

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

“PAPEL DA TREALOSE NO METABOLISMO  
DE LARVAS DE *Pyrearinus termitilluminans*  
(COLEOPTERA: ELATERIDAE) SOB ESTRESSE HÍDRICO”

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**MOACIR ALUISIO TORRES**

ACADÊMICO

**PROF. Dr. ETELVINO J.H. BECHARA**

DEPARTAMENTO de Bioquímica, IQ – USP

ORIENTADOR

São Paulo, 02 outubro de 2003

*Ainda me lembro de um momento na meninice  
em que minha Mãe pacientemente lia pra mim “As Aventuras de Turuna” e da  
primeira visita à biblioteca da cidade  
ao lado de meu Pai que me explicava tudo por ali.*

§

*...Ciente da impossibilidade de retribuir a altura e sem a pretensão de que um dia  
possa, agradeço aos meus pais por todas as chances que negadas a eles, foram por eles  
mesmos, concedidas a mim...*

## AGRADECIMENTOS

É sempre uma tarefa difícil declinar os constituintes de um rol de pessoas ligadas direta ou indiretamente ao objetivo alcançado no final de um trabalho. Portanto expressarei aqui, numa tentativa e não mais do que isso, minha gratidão no conjunto de alguns nomes.

Ao meu orientador Prof. Dr. Etelvino Bechara, inalcançável pelo exemplo, seriedade, dedicação e confiança. Minha gratidão a ele pelo crescimento ao me permitir fazer parte de seu grupo de pesquisa.

Aos meus amigos do laboratório Dutra, Leandro, Brian, Carlos e Adriana V. com os quais, além de química e bioquímica, muito me ensinaram sobre convivências, relacionamentos e expectativas.

A minha amiga Adriana que, como a batuta que firme à mão do maestro orquestra, conduz com destreza as atividades do laboratório com vistas à harmonia do conjunto.

As longas viagens não seriam tão curtas não fosse a agradável companhia do meu amigo Sanches. Agradeço também a Dóris pela dedicação e delicadeza no cuidado com os insetos. Ao meu aluno de IC Paulo de Ávila Jr. Pelo auxílio nas medidas das enzimas antioxidantes.

Um agradecimento em particular ao Prof. Dr. H. Terensi de Ribeirão Preto por me fornecer ainda no período de padronização das técnicas, cepas de *H. grisea* como fonte de trealase. A Prof<sup>ª</sup>. B. Cordenunsi, por gentilmente ceder o equipamento cromatográfico para análise dos açúcares com o imprescindível auxílio do Alberto, técnico responsável e prestativo.

Ao meu amigo Cassius que, entre lições de *rock-and-roll* e culinária, ainda encontra tempo pra me falar de coisas como pesquisa, ciência e desenvolvimento tecnológico, uma das pessoas mais impressionantes que já conheci.

Um agradecimento inundado de sentimentos à Camila, meu bem maior, pelos inúmeros momentos de compreensão quando eu estava ausente, imerso nos meus afazeres e por todos os momentos que passamos juntos, sempre e incondicionalmente inesquecíveis.

As agências FAPESP e CNPq e ao programa PRONEX pelo pelas bolsas e auxílios concedidos.

A todas as pessoas que eventualmente não foram aqui mencionadas e que colaboraram de uma maneira ou de outra para a execução desse trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

## RESUMO

Entre centenas de espécies brasileiras de pirilampos, o *Pyrearinus termitilluminans* é o único cujo ciclo de vida se passa integralmente nos cupinzeiros luminosos localizados no Brasil central claramente observados durante a estação das chuvas. A emissão de luz nos elaterídeos tem a função de atração de presas para a alimentação. A bioluminescência desses animais desaparece nos meses de seca juntamente com a nuvem de presas aladas. Assim, o metabolismo de trealose aqui estudado poderia prover informações sobre a capacidade da larva de sobreviver em ambientes edáficos. As concentrações de trealose e glicose são determinadas nos extratos de larvas com um sistema DIONEX® de cromatografia iônica. A trealase foi medida com 17 mM de trealose. O glicogênio foi estimado com uma amiloglicosidase. Paralelamente o estresse oxidativo associado com a restrição de água foi monitorado através da determinação do TBARS, juntamente com a catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase. Nas larvas submetidas ao ensaio na câmara climática (25% de umidade) a trealase ( $159,69 \pm 10,95$  mU/animal) estava 80 vezes mais alta do que a do grupo controle ( $2,02 \pm 1,41$  mU/animal). As larvas sob estresse apresentaram distintos níveis de trealose e glicose ( $29,85 \pm 3,20$   $\mu$ mol/animal e  $18,27 \pm 0,82$   $\mu$ mol/animal, respectivamente) quando comparadas com o grupo controle ( $64,61 \pm 1,54$   $\mu$ mol/animal e  $2,16 \pm 0,11$   $\mu$ mol/animal, respectivamente). A elevação dos níveis das enzimas antioxidantes (4, 4,3 e 2,4 vezes respectivamente) com níveis invariáveis de TBARS apontam para a ação antioxidante contra a produção elevada de espécies reativas de oxigênio. Os insetos submetidos à restrição hídrica perderam aproximadamente 35% do peso. O aumento da atividade da trealase, com concomitante decréscimo dos níveis de trealose, sugerem que esse açúcar poderia ser usado como fonte hídrica. Entretanto, os níveis de glicose, 10 vezes mais elevados no grupo sob estresse poderia ser usado na via de biossíntese de trealose uma vez que os níveis de glicogênio estão diminuídos. As mudanças no metabolismo de trealose e o desbalanço no equilíbrio redox, poderiam fornecer importantes informações fisiológicas desses insetos sob estresse hídrico.

## ABSTRACT

The life cycle of *Pyrearinus termitilluminans* (Coleoptera: Elateridae) takes place totally into the so-called "luminous termite mounds" located in Central Brazil, which are clearly observed during the rainy season. Light emission by the elaterid larvae acts like a trap attracting flying insects. The bioluminescence disappears in the dry months together with the food supply. The trehalose metabolism study described here could provide information about larva capacity to survive throughout hard climatic changes. Trehalose and glucose concentrations are determined in the larva extracts with a DIONEX® ion chromatography system. The trehalase activity was measured with 17 mM trehalose. The glycogen level was estimated with amyloglucosidase. In parallel oxidative stress associated to water deprivation was evaluated through determination of TBARS and the catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase activities. In larvae submitted to dryness in a growth chamber (25% humidity) we have found 80-fold higher trehalase activity ( $159.69 \pm 10.95$  mU/animal) than in the control group raised under room conditions ( $2.02 \pm 1.41$  mU/animal). Stressed larvae showed distinct trehalose and glucose contents ( $29.85 \pm 3.20$   $\mu$ mol/animal and  $18.27 \pm 0.82$   $\mu$ mol/animal, respectively) when compared with the control group ( $64.61 \pm 1.54$   $\mu$ mol/animal and  $2.16 \pm 0.11$   $\mu$ mol/animal, respectively), whereas the glycogen level was lower ( $11.53 \pm 2.01$  mg/animal and  $28.26 \pm 2.31$  mg/animal, respectively). Elevation of the antioxidant enzyme levels (4-fold, 4.3-fold and 2.4-fold respectively) with maintenance of TBARS pointed to depletion to exacerbated production of reactive oxygen species. Insects submitted to water restriction lost about 35% wet weight. The observed increase of trehalase activity and concomitant decrease of trehalose level suggest that trehalose could be used as a metabolic water source. Moreover, the 10-fold higher glucose level in the stressed group could be used by the trehalose biosynthetic pathway as the glycogen level decreases in parallel. The trehalose metabolic and redox balance changes described here may shed light on the yet unknown physiological mechanisms of larval elaterid adaptation to water stress.

## ABREVIATURAS

**CAT** – CATALASE

**EPR** – RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA DE ELÉTRONS

**EDTA** – ÁCIDO ETILENODIAMINOTETRAACÉTICO

**EROs** – ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

**GSH** – GLUTATIONA REDUZIDA

**GSSG** – GLUTATIONA OXIDADA

**GPx** – GLUTATIONA PEROXIDASE

**GR** – GLUTATIONA REDUTASE

**HPAE-PAD** – CROMATOGRAFIA DE TROCA ANIÔNICA DE ALTA PRESSÃO COM DETECÇÃO  
AMPEROMÉTRICA PULSADA

**PUFA** – ÁCIDO GRAXO POLIINSATURADO

**Pi** – FOSFATO INORGÂNICO

**PPi** – PIROFOSFATO INORGÂNICO

**P<sub>O<sub>2</sub></sub>** – PRESSÃO PARCIAL DE O<sub>2</sub>

**TPS** – TREALOSE-6-FOSFATO SINTASE

**TPP** – TREALOSE-6-FOSFATO FOSFATASE

**TRH** – TREALASE

**t-BOOH** – *tert*-BUTILHIDROPERÓXIDO

**TBARS** – ESPÉCIES REATIVAS COM O ÁCIDO TIOBARBITÚRICO

**TBA** – ÁCIDO TIOBARBITÚRICO

## ÍNDICE

ÍNDICE.....	6
1. INTRODUÇÃO .....	8
1.1 Aspectos abordados na pesquisa com <i>P. termitilluminans</i> .....	8
1.2 Crescimento larval e estratégias de alimentação .....	9
1.3 Estratégias adaptativas a ambientes edáficos .....	10
1.3.1 Estresse hídrico e oxidativo .....	11
1.3.2 Bioluminescência como sistema antioxidante .....	12
1.3.3 Proteção antioxidante .....	13
1.4 Carboidratos de reserva nos insetos .....	13
1.4.1 Glicogênio e a sua função .....	14
1.4.2 A Trealose .....	14
1.4.2.1 Biossíntese de trealose .....	15
<input type="checkbox"/> Síntese a partir de glicogênio .....	16
<input type="checkbox"/> Síntese a partir da gliconeogênese .....	16
1.4.2.2 Degradação de trealose .....	17
2. JUSTIFICATIVA .....	18
3. OBJETIVOS .....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	20
4.1 Coleta .....	20
4.1.1 Manutenção das larvas e instalação da câmara climática .....	21
4.2 Grupos amostrais .....	21
4.3 Programação da câmara climática .....	21
4.4 Homogenato das larvas .....	22
4.5 Ensaio bioquímicos .....	22
4.5.1 Padronização, determinação e quantificação dos açúcares .....	22
4.5.2 Análise dos açúcares nas amostras biológicas .....	23
4.5.3 Padronização, determinação e quantificação do glicogênio .....	23
4.5.4 Análise de glicogênio nas amostras biológicas .....	23
4.5.5 Configuração do equipamento e condições experimentais .....	24
4.5.6 Determinações enzimáticas .....	25
4.5.6.1 Trealase (E.C.: 3.2.1.28) .....	25
4.5.6.2 Catalase (E.C.: 1.11.1.6) .....	26
4.5.6.3 Glutaciona Peroxidase (E.C.: 1.11.1.9) .....	26
4.5.6.4 Glutaciona Redutase (E.C.: 1.8.1.7) .....	26

4.5.7 Dano Celular.....	26
4.5.8 Determinação de proteínas e tratamento estatístico .....	27
5. RESULTADOS .....	28
5.1 Expedições ao cerrado .....	28
5.2 Testes e ensaios de resistência hídrica e nutricional .....	28
5.3 Status dos principais açúcares.....	29
5.4 Trealase .....	30
5.5 Níveis de Glicogênio .....	31
5.6 Enzimas antioxidantes .....	32
5.7 Dano celular.....	34
6. DISCUSSÃO .....	35
7. CONCLUSÕES .....	42
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43

## 1. INTRODUÇÃO

“*La fixité du milieu interieur est la condition de la vie libre.*” (Claude Bernard – 1813-1878)<sup>1</sup>

Processos evolutivos em insetos sob distintos ambientes os têm levado a uma considerável especialização ao nível morfológico, fisiológico e bioquímico. Algumas dessas especializações são características da Classe *Insecta*, como por exemplo o exoesqueleto impermeável e o sistema excretor com uma considerável sofisticação para evitar a perda excessiva de água<sup>2</sup>. Entretanto outras especializações em insetos, são representativas de um determinado *taxon* ou *taxa* em particular.<sup>3</sup> Exemplos de relações intra-específicas existentes na classe *Insecta* como as vespas parasitas (Hymenoptera: Stephanidae)<sup>4</sup> ou como as formigas escravagistas (Hymenoptera: Formicidae)<sup>5</sup> figuram entre as mais intrigantes e espetaculares manifestações evolutivas do planeta.

No entanto, entre centenas de espécies brasileiras de pirilampos, o *Pyrearinus termitilluminans* (Coleoptera: Elateridae), descrito por Costa,<sup>6</sup> é o único cujo ciclo de vida se passa integralmente dentro dos cupinzeiros, distribuídos nos cerrados do Brasil central. A relação ecológica entre esse elaterídeo e isópteras (*Cornitermes cumulans.*, *Paracornitermes* sp., *Spinitermes* sp., *Embiratermes* sp.) resulta no espetáculo dos "cupinzeiros luminosos" dos cerrados,<sup>7</sup> observados há mais de um século por naturalistas alemães<sup>8</sup> e estudados mais recentemente por Redford,<sup>9</sup> Bechara<sup>10</sup> e Santos.<sup>11</sup>

### 1.1 Aspectos abordados na pesquisa com *P. termitilluminans*

Duas décadas após a descrição da biologia e caracterização taxonômica do elaterídeo *P. termitilluminans* por Costa,<sup>6</sup> o Prof. Bechara e seu grupo continuam produzindo informações sobre a ecologia e a vida bioluminescente desses insetos.<sup>7,10,12-16</sup>

Igualmente importantes são os trabalhos desenvolvidos pelo grupo com o objetivo de caracterizar a atividade bioluminescente como um antigo mecanismo de detoxificação de O<sub>2</sub> prevenindo o estresse oxidativo. Trabalhos preliminares com insetos luminescentes e não luminescentes<sup>17</sup> e pesquisas<sup>14</sup> com câmaras de atmosfera controlada e inibidores de luciferase *in vivo*,<sup>18,19</sup> ou na presença de 20-hidroxi-ecdizona,<sup>20</sup> estimulante da metamorfose, mudas e reprodução de insetos, reforçam essa hipótese. Estudos da pressão parcial de O<sub>2</sub> no interior do protorax de *P. termitilluminans* utilizando a técnica de EPR *in vivo*<sup>21</sup> e medida da cinética de difusão de oxigênio da traquéia aos fotócitos,<sup>22</sup> feitos em associação com o



Centro de Estudos em EPR do *Dartmouth Medical School*, estabeleceram conexões entre estados de hipóxia e hiperóxia com a emissão de luz.

Outros trabalhos também compõem esse amplo espectro de estudos sobre *P. termitilluminans*:

- Abordagens sobre digestão extra-corpórea.<sup>23</sup>
- Identificação da luciferina, espectros de emissão e determinação da energia de ativação do sistema luciferina/luciferase em ovos de desses insetos.<sup>24</sup>
- Identificação dos precursores de luciferina.<sup>25</sup>
- Estudos abordando o mecanismo de modulação de emissão de cor nas luciferases de lampirídeos e elaterídeos<sup>26</sup>
- Clonagem e caracterização molecular de DNA complementar de luciferase de *P. termitilluminans*.<sup>27</sup>

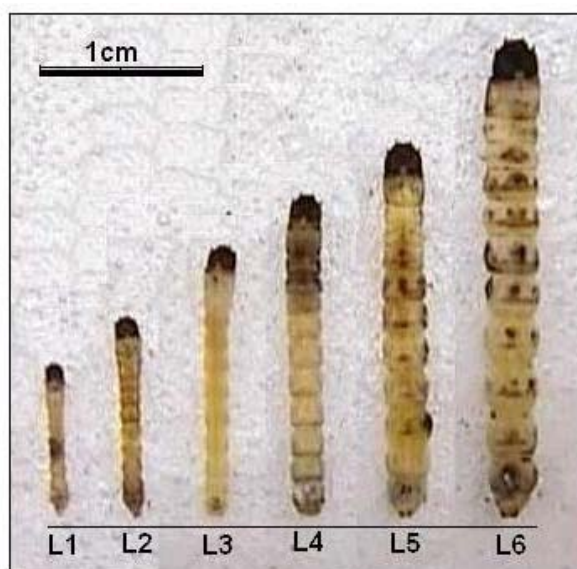
## 1.2 Crescimento larval e estratégias de alimentação

Como em todos os animais, o crescimento larval de insetos (Fig. 01) está intimamente relacionado com a aquisição de alimento e sua imediata ou oportuna utilização.<sup>28</sup> Somando-se a isso, a presença do exoesqueleto vincula o crescimento à ciclicidade de mudas, permitindo a extensão corpórea entre ecdises (estádios larvais) ou entre apólises (ínstares larvais).<sup>2,29</sup>

O fenômeno dos cupinzeiros luminosos, decorrente de uma estratégia singular de alimentação, é mais visível durante a estação das chuvas, entre outubro e dezembro, em noites precedidas por dias quentes, úmidos e sem vento, logo após o pôr-do-sol. Sob essas condições, centenas de pontos luminosos verdes polvilham a superfície dos cupinzeiros, resultantes da ação predatória das larvas de *P. termitilluminans* sobre cupins e formigas alados atraídos pela luz.<sup>6,9,10</sup>

Moldagem dos túneis com poliestireno e observações de campo revelaram como se dá o processo de infestação dos cupinzeiros pelo elaterídeo<sup>10</sup>. Fêmeas fecundadas de *P. termitilluminans* depositam os ovos na superfície do solo imediatamente próximo ao cupinzeiro. Após eclosão, as larvas de primeiro ínstar, se alimentam do *meiofauna* (organismos intersticiais) e iniciam a escalada para o topo do cupinzeiro mediante uma rede intrincada de túneis escavados paralelos à camada mais externa do mesmo. Alguns destes túneis aprofundam-se perpendicularmente para cerca de 10 cm da superfície e, após uma curva em U, se estendem de volta à superfície apresentando uma dilatação (átrio) para estocagem das presas capturadas.

É interessante notar que esse fenômeno de migração de larvas ao longo do cupinzeiro gera uma estratificação por idade, sendo que no topo dos cupinzeiros encontram-se larvas mais desenvolvidas, pupas, indivíduos adultos e um número reduzido de larvas em ínstares iniciais.<sup>10</sup>



**Figura 01** – Estádios de crescimento larval de *P. termitilluminans*. Foto originalmente em cores, realizada durante o dia com câmera digital sem *flash* (Mavica FD-7) com resolução de 640X480 pixels.

No período das chuvas, portanto, sabe-se com detalhes como as larvas de elaterídeos se alimentam. No período da seca, no entanto, quando desaparece a luminescência dos cupinzeiros e, concomitantemente, as nuvens de presas aladas, não se sabe ainda como ou mesmo se essas larvas se alimentam. Cabe aqui, relatar duas observações acidentais ocorridas no laboratório, porém, não menos relevantes: **(i)** A pesquisadora Dra. C. Costa do Museu de Zoologia da USP, que descreveu a biologia e taxonomia de *P. termitilluminans*, relatou que ovos desidratados de elaterídeos, quando deixados em prateleira, eclodiram normalmente quando re-hidratados (comunicação pessoal) e **(ii)** Prof. Dr. E.J.H. Bechara (comunicação pessoal) observou que larvas de *P. termitilluminans*, esquecidas em prateleira sobreviveram durante aproximadamente 3 meses sem água ou alimentação e, posteriormente, quando foram umedecidas e alimentadas, desenvolveram-se normalmente.

### 1.3 Estratégias adaptativas a ambientes edáficos

O ambiente terrícola proporciona uma variedade de habitats que, devido à localização geográfica ou mesmo devido a circunstâncias temporais, podem tornar-se extremamente agressivos para muitos organismos. Assim, é necessário por parte do indivíduo dispor de uma série de mecanismos para viabilizar a sua subsistência.

