

SOLANGE MARQUES DA SILVA

SÍTIOS DE PRODUÇÃO DE PROTEÍNA INTEGRANTE DA MEMBRANA  
PERITRÓFICA DE LARVAS DA ABELHA *Melipona quadrifasciata anthidioides*  
(HYMENOPTERA, MELIPONINI)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2003

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

Silva, Solange Marques da, 1974

S586s  
2003

Sítios de produção de proteína integrante da membrana  
peritrófica de larvas de abelha *Melipona quadrifasciata*  
anthidioides (Hymenoptera Meliponini) / Solange

Marques

da Silva. – Viçosa : UFV, 2003.

59p. : il.

Orientador: José Eduardo Serrão

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de

Viçosa

1. Meliponinae - Morfologia. 2. Abelha sem ferrão -  
Intestino médio. 3. Abelha sem ferrão - Membrana peri-  
trófica. 4. Peritrofina - Síntese. 5. Antiperitrofina. I. Uni-  
versidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 595.799044

CDD 20.ed. 595.799044

SOLANGE MARQUES DA SILVA

SÍTIOS DE PRODUÇÃO DE PROTEÍNA INTEGRANTE DA MEMBRANA  
PERITRÓFICA DE LARVAS DA ABELHA *Melipona quadrifasciata anthidioides*  
(HYMENOPTERA, MELIPONINI)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

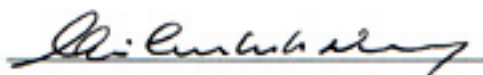
APROVADA: 29 de julho de 2003



Prof. José Mário da Silveira  
Mezêncio  
(Conselheiro)



Prof. Lúcio Antônio de Oliveira  
Campos



Prof. Clóvis Andrade Neves



Prof. José Lino Neto



Prof. José Eduardo Serrão

(Orientador)

Aos meus pais, Arlindo e Dilce.  
À minha avó Zulmira (*in memoriam*)  
E ao meu querido esposo Charles.

## AGRADECIMENTO

Por mais que eu agradeça talvez sempre esquecerei de alguém que em algum momento contribuiu para a realização deste trabalho, bem como para o meu crescimento e amadurecimento...

Agradeço primeira e infinitamente a Deus por me dar a oportunidade de estar aqui e por realizar em minha vida tudo que Ele julga ser necessário.

Agradeço aos meus pais Arlindo Antunes Silva e Dilce Marques das Neves Silva, meus amores, meus alicerces na vida, exemplos de amor, dedicação e doação....

Agradeço ao meu amor, meu querido Charles por tudo que fez e faz por mim... “acho que se você pudesse moveria céus e terra...” Você é meu ponto de equilíbrio, meu ancoradouro...

Agradeço também aos meus sogros Adil e Maria, cunhados Taylor e Tiago que sempre torceram por mim...

Agradeço aos meus irmãos Rosangela e Rodinei meus grandes amigos, pessoas extremamente fortes e batalhadoras, mas ao mesmo tempo sensíveis e doces... Aos meus sobrinhos Max , Igor (Gui) e Ben Hur (Bebê) pela descontração e alegria...

Minha avó Zulmira (in memoriam) exemplo de uma mulher forte e cheia de vida... não pude vê-la nos seus 100 anos de vida e nem quando partiu no início deste ano... sinto muito sua falta, mas sei que carrego um pouquinho da senhora em mim...

Ao meu Orientador Prof. José Eduardo Serrão ... não consigo encontrar palavras de agradecimentos que expressem realmente o que sinto, mas enfim sinto uma imensa gratidão por tudo que você fez por mim. Você é mais que apenas um orientador, e nós como seus orientados sabemos que és um grande ser humano e um amigo incrível. Obrigada do fundo do meu coração por confiar em minha capacidade desde o início quando solicitei-lhe um estágio em seu laboratório. A partir daí então, deu-se início os meus primeiros passos na morfologia interna de insetos... e, você sempre muito paciente e didático com os meus erros e acertos. Agradeço à minha grande amiga Gisele (Gi) minha irmãzinha de alma, sempre me dizendo aquilo que devo ouvir e não o quero ouvir, mesmo estando tão longe você sabe quanto me ajudou... obrigada por suas orações.

