelino, pelas conversas e apoio técnico.

Ao Márcio V. Cruz e Waldir Caldeira, do Instituto de Biociências, pelo auxílio técnico nos dados de microscopia.

Ao meu pai, pela confiança, incentivo e conselhos, e à minha mãe, por acreditar que uma menininha de apenas 5 anos, que começava o primeiro ano “primário”, pudesse chegar até aqui! Aos meus queridos irmãos Michaela e Betinho, agradeço pelo orgulho e amizade. Ao Fê, agradeço todo o carinho e paciência.

Às queridas amigas Karina Greco, Edna Borges, Mônica Medeiros, Fabiana Fazzio e Denise Tafarello, pela amizade e ótimas risadas.

À FAPESP, pela bolsa concedida.

Durante a elaboração desse trabalho, o laboratório foi mantido por auxílios concedidos pela FAPESP, PRONEX e CNPq.

1-Introdução

1.1-Considerações iniciais

Os insetos são seres capazes de se adaptar a vários tipos de alimento e a diferentes ambientes. Muitos deles são conhecidos como pragas agrícolas de grande importância (pois competem com os seres humanos pelo mesmo alimento), e outros são conhecidos vetores de doenças animais e vegetais. A aspiração de controlá-los faz com que haja grande necessidade em se estudar aspectos bioquímicos e fisiológicos desta classe de animais.

O controle das pragas agrícolas é feito, na maior parte das vezes, com o uso de agrotóxicos que prejudicam o meio ambiente e que, portanto, não são muito satisfatórios. O conhecimento e aprimoramento de outras estratégias de controle dos insetos, entretanto, estão sendo pesquisados e denotam grande importância nos dias atuais.

Já é sabido que as plantas possuem um sistema de defesa bastante interessante contra insetos que consiste na produção de substâncias químicas capazes de afetar o sistema digestivo dos insetos. Estratégias parecidas vêm sendo utilizadas pelos homens no controle de pragas agrícolas, baseadas em toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Mc Gaughey & Whalon, 1992; Bauer, 1995). Outras técnicas, como por exemplo a introdução de genes heterólogos em plantas alvo dos insetos tornando-as resistentes, estão constantemente sendo desenvolvidas. Tem-se utilizado principalmente genes que codificam inibidores de enzimas digestivas ou lectinas (Jouanin et. al., 1998).

Devido ao fato dos insetos adquirirem resistência a todo tipo de estratégia utilizada para combatê-los, elas devem ser constantemente aprimoradas. Além disso, novas técnicas de controle devem ser desenvolvidas. Uma vez que o tubo digestivo é uma importante área de contato com o meio ambiente, o aprofundamento nos estudos relacionados com a fisiologia e bioquímica do sistema digestivo dos insetos pode levar a um aprimoramento nas técnicas de controle desses organismos.

1.2- Anatomia do tubo digestivo dos insetos

O tubo digestivo dos insetos é dividido em três partes: intestino anterior, médio e posterior. As regiões anterior e posterior são revestidas por quitina e não secretam enzimas nem absorvem os produtos resultantes da ação delas sobre o alimento. O intestino anterior pode realizar parte da digestão, dependendo da ocorrência de um papo. Neste local pode haver enzimas digestivas originadas das glândulas salivares ou do próprio intestino médio. O intestino posterior, por sua vez, tem função de absorção de água e íons, para que as fezes possam ser concentradas e então excretadas. A *figura 1.1* mostra um esquema genérico do tubo digestivo de um inseto.

O intestino médio corresponde à parte responsável pela maior parte da digestão. A absorção de nutrientes e a secreção das enzimas digestivas ocorre neste local do tubo digestivo que, na maioria dos Holometábola (insetos com metamorfose completa), é responsável por toda a digestão do alimento. O intestino médio pode ser formado somente por um cilindro, que pode ter comprimento e diâmetro variável, denominado ventrículo. Além do ventrículo podem estar presentes

no intestino médio cecos gástricos em número, tamanho e localização variável, conforme a espécie.

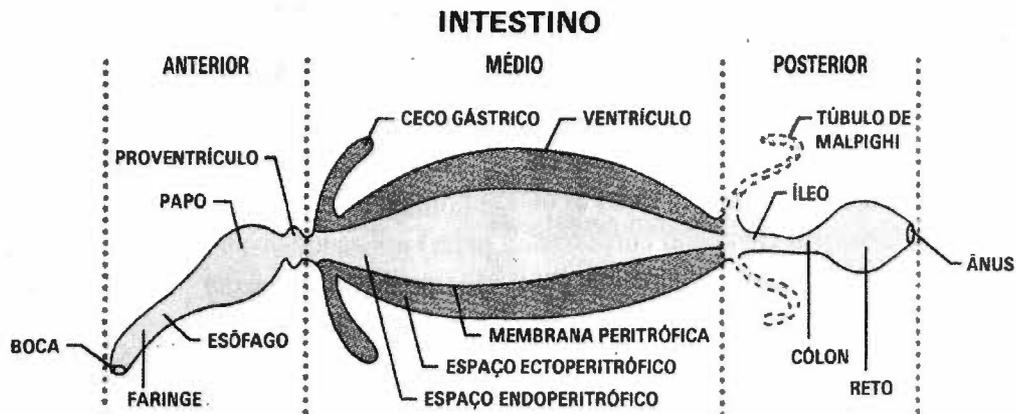


Figura 1.1: Diagrama generalizado do tubo digestivo dos insetos. O intestino anterior e o posterior são revestidos por quitina, o que os torna impermeáveis à maioria das substâncias. O proventrículo é um órgão triturador em alguns insetos e em outros apenas uma válvula que regula a entrada de alimento no intestino médio, principal sítio de digestão e absorção de nutrientes. A membrana peritrófica, permeável a compostos de tamanho molecular médio, é uma estrutura quitino-protéica que envolve o alimento no ventrículo, e os túbulos de Malpighi são órgãos excretores.

No intestino médio da maioria dos insetos, o bolo alimentar é envolvido por uma camada acelular semipermeável composta por quitina e proteínas, denominada membrana peritrófica (MP). A MP delimita o espaço endoperitrófico (onde se encontra o bolo alimentar) e o espaço ectoperitrófico (espaço luminal entre a MP e o epitélio).

Os insetos da ordem Hemiptera não possuem MP. As células do intestino médio desses animais possuem uma segunda membrana celular que reveste as microvilosidades como um dedo de luva e se prolongam para o espaço luminal. São as chamadas membranas perimicrovilares (Ferreira et. al., 1988).

1.3-Estrutura da membrana peritrófica

São conhecidos dois tipos de MP nos insetos. O primeiro tipo (denominado Tipo 1) é sintetizado pelas células do intestino médio em resposta ao alimento e está presente na maioria dos insetos. A MP se forma na superfície apical das células e periodicamente é liberada das microvilosidades, como uma camada. Neste caso, observa-se a formação de ciclos subsequentes de síntese e delaminação da MP (Ryerse et. al., 1994). Este tipo de MP é formado, portanto, por várias lamelas e parece ser secretado por toda a extensão do intestino médio ou por somente uma parte dele (região anterior ou posterior).

O segundo tipo de MP é denominado Tipo 2. Neste caso, a MP é secretada por células especializadas presentes na região anterior do intestino médio (cárdia), e cresce em direção às regiões posteriores, sendo mais resistente que a do Tipo 1 (Terra, 1996). Este tipo de MP está presente em larvas e adultos de mosquitos não hematófagos, em moscas (Diptera) e em alguns adultos da ordem Lepidoptera.

Existe uma estrutura encontrada no intestino médio de alguns Coleoptera (Bruchideos) que sempre foi denominada de MP, apesar de ser obviamente mais frágil. Esta estrutura é encontrada em todo o intestino médio ou somente na sua região anterior. Em certos Orthoptera observa-se a presença dessa estrutura também nos cecos gástricos. Esse material foi recentemente denominado de gel peritrófico e sua ocorrência é detectada quando não se consegue pegá-lo com uma pinça (Terra, 2000). Além de ser fisicamente distinto da MP, o gel peritrófico possui uma permeabilidade muito maior (Terra, 2000).

Conforme comentado anteriormente, a MP é uma estrutura quitino-protéica. Comentaremos agora o que se conhece a respeito desses dois componentes.

1.3.1-Quitina

A presença de quitina na MP foi atestada muitas vezes por métodos de coloração para quitina e por ligação de aglutinina de gérmen de trigo (WGA), uma lectina que se liga especificamente a N-acetilglicosamina, que é o monômero que compõe a quitina. Alguns autores utilizam esta lectina acoplada a ouro coloidal para observar a MP através de microscopia eletrônica (Ryerse et. al., 1994; Ryerse et. al., 1992; Peters & Latka, 1986; Eisemann & Binnington, 1994; Harper & Hopkins; 1997). Tellam et. al. (1998) argumentam que as técnicas utilizadas para a detecção de quitina também detectam proteínas glicosiladas, como é o caso de várias das proteínas componentes da membrana peritrófica (Moskalyk et.al., 1996; Wang & Granados, 1997b). Embora esse comentário seja verdadeiro, é sabido que WGA tem maior afinidade pela quitotriose do que pela N-acetilglicosamina. Desse modo, a ligação de WGA a glicoproteínas é muitas vezes revertida pela adição de N-acetilglicosamina ao meio. Na presença do monossacarídeo, somente a WGA ligada a pelo menos três resíduos contínuos de N-acetilglicosamina tenderá a permanecer ligada (Martin & Kirkham, 1989).

Tellam & Eiseman (2000) acumularam várias evidências que mostraram que a MP da larva de *Lucilia cuprina* (Diptera) possui pouca quantidade de quitina. Tratamentos com calcoflúor (substância que se liga à quitina e desagrega a MP de Lepidoptera, ver a seguir), com polioxina D (inibe a quitina sintase) ou com quitinase não mostraram efeitos perceptíveis na estrutura da MP, embora tenham afetado o crescimento e a viabilidade das larvas. Além disso, eles não detectaram RNA mensageiro para quitina sintase na cárdia, que é a região do intestino que produz a MP do tipo 2, presente nesses animais. Os autores comentam que talvez a quitina sintase da cárdia seja diferente da enzima presente em outros tecidos, e os primers

usados para a reação de PCR talvez não tenham detectado o RNAm da quitina sintase aí presente.

A quitina parece estar presente em maiores quantidades nas membranas peritróficas do tipo 1. Esse tipo de membrana é completamente desagregado por calcoflúor (Wang & Granados, 2000). Além disso, Tellam & Eiseman (2000) descrevem trabalhos da literatura onde houve alterações dessa MP com a utilização de polioxina D e quitinase.

Edwards & Jacobs-Lorena (2000) incubaram membranas peritróficas de larvas e adultos de mosquitos com quitinase. Esses autores mostraram que nas larvas, que têm MP do tipo 2, ela permanece intacta, enquanto que nos adultos, que têm membrana peritrófica do tipo 1, há rompimento dessa estrutura.

Os trabalhos comentados acima indicam que em membranas peritróficas do tipo 2 a quitina está presente em pequenas quantidades, ou o modo como ela interage com as peritrofinas é tal que impede a ação das substâncias testadas, ao contrário do observado nas membranas peritróficas do tipo 1.

Alguns autores tentaram determinar onde a quitina é sintetizada marcando sua distribuição com WGA. Usando esse tipo de marcação, Harper & Hopkins (1997) concluíram que em *Ostrinia nubialis* a membrana peritrófica é sintetizada somente na região anterior do ventrículo, porque somente nesse local é visível uma linha de marcação com WGA, que corresponderia à MP em formação. Em *Trichoplusia ni*, Harper & Granados (1999) mostraram marcação da MP e na superfície das microvilosidades do ventrículo anterior. Em *Heliothis virescens*, a marcação com WGA é vista na MP e em vesículas no interior da célula (Ryerse et al., 1992). Essa marcação dentro das células deve ser atribuída à interação da WGA com glicoproteínas.

1.3.2-Proteínas da MP

As proteínas perfazem um total de 21 a 55% da massa estrutural da MP (Tellam, 1996). Tellam et. al. (1999) foram os primeiros a solubilizarem diferencialmente as proteínas presentes na membrana peritrófica da larva da mosca varejeira *Lucilia cuprina* (Diptera). Segundo eles, as proteínas podem ser subdivididas em 4 classes, de acordo com as características do processo de sua extração. Assim, as proteínas da MP são classificadas em:

Classe 1- Proteínas facilmente extraídas;

Classe 2- Proteínas removidas por detergentes brandos;

Classe 3- Proteínas removidas por agentes denaturantes fortes;

Classe 4- Proteínas restantes na MP após os tratamentos anteriores.

As proteínas pertencentes à classe 1 são extraídas usando-se tampões fisiológicos ou com alta força iônica e correspondem provavelmente a proteínas que foram captadas em trânsito no lúmen intestinal. Este tipo de tratamento não é capaz de solubilizar muitas das proteínas da MP.

As proteínas da classe 2 são as removidas por detergentes anfipáticos do tipo Zwittergent, que atua sobre as interações proteína-proteína, proteína-oligossacarídeo ou proteína-quitina. Este tipo de tratamento também é pouco eficiente na extração das proteínas da MP, sendo que apenas 2% das proteínas de MP de *Lucilia cuprina* são extraídas neste tratamento.

Agentes denaturantes fortes como uréia, guanidina-HCl e SDS (sob condições não redutoras) conseguem solubilizar grande parte das proteínas da MP que restaram após os tratamentos anteriores. As proteínas extraídas assim, são denominadas “peritrofinas”, devido a sua forte interação com a MP.

As proteínas que pertencem à classe 4 correspondem àquelas que não foram extraídas por agentes desnaturantes fortes e que provavelmente estão ligadas covalentemente umas às outras ou a constituintes da MP, como por exemplo à quitina ou a glicosaminoglicanos. Não se sabe ao certo se estas proteínas são diferentes daquelas da classe 3. Em *Lucilia cuprina* elas correspondem a 87% da proteína presente na MP.

Recentemente Wang & Granados (2000), usando membranas peritróficas de *Trichoplusia ni* e calcoflúor (substância que se liga à quitina), extraíram proteínas que não eram removidas da MP por uréia, Chaps ou SDS- β -mercaptoetanol.

Algumas das peritrofinas de insetos já foram clonadas e sequenciadas. Quatro delas são de *Lucilia cuprina* (peritrofina 30, peritrofina 44, peritrofina 55 e peritrofina 95) e duas de *Chrysomya bezziana* (peritrofina 15 e peritrofina 48) (Tellam et.al., 1999). Esses dois insetos possuem MP tipo 2. Outra peritrofina (peritrofina 1) está presente na MP do tipo 2 dos adultos do Diptera *Anopheles Gambiae*, o vetor da malária (Shen & Jacobs-Lorena, 1998), e uma oitava peritrofina clonada foi isolada a partir da MP tipo 1 da larva do Lepidoptera *Trichoplusia ni* (Wang & Granados, 1997a).

Tellam et. al. (1999) sugerem que por encontrarem-se fortemente, mas não covalentemente ligadas à MP, as peritrofinas estariam envolvidas em interações intermoleculares. Elas possuem vários domínios ricos em cisteína, de função ainda não conhecida, mas que poderiam estar propiciando ligações cruzadas entre as peritrofinas ou entre elas e outros constituintes da MP. Além disso, todas as peritrofinas têm em comum o fato de possuírem domínios ligantes de quitina, semelhantes aos que são encontrados em quitinases.

Barry et. al. (1999) clonaram e sequenciaram um gen de *Drosophila melanogaster* que é expresso na traquéia do embrião. A proteína codificada por

esse gen é muito semelhante às peritrofinas. Esse fato levou os autores a proporem que as peritrofinas são membros de uma família de proteínas ligantes de quitina, que possivelmente desempenham papéis mais variados que o proposto inicialmente. De acordo com essa proposição está o fato de ter sido encontrada certa expressão de mucina (uma peritrofina) nos túbulos de Malpighi e nas células da hemolinfa de *Trichoplusia ni* (Wang & Granados, 1997a).

A peritrofina de *Trichoplusia ni* é também chamada de mucina porque apresenta algumas características semelhantes às mucinas de mamíferos, tais como alta concentração de Thr, Ala e Pro, alto grau de glicosilação e resistência à proteólise (Wang e Granados, 1997b). Entretanto, sua sequência de aminoácidos não se assemelha a esse tipo de proteínas presente em vertebrados (Tellam, 1996).

As proteínas da MP já têm sido utilizadas no controle de alguns insetos. East et. al. (1993) vacinaram ovelhas com frações de proteínas extraídas da MP de *Lucilia cuprina* (Diptera) com detergente ou uréia. Essa larva é um tipo de berne muito comum na Austrália, que ataca as ovelhas. As larvas que se alimentaram das ovelhas vacinadas tiveram o seu crescimento significativamente retardado, devido à ligação específica do anticorpo produzido pelas ovelhas com a MP das larvas. Esta ligação foi demonstrada por imunofluorescência, isolando-se e concentrando o anticorpo produzido pelas ovelhas (Tellam & Eisemann, 1998).

Outras substâncias como vicilinas (proteínas presentes em sementes de plantas) e lectinas com domínios ligantes de quitina estão envolvidas em mecanismos de defesa de plantas contra insetos. Sales et. al. (1996) mostraram que a associação de vicilinas com a quitina da MP de *Callosobruchus maculatus* (Bruchideo) é capaz de afetar o desenvolvimento dessas larvas. Os autores propõem que a ligação da proteína com as estruturas quitinosas leva à perturbações

nos processos de digestão e absorção de nutrientes, os quais resultam em diminuição do crescimento e morte das larvas (Firmino et. al., 1996).

Embora se conheça com detalhes certos componentes da MP, o modo como esses componentes interagem e como a MP é montada ainda é desconhecido. Também não se sabe se a quitina é produzida pelas mesmas células que sintetizam as peritrofinas e não se tem conhecimento sobre as propriedades da quitina sintase.

1.4-Funções da MP

As funções da membrana peritrófica podem ser divididas em gerais e específicas (Terra, 2000). As funções gerais são aquelas análogas as do muco que existe no intestino de vários animais e do qual acredita-se que a MP seja derivada. Essas funções compreendem a proteção mecânica (Peters, 1992) e contra microrganismos que possam vir a adentrar o tubo digestivo do inseto (Peters, 1992; Jacobs-Lorena & Oo, 1996; Tellam, 1996; Lehane, 1997).

As funções específicas são aquelas diferentes das do muco e ocorrem devido à compartimentalização da digestão conferida pela MP. Os primeiros estudos sobre compartimentalização da digestão em insetos foram realizados com as larvas do Diptera *Rhynchosciara americana*. Nesse animal foi demonstrado que as enzimas responsáveis pela digestão inicial estavam restritas ao espaço endoperitrófico, as enzimas que realizavam a digestão intermediária estavam presentes no espaço ectoperitrófico e as de digestão terminal eram restritas às células (Terra et. al., 1979). Posteriormente demonstrou-se que as enzimas de digestão terminal estavam localizadas nas membranas microvilares intestinais (Ferreira & Terra, 1980) e as enzimas luminiais eram restritas ao espaço ectoperitrófico ou penetravam no espaço

endoperitrófico, devido ao seu diâmetro (Terra & Ferreira, 1983). Baseados nesses diâmetros, os autores calcularam que os poros da MP desse animal tinham de 7 a 8 μ m de diâmetro (Terra & Ferreira, 1983).

Outras observações importantes foram feitas em *R. americana*. Verificou-se que as enzimas presentes no fluido ectoperitrófico eram excretadas em menor velocidade que as presentes no espaço endoperitrófico. Mais importante ainda foi a observação de que a excreção das enzimas que estavam no espaço endoperitrófico era muito menor do que a esperada levando-se em conta o tempo de tráfego do bolo alimentar (Terra & Ferreira, 1981). Terra & Ferreira (1981) verificaram também que havia, no bolo alimentar, um gradiente antero-posterior decrescente de tripsina, e que esse gradiente era quase totalmente desfeito se uma dieta rica em proteínas era oferecida a essas larvas.

Resumindo todos esses dados mais o fato de que a porção anterior do ventrículo de *R. americana* absorve fluidos e a região posterior secreta fluidos, Ferreira et. al. (1981) postularam um esquema de como ocorreria a digestão nesses organismos. As despolimerases, capazes de passar pela MP e entrar em contato com o alimento, se ligariam aos seus substratos já na região anterior do ventrículo. O complexo enzima-substrato seria muito grande para atravessar os poros da MP e iria sendo levado com o bolo alimentar até que o substrato diminuísse de tamanho e tanto os polímeros quanto as despolimerases pudessem passar pelos poros da MP e ir para o espaço ectoperitrófico. Uma vez que a região posterior do ventrículo secreta água e a região anterior absorve, no espaço ectoperitrófico há um contrafluxo de fluidos (em direção oposta a do fluxo do bolo alimentar). Tanto as enzimas quanto os oligômeros vindos do espaço endoperitrófico seriam levados para a região anterior por esse contrafluxo de fluidos. Na região anterior do ventrículo as despolimerases poderiam novamente entrar no espaço endoperitrófico. Desse modo

as enzimas não seriam excretadas com as fezes nas taxas calculadas levando-se em conta a quantidade de uma determinada enzima presente na região endoperitrófica. O modelo explica também porque há um gradiente antero-posterior de tripsina no espaço endoperitrófico (na região mais anterior as proteínas ainda não foram digeridas e a tripsina fica retida por estar complexada ao seu substrato) e porque esse gradiente é desfeito quando a dieta é muito rica em proteínas (mesmo nas regiões posteriores do ventrículo ainda há proteína não digerida, o que retém a tripsina no espaço endoperitrófico).

O modelo de circulação endo-ectoperitrófica de enzimas foi reforçado quando se verificou que a celulase ingerida na dieta de *Trichosia pubescens* (Diptera com anatomia semelhante à de *R. americana*) era encontrada nos cecos gástricos, que ficam na região anterior do ventrículo (Espinosa-Fuentes et. al., 1984).