Uma enorme variedade de animais desenvolveu, ao longo da evolução, a capacidade de sobreviver em condições extremas, como congelamento e desidratação.<sup>30</sup> Essa capacidade é traduzida segundo uma pletera de mecanismos adaptativos variáveis, de

acordo com o *taxon* e o nível de organização biológica desses organismos. No entanto, sob o ponto de vista celular e molecular, essas adaptações são ubíquas, em virtude da relativa uniformidade das estruturas e funções celulares.<sup>31</sup>

### 1.3.1 Estresse hídrico e oxidativo

Muito dos mecanismos usados por insetos ativos para manter o balanço hídrico pode não estar disponível em indivíduos que, por mudanças climáticas ou por escassez de alimentos, tiveram que diminuir sua atividade metabólica. Sabe-se que a água é indispensável para o funcionamento da maquinaria bioquímica de uma célula e que em situações ordinárias pode-se obter água diretamente ou por ingestão de alimentos.<sup>30</sup> Entretanto, sob elevada dessecação pode ocorrer o fenômeno da anidrobiose,<sup>32-34</sup> um estado quiescente induzido pela desidratação.<sup>35</sup> Esse fenômeno é conhecido e ocorre em plantas e animais, tendo sido documentado em larvas de insetos,<sup>36</sup> ovos de crustáceos,<sup>37</sup> em todos os estádios de desenvolvimento de algumas espécies de *collembola*<sup>38</sup> e em pequenos invertebrados como crustáceos,<sup>39</sup> rotíferos,<sup>40</sup> nemátodas<sup>41</sup> e tardígrados.<sup>42,43</sup> Tecidos nessas condições, sofrem dano ao nível celular, nas membranas por fusão e alteração da temperatura de transição de fase e em proteínas por desmantelamento da estrutura terciária.<sup>44</sup>

Em decorrência do sistema traqueal de entrega de O<sub>2</sub> diretamente aos tecidos por difusão gasosa e também pela demanda excepcional de O<sub>2</sub> durante a atividade de vôo.<sup>45</sup>, a classe *Insecta* está sujeita à ação de espécies reativas de oxigênio (EROs)<sup>46</sup>. Estima-se que 98% do O<sub>2</sub> consumido por organismos aeróbicos, sejam reduzidos até H<sub>2</sub>O,<sup>47</sup> através da ação da citocromo oxidase (aa<sub>3</sub>),<sup>48,49</sup> sem a concomitante geração de EROs.<sup>50</sup> Não obstante, o principal sítio de formação de ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), proveniente da redução unieletrônica do oxigênio,<sup>47</sup> está localizado na cadeia respiratória mitocondrial,<sup>51</sup> correspondendo à cerca de 2% do oxigênio consumido.<sup>47,52</sup> O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gerado, essencialmente, em mitocôndrias e peroxissomos, possui atividade oxidante e elevada capacidade de difusão.<sup>53</sup> A produção de radical hidroxil (•OH) intracelular a partir da redução do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por O<sub>2</sub><sup>•-</sup> na presença de íons metálicos, tem grande significado biológico devido à sua elevada reatividade e nocividade.<sup>53-56</sup> Apesar de sua concentração intracelular extremamente baixa (10<sup>-18</sup> M) e na reduzidíssima vida-média (10<sup>-9</sup> s), esta espécie tem papéis importantes no surgimento e evolução de quadros patológicos em organismos aeróbicos. Seus efeitos sobre as estruturas biológicas são processos contínuos<sup>57</sup> e estão presentes mesmo em condições de normóxia e em organismos aeróbicos sadios.<sup>53</sup>

Contudo, os insetos, similarmente a outros organismos, estão sob a égide de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Tab. 01), controlando em grande medida a ação das EROs.<sup>58,59</sup> Da mesma forma, a presença de açúcares confere proteção aos organismos em estados anidrobióticos ou sob condições restritivas menos estressantes (Fig. 04).

### 1.3.2 Bioluminescência como sistema antioxidante

A bioluminescência, ou seja, emissão de luz “fria” por organismos vivos é uma via importante de consumo de O<sub>2</sub>.<sup>60</sup> O sistema enzimático (luciferase/luciferina) pelo qual o vaga-lume (Lampyridae) produz bioluminescência é bastante conhecido e mostrado ser essencialmente o mesmo nas três famílias de coleópteros (Lampyridae, Elateridae e Phengodidae).<sup>24,26,61</sup> A reação consiste na adição de oxigênio molecular à estrutura da luciferina previamente adenilada pela luciferase, produzindo um intermediário dioxetânico termo-instável que, quando descarboxilado, gera oxiluciferina no estado excitado singlete (fluorescente). Esse composto então volta ao estado fundamental emitindo luz que pode variar de  $\lambda_{\text{max}} = 565$  nm (verde-amarelada) até  $\lambda_{\text{max}} = 615$  nm (vermelha), dependendo das condições do meio (ácido/básico) ou das características do emissor (forma cetônica/forma enólica) (Fig. 02).<sup>62,63</sup>

Não é nova a hipótese de que a bioluminescência pode estar relacionada com um antigo mecanismo de detoxificação de O<sub>2</sub> tendo a única e restrita função de consumir O<sub>2</sub>, mas que foi mais tarde, na história evolutiva, recrutada para prover mecanismos de sinalização biológicos.<sup>64</sup> Essa possibilidade tem sido objeto de intenso debate. O apoio a essa idéia<sup>15,17,18,20,65-67</sup> vem do fato de que sistemas bioluminescentes utilizam O<sub>2</sub> para oxidar o substrato, evidenciando assim um mecanismo de *scavenging* (seqüestrador) de oxigênio e também por que a reação bioluminescente é altamente exergônica (-200 kJmol<sup>-1</sup>), deslocando a reação acentuadamente para formação de produtos, tornando o consumo de oxigênio irreversível, sendo o sistema otimizado mesmo com pequenas concentrações de luciferina e luciferase.<sup>67</sup>

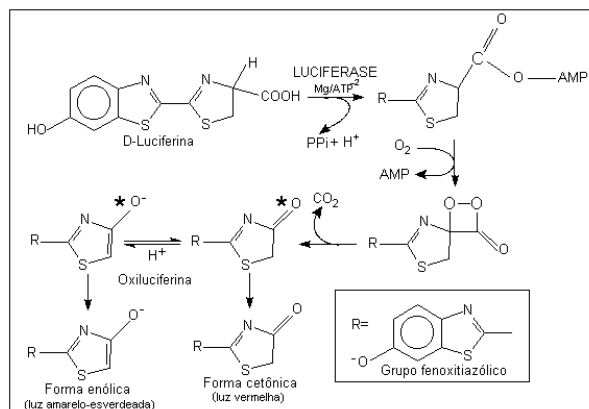


Figura.02- Via enzimática de geração de bioluminescência em vaga-lumes.<sup>18</sup>

Assim, ainda que seja refutada essa função primordial do sistema luciferina/luciferase,<sup>68-70</sup> a “utilização fútil” do oxigênio nos organismos em uma atmosfera originalmente redutora, sendo posteriormente *exaptada*<sup>71</sup> como forma de sinalização devido ao aumento da emissão luminosa já em ambiente oxidativo, parece bastante razoável, carecendo no entanto ainda de confirmações.

### 1.3.3 Proteção antioxidante

Halliwell<sup>53</sup> define como antioxidante “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas a de um substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação deste substrato”. Esta definição compreende compostos de natureza enzimática e não enzimática (Tab. 01). Através de diferentes mecanismos, as EROs são destruídas de forma a impedir reações posteriores de propagação<sup>72</sup>.

**Tabela 01** - Resumo das principais defesas antioxidantes nos sistemas biológicos<sup>72</sup>

SISTEMA	FUNÇÃO
<p><b><u>Não Enzimáticos</u></b>  <math>\alpha</math> - Tocoferol  <math>\beta</math> - Caroteno                      Licopeno                      Ubiquinol 10                      Ácido ascórbico                      Ácido úrico                      Glutathione</p>	<p>Inibidor de lipoperoxidação                      Supressor de <math>^1O_2</math> (Oxigênio singlete)                      Supressor de <math>^1O_2</math>                      Seqüestrador de radicais                      Várias funções antioxidantes                      Seqüestrador de radicais                      Várias funções antioxidantes</p>
<p><b><u>Enzimáticos</u></b>                      Superóxido dismutase (E.C.: 1.15.1.1)                      Catalase (E.C.: 1.11.1.6)                      Glutathione peroxidase (E.C.: 1.11.1.9)</p>	<p>Dismutação do <math>O_2^{\bullet-}</math>                      Decomposição <math>H_2O_2</math> a <math>O_2</math> e <math>H_2O</math>                      Redução de peróxidos</p>
<p><b><u>Enzimáticos auxiliares</u></b>                      Glutathione Redutase (E.C.: 1.6.4.2)</p>	<p>Regeneração de GSH                      (a partir de GSSG/NADPH)</p>

### 1.4 Carboidratos de reserva nos insetos

Carboidratos, juntamente com proteínas e lipídeos, contribuem para a estrutura e função de todos os tecidos dos insetos.<sup>73</sup> Os dois carboidratos de reserva prevalentes nos insetos são o polissacarídeo glicogênio e o dissacarídeo trealose.<sup>74</sup> Em certos insetos, os níveis totais de açúcar são extremamente altos. A larva de *Trichiocampus populi* (Hymenoptera: Tenthredinidae) que, após um pré-congelamento, pode sobreviver quase 2 h em nitrogênio líquido, possui até 9% do peso úmido em açúcar e mais de 97% desse açúcar é trealose.<sup>75</sup> Por outro lado, abelhas, de hábitos solitários, como *Ceratina flavipes* (Hymenoptera: Ceratinidae), que contêm 15% do peso em açúcares totais detêm apenas 4 mg/g de trealose, um nível similar ao de insetos que não toleram invernos muito rigorosos.<sup>76</sup>

### 1.4.1 Glicogênio e a sua função

O corpo gorduroso é o maior sítio de deposição de glicogênio nos insetos.<sup>77,78</sup> É uma forma fácil de disponibilizar glicose para outros tecidos quando convertida em trealose, o açúcar circulante do sangue. Glicogênio também é estocado na musculatura alar de insetos como fonte imediata de glicose para combustível de vôo.<sup>79</sup>

### 1.4.2 A Trealose

É um dissacarídeo não redutor de glicose ( $\alpha$ -D-glicopiranosil-1, 1- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo) (Fig. 03), primeiramente isolado e identificado na hemolinfa de *Antheraea polyphemus* (Lepidoptera: Saturniidae) nos estádios de larva e pupa.<sup>80</sup> No mesmo ano, Howden e Kilby<sup>81</sup> descreveram o açúcar em *Schistocerca gregaria* (Orthoptera: Acrididae) e Evans e Dethier<sup>82</sup> determinaram a presença de trealose em *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae). Desde então, poucos insetos têm sido caracterizados como *atrealósicos*, excetuando-se algumas famílias de Dípteras (Calliphoridae, Sarcophagidae e Muscidae).<sup>83</sup>

Esse açúcar ocupa uma posição central no metabolismo de carboidratos em insetos<sup>84</sup> e atuam como fonte energética dos tecidos banhados pela hemolinfa (Fig. 05), gerando o dobro da quantidade de energia por partícula osmoticamente ativa (e.g. glicose). Isso é entendido como uma importante adaptação dos insetos voadores.<sup>85</sup> Esse papel especial foi primeiramente reconhecido com estudos em *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae).<sup>80</sup> Assim, ao contrário da glicose,<sup>84</sup> a trealose é o principal carboidrato encontrado na hemolinfa de insetos,<sup>86</sup> onde está presente em altas concentrações (0,06 M),<sup>59,74,85,87,88</sup> permitindo elevadas taxas de utilização de trealose pelos músculos durante o vôo, mesmo sob a dependência de um sistema circulatório primitivo.<sup>89</sup>

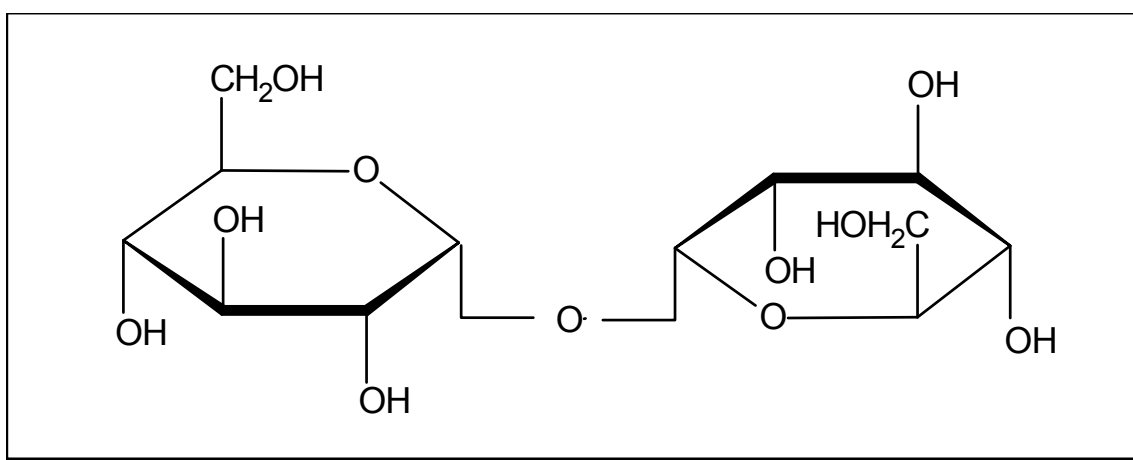
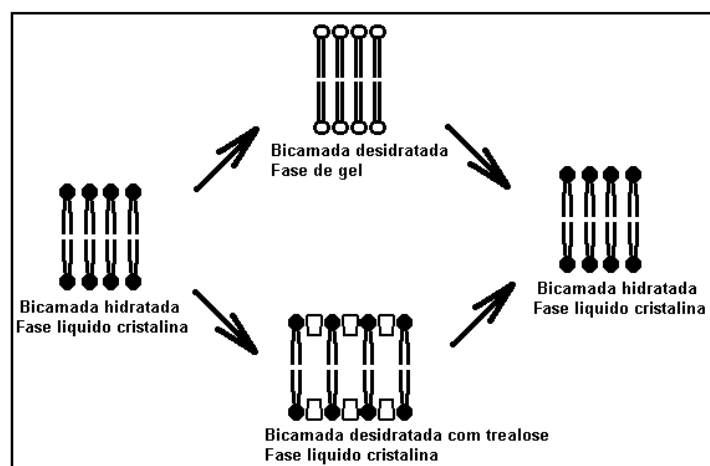


Figura 03 - Estrutura da  $\alpha$ -D-glicopiranosil-1,1- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo (trealose)

Um aspecto muito importante da trealose é que essa molécula se apresenta como um importante agente de proteção de biomoléculas. Membranas e várias proteínas podem ser estabilizadas através da ligação com trealose.<sup>34,44,90-96</sup> Essa capacidade protetora resulta da formação de pontes de hidrogênio entre o dissacarídeo e a região polar dos fosfolipídeos. As porções polares dos fosfolipídios das membranas são, normalmente, hidratadas, estando essas extremidades separadas por moléculas de água.



**Figura 04** - Ilustração do mecanismo de estabilização dos lipossomas desidratados na presença de trealose.<sup>97</sup>

Quando a membrana é severamente desidratada, a carência de água aumenta a probabilidade de formar-se um denso agregado por intensificarem-se as interações de Van der Waals entre as porções apolares dos fosfolipídeos. Como resultado, a membrana adquire menor fluidez, passando de uma fase líquido-cristalina para uma fase de gel. Com a formação desses agregados, a membrana sofre rachaduras que causarão seu rompimento e conseqüentemente, o extravasamento do conteúdo celular durante a re-hidratação. Quando a célula é desidratada em presença de trealose (Fig. 04), essa temperatura de transição de fase diminui, fazendo com que a estrutura líquido-cristalina se mantenha, o que previne a ocorrência de rupturas e evita a morte celular.<sup>97-99</sup>

A capacidade protetora também é exercida sobre proteínas, mantendo sua estrutura terciária, sugerindo assim uma função de chaperonina à trealose.<sup>100</sup>

#### 1.4.2.1 Biossíntese de trealose

A conversão *in vivo* de monossacarídeos disponíveis da dieta em trealose tem sido demonstrada em vários insetos.<sup>101-104</sup> A administração *in vitro* de glicose radioativa aos corpos gordurosos e determinação posterior de trealose radioativa, demonstrou que a síntese de trealose ocorre no citossol (Fig. 05) das células que constituem o corpo gorduroso de *S. gregaria*,<sup>105,106</sup> *P. Regina*,<sup>102</sup> *B. mori*<sup>107</sup> e de *Hyalophora cecropia* (Lepidoptera: Saturniidae).<sup>108</sup> Além de ser sintetizada a partir de monossacarídeos da dieta,

a trealose pode ser obtida a partir do glicogênio estocado e por gliconeogênese a partir de uma variedade de precursores.<sup>85</sup>

Embora o corpo gorduroso seja o maior sítio de produção de trealose, outros tecidos podem, mesmo que com restrições, participar na produção do açúcar.<sup>109-111</sup> Segundo Bailey<sup>109</sup> os tecidos muscular e intestinal podem ser sítios de síntese de trealose. A biossíntese de trealose no corpo gorduroso de *S. gregaria*<sup>106,112</sup> e em culturas de células de *Antheraea eucalypti* (Lepidoptera: Saturniidae)<sup>113</sup> usa a mesma via encontrada nos fungos,<sup>114</sup> processando-se em duas reações: A primeira é a formação de trealose-6-fosfato catalisada pela  $\alpha,\alpha$ -trealose-6-fosfato sintase (TPS) (E.C.: 2.4.1.15) utilizando UDP-glicose. A segunda é a clivagem hidrolítica do composto fosforilado catalisada pela trealose-6-fosfato fosfatase (TPP) (E.C.: 3.1.3.12).<sup>112,115</sup>

A regulação da síntese de trealose pode ocorrer em dois níveis: **(i)** Regulação hormonal da conversão de glicogênio a trealose e **(ii)** Regulação por *feedback* pela trealose formada. A inibição da síntese de trealose pelo produto tem sido evidenciada em várias espécies tais como *B. morri*, *P. regina* e *Blaberus discoidalis* (Blattaria: Blaberidae) e esse mecanismo é visto como uma maneira de regular a concentração de trealose na hemolinfa.<sup>85</sup>

#### □ Síntese a partir de glicogênio

A enzima chave que inicia a quebra do glicogênio é a glicogênio fosforilase e, em geral, o aumento da atividade dessa enzima leva a um aumento da concentração de trealose.<sup>85,116</sup> No entanto, a ativação dessa enzima não necessariamente resulta no aumento de trealose, pois a glicose-6-fosfato pode alternativamente servir para a glicólise. Recentes trabalhos mostram que a síntese de trealose pode ser estimulada por hormônios hipertrealossêmicos<sup>117</sup> em *Blaptica dubia*<sup>118,119</sup> (Blattaria: Blaberidae) inibindo a produção de frutose-2,6-bifosfato.<sup>120</sup>

#### □ Síntese a partir da gliconeogênese

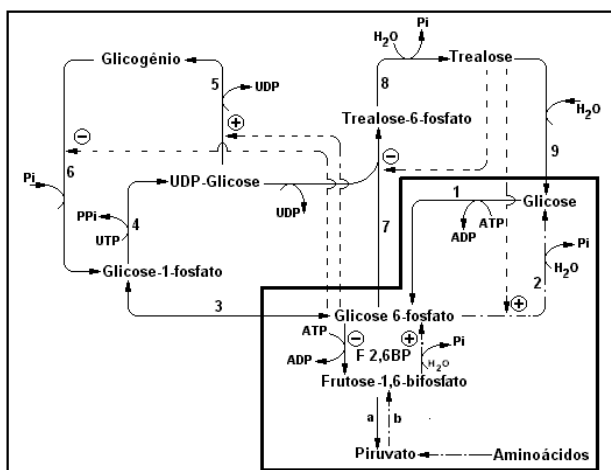
Gliconeogênese é a síntese de carboidratos a partir de precursores como aminoácidos, lactato e glicerol. A capacidade dos insetos de fazer gliconeogênese foi registrada pela primeira vez por Wigglesworth ao estudar *Aedes aegyptis* (Diptera: Culicidae) sob estresse nutricional.<sup>121</sup> Desde então a existência da via tem sido demonstrada em várias espécies tais como, *Periplaneta americana* (Blattaria: Blattidae),<sup>122</sup> *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae),<sup>123</sup> *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae),<sup>124</sup> utilizando-se precursores marcados. Uma investigação minuciosa sobre as enzimas da gliconeogênese em corpo gorduroso de *P. americana*, demonstra que a atividade e a distribuição intracelular das enzimas é muito similar às encontradas em mamíferos.<sup>125</sup>