Agradeço às minhas amigas Davy, Paula e Cléa... pelo convívio saudável, pela sinceridade... vocês são verdadeiras e grandes companheiras. Amigas de todas as horas... nas boas, difíceis e ruins também... Aos amigos Marcelo, Fred e ao pessoal da turma de taxonomia pelo convívio. Aos amigos queridos que ficarão sempre em nossos corações Fernanda (Fê) e Rogério, Luciana (Lú) e Agenor, e Sérgio (gaúcho) pela amizade sincera e pela convivência. À turma da UFMS-Dourados e grandes amigos Nilbe e Cassiano, e Ana Maria que aqui estão na batalha como nós...

Agradeço ao amigo Gustavo pela convivência e por ser generoso comigo desde o início no laboratório...

Aos técnicos do laboratório Monteiro, Carlos (Charle Brown) e Bhering.

Aos colegas Angélica, Andréia, Denilce, Silvane, Carol, Dihego, Bruno, Policarpo e Claudia (Colombiana).

Aos meus conselheiros Prof. José Mário da Silveira Mezêncio pelos ensinamentos no campo da imunologia, e ao Prof. Adilson Ariza Zacaro pelas suas dicas e conselhos proveitosos...

À Prof<sup>a</sup>. Marluci Ribeiro pelas conversas que tivemos durante o desenvolvimento do trabalho prático da tese.

Ao Prof. Joaquín H. Patarroyo Salcedo pelos seus aconselhamentos e pela disponibilização do seu laboratório durante o desenvolvimento prático da tese. Em especial ao técnico de laboratório Márcio Mendes (Márcinho) um anjinho fundamental que me ajudou na realização desta tese... meu muito obrigada de coração.

Ao Prof. Kyioshi Matsuoka por ceder seu laboratório e o microscópio eletrônico de transmissão durante a realização deste trabalho e, principalmente á Dra. Claudia Alencar Vanetti pela sua disponibilidade e amabilidade ao me ajudar na realização da técnica imunocitoquímica.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Entomologia, em especial à Paula nossa secretária por sua docilidade e profissionalismo.

Ao Prof. Lúcio A. O. Campos por ceder o material biológico utilizado neste trabalho e aos funcionários do Apiário da UFV, principalmente ao Íris, Geraldo e ao Lulu, sempre atenciosos e prestativos nas coletas das abelhas.

À CAPES pela concessão da bolsa durante todo período de curso.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Solange Marques Silva, filha de Arlindo Antunes Silva e Dilce Marques das Neves Silva, nasceu em Dourados - MS, em 13 de abril de 1974. Em março de 1998, licenciou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Dourados, MS.

Durante os anos de 1995 a 1997 na graduação foi estagiária no laboratório de Biologia do Campus da UFMS – Dourados, trabalhando com biologia de abelhas.

De março a dezembro de 1998, trabalhou como professora de Ciências e Biologia no ensino fundamental e médio. De 1999 a 2000 foi secretária do Curso de Pós-Graduação em Agronomia no Campus da UFMS - Dourados.

Em agosto de 2001, iniciou o curso de Mestrado em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa, defendendo tese em 30 de julho de 2003.