Experimentos realizados com *Musca domestica* (outro Diptera) mostraram que uma dieta rica em proteínas não só diminuía o gradiente antero-posterior de tripsina no espaço endoperitrófico, mas também aumentava a eliminação dessa enzima nas fezes. Nesse inseto também foi possível determinar quantitativamente a absorção e secreção de fluidos (Espinosa-Fuentes & Terra, 1987).

Pelo modelo descrito acima, uma das funções óbvias da MP seria economizar enzimas digestivas, que seriam excretadas em menor quantidade. Outra função que deve ser derivada dessa organização descrita pelo modelo de circulação endo-ectoperitrófica de enzimas deve ser uma maior eficiência da digestão. Isso ocorreria pelo fato dos oligômeros serem eficientemente removidos do espaço endoperitrófico pelo contra-fluxo de fluido aí existente (oligômeros podem inibir despolimerases) e por impedir a ligação inespecífica de material não digerido à superfície celular.

Os três insetos que foram utilizados para realizar os experimentos descritos acima e que indicam fortemente a existência da circulação endo-ectoperitrófica de enzimas possuem membrana peritrófica do tipo 2. Esse tipo de MP, aparentemente, possibilita um espaço ectoperitrófico maior do que aquele delimitado pela membrana peritrófica do tipo 1. Embora outros trabalhos indiquem que o mesmo sistema de contrafluxo de fluido e economia de enzimas exista em insetos que possuem MP do tipo 1 (Santos et. al., 1983; Terra et. al., 1985), algumas dúvidas às vezes são levantadas sobre a veracidade do modelo nesses insetos. O argumento utilizado é que o espaço ectoperitrófico em insetos com MP tipo 1 seria muito pequeno para possibilitar a referida circulação.

Além das funções descritas acima, a MP parece também imobilizar enzimas (Terra et. al., 1979). No Lepidoptera *S. frugiperda* 13% da atividade de amilase e 18% da atividades de tripsina presente no tubo digestivo foram detectadas na MP (Ferreira et. al., 1994a).

1.5-Secreção de enzimas em insetos

Existem três tipos de mecanismos de secreção de proteínas: holócrina, apócrina e exocitose. Nas secreções holócrina e apócrina os produtos de secreção permanecem estocados até que toda a célula (holócrina) ou parte dela (apócrina) seja liberada para o espaço extracelular. Já na exocitose, os produtos de secreção são estocados em vesículas que se fundem com a membrana plasmática das células, liberando seu conteúdo.

Graf et. al. (1986) demonstraram que vesículas de secreção contendo tripsina de células intestinais de *Aedes aegypti* são liberadas para o lúmen pela via

exocítica, e Lemos et. al. (1993) verificaram que a lisozima intestinal de *M. domestica* também é secretada por essa via.

A ocorrência de enzimas digestivas em vesículas de secreção (que não necessariamente sofrem exocitose) foi verificada em diferentes ordens de insetos: no Isoptera *C.severus* (Bignell et. al.; 1982), nos Coleoptera *P. aequinoctialis* (Ferreira & Terra; 1989) e *T. molitor* (Ferreira et. al.; 1990), nos Diptera *M. domestica* (Espinosa-Fuentes & Terra, 1987; Jordão & Terra, 1989; Terra & Jordão, 1989 e Lemos & Terra, 1992a) e *S. calcitrans* (Moffatt & Lehane, 1990) e nos Lepidoptera *E. ello* (Santos et. al; 1986) e *S. frugiperda* (Ferreira et. al., 1994a).

A secreção apócrina de enzimas digestivas não parece ser um evento frequente em insetos, mas alguns exemplos da sua ocorrência são descritos a seguir: em *S. calcitrans* a secreção de tripsina, apesar de ocorrer principalmente por exocitose, é feita também via apócrina (Wood & Lehane, 1991; Jordão et. al, 1996a). Jordão et. al. (1996a), através de estudos de imunocitocalização, mostraram que grânulos de secreção imunomarcados foram encontrados no fluido ectoperitrófico, junto com restos celulares.

Na larva de *Tenebrio molitor* a amilase ocorre em poucas células da região anterior do intestino médio, no interior de vesículas originárias do complexo de Golgi, que parecem se fundir antes da sua liberação, através do citoplasma apical (secreção apócrina). A tripsina deste inseto, por outro lado, é observada dentro de pequenas vesículas perto da membrana plasmática apical das células da região posterior do intestino médio, sugerindo um mecanismo exocítico de secreção (Cristofoleti et. al., 2001).

Nos Lepidoptera uma forma alternativa de secreção foi verificada. Em *Spodoptera frugiperda* observou-se que amilase e tripsina são encontradas tanto na forma solúvel como ligadas às membranas das células do ventrículo (Ferreira et. al.,

1994a). Além disso, essas enzimas são detectadas, tanto na forma solúvel quanto na forma particulada, em pequenas vesículas que são encontradas no fluido ectoperitrófico e que se destacam das microvilosidades da região anterior do ventrículo (Ferreira et. al., 1994a; Jordão et. al., 1999). Em *Spodoptera frugiperda* foi possível visualizar por microscopia eletrônica pequenas vesículas de secreção migrando no interior das microvilosidades. Um anticorpo gerado contra a tripsina solúvel de *S. frugiperda* permitiu imunocitocalizar a tripsina ainda ligada à membrana das vesículas (Jordão et. al., 1999).

Os dados comentados acima deram suporte para o mecanismo de secreção proposto, denominado de secreção microapócrina. Nesse tipo de secreção, a amilase e a tripsina estariam inicialmente ligadas à membrana de vesículas presentes no citoplasma celular. Essas vesículas caminhariam até as microvilosidades onde se destacariam lateralmente (saindo uma vesícula com dupla membrana) ou deslocariam-se até o topo das microvilosidades, fundindo-se entre si e com a membrana microvilar. Durante este trajeto parte das enzimas seria solubilizada e parte continuaria presa à membrana da vesícula. No lúmen, as enzimas ainda ligadas à membrana seriam então solubilizadas pelo alto pH reinante (cerca de 9,5) ou poderiam ser incorporadas à MP (Jordão et. al., 1999). A *figura 1.2* mostra um esquema representando a secreção microapócrina em *S. frugiperda*.

A secreção de proteínas estruturais da MP (peritrofinas) foi estudada em dois insetos Lepidoptera e em um Diptera. Ryerse et. al. (1992) produziram um anticorpo contra todas as proteínas da MP de *Heliothis virescens* e utilizaram esse anticorpo para imunocitocalizar as peritrofinas no intestino do inseto. Os autores observaram marcação na própria MP, nas microvilosidades e em vesículas citoplasmáticas.

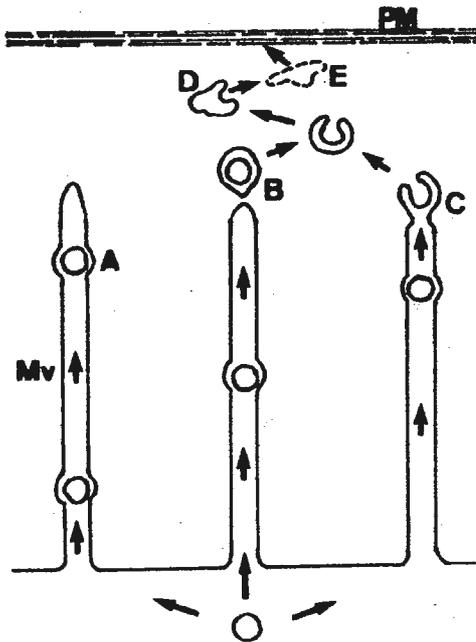


Figura 1.2: Esquema representando a secreção microapócrina nas células colunares da região anterior do intestino médio de *S. frugiperda*. (A) Vesícula de secreção migrando dentro da microvilosidade; (B) Ápice da microvilosidade com uma vesícula se destacando; (C) vesícula de secreção se fundindo com a membrana da microvilosidade, antes de se destacar; (D) vesícula com dupla membrana passando a membrana simples, provavelmente por causa do alto pH no lúmen; (E) a membrana de vesícula remanescente pode ser incorporada na MP (Jordão et. al., 1999).

Harper & Granados (1999) realizaram a imunocitocalização da mucina de *Trichoplusia ni* com um anticorpo produzido contra essa proteína. Os autores dizem que na região anterior do ventrículo há vesículas intracelulares e algumas são extensivamente marcadas. O comentário a respeito dos resultados obtidos para o ventrículo posterior é discutível. Os autores afirmam que a marcação ocorre nas microvilosidades das células colunares adjacentes às células caliciformes e ao redor de toda a microvilosidade. Isto indicaria que a secreção da mucina ocorre através da membrana plasmática microvilar, mas os autores não comentam esse tipo de secreção. A afirmação de que a marcação aparece nas microvilosidades das células colunares adjacentes às células caliciformes é intrigante, uma vez que os próprios autores admitem que a secreção não é feita

pelas células caliciformes. O fato da proteína ser encontrada ao redor das microvilosidades só significa que ela deve estar aderida ao glicocálix celular, como ocorre com enzimas em mamíferos (Ugolev & Tsvetkova, 1986) e insetos (Santos et. al., 1986; Ferreira et. al., 1990; Terra & Ferreira, 1994).

Tellam et. al. (2000) também realizaram marcação de peritrofinas. Eles verificaram, com seu anticorpo anti-peritrofina 95 de *Lucilia cuprina*, que a síntese da proteína neste inseto ocorre somente na região da cárdia, como seria esperado para este inseto, pois possui MP tipo 2. Além disso, os autores verificaram que só há produção do RNAm para a peritrofina 95 nas células da cárdia desse inseto. Essa proteína, embora necessite de condições relativamente drásticas para ser solubilizada da MP, aparece como proteína solúvel e monomérica nos excretas e no regurgitado das larvas. O mesmo acontece quando a proteína é clonada e expressa. Os autores acreditam que a proteína torne-se insolúvel ao interagir com outros componentes da MP, e que a proteína monomérica que aparece solúvel encontra-se nesse estado devido a um excesso da peritrofina 95 que não interagiu com nenhuma outra molécula.

1.6-Objetivos desse trabalho

Nosso objetivo é contribuir para um maior conhecimento sobre a secreção e função da membrana peritrófica (MP) de insetos. Para isso, propusemo-nos a estudar a secreção de peritrofinas no Lepidoptera *Spodoptera frugiperda*, onde a secreção de enzimas digestivas já foi razoavelmente descrita, e verificar se a secreção de peritrofinas ocorre pelo mesmo mecanismo que leva à secreção das enzimas digestivas.

No que se refere à função da MP, pretendemos verificar se a imobilização de enzimas digestivas nessa estrutura ocorre por um aprisionamento casual das enzimas. Além disso, pretendemos testar o papel da MP na manutenção do gradiente antero-posterior de enzimas digestivas no espaço endoperitrófico.

A escolha do Lepidoptera *S. frugiperda* como modelo de estudo deveu-se ao fato dos Lepidoptera apresentarem um modo peculiar de secreção de enzimas digestivas (já estudado em *S. frugiperda*), de possuírem MP tipo 1, que é uma característica importante para o estudo das funções da MP, e por esse inseto possuir bom tamanho e ser de fácil cultivo.

2-Material e Métodos

2.1-Material

A maior parte dos materiais utilizados neste trabalho foram provenientes da Sigma Co. (EUA). Alguns marcadores de peso molecular, reagentes para eletroforeses e membranas de nitrocelulose e PVDF (polyvinylidene difluoride) foram obtidos da Bio-Rad (EUA). Os demais reagentes foram provenientes da Merck ou da mais alta qualidade disponível.

2.2-Animais

As larvas de *Spodoptera frugiperda* foram alimentadas com uma dieta a base de feijão (*Phaseolus vulgaris*), gérmen de trigo, levedura e ágar, segundo Parra (1986). As lagartas foram criadas em tubos de vidro individuais e mantidas em foto regime natural a 25°C. Os adultos foram alimentados com uma solução de mel 10%. Foram utilizadas somente as larvas que estavam no 5º (último) estágio larval e que ainda estavam se alimentando ativamente.

Alternativamente, algumas larvas de *S. frugiperda* foram alimentadas com a mesma dieta, porém acrescida de calcoflúor 1%.

As larvas de *Tenebrio molitor* foram criadas em farelo de trigo a 24-26°C e umidade relativa de 70-75%. Foram utilizadas larvas do último estágio larval, pesando aproximadamente 0,12g e que possuíam o intestino preenchido com alimento.

2.3-Dissecção das larvas

As larvas de *Spodoptera frugiperda* foram imobilizadas em gelo picado por aproximadamente 15 min, antes de serem dissecadas em solução NaCl 125mM gelada, com o auxílio de uma lupa. O tubo digestivo foi então isolado e lavado externamente com salina, com o cuidado de se eliminar os corpos gordurosos, os túbulos de Malpighi e as grandes traquéias. Os intestinos anterior e posterior foram descartados, o intestino médio foi aberto e a membrana peritrófica com o conteúdo alimentar removida. O epitélio ventricular foi a seguir lavado com NaCl 125mM e a salina dessa lavagem foi armazenada a -20°C até o uso. Este procedimento foi realizado para a coleta do fluido ectoperitrófico, que foi posteriormente processado como será descrito no *item 2.5*.

O epitélio do intestino médio foi dividido em três partes de mesmo tamanho denominadas epitélio do ventrículo anterior (ou região anterior do intestino médio), epitélio do ventrículo médio (ou região média do intestino médio) e epitélio do ventrículo posterior (ou região posterior do intestino médio). O epitélio do ventrículo médio foi descartado porque trata-se de uma zona de transição entre o epitélio dos ventrículos anterior e posterior, com características comuns a essas duas partes. O epitélio do ventrículo anterior foi utilizado para obtenção das microvilosidades intestinais de *Spodoptera frugiperda*, cujo procedimento será descrito adiante (*item 2.4*).

A MP com o conteúdo alimentar foi aberta longitudinalmente e o conteúdo removido. A MP foi então lavada ligeiramente em salina para diminuir a contaminação pelo alimento. Lotes com material de 100 animais foram mantidos a -20°C em solução de NaCl 125mM até o uso.

Nos animais que haviam ingerido calcoflúor e nos seus respectivos controles, as disseções foram feitas de maneira diferente. A MP mais o conteúdo alimentar foi dividida em três partes: anterior, média e posterior, e o epitélio foi descartado.

Os lotes de amostras das três regiões da MP foram homogeneizados (separadamente) em água bidestilada com a ajuda de um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem e centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes obtidos após essa centrifugação foram estocados a -20°C até o uso.

As larvas de *Tenebrio molitor* (Coleoptera) foram dissecadas de maneira análoga às de *Spodoptera frugiperda*. A MP junto com o conteúdo (alimento) foi isolada e o epitélio ventricular foi descartado.

2.4-Preparação das membranas microvilares intestinais de *S. frugiperda*

O epitélio do ventrículo anterior das larvas de *Spodoptera frugiperda* foi submetido a precipitação diferencial por Mg^{2+} segundo um protocolo semelhante ao descrito por Schimitz et. al. (1973) e modificado por Capella et. al. (1997). As membranas microvilares do epitélio do ventrículo anterior são isoladas de modo mais rápido e com maior rendimento do que as do epitélio do ventrículo posterior.

O epitélio do ventrículo anterior de 100 animais foi homogeneizado em 4mL de meio de homogeneização contendo Tris-HCl 2mM e manitol 50mM (pH 7,5). A homogeneização foi feita em homogeneizador Omni-Mixer (Sorvall), em dois ciclos de 1 minuto a 8.000 rpm, sempre a baixa temperatura. O intervalo entre um ciclo e outro foi de 1 minuto.

A seguir, o homogeneizado foi filtrado em malha de nylon de 45 μ m e o volume completado para 5 mL com meio de homogeneização. A 1 volume de

homogeneizado foi adicionado 1 volume de $MgCl_2$ 24mM em água. Após a adição de $MgCl_2$, a amostra permaneceu no gelo durante 15 minutos com agitação por inversão, ocasionalmente. A seguir, a preparação foi sequencialmente centrifugada a $3.500 \times g$ por 10 minutos a $4^\circ C$, e a $23.000 \times g$, por 30 minutos a $4^\circ C$. O sedimento ($23.000 \times g$) foi ressuscitado em 2 mL de meio de homogeneização aos quais foram adicionados 2ml de $MgCl_2$ 24mM. A amostra permaneceu novamente no gelo por 15 minutos com agitação ocasional antes de ser submetida às mesmas centrifugações ($3.500 \times g$, 10min seguida de $23.000 \times g$, 30 min), a $4^\circ C$.

A *figura 2.1* mostra um esquema da preparação das microvilosidades intestinais de *Spodoptera frugiperda*. O sedimento contendo as microvilosidades (P4) foi ressuscitado em 1 mL de meio de homogeneização com auxílio de um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem e armazenado a $-20^\circ C$ até o uso.

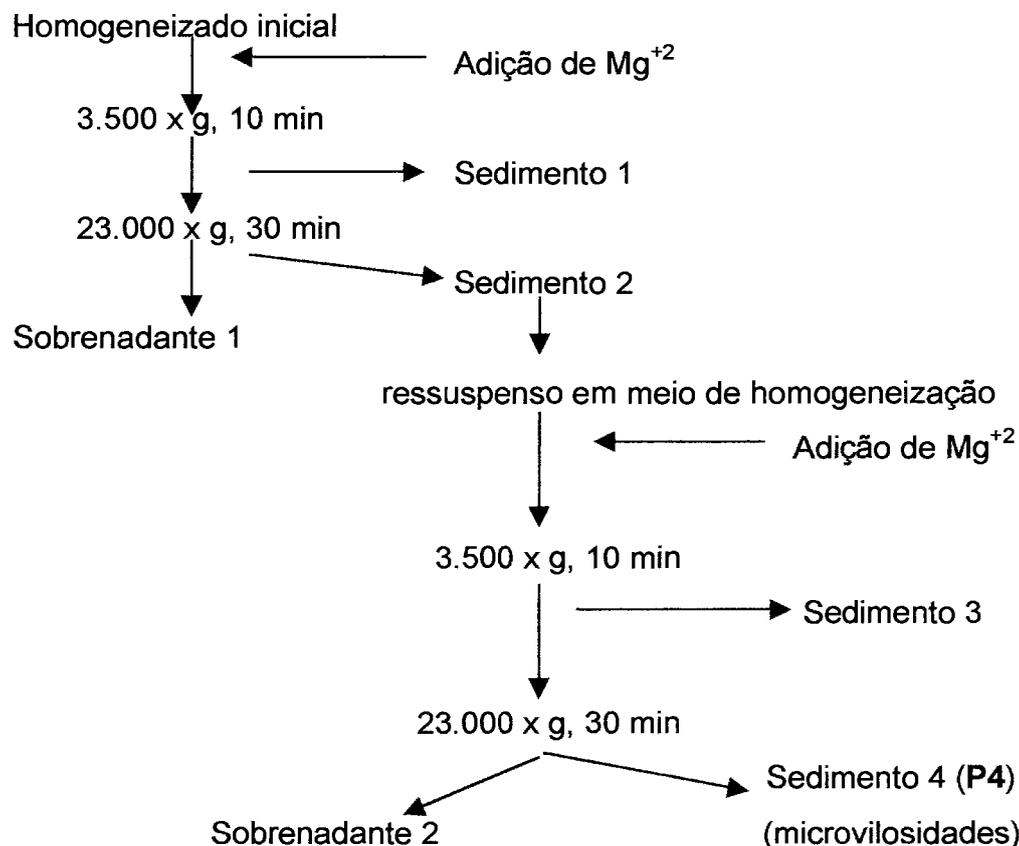


Figura 2.1: Esquema representativo das etapas utilizadas para a preparação das membranas microvilares de *Spodoptera frugiperda*.

2.5-Preparação da fração solúvel e de vesículas do fluido ectoperitrófico de *Spodoptera frugiperda*

As proteínas presentes nas vesículas do fluido ectoperitrófico foram isoladas conforme descrito em Ferreira et al. (1994a).

Na dissecação, o epitélio do intestino médio foi isolado e lavado com NaCl 125mM para a obtenção do fluido ectoperitrófico (contendo as pequenas vesículas), conforme descrito anteriormente. O material correspondente a 100 animais foi congelado a -20°C e após descongelamento foi centrifugado a $600 \times g$ por 10 minutos, a 4°C . O sedimento obtido após a centrifugação foi descartado, uma vez que contém pequenos fragmentos de alimento contaminantes. O sobrenadante foi centrifugado a $25.000 \times g$ por 30 minutos, a 4°C . O sobrenadante obtido após esta segunda centrifugação corresponde à fração solúvel do fluido ectoperitrófico e o sedimento contém as membranas das vesículas do fluido ectoperitrófico. Este último sedimento foi então ressuspensionado em 1mL de NaCl 125 mM. A *figura 2.2* mostra as etapas de centrifugação para obtenção das proteínas do fluido ectoperitrófico.

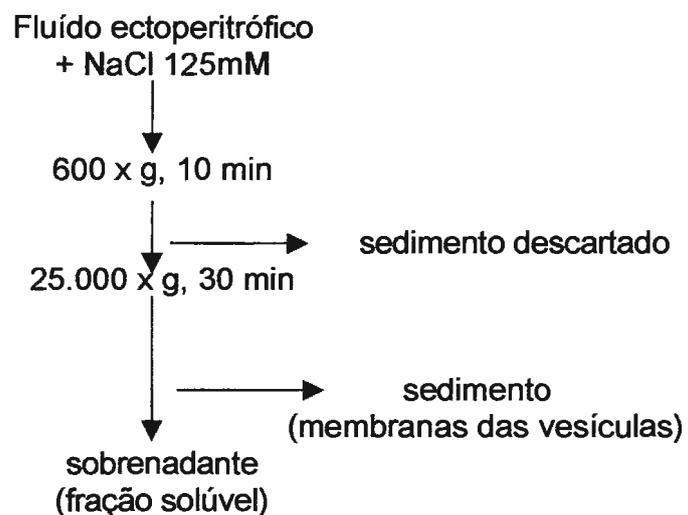


Figura 2.2: Esquema representativo das etapas de centrifugação para obtenção das proteínas do fluido ectoperitrófico de *Spodoptera frugiperda*.