A síntese de trealose por gliconeogênese deve ser mais importante em situações onde a injeção de carboidratos está limitada, como poderia ocorrer em muitas espécies quando em depressão metabólica sob estresse hídrico, ou em de vôos migratórios ou ainda em espécies cuja dieta em carboidratos é naturalmente inexpressiva.<sup>85</sup>

### 1.4.2.2 Degradação de trealose

A trealose é hidrolisada (Fig. 05) pela ação da enzima trealase (TRH) (E.C.: 3.2.1.28). Estudos indicaram que em *Sarcophaga barbata* (Diptera: Sarcophagidae) a reação envolve a inversão de configuração de uma das duas moléculas de glicose produzida, o que é consistente com um mecanismo SN<sub>2</sub> (substituição nucleofílica bimolecular).<sup>126</sup> As TRHs têm sido isoladas como enzimas solúveis no conteúdo intestinal e hemolinfa de insetos como em *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae),<sup>127</sup> *H. cecropia*,<sup>128</sup> *B. discoidalis*,<sup>129</sup> *P. Regina*,<sup>130</sup> em outros tecidos em *Pastronygylus megistus* (Hemíptera: Reduviidae)<sup>131</sup> e *P. americana*.<sup>132</sup> Essas enzimas também ocorrem ligadas ao retículo endoplasmático de *H. cecropia*<sup>128</sup> e *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae), em membranas de mitocôndrias de musculatura alar de *P. Regina*,<sup>133</sup> *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) e *Sarcophaga bullata* (Diptera: Sarcophagidae).<sup>134</sup> Muitos insetos possuem elevadas concentrações de TRH na hemolinfa e corpo gorduroso. Porém, essas enzimas estão sob forma de pró-enzima. O mecanismo fisiológico pelo qual um inseto converte a pró-enzima e em forma ativa de TRH ainda precisa ser elucidado.<sup>74</sup>



**Figura 05** – Diagrama simplificado do conjunto de interações entre glicose, trealose e glicogênio em células do corpo gorduroso de insetos. Os números representam as enzimas da via. São elas: (1) Hexoquinase; (2) Glicose-6-fosfato fosfatase; (3) Fosfoglicomutase; (4) UDP-Glicose pirofosforilase; (5) Glicogênio sintetase; (6) Glicogênio fosforilase; (7) Trealose-6-fosfato sintase; (8) Trealose-6-fosfato fosfatase; (9) Trealase. A região destacada refere-se às reações da glicólise (a) e da gliconeogênese (b). Esquema confeccionado a partir dos trabalhos de Wyatt,<sup>78</sup> Bailey,<sup>109</sup> Sacktor<sup>135</sup> e Candy.<sup>85</sup>

## 2. JUSTIFICATIVA

A resistência de larvas de *P. termitilluminans* ao estresse hídrico foi constatada preliminarmente em laboratório por "secagem" intencional destas larvas em estufa, sem que perdessem sua vitalidade. Aventamos então, a partir de informações sobre trealose como estabilizador de proteínas e membranas,<sup>136-138</sup> protegendo bactérias,<sup>139</sup> leveduras,<sup>137,140</sup> nematóides,<sup>141</sup> insetos<sup>142,143</sup> e crustáceos<sup>34</sup>, como fonte de energia possibilitando a germinação de corpos de frutificação,<sup>144</sup> permitindo o vôo de insetos<sup>102</sup>, como componentes estruturais em *Mycobacterium smegmatis*,<sup>145</sup> como agente termotolerante sendo induzida<sup>146</sup> ou funcionando como uma *HSP-like*,<sup>147</sup> ou ainda como fonte de água metabólica,<sup>148</sup> que esse açúcar desempenha um papel fundamental em larvas de *P. termitilluminans* quando submetidas a um recesso alimentar e a uma restrição hídrica natural (nos cupinzeiros) ou induzida (em laboratório).

Estes estudos poderão gerar informações relevantes para a compreensão da interação cupim/pirilampo no cerrado, bem como, esclarecer os mecanismos adaptativos que esses insetos disponibilizaram ao longo de milhões de anos, com o fim último da sobrevivência.

### 3. OBJETIVOS

A pergunta central deste projeto de pesquisa refere-se ao envolvimento da trealose no mecanismo bioquímico pelo qual larvas de *P. termitilluminans* sobrevivem durante o inverno sem recrutamento alimentar e com deficiência no aporte hídrico, já que a trealose é reconhecida como uma biomolécula estabilizadora de proteínas e membranas.

Para tanto, propôs-se o estudo dos parâmetros bioquímicos do metabolismo de trealose no elaterídeo, sob estresse hídrico e nutricional, mediante o uso de uma câmara climática Binder KBWF<sup>®</sup> em condições pré-estabelecidas e de um sistema DIONEX<sup>®</sup> de cromatografia líquida de troca iônica de alta pressão, associado a um detector com amperometria pulsada (HPAE-PAD). As metas específicas perseguidas nesse trabalho foram:

- Estabelecimento dos níveis médios de trealose, trealose-6-fosfato, glicose, glicose-6-fosfato, glicose-1-fosfato e glicogênio e
- Determinação da atividade da enzima trealase envolvida na degradação de trealose.

Entretanto, sabendo-se que sob condições hídricas restritivas, o aporte de O<sub>2</sub> aos tecidos banhados pela hemolinfa fica comprometido em virtude do aumento progressivo da viscosidade, procurou-se estabelecer um ponto de concurso entre estresse hídrico e oxidativo. Dessa forma, parte do projeto envolveu o estudo de enzimas antioxidantes em *P. termitilluminans*. As etapas para esta caracterização incluíram:

- Determinação das atividades das enzimas antioxidantes catalase e glutationala peroxidase;
- Determinação da atividade da enzima glutationala redutase e
- Avaliação dos níveis médios de dano celular por lipoperoxidação através da medida de substâncias reativas com o ácido tiobarbiturico (TBARS).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta

Durante o período de execução experimental do projeto de mestrado (03/2001 – 05/2003) quatro expedições foram organizadas, tendo como um dos objetivos a coleta de larvas de *P. termitilluminans*. A primeira foi efetuada do dia 14 ao dia 20 de outubro de 2001, já no fim da primavera e a segunda no verão de 2002, entre os dias 20 a 25 de janeiro. A terceira expedição teve início na segunda semana da primeira quinzena do mês de julho, do dia 07 ao dia 13, sendo portanto efetuada no ápice do período invernal. Na última semana da primeira quinzena do mês de novembro de 2002, teve lugar a última expedição pertinente ao projeto. Em cada uma das coletas seguiu-se o mesmo protocolo utilizado em coletas anteriores: larvas foram coletadas dos cupinzeiros luminosos logo após o pôr-do-sol nos campos cerrados do extremo norte de Mato Grosso do Sul, na cidade de Costa Rica (Fazenda Santo Antônio), aproximadamente 30 quilômetros ao oeste do Parque Nacional das Emas – GO. Sendo de coleta trabalhosa, as larvas inicialmente foram removidas das galerias dos cupinzeiros, mediante o uso de picareta e mãos. Os grandes blocos removidos dos cupinzeiros, foram quebrados manualmente em pequenos pedaços. Prontamente, as larvas identificam-se nos torrões com a região do pró-tórax bioluminescente. Sob condições ideais, cada cupinzeiro fornece em média de 80 indivíduos, sendo que aproximadamente 30% desses têm uso imediato, pois são larvas em ínstares L5 ou L6 pesando aproximadamente 100 mg (Fig. 01). As larvas restantes, de ínstares menores, são criadas em laboratório para uso posterior. Após coleta, as larvas foram acondicionadas em frascos com terra do próprio cupinzeiro, estando assim, prontas a serem transportadas em uma viagem de 1200 km de volta ao laboratório.

No laboratório, as larvas foram examinadas (aproximadamente 20% da coleta se perdem em função de agressões decorrentes do transporte ou de manuseio inadequado no momento da coleta) e logo após, umedecidas, pesadas e acondicionadas em frascos com terra do próprio cupinzeiro em uma sala com temperatura controlada (Fig. 06).<sup>10</sup>



**Figura 06** Larvas de *P. termitilluminans* acondicionadas em frascos na sala de larvas. Foto originalmente em cores, realizada durante o dia com câmera digital sem *flash* (Mavica FD-7) com resolução de 640X480 pixels.

#### 4.1.1 Manutenção das larvas e instalação da câmara climática

Acondicionadas em uma sala especialmente designada para essa atividade, as larvas de *P. termitilluminans*, sob condicionamento de ar e umidade (22°C e 80% UR), foram devidamente numeradas e catalogadas. Sendo que, até o momento do ensaio as larvas haviam sido monitoradas e alimentadas a cada quinzena sendo concorrentemente pesadas, inspecionadas e umedecidas uma vez por mês.

A instalação da câmara climática Binder KBWF 240<sup>®</sup> com a qual é possível controlar temperatura, umidade e ciclo claro-escuro, imprescindível à execução do projeto, exigiu uma gama de acessórios como linha e filtros hidráulicos, controle de condutividade da água bem como interface com computador para acionamento e controle automáticos dos ensaios de temperatura, umidade e luminosidade. Essa instalação providenciada durante o período do mestrado gerou radical reformulação e re-alocação dos animais na sala de larvas.

#### 4.2 Grupos amostrais

Os ensaios bioquímicos foram feitos em dois grupos idealizados da seguinte maneira: Grupo A – Grupo de 20 larvas escolhidas entre os ínstaes L5 e L6 e pesando em média 120 mg. Outros aspectos como, mobilidade, aparência e agressividade, foram considerados na escolha das larvas. Grupo B – Conjunto de 50 larvas, escolhidas segundo os mesmos critérios do grupo anterior, submetidas ao estresse hídrico e nutricional na câmara climática de condições constantes, durante o período de dez dias, sob condições previamente estabelecidas (Fig. 07). Ambos os grupos não foram alimentados durante os ensaios.

#### 4.3 Programação da câmara climática

Para realização dos testes, os animais foram retirados dos frascos, pesados e limpos e recolocados nos mesmos, sendo em seguida submetidos à câmara climática sob uma célula de programação com 10 repetições (10 dias). Posteriormente o mesmo ensaio foi repetido porém, com 33 larvas.

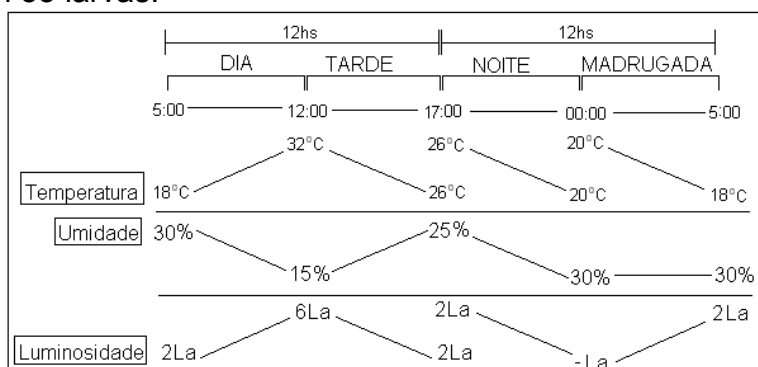
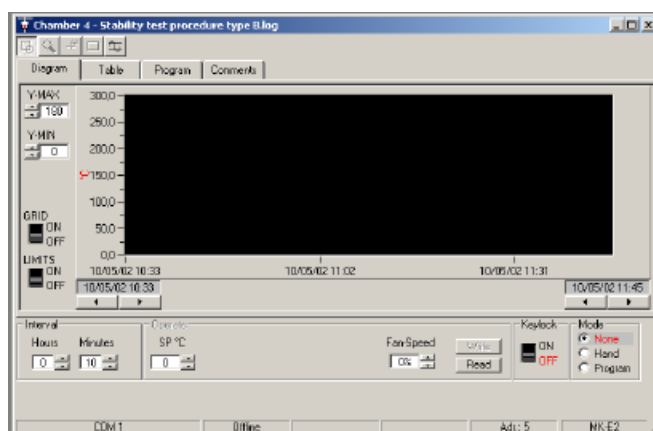


Figura 07 – Célula de programação da câmara climática de condições constantes Binder - KBWF 240<sup>®</sup>.

Todo monitoramento dos parâmetros durante os dez dias de ensaio foi acompanhado por intermédio de um computador (Fig. 08) utilizando-se o software APT-COM<sup>®</sup>. Contudo, as larvas, mesmo nas câmaras, foram observadas periodicamente (uma vez a cada dois dias) com o intuito de verificar a integridade dos animais sob tais condições restritivas.



**Figura 08** – Tela principal do software APT-COM<sup>®</sup> que permite o controle automático de temperatura, umidade e luminosidade da câmara climática.

#### 4.4 Homogenato das larvas

Para determinação de cada parâmetro enzimático e não enzimático, as larvas do grupo A e B, homogêneas quanto ao seu estágio larval, foram inicialmente anestesiadas em gelo seco durante 15 min,<sup>149</sup> e em seguida colocadas numa solução fisiológica de Ringer<sup>150</sup>. Logo após, utilizando um papel filtro, foram limpas e o excesso da solução eliminado, sendo finalmente pesadas.

O extrato foi preparado utilizando-se aproximadamente 1500 mg de larvas inteiras sem distinção de sexo ( $\pm 10$  larvas em estádios L5 e L6) com diluição de 15% (w/v), durante 80 segundos em tampão fosfato de sódio 120 mM pH 7,0<sup>151</sup> com 2 mM de feniltiourea,<sup>152,153</sup> para evitar escurecimento do homogenato por melanização da hemolinfa.<sup>154</sup> Utilizou-se um homogenizador Tekmar<sup>®</sup> dotado de um rotor axial de 21000 rpm, sendo o homogenato posteriormente centrifugado a 12000 g<sup>155</sup> durante 15 min a 4°C.

#### 4.5 Ensaios bioquímicos

##### 4.5.1 Padronização, determinação e quantificação dos açúcares

A determinação enzimática de trealose gerada pela hidrólise do dissacarídeo com TRH<sup>156-163</sup> e posterior determinação da glicose liberada pelo método da glicose oxidase com o-dianizidina como cromóforo derivatizante ( $\lambda = 420$  nm)<sup>164-168</sup> é um método bastante aceito e amplamente divulgado. No entanto, a determinação direta da trealose sem derivatizante e com a utilização de um sistema DIONEX<sup>®</sup> de cromatografia líquida iônica de alta pressão,

associado a um detector com amperometria pulsada (HPAE-PAD)<sup>169</sup>, além de ser avançado do ponto de vista tecnológico, mostrou-se mais preciso e eficiente. Assim, após prévia exposição do projeto de mestrado à professora Beatriz Rosana Cordenunsi pesquisadora do Laboratório de Química e Bioquímica de Alimentos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP que dispõe desse equipamento, decidiu-se em comum acordo que as determinações de açúcares como trealose, sacarose, glicose e suas formas fosfatadas (glicose-6-fosfato e glicose-1-fosfato) bem como trealose-6-fosfato<sup>170-172</sup> fossem conduzidas em seu laboratório.

Para a construção da curva de calibração, utilizou-se alíquotas diluídas em H<sub>2</sub>O Milli-Q<sup>®</sup> contendo de 7,5 a 180 µM de trealose, 1 a 40 µM de glicose, 2,5 a 80 µM sacarose, 10 a 400 µM de glicose-6-fosfato, 0,5 a 20 µM de glicose-1-fosfato e de trealose-6-fosfato.

#### 4.5.2 Análise dos açúcares nas amostras biológicas

Imediatamente após a centrifugação do homogenato dos grupos amostrais, uma alíquota de de 2 mL do sobrenadante de cada grupo foi filtrada em uma unidade Millipore Millex-GV<sup>®</sup> com 0,22 µm de poro, sendo em seguida submetida (*vial* com 1000 µL) à análise no sistema cromatográfico.

#### 4.5.3 Padronização, determinação e quantificação do glicogênio

Os níveis de glicogênio foram avaliados por método enzimático, utilizando-se amiloglicosidase (E.C.: 3.2.1.3),<sup>173</sup> uma exoglicosidase que hidrolisa as ligações α-D-(1-4) e α-D-(1-6) do glicogênio<sup>174</sup> sem a necessidade de extração prévia do glicogênio do tecido.<sup>175-180</sup>

Para a construção da curva de calibração do glicogênio, alíquotas de 11,5; 23; 46 e 92 µg de glicogênio puro em um volume de 1150 µl de tampão acetato 100 mM pH 4,6 com 30 mM de CaCl<sub>2</sub> foram incubadas com 3,5 U de amiloglicosidase<sup>181</sup> por 1 h a 55°C com agitação. A reação foi interrompida colocando os tubos com meio reacional em água fervente durante 3 min. A glicose liberada foi submetida a análise cromatográfica.

#### 4.5.4 Análise de glicogênio nas amostras biológicas

Para determinação de glicogênio na amostra uma alíquota de 50 µl do extrato filtrado foi submetida ao meio reacional contendo 1150 µl de tampão acetato 100 mM pH 4,6 com 30 mM de CaCl<sub>2</sub> incubadas com 3,5 U de amiloglicosidase por 1 h a 55°C com agitação. A

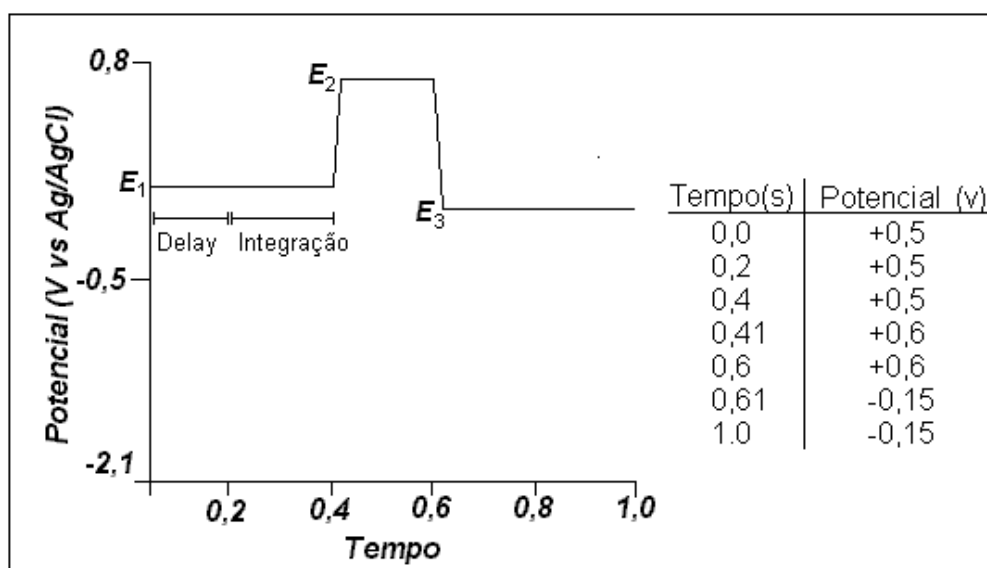
reação foi interrompida colocando os tubos com meio reacional em água fervente durante 3 min, com posterior determinação da glicose.

#### 4.5.5 Configuração do equipamento e condições experimentais

O equipamento utilizado foi um DIONEX<sup>®</sup> DX500<sup>®</sup> acoplado a um detector amperométrico pulsado DIONEX<sup>®</sup> ED40<sup>®</sup> munido de uma bomba ternária DIONEX<sup>®</sup> GP40<sup>®</sup> e de um injetor automático DIONEX<sup>®</sup> AS50<sup>®</sup> com um *loop* de 25  $\mu$ l.