## CONTEÚDO

|   |      |
|---|------|
| RESUMO .....  | vii  |
| ABSTRACT .....  | viii |
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 1    |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA .....  | 2    |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS .....   | 12   |
| 3.1 Obtenção da Membrana Peritrófica para Produção de<br>Antissoro Policlonal ..... | 12   |
| 3.2 Extração das Proteínas .....  | 12   |
| 3.3 Dosagem de Proteína e Eletroforese em Gel de Poliacrilamida<br>(SDS-PAGE) ..... | 14   |
| 3.4 Produção do Antissoro Policlonal .....  | 15   |
| 3.5 Imuno “Dot Blot” .....  | 16   |
| 3.6 “Western Blotting” .....  | 17   |
| 3.7 Imunohistoquímica .....   | 18   |
| 3.8 Detecção de Quitina .....   | 20   |
| 3.9 Imunocitoquímica .....  | 21   |
| 4. RESULTADOS .....   | 23   |
| 5. DISCUSSÃO .....  | 38   |
| 6. CONCLUSÃO .....  | 51   |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 52   |

## RESUMO

SILVA, Solange Marques da, M.S. Universidade Federal de Viçosa, Julho de 2003. **Sítios de produção de uma proteína integrante da membrana peritrófica de larvas da abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Meliponini).** Orientador: José Eduardo Serrão. Conselheiros: Adilson Ariza Zacaro e José Mário da Silveira Mezêncio.

Este trabalho identificou os sítios de síntese da membrana peritrófica larvas da abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Lepelletier) (Hymenoptera, Meliponini). Para isto uma peritrofina de larvas de 4º instar foi isolada e usada para produzir anticorpo policlonal em camundongos. Os anticorpos foram utilizados em experimentos para imunolocalizações desta peritrofina na membrana peritrófica e no ventrículo através de técnicas de imunohistoquímica e imunocitoquímica com o auxílio de microscopia de luz e eletrônica. Foi realizado também um experimento para detecção de quitina na composição química da membrana peritrófica de larvas através da técnica WGA/FITC. Os resultados mostraram que a membrana peritrófica de larvas de 4º instar possui o aspecto de um filme peritrófico, entretanto apresentando um material gelatinoso sobre sua superfície externa. Quanto à imunolocalização da peritrofina no ventrículo de larvas pôde-se evidenciar que a mesma é secretada através das microvilosidades das células epiteliais ao longo de todo o ventrículo, porém sendo a porção anterior deste órgão o principal sítio de produção. Os mesmos experimentos acima foram realizados com ventrículos de abelhas adultas, mas os resultados foram negativos em relação à reação antígeno-anticorpo anti-peritrofina. Os resultados obtidos na detecção de quitina foram positivos somente na membrana peritrófica, pois este polissacarídeo no interior da célula possui constituição diferente daquela após ser secretado. Finalmente, considerando a presença da peritrofina em todo o epitélio ventricular, conclui-se que a membrana peritrófica em larvas de *Melipona quadrifasciata anthidioides* corresponde ao tipo-I.

## ABSTRACT

SILVA, Solange Marques da, M.S. Universidade Federal de Viçosa, July of 2003. **Production sites of an integral protein of the peritrophic membrane in the *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Meliponini) larvae.** Adviser: José Eduardo Serrão. Committee Members: Adilson Ariza Zacaro and José Mário da Silveira Mezêncio.

This work identified the synthesis sites of the peritrophic membrane in larvae of the stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Lepelletier) (Hymenoptera, Meliponini). A peritrophin from 4th instar larvae was isolated and used to produce polyclonal antibody in mouse. This antibody was used in immunolocalization tests of this peritrophin in the peritrophic membrane and midgut epithelium for both light and electron microscopies. Detection of chitin in the peritrophic membrane was performed with WGA/FITC. Results showed that the peritrophic membrane from 4th instar larvae has the aspect of a peritrophic film, but with a gelatinous material on its outer surface. The peritrophin-55 kDa, in the midgut larvae, was found to be secreted through epithelial cells microvilli along the whole midgut, even so being the anterior end of the midgut the main production site. The same experiments were performed with midgut of adult bees, but the results were negative in relation to the antibody anti-peritrophins. The results to chitin detection were only positive in the peritrophic membrane. These results are discussed in relation to peritrophic membrane data available to the insects. Finally, considering the peritrophin presence in the whole midgut epithelium, it is addressed that the peritrophic membrane in larvae of *Melipona quadrifasciata anthidioides* is of the type-I.