2.6-Obtenção de frações do conteúdo alimentar e das frações fibrosa e gelatinosa da MP de *Spodoptera frugiperda*

A MP de *S. frugiperda* é parcialmente solubilizada se submetida a sucessivas lavagens com salina. Essa fração, que se assemelha a um gel e que é facilmente solubilizada, nós denominamos de fração gelatinosa da MP. A parte remanescente, de aspecto resistente e bastante diferente, foi denominada por nós de fração fibrosa.

Para a obtenção dessas frações da MP, os lotes contendo as membranas peritróficas sem o conteúdo alimentar foram homogeneizados em água bidestilada com a ajuda de um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem e centrifugados a 600 x g por 10 minutos, a 4°C. O sedimento resultante dessa centrifugação foi coletado como a porção fibrosa da MP e o sobrenadante foi centrifugado a 25.000 x g por 30 minutos. Este novo sedimento corresponde ao material particulado da fração gelatinosa e o novo sobrenadante, ao material solúvel dessa mesma fração. Para a determinação de atividades enzimáticas nessas frações foram utilizados quatro lotes de quatro animais cada.

O conteúdo da MP (comida) também foi coletado, homogeneizado com água bidestilada em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem e centrifugado a 600 x g por 10 minutos. O sobrenadante (material solúvel) e o sedimento (material particulado) obtidos após essa centrifugação foram coletados e as enzimas digestivas foram ensaiadas nesses materiais.

2.7-Solubilização das proteínas da MP de *S. frugiperda*

A fração fibrosa da MP obtida como descrito no *item 2.6* e correspondente a 100 animais foi transferida para um homogeneizador de teflon-vidro (Potter-

Elvehjem) e homogeneizada em 1ml de solução de NaCl 215mM, Tris 40mM, pH 7,0 contendo Chaps (65mM), um detergente. O homogeneizado foi então centrifugado novamente a 25.000 x g por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante obtido após esta centrifugação foi denominado **S_{Chaps}** e contém as proteínas da membrana peritrófica de *Spodoptera frugiperda* extraídas com Chaps.

O sedimento obtido após o tratamento com Chaps foi transferido para um novo homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem e novamente homogeneizado, mas desta vez em 1 mL de solução NaCl 215mM, Tris 40mM, pH 7,0, saturada com uréia. Este homogeneizado foi também centrifugado a 25.000 x g por 30 minutos a 4°C, e o sobrenadante obtido após esta centrifugação foi denominado **S_{uréia}**.

O sedimento obtido após a terceira centrifugação foi novamente homogeneizado em Potter-Elvehjem, com 500 µL de uma solução de SDS 2% e β-mercaptoetanol 5% (concentrações finais). A amostra foi então levada em banho de ebulição por 4 minutos. Após esfriar, a preparação foi centrifugada a 25.000 x g por 30 minutos. O sobrenadante obtido após esta última centrifugação foi denominado **S_{SDS-Mercaptoetanol}**. A *figura 2.3* mostra esquematicamente as etapas experimentais utilizadas para a solubilização das proteínas da MP.

O procedimento para obtenção das proteínas da MP de *Tenebrio molitor* está descrito a seguir: 100 larvas foram dissecadas e isolou-se a MP juntamente com o alimento presente em seu interior. O material foi então homogeneizado em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem com água bidestilada. O homogeneizado foi centrifugado a 25.000 x g por 30 minutos, a 4°C. O sedimento resultante dessa centrifugação foi ressuspensionado em 1 mL de solução de glicerol 60% e a preparação foi novamente homogeneizada e centrifugada a 25.000 x g por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante dessa centrifugação foi diluído quatro vezes com água e então homogeneizado e centrifugado a 25.000 x g por 30 minutos (4°C). O

sedimento obtido dessa última centrifugação foi ressuspenso em água e utilizado como fonte de proteínas da MP de *Tenebrio molitor*. As proteínas foram solubilizadas da MP pela adição de tampão de amostra (item 2.12) contendo SDS e β -mercaptoetanol, e aquecimento em banho em ebulição por 4 minutos.

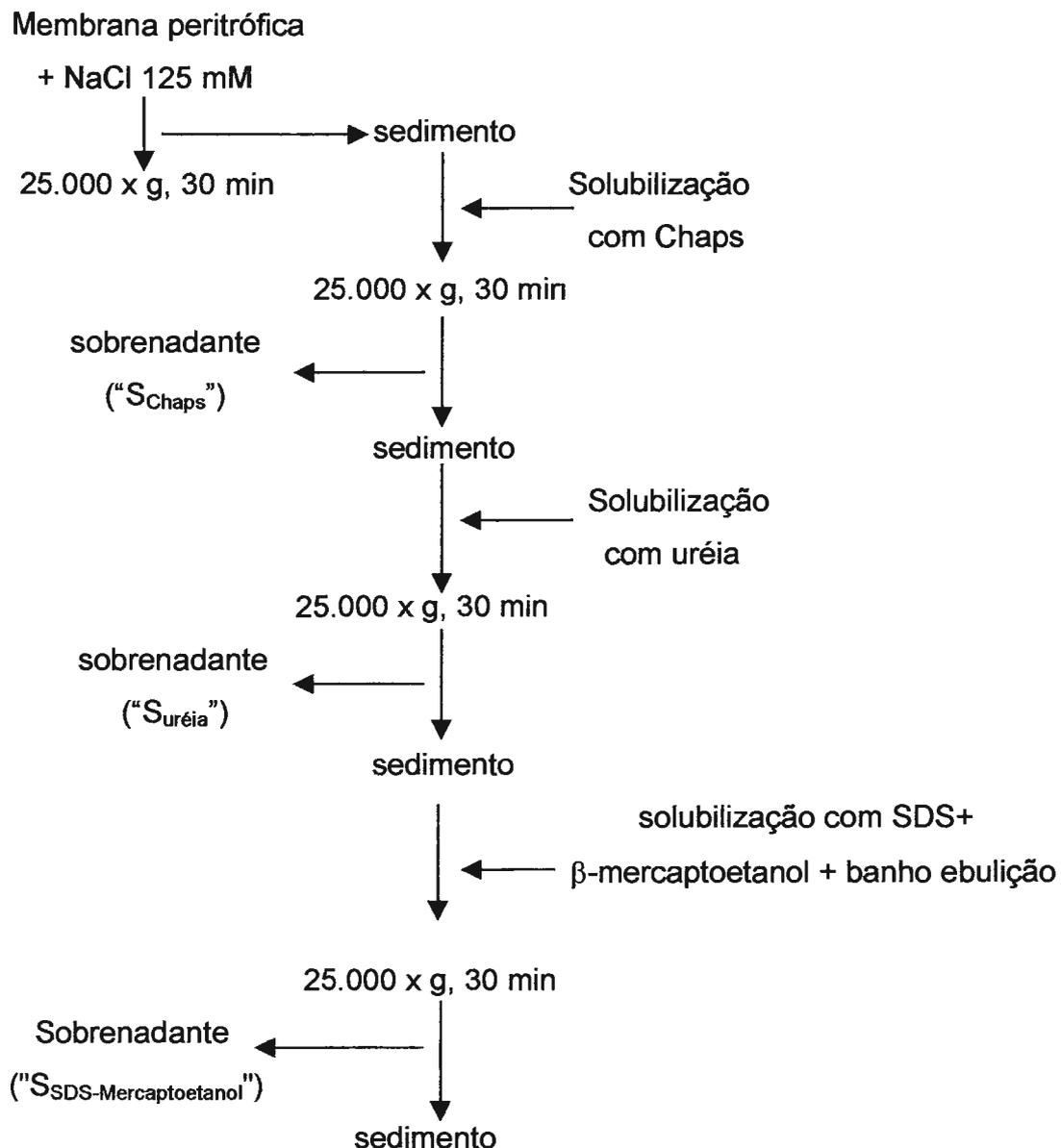


Figura 2.3: Esquema mostrando as etapas realizadas para a solubilização das proteínas da MP e obtenção das amostras S_{Chaps}, S_{uréia} e S_{SDS-Mercaptoetanol}.

2.8-Remoção de substâncias de baixo peso molecular

A remoção de substâncias de baixo peso molecular de algumas amostras foi feita dialisando-se o material ou passando-o em coluna Hi-Trap Desalting (Pharmacia). A diálise era feita contra 2000ml de água bidestilada em microtubos de centrífuga (Eppendorff) de 1,5 mL, que tinham suas tampas removidas, e uma película de membrana de diálise era colocada em seu lugar. Em cada microtubo foram dialisados de 150 a 200 μ L de amostra, e cada troca da água foi feita com intervalo mínimo de três horas, totalizando 3 trocas. A membrana de diálise utilizada é permeável a moléculas de pesos moleculares menores que 12kDa.

Na coluna HiTrap Desalting, 1,5 mL das amostras era aplicado à coluna previamente equilibrada com 10 mL de água bidestilada.

2.9-Dosagem de proteína

A maior parte das determinações de proteínas foi feita com a utilização de ácido bicinchonínico (BCA), de acordo com o método descrito por Smith et. al. (1985) e modificado por Morton & Evans (1992). A intensidade da cor formada foi mensurada em espectrofotômetro a 562nm e a concentração de proteína das amostras foi obtida por interpolação dos valores em uma curva padrão construída com albumina sérica bovina (BSA). Esta metodologia permite a quantificação de μ g de proteína e sofre interferência por carboidratos.

Algumas determinações de proteína foram feitas segundo Bradford (1976), usando Comassie Blue G como corante e ovoalbumina como padrão. Albumina

sérica bovina não é bom padrão neste caso, pois é capaz de ligar mais corante por unidade de massa protéica do que a maioria das proteínas (Read & Northcote, 1981). Esta metodologia sofre interferência por lipídeos.

2.10-Cromatografia em coluna MonoQ das proteínas solubilizadas da MP por uréia

A amostra $S_{uréia}$ estava em tampão Tris 20mM, pH 7,5, em presença de uréia. Os procedimentos de diálise ou troca de tampão não foram adotados, afim de que possíveis perdas na quantidade de proteínas fossem evitadas. A amostra foi aplicada em uma coluna Mono Q H/R 5/5 do sistema FPLC (Pharmacia Biotech), previamente equilibrada com tampão Tris 20mM pH 7,5 em presença de uréia 6 M.

As amostras foram eluídas através de 20mL de um gradiente linear de NaCl de 0 a 1M. O fluxo foi de 1 mL/min e o material eluído foi coletado em frações de 0,4 mL. O perfil de eluição das proteínas foi monitorado espectrofotometricamente a 280 nm.

2.11-Purificação da amilase de *Tenebrio molitor*

A purificação da amilase de *Tenebrio molitor* foi realizada como descrito por Cristofolletti et. al. (2001). A enzima foi purificada através da combinação de eletroforese preparativa, cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ, cromatografia de interação hidrofóbica em Fenil Superose e filtração em gel em Superose 12.

A eletroforese preparativa foi realizada em sistema Prep Cell (Bio Rad) segundo Davis (1964) em gel de poliacrilamida 10%. As frações contendo atividade de amilase foram recolhidas e aplicadas em coluna de troca iônica (MonoQ), equilibrada com tampão piperazina 20mM, pH 5,5 e eluídas com gradiente de NaCl de 0 a 0,6 M. As frações contendo atividade de amilase foram reunidas e aplicadas em coluna hidrofóbica Fenil Superose equilibrada com tampão citrato-fosfato 100mM, pH 6,0 contendo 1,7M de sulfato de amônio. A eluição da enzima foi realizada em gradiente de 1,7 a 0 M de sulfato de amônio em tampão citrato-fosfato 100mM pH 6,0. As frações contendo atividade de amilase foram reunidas e aplicadas em coluna de filtração em gel (Superose 12) equilibrada com tampão citrato-fosfato 20mM, pH 6,0 contendo NaCl 150mM. As frações ativas, reunidas após cada passo foram submetidas a eletroforese sob condições desnaturantes (SDS-PAGE, *item 2.12*) onde pôde-se avaliar o grau de purificação da amilase.

2.12-Eletroforese em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

As amostras a serem separadas eletroforeticamente foram concentradas por centrifugação à vácuo, exceto quando especificado. Após a secagem, as amostras foram ressuspensas em 20 μ L de tampão de amostra (Tris-HCl 60 mM pH 6,8, contendo 2- β -mercaptoetanol 0,36 mM, glicerol 10% (v/v), SDS 2% (p/v) e azul de bromofenol 0,0025% (p/v)). Algumas amostras, antes de serem concentradas, foram submetidas a Hi-Trap Desalting ou foram dialisadas contra água (*item 2.8*). Após a liofilização, as preparações foram ressuspensas em tampão de amostra contendo

SDS 2,0% (p/v). Antes de iniciar a eletroforese, todos os materiais em tampão de amostra foram aquecidos a 95°C por 4 minutos.

Utilizando o equipamento Mini-Protean II (Bio-Rad, EUA), as eletroforeses foram realizadas em placa fina (0,75 ou 1 mm) de poliacrilamida na presença de SDS 0,1%, conforme descrito por Laemmli (1970). Os géis de corrida foram preparados em concentração fixa de poliacrilamida, utilizando-se tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 8,8, 50µl de SDS 10%, 2,5µl de TEMED e 13,3µl de persulfato de amônio (100mg/ml), para um volume final de 5,0mL. A concentração de poliacrilamida utilizada foi 7,5 ou 12% para os géis de corrida, exceto em algumas eletroforeses que foram realizadas em géis contendo um gradiente de poliacrilamida (7,5 a 12%), montados com o auxílio de uma bomba peristáltica.

Os mesmos reagentes foram empregados para os géis de empilhamento, preparados na concentração final de 4% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 1,0M, pH 6,8. As eletroforeses foram realizadas a 200V e temperatura ambiente, até que o azul de bromofenol (utilizado como indicador da mobilidade eletroforética), estivesse a 0,5 cm da borda inferior da placa. A solução de azul de bromofenol 0,02% foi preparada com SDS 0,1%, glicerol 10% e ácido fosfórico 0,1M, pH 6,8,

O peso molecular das proteínas observadas nos géis foi estimado utilizando como padrões as seguintes proteínas: fosforilase b (97,4 KDa), albumina sérica bovina (66,2 KDa), ovoalbumina (45 KDa), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36 KDa), anidrase carbônica (31 KDa), inibidor de tripsina de soja (21,5 KDa), aprotinina (6,5 KDa), lisozima (14,4 KDa), miosina (200 KDa) e β-galactosidase (116,5 KDa).

2.13- Coloração de proteínas nos géis

Após a eletroforese, as proteínas foram fixadas no gel em solução contendo metanol 50% (v/v), ácido acético 12% (v/v) e formaldeído 0,02% (v/v), e submetidas ao método de coloração por prata desenvolvido por Blum et. al. (1987). Após o aparecimento das bandas de proteínas, os géis foram fotografados e mantidos em solução de ácido acético 0,5%.

Alguns géis foram corados com Comassie Blue R 0,1% em metanol 40% e ácido acético 10%, por 30 minutos. Após a coloração, foram feitas várias lavagens dos géis com uma solução metanol 40% e ácido acético 10%, até que as bandas de proteínas pudessem ser visualizadas.

2.14-Transferência de proteínas para membrana de PVDF

As amostras de proteínas submetidas a SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride) segundo o método de Matsudaira et. al. (1987), com o uso do kit 'Mini Trans-Blot' da Bio-Rad. As transferências foram feitas em tampão CAPS (3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid) 0,01M, em presença de metanol 10 ou 20%. A eficiência das transferências foi monitorada com o uso de padrões de peso molecular pré-corados (Bio-Rad). Algumas proteínas solubilizadas da MP foram submetidas a sequenciamento amino-terminal ou sequenciamento de peptídeos internos após as transferências, mas os resultados não foram conclusivos, pois a quantidade de proteínas transferidas do gel para a membrana de PVDF não era suficiente para a determinação das sequências. Mesmo aplicando ao gel uma quantidade de proteína

superior a 200µg não foi possível a obtenção de uma sequência N-terminal das proteínas solubilizadas da MP, uma vez que elas podem estar se agregando entre si, o que dificultaria a sua entrada no gel de poliacrilamida. Devido a isso, optou-se por utilizar uma estratégia diferente: uma amostra contendo a proteína pura isolada da membrana peritrófica eluída da coluna de troca iônica (MonoQ) foi transferida para uma membrana de PVDF (polyvinylidene difluoride) de poro de 0,2µm, segundo uma adaptação do método de Matsudaira et. al. (1987). Para tanto, utilizou-se um aparelho de concentração de amostras da Amicon (EUA) e gás nitrogênio. A membrana de PVDF foi previamente molhada em metanol e então utilizada para a transferência. A amostra contendo a proteína pura foi aplicada na parte superior do aparelho e o nitrogênio foi liberado gradativamente nesta mesma parte do aparelho. A pressão exercida pelo gás na região superior fez com que a amostra se deslocasse para a parte inferior, passando antes pela membrana de PVDF. Como esta membrana possui alta afinidade por proteínas, a peritrofina ficou retida, enquanto que o líquido contendo o tampão em uréia deslocou-se para a parte inferior do aparelho. Este método foi utilizado devido ao fracasso de várias tentativas de transferências para membranas de PVDF através de géis de poliacrilamida. Neste caso, a proteína não teve que ser submetida a eletroforese em gel, evitando portanto, a precipitação ou perda da proteína durante o procedimento de SDS-PAGE.

A proteína transferida foi corada com Comassie Blue R-250 0,1% em metanol 50% e deverá ser submetida a sequenciamento amino-terminal ou sequenciamento de peptídeos internos utilizando métodos diferenciados como a clivagem química ao invés da clivagem enzimática, uma vez que essa proteína sai de solução na ausência de uréia.

2.15-Preparação dos anticorpos contra a peritrofina de 33kDa

Foram realizadas eletroforeses das amostras S_{Chaps} e $S_{\text{uréia}}$ em condições desnaturantes (SDS-PAGE), com a finalidade de se obter uma única proteína em quantidade suficiente para a imunização de 2 coelhos: um para uma proteína de 33kDa de S_{Chaps} e outro para a mesma proteína, presente também em $S_{\text{uréia}}$. O procedimento utilizado para a produção e preparação dos anticorpos foi baseado no protocolo descrito por Jordão et. al. (1996).

Aproximadamente 200 μg de proteína da amostra solubilizada da MP pelo tratamento com uréia foram aplicados em 8 raias de um gel em gradiente de poliacrilamida (7,5-12%). Na nona raia do mesmo gel foram aplicados 2 μg de proteína da mesma amostra. Após a eletroforese, somente a nona raia do gel foi corada por prata conforme descrito no *item 2.13*, e o restante do gel foi armazenado em água bidestilada até que o procedimento de coloração da nona raia pudesse ser completado. Este procedimento foi realizado para que a nona raia do gel fosse utilizada como indicador da localização da banda da proteína de 33kDa. A seguir, o gel foi cortado na direção desta banda da proteína de acordo com a distância percorrida por ela, mostrada na nona raia do gel. O mesmo procedimento foi realizado com a amostra de proteínas solubilizadas da MP pelo tratamento com Chaps.

Os pedaços de gel contendo a proteína foram homogeneizados em 2 mL de água bidestilada, com o auxílio de um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem. O homogeneizado foi misturado com 2ml de adjuvante completo de Freund (Sigma) e a emulsão resultante foi injetada em quatro regiões diferentes das costas de um coelho. Depois de 65 dias, uma injeção similar contendo 150 μg de proteína foi

administrada no coelho, mas homogeneizada com adjuvante incompleto de Freund (Sigma). Depois de 8 dias, o coelho foi sangrado e, no total, foram coletados 15mL de sangue, que permaneceram em banho a 37°C por 30 min e depois cerca de 12 horas a 4°C. A seguir, o soro obtido foi isolado do coágulo e centrifugado a 3.000 x g por 10 min, a 4°C. O sedimento dessa centrifugação foi descartado e ao sobrenadante foi adicionada uma solução de sulfato de amônio saturada pH 6,8, de modo que o sobrenadante ficasse 50% saturado em sulfato de amônio. A amostra permaneceu durante a noite em temperatura ambiente e no dia seguinte foi centrifugada a 5.000 x g por 15 min, a 4°C. O sedimento obtido após esta centrifugação foi ressuscitado em solução de sulfato de amônio 50% saturada e novamente centrifugado a 5.000 x g por 15 min, a 4°C. Este procedimento foi repetido até que o sedimento adquirisse uma coloração esbranquiçada. O sedimento final foi ressuscitado em 1 mL de uma solução de NaCl 0,1M e dialisado contra 1000 volumes de NaCl 0,1M, com uma troca de salina. O dialisado foi centrifugado a 10.000 x g por 10 min (4°C) e o sobrenadante resultante desta centrifugação foi distribuído em alíquotas de 20 µL, que foram armazenadas a –20°C até o uso.

O procedimento utilizado para a produção de anticorpos contra a proteína de 33kDa de S_{Chaps} foi análogo ao da proteína de S_{uréia}. A primeira inoculação foi feita com 220µg de proteína e a segunda inoculação, com 130µg de proteína. Os anticorpos foram denominados anti-S_{uréia} (contra a proteína de 33kDa da amostra S_{uréia}) e anti-S_{Chaps} (contra a proteína de 33kDa da amostra S_{Chaps}).

Como controle, foram coletados 5 mL de sangue de cada coelho antes da primeira inoculação de proteínas, para a preparação dos soros pré-ímmes. A preparação desses materiais foi a mesma descrita acima para os soros ímmes.