A célula de detecção do DIONEX<sup>®</sup> ED40<sup>®</sup> continha um eletrodo de trabalho de ouro<sup>170</sup> de 1 mm de diâmetro e um eletrodo de referência de Ag/AgCl. Para separação dos carboidratos o sistema foi conectado a uma coluna analítica de troca iônica DIONEX<sup>®</sup>CarboPac<sup>™</sup> PA1 (250 X 4 mm D.I.) e uma guarda-coluna DIONEX<sup>®</sup>CarboPac<sup>™</sup> PA1 (50 X 40 mm D.I.)<sup>171</sup>, ambas contendo uma matriz de 10  $\mu$ m de diâmetro revestida de poliestireno/divinilbenzeno associada ao poliacrilato *MicroBead*<sup>™</sup> de 500 nm e funcionalizado com um sal quaternário de amônio altamente estável nos potenciais hidrogeniônicos de 0 – 14.<sup>172</sup>

A detecção por amperometria pulsada foi realizada de acordo com os parâmetros das *waveforms* abaixo tabelados e esquematizados.



**Figura 09** – Diagrama (direita) da seqüência de pulso para detecção dos carboidratos. Onde  $E_1$  é o potencial onde a oxidação do carboidrato é medida.  $E_2$  é um potencial que deve ser alto e suficientemente longo para oxidar a superfície do eletrodo até que todos os produtos de oxidação dos carboidratos sejam completamente removidos. O último potencial  $E_3$  deve ser baixo o suficiente para reduzir a superfície oxidada do eletrodo. Tabela (esquerda) mostra os parâmetros das *waveforms*.

A separação dos carboidratos foi obtida com um gradiente de NaOH e acetato de sódio (Tab. 03). Nos primeiros 7 min produziu-se um fluxo isocrático de NaOH 10 mM. Em seguida, um gradiente linear foi formado em 13 min aumentando a concentração de NaOH



de 10 para 50 mM. Nos próximos 25 min, obteve-se um gradiente linear de 50 mM NaOH a 50 mM NaOH mais 400 mM de acetato de sódio. Com 45 min de eluição, todos os açúcares já haviam passado pelo detector. Os próximos 25 min foram utilizados para remoção do acetato de sódio e para retornar a coluna à sua condição inicial para a próxima análise.

**Tabela 03** – Programa de eluição para separação de carboidratos em uma coluna de troca iônica DIONEX® CarboPac PA1

Tempo (min)	Eluentes <sup>a</sup>		
	A(%)	B(%)	C(%)
0	10	90	0
7	10	90	0
20	50	50	0
45	10	50	40
45,1	50	50	0
60	50	50	0
60,1	10	90	0
70	10	90	0

<sup>a</sup>Soluções: A= 100 mM NaOH, B= Água deionizada, C= 100 mM NaOH + 1 M de acetato de sódio. Todas as soluções foram feitas em água deionizada.

#### 4.5.6 Determinações enzimáticas

Todas as análises enzimáticas foram feitas no sobrenadante dos homogenatos dos dois grupos amostrais.

##### 4.5.6.1 Trealase (E.C.: 3.2.1.28)

O ensaio da atividade de TRH realizou-se em um volume de 1000 µl, contendo, 17 mM de trealose<sup>182</sup> em tampão citrato 200 mM pH 5,6<sup>149</sup> e 50 µl do extrato.<sup>183</sup> A mistura ficou sob agitação a 37°C durante 10, 20, 30, 60 e 120 min e a reação foi interrompida no final de cada tempo colocando os tubos com meio reacional em água fervente durante 3 min.<sup>184,185</sup> A glicose liberada foi determinada no sistema cromatográfico descrito anteriormente. Uma unidade de trealase foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a hidrólise de 1 µmol de trealose por minuto a 37°C em pH 5,6.

#### 4.5.6.2 Catalase (E.C.: 1.11.1.6)

Com base em Aebi<sup>186</sup> determinou-se da atividade da catalase, utilizando um volume final de 980  $\mu\text{L}$  a 30°C sem agitação, em tampão fosfato 50 mM pH 7,0 e 20  $\mu\text{L}$  de extrato, mediante o monitoramento por espectrofotômetro da decomposição 10 mM (diluído na cubeta) de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\epsilon_{240} = 39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) por 40 segundos. Uma unidade de CAT foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a decomposição de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto a 30°C em pH 7.0.

#### 4.5.6.3 Glutathione Peroxidase (E.C.: 1.11.1.9)

A determinação da atividade da glutathione peroxidase<sup>187</sup> foi feita em um volume final de 1000  $\mu\text{L}$  a 37°C sem agitação, monitorando a oxidação de NADPH 150  $\mu\text{M}$  com espectrofotômetro ( $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) por 300 segundos. Utilizando como meio de reação 500  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 100 mM com EDTA 1 mM pH 7,0, 100  $\mu\text{L}$  de GSH 10 mM, 100  $\mu\text{L}$  de glutathione reductase 2,4 U, 100  $\mu\text{L}$  de *t*-butil hidroperóxido (*t*-BOOH) 12 mM e 100  $\mu\text{L}$  de extrato. Uma unidade de GPx foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH por minuto, a 37°C em pH 7,0.

#### 4.5.6.4 Glutathione Redutase (E.C.: 1.8.1.7)

A determinação da atividade da glutathione reductase<sup>188</sup> no extrato de larvas foi feita em um volume final de 1000  $\mu\text{L}$  a 30°C sem agitação, monitorando a oxidação de NADPH 200  $\mu\text{M}$  com espectrofotômetro ( $\epsilon_{340} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) por 60 segundos. Utilizou-se como meio de reação tampão fosfato 100 mM pH 7,6 com EDTA 0,5 mM e 1,0 mM de GSSG e 100  $\mu\text{L}$  de extrato. A oxidação de 1  $\mu\text{mol}$  de NADPH/min sob essas condições foi usada como unidade de atividade da GR.

#### 4.5.7 Dano Celular

Para determinação do dano celular por lipoperoxidação nos extratos de *P. termitilluminans* optou-se pelo método de Ohkawa *et al.*<sup>189</sup> quantificando as substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) ( $\epsilon_{532} = 156000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )<sup>190</sup>. Assim, um volume de 4,0 mL contendo 1,5 mL de ácido acético 20% pH 3,5, 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8%, 200  $\mu\text{L}$  de dodecilsulfato de sódio (SDS) 8,1%, 200  $\mu\text{L}$  de homogenato e 600  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , foi deixado em banho-maria por 60 min e, ao atingir a temperatura ambiente, 1,0 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  e 5 mL de *n*-butanol foi adicionado, e logo após vigorosa agitação, a mistura foi

submetida a uma centrifugação (4000 rpm) por 10 min. Então, a parte orgânica da mistura foi removida para leitura em espectrofotômetro ( $\lambda_{\text{max}} = 532 \text{ nm}$ ).

#### **4.5.8 Determinação de proteínas e tratamento estatístico**

Para determinação de proteínas, utilizou-se o método Bradford que utiliza o reagente de Coomassie® (cromóforo Brilliant Blue G 250) para proteína cuja absorvidade máxima ocorre em 595 nm.<sup>191</sup>

Dentro do delineamento experimental que constitui o presente trabalho, a avaliação estatística dos resultados foi realizada empregando-se o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste complementar de Turkey-Kramer para amostra de tamanhos iguais e diferentes, considerando um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).<sup>192</sup>

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Expedições ao cerrado

Fatores como a elevada temperatura de 28°C e umidade 85% por ocasião da primeira expedição em outubro de 2001 e temperaturas de 31°C e 92% de umidade na segunda expedição, em janeiro de 2002, entremeada por precipitações recorrentes, fizeram com que o fenômeno de bioluminescência se tornasse bastante expressivo nesse período, resultando em eficientes coletas em ambas as viagens (500 indivíduos na primeira e 730 indivíduos na segunda viagem). Entretanto, durante o período da terceira expedição em julho de 2002, uma massa de ar polar deslocou-se da Argentina em direção a região centro-oeste do Brasil fazendo com que a temperatura no campo nas primeiras duas noites chegasse a 7°C. Somando-se a isso, o baixo nível pluviométrico típico da região nesse período do ano fizeram com que o fenômeno de bioluminescência dos cupinzeiros se tornasse escasso ou mesmo inexistente durante a coleta. Essa situação adversa acarretou grande dificuldade na coleta, culminando com a derrubada de inúmeros cupinzeiros ( $\pm 15$  construções) para que obtivéssemos um número amostral de 345 indivíduos. Um índice que justificou a obtenção de material de pesquisa para o trabalho laboratorial. Durante a quarta e última expedição ao mesmo local de coleta em novembro de 2002, constatou-se intensa atividade agrícola na região, traduzida na forma de aragem e posterior demarcação de uma vasta faixa de terra, ocasionando dessa forma a derrubada e destruição de inúmeros cupinzeiros. Esse fato fez-nos restringir a coleta a um número mínimo de exemplares, aproximadamente 300 larvas, com vistas a preservar o pouco dos termiteiros ainda restantes.

### 5.2 Testes e ensaios de resistência hídrica e nutricional

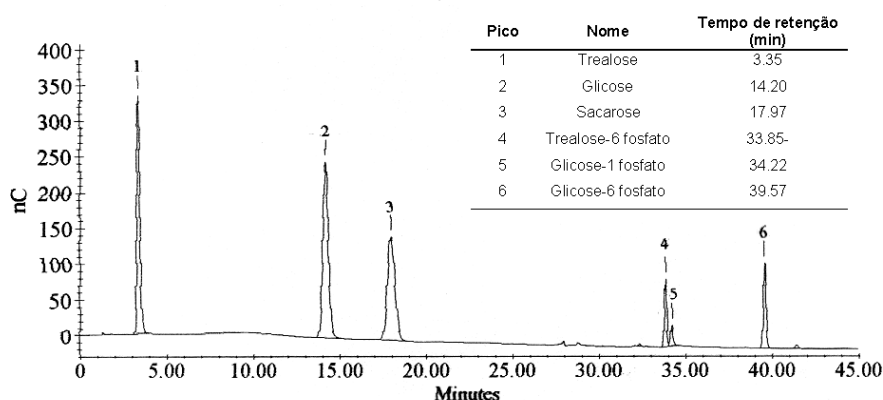
Antes da instalação da câmara climática de condições constantes, muitos testes foram efetuados em estufas simples e em dessecadores de laboratório a fim de testar a resistência desses insetos à restrição hídrica e falta de alimento. Esses animais demonstraram boa resistência, mantendo-se vivos em média por uma semana (em estufa a 35°C) ou durante aproximadamente 80 horas (em dessecadores c/ sílicagel). No entanto, invariavelmente todos os insetos entraram em colapso ao final dos 10 dias no primeiro protocolo e ao final de 4 dias no segundo experimento.

Os insetos submetidos aos dois ensaios na câmara climática conforme programação previamente elaborada (Fig. 07) tiveram uma perda de aproximadamente 35% a 41% do peso. Ao findar os dez dias do primeiro ensaio das 50 larvas iniciais restaram apenas 41 larvas sendo que 7 indivíduos morreram e 2 larvas embora vivas, estavam com regiões ao longo do corpo completamente necrosadas. Das 33 larvas submetidas ao segundo ensaio,

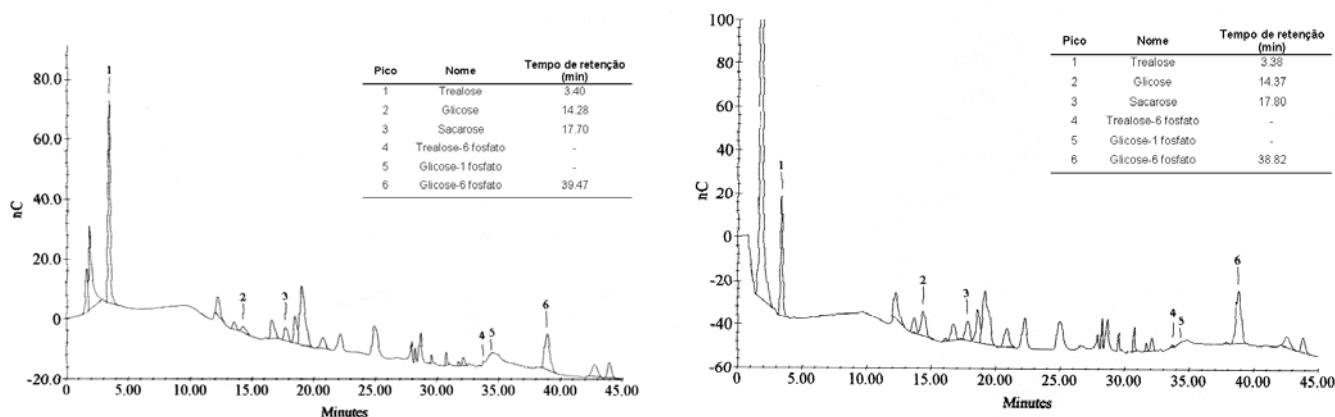
apenas 24 sobreviveram. As larvas restantes em ambos os ensaios, estavam vivas, bem conservadas e inseridas inertes em câmaras construídas por elas mesmas, um fato característico em insetos terrícolas de ambientes edáficos.<sup>35</sup> Testes prévios de resistência apontam a sobrevivência desses animais nessas condições (Fig. 07) na câmara climática por um período não maior que 23 dias, muito embora haja, sob essas circunstâncias, mortandade desses insetos.

### 5.3 Status dos principais açúcares

O uso do cromatógrafo iônico tornou possível a detecção e quantificação de vários açúcares importantes no metabolismo de insetos. Nas condições cromatográficas anteriormente especificadas (Fig. 09 e Tab. 03) o tempo mínimo necessário para a eluição de todos os açúcares na coluna foi de 45 min.



**Figura 10** - Perfil cromatográfico dos padrões (1 mM) dos açúcares avaliados nas larvas de *P. termitilluminans*. A tabela relaciona os picos com os tempos de retenção dos açúcares na coluna.



**Figura 11** – Perfil cromatográfico do *status* de açúcar em homogenato de larvas de *P. termitilluminans*. À esquerda larvas controle e à direita larvas submetidas ao estresse (n=54).

As larvas sujeitas à deprivação de água apresentam níveis de trealose e glicose (Tab. 04.) com variações estatisticamente significativas (Grupo B:  $29,85 \pm 3,20$   $\mu\text{mol/animal}$  e  $18,27 \pm 0,82$  respectivamente) quando comparadas com o grupo controle (Grupo A:

64,61±1,54  $\mu\text{mol/animal}$  e 2,16±0,11 respectivamente). A tabela abaixo resume de forma comparativa o *status* dos principais açúcares detectados e quantificados em *P. termitilluminans* controle e sob restrição hídrica.

**Tabela 04-** Dosagem dos principais açúcares encontrados em larvas de *P. termitilluminans*.

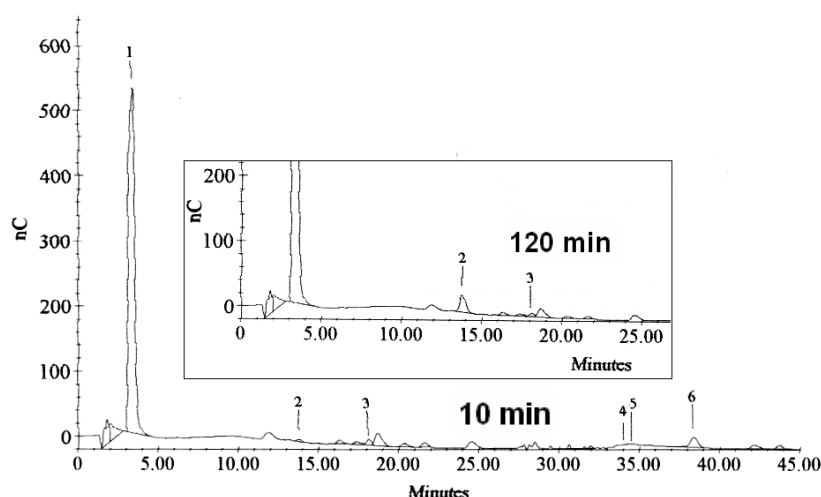
	<b>A<sup>a</sup></b>	<b>B<sup>a</sup></b>
	( $\mu\text{mol/animal}$ )	( $\mu\text{mol/animal}$ )
Trealose	64,61±1,54	29,85±3,20*
Glicose	2,16±0,11	18,27±0,82*
Sacarose	8,81±2,30	11,41±2,17
Glicose-6 fosfato	130,54±13,73	115,54±21,65

<sup>a</sup>A: açúcares em larvas de *P. termitilluminans* controle (n=25) e B: açúcares em larvas de *P. termitilluminans* submetidas ao estresse hídrico (n=54).

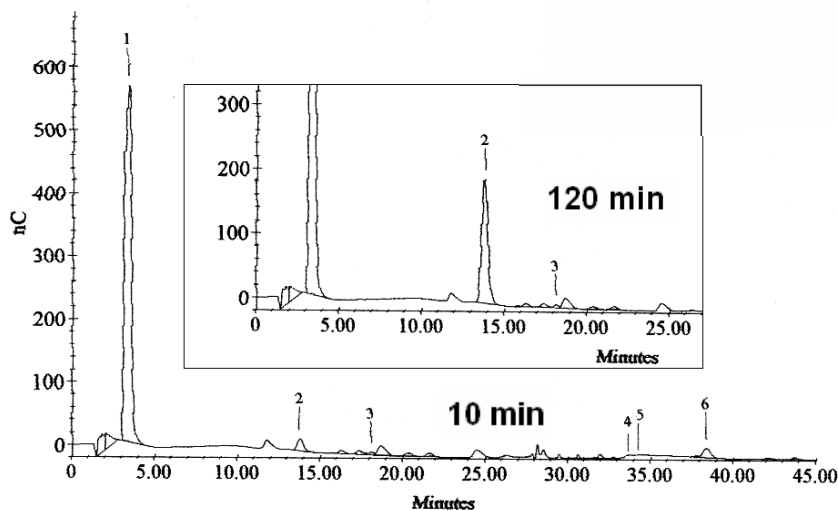
(\*) Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4 Trealase

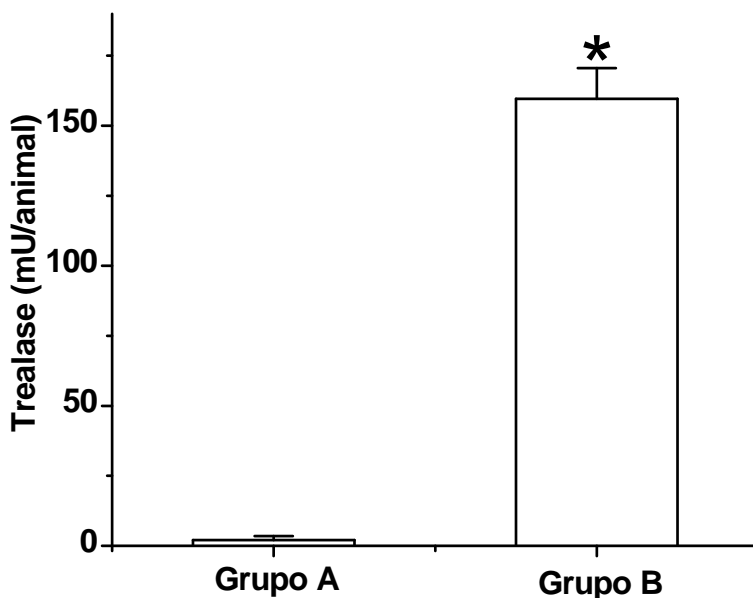
A atividade enzimática da TRH (Fig. 14) está aumentada de quase duas ordens de grandeza (Grupo B: 159,69±10,95 mU/animal) no grupo submetido ao estresse hídrico, quando comparado com o grupo controle (Grupo A: 2,02±1,41 mU/animal). Essa diferença, acompanhada pela produção de glicose, está bem evidenciada nos cromatogramas com o pico de produção do açúcar nos animais controle e sob estresse respectivamente (Fig 12 e 13).



**Figura 12** – Perfil cromatográfico da geração de glicose (pico número 2) pela hidrólise da trealose em larvas de *P. termitilluminans* controle (n=25). No cromatograma maior, geração de glicose após 10 min de atividade da TRH e, no cromatograma em destaque, geração de glicose após 120 min de atividade de TRH.