## 1. INTRODUÇÃO

A membrana peritrófica (MP) está presente na maioria dos insetos, exceto em Phthiraptera, Psocoptera, Zoraptera, Thysanoptera, Strepsitera, Raphidioptera e Megaloptera e no caso da ordem Hemiptera que apresentam a membrana perimicrovilar. A MP envolve o alimento no interior do ventrículo, proporcionando a compartimentalização espacial do sistema digestivo e atuando funcionalmente como: barreira mecânica impedindo que o epitélio ventricular sofra lesões; barreira física prevenindo infecções por patógenos; barreira permeável para as enzimas e produtos da digestão; e dispositivo para conservação das enzimas digestivas.

A MP é classificada de acordo com o local de síntese, sendo que a MP tipo-I é produzida por todo o epitélio ventricular e está presente na grande maioria dos insetos. Acredita-se que a síntese da MP tipo-I ocorra em função da ingestão de alimento causando a distensão do epitélio. Já a MP tipo-II é sintetizada por células especializadas da cárdia, região localizada na porção anterior do ventrículo, e está presente na maioria dos adultos de Diptera e em alguns Lepidoptera.

Pesquisas realizadas com espécies de Hymenoptera não têm chegado a um consenso em relação ao tipo de MP presente neste grupo, pois muitos autores divergem quanto ao local de síntese e secreção dos seus precursores.

Este trabalho teve por objetivo identificar os sítios de síntese da membrana peritrófica em larvas da abelha *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Lepeletier) (Hymenoptera, Meliponini).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

A morfologia do canal alimentar dos insetos consiste em três partes: o estomodeu ou intestino anterior, o mesêntero ou ventrículo e o proctodeu ou intestino posterior. A origem embriológica do ventrículo é endodérmica, sendo revestido internamente pela MP. Já o intestino anterior e posterior têm origem ectodérmica e são revestidas por cutícula (Snodgrass, 1935).

A membrana peritrófica (MP) está presente no intestino médio ou ventrículo da maioria dos insetos, exceto em Hemiptera, Phthiraptera, Psocoptera, Zoraptera, Thysanoptera, Strepsitera, Rhabdoptera e Megaloptera (Peters, 1992). Hemiptera e Thysanoptera possuem membrana perimicrovilar, diferente morfológica e bioquimicamente da MP (Billingsley, 1983).

Anteriormente, acreditava-se que a MP estaria presente somente nos insetos que se alimentavam de substâncias sólidas, para a proteção do epitélio intestinal contra possíveis lesões, e ausente naqueles que ingeriam alimentos líquidos, livres de partículas sólidas e duras. Entretanto, foi demonstrada a existência de MP em espécies de dieta líquida. Neste sentido, Lehane (1997) acredita que a presença da MP em insetos de dieta líquida esteja relacionada à infecção microbiana no alimento que ingerem, isto é, insetos que ingerem alimento estéril, ou pelo menos dietas líquidas menos infectadas tais como: sangue, néctar e hemolinfa tendem à ausência da MP enquanto, insetos que ingerem dietas líquidas altamente contaminadas com microrganismos tendem a manter sua MP.

Segundo Richards & Richards (1977), a MP pode estar presente em todos os estágios do desenvolvimento dos insetos, além disso Terra (2001) encontrou diferenças na consistência da MP e considerou a existência de dois tipos desta estrutura acelular envolvendo o bolo alimentar: a membrana peritrófica que consiste em um filme completo envolvendo o alimento e, o gel peritrófico sendo uma estrutura com consistência gelatinosa, que ao contrário da membrana não pode ser pinçado durante a dissecação e é susceptível à solubilização durante processos de fixação. Assim, a ausência de MP em algumas espécies deve ser considerada cuidadosamente, devendo-se analisar, principalmente, durante a dissecação a presença do gel peritrófico ou da membrana peritrófica.