2.16-Preparação do anticorpo contra proteínas da membrana microvilar de *Spodoptera frugiperda*

O procedimento utilizado para a produção e preparação dos anticorpos foi baseado no protocolo descrito por Jordão et. al. (1996). As microvilosidades intestinais de *Spodoptera frugiperda* foram isoladas conforme descrito no ítem 2.4. A solução contendo as proteínas da membrana microvilar de *Spodoptera frugiperda* foi misturada com adjuvante completo de Freund (Sigma). A emulsão resultante foi injetada em quatro regiões diferentes das costas de um coelho. Depois de 60 dias, uma injeção similar contendo aproximadamente 250 µg de proteína foi administrada no coelho, antes de ser homogeneizada com adjuvante incompleto de Freund (Sigma). Depois de 8 dias, o coelho foi sangrado e, no total, foram coletados 15mL de sangue, que permaneceram em banho a 37°C por 30 min e depois por cerca de 12 horas a 4°C. Os procedimentos de purificação do anticorpo foram os mesmos descritos no ítem anterior.

Como controle, foram coletados 5 mL de sangue do coelho antes da primeira inoculação de proteínas, para a preparação do soro pré-imune. A preparação desse material foi a mesma descrita acima para o soro imune.

2.17-Preparação do anticorpo anti-amilase de *Tenebrio molitor*

Foram selecionados 5 camundongos adultos e fêmeas da linhagem Balbise. Em cada camundongo foram inoculados 20µg de amilase purificada de *Tenebrio molitor* via intraperitoneal. Para tanto, a amostra foi diluída 2 vezes com adjuvante

completo de Freund. Após uma semana foi realizada a segunda inoculação, também via intraperitoneal, mas a amostra (20 μ g de amilase/camundongo) foi diluída em adjuvante de Freund incompleto. Uma terceira inoculação foi realizada depois de oito dias, mas desta vez sem o adjuvante de Freund. Esta terceira e última inoculação foi intravenosa. O sangue dos camundongos (aproximadamente 1mL por camundongo) foi recolhido após cinco dias, incubado a 37°C por 1 hora e a seguir overnight a 4°C.

O soro obtido foi submetido aos mesmos procedimentos de purificação descritos no *item 2.15*. Como controle, foram coletados 200 μ L de sangue de cada camundongo antes da primeira inoculação de proteínas, para a preparação do soro pré-imune, que foi a mesma descrita acima para o soro imune.

2.18-Western blot e imunoenensaio

As amostras de *S. frugiperda* (proteínas solubilizadas da MP com uréia, proteínas da membrana microvilar e de membranas de vesículas do fluido ectoperitrófico) e proteínas solubilizadas da MP de *Tenebrio molitor* foram aplicadas em placas de géis de poliacrilamida contendo SDS (*item 2.12*). Após a separação eletroforética, o gel foi submetido ao método de Towbin et. al. (1979) de transferência de proteínas para membranas de nitrocelulose. Para tanto, os géis foram inicialmente equilibrados em tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM, contendo metanol 20%, por 30 minutos. Em seguida, realizou-se a transferência eletroforética das proteínas dos géis para membrana de nitrocelulose de poro de 0,2 μ m, previamente equilibrada por 15 minutos com o mesmo tampão. Foi utilizado um sistema de transferência de proteínas semi-seco da Bio-Rad na presença do

tampão acima e nas condições especificadas pelo manual do aparelho: 15V, 250mA por 30min. A eficiência da transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose foi averiguada pelo uso de marcadores de peso molecular pré-corados (Bio-Rad) e pela coloração por prata dos géis após a transferência.

Antes de serem ensaiadas, as membranas de nitrocelulose permaneceram imersas em uma solução 5% de leite em pó desnatado dissolvido em TBS (tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 M) por 18 horas a 4°C, sem agitação. Esta solução é capaz de bloquear os sítios da membrana que não contêm proteínas transferidas dos géis, evitando assim ligações inespecíficas dos anticorpos nos passos descritos adiante.

Após o bloqueio, as membranas foram lavadas (4 vezes por 5 min cada) com TBS contendo Tween 20 0,05% (TBS-T). A seguir, as membranas foram incubadas por duas horas com o anticorpo primário diluído em TBS-T. A diluição utilizada para o anticorpo anti-peritrofina foi de 100 vezes e para o anticorpo anti-proteínas da membrana microvilar de *S. frugiperda* foi de 1000 vezes.

Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas novamente com TBS-T (4 vezes por 5 min cada) e então incubadas com o anticorpo secundário diluído 1000 vezes em TBS-T, por duas horas. O anticorpo utilizado foi anti-IgG de coelho ou camundongo, produzido em cabra e acoplado a uma peroxidase (Sigma). Depois da incubação, as membranas foram lavadas com TBS (sem Tween 20) por 4 vezes de 5 min cada e submetidas aos métodos de detecção para verificação das proteínas reconhecidas pelos anticorpos.

Foram utilizados dois métodos diferentes de detecção:

- 1) Após a lavagem, as membranas foram incubadas com uma solução feita com 20 mg de 4-cloro-1-naftol dissolvidos em 4mL de metanol, à qual foram adicionados 20 mL de TBS aquecido a 37°C e 15 μ l de H₂O₂. As membranas foram incubadas

até que as bandas escuras pudessem ser visualizadas (até 15 min). Após serem lavadas extensivamente com água bidestilada, as membranas foram secas ao ar;

2) Após a lavagem com TBS, as membranas foram tratadas com o Kit “ECL Western Blotting” (Amersham), de acordo com as instruções do fabricante. Após o tratamento, as membranas foram expostas a um filme de detecção de luminescência de “high performance” (Hyperfilm-ECL, Amersham) ou “diagnostic film” (Kodak). O kit mencionado é um método de detecção não radioativo emissor de luz para detecção de antígenos específicos imobilizados.

2.19- Microscopia eletrônica de transmissão

As larvas de *Spodoptera frugiperda* foram dissecadas em fixador (glutaraldeído 0,3% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 com paraformaldeído 4%) e o epitélio do intestino médio foi dividido em três partes: ventrículos anterior, médio e posterior, de igual comprimento. Os ventrículos anterior e posterior permaneceram no fixador por 90 min a 4°C. Depois de lavados com tampão fosfato (5 x 10 min), os materiais foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (3 x 5 min em 70% e 2 x 10 min em 90%) a temperatura ambiente. As amostras foram embebidas em um volume de resina L. R. White (Electron Microscopy Sciences, Ft. Washington, USA) para um volume de álcool 90% (2 x 10 min) a temperatura ambiente, seguida da embebição em resina pura durante a noite a 4°C e a temperatura ambiente (3 x 10 min). A emblocagem foi feita a 56°C por 72 horas.

Cortes ultrafinos foram feitos em ultramicrótomo e montados em telas de níquel de 200µm (revestidas com parlodiu). As telas foram colocadas (flutuando) sobre gotas de água bidestilada (2 x 5 min) e a seguir sobre NGS (Amersham,

Inglaterra) diluído 30 vezes em TBS (Tris-HCl 50mM) pH 7,2 contendo BSA 1% e NaN_3 0,05%, por 30 min a 4°C. As telas foram então incubadas com anticorpo primário diluído em TBS pH 7,2 contendo BSA 1%, NaN_3 0,05% a 4°C, durante a noite. Depois de lavadas em TBS pH7,2 contendo BSA 0,2%, e NaN_3 0,05% e Tween 20 0,1% (4 x 5 min, com agitação), as amostras foram colocadas em TBS pH8,2 com BSA 1% e NaN_3 0,05% por 30 min a temperatura ambiente, e incubadas com anticorpo secundário (anti-IgG de coelho produzido em cabra) acoplado a partículas de ouro de 15nm (Amershan, Inglaterra), diluído 15 vezes em TBS pH 8,2 com BSA 1% e NaN_3 0,05%, por 1 hora a temperatura ambiente. As telas foram lavadas em TBS pH 7,2 com BSA 0,2%, NaN_3 0,05% e Tween 20 0,1% (4 x 5 min, com agitação), seguida pela lavagem com a mesma solução sem BSA e NaN_3 0,05% (2 x 5 min). Depois da fixação com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,4 por 10 min a temperatura ambiente, as telas foram lavadas em água bidestilada (3 x 2 min, com agitação) e coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo (Reynolds, 1963). Todos os cortes foram visualizados em um microscópio eletrônico de transmissão Phillips 301.

2.20-Microscopia de fluorescência em sistema Confocal

A microscopia confocal foi usada para visualização das peritrofinas, amilase, proteínas da membrana microvilar e da MP em cortes histológicos de *Spodoptera frugiperda*. As larvas foram dissecadas em fixador de Zamboni (Stefanini et. al., 1967) e o intestino médio foi isolado e dividido em três partes de mesmo comprimento, denominadas ventrículos anterior, médio e posterior. Os ventrículos anterior e posterior permaneceram na solução do fixador por 16 horas a 4°C, e o ventrículo médio foi descartado. A seguir, as amostras foram desidratadas em

concentrações crescentes de álcool (15 min em 70%, 20 min em 95% e 2 x 30 min em 100%), seguida de uma solução de 1 volume de álcool 100% para um volume de Xilol (30 min) e logo depois em Xilol puro por uma hora, à temperatura ambiente. Os materiais foram embebidos em parafina, em estufa a 58°C (2 x 15 min). Após a embebição, o material foi retirado da estufa e emblocado.

Cortes dos tecidos de 7µm de espessura foram feitos no micrótomo Autocut 2040 (Reichert-Jung) e transferidos para lâminas histológicas. As lâminas foram passadas em Xilol (2 x 30 min) e a seguir incubadas em álcool 100% (3 min), 95% (3 min) e 70% (3 min). Antes da incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas em tampão PBS (2 x 5 min) e Triton X-100 em PBS por 5 min. O anticorpo primário foi diluído em PBS e incubado por 16 horas a 4°C. As diluições utilizadas para os anticorpos primários foram diferentes de um anticorpo para outro e estão indicadas em cada resultado. Depois de lavadas em PBS (3 x 5 min) à temperatura ambiente, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho ligado a fenilisotiocianato (FITC) diluído 100 vezes por uma hora à temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram novamente lavadas com PBS (3 x 5 min). Os cortes foram montados em Vectashield (Vector Labs, Inc., USA) e examinados em um microscópio confocal Zeiss LSM 410.

Para a visualização de quitina (componente da MP), cortes de tecido preparados como descrito acima foram incubados com WGA (aglutinina de gérmen de trigo). O procedimento de fixação é o mesmo descrito acima, mas a incubação dos reagentes foi feita de duas maneiras diferentes. Na primeira, utilizou-se WGA ligado a FITC (diluição 1: 500). A incubação foi feita por 16 horas a 4°C, seguida da lavagem da amostra com TBS (3 x 5 min). A seguir, a montagem foi realizada como descrito acima.

Na segunda maneira utilizou-se WGA ao invés de WGA ligado a FITC (diluição 1: 250). A incubação foi feita por 16 horas a 4°C, seguida de uma segunda incubação com um anticorpo anti-WGA (diluição 1: 500), por 2 horas à temperatura ambiente. A seguir foram realizadas 3 lavagens de 5 min cada com PBS e então foi feita uma terceira incubação, com anticorpo secundário ligado a FITC (diluição 1: 100) por 1 hora a temperatura ambiente. A montagem foi realizada como descrito acima.

A marcação com WGA-FITC também foi realizada em presença de N-acetilglicosamina 0,2M, com o objetivo de evitar a ligação da lectina com glicoproteínas, pois a ligação do WGA com a quitina é específica em presença de excesso do monômero (Peters & Latka, 1986).

2.21-Ensaio enzimáticos

Aminopectidase

Utilizou-se como substrato leucina *p*-nitroanilida (LpNa) 1mM e a atividade foi ensaiada em tampão Tris-HCl 100mM pH 7,5. A hidrólise de LpNa foi determinada medindo-se a liberação de *p*-nitroanilina (produto da reação) segundo Erlanger et. al. (1961).

Amilase

A atividade de amilase foi monitorada pela produção de grupos redutores gerados pela hidrólise do amido, em tampão glicina 50mM, pH 9,5 em presença de NaCl 10mM, seguindo o método que usa ácido dinitrossalicílico (DNS) descrito por Noelting & Bernfeld (1948). O substrato utilizado foi amido solúvel 0,5%.

Tripsina

A atividade de tripsina foi medida através da liberação do grupo *p*-nitroanilina a partir do substrato BAPNA (α -N-benzoil-DL-arginina *p*-nitroanilida) 0,83mM em tampão Tris-HCl 100mM, pH 7,5, segundo o método descrito por Erlanger et. al. (1961).

β -N-acetilglicosaminidase

A atividade de β -N-acetilglicosaminidase foi ensaiada utilizando *p*-Nitrofenil-N-acetil- β -glicosídeo 2,5mM como substrato, em tampão citrato-fosfato 100mM, pH 5,0. A reação foi interrompida com tampão carbonato-bicarbonato em presença de SDS e o *p*-nitrofenolato liberado foi quantificado medindo-se a absorbância a 420nm, conforme descrito por Terra et. al. (1979).

Quimotripsina

A quimotripsina foi ensaiada com N-succinil-Ala-Ala-Phe 7-amido-4-metilcomarina 1 μ M (Barrett et. al., 1998), em tampão Tris-HCl 100mM, pH 8,5. O substrato foi dissolvido em DMSO e então diluído 10 vezes em tampão. A reação foi parada pela adição de ácido acético 5% e a fluorescência liberada foi detectada em um fluorímetro F2000 Hitachi, com excitação a 380nm e detecção a 460nm (Alves et. al., 1996).

Todos os ensaios foram realizados a 30°C e em condições tais que a quantidade de produto foi proporcional à concentração de enzima e ao tempo de incubação. Para todos os ensaios foram realizados controles sem enzima e outros sem substrato. Uma unidade de atividade (U) é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de substrato (ou ligação) por minuto.

Deve-se ressaltar que todos os sedimentos obtidos por centrifugação foram ressuspensos por homogeneização com o auxílio de um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem. Se essa medida não é tomada, a recuperação das atividades enzimáticas fica muito diminuída.

3-Resultados

3.1-Determinação de proteínas nas preparações solubilizadas da membrana peritrófica

Estávamos em dúvida sobre que método utilizar para determinar a quantidade de proteínas presente nas amostras solubilizadas da MP por Chaps e por uréia. Desse modo, comparamos as determinações realizadas utilizando BCA e Comassie Blue, e obtivemos os mesmos valores. Optamos então por utilizar BCA nessas determinações.

Com a finalidade de verificar se uréia ou Chaps interferiam nas dosagens de proteína por BCA realizadas no material solubilizado da MP de *S. frugiperda*, levando a determinações erradas, realizou-se um teste onde a curva padrão de proteínas continha Chaps ou uréia, na mesma quantidade utilizada para a solubilização das proteínas da MP. A *figura 3.1* mostra uma comparação entre os resultados de uma dosagem de proteína (albumina sérica bovina) realizada utilizando uma curva padrão sem Chaps ou uréia (controle), e curvas contendo um dos dois reagentes. Os resultados mostram uma diferença na inclinação da reta referente a curva padrão feita com Chaps, em relação a curva padrão controle. Para a determinação da quantidade de proteína por BCA das amostras contendo Chaps foi utilizado, portanto, um fator de cálculo diferente daquele usado para as amostras contendo uréia.

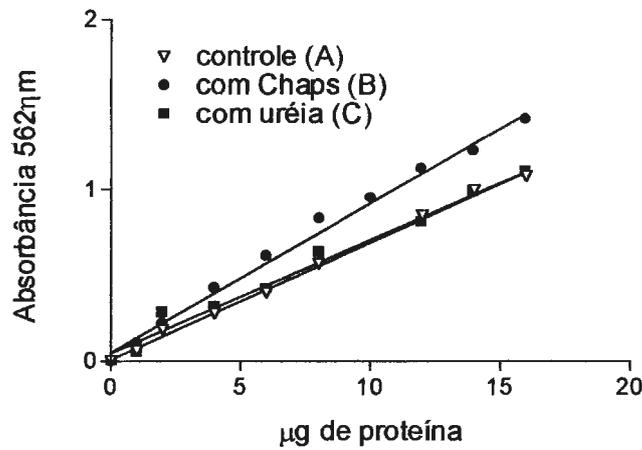


Figura 3.1: Efeito da utilização de Chaps ou uréia em determinações de proteínas por BCA. As inclinações das retas referentes aos gráficos A, B e C são 0,068, 0,088 e 0,067, respectivamente.

3.2-Solubilização das proteínas da MP de *Spodoptera frugiperda*

A MP de *S. frugiperda* é composta por um material gelatinoso, que se solubiliza por lavagens em salina (que nós denominamos de fração gelatinosa), e por uma estrutura sólida e resistente que denominamos de fração fibrosa. Essa última fração foi sequencialmente submetida a tratamentos com Chaps, uréia e SDS + β -mercaptoetanol, na tentativa de solubilizar suas proteínas. As proteínas solubilizadas por esses reagentes foram submetidas a SDS-PAGE, em um gel com gradiente de poliacrilamida de 7,5 a 12%. A *figura 3.2B* mostra a foto do gel com as proteínas solubilizadas pelos diferentes tratamentos.

Pode-se observar que o tratamento com uréia é capaz de solubilizar uma maior quantidade de proteínas da MP do que o tratamento com Chaps, mas em ambos os extratos observa-se uma mesma banda de proteína. O peso molecular relativo dessa proteína solubilizada por uréia e Chaps foi estimado através da comparação com a migração eletroforética dos padrões de peso molecular. Essa proteína (solubilizada da MP com Chaps e uréia) foi estimada como tendo Mr de 33kDa, que é um tamanho parecido com aquele de outras peritrofinas descritas.

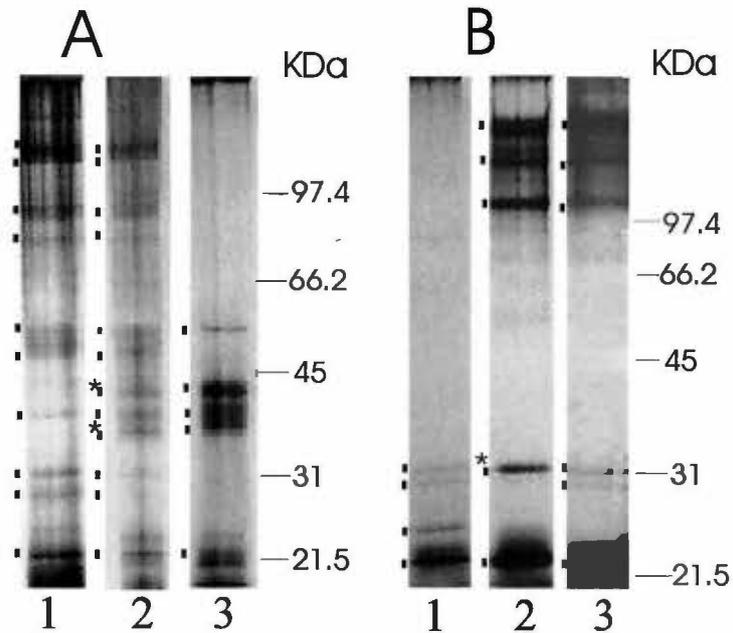


Figura 3.2: Coloração por prata após SDS-PAGE das proteínas da membrana microvilar, das vesículas do fluido ectoperitrófico e da MP de *S. frugiperda*. (A) gel 12%. Raia 1: proteínas da membrana microvilar da região anterior do intestino médio; raia 2: proteínas das vesículas do fluido ectoperitrófico; raia 3: proteínas da fração gelatinosa da MP. Os asteriscos correspondem às proteínas que estão presentes nas vesículas e na fração gelatinosa, mas não nas membranas microvillares. (B) gel 7,5-12%. Raia 1: proteínas solubilizadas da MP com Chaps; raia 2: proteínas solubilizadas da MP com uréia; raia 3: proteínas solubilizadas da MP com SDS e β -mercaptoetanol. O asterisco indica a proteína de 33kDa. Os pontos indicam as proteínas majoritárias encontradas em cada fração.

Além disso, uma vez que a maior quantidade dessa proteína é solubilizada depois do tratamento com uréia, ela certamente deve ser uma proteína integrante da MP ou peritrofina (Tellam et. al., 1999).

Conforme comentado anteriormente, vesículas de secreção e porções das membranas microvilares se destacam das células formando as vesículas presentes no fluido ectoperitrófico. Como hipoteticamente essas vesículas incorporam-se à MP, uma comparação das proteínas presentes em todas essas frações foi realizada. Para tanto, uma amostra contendo as proteínas presentes na fração gelatinosa da MP foi submetida a SDS-PAGE, em um gel com concentração de poliacrilamida de 12%. Também foram aplicadas nesse gel as amostras contendo as proteínas das membranas microvilares e das membranas do fluido ectoperitrófico de *Spodoptera frugiperda*. A figura 3.2A mostra a fotografia do gel após a eletroforese. Pode-se observar que algumas proteínas da membrana microvilar estão aparentemente presentes também nas vesículas do fluido ectoperitrófico e na fração gelatinosa da MP. Outras proteínas estão presentes somente nas vesículas e na fração gelatinosa. Nota-se também que aparentemente há uma identidade muito grande entre as proteínas da membrana microvilar e das vesículas do fluido ectoperitrófico.

3.3-Tentativas de obtenção da sequência de aminoácidos de um peptídeo da peritrofina de 33kDa

Desejávamos obter uma sequência amino-terminal e/ou uma sequência de um peptídeo interno da peritrofina de 33kDa. Nosso intuito inicialmente era utilizar essa sequência para comparação com sequências de peritrofinas depositadas em bancos de dados. Tínhamos também interesse nessas sequências para no futuro

produzimos sondas e clonamos a peritrofina de 33kDa a partir de uma biblioteca de cDNA de tubo digestivo de *S. frugiperda*, que temos em nosso laboratório.