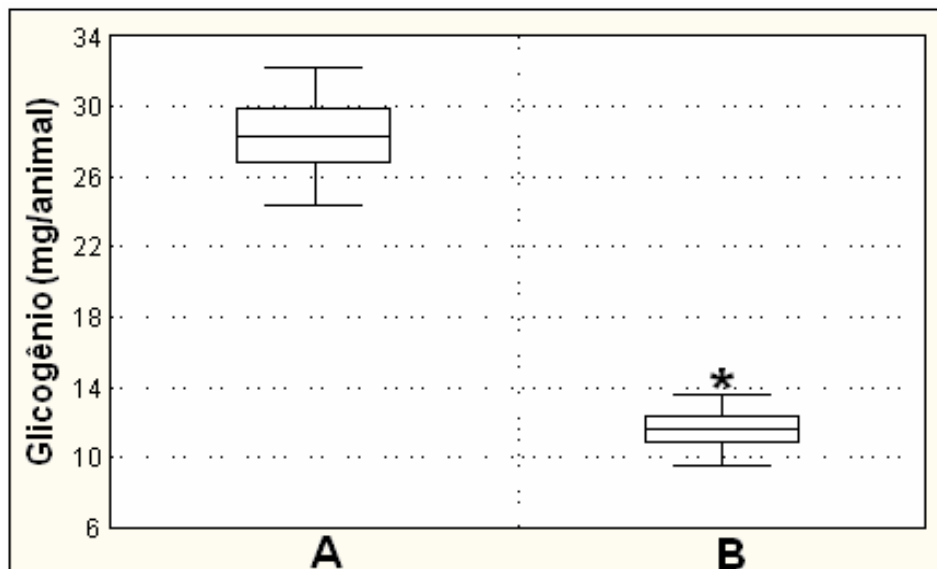
**Figura 13** – Perfil cromatográfico da geração de glicose (pico número 2) pela hidrólise da trealose em larvas de *P. termitilluminans* submetidas ao estresse hídrico (n=54). No cromatograma maior, geração de glicose após 10 min de atividade da TRH e, no cromatograma em destaque, geração de glicose após 120 min de atividade de TRH.



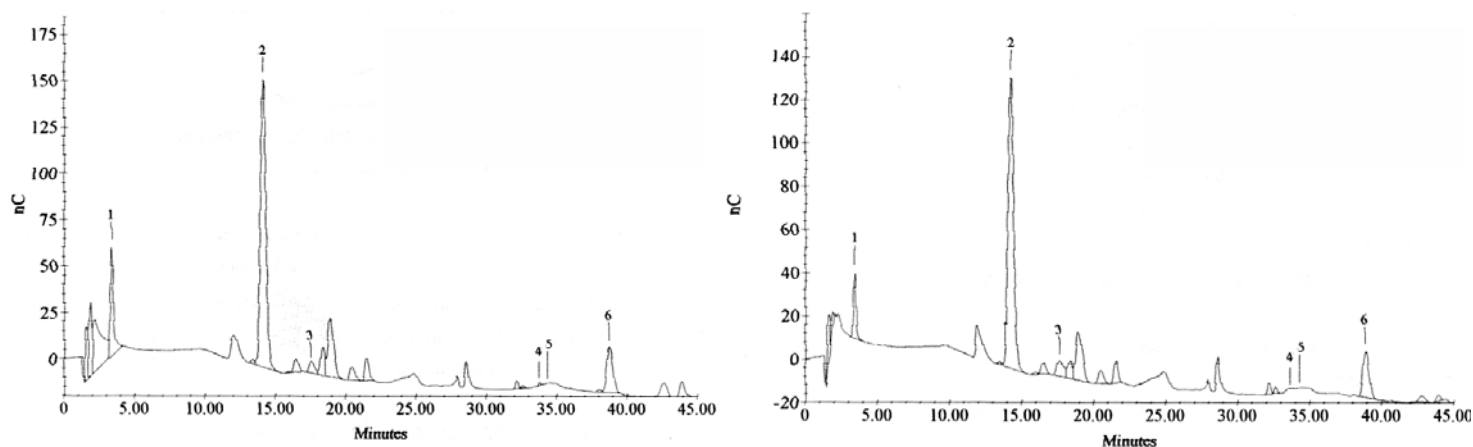
**Figura 14** – A: Atividade da trealase (TRH; mU/animal) em larvas de *P. termitilluminans* controle (n=25). B: Atividade da trealase (TRH; mU/animal) em larvas de *P. termitilluminans* submetidas ao estresse hídrico (n=54). (\*) Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

### 5.5 Níveis de Glicogênio

Os valores de concentração de glicogênio (Fig. 15) encontrados nos animais sujeitos ao estresse hídrico foram significativamente menores (Grupo B:  $11,53 \pm 2,01$  mg/animal) do que nos animais controle (Grupo A:  $28,26 \pm 2,31$  mg/animal).



**Figura 15** – *Box-plot* da distribuição de glicogênio. A: glicogênio (mg/animal) em larvas de *P. termitilluminans* controle (n=25). B: glicogênio (mg/animal) em larvas de *P. termitilluminans* submetidas ao estresse hídrico (n=54). (\*) Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



**Figura 16**– Perfil cromatográfico da hidrólise do glicogênio em glicose pela ação da amiloglicosidase durante 60 min em larvas de *P. termitilluminans* (n=25). Animais controle à esquerda (n= 25) e animais sob estresse hídrico à direita (n= 54).

## 5.6 Enzimas antioxidantes

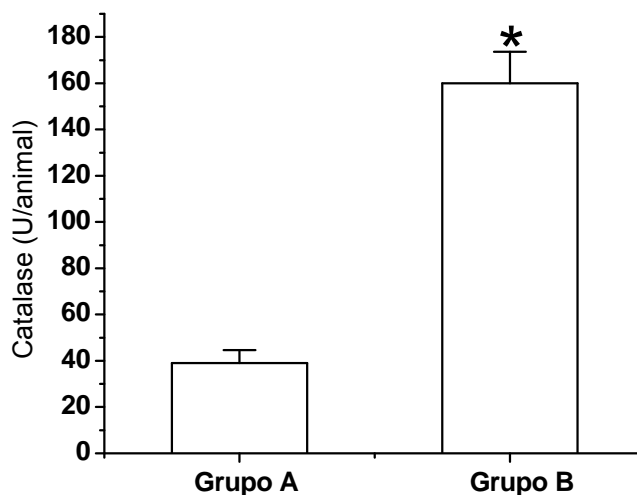
A atividade enzimática da catalase (Fig. 17) no grupo submetido ao estresse hídrico está aumentada (Grupo B:  $160,3 \pm 13,6$  U/animal) quando comparada com o grupo controle (Grupo A:  $39,7 \pm 5,7$  U/animal).

Apesar de a glutaciona peroxidase (Fig. 18) expressar, em insetos, níveis de atividade inferiores aos ordinariamente encontrados em mamíferos, apresentou-se significativamente mais elevada no grupo de larvas sujeitas à falta de água (Grupo B:  $10,5 \pm 1,7$  mU/animal) quando confrontadas com o grupo controle (Grupo A:  $2,4 \pm 0,5$  mU/animal).

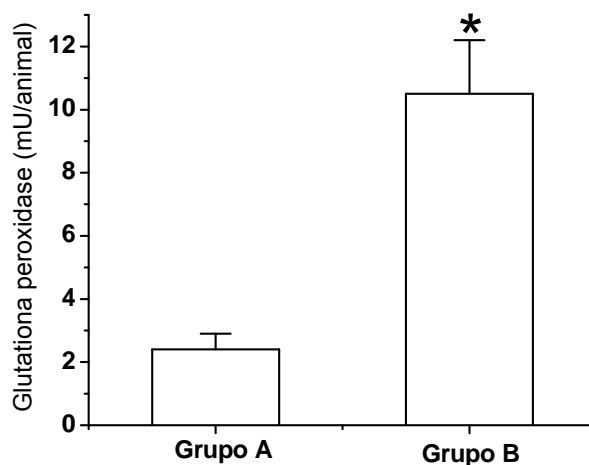
Os níveis de atividade enzimática da glutaciona redutase (Fig. 19), de forma semelhante às enzimas anteriores, apresentaram diferenças estatísticas entre o grupo de



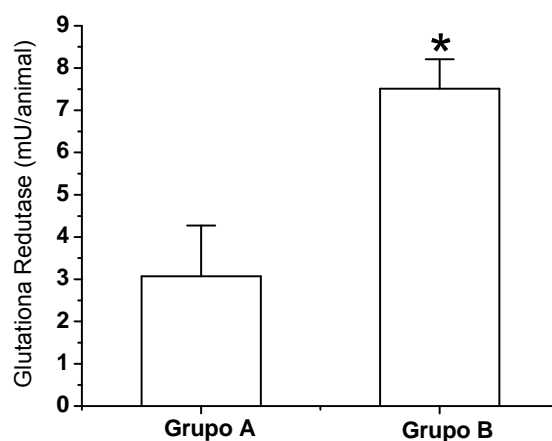
larvas sujeitas ao estresse hídrico e grupo controle (Grupo B:  $7,5 \pm 0,7$  mU/animal e Grupo A:  $3,1 \pm 1,2$  mU/animal respectivamente).



**Figura 17** – A: Atividade da catalase (CAT; U/animal) em extrato de larvas de *P. termitilluminans* controle (n=25). B: Atividade da catalase (CAT; U/animal) em larvas de *P. termitilluminans* submetidas ao estresse hídrico (n=54). (\*) Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



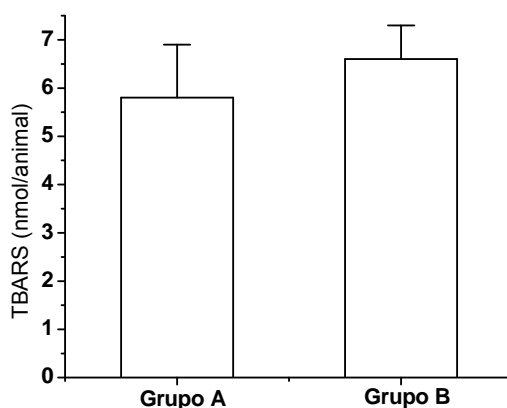
**Figura 18** – A: Atividade da glutathione peroxidase (GPx; mU/animal) em extrato de larvas de *P. termitilluminans* controle (n=25). B: Atividade da glutathione peroxidase (GPx; mU/animal) em larvas de *P. termitilluminans* submetidas ao estresse hídrico (n=54). (\*) Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



**Figura 19** – A: Atividade da glutathione redutase (GR; mU/animal) em extrato de larvas de *P. termitilluminans* controle (n=25). B: Atividade da glutathione redutase (GR; mU/animal) em larvas de *P. termitilluminans* submetidas ao estresse hídrico (n=54). (\*) Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

### 5.7 Dano celular

Valores de concentração de TBARS (Fig. 20) encontrados no grupo de larvas sujeito ao estresse hídrico (Grupo B:  $6,6 \pm 0,7$  nmol/animal) não revelaram diferenças significativas ao se comparar com o grupo de larvas controle (Grupo A:  $5,8 \pm 0,3$  mg/animal).



**Figura 20** – A: Níveis de lipoperoxidação (TBARS; nmol/animal) em extratos de larvas de *P. termitilluminans* controle (n=25). B: Níveis de lipoperoxidação (TBARS; nmol/animal) em larvas de *P. termitilluminans* submetidas ao estresse hídrico (n=54).

## 6. DISCUSSÃO

O encurtamento da vida-média das larvas de *P. termitilluminans* em sistemas simples como estufas e dessecadores, muito provavelmente, se deve à falta no controle do monitoramento da umidade no interior desses equipamentos. Fato esse que, indiretamente, reflete limitações na avaliação dos níveis hídricos das larvas durante os ensaios. O conteúdo de água nos mais diferentes grupos de insetos varia de 60 a 80% do peso do corpo, muito embora haja registros de alguns insetos com níveis hídricos abaixo de 40%.<sup>89</sup> Os graus de tolerância à perda de água variam muito entre os insetos, no entanto a perda excessiva de água culmina invariavelmente com a morte do animal.<sup>30</sup>

Entretanto, em *Arthropoda*, a relação entre água e oxigênio tem forte influência do *bauplan*, ou seja, o tamanho reduzido dos insetos resulta em uma razão superfície/volume > 1, o que por conseqüência promove perda de água e grande difusibilidade do oxigênio.<sup>35</sup> Além disso, por ser a água uma molécula menor do que a do oxigênio, os sistemas fisiológicos empregados para troca de gases durante a respiração, são sempre susceptíveis a perda de água na forma de vapor.<sup>193</sup>

Os insetos possuem muitas adaptações desenvolvidas em resposta à necessidade de conservar seu conteúdo de água e também de repor a água perdida.<sup>148</sup> Espécies terrícolas são dotadas de tegumentos que impedem a perda de água.<sup>194</sup> Obstrução por válvulas de aberturas espiraculares no sistema respiratório, utilização de ácido úrico como principal produto de excreção nitrogenado e reabsorção de água fecal pelo *rectum* estão entre uma pletera de mecanismos que contribuem para a conservação de água nos insetos.<sup>74,89,148</sup>

Não obstante, a água é o produto final do metabolismo oxidativo e, sendo assim, também pode ser obtida através da oxidação de carboidratos e ácidos graxos. Insetos do gênero *Dermestes* sp. (Coleoptera: Dermestidae) chegam a obter cerca de 30% da água através de atividade metabólica.<sup>195</sup> A quantidade de água metabólica produzida depende da quantidade e da natureza do alimento utilizado. A completa combustão de gorduras leva à produção de grande quantidade de água. Assim, 100 g de ácido palmítico produz 112 g de água e 100 g de glicogênio produz cerca de 56 g de água.<sup>89</sup> Porém, de uma forma geral, o metabolismo está atrelado à demanda energética do inseto. Portanto, a liberação de uma certa quantidade de energia, por exemplo, decorrente da oxidação de ácido graxo (~ 1000 cal/mol), dependendo da situação, leva à produção de menos água metabólica do que se carboidratos fossem os substratos. Dessa forma o inseto não ganhará mais água pela oxidação de ácidos graxos, se não houver demanda da energia produzida por essa oxidação. Disso resulta que a degradação de gorduras pode ser interessante para insetos,

os quais necessitam de consideráveis porções energéticas ao, por exemplo, fazerem grandes vôos migratórios.<sup>196</sup>

O fato de a atividade da TRH estar muito elevada nos animais submetidos à restrição hídrica (Fig 14) quando em comparação aos animais controle e, acrescentando-se a isso, o fato de que as larvas de *P. termitilluminans* permaneceram inertes e portanto com demanda energética minorada, nos leva a compor a hipótese de uma utilização preferencial de carboidratos, haja visto também um consumo maior de glicogênio (Fig. 14) e um teor maior de glicose livre (Tab. 04) relativamente aos animais sob restrição hídrica. Um resultado semelhante a este foi observado em *Onymacris rugatipennis* (Coleoptera: Tenebrionidae) quando submetido a uma umidade de 15% durante 10 dias em um dessecador a 27°C.<sup>197</sup>

Numerosos organismos (forma esporofítica de bactérias, esporos de fungos, células de leveduras, sementes de plantas, plantas, nemátodos e alguns grupos da classe *Insecta*) têm a capacidade de sobreviver em anidrobiose severa ou moderada, cuja concentração de água pode chegar a índices residuais inferiores a 2%.<sup>30,198</sup> Nesse estado podem-se detectar altas concentrações de dissacarídeos, particularmente trealose.<sup>138,199</sup> A comparação entre o perfil cromatográfico do *status* de açúcares obtido para as larvas de *P. termitilluminans* controle (Fig.11 - esquerda) e das larvas sujeitas ao estresse hídrico (Fig. 11 - direita), com especial atenção aos níveis de trealose (64,61±1,54 e 29,85±3,20 µmol/animal respectivamente - Tab. 04), denotam aparente efeito contraditório ou seja, os animais sujeitos a restrição hídrica sob as condições do ensaio curiosamente não respondem com a produção de trealose. No entanto, cabem aqui algumas considerações. Primeiramente, é importante ressaltarmos que a perda de 35% do peso em água no final de 10 dias de experimento não caracteriza um estado anidrobiótico.<sup>34</sup> Em segundo lugar, os animais ficaram submetidos a uma umidade média de aproximadamente 25% e, atrelado a esse fato, consideramos a hipótese que a atividade metabólica pode funcionar como fonte hídrica celular e finalmente que o período de ensaio poderia ser insuficiente para percebermos qualquer mudança significativa.<sup>97</sup> Destarte, entendemos que os resultados apontam para a utilização primária dos carboidratos como fonte energética, haja visto os níveis altos de glicose-6 fosfato em ambos os grupos como forma de preservar a glicose no interior da célula e concomitante produção de glicose livre no grupo sob estresse, resultado muito provavelmente da degradação da trealose (Tab. 04). Os níveis mais baixos de glicogênio evidenciados nos animais sujeitos a restrição hídrica (Fig. 15) atestam um possível uso do polissacarídeo para produção de trealose ou mesmo como combustível para via glicolítica.<sup>200</sup>

O efeito do jejum no metabolismo de insetos foi estudado nos últimos ínstares de larva de *B. mori*, tendo-se observado que o estado de estresse nutricional induz a liberação

de fatores hipertrealossêmicos, já descritos em vários insetos.<sup>201-204</sup> Isto, em última análise, foi constatado pelo aumento da atividade de glicogênio fosforilase e diminuição das reservas de glicogênio no corpo gorduroso desses insetos.<sup>205</sup> No entanto, a ativação da glicogênio fosforilase não necessariamente resulta em uma síntese elevada de trealose, pois a glicose-1 fosfato resultante da atividade hidrolítica pode alternativamente servir como substrato para glicólise.<sup>206</sup>

Examinando-se os trabalhos publicados sobre quantificação de trealose e glicose, nota-se que a grande maioria das dosagens são feitas na hemolinfa, como em adultos de *Melanoplus differentialis* (Orthoptera: Acrididae) - 14,5 e 0,25 mg/mL, respectivamente,<sup>207</sup> *P. americana* - 13,9 e 0,4 mg/mL respectivamente,<sup>208</sup> e *L. maderae* - 5,8 e 0,6 mg/mL, respectivamente,<sup>209</sup> *P. Regina* - 1,2 - 30 e 0,3 - 6,0 mg/mL, respectivamente<sup>82</sup> em fêmeas adultas de *S. gregaria* - 6,9 e 0,2 mg/mL respectivamente,<sup>101</sup> *B. mori* - 4,5 mg/ml de trealose,<sup>107</sup> e *Leucania separata* (Lepidoptera: Noctuidae) - 3,0 e 0,9 mg/mL de trealose e glicose.<sup>210</sup> A medida de trealose na hemolinfa é importante pois figura como um dos principais sítios de acúmulo desse açúcar, juntamente com o corpo gorduroso. Problemas somam-se à tentativa de enquadrar essa metodologia ao escopo do ensaio realizado nesse projeto, primeiramente, pela coleta de hemolinfa ser trabalhosa em função da melanização e, secundariamente, pela demanda de muitos insetos para obtenção de uma quantidade apreciável de hemolinfa (10 a 20 µL). Além disso, após o ensaio de estresse hídrico, há grande perda de líquido o que multiplica ainda mais a dificuldade da coleta da hemolinfa. Mais pelo último argumento do que pelos dois primeiros é que resolvemos determinar o *status* de trealose e de outros açúcares no homogenato do animal inteiro não fazendo distinção prévia dos sítios de estoque desses açúcares. Destarte, *P. termitilluminans* apresentou níveis de trealose e glicose significativamente diferentes: Grupo A, 25% e 0,4% do peso do animal quando comparado ao grupo B, 15% e 4,3% respectivamente, expressos em µmol/animal e não por mL de hemolinfa (Tab 04) com o intuito de prevenir possíveis incorreções devido à redução do volume da hemolinfa durante o ensaio hídrico.<sup>211</sup>

Uma comparação dos níveis de glicogênio encontrados em alguns insetos como *B. mori* mostra que, durante o desenvolvimento do animal, os valores podem variar de 52,5 mg/g de peso seco (nos primeiros estádios larvais) até 215 mg/g de peso seco (no estado pré-pupa) e os níveis de glicogênio no corpo gorduroso abdominal e torácico e na musculatura torácica de *P. americana* é de 8,36, 5,46 e 14,80 chega 91,6 µg/mg de tecido respectivamente.<sup>212</sup> Assim os valores encontrados para *P. termitilluminans* controle e sob estresse (28,26±2,31 e 11,53±2,01 mg/animal) (Fig. 15) são comparáveis com os da literatura, embora, os animais sob condições restritivas tenham níveis restantes de

glicogênio consideravelmente elevados. Wigglesworth,<sup>121</sup> ao examinar o conteúdo de glicogênio em larvas *A. aegypti*, observou que chegavam a níveis muitíssimos baixos após 20 dias de jejum.