Em Hemiptera observa-se a presença de uma estrutura de origem lipoprotéica, denominada membrana perimicrovilar, secretada pelas células ventriculares com funções semelhantes à MP (Terra et al., 1996).

Em relação à composição química da MP, Zimmermann et al. (1975) e Lehane (1997) constataram que fibrilas de quitina compreendem entre 3 a 40% e as proteínas entre 20 a 60% da constituição, embora essa proporção possa variar de acordo com o tipo de MP, a espécie e o estágio do desenvolvimento do inseto.

A MP tipo-I é considerada menos diferenciada estruturalmente em relação a MP tipo-II, sendo formada por delaminações da superfície do epitélio intestinal, onde diferentes regiões do epitélio podem contribuir variavelmente para a síntese. Essas camadas de MP tipo-I podem ser formadas por secreção seqüencial de diferentes componentes, por agregação diferencial de componentes secretados no lúmen ventricular ou por diferenças na forma física

tomada pelos constituintes básicos da MP (Lehane, 1997). Reid & Lehane (1984) sugeriram que a formação da MP tipo-I passa por um processo de maturação que ocorre em três passos: 1) secreção dos precursores das fibrilas de quitina; 2) maturação deste material formando uma rede; e 3) o ligamento de uma matriz protéica que localiza-se entre as fibrilas de quitina.

A MP tipo-II é secretada constitutivamente pelas células da cárdia, formando assim um tubo devido à pressão do material secretado contra as paredes do epitélio. A MP tipo-II pode ser constituída por uma ou até três camadas concêntricas, onde as fibrilas de quitina estão dispostas aleatoriamente ou organizadas ortogonalmente (Lehane, 1997).

Quanto às proteínas que compõem a MP, Tellam et al. (1999) sugerem que sejam divididas em quatro classes, com base em técnicas de extração diferencial, utilizando-se para isto condições solubilizantes que aumentam a severidade extratora, sendo classificadas em: proteínas da classe 1 as quais são facilmente removidas usando-se tampões fisiológicos ou tampões com alta força iônica. Este extrato corresponde às proteínas em trânsito para ou do ventrículo e aquelas que se encontram fracamente ligadas à MP; proteínas da classe 2 que são removidas através do uso de detergentes relativamente fracos; proteínas da classe 3 ou peritrofinas que são consideradas como as proteínas integrantes da membrana peritrófica, sendo extraídas por fortes agentes desnaturantes; proteínas ou peritrofinas da classe 4: consideradas de difícil extração e são pouco conhecidas.

As funções da MP foram estabelecidas através de estudos do efeito desta estrutura nos eventos digestivos, em conjunto com o estabelecimento

das propriedades estruturais da mesma. Sendo assim, foram propostas as seguintes funções básicas:

- Barreira mecânica, evitando que as células intestinais sofram algum tipo de traumatismo devido ao atrito das partículas sólidas do alimento, considerando-se que esta região não é revestida por cutícula (Wigglesworth, 1972). De acordo com um modelo proposto por Terra (2001), esta função seria considerada ancestral, pois supõe-se que o inseto ancestral apresentava seu intestino médio ou ventrículo coberto por muco, semelhante ao encontrado em muitos animais e que a MP teria evoluído a partir desse muco;

- Barreira física, impedindo a invasão de microrganismos, onde patógenos presentes no espaço endoperitrófico não conseguem atravessar a MP e portanto, não infectam as células ventriculares (Snodgrass, 1935; Smith, 1968);

- Barreira permeável às enzimas digestivas e produtos da digestão. Pois, sugere-se que a MP retenha as partículas alimentares não digeridas no espaço endoperitrófico, mas seja permeável às enzimas e produtos iniciais da digestão (Day & Waterhouse, 1953; Mello et al., 1971);

- Dispositivo para a conservação das enzimas digestivas através da compartimentalização da digestão e o fluxo de fluidos no ventrículo proporcionado pela presença da MP (Terra et al., 1979; Ferreira et al., 1981).