Para a obtenção das sequências tentamos inicialmente transferir as proteínas (solubilizadas da MP) do gel para membranas de PVDF, mas uma série de problemas ocorreram com inúmeras tentativas. O principal problema observado foi a não eficiência na transferência da proteína de 33kDa. Aventamos a possibilidade de não estar havendo a transferência, mas sempre que os géis utilizados nas transferências eram corados por prata, observava-se apenas um mínimo de proteína que ainda permanecia no gel, mas uma grande quantidade de proteína era transferida, sem aderir à membrana de PVDF. Ademais, os padrões de peso molecular pré-corados utilizados nos experimentos eram muito bem transferidos para as membranas de PVDF. O problema era, portanto, intrínseco às proteínas destas amostras. Foram testadas diferentes concentrações de metanol no tampão de transferência, mas em nenhum teste observou-se resultado satisfatório. Também foram experimentadas diferentes condições de transferência, variando-se a voltagem, a corrente ou o tempo de transferência utilizado. Em alguns experimentos observou-se a transferência de proteínas para a membrana, mas nestes casos a coloração da banda de proteína na membrana de PVDF era muito tênue, indicando pouca quantidade de proteína transferida.

Uma vez que não conseguimos obter uma sequência transferindo as proteínas para a membrana de PVDF, tentamos a seguir enviá-las no próprio gel, para o laboratório de análises de sequências de proteínas da Universidade de Kentucky (USA). Embora cerca de 60µg de proteína tenha sido mandada, após clivagem proteolítica da amostra nenhum peptídeo foi detectado. Posteriormente foi observado que sempre que aplicávamos amostras com mais de 10µg de proteínas solubilizadas a partir da MP em uma mesma raia no gel, somente

proteínas com mais de 50 kDa eram observadas após a eletroforese em SDS-PAGE. Esses resultados indicam que a proteína deve sair de solução em várias condições.

3.4- Purificação da proteína de 33kDa

Uma vez que nossa hipótese é que as peritrofinas de *S. frugiperda* saem facilmente de solução, decidimos então tentar purificar a proteína de Mr 33kDa, mantendo-a sempre em meio contendo uréia. Para tanto, uma amostra de proteínas, solubilizadas da MP pelo tratamento com uréia correspondente a 100 larvas, foi aplicada em uma coluna de troca iônica (MonoQ) em sistema FPLC (Pharmacia, Biotech), conforme descrito no *item 2.10*. Todos os procedimentos foram feitos utilizando-se uréia na mesma concentração da amostra, para que não houvesse perda de proteínas devido à precipitação. O pH dos tampões foi idêntico ao pH da amostra, também para evitar a perda de proteínas nos procedimentos de troca de tampão. A *figura 3.3* mostra a fotografia do SDS-PAGE feito com algumas frações eluídas desta cromatografia, que foram escolhidas com base no perfil de proteínas traçado pelo registrador UV acoplado ao FPLC. Os géis foram feitos em gradiente de poliacrilamida de 7,5 a 12% e as amostras não foram dialisadas nem concentradas em Speed vac.

Na *figura 3.3* pode-se observar que nas raias correspondentes às frações 44, 46, 47 e 48, a proteína de Mr 33kDa está pura. Nas outras raias observam-se proteínas majoritárias, mas com alguns contaminantes. A proteína de 33kDa foi transferida para membrana de PVDF (conforme descrito no *item 2.14*) para poder ser enviada a um centro de sequenciamento. Tentaremos obter uma sequência

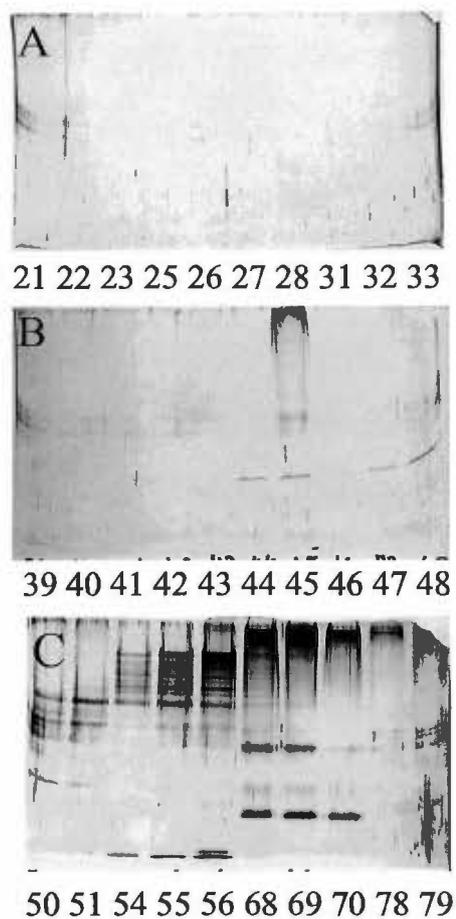


Figura 3.3: SDS-PAGE com as frações eluídas da cromatografia em coluna MonoQ (FPLC). (A) frações 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 31, 32 e 33; (B) frações 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 e 48; (C) frações 50, 51, 54, 55, 56, 68, 69, 70, 78 e 79. Observar a proteína de 33kDa purificada nas frações 44, 46, 47 e 48.

de aminoácidos de um peptídeo formado a partir de hidrólise química da proteína, uma vez que provavelmente ela sairá de solução caso não esteja na presença de altas concentrações de uréia.

3.5-Especificidade do anticorpo anti-peritrofina

A proteína de 33kDa solubilizada da MP foi isolada através de SDS-PAGE em quantidade suficiente para produção de anticorpo policlonal em coelho. A razão pela qual não utilizamos a peritrofina de 33k purificada a partir da cromatografia em coluna MonoQ para produzirmos o anticorpo é que o rendimento nesse procedimento é extremamente baixo.

Os procedimentos para a obtenção do anticorpo estão descritos no *item 2.15*. Um dos anticorpos foi feito a partir de uma proteína de 33k da amostra S_{Chaps}. Esta mesma proteína é também observada na amostra S_{uréia}. Para garantirmos a produção do anticorpo contra a proteína de 33k, dois coelhos foram utilizados para a produção do anticorpo, um para a proteína de 33kDa da amostra solubilizada com Chaps e o outro para a mesma proteína, mas da amostra solubilizada com uréia. Dessa forma seria mais provável a produção do anticorpo. Quando os anticorpos foram testados quanto a sua especificidade através de western blot, observou-se que o anticorpo produzido a partir da proteína solubilizada com uréia não era específico, pois observava-se marcação de várias proteínas na utilização do soro pré-imune, que foi retirado do coelho antes da primeira inoculação de proteínas. Já os resultados observados na utilização do anticorpo produzido a partir da amostra da proteína de 33kDa solubilizada com

Chaps foram bastante satisfatórios. Este anticorpo mostrou-se específico contra a proteína de S_{Chaps} de 33K, que também foi reconhecida na amostra S_{uréia}.

Este anticorpo foi testado quanto à sua especificidade através de western blot com uma amostra contendo todas as proteínas solubilizadas da MP pelo tratamento com uréia. O resultado deste experimento está mostrado na *figura 3.4*. O anticorpo anti-peritrofina aparentemente reconheceu a proteína de 33kDa. O reconhecimento muito tênue da proteína de 33K nesse western blot provavelmente se deve à pequena quantidade de proteína transferida para a membrana de nitrocelulose. A especificidade da resposta às proteínas de *Spodoptera frugiperda* foi confirmada através de outro Western blot, onde uma fração do sangue do coelho antes da imunização (sore pré-imune) não reconheceu as bandas de proteínas (dado não mostrado).

O anticorpo anti-peritrofina de *Spodoptera frugiperda* também é capaz de reconhecer proteínas da MP de *Tenebrio molitor*. Após os procedimentos para obtenção das proteínas da MP de *Tenebrio molitor* (*item 2.7*), a amostra foi aplicada em um gel com gradiente de poliacrilamida de 7,5 a 12%. A seguir as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, conforme descrito no *item 2.18*. A *figura 3.5* mostra o reconhecimento de pelo menos duas bandas de proteínas na amostra de *Tenebrio molitor*, indicando identidade imunológica entre a proteína da MP de *S. frugiperda* e duas proteínas de *T. molitor*.

3.6-Imunocitocalização da peritrofina no intestino médio de *S. frugiperda*

O anticorpo feito contra a proteína de 33kDa foi utilizado para imunocitocalizar a peritrofina no intestino médio de *S. frugiperda*. Na *figura 3.6*

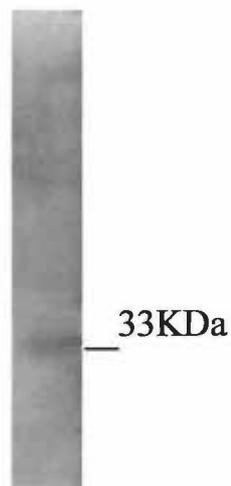


Figura 3.4: Western blot com a amostra de proteínas solubilizadas da MP com uréia usando o anticorpo anti-peritrofina. Observar o reconhecimento da banda de 33kDa.

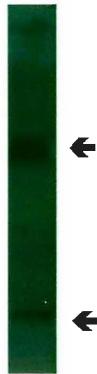


Figura 3.5: Western blot com a amostra de proteínas da MP de *T. molitor* usando o anticorpo anti-peritrofina de *S. frugiperda* diluído 100 vezes. As setas indicam as proteínas principais reconhecidas pelo anticorpo.

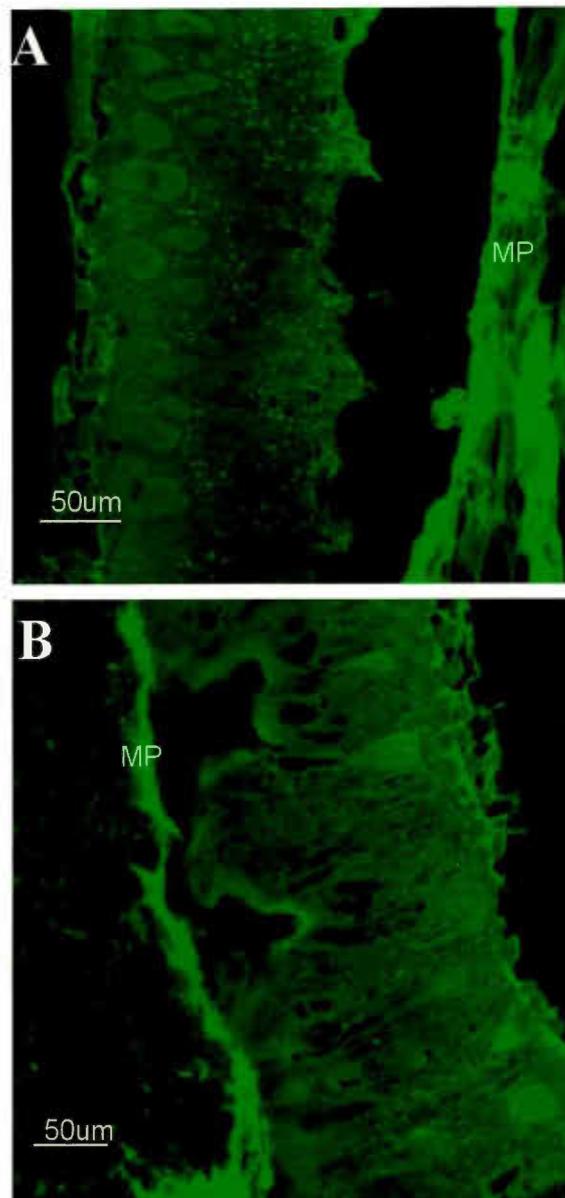


Figura 3.6: Visualização da peritrofina de 33kDa por imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-peritrofina de *S. frugiperda* diluído 20 vezes. (A) Ventrículo anterior com vesículas de secreção marcadas no interior das células colunares; (B) Ventrículo posterior, com marcação bem menos intensa nas células e mais restrita à MP. MP= membrana peritrófica. Barras= 50µm.

vemos um resultado de imunofluorescência em microscópio Confocal. Na região anterior (*figura 3.6A*) observamos marcação em inúmeras vesículas de secreção, na região das microvilosidades, na membrana peritrófica e na membrana basal. Na região posterior (*figura 3.6B*), a marcação só é abundante na MP. Controles feitos com o soro pré-imune foram negativos.

Além dos resultados observados em sistema Confocal, uma outra abordagem foi utilizada: os cortes de tecido, após serem incubados com o anticorpo anti-peritrofina foram incubados com um anticorpo anti-IgG de coelho produzido em cabra e acoplado a ouro coloidal. Este anticorpo secundário permite verificar a marcação ao microscópio eletrônico. Na *figura 3.7* está mostrada a marcação na MP e na *figura 3.8* observa-se que na região anterior do intestino médio a peritrofina está presente no interior de pequenas vesículas de secreção (*figura 3.8C*). Nas microvilosidades dessa região, a marcação é observada principalmente de forma agrupada (*figura 3.8 A e D*). No ventrículo posterior (*figura 3.9*) a marcação é bem menos intensa, tanto nos grânulos de secreção como nas microvilosidades. Nesta região, a marcação é observada somente nas raras pequenas vesículas de secreção presentes nesse local, enquanto que as grandes vesículas, típicas dessa região do intestino médio, não estão marcadas.

3.7-Visualização de quitina com WGA

Com a finalidade de certificarmos de que a estrutura extracelular fortemente marcada com o anticorpo anti-peritrofina corresponde à MP, realizamos a marcação do intestino médio de *S. frugiperda* com WGA acoplada a uma proteína fluorescente (WGA-FITC), ou WGA seguido de uma nova incubação com anti-WGA.

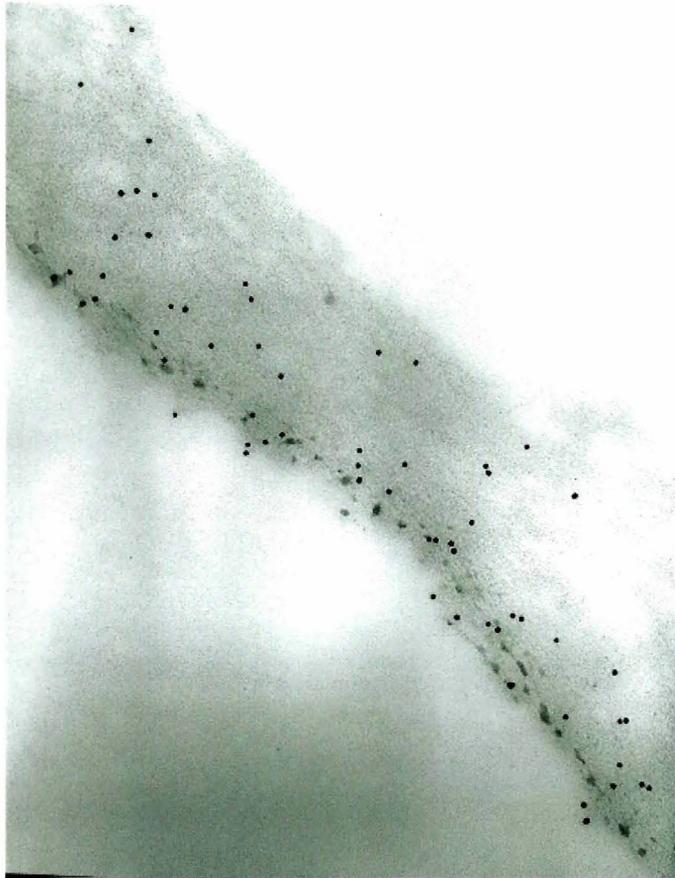


Figura 3.7: Imunocitocalização de peritrofinas na membrana peritrófica da região anterior do intestino médio de *S. frugiperda* usando o anticorpo anti-peritrofinas. Aumento de 52.000 vezes.

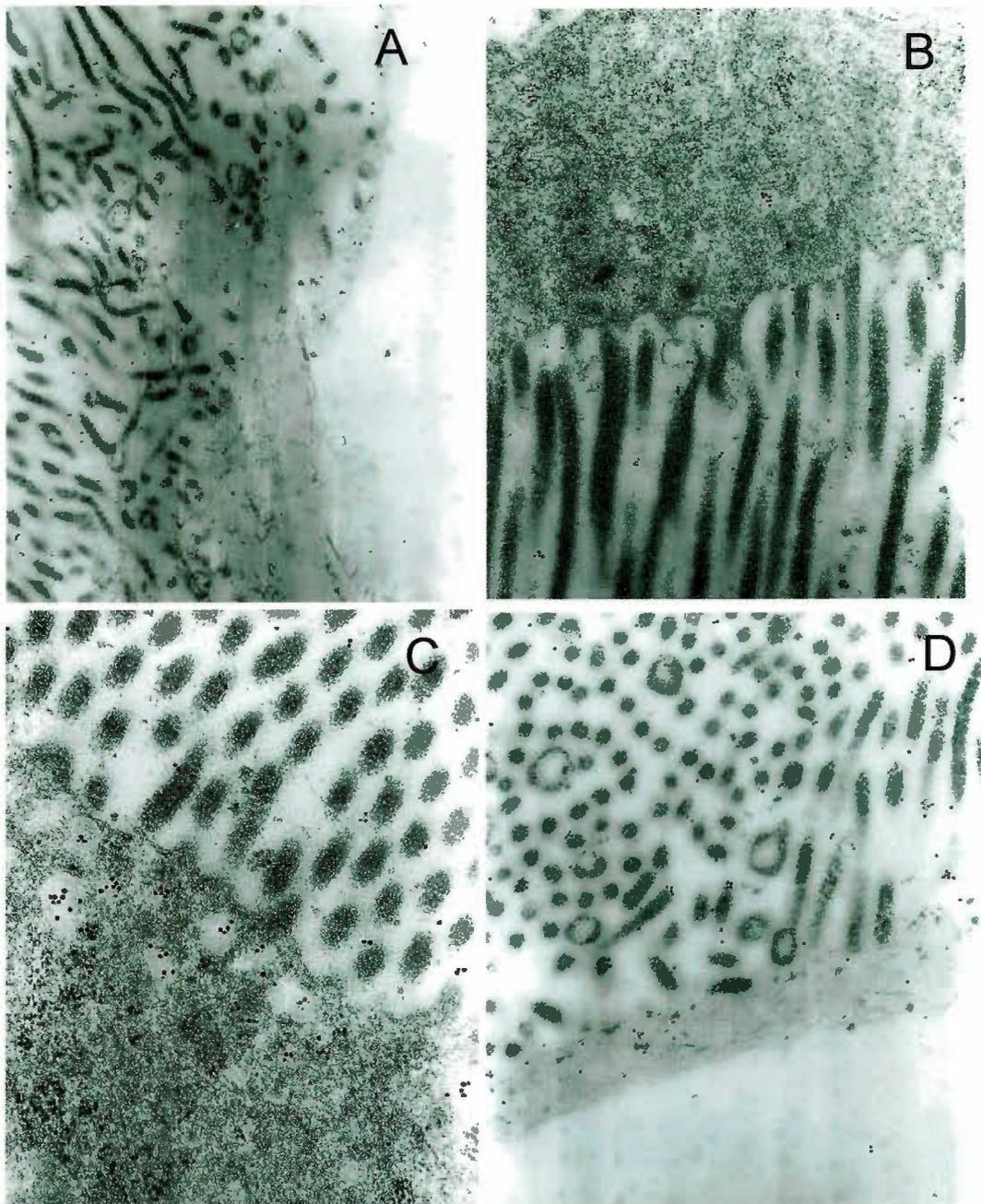


Figura 3.8: Imunocitocalização da peritrofina de 33kDa nas células do epitélio do ventrículo anterior de *S. frugiperda*. Observar a marcação nas microvilosidades (A e B), na MP (A e D) e no interior das vesículas de secreção (C). Aumentos: A=16.000 vezes; B=37.500 vezes; C=41.000 vezes; D=28.000 vezes.

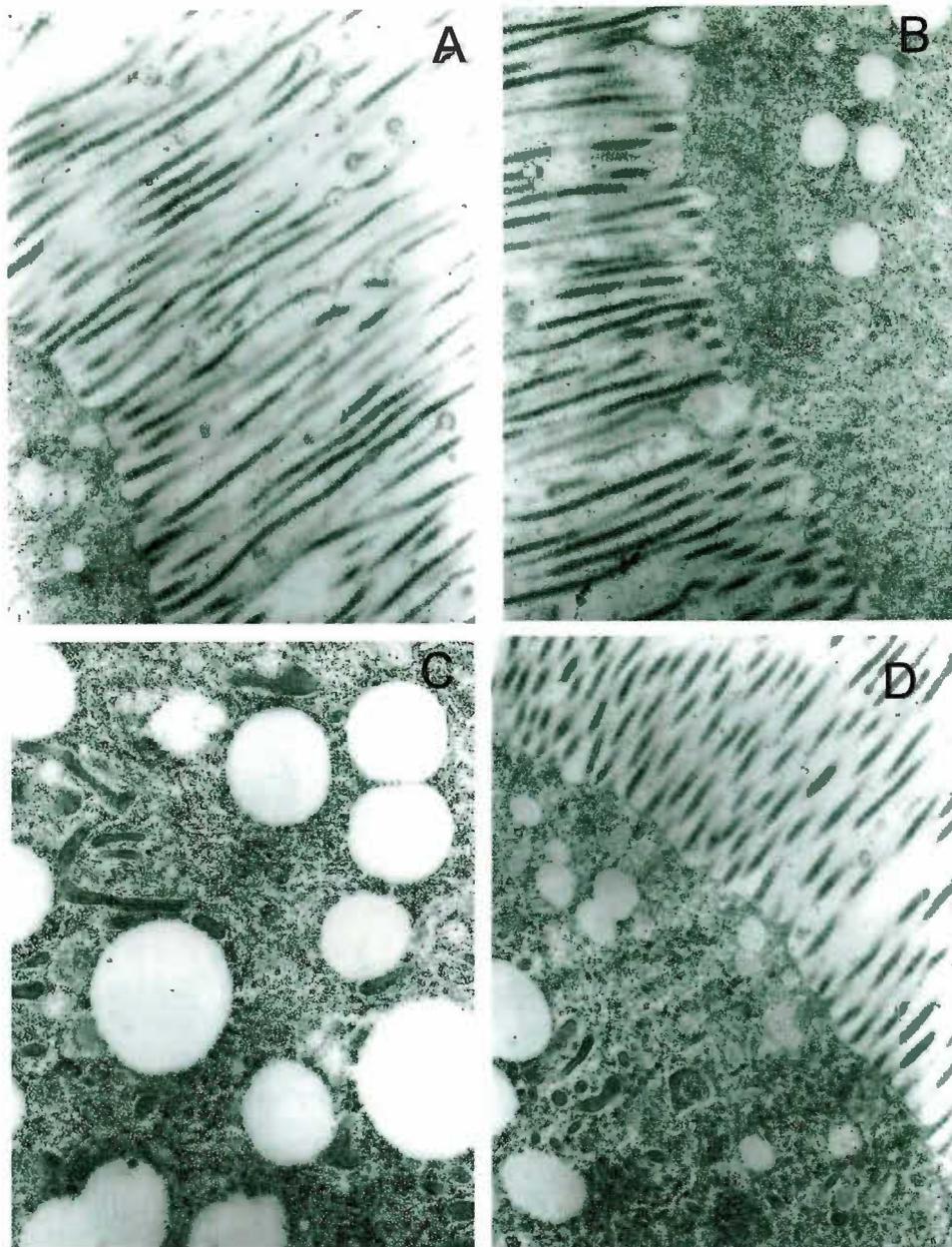


Figura 3.9: Imunocitocalização da peritrofina de 33kDa nas células do epitélio do ventrículo posterior de *S. frugiperda*. Observar a pouca marcação nas microvilosidades (A, B e D) e nas grandes vesículas de secreção (C). Notar que a presença de grânulos de ouro somente nas raras pequenas vesículas de secreção (D). Aumentos: A, B e D=15.000 vezes; C=15.500 vezes.