O uso metabólico da trealose depende de sua hidrólise à glicose pela ação da TRH. Muitos de trabalhos têm sido realizados com o objetivo de verificar a atividade e a localização tecidual dessa enzima em insetos. Como exemplo, podemos citar trabalhos em *M. sexta* utilizando o extrato bruto de larvas (15 mU/mg),<sup>213</sup> e de tecidos (corpo gorduroso, hemolinfa e musculatura alar) tanto em larvas machos como fêmeas (5 a 200 mU/mg)<sup>214</sup> e também na musculatura alar de *P. Regina* (400 mU/mg).<sup>166</sup> Há também os trabalhos sobre trealases solúveis e ligadas à membrana em larvas, pupas e adultos de *Musca domestica* (Diptera: Muscidae), as quais exibem ampla variação na atividade da enzima (47 mU/mg a 1,8 mU/mg no sobrenadante e 60 mU/mg a 9 mU/mg no *pellet*),<sup>185</sup> e avaliações da TRH no extrato regurgitado de larvas de *P. termitilluminans* (58 mU/mg no intestino).<sup>23</sup> Nos experimentos realizados em um sistema DIONEX<sup>®</sup> com leitura direta da glicose produzida nos animais controle e submetidos ao estresse hídrico (Fig. 12 e 13, respectivamente) obtemos valores oscilando entre 0,38 mU/mg para os animais controle e 1,74mU/mg para as larvas sujeitas à restrição hídrica.

Os sítios mais importantes em atividade de TRH localizam-se principalmente na musculatura alar e no sistema digestivo.<sup>215,184,129</sup> A utilização de trealose durante o vôo é justificada pela presença de TRH para obtenção de energia na forma de glicose.<sup>216</sup> No entanto, a presença universal da TRH com elevada atividade no sistema digestivo de insetos como *L. maderae*,<sup>217</sup> *M. differentialis*,<sup>218</sup> *S. gregaria*,<sup>219</sup> *Lucilia sericata*, (Diptera: Sarcophagidae)<sup>220</sup> além de *P. termitilluminans*,<sup>23</sup> chama a atenção uma vez que trealose está raramente presente na dieta de insetos.<sup>78</sup> Para a maioria dos insetos, glicose, frutose e sacarose são açúcares adequados para a dieta. Não obstante, é bem verdade que estudos têm mostrado que as exigências tanto quantitativas como qualitativas para carboidratos variam de acordo com a idade, sexo e estágio metamórfico.<sup>73</sup>

A despeito das considerações acima, a atividade de TRH encontrada no intestino de *P. termitilluminans*<sup>23</sup> poderia ser interpretada como um mecanismo impedindo a difusão de trealose para o lúmen do intestino, mantendo-se o *status* de trealose na hemolinfa. Dessa forma, a trealose poderia ser re-captada na forma de glicose podendo servir ao metabolismo energético ou mesmo em casos específicos, ser re-sintetizada atuando como protetor de membranas. Essa hipótese implicaria em um ciclo, onde a glicose seria convertida em trealose no corpo gorduroso, e trealose seria hidrolisada em glicose no intestino. Essa proposta também implica o uso de energia para a re-síntese de trealose, no entanto o *pool*

energético é bem menor se *trealoses* fossem continuamente excretadas sem prévia recuperação.<sup>78</sup>

Embora elegante, essa hipótese tem sido contestada a partir dos resultados obtidos nos trabalhos de Terra e Ferreira com larvas de *Rhynchosciara americana* (Diptera) submetidas ao estresse nutricional.<sup>221</sup> Os autores sugerem que a atividade de trealase intestinal está diretamente relacionada com a presença de alimento no intestino e dissociada de qualquer relação com os níveis de trealose na hemolinfa.<sup>222</sup>

A desidratação pode induzir a depressão do metabolismo,<sup>30</sup> sendo também importante efetora, devido à diminuição do volume com concomitante aumento da viscosidade da hemolinfa, de um estado de hipóxia.<sup>58</sup> Assim, a re-hidratação poderia significar re-oxigenação dos tecidos, o que acarretaria produção de oxirradicais com potencial instauração de estresse oxidativo.<sup>223</sup> Dessa forma, a relação dinâmica entre ganho e perda de água atrelada à forma e a eficiência dos órgãos respiratórios como óbice a uma excessiva dessecação, se combinam para determinar nichos que *não* podem ser ocupados, possibilitando dessa forma plena adaptabilidade com um mínimo de agressão seja ao nível molecular, celular ou no organismo.<sup>96</sup> Entretanto, um aumento do metabolismo de açúcares para aumentar o aporte energético atrelado a um maior consumo de oxigênio poderia contribuir para o desbalanço oxidativo, culminando *grosso modo*, como um aumento de dano celular.

Em coleópteros luminescentes, o mecanismo de emissão de luz (Fig. 02) é uma via alternativa à respiração celular para consumo de O<sub>2</sub>.<sup>17</sup> Algo observado principalmente nos fotócitos em decorrência da abundância em enervação e terminações traqueais com objetivo de controlar a irrigação de O<sub>2</sub>.<sup>18</sup> Medidas de tensões de oxigênio interna e externamente ao pró-tórax sob normóxia mostraram-se muito próximos. Comparativamente aos mamíferos, esses resultados revelam elevada pressão parcial de O<sub>2</sub> ( $P_{O_2}$ ) nos elaterídeos, apontando para um sistema de entrega de O<sub>2</sub> extremamente eficiente.<sup>21</sup> Dessa forma, os animais no interior da câmara climática, apesar de estarem sob condições hídricas restritivas, estariam com níveis de O<sub>2</sub> similares a uma condição de normóxia.

Um dos produtos da dismutação de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> é o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que, por sua vez, é detoxificado pela ação de peroxidases e/ou catalase<sup>53</sup> Há poucos ou quase nenhum relato sobre ausência de catalase em organismos aeróbicos exceção se faz a alguns helmintos e protozoários parasitas.<sup>224</sup> Aparte isso, invertebrados possuem uma atividade catalásica normalmente maior do que em vertebrados.<sup>225,226</sup> Os valores da atividade de catalase nos extratos de larvas de *P. termitilluminans* submetidos ao ensaio de restrição hídrica, estão cerca de 4 vezes mais aumentados quando comparados com o grupo controle (Fig. 17). Os níveis de catalase tanto no grupo controle como sob estresse (Fig. 17) podem ter carácter

compensatório quando associadas ao papel secundário, ou mesmo ausente da glutathione peroxidase em insetos. O que demonstra os estudos de toxicidade de  $O_2$  em *Pyrophorus divergens* (Coleoptera: Elateridae) onde se observa níveis de catalase cerca de 70% mais ativos do que grupos de elaterídeos não luminescentes.<sup>17</sup> No entanto no mesmo trabalho,<sup>17</sup> *P. termitilluminans* apresenta níveis de catalase 30% mais baixos que os encontrados em *P. divergens*, se aproximando dos níveis encontrados em insetos não luminescentes. Somando-se a isso a atividade da catalase apresentou-se com valores iguais quando comparado o protórax com os demais segmentos do corpo de *P. termitilluminans*.<sup>17</sup> Entretanto, essas variações não invalidam o eventual caráter compensatório da catalase, uma vez que enzimas antioxidantes também podem sofrer variações ontogenéticas.<sup>20</sup> É o que se verifica em larvas de *P. termitilluminans* comparando-se a atividade da catalase em indivíduos (L1) com menos de 1,5 cm de comprimento com indivíduos (L5 – L6) ou seja, com mais de 2,0 cm de comprimento ( $80,3 \pm 6,7$  e  $22,2 \pm 1,4$  U/mg respectivamente). Resultado este muito provavelmente decorrente do aumento de antioxidantes não enzimáticos como o urato ( $\pm 50$  vezes) ou luciferina ( $\pm 3$  vezes)<sup>20</sup> Dessa forma, os mecanismos compensatórios de detoxificação de peróxidos podem sofrer alterações em decorrência dos estádios de desenvolvimento do animal.

Os valores de atividade de glutathione peroxidase (Fig. 18) encontrados em extratos de *P. termitilluminans* são muito residuais. Barros<sup>18</sup> em um trabalho associando a possível função detoxificadora de oxigênio à bioluminescência, determina valores muito baixos de GPx em pró-tórax de *P. termitilluminans* controles e submetidos a hiperóxia ( $6,3 \pm 2,5$  e  $7,3 \pm 1,3$  U/mg respectivamente). Assim, a eliminação de peróxidos orgânicos e mesmo  $H_2O_2$  pode estar a cargo de outros sistemas, envolvendo enzimas como ascorbato peroxidase, dehidroascorbato redutase e moléculas como a GSH.<sup>18</sup> A compensação dos baixos níveis de glutathione peroxidase por catalase é demonstrada pelo fato de as atividades de ambas estarem inversamente correlacionadas, fato evidenciado em várias espécies.<sup>227</sup>

Responsável pela produção de grupos redutores SH livres para detoxificação de peróxidos via glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase e dehidroascorbato redutase, a glutathione redutase figura como uma importante flavoenzima nos processos de proteção antioxidantes. Estudos com insetos *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) mostraram que glutathione redutase apresenta-se com elevada atividade em gônadas e músculos, estando porém ausente na hemolinfa.<sup>59</sup>

As análises feitas em *P. termitilluminans* para verificação da atividade enzimática da glutathione redutase (Fig. 19) mostraram-se direta e estreitamente relacionadas com a atividade da glutathione peroxidase ao se comparar grupo controle e grupo submetido à dessecação. Embora pareça evidente o papel de enzima auxiliar para glutathione redutase,



como nos processos de detoxificação de  $H_2O_2$  pela glutathione peroxidase e enzimas correlatas, a manutenção do poder redutor na célula pode ser determinante em patologias relacionadas com a idade do organismo, influenciando nas taxas de sobrevivência do animal.<sup>228</sup>

A despeito da concatenação das defesas antioxidantes, a proteção contra os oxirradicais muitas vezes é incompleta. A produção de radical hidroxil ( $\cdot OH$ ), originado do  $H_2O_2$  na presença íons de metais de transição, pode agir eficientemente sobre lipídeos insaturados (PUFA) causando dano às células.<sup>229</sup> Primeiramente, há formação de radical livre alílico, com subsequente conjugação diênica. Incorporação de  $O_2$  neste radical dienil gera radical peroxil, o qual propaga a cadeia de lipoperoxidação, com a produção final de hidroperóxidos,<sup>230</sup> aldeídos e hidrocarbonetos. Estes produtos podem funcionar como indicadores confiáveis de injúria celular.<sup>231</sup>

Todavia, os dados obtidos com extratos de larvas de *P. termitilluminans* acerca do dano celular pelo método TBARS (detecção de aldeídos em geral, entre eles o MDA) não apresentam diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo sob estresse hídrico (Fig. 20), denotando num primeiro momento, manutenção do balanço oxidativo, haja vista o aumento das defesas antioxidantes.

Apesar de ainda um tanto incompletos, os dados aqui apresentados apontaram para uma conexão entre estresse hídrico e oxidativo em *P. termitilluminans*. Já apresentamos aqui evidências seguras e reveladoras de que *P. termitilluminans* responde bem às condições adversas impostas durante o experimento em laboratório, mostrando elevada atividade de TRH e marcante consumo de glicogênio e trealose com fins de manter a manutenção do equilíbrio hídrico.

A demanda de  $O_2$  na cadeia mitocondrial de transporte de elétrons decorrente da utilização dos açúcares, com o objetivo de produzir energia e garantir um suprimento de água durante o período de carência hídrica, reflete um aumento na produção de EROs o que, segundo o que observamos, é controlado pelo aumento de defesas antioxidantes. Resultados confirmadores de aumento de defesa antioxidante como resposta depletiva ao aumento da tensão de  $O_2$  foram obtidos por Barros e Bechara<sup>18</sup> ao submeterem larvas de *P. termitilluminans* à hiperóxia.

É muito provável que insetos de habitats adversos, que exigem otimização do sistema fisiológico, utilizem os mecanismos bioquímicos aqui propostos como uma alternativa disponível no arsenal de respostas metabólicas para manutenção e estabelecimento da subsistência em tais ambientes.

## 7. CONCLUSÕES

- A atividade da trealase está mais elevada nos extratos de larvas de *P. termitilluminans* submetidas à restrição hídrica (25% UR/32 °C com n= 54) quando comparada com o grupo controle (n=25), sugerindo um uso metabólico preferencial dos carboidratos.
- A manutenção dos mesmos níveis de glicose-6-fosfato nos extratos controle e sob estresse, fortalecem o uso de glicose-6-fosfato preservada no interior da célula como ponto central na produção de energia e água metabólica.
- Os baixos níveis de glicogênio observados nos extratos de larvas sob estresse hídrico, apontam para um papel do polissacarídeo como:
  - I. Fonte de glicose para produção de UDP-glicose e glicose 6-fosfato, substratos para produção de trealose.
  - II. Fonte de glicose para produção de glicose-6-fosfato utilizada com combustível para glicólise.
- As atividades das enzimas antioxidantes (catalase e glutatona peroxidase) mostram-se mais elevadas nos extratos de larvas sob restrição hídrica, apontando para um possível desbalanço oxidativo.
- A atividade glutatona redutase mostra-se mais aumentada nos animais sob estresse o que pode significar uma maior reposição de GSH nesses grupos.
- Os níveis de TBARS resultantes de danos por radicais livres são equivalentes nos dois grupos, o que de alguma maneira sugere a ação de elementos antioxidantes ou mesmo da bioluminescência como mecanismo de manutenção do equilíbrio redox do inseto.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- <sup>1</sup> Friedman, S. (1978) Trehalose regulation, one aspect of metabolic homeostasis. *Ann. Rev. Entomol.* **23**, 389-407.
- <sup>2</sup> Klowden, M.J. (2002) *Physiological Systems in Insects*. Academic Press, New York.
- <sup>3</sup> Candy, D.J. (1985) Intermediary metabolism. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 10, (Kerkut, G.A. e Gilbert L.I. Eds.), Pergamon Press, Oxford, pp. 1-41.
- <sup>4</sup> Doutt, R. L. (1959) The biology of parasitic Hymenoptera. *Ann. Rev. Entomol.* **4**, 161-182.
- <sup>5</sup> Zamora-Munhoz, C.; Ruano, F.; Errard, C.; Lenoir, A.; Hefetz, A. e Tinaut, A. (2003) Coevolution in the slave-parasite system *Proformica longisetata-Rossomyrmex minuchae* (Hymenoptera: Formicidae). *Sociobiology* **42**, 1-19.
- <sup>6</sup> Costa, C. (1982) *Pyrearinus termitilluminans*, sp. n., with description of the immature stages (Coleoptera, Elateridae, Pyrophorini). *Rev. Bras. Entomol.* **1**, 23-30.
- <sup>7</sup> Migliaccio, M.I.; Bechara, E.J.H.; Costa, C.; Vanin, S.A. e Colepicolo-Neto, P. (1985) Cupinzeiros luminescentes. *Ci. Hoje* **3**, 92-93.
- <sup>8</sup> Lenko, K. e Papavero, N. (1996) *Insetos no Folclore*. 2ª ed., Plêiade/FAPESP. São Paulo, pp. 319-337.
- <sup>9</sup> Redford, K. (1982) Prey attraction as a possible function of bioluminescence in the larvae of *Pyrearinus termitilluminans* (Coleoptera: Elateridae). *Rev. Bras. Ent.* **1**, 35-39.
- <sup>10</sup> Bechara, E.J.H. (1988) Luminescent elaterid beetles: biochemical, biological and ecological aspects. In *Advances in Oxygenated Processes*, ( Baumstark, A.L. Ed.), JAI Press Inc., London, pp. 123-178.
- <sup>11</sup> Santos, A.C.P. (2003) *Ecologia do vagalume Pyrearinus termitilluminans Costa, 1982* (Coleoptera, Elateridae) em cupinzeiros luminosos da região do Parque Nacional das Emas, GO. Dissertação de mestrado do programa de pós graduação do Departamento de Ecologia do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP.
- <sup>12</sup> Colepicolo-Neto, P. e Bechara, E.J.H. (1984) Bioluminescência de insetos: Química e biologia. *Arq. Biol. Tecnol.* **27**, 439-462.
- <sup>13</sup> Bechara, E.J.H. e Colepicolo-Neto, P. (1987) Brazilian species of luminescent elaterids: Biochemistry and biology. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **82(sup.III)**, 129-131
- <sup>14</sup> Colepicolo-Neto, P. (1986) *Contribuição ao estudo de espécies brasileiras de elaterídeos luminescentes: Bioluminescência, metabolismo radicalar de oxigênio e digestão extra-corpórea*. Tese de doutorado do programa de pós graduação do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP.
- <sup>15</sup> Bechara, E.J.H.; Colepicolo-Neto, P. Viviani, V.R.; Barros, M.P. e Costa, C. (1999) Colors and biological functions of beetle bioluminescence. *An. Acad. Bras. Ci.* **71**, 169-174.
- <sup>16</sup> Viviani, V. R. (1995) *Contribuição ao estudo da bioluminescência de fengodídeos, e da origem, funções e evolução das luciferases de coleópteros*. Tese de doutorado do programa de pós graduação do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP.
- <sup>17</sup> Colepicolo-Neto, P.; Bechara, E.J.H. e Costa, C. (1986) Oxygen toxicity aspects in luminescent and non-luminescent elaterid larvae. *Insect Biochem.* **16**, 381-386.
- <sup>18</sup> Barros, M.P. e Bechara, E.J.H. (1998) Bioluminescence as a possible auxiliary oxygen detoxifying mechanism in elaterid larvae. *Free Radic. Biol. Chem.* **24**, 767-777.
- <sup>19</sup> Barros, M.P. (1998) *Conexões entre bioluminescência e metabolismo de oxi-radicais em larvas de Pyrearinus termitilluminans* (Coleoptera: Elateridae) Tese de doutorado do programa de pós graduação do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP.