Esta lectina se liga especificamente a resíduos de N-acetilglicosamina, que é o monômero que compõe a quitina da MP. A *figura 3.10* mostra o resultado obtido com as marcações com WGA. Nota-se que a marcação na região anterior do intestino médio (*figura 3.10 A e C*) é mais intensa do que na região posterior (*figura 3.10 B e D*). A marcação intracelular observada nesse experimento deve-se à ligação da lectina com glicoproteínas, uma vez que ela não é mais observada em presença de excesso de N-acetilglicosamina (*figura 3.11*). Com esse procedimento, observa-se marcação na MP (no mesmo local marcado com o anticorpo anti-peritrofina) e na base das células espiteliais do intestino médio, que deve corresponder aos anéis de quitina das traquéias.

3.8-Imunocitocalização de amilase no intestino médio de *S. frugiperda*

Resultados anteriormente obtidos em nosso laboratório demonstraram que um anticorpo anti-amilase de *Tenebrio molitor* feito em coelho (Cristofolletti et.al; 2001) é capaz de reconhecer duas amilases de *Spodoptera frugiperda*. Com base neste resultado, decidimos produzir um novo anticorpo anti-amilase de *T. molitor*, mas desta vez feito em camundongos, com o objetivo de verificarmos comparativamente, através de microscopia eletrônica, se as vesículas presentes na região anterior do intestino médio de *S. frugiperda*, responsáveis pela secreção das peritrofinas, são também responsáveis pela secreção de enzimas digestivas para o lúmen intestinal. A necessidade de um novo anticorpo dá-se pelo fato de que, para que dois anticorpos sejam utilizados em uma mesma imunocitocalização (marcação dupla), estes devem possuir IgGs de animais diferentes. Assim, os anticorpos secundários (anti-IgG de coelho e anti-igG de camundongo) podem ser

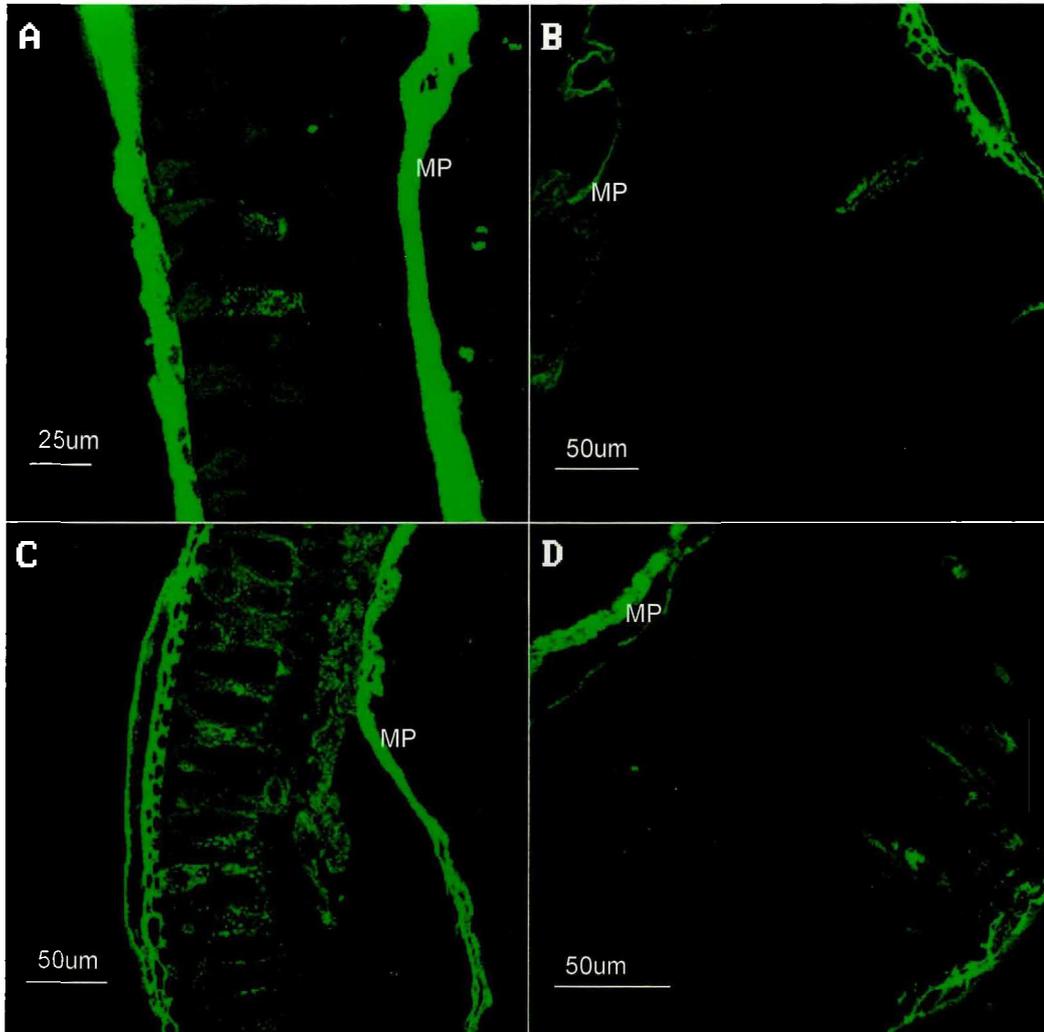


Figura 3.10: Visualização da MP de *S. frugiperda* utilizando WGA-FITC (500 vezes diluído) (A-B) e WGA (500 vezes diluído) + anti-WGA (500 vezes diluído) (C-D). A e C: intestino médio anterior; B e D: intestino médio posterior. MP= membrana peritrófica.

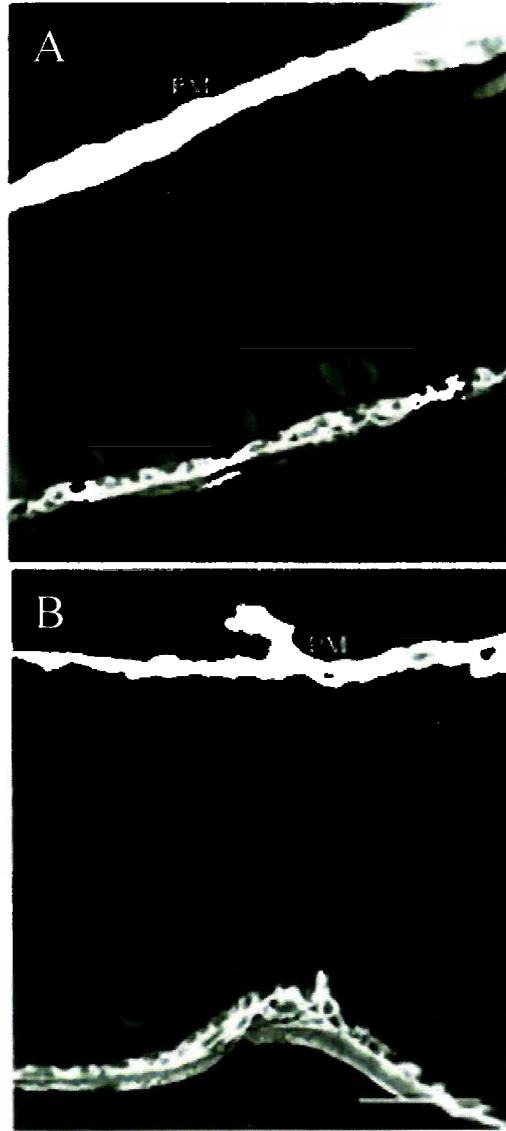


Figura 3.11: Visualização de quitina no intestino médio de *S. frugiperda* usando WGA-FITC em presença de excesso de N-acetilglicosamina. (A) Intestino médio anterior; (B) intestino médio posterior. Observar a forte marcação na MP e nas traquéias que contornam o epitélio. Barras= 50 μ m.

identificados através do acoplamento com partículas de ouro de tamanhos diferentes (ou com diferentes proteínas fluorescentes). Isso permite, portanto, a diferenciação na marcação de proteínas da MP com o anticorpo anti-peritrofina feito em coelho e a amilase digestiva com o anticorpo anti-amilase feito em camundongos.

O primeiro passo para a produção do anticorpo em camundongos foi a purificação da amilase de *T. molitor*. O procedimento de purificação utilizado foi descrito por Cristofolletti et. al. (2001) e todos os passos cromatográficos estão descritos no *item 2.11*. A amilase de *T. molitor* foi purificada a partir do homogeneizado de intestino médio de 200 larvas, através de uma combinação de técnicas cromatográficas e eletroforese preparativa em gel de poliacrilamida. O anticorpo anti-amilase não foi gerado contra a amilase de *S. frugiperda* porque esta enzima nunca foi obtida na forma pura, em várias tentativas de purificação realizadas.

Conseguimos obter marcação das amilases de *S. frugiperda* com esse anticorpo em western blots (dados não mostrados), mas seu título estava muito baixo e portanto não possibilitou a utilização desse anticorpo em experimentos de imunocitocalização. Dessa forma, decidimos utilizar o anticorpo contra a amilase de *T. molitor* feito em coelho para imunocitocalizar a enzima no intestino médio de *S. frugiperda*. Apesar dele possuir IgG de mesma origem que o do anticorpo anti-peritrofina, poderíamos verificar se o tipo de secreção de amilase é o mesmo das peritrofinas e ainda se o mesmo tipo de vesículas (de mesmo tamanho e localizadas nas mesmas regiões) são capazes de secretar tanto peritrofinas quanto enzimas digestivas.

O anticorpo contra amilase de *T. molitor* feito em coelho foi utilizado em experimentos de imunocitocalização no intestino médio de *S. frugiperda*. Para

tanto, o anticorpo secundário era acoplado a uma proteína fluorescente, o que permitia a visualização da amilase em microscópio Confocal, ou era acoplado a partículas de ouro coloidal, permitindo a visualização em microscópio eletrônico no nível ultraestrutural. A *figura 3.12A* mostra que a marcação da amilase nas microvilosidades das células do ventrículo anterior é mais intensa do que a marcação observada com o anticorpo anti-peritrofina. Também observa-se marcação em vesículas de secreção no interior das células colunares dessa região. No ventrículo posterior (*figura 3.12B*), a marcação praticamente restringe-se à MP. Quando a localização de amilase é visualizada ao microscópio eletrônico (*figura 3.13*), observa-se marcação na MP (*figura 3.13A*), nas microvilosidades (*figura 3.13B*) e também aparentemente ligada à membrana das vesículas presentes nas microvilosidades (*figura 3.13A*). No interior das células a marcação é observada nas pequenas vesículas da região anterior, do mesmo modo que se observa a marcação para peritrofina. Entretanto, a amilase parece muitas vezes estar presente nas membranas dessas vesículas (*figura 3.13B*, setas). Na região posterior (*figura 3.13C*), pouca marcação é observada nas grandes vesículas típicas dessa região e nas raras pequenas vesículas aí encontradas. Em muitos campos nenhuma dessas pequenas vesículas é detectada.

3.9-Especificidade do anticorpo anti-proteínas microvilares do ventrículo anterior de *S. frugiperda*

Uma preparação da membrana microvilar do epitélio do ventrículo anterior de *Spodoptera frugiperda* foi utilizada para produção de anticorpos em coelho. Nosso objetivo, com a produção de um anticorpo contra todas as proteínas

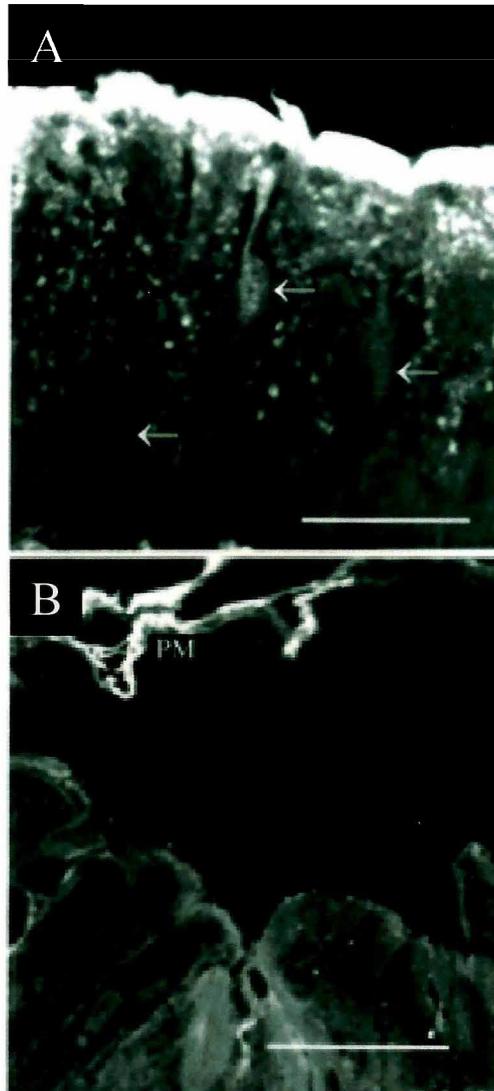


Figura 3.12: Visualização da amilase no intestino médio de *S. frugiperda*. (A) Região anterior do intestino médio com marcação nas microvilosidades e nas vesículas das células colunares. As setas indicam as células caliciformes não marcadas. (B) Intestino médio posterior com a fluorescência restrita à MP. PM=membrana peritrófica. Barras= 50 μ m.

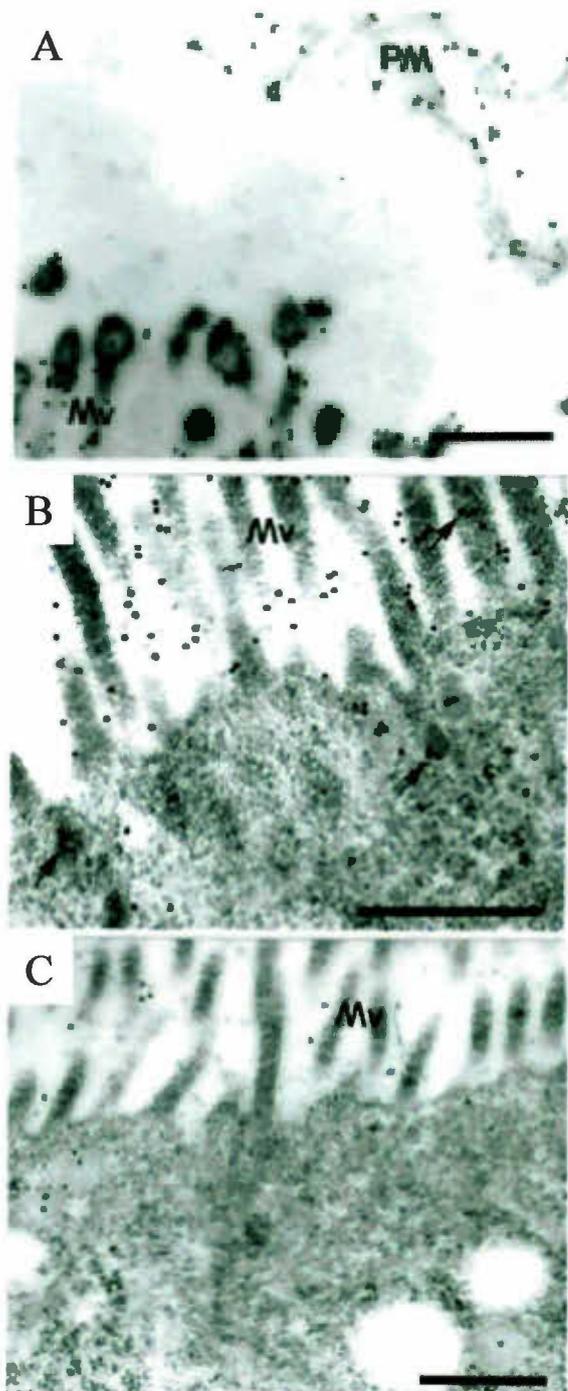


Figura 3.13: Localização imunocitoquímica da amilase no intestino médio de *S. frugiperda*. (A) e (B) Região anterior do intestino médio com marcação na MP, nas microvilosidades e ocasionalmente nas membranas das vesículas. (C) Região posterior do intestino médio. Mv=microvilosidades; PM=membrana peritrófica. Barras=0,5 μ m.

presentes nas membranas microvilares, era comparar a composição protéica dessa membrana com a das vesículas presentes no fluido ectoperitrófico, além da verificação da presença dessas proteínas na MP. Um western blot das amostras de proteínas da membrana microvilar e das vesículas do fluido ectoperitrófico, previamente submetidas a SDS-PAGE, está mostrado na *figura 3.14*. O anticorpo anti-proteínas microvilares aparentemente reconheceu várias proteínas da amostra de membranas microvilares de *S. frugiperda*, como esperado. As bandas reconhecidas nesta amostra possuem os seguintes valores de Mr: 21.6k, 27.3k, 30k, 54.7k, 79.2k, 93.1k, 112.2k, 120k. As proteínas da membrana microvilar com Mr de 112.2k e 120k também foram reconhecidas pelo anticorpo anti-amilase de *T. molitor*, e a proteína com Mr de 93.1k foi reconhecida por um anticorpo anti-tripsina de *Musca domestica* (dados não mostrados). Esses pesos moleculares são muito diferentes dos observados para essas mesmas enzimas obtidas a partir da fração solúvel da membrana peritrófica mais conteúdo (Ferreira et. al., 1994b; Jordão et. al., 1999; dados não mostrados). Uma hipótese para esses pesos moleculares diferentes é o fato das proteínas estarem ligadas à membrana e talvez por isso ainda associadas a outras moléculas. Essas associações não estariam sendo desfeitas pelo tratamento com SDS e β -mercaptoetanol a 95°C. Isso não parece completamente estranho, uma vez que mesmo proteínas puras podem formar agregados que não são desfeitos nessas condições (Jordão et. al., 1996). Supomos, portanto, que essas proteínas correspondam às amilases e à tripsina ligadas à membrana microvilar (Jordão et. al., 1999).

Na raia correspondente à amostra de proteínas da membrana do fluido ectoperitrófico, observa-se o reconhecimento de algumas bandas, com Mr de 21.6k, 27.3k e 30k. Isto indica que pelo menos parte das proteínas das vesículas do fluido

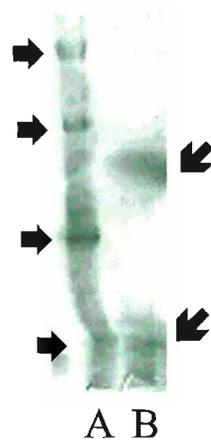


Figura 3.14: Western blot com o anticorpo anti-proteínas da membrana microvilar de *S. frugiperda*. (A) Amostra de microvilosidades; (B) amostra de vesículas do fluido ectoperitrófico. As setas indicam as proteínas principais reconhecidas pelo anticorpo.

ectoperitrófico são derivadas das membranas microvilares do intestino médio anterior.

O anticorpo contra as proteínas da membrana microvilar foi utilizado para imunocitocalizar essas proteínas no intestino médio de *S. frugiperda*, através de microscopia Confocal. A *figura 3.15* mostra que a marcação é mais evidente no ápice das células da região anterior do intestino médio (*figura 3.15 A*) do que na região posterior (*figura 3.15B*). Na região anterior, intensa marcação é observada em vesículas intracelulares. Também observa-se marcação na MP ao longo de todo o intestino médio.