- <sup>20</sup> Barros, M.P. e Bechara, E.J.H. (2000) Luciferase and urate may act as antioxidant defenses in larval *Pyrearinus termitilluminans* (Coleoptera: Elateridae) during natural development and upon 20-hydroxyecdysone treatment. *Photochem. Photobiol.* **71**, 648-654.
- <sup>21</sup> Timmins, G.S.; Penatti, C.A.A.; Bechara, E.J.H. e Swartz, H.M. (1999) Measurement of oxygen partial pressure, its control during hypoxia and hyperoxia, and its effect upon light emission in a bioluminescent elaterid larva. *J. Exp. Biol.* **202**, 2631-2638.
- <sup>22</sup> Timmins, G.S.; Bechara, E.J.H. e Swartz, H.M. (2000) Direct determination of kinetics of oxygen diffusion to the photocytes of a bioluminescent elaterid larva, measurement of gas-and aqueous-phase diffusional barriers and modelling of oxygen supply. *J. Exp. Biol.* **203**, 2479-2484.
- <sup>23</sup> Colepicolo-Neto, P.; Bechara, E.J.H.; Ferreira, C. e Terra, W.R. (1986) Evolutionary considerations of the spatial organization of digestion in the luminescent predaceous larvae of *Pyrearinus termitilluminans* (Coleoptera: Elateridae). *Insect Biochem.* **16**, 811-817.
- <sup>24</sup> Colepicolo-Neto, P.; Costa, C. e Bechara, E.J.H. (1986) Brazilian species of luminescent elateridae – Luciferin identificação and bioluminescence spectra. *Insect Biochem.* **16**, 803-810.
- <sup>25</sup> Colepicolo-Neto, P.; Pagni, D. e Bechara, E.J.H. (1988) Luciferin biosynthesis in larval *Pyrearinus termitilluminans* (Coleoptera: Elateridae). *Comp. Biochem. Physiol.* **91(B)**: 143-147.
- <sup>26</sup> Viviani, V.R. e Bechara, E.J.H. (1995) Bioluminescence of brazilian fireflies (Coleoptera: Lampyridae): spectral distribution and pH effect on luciferase-elicited colors. Comparison with elaterid and phengodid luciferases. *Photochem. Photobiol.* **62**, 490-495.
- <sup>27</sup> Viviani, V.R.; Silva, A.C.R.; Perez, G.L.O.; Santelli, R.V.; Bechara, E.J.H. e Reinach, F.C. (1999) Clonig and molecular characterization of the cDNA for the brazilian larval click-beetle *Pyrearinus termitilluminans* luciferase. *Photochem. Photobiol.* **70**, 254-260.
- <sup>28</sup> Chen, P.S. (1971) Larval development. In *Biochemical Aspects of Insect Development - Monographs in Developmental Biology*, vol. 3, (Wolsky, A e Tarrytown, N.Y. Eds.), S. Karger, Basel, pp. 33 – 49.
- <sup>29</sup> Frantisek, S. (1985) Grow and life cycles. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 2, (Kerkut, G.A. e Gilbert, L.I. Eds.), Pergamon Press, Oxford, pp. 1-88.
- <sup>30</sup> Danks, H.V. (2000) Dehydration in dormant insects. *J. Insect Physiol.* **46**, 837-852.
- <sup>31</sup> Clegg, J.S.; Seitz, P.; Seitz, W. e Hazlewood, C.F. (1982) Cellular response to extreme water loss: The water replacement hypothesis. *Cryobiology* **19**, 306-316.
- <sup>32</sup> Crowe, J.H. (1971) Anhydrobiosis: an unsolved problem. *Amer. Natural.* **105**, 563-573.
- <sup>33</sup> Crowe, L.M e Crowe, J.H. (1992) Anhydrobiosis: a strategy for survival. *Adv. Space Res.* **12**, 239-247.
- <sup>34</sup> Crowe, J.H.; Hoekstra, F.A. e Crowe, L.M. (1992) Anhydrobiosis. *Ann. Rev. Physiol.* **54**, 579-599.
- <sup>35</sup> Villani, M.G.; Allee, L.L.; Díaz, A. e Robbins, P.S. (1999) Adaptative strategies of edaphic arthropods. *Ann. Rev. Entomol.* **44**, 233-256.
- <sup>36</sup> Hinton, H.E. (1960) Cryptobiosis in the chironomid *Polypedilum vanderplanki*. *J. Insect Physiol.* **5**, 286-300.
- <sup>37</sup> Crowe, L.M e Crowe, J.H. (1982) Induction of anhydrobiosis: membrane changes during drying. *Cryobiology* **19**, 317-328.
- <sup>38</sup> Harisson, P.M.; Rothery, P. e Block, W. (1991) Drying processes in Antarctic collembolan *Cryptopygus antarcticus* (Willem). *J. Insect Physiol.* **37**, 883-890.
- <sup>39</sup> Brendonck, L. (1996) Diapause, quiescence, hatching requirements: What we can learn from large freshwater branquiopods (Crustacea: Branquiopoda: Anostraca, Notostraca, Conchostraca) *Hydrobiologia* **320**, 85-97.
- <sup>40</sup> Gilbert, J.J. (1974) Dormancy in rotifers. *Trans. Amer. Microsc. Soc.* **93**, 490-513.

- <sup>41</sup> Madin, K.A.C. e Crowe, J.H. (1975) Anhydrobiosis in nematodes: Carbohydrate and lipid metabolism during dehydration. *J. Exp. Zool.* **193**, 335-342.
- <sup>42</sup> Wright, J.C.; Westh, P. e Ramlöv, H. (1992) Cryptobiosis in *Tardigada*. *Biol. Rev.* **67**, 1-29.
- <sup>43</sup> Sömme, L. (1995) Anhydrobiosis and cold tolerance in tardigrades. *Eur. J. Entomol.* **93**, 349-357.
- <sup>44</sup> Crowe, J.H. e Crowe, L.M. (1992) Membrane integrity in anhydrobiotic organism: toward a mechanism for stabilizing dry cells. In *Water and Life*, (Somero, G.N., Osmond, C.B., Bolis, C.L. Eds.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 87-103.
- <sup>45</sup> Krogh, A. e Weis-Fogh, T. (1951) The respiratory exchange of the desert locust (*Schistocerca gregaria*), before, during and after flight. *J. Exp. Biol.* **28**, 342-357.
- <sup>46</sup> Felton, W.G. e Summers, C.B. (1995) Antioxidant systems in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **29**, 187-197.
- <sup>47</sup> Chance, B.; Sies, H. e Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, 527-602.
- <sup>48</sup> Paraidathethu, T.; De Groot, H. e Kehrer, J.P. (1992) Production of reactive oxygen by mitochondria from normoxic and hypoxic rat heart tissue. *Free Radic. Biol. Med.* **13**, 289-297.
- <sup>49</sup> Sohal, R.S. (1993) Aging, cytochrome oxidase activity, and hydrogen peroxide release by mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **14**, 583-588.
- <sup>50</sup> Fridovich, I. (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* **201**, 875-880.
- <sup>51</sup> Boveris, A. e Chance, B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* **34**, 707-717.
- <sup>52</sup> Boveris, A. e Cadenas, E. (1982) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In *Superoxide Dismutase*, vol. 2, (Oberly, L.W. Ed.), CRC Press, Boca Raton, pp. 159-168.
- <sup>53</sup> Halliwell, B. (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3<sup>rd</sup> ed., Clarendon Press, Oxford.
- <sup>54</sup> Pryor, W.A. (1966) *Introduction to Free Radical Chemistry*. Prentice-Hall, New Jersey.
- <sup>55</sup> Fridovich, I. (1986) Superoxide dismutase. *Adv. Enzymol.* **58**, 62-98.
- <sup>56</sup> Yamazaki, I. (1993) Hydroxyl radical formation in biological systems. *Quim. Nova* **16**, 365-369.
- <sup>57</sup> Gerschman, R.; Gilbert, D.L.; Nye, S.W.; Dwyer, P. e Fenn, W.O. (1954) Oxygen poisoning and X-radiation: a mechanism in common. *Science* **119**, 623-626.
- <sup>58</sup> Joannis, D.R. e Storey, K.B. (1996) Oxidative stress and antioxidants in overwintering larvae of cold-hardy goldenrod gall insects. *J. Exp. Biol.* **199**, 1483-1491.
- <sup>59</sup> Felton, G.W. (1995) Antioxidant defenses of invertebrates and vertebrates. In *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*, (Ahmad, S. Ed.), Chapman & Hall, New York, pp. 356-434.
- <sup>60</sup> McElroy, W.D. e DeLuca, M. (1978) Chemistry of firefly luminescence. In *Bioluminescence in Action*, (Herring, P.J. Ed.), Academic Press, London, pp. 109-127.
- <sup>61</sup> Viviani, V.R. e Bechara, E.J.H. (1997) Bioluminescence and biological aspects of Brazilian railroad-worms (Coleoptera: Phengodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **90**, 389-398.
- <sup>62</sup> DeLuca, M. e McElroy, W.D. (1974) Kinetics of firefly luciferase catalyzed reactions. *Biochemistry* **13**, 921-925.
- <sup>63</sup> Seliger, H.H. e McElroy, W.D. (1960) Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence. *Arch. Biochem. Biophys.* **88**, 136-141.

- <sup>64</sup> Hastings, J.W. (1995) Bioluminescence: Similar chemistries but many different evolutionary origins. *Photochem. Photobiol.* **62**, 599-600.
- <sup>65</sup> Colepicolo-Neto, P., Camarero, V.C.C.P., Eickstein, J. e Hastings, J.W. (1992) Induction of bacterial luciferase by pure oxygen. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 1-6.
- <sup>66</sup> Rees, J.F.; De Wergifosse, B.; Noiset, O.; Dubuisson, M.; Janssens, B. e Thompson, E.M. (1998) The origins of marine bioluminescence: Turning oxygen defense mechanisms into deep-sea communication tools. *J. Exp. Biol.* **201**, 1211-1221.
- <sup>67</sup> Timmins, G.S., Jackson, S.K. e Swartz, H.M. (2001) The evolution of bioluminescent oxygen consumption as a oxygen detoxification mechanism. *J. Mol. Evol.* **52**, 321-332.
- <sup>68</sup> Seliger, H.H. (1975) The origin of bioluminescence. *Photochem. Photobiol.* **21**, 355-361.
- <sup>69</sup> Seliger, H.H. (1897) The origin of bioluminescence in bacteria. *Photochem. Photobiol.* **45**, 291-297.
- <sup>70</sup> Hastings, J.W. (1983) Biological diversity, chemical mechanism and evolutionary origins of bioluminescent system. *J. Mol. Evol.* **19**, 309-321.
- <sup>71</sup> Gould, S.J. e Vrba, E.S. (1982) Exaptation: A missing term in the science of form. *Paleobiology* **8**, 4-15.
- <sup>72</sup> Sies, H. (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* **215**, 213-219.
- <sup>73</sup> Chippendale, M. G. (1978) The function of carbohydrates in insect life processes. In *Biochemistry of Insects*, (Rockstein, M. Ed.), Academic Press, New York, pp. 1-55.
- <sup>74</sup> Nation, J. (2001) *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC Press, New York.
- <sup>75</sup> Asahina, E. e Tanno, K. (1964) A large amount of trehalase in frost-resistant insect. *Nature* **204**, 1222.
- <sup>76</sup> Tanno, K. (1964) High sugar levels in solitary bee, *Ceratina*. *Low Temp. Sci.* **22(B)**, 51-57.
- <sup>77</sup> Kilby, B.A. (1963) The biochemistry of insect fat body. In *Advances in Insect Physiology*, vol. 1, (Beament, J.W.L. Treherne, J.E. e Wigglesworth, V.B. Eds.), Academic Press, New York, pp. 111-174.
- <sup>78</sup> Wyatt, G.R. (1967) The biochemistry of sugar and polysaccharides in insects. In *Advances in Insect Physiology*, vol. 4, (Beament, J.W.L. Treherne, J.E. e Wigglesworth, V.B. Eds.), Academic Press, New York, pp. 287-360.
- <sup>79</sup> Friedman, S. (1985) Carbohydrate metabolism. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 10, (Kerkut, G.A. e Gilbert L.I. Eds.), Pergamon Press, Oxford, pp. 43-75.
- <sup>80</sup> Wyatt, G.R. e Kalf, G.F. (1957) The chemistry of insect hemolymph. II Trehalose and other carbohydrates. *J. Gen. Physiol.* **40**, 833-847.
- <sup>81</sup> Howden, G.F. e Kilby, B.A. (1956) Trehalose and trehalase in the locust. *Chem. Ind.* **1956**, 1453-1454.
- <sup>82</sup> Evans, D.R. e Dethier, V.G. (1957) The regulation of taste thresholds for sugar in the blowfly. *J. Insect Physiol.* **1**, 3-17.
- <sup>83</sup> Crompton, M. e Birt, L.M. (1967) Changes in the amounts of carbohydrates, phosphate, and related compounds during the metamorphosis of the blowfly, *Lucilia cuprina*. *J. Insect Physiol.* **13**, 1575-1592.
- <sup>84</sup> Rees, H.H. (1977) *Insect Biochemistry*. Chapman and Hall, London.
- <sup>85</sup> Candy, D.J.; Beckert, A. e Wegner, G. (1997) Coordination of metabolism in insect flight. *Comp. Biochem. Physiol.* **117(B)**, 497-512.
- <sup>86</sup> Weis-Fogh, T. (1964) Diffusion in insect wing muscle, the most active tissue known. *J. Exp. Biol.* **41**, 229-256.
- <sup>87</sup> Mayer, R.J. e Candy, D.J. (1969) Changes in energy reserves during flight of the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Comp. Biochem. Physiol.* **31**, 409-418.

- <sup>88</sup> Sacktor, B. e Wormser-Shavit, E. (1966) Regulation of metabolism in working muscle in vivo. I. Concentration of some glycolytic, tricarboxylic acid cycle, and amino acid intermediates in insect flight muscle during flight. *J. Biol. Chem.* **241**, 624-631.
- <sup>89</sup> Chapman, R.F. (1998) *The insects – Structure and function*, 4<sup>th</sup> ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- <sup>90</sup> Crowe, J.H.; Crowe, L.M. e Chapman, D. (1984) Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. *Science* **223**, 701-703.
- <sup>91</sup> Crowe, J.H.; Carpenter, J.F.; Crowe, L.M. e Anchordoguy, T.J. (1990) Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Criobiology* **27**, 219-231.
- <sup>92</sup> Carpenter, J.F. e Crowe, J.H. (1988) The mechanisms of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology* **25**, 244-255.
- <sup>93</sup> Rudolph, A.S. e Crowe, J.H. (1985) Membrane stabilization during freezing: The role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology* **22**, 367-377.
- <sup>94</sup> Carpenter, J.F. e Crowe, J.H. (1989) An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry* **28**, 3916-3922.
- <sup>95</sup> Womersley, C.; Ulster, P.S.; Rudolph, A.S. e Crowe, J.H. (1986) Inhibition of dehydration-induced fusion between liposomal membranes by carbohydrates as measured by fluorescence energy transfer. *Cryobiology* **23**, 245-255.
- <sup>96</sup> Crowe, L.M. e Crowe, J.H. (1988) Trehalose and dry dipalmitoylphosphatidylcholine revisited *Biochem. Biophys. Acta* **946**, 193-201.
- <sup>97</sup> Crowe, J.H.; Carpenter, J.F. e Crowe, L.M. (1998) The role of vitrification in anhydrobiosis. *Ann. Rev. Physiol.* **60**, 73-103.
- <sup>98</sup> Carninci, P.; Nishiyama, Y.; Westover, A.; Ioth, M.; Nagoaka, S.; Sasaki, N.; Okazaki, Y.; Muramatsu, M. e Hayashizaki, Y. (1998) Thermostabilization and thermoactivation of thermolabile enzymes by trehalose and its application for the synthesis of full length cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 520-524.
- <sup>99</sup> Sano, F.; Asakawa, N.; Inoue, Y. e Sakurai, M. (1999) A dual role for intracellular trehalose in the resistance of yeast cells to water stress. *Cryobiology* **39**, 80-87.
- <sup>100</sup> Leslie, S.B.; Israeli, E.; Lighthart, B.; Crowe, J.H. e Crowe, L.M. (1995) Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3592-3597.
- <sup>101</sup> Treherne, J.E. (1958) The absorption and metabolism of some sugars in the locust, *Schistocerca gregaria*. *J. Exp. Biol.* **35**, 611-625.
- <sup>102</sup> Clegg, J.S. e Evans, D.R. (1961) The physiology of blood trehalase and its function during flight in the blowfly. *J. Exp. Biol.* **38**, 771-792.
- <sup>103</sup> Lipke, H.; Graves, B. e Leto, S. (1965) Polysaccharide and glycoprotein formation in the cockroach. II. Incorporation of D-glucose-C<sup>14</sup> into bound carbohydrate. *J. Biol. Chem.* **240**, 601-608.
- <sup>104</sup> Van Handel, E. e Nayar, J.K. (1972) Direct use of carbohydrates during sustained flight in the moth, *Spodoptera frugiperda*. *Insect Biochem.* **2**, 203-208.
- <sup>105</sup> Clements, A.N. (1959) Studies of the metabolism of locust fat body. *J. Exp. Biol.* **36**, 665-675.
- <sup>106</sup> Candy, D.J. e Kilby, B.A. (1959) Site and mode of trehalose biosynthesis in the locust. *Nature* **183**, 1594-1595.
- <sup>107</sup> Saito, S. (1963) Trehalose in the body fluid of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Insect Physiol.* **9**, 509-519.

- <sup>108</sup> Murphy, T.A. e Wyatt, G.R. (1965) The enzyme of glycogen and trehalose synthesis in silk moth fat body. *J. Biol. Chem.* **240**, 1500-1508.
- <sup>109</sup> Bailey, E. (1975) Biochemistry of insect flight. In *Insect Biochemistry and Function*, (Candy, D.J. e Kilby, B.A. Eds.), Chapman and Hall, London, pp. 89-76.
- <sup>110</sup> Trevelloni, J.C. (1960) Biosynthesis of glycosides and glycogen in the locust. *Arch. Biochem. Biophys.* **89**, 149-150.
- <sup>111</sup> Hines, W.J.W. e Smith, M.J.H. (1963) Some aspects of intermediary metabolism in the desert locust *Schistocerca gregaria*. *J. Insect Physiol.* **9**, 463-468.
- <sup>112</sup> Candy, D.J. e Kilby, B.A. (1961) The biosynthesis of trehalose in the locust fat body. *Biochem. J.* **78**, 531-536.
- <sup>113</sup> Clements, A.N. (1967) The utilization of sugars by insect cells in culture. *J. Insect Physiol.* **13**, 1327-1332.
- <sup>114</sup> Cabib, E. e Leloir, L.F. (1958) The biosynthesis of trehalose phosphate. *J. Biol. Chem.* **231**, 259-275.
- <sup>115</sup> Pontis, H.G. e Leloir, L.F. (1962) Measurement of UDP-Enzyme systems. *Meth. Biochem. Anal.* **10**, 107-136.
- <sup>116</sup> Steele, J.E. (1963) The site of action of insect hyperglycemic hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* **3**, 46-52.
- <sup>117</sup> Steele, J.E. (1961) Occurrence of a hyperglycemic factor in the corpora cardiac of an insect. *Nature* **192**, 680-681.
- <sup>118</sup> Becker, A. e Wegener, G. (1995) Hypertrehalosemic peptides and the content of fructose 2,6-bisphosphate in isolated fat body of the cockroach *Blattella germanica*. *Physiol. Zool.* **68**, 129.
- <sup>119</sup> Becker, A.; Schlöder, P.; Steele, J.E. e Wegener, G. (1996) The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia* **52**, 433-439.
- <sup>120</sup> Van Schaftingen, E.; Hue, L. e Hers, H. G. (1980) Fructose 2,6-bisphosphate, the probable structure of the glucose and glucagon sensitive stimulator of phosphofructokinase. *Biochem. J.* **192**, 897-901.
- <sup>121</sup> Wigglesworth, V.B. (1942) The storage of protein, fat, glycogen and uric acid in the fat body and other tissues of mosquito larvae. *J. Exp. Biol.* **19**, 56-77.
- <sup>122</sup> Sevala, V.L. e Steele, J.E. (1989) Absence of a stimulatory effect of the *corpus cardiacum* on gluconeogenesis in cockroach (*Periplaneta americana*) fat body. *J. Insect Physiol.* **35**, 1031-1036.
- <sup>123</sup> Gourdoux, L.; Lequellerc, Y.; Moreau, R. e Dutrieu, J. (1983) Gluconeogenesis from some amino acids and its endocrine modification in *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera). *Comp. Biochem. Physiol.* **74(B)**, 273-276.
- <sup>124</sup> Thompson, S.N. e Lee, R.W.K. (1993) Metabolic fate of alanine in an insect *Manduca sexta* – effects of starvation and parasitism. *Biochem. Biophys. Acta.* **1157**, 259-269.
- <sup>125</sup> Storey, K. B. e Bailey, E. (1978) Intracellular distribution of enzymes associated with lipogenesis and gluconeogenesis in fat body of the adult cockroach, *Periplaneta americana*. *Insect Biochem.* **8**, 125-131.
- <sup>126</sup> Clifford, K.H. (1980) Stereochemistry of the hydrolysis of trehalose by the enzyme trehalase prepared from the flesh fly *Sarcophaga barbata*. *Eur. J. Biochem.* **106**, 337-340.
- <sup>127</sup> Kalf, G.F. e Rieder, S.V. (1958) The purification and properties of trehalase. *J. Biol. Chem.* **230**, 691-698.
- <sup>128</sup> Gussin, A.E.S. e Wyatt, G.R. (1965) Membrane bound trehalase from *Cecropia* silkworm muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* **112**, 626-634.
- <sup>129</sup> Gilb, A.R.; Wyatt, S.S. e Wyatt, G.R. (1967) Trehalases from the cockroach, *Blattella germanica*: Activation, solubilization and properties of the muscle enzyme and some properties of the intestinal enzyme. *Acta Biochem. Polon.* **14**, 83-100.