3.10-Associação de enzimas digestivas com a MP de *S. frugiperda*

Ferreira et. al. (1994a) tinham mostrado que quantidades significativas de amilase e tripsina eram encontradas na MP de *S. frugiperda*. Decidimos obter uma fração que contivesse principalmente proteínas da porção gelatinosa da MP e verificar se enzimas digestivas eram encontradas aí. Além disso, através da determinação da atividade específica das enzimas e da comparação com a atividade específica determinada em outros compartimentos do intestino médio, talvez pudéssemos observar se existiam diferenças na proporção em que elas seriam retidas na MP. Para tanto, quatro lotes de quatro animais cada um foram utilizados nos ensaios enzimáticos de amilase, tripsina, aminopeptidase e N-acetilglicosaminidase. As amostras usadas foram as frações fibrosa e gelatinosa (material particulado e material solúvel) e o conteúdo da MP (material particulado e material solúvel). A **Tabela I** mostra as atividades e atividades específicas das

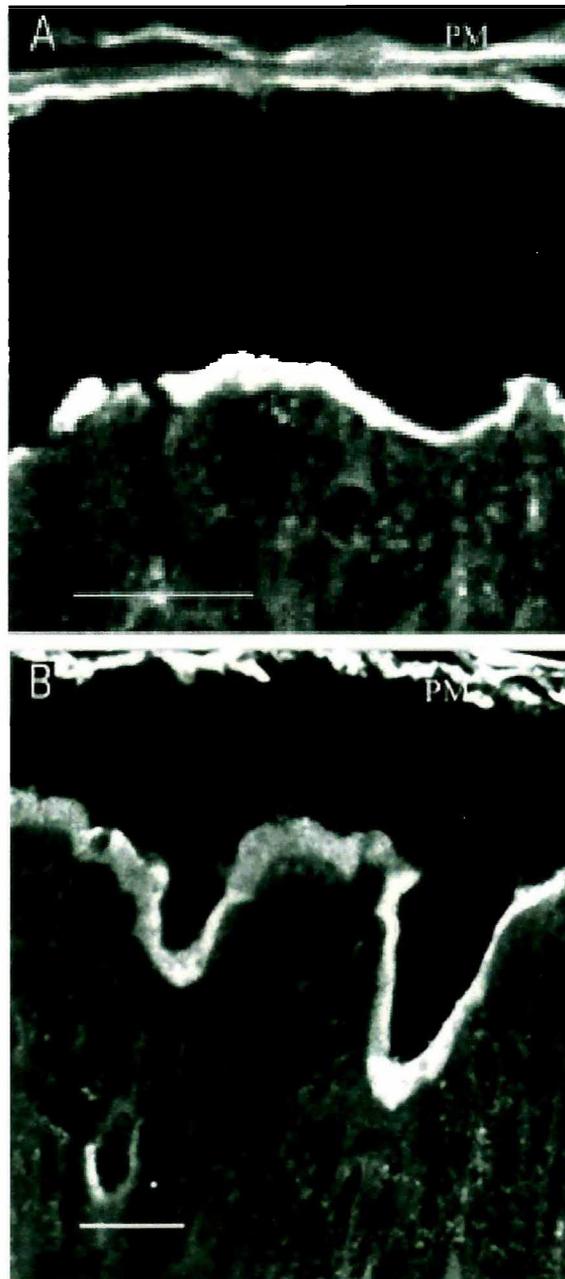


Figura 3.15: Visualização das proteínas da membrana microvilar no intestino médio de *S. frugiperda*. (A) Região anterior do intestino médio com marcação nas células, na MP e nas microvilosidades; (B) região posterior do intestino médio com marcação na MP e nas microvilosidades. Notar que a marcação no ápice das células é mais intensa na região anterior do que na região posterior do intestino médio. PM= membrana peritrófica. Barras= 50 μ m.

enzimas nas amostras da MP, no conteúdo alimentar, nas membranas microvilares e nas membranas das vesículas e fração solúvel do fluido ectoperitrófico.

Pode-se observar que uma maior quantidade de enzimas é incorporada na fração gelatinosa do que na fração fibrosa da MP. Deve-se levar em consideração que as diferenças são sempre maiores do que as observadas, uma vez que a porção fibrosa da MP é necessariamente contaminada com partículas de comida. Nessas partículas se adsorvem uma grande quantidade de enzimas digestivas (ver material particulado correspondente ao conteúdo da MP, **Tabela I**), principalmente amilase e tripsina.

A atividade específica de amilase e tripsina é maior na fração gelatinosa da MP do que nas vesículas do fluido ectoperitrófico, e o contrário é observado para a aminopeptidase (**Tabela I**). Já para N-acetilglicosaminidase, a maior atividade específica é observada no fluido ectoperitrófico.

3.11-Efeito do calcoflúor na MP de *S. frugiperda*

O calcoflúor é uma substância capaz de se ligar à quitina e, portanto, à MP. Sabe-se que esta droga provoca danos na MP de insetos com MP do tipo 1 através da competição com as proteínas da MP pela ligação com a matriz quitinosa (Wang & Granados; 2000). Para verificarmos se danos na MP levavam à alteração na distribuição de enzimas no interior da MP, larvas de *S. frugiperda* foram alimentadas com dieta contendo calcoflúor e, após 8 horas, dissecadas. Os controles foram feitos com os insetos no mesmo estágio larval e alimentados com a mesma dieta, porém sem calcoflúor. Após a dissecação, as membranas peritróficas das larvas alimentadas com calcoflúor e das larvas controle foram analisadas e comparadas. A

Tabela 1: Enzimas digestivas de *Spodoptera frugiperda* nas membranas microvillares, vesículas do fluido ectoperitroífico, MP e conteúdo da MP^a.

Enzima	Membrana ^b microvillar	Fluido ectoperitroífico ^c			MP ^d			Conteúdo da MP ^e	
		vesículas	sobrenadante	FG (s)	FG (p)	FF	solúvel	particulado	
Acetilglicosaminidase	n.d.	0,42	10	1.1 (3,4)	0,001 (0,01)	0,7 (0,47)	0,66 (0,5)	0,26 (0,1)	
Aminopectidase	3100	1680	50	65 (6,0)	870 (3,8)	120 (2,9)	19 (18,2)	34 (8,6)	
Amilase	430	2160	1700	1900 (5,5)	4800 (0,9)	8300 (6,6)	730 (32,1)	5120 (55)	
Tripsina	7	86	75	160 (12,1)	350 (2,0)	190 (3,7)	190 (61,9)	174 (20,2)	

^aOs resultados são atividades específicas (mU/mg de proteína) e atividades relativas (em parênteses) calculadas como porcentagem das atividades no lúmen do intestino médio (fluido ectoperitroífico + MP + conteúdo da MP). Os dados estão expressos como médias calculadas de quatro ensaios realizados em três diferentes preparações obtidas de cinco animais cada. Os desvios padrão da média foram sempre obtidos entre 20 e 30 % do valor das médias.

^bOs dados correspondem às células do intestino médio anterior (Capella et. al., 1997).

^cO fluido ectoperitroífico foi coletado através da lavagem da superfície do tecido do intestino médio com salina. Este material foi então centrifugado a 600 x g por 10 minutos. O sobrenadante resultante dessa centrifugação foi novamente centrifugado a 25000 x g por 30 minutos. O novo sedimento corresponde às vesículas e o novo sobrenadante ao fluido ectoperitroífico. Os valores foram calculados baseados em Ferreira et. al. (1994a).

^dA MP sem o conteúdo alimentar foi homogeneizada em salina. O material particulado resultante de uma centrifugação a 600 x g por 10 minutos foi coletado como a fração fibrosa da MP (FF) e o sobrenadante foi novamente centrifugado a 25000 x g por 30 minutos. O novo sedimento foi denominado como material particulado (p) da fração gelatinosa da MP (FG) e o novo sobrenadante corresponde ao material solúvel (s) da fração gelatinosa da MP (FG).

^eO conteúdo da MP foi homogeneizado, centrifugado a 600 x g por 10 minutos, e o sedimento e o sobrenadante foram coletados.

figura 3.16 mostra a MP com o conteúdo alimentar de uma larva alimentada com calcoflúor e uma larva controle. Observou-se que a MP da larva alimentada com calcoflúor estava completamente modificada (*figura 3.16 B e D*), possuindo a aparência de um gel. O bolo alimentar estava disperso no interior do epitélio ventricular e não havia uma separação bem delimitada do espaço ectoperitrófico do espaço endoperitrófico pela MP, como foi observado para as larvas controle.

Além de se ligar à quitina, o calcoflúor é um agente fluorescente. As membranas peritróficas das larvas controle e alimentadas com a droga foram observadas em transiluminador UV, para verificação da incorporação do calcoflúor na MP e também para certificarmos de que as larvas alimentadas com calcoflúor estavam mesmo comendo a dieta. A *figura 3.17* mostra a diferença entre uma larva controle e uma larva alimentada com calcoflúor. Podemos verificar que os insetos estão realmente comendo a dieta contendo calcoflúor e que este agente está nitidamente se ligando à MP, provocando a perda da integridade dessa estrutura (*figura 3.17 B*).

A MP junto com o conteúdo alimentar das larvas controle e alimentadas com calcoflúor foram divididos em três regiões de igual comprimento (anterior, média e posterior). Foram recolhidas as amostras de 16 animais, divididos em quatro lotes de quatro animais cada um. O mesmo procedimento foi realizado com as larvas controle. As atividades de tripsina e quimotripsina foram determinadas nas três regiões da MP, com a finalidade de verificarmos se o gradiente antero-posterior das enzimas estava alterado. Os valores de atividade encontrados ao longo do tubo digestivo das larvas controle e alimentadas com calcoflúor estão apresentados na **Tabela II**. Observa-se claramente que o gradiente antero-posterior de ambas as enzimas, presente nas larvas controle, é completamente desorganizado nas larvas alimentadas com calcoflúor. Esse resultado mostra que a MP exerce papel

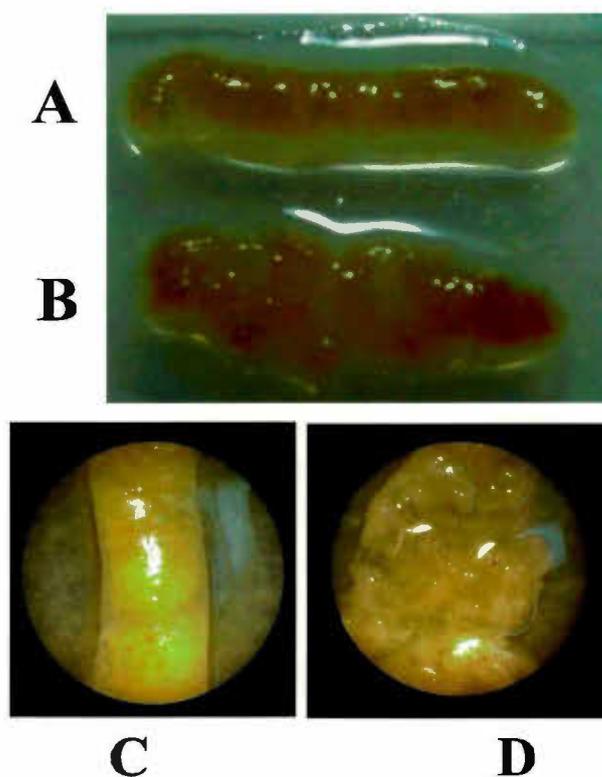


Figura 3.16: Membranas peritróficas com conteúdo alimentar isoladas de larvas de *S. frugiperda*. (A) e (C) MP dissecada de uma larva alimentada com dieta controle, mostrando o desenvolvimento normal da MP; (B) e (D) conteúdo alimentar de uma larva alimentada com dieta contendo calcoflúor 1% por 8 horas, mostrando a dispersão da comida devido à ausência de uma MP normal.

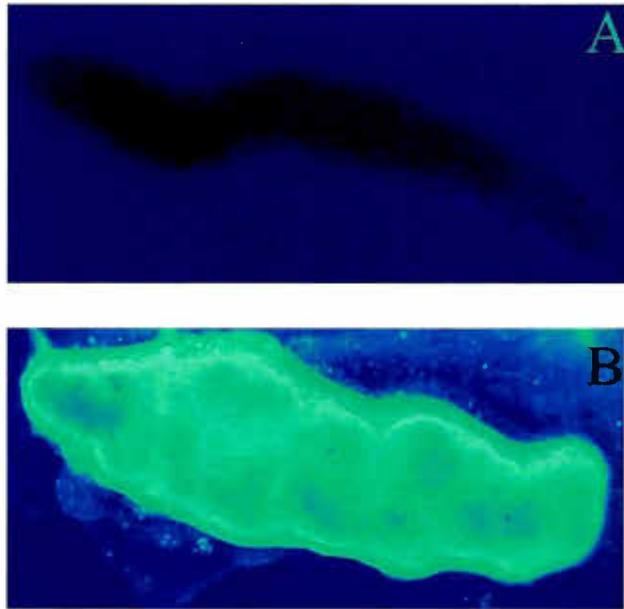


Figura 3.17: Visualização utilizando luz UV (ultravioleta) das membranas peritróficas isoladas das larvas de *S. frugiperda* alimentadas com (A) dieta controle e (B) com dieta contendo calcoflúor 1%, por 8 horas. Observar a fluorescência em (B) devido à presença do calcoflúor.

fundamental na manutenção do gradiente de tripsina e quimotripsina ao longo do tubo digestivo de *S. frugiperda*.

Tabela II: Distribuição de tripsina e quimotripsina (%) a longo do conteúdo do intestino médio de *S. frugiperda*, em larvas controle e alimentadas com calcoflúor.

Conteúdo luminal	Tripsina		Quimotripsina	
	Controle	Calcoflúor	Controle	Calcoflúor
Anterior	51 + 5	24 + 2	58 + 1	35 + 5
Médio	38 + 5	43 + 2	34 + 1	42 + 2
Posterior	11 + 2	33 + 2	9 + 2	23 + 4

Os valores correspondem à médias e desvio padrão da média baseados em determinações realizadas em 4 diferentes preparações obtidas de 4 larvas cada. As larvas experimentais foram alimentadas com dieta contendo calcoflúor por 8 horas, antes de serem dissecadas. O conteúdo do intestino médio foi dividido em três partes de mesmo comprimento e tripsina e quimotripsina foram ensaiadas nessas partes.

4-Discussão

4.1-A proteína de 33kDa da MP de *S. frugiperda*

A MP de *S. frugiperda* é composta por uma matriz sólida de quitina e proteínas. O tratamento dessa matriz com uréia leva à solubilização de algumas proteínas, entre elas a proteína de 33kDa. Embora não tenhamos conseguido uma sequência de aminoácidos para podermos comparar com sequências de peritrofinas depositadas em bancos de dados, essa proteína só é majoritariamente solubilizada após tratamento com uréia, e possui propriedades de solubilidade e valor de Mr parecidos com outras peritrofinas (Tellam et. al., 1999). Esses dados indicam fortemente que ela é uma proteína estrutural da MP de *S. frugiperda*.

As amostras S_{Chaps} e $S_{\text{uréia}}$ foram submetidas à diálise com a finalidade de eliminarmos as moléculas de Chaps e uréia presentes nos materiais. Dosagens de proteínas feitas em amostras dialisadas e não dialisadas mostraram que há uma perda significativa da quantidade de proteína após o procedimento da diálise. Teoricamente este resultado pode ser devido a uma possível agregação e consequente precipitação das proteínas das amostras, resultantes da eliminação do Chaps ou uréia. Como tratam-se de proteínas estruturais que são solubilizadas da membrana peritrófica somente em condições especiais, essas proteínas poderiam sair de solução em razão da eliminação dos reagentes pela diálise. Diante desses fatos, a nossa hipótese é que as proteínas da MP solubilizadas com Chaps ou uréia formam agregados insolúveis ao saírem do contato com essas substâncias, que são as condições em que são solubilizadas, o que impede

a sua transferência para a membrana de PVDF, e por isso nenhum peptídeo é observado na cromatografia realizada após a clivagem proteolítica das proteínas.

4.2-Mecanismos de secreção de tripsina e amilase na região anterior do intestino médio de *S. frugiperda*

De acordo com o modelo proposto por Jordão et. al. (1999), a tripsina de *S. frugiperda* é sintetizada ligada à membrana através de uma âncora hidrofóbica. A enzima é então processada no complexo de Golgi e transportada em vesículas de secreção. Essas vesículas migram através das microvilosidades das células e, antes ou após fundirem-se com as membranas microvilares no topo das microvilosidades, são liberadas no lúmen do intestino médio. Parte da tripsina é solubilizada da membrana da vesícula através de proteólise limitada ou dissolução parcial das vesículas em função do alto pH luminal. A membrana de vesícula remanescente, com parte das moléculas de tripsina ainda ligadas seria finalmente incorporada à MP.

O modelo mencionado acima é baseado nas seguintes observações: (1) Os dados de imunomarcacão mostram a tripsina associada com a membrana das vesículas que migram através das microvilosidades e são lançadas no lúmen; (2) A solubilização da tripsina ligada à membrana por vários agentes sugeriu que essa proteína é ancorada na membrana através de um peptídeo hidrofóbico (Jordão et. al., 1999); (3) A atividade específica de tripsina nas membranas das vesículas do fluido ectoperitrófico de *S. frugiperda* é muito mais alta que nas membranas microvilares, enquanto que a atividade específica de aminopeptidase é aproximadamente a mesma em ambas as membranas (Ferreira et. al., 1994a e

Tabela I). Isso sugere que as membranas que carregam tripsina são produzidas em uma região específica das membranas microvilares das células colunares, uma vez que as atividades específicas são diferentes nos dois tipos de membrana; (4) Cerca de 18% da atividade de tripsina no lúmen do intestino médio é encontrada incorporada na MP (Ferreira et. al., 1994a, **Tabela I**).

Este trabalho reforça o modelo de secreção proposto para tripsina por vários fatores: (1) Western blots revelaram a presença de tripsina nas membranas microvilares e a ocorrência de proteínas microvilares nas membranas das vesículas do fluido ectoperitrófico (dados não mostrados); (2) Algumas proteínas das membranas das vesículas do fluido ectoperitrófico são encontradas na fração gelatinosa da MP mas não na membrana microvilar (*figura 3.2*), confirmando a idéia que as vesículas do fluido ectoperitrófico são liberadas de regiões específicas das microvilosidades do ventrículo anterior e tornam-se parcialmente incorporadas à fração gelatinosa da MP; (3) A tripsina ligada à membrana é encontrada na MP, juntamente com a aminopeptidase microvilar (**Tabela I**) e (4) Os dados de imunocitoquímica confirmaram a presença de outras proteínas microvilares na MP (*figura 3.15*).

A secreção de amilase em *S. frugiperda* parece seguir uma rota similar à descrita para tripsina na região anterior do intestino médio, com a diferença que as vesículas de secreção contêm uma fração solúvel de moléculas derivadas das enzimas ligadas à membrana. Isso ocorreria por causa do aumento do pH no interior da vesícula (Jordão et. al., 1999). Neste trabalho, o modelo de secreção microapócrina é reforçado por dados de western blot, onde foi revelada a presença de amilase nas membranas microvilares e por dados de imunocitoquímica, mostrando a ocorrência de formas de amilase solúveis e ligadas à membrana (*figura*

3.13). Além disso, foram apresentados neste trabalho resultados confirmando a ocorrência de amilase ligada à membrana associada à MP. (Tabela I).

4.3- Secreção de peritrofinas e formação da MP de *S. frugiperda*

Há muito é dito que os insetos que possuem MP tipo 2 secretam essa estrutura somente na região da cárdia, enquanto os insetos que apresentam MP tipo 1 realizam essa secreção ao longo de todo o tubo digestivo. Entretanto, só recentemente poucos estudos mais sofisticados foram realizados envolvendo imunocitocalização com anticorpos anti-peritrofinas.

Neste trabalho, a peritrofina de 33kDa de *S. frugiperda* foi isolada e um anticorpo feito em coelho contra essa proteína mostrou pouca marcação nas vesículas da região posterior do intestino médio, que são bem maiores que as da região anterior. Essas vesículas são semelhantes às descritas por Harper & Granados (1999). Nas microvilosidades da região posterior são observados alguns grãos de ouro, provavelmente correspondentes à proteínas aderidas ao glicocálix. Raramente observa-se nessas células agrupamentos de grãos de ouro, exceto nas raras pequenas vesículas que aparecem nessa região do intestino médio.

A peritrofina de 33kDa é secretada pelas pequenas vesículas presentes em abundância nas células colunares da região anterior do intestino médio (*figuras 3.6 e 3.8*). No interior dessas vesículas, a localização da peritrofina detectada por nós indica que a proteína deve estar solúvel, pois os grânulos de ouro estão no interior da vesícula (*figura 3.8C*). Além disso, é frequente observar, nas microvilosidades da região anterior, grupos de grânulos de ouro. Talvez eles

correspondam à vesículas que estão unindo-se ou que acabaram de se unir à membrana microvilar.

Apesar desse inseto possuir MP tipo 1, a peritrofina de 33kDa é secretada somente pela região anterior do intestino médio. A secreção de peritrofinas pela região anterior do intestino médio também foi descrita na larva do Lepidoptera *Heliothis virescens* (Ryerse et. al., 1992), baseada em dados obtidos com a utilização de anticorpos contra todas as proteínas da MP desse inseto. Desse modo, o conceito de que MP tipo 1 é sintetizada ao longo de todo o intestino médio deve ser revisto.

A MP de *S. frugiperda* é composta por uma matriz sólida de quitina e proteínas e um material gelatinoso associado a essa matriz (fração gelatinosa). Uma vez que a peritrofina de 33kDa, amilase e a tripsina ocorrem nas mesmas vesículas de secreção presentes na região anterior do intestino médio, a formação da MP deve ocorrer de acordo com a seguinte hipótese: as vesículas de secreção com a tripsina e a amilase associadas à membrana e contendo as peritrofinas em seu interior migram do complexo de Golgi para a microvilosidade da célula. Durante esse percurso, um aumento gradual do pH no interior da vesícula solubiliza parte da amilase. As vesículas então saem do topo das microvilosidades, resultando em vesículas com dupla membrana que se fundem em uma única membrana. Durante esse processo, as peritrofinas e a maior parte da amilase são liberadas, enquanto que a tripsina é parcialmente solubilizada por proteólise limitada ou por dissolução das vesículas devido ao pH do lúmen. As membranas das vesículas remanescentes, com parte das enzimas ainda ligadas, são finalmente incorporadas à MP. As peritrofinas, por sua vez, provavelmente se associam com as microfibras de quitina para formar a MP.

A secreção microapócrina de peritrofinas provavelmente é uma adaptação para aumentar a dispersão do conteúdo das vesículas de secreção dentro do lúmen do intestino médio de tecidos que absorvem água, como a região anterior do intestino médio de insetos Lepidoptera (Santos et. al., 1984).

4.4-Papel da MP na imobilização de enzimas digestivas

O primeiro trabalho que descreveu a existência de enzimas digestivas parcialmente imobilizadas na MP foi publicado em 1979 (Terra et. al., 1979). Desde então vários estudos confirmaram este fato em diferentes insetos (Terra, 2000), apesar de somente em *S. frugiperda* terem sido realizadas determinações quantitativas de enzimas digestivas associadas com a MP, que indicaram que a MP pode conter 13 e 18% da atividade presente no lúmen do intestino médio de amilase e tripsina, respectivamente (Ferreira et. al., 1994a).