- <sup>130</sup> Friedman, S. (1961) Inhibition of trehalase activity in the hemolymph of *Phormia regina* Meig. *Arch. Biochem. Biophys.* **93**, 550-554.
- <sup>131</sup> Chandelier, E.L.; Marechal, L.R. e Veiga, L.A. (1979) Soluble trehalase from *Panstrogylyus magistus* (Reduviidae, Triatominae). *Rev. Bras. Biol.* **39**, 267-274.
- <sup>132</sup> Takahashi, S.Y.; Higashi, S.; Minoshima, S.; Ogiso, M. e Hanoaka, K. (1980) Trehalases from the American cockroach, *Periplaneta americana*: multiple occurrence of the enzymes and partial purification of enzymes from male accessory glands. *Int. J. Invert. Reprod.* **2**, 373-381.
- <sup>133</sup> Friedman, S. (1960) The purification and properties of trehalase isolated from *Phormia regina*, Meig. *Arch. Biochem. Physiol.* **87**, 252-258.
- <sup>134</sup> Brandt, N.R. (1979) The kinetic parameters of trehalase in whole and disrupted mitochondrial preparation from two insects with asynchronous muscle. *Can. J. Biochem.* **57**, 1210-1215.
- <sup>135</sup> Sacktor, B. (1970) Regulation of intermediary metabolism, with special reference to the control mechanisms in insect flight muscle. In *Advances in insect Physiology*, vol. 7, (Beament, J.W.L. Treherne, J.E. e Wigglesworth, V.B. Eds.), Academic Press, New York, pp. 267-348.
- <sup>136</sup> Mansure, J.J.C.; Panek, A.D.; Crowe, L.M. e Crowe, J.H. (1994) Trehalose inhibits ethanol effects on intact yeast cells and liposomes. *Biochem. Biophys. Acta* **1191**, 309-316.
- <sup>137</sup> Araújo, P.S. (1996) The role of trehalose in cell stress. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **29**, 873-875.
- <sup>138</sup> Crowe, J.H.; Crowe, L.M.; Carpenter, J.F.; Rudolph, A.S.; Wistrom, C.A.; Spargo, B.J. e Anchoedoguy, T.J. (1988) Interactions of sugars with membranes. *Biochem. Biophys. Acta* **947**, 367-384.
- <sup>139</sup> Xavier, K.B.; Martins, L.O.; Peist, R.; Kossmann, M.; Boos, W. e Santos, H. (1996) High-affinity maltose-trehalose transport system in the hyperthermophilic archeon *Lhermococcus litoralis*. *J. Bacteriol.* **178**, 4773-4777.
- <sup>140</sup> Eleutherio, E.C.; Ribeiro, M.J.; Pereira, M.D.; Maia, F.M. e Panek, A.D. (1995) Effect of trehalose during stress in a heat-shock resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **36**, 1217-1223.
- <sup>141</sup> Behm, C.A. (1997) The role of trehalose in the physiology of nematodes. *Int. J. Parasitol.* **27**, 215-229.
- <sup>142</sup> Chown, S.L.; Addo-Bediako, A. e Gaston, K.J. (2002) Physiological variation in insects: large-scale patterns and their implications. *Comp. Biochem. Physiol.* **131(B)**, 587-602.
- <sup>143</sup> Williams, A.E.; Rose, M. R. e Bradley, T.J. (1998) Using laboratory selection for desiccation resistance to examine the relationship between respiratory pattern and water loss in insects. *J. Exp. Biol.* **201**, 2945-2952.
- <sup>144</sup> Sussman, A.S. e Lingappa, B.T. (1954) Role of trehalose in Ascospores of *Neurospora tetrasperma*. *Science* **130**, 1343.
- <sup>145</sup> Elbein, A.D. e Mitchell, M. (1973) Levels of glycogen and trehalose in *Mycobacterium smegmatis* and purification and properties of glycogen synthetase. *J. Bacteriol.* **113**, 863-873.
- <sup>146</sup> Hottiger, T.; Schmutz, P. e Wiemken, A. (1987) Heat-Induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **169**, 5518-5522.
- <sup>147</sup> Singer, M.A. e Lindquist, S. (1998) Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: The yin and yang of trehalose. *Trends Biotech.* **16**, 460-468.
- <sup>148</sup> Wharton, G.W. (1985) Water balance of insects. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 4, (Kerkut, G.A. e Gilbert, L.I. Eds.), Pergamon Press, Oxford, pp. 565-601.
- <sup>149</sup> Friedman, S. (1966) Trehalase from insects. *Meth. Enzymol.* **8**, 600-603.
- <sup>150</sup> Price, G.M. (1969) Protein synthesis and nucleic acid metabolism in the fat body of the larva of the blowfly, *Calliphora erythrocephala*. *J. Insect Physiol.* **15**, 931-944.

- <sup>151</sup> Candy, D.J. (1974) The control of muscle activity during locust flight. *Biochem. Soc. Trans.* **2**, 1107-1109.
- <sup>152</sup> Duve, H. (1972) Purification and properties of trehalase isolated from the blowfly *Calliphora erythrocephala*. *Insect Biochem.* **2**, 445-450.
- <sup>153</sup> Talbot, B.G.; Muir, J.G. e Huber, R.E. (1975) Properties of a free and a solubilized form of bound  $\alpha,\alpha$ -trehalase purified from honey bee thorax. *Can. J. Biochem.* **53**, 1106-1117.
- <sup>154</sup> Yanagawa, H-A (1971) Purification and properties of trehalases from larval muscle and midgut of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* **1**, 102-112.
- <sup>155</sup> Marzluf, G. (1969) Studies of trehalose and sucrose of *Drosophila melanogaster*. *Arch. Biochem. Biophys.* **134**, 8-18.
- <sup>156</sup> Giebel, P.E. e Domnas, A.J. (1976) Soluble trehalases from larvae of the mosquito, *Culex pipens*, and the fungal parasite, *Lagenidium giganteum*. *Insect Biochem.* **6**, 303-311.
- <sup>157</sup> Saito, S. (1960) Trehalase of the silkworm, *Bombyx mori*. Purification and properties of the enzyme. *J. Biochem. Tokyo* **48**, 101-109.
- <sup>158</sup> Hart, D. E. e Steele, J.E. (1973) The glycogenolytic effect of the *corpus cardiacum* on the cockroach nerve cord. *J. Insect. Physiol.* **19**, 927-939.
- <sup>159</sup> Araújo, P.S.; Panek, A.C.; Ferreira, R. e Panek, A.D. (1989) Determination of trehalose in biological samples by a simple and stable trehalase preparation. *Anal. Biochem.* **176**, 432-436.
- <sup>160</sup> Kienle, I.; Burgert, M. e Holzer, H. (1993) Assay of trehalase with acid trehalase purified from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **9**, 607-611.
- <sup>161</sup> Parrou, J.L. e François, J. (1997) A simplified procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalase in whole yeast cells. *Anal. Biochem.* **248**, 188-190.
- <sup>162</sup> Neves, M.J.; Jorge, J.A.; François, J.M. e Terenzi, H.F. (1991) Effects of heat shock on the level of trehalose and glycogen, and on the induction of thermotolerance in *Neurospora crassa*. *FEBS Lett.* **283**, 19-22.
- <sup>163</sup> Neves, M.J., Terenzi, H.F., Leone, F.A. e Jorge, J.A. (1994) Quantification of trehalose in biological samples with a conidial trehalase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *World J. Microb. Biotech.* **10**, 20-26.
- <sup>164</sup> Huggett, A. St.G. e Nixon, D.A. (1957) Enzymatic determination of blood glucose. *Biochem. J.* **66**, 12P.
- <sup>165</sup> Papadopoulos, N.M. e Hess, W.C. (1960) Determination of neuramic (sialic) acid, glucose and fructose in spinal fluid. *Arch. Biochem. Biophys.* **88**, 167-171.
- <sup>166</sup> Friedman, S. (1971) Interactions among sites responsible for trehalose 6-phosphate and trehalase-activated glucose 6-phosphate hydrolysis on trehalose phosphate isolated from *Phormia regina*. *J. Biol. Chem.* **246**, 4122-4130.
- <sup>167</sup> Bergmeyer, H.U. e Bernt, E. (1974) Glucose: Determination with glucose oxidase and peroxidase In *Methods of Enzymatic Analysis*, 2<sup>nd</sup> English ed.,(Bergmeyer, H.U. Ed.), Verlag Chemie, Weinheim, Academic Press, New York, pp. 1205-1215.
- <sup>168</sup> Dahlqvist, A. (1964) Method for assay of intestinal disaccharidases. *Anal. Biochem.* **7**, 18-25.
- <sup>169</sup> Hubber, C.G. e Bonn, G.K. (1995) HPLC of carbohydrates with cation-and anion-exchange silica and resin-based stationary phases. In *Carbohydrate Analysis: High Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis*, (Zaid, R. Ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 147-181.
- <sup>170</sup> Cataldi, T.R.I.; Campa, C.; Angelotti, M. e Bufo, S.A. (1999) Isocratic separation of closely-related mono- and disaccharides by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection using dilute alkaline spiked with barium acetate. *J. Cromatogr. A* **855**, 539-550.

- <sup>171</sup> Lee, Y.C. (1990) High-performance anion-exchange chromatography for carbohydrate analysis. *Anal. Biochem.* **189**, 151-162.
- <sup>172</sup> Wannet, W.J.B.; Hermans, J.H.M.; Drift, C. e Camp, H.J.M.O. (2000) HPLC detection of soluble carbohydrates involved in manitol and trehalose metabolism in the edible mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 287-291.
- <sup>173</sup> Johnson, J. e Fusaro, R. (1964) An enzymic method for the quantitative determination of microquantities of glycogen. *Anal. Biochem.* **7**, 189-191.
- <sup>174</sup> Keppler, D. e Decker, K. (1974) Glycogen – Determination with amyloglucosidase. In *Methods of Enzymatic Analysis 2<sup>nd</sup>* English ed., (Bergmeyer, H.U. Ed.), Verlag Chemie, Weinheim, Academic Press, New York, pp. 1127-1131.
- <sup>175</sup> Kowalski, W.B. e Chatterton Jr., R.T. (1997) Enzymatic determination of endometrial tissue glycogen in the presence of reducing groups. *Anal. Biochem.* **252**, 207-210.
- <sup>176</sup> Huijing, F. (1970) A rapid enzymic method for glycogen estimation in very small tissue samples. *Clin. Chem. Acta.* **30**, 567-572.
- <sup>177</sup> Bruss, M.L. e Black, A.L. (1978) Enzymatic microdetermination of glycogen. *Anal. Biochem.* **84**, 309-312.
- <sup>178</sup> Gómez-Lechón, M.J.; Ponsoda, X. e Castell, J.V. (1996) A microassay for measuring glycogen in 96-well-cultured cells. *Anal. Biochem.* **236**, 296-301.
- <sup>179</sup> Murat, J.C. e Serfaty, A. (1974) Simple enzymatic determination of polysaccharide (glycogen) content of animal tissues. *Clin. Chem.* **20**, 1576-1577.
- <sup>180</sup> Farkas, V.; Kelenyi, G. e Sandor, A. (1999) A dramatic accumulation of glycogen in the brown adipose tissue of rats following recovery from cold exposure. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 54-61.
- <sup>181</sup> Roehrig, K. e Allred, J. (1974) Direct enzymatic procedure for determination of liver glycogen. *Anal. Biochem.* **58**, 414-421.
- <sup>182</sup> Friedman, S. (1975) Multiple forms of trehalase in *Phormia regina*. Partial purification, tissue specificities, and some kinetic properties of adult enzymes. *Insect Biochem.* **5**, 151-164.
- <sup>183</sup> Duve, H. (1975) Intracellular localization of trehalase in thoracic muscle of blowfly *Calliphora erythrocephala*. *Insect Biochem.* **5**, 299-311.
- <sup>184</sup> Friedman, S. e Alexander, S. (1971) Multiple forms of trehalase in *Phormia regina*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **42**, 818-823.
- <sup>185</sup> Jensen, D.E. e Buckner, A. (1973) Soluble and particle-bound trehalase in extracts from larvae, pupae, and adults of *Musca domestica*. *J. Insect Physiol.* **19**, 2255-2259.
- <sup>186</sup> Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. *Meth. Enzymol.* **105**, 121-126.
- <sup>187</sup> Flohé, L. e Gunzler, W.A. (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Meth. Enzymol.* **105**, 114-121.
- <sup>188</sup> Carlberg, I. e Mannervik, B. (1975) Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol Chem.* **250**, 5475-5480.
- <sup>189</sup> Ohkawa, H.; Ohishi, N. e Yagi, K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351-358.
- <sup>190</sup> Ghatak, S. e Ho, S-M (1996) Age-related changes in the activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation status in ventral and dorsolateral prostate lobes of Noble rats. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **222**, 362-367.
- <sup>191</sup> Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

- <sup>192</sup> Zar, J. H. (1999) *Biostatistical analysis*. 4<sup>th</sup> ed. Prentice Hall, New Jersey.
- <sup>193</sup> Little, C. (1990) *The terrestrial Invasion: An Ecophysiological Approach to the Origins of land Animals*. Cambridge, London, pp. 203-246.
- <sup>194</sup> Neville, A.C. (1975) *Biology of the Arthropod Cuticle*. Springer, Berlin, 283-291.
- <sup>195</sup> Fraenkel, G. e Blewett, M. (1944) The utilization of metabolic water in insects. *Bull. Entomol. Res.* **35**, 127-139.
- <sup>196</sup> Weis-Fogh, T. (1967) Respiration and tracheal ventilation in locusts and other flying insects. *J. Exp. Biol.* **47**, 561-587.
- <sup>197</sup> Naidu, S.G. (2001) Osmoregulation in *Onymacris rugatipennis*, a free-ranging tenebrionid beetle from the Namib desert. *Comp. Biochem. Physiol.* **129(A)**, 873-885.
- <sup>198</sup> Sun, W.Q e Leopold, A.C. (1997) Cytoplasmatic vitrificação and survival of anhydrobiotic organisms. *Comp. Biochem. Physiol.* **117(A)**, 327-333.
- <sup>199</sup> Crowe, J.H.; Crowe, L.M.; Carpenter, J.F. e Wistron, A.C. (1987) Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem. J.* **242**, 1-10.
- <sup>200</sup> Horie, Y. (1960) Blood trehalose and fat body glycogen in silkworm, *Bombyx mori*. *Nature* **188**, 583-584.
- <sup>201</sup> Bowers, W.S. e Friedman, S. (1963) Mobilization of fat body glycogen by a extract of corpus cardiacum. *Nature* **198**, 685.
- <sup>202</sup> Friedman, S. (1967) The control of trehalose synthesis in the blowfly, *Phormia regina* Meig. *J. Insect Physiol.* **13**, 397-405.
- <sup>203</sup> Mordue, W. e Goldsworthy, G.J. (1969) The physiological effects of corpus cardiacum extracts in locusts. *Gen. Comp. Endocrinol.* **12**, 360-369.
- <sup>204</sup> Norman, T.C. e Duve, H. (1969) Experimentally induced release of a neurohormone influencing hemolymph trehalose level in *Calliphora erythrocephala*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **12**, 449-459.
- <sup>205</sup> Satake, S., I.; Kawabe, Y. e Mizoguchi, A. (2000) Carbohydrate metabolism during starvation in the silkworm *Bombyx mori*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **44**, 90-98.
- <sup>206</sup> Wiens, W.A. e Gilbert, I.L. (1967) Regulation of carbohydrate mobilization and utilization in *Leucophaea maderae*. *J. Insect Physiol.* **13**, 779-794.
- <sup>207</sup> Randall, D.D. e Derr, R.F. (1965) Trehalose: Occurrence and relation to egg diapause and active transport in the differential grasshopper, *Melanoplus differentialis*. *J. Insect. Physiol.* **11**, 329-335.
- <sup>208</sup> Treherne, J.E. (1960) The nutrition of the central nervous system in the cockroach, *Periplaneta americana* L. The exchange and metabolism of sugars. *J. Exp. Biol.* **37**, 513-533.
- <sup>209</sup> Todd, M.E. (1958) Blood composition of the cockroach, *Leucophaea maderae*. *J. New York Entomol. Soc.* **66**, 135-143.
- <sup>210</sup> Liu, F. e Feng, H. (1965) The metabolism of blood sugars of the armyworm. *Acta Entomol. Sin.* **14**, 432-440.
- <sup>211</sup> Reynolds, S.E. (1980) Integration of behavior and physiology in ecdysis. In *Advances Insect Physiology*, vol. 15, (Beament, J.W.L., Treherne, J.E. e Wigglesworth, V.B. Eds.), Academic Press, New York, pp. 475-595.
- <sup>212</sup> Downer, R.G.H e Parker, G.H. (1979) Glycogen utilization during flight in the american cockroach, *Periplaneta americana*. *Comp. Biochem. Physiol.* **64(A)**, 29-32.
- <sup>213</sup> Dahlman, D.L. (1971) Purification and properties of trehalase from tobacco hornworm larvae. *J. Insect. Physiol.* **17**, 1677-1687.

- <sup>214</sup> Dahlman, D.L. (1972) Age-dependent trehalase activity in adult tobacco hornworm tissues. *Insect Biochem.* **2**, 143-149.
- <sup>215</sup> Gussin, A.E.S. e Wyatt, G.R. (1964) Soluble and membrane bound trehalases in insects. *Am. Zool.* **4**, 19.
- <sup>216</sup> Sacktor, B. (1955) Cell structure and metabolism of insect flight muscle. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1**, 1-12.
- <sup>217</sup> Zebe, E.C. e McShan, W.H. (1959) Trehalase in the thoracic muscles of the woodroach, *Leucophaea maderae*. *J. Cell. Comp. Physiol.* **53**, 21-29.
- <sup>218</sup> Derr, R.F. e Randall, D.D. (1966) Trehalase of differential grasshopper, *Melanoplus differentialis*. *J. Insect Physiol.* **12**, 1105-1114.
- <sup>219</sup> Evans, W.A.L. e Payne, D.W. (1964) Carbohydrases of the alimentary tract of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *J. Insect Physiol.* **10**, 657-674.
- <sup>220</sup> Evans, W.A.L. e Marden, J. (1956) Carbohydrases in blowfly larvae. *Nature* **177**, 478.
- <sup>221</sup> Terra, W. R. e Ferreira, C. (1981) The physiological role of the peritrophic membrane and trehalase: digestive enzymes in the midgut and excreta of starved larvae of *Rhynchosciaria*. *J. Insect Physiol.* **27**, 325-331.
- <sup>222</sup> Terra, W.R. e Ferreira, C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* **109(B)**, 1-62.
- <sup>223</sup> Hermes-Lima, M. e Storey, K.B. (1998) Role of antioxidant defenses in the tolerance of severe dehydration by anurans. The case of leopard frog *Rana pipens*. *Mol. Cell Biochem.* **189**, 79-89.
- <sup>224</sup> Barrett, J. e Beis, I. (1982) Catalase in free-living and parasitic platyhelminths. *Experientia* **38**, 536.
- <sup>225</sup> Livingstone, D.R.; Lips, F.; Martinez, P.G. e Pipe, R.K. (1992) Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biol.* **112**, 265-276.
- <sup>226</sup> Torres, M. A.; Testa, C. P.; Gáspari, C.; Masutti, M. B.; Panitz, C. M. N.; Pedrosa, R. C., Almeida, E. A.; Mascio, P. e Wilhelm Filho, D. (2002) Oxidative stress in the mussel *Mytella guayanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brasil. *Marine Poll. Bull.* **44**, 923-932.
- <sup>227</sup> Godin, D.V. e Garnett, M.E. (1992) Species-related variations in tissue antioxidant status – I. Differences in antioxidant enzyme profiles. *Comp. Biochem. Physiol.* **103(B)**, 737-742.
- <sup>228</sup> Meister, A. (1988) Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* **263**, 17205-17208.
- <sup>229</sup> Halliwell, B.(2000) Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovasc. Res.* **47**, 410-418.
- <sup>230</sup> Niki, E. (2001) Lipid peroxidation and its inhibition: Overview and perspectives. *J. Oleo Sci.* **50**, 313-320.
- <sup>231</sup> Fernández, J.; Pérez-Álvarez, J.A. e Fernández-López, J.A. (1997) Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chem.* **59**, 345-353.