Conforme comentado anteriormente, N-acetilglicosaminidase é uma enzima encontrada majoritariamente no fluido ectoperitrófico de *Spodoptera frugiperda* (Ferreira et. al., 1994a). Essa enzima claramente ocorre na MP somente como um contaminante, levando-se em consideração a grande diferença encontrada nos valores de atividade específica do fluido ectoperitrófico e nas frações gelatinosa e fibrosa da MP (Tabela I). O fato da atividade enzimática encontrada na fração gelatinosa solúvel ser um pouco elevada (3,4% da atividade encontrada no lúmen do intestino médio) provavelmente ocorre em razão da atividade na MP ser muito baixa, o que leva a erros maiores nas determinações.

As distribuições das outras enzimas nas frações da MP e conteúdo alimentar diferem entre si (Tabela I). α -amilase é uma enzima encontrada principalmente no

espaço endoperitrófico, e que adsorve-se muito ao alimento (Ferreira et. al., 1994a). Assim sendo, a alta atividade específica encontrada na fração fibrosa pode ser explicada porque nesse sedimento devem ser encontrados pequenos fragmentos de alimento. O sedimento do conteúdo alimentar certamente possui grande quantidade de amilase adsorvida (Tabela I). A atividade específica exibida pela α -amilase no material particulado da fração gelatinosa deve corresponder à enzima ligada à membrana de vesículas incorporadas à MP. Essa atividade específica é maior do que a observada no sobrenadante da fração gelatinosa e no sobrenadante do fluido ectoperitrófico, que apresentam atividades específicas muito semelhantes.

A tripsina apresenta maior atividade específica no sedimento da fração gelatinosa, indicando que essa atividade corresponde àquela presente em membranas de vesículas incorporadas à MP. Diferente do observado para amilase, tripsina apresenta maior atividade específica no sobrenadante da fração gelatinosa do que no fluido ectoperitrófico.

O sobrenadante do fluido ectoperitrófico e da fração gelatinosa contém enzimas solúveis e que se encontram em compartimentos adjacentes. A diferença em atividade específica nessas duas frações para N-acetilglicosaminidase (maior no fluido ectoperitrófico), amilase (não difere nos dois compartimentos) e tripsina (maior na fração solúvel da MP) indicam que a MP seletivamente contém mais um tipo de enzima que outro. O simples aprisionamento de enzimas digestivas pela delaminação da MP deve ser muito pequeno, uma vez que a N-acetilglicosaminidase é encontrada com atividade específica muito baixa na MP. Talvez essas enzimas solúveis com atividade específica igual ou maior do que as observadas na fração solúvel do fluido ectoperitrófico (amilase e tripsina) possam aparecer nessa fração após a solubilização das vesículas que foram aprisionadas pela MP

A aminopeptidase apresenta uma distribuição no tubo digestivo de *S. frugiperda* muito diferente das demais enzimas. 80% da atividade de aminopeptidase ocorre nas células epiteliais, onde ela encontra-se majoritariamente ligada às membranas microvilares (Ferreira et. al., 1994a; Capella et. al., 1997). No espaço ectoperitrófico essa enzima aparece também predominantemente nas membranas das vesículas presentes nesse compartimento (Jordão et. al., 1999). A fração gelatinosa da MP pode conter as vesículas presentes no espaço ectoperitrófico (Jordão et. al., 1999) e que possuem aminopeptidase ligada à membrana. Essas vesículas poderiam ter sido aprisionadas na MP pela delaminação das camadas da MP. Entretanto, a atividade específica encontrada para aminopeptidase na fração gelatinosa é menor que a atividade específica encontrada nas membranas microvilares e nas vesículas do fluido ectoperitrófico (Tabela I, Ferreira et. al., 1994a). Nossa hipótese é que as vesículas que secretam aminopeptidase são mais facilmente solubilizadas no fluido ectoperitrófico do que as que secretam amilase e tripsina, antes de serem incorporadas à MP. A atividade específica significativa de aminopeptidase encontrada dentro da MP pode corresponder a um enzima minoritária, diferente da aminopeptidase microvilar (Ferreira et. al., 1994a).

Essa concentração de determinadas enzimas na MP talvez tenha um papel na digestão, como por exemplo aumentar a economia desse tipo de enzima diminuindo ainda mais sua excreção (por torná-la imobilizada) ou só permitir a passagem de pequenos fragmentos de proteína do espaço endo- para o ectoperitrófico, uma vez que seriam processados pela tripsina enquanto atravessam a MP. Apesar dessas hipóteses serem possíveis, a imobilização de enzimas digestivas na MP parece ser mais uma consequência da secreção microapócrina do que uma adaptação para aumentar a eficiência da digestão. Talvez os insetos que

não dispõem de formas inativas das suas proteinases digestivas (como zimógenos), controlam as atividades dessas enzimas através da sua ligação com a membrana, até o momento em que elas são liberadas para o lúmen do intestino médio. Essa imobilização de tripsina na membrana de vesículas de secreção até no momento da exocitose foi observada em *Musca domestica*, que não possui zimógeno (Jordão et. al., 1996b), enquanto que em *Stomoxys calcitrans* (que é um Diptera como *Musca domestica*), que possui zimógeno para tripsina, ela está solúvel nos grânulos de secreção (Jordão et. al., 1996a). Essa ligação à membrana das vesículas secretoras é observada em *S. frugiperda*. A presença da amilase ligada às membranas das vesículas de secreção provavelmente tem uma explicação semelhante à da tripsina. As células do intestino médio de *S. frugiperda* são ricas em glicogênio (Capella et. al., 1997) e a hidrólise descontrolada desse polímero poderia resultar em um choque osmótico letal.

4.5-Papel da MP na reciclagem de enzimas digestivas

Conforme comentado na introdução, entre as funções da MP está a circulação endo-ectoperitrófica de enzimas digestivas, que leva a um aumento na eficiência da digestão e à economia de enzimas digestivas. Embora várias evidências indiretas apoiem esse modelo, a única evidência direta que existia anteriormente era o fato de que uma quantidade excessiva de proteína administrada na dieta das larvas leva a uma diminuição no gradiente de tripsina ao longo do intestino médio e a um aumento na taxa de excreção dessa enzima (Terra & Ferreira, 1981; Espinosa-Fuentes & Terra, 1987). A existência do mecanismo de reciclagem de enzimas digestivas também pode ser testada

através da destruição da MP. Conforme esperado pelo modelo, as larvas de *S. frugiperda* alimentadas com calcoflúor e que tinham a sua MP desestruturada apresentaram uma diminuição no gradiente de tripsina e quimotripsina ao longo do intestino médio, que é claramente observado nas larvas controle (Tabela II). Provavelmente a circulação endo-ectoperitrófica está comprometida e a taxa de excreção das enzimas nas larvas alimentadas com calcoflúor deve ser maior.

A importância da MP na compartimentalização dos eventos digestivos em condições normais é provavelmente maior do que o seu papel na prevenção contra a infecção por microrganismos. Esta hipótese é reforçada pelos resultados observados por Wang & Granados (2000). Esses autores alimentaram a larva de *Trichoplusia ni* com calcoflúor e notaram uma alta taxa de mortalidade nas larvas com a MP desestruturada, mas nenhum sinal de infecção por microrganismos.

Esse trabalho apresenta uma importante contribuição ao modelo de circulação endo-ectoperitrófica de enzimas, uma vez que os experimentos relatados nesse ítem são a única evidência mais direta observada em insetos com MP tipo 1, onde a hipótese da ocorrência da circulação endo-ectoperitrófica tem sido contestada.

Referências Bibliográficas

- Alves L.C., Almeida P.C., Franzoni L., Juliano L. & Juliano M.A. (1996) - Synthesis of N α -protected aminoacyl 7-amino-4-methyl-coumarin amide by phosphorous oxychloride and preparation of specific fluorogenic substrates for papain. *Peptide Res.* **9**, 92-96.
- Barrett A.J., Rawlings N.D. & Woessner J.F. (1998) - *Handbook of proteolytic enzymes*-Academic Press, INC , Londres.
- Barry M.K., Triplett A.A. & Christensen A.C. (1999) A peritrophin-like protein expressed in the embryonic trachea of *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **29**, 319-327.
- Bauer L.S. (1995) Resistance: A threat to the insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Florida Entomol.* **78**, 414-443.
- Barbehenn R.V. & Martin M.M. (1994) Peritrophic envelope permeability in herbivorous insects. *J. Insect Physiol.* **41**, 303-311.
- Bignell D.E., Oskarsson H. & Anderson J. M. (1982) Formation of membrane-bound secretory granules in the midgut epithelium of a termite, *Cubitermes severus*, and a possible intercellular route of discharge. *Cell Tiss. Res.* **222**, 187-200.
- Blum H., Beier H. & Gross H. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis.* **8**, 93-99.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* **72**, 248-254.
- Capella A.N., Terra W.R., Ribeiro A.F. and Ferreira C. (1997). Cytoskeleton removal and characterization of the microvillar membranes isolated from two midgut regions of *Spodoptera frugiperda* (Lepdoptera). *Insect Biochem. Molec. Biol.* **27**, 793-801.

- Cristofolletti P.T., Ribeiro A.F. & Terra W.R. (2001) Apocrine secretion of amylase and exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Journal of Insect Physiology* **47**, 143-155.
- Davis, B.J. (1964) Disc electrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* **121**, 404-427.
- East I.J., Fitzgerald C.J., Pearson R.D., Donaldson R.A., Vuocolo T., Cadogan L.C., Tellam R.L. & Eisemann C.H. (1993) *Lucilia cuprina*: inhibition of larval growth induced by immunization of host sheep with extracts of larval peritrophic membrane. *International Journal for parasitology*. **23**, 221-229.
- Edwards M.J. & Jacobs-Lorena M. (2000) Permeability and disruption of the peritrophic matrix and cecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. *J. Insect Physiol.* **46**, 1313-1320.
- Eisemann C.H. & Binnington K.C. (1994) The peritrophic membrane: its formation, structure, chemical composition and permeability in relation to vaccination against ectoparasitic arthropods. *International Journal for Parasitology*. **24**, 15-26.
- Erlanger BF, Kokowsky N, Cohen W, (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **95**, 271-278.
- Espinosa-Fuentes F.P., Ferreira C., Terra W.R. (1984) Spatial organization of digestion in the larval and imaginal stages of the sciarid fly *Trichosia pubescens*. *Insect Biochem* **14**, 631-638.
- Espinosa-Fuentes F.P. & Terra W.R. (1987) Physiological adaptations for digesting bacteria. Water fluxes and distribution of digestive enzymes in *Musca domestica* larval midgut. *Insect Biochem.* **17**, 809-817.
- Ferreira C., Bellinello G.L., Ribeiro A.F. & Terra W.R. (1990) Digestive enzymes associated with the glycocalyx, microvillar membranes and secretory vesicles from midgut cells of *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochem.* **20**, 839-847.

- Ferreira C., Capella A.N., Sitnik R. & Terra W.R. (1994a) Digestive enzymes in midgut cells, endo- and ectoperitrophic contents and peritrophic membranes of *Spodoptera frugiperda* (Lepdoptera) larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, **26**, 299-313.
- Ferreira C., Capella A.N., Sitnik R. & Terra W.R. (1994b) Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 107 A, 631-640.
- Ferreira C., Ribeiro A.F., Garcia E.S. & Terra W.R. (1988) Digestive enzymes trapped between and associated with the double plasma membranes of *Rhodnius prolixus* posterior midgut cells. *Insect Biochemistry*. **18**, 521-530.
- Ferreira C., Ribeiro A.F. & Terra W.R. (1981) Fine structure of the larval midgut of the fly *Rhynchosciara americana* and its physiological implications. *Journal of Insect Physiology*. **27**, 559-570.
- Ferreira C. & Terra W.R. (1980) Intracellular distribution of hydrolases in midgut caeca cells from an insect with emphasis on plasma membrane-bound enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **66B**, 467-473.
- Ferreira C. & Terra W.R. (1989) Spatial organization of digestion, secretory mechanisms and digestive enzyme properties in *Pheropsophus aequinoctialis* (Coleoptera: Carabidae). *Insect Biochemistry*. **19**, 383-391.
- Firmino F., Fernandes K.V.S., Sales M.P., Gomes V.M., Miranda M.R.A., Domingues S.J.S. & Xavier J. (1996) Cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins associate with putative chitinous structures in the midgut and feces of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. *Brazilian Journal of medical and Biological Research*. **29**, 749-756.
- Graf R., Raikhel A.S., Brown M.R., Lea A.O. & Briegel H. (1986) Mosquito trypsin: immunocytochemical localization in the midgut of blood-fed *Aedes aegypti* (L.) *Cell Tis. Res.* **245**, 19-27.

- Harper M.S. & Granados R.R. (1999) Peritrophic membrane structure and function of larval *Trichoplusia ni* with an investigation on the secretion patterns of a PM mucin. *Tissue & Cell*. **31**, 202-211.
- Harper M.S. & Hopkins T.L. (1997) Peritrophic membrane structure and secretion in european corn borer larvae (*Ostrinia nubilalis*). *Tissue & Cell*, **29**, 463-475.
- Jacobs-Lorena M. & Oo M.M. (1996) The peritrophic matrix of insects. In: Beaty B., Marquardt W. (Eds) *Biology of disease vectors: a molecular, physiological and population approach*. University Press of Colorado, Denver, 318-332.
- Jordão B.P., Capella A.N., Terra W.R., Ribeiro A.F., Ferreira C. (1999). Nature of the anchors of membrane-bound aminopeptidase, amylase and trypsin and secretory mechanisms in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) midgut cells. *J. Insect Physiol.* **45**,29-37.
- Jordão B.P., Lehane M.J., Terra W.R., Ribeiro A.F. & Ferreira C. (1996a) An imunocytochemical investigation of trypsin secretion in the midgut of the stablefly, *Stomoxys calcitrans*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **26**, 445-453.
- Jordão B.P. & Terra W.R. (1989) Distribution, properties and functions of midgut carboxypeptidases and dipeptidases from *Musca domestica* larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **11**, 231-244.
- Jordão B.P., Terra W.R., Ribeiro A.F., Lehane M.J. & Ferreira C. (1996b) Trypsin secretion in *Musca domestica* larval midguts: a biochemical and imunocytochemical studies. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **26**, 337-346.
- Jouanin L., Bonadé-Bottino M., Girard C., Morrot G. & Giband M. (1998) Transgenic plants for insect resistance. *Plant Science.* **131**, 1-11.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₇. *Nature* **227**, 680-685.
- Lehane M.J. (1997) Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology* **42**, 525-550.

- Lemos F.J.A., Ribeiro A.F. & Terra W.R. (1993) A bacteria-digesting midgut-lysozyme from *Musca domestica* (Diptera) larvae. Purification, properties and secretory mechanism. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **23**, 533-541.
- Lemos L.J.A. & Terra W.R. (1992) A high yield preparation of *Musca domestica* larval midgut microvilli and the subcellular distribution of amylase and trypsin. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **22**, 433-438.
- Matsudaira P. (1987). Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* **262**, 10035-10038.
- Martin J.S. & Kirkham J.B. (1989) Dynamic role of microvilli in peritrophic membrane formation. *Tissue & Cell* . 627-638.
- Mc Gaughey W.H. & Whalon M.E. (1992). Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science* **258**, 1451-1455.
- Moffatt M.R. & Lehane M.J. (1990) Trypsin is stored as na inactive zymogen in the midgut of *Stomoxys calcitrans*. *Insect Biochem.* **20**, 719-723.
- Morton R.E. & Evans T.A. (1992) Modifications of the bicinchoninic acid protein assay to eliminate lipid interference in determining lipoprotein protein content. *Anal. Biochem.* **204**,332-334.
- Moskalyk L.A., Mo M.M.& Jacobs-Lorena M. (1996) Peritrophic matrix proteins of *Anopheles Gambiae* and *Aedes aegypti* *Insect Molecular Biology.* **5**, 261-268.
- Noelting G. & Bernfeld P. (1948) Sur les enzymes amylolytiques. III. La b-amylase: dosage d'activité et contrôle de l'absence d'a-amylase. *Helv. Chim. Acta.* **31**, 286-290.
- Parra, J.R.P., (1986). Criação de insetos para estudos com patógenos. In Alves, SB. (Ed.), Controle microbiano de insetos. Editora Manole, São Paulo, pp.348-373.
- Peters W. (1992) Peritrophic membranes. Springer-Verlag. Berlin.

- Peters W. & Latka I. (1986) Electron microscopic localization of chitin using colloidal gold labelled with wheat germ agglutinin. *Histochemistry*. **84**, 155-160.
- Read S.M. & Northcote D.H. (1981) Minimization of variation in the response to different proteins of the comassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.* **116**, 53-64.
- Reynolds E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 208-212.
- Ryerse J.S., Purcell J.P. & Sammons R.D. (1994) Structure and formation of the peritrophic membrane in the larva of the southern corn rootworm, *Diabrotica undecimpunctata*. *Tissue and Cell*. **26**, 431-437.
- Ryerse J.S., Purcell J.P., Sammons R.D. & Lavrik P.B. (1992) Peritrophic membrane structure and formation in the larva of a moth, *Heliothis*. *Tissue Cell*. **24**, 751-771.
- Sales M.P., Gomes V.M., Fernandes K.V.S & Xavier J. (1996) Chitin-binding proteins from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **29**, 319-326.
- Santos C.D., Ferreira C. & Terra W.R. (1983) Consumption of food and spatial organization of digestion in the cassava hornworm, *Erinnys ello*. *J. Insect Physiol.* **29**, 707-714.
- Santos C.D., Ribeiro A.F., Ferreira C. & Terra W.R. (1984) The larval midgut of the cassava hornworm (*Erinnys ello*). Ultrastructure, fluid fluxes and the secretory activity in relation to the organization of digestion. *Cell Tiss. Res.* **237**, 565-574.
- Santos C.D., Ribeiro A.F. & Terra W.R. (1986) Differential centrifugation, calcium precipitation and ultrasonic disruption of midgut cells of *Erinnys ello* caterpillars. Purification of cell microvilli and inferences concerning secretory mechanisms. *Can. J. Zool* **64**, 490-500.

- Schmitz J., Preiser H., Maestracci D., Ghosh B.K., Cerda J. & Crane R.K. (1973) Purification of the human intestinal brush border membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* **323**, 98-112.
- Shen Z. & Jacobs-Lorena M. (1998) A type I peritrophic matrix protein from the malaria vector *Anopheles gambiae* binds to chitin. Cloning, expression and characterization. *J. Biol. Chem.* **273**, 17665-17670.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. & Klenk D.C. (1985) Measurements of proteins using bicinchoninic acid. *Anall. Biochem.* **150**, 76-85.
- Stefanini M., De Martino C. & Zamboni L. (1967) Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, **216**, 173-174.
- Tellam R.L. (1996) The peritrophic matrix. In *The Insect midgut* (Lehane MJ Billingsley P.F.ads.) *Chapman and Hall*, London pp.86-114.
- Tellam R.L. & Eisemann C.H. (1998) Inhibition of growth of *Lucilia cuprina* larvae using serum from sheep vaccinated with first-instar larval antigens. *International Journal of Parasitology.* **28**, 439-450.
- Tellam R.L. & Eisemann C.H. (2000) Chitin is only a minor component of the peritrophic matrix from larvae of *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **30**, 1189-1201.
- Tellam R.L., Eisemann C., Casu R. & Pearton R. (2.000) The intrinsic peritrophic matrix protein peritrophin-95 from larvae of *Lucilia cuprina* is synthesised in the cardia and regurgitated or excreted as a highly immunogenic protein. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **30**, 9-17.
- Tellam R.L., Wijffels G. & Willadsen P. (1999) Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **29**, 87-101.
- Terra W.R. (1996) Evolution and function of insect peritrophic membrane. *J. Braz. Ass. Adv.Sci.* **48**, 317-324.

- Terra W.R. (2000) Origin and function of the structures separating food and midgut cells in insects. (submetido à publicação).
- Terra W.R. & Ferreira C. (1981) The physiological role of the peritrophic membrane and trehalase: digestive enzymes in the midgut and excreta of starved larvae of *Rhynchosciara Americana*. *J. Insect Physiol.* **27**, 325-331.
- Terra W.R. & Ferreira C. (1983) Further evidence that enzymes involved in the final stages of digestion by *Rhynchosciara americana* do not enter the endoperitrophic space. *Insect Biochemistry.* **13**, 143-150.
- Terra W.R., Ferreira C. & Bastos F. (1985) Phylogenetic considerations on insect digestion: Dissaccharidases and the spatial organization of digestion in the *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochem.* **15**, 443-449.
- Terra W.R., Ferreira C. & De Bianchi A.G. (1979) Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. *J. Insect Physiol.*, **25**, 486-494.
- Terra W.R. & Jordão B.P. (1989) Final digestion of starch in *Musca domestica* larvae. Distribution and properties of midgut α -D-glucosidases and glucoamylase. *Insect Biochem.* **19**, 285-292.
- Towbin H., Stehelin T. & Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocelulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. Acta* **571**, 4350-4354.
- Ugolev A.M. & Tsvetkova V.A. (1986) The intestinal glycocalyx- In *Molecular and Cellular Basis of Digestion*. Ed. by Desnuelle P., Sjöström A. & Morén O. Elsevier, Amsterdam.
- Wang P. & Granados R.R. (1997a) An intestinal mucin is a target substrate for a baculovirus enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 6977-6982.
- Wang P. e Granados R.R. (1997b). Molecular cloning and sequencing of a novel invertebrate intestinal mucin cDNA. *J. Biol. Chem.* **272**, 16663-16669.

Wang P & Granados R.R. (2000) Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **30**, 135-143.

Wood A.R. & Lehane M.J. (1991) Relative contributions of apocrine and eccrine secretion to digestive enzyme release from midgut cells of *Stomoxys calcitrans* (Insecta: Diptera). *J. Insect Physiol.* **20**, 1079-1085.