Para alguns autores a função mais importante da MP seria seu papel como barreira contra invasão de microrganismos (Peters, 1992; Jacobs-Lorena & Oo, 1996; Tellam, 1996; Lehane, 1997). Porém, Terra (2001) supõe que uma das atribuições mais importantes dadas à MP seja a sua função como uma barreira permeável às enzimas e produtos da digestão, o que leva a formação

de um sistema de compartimentalização dos processos digestivos, bem como ao impedimento da excreção das enzimas digestivas. Esta compartimentalização torna-se possível devido à permeabilidade da MP às enzimas e aos nutrientes, sugerindo a existência de poros com diâmetros que variam entre 7 e 8 nm (Terra & Ferreira, 1983). Então, a consideração feita por Terra (2001) pode ser considerada extremamente vantajosa para os insetos, uma vez que leva a um mecanismo de economia na síntese de enzimas digestivas, as quais são “recicladas” através da circulação endo-ectoperitrófica de fluidos no ventrículo, permitindo que o inseto invista sua energia em outros processo vitais.

Corroborando o fato de várias enzimas poderem atravessar a MP, Edwards & Jacobs-Lorena (2000) demonstraram que a mesma em *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae* é permeável à moléculas com Mr até 148 KDa, o equivalente entre 7 e 8 nm em diâmetro dos poros.

Segundo Terra et al. (1979) a compartimentalização das enzimas digestivas, em espaços distintos formados pela MP, proporciona que estas acompanhem o movimento do fluxo de fluidos no ventrículo. Este estudo foi realizado utilizando-se larvas de *Rynchosciara americana* (Diptera, Nematocera), que apresentavam condições morfológicas favoráveis pois, a MP possui consistência pastosa e o fluido ectoperitrófico localiza-se, quase totalmente, restrito ao lúmen de seus dois grandes cecos gástricos anteriores. As determinações enzimáticas, realizadas em células intestinais e em espaços luminiais exteriores e interiores à MP das larvas, mostraram que amilase, tripsina e aminopeptidase são secretadas para o espaço ectoperitrófico, mas apenas as duas primeiras atravessam a MP penetrando no espaço

endoperitrófico, pois a aminopeptidase possui tamanho maior que os poros da MP. Os ensaios revelaram também que maltase e dipeptidase estão restritas às células intestinais. Estes autores também verificaram que esta espécie apresentava baixa taxa de excreção de enzimas, onde cerca de 80% das mesmas presentes no espaço endoperitrófico são removidas do bolo alimentar antes de serem expelidas pelo inseto, confirmando-se a hipótese de circulação endo-ectoperitrófica bem como da compartimentalização das enzimas.

Detra & Romoser (1979) e Terra et al. (1979) descreveram que as enzimas digestivas polímero-hidrolases secretadas pelas células epiteliais do ventrículo podem atravessar a MP em direção ao espaço endoperitrófico. Além disso, Terra et al. (1979) e Terra & Ferreira (1981) sugerem que os oligômeros derivados de partículas alimentares pré-digeridas pelas polímero-hidrolases atravessam a MP acompanhadas por estas enzimas em direção ao espaço ectoperitrófico. Entretanto, as enzimas retornam para direção oposta, ou seja, no sentido posterior para anterior seguindo o movimento dos fluidos e atravessando novamente a MP para dentro do espaço endoperitrófico.

A atuação da MP como uma barreira física pode estar relacionada ao tipo de MP existente em cada inseto. De acordo com Lehane (1997), a MP tipo-II é mais efetiva como uma barreira permanente entre as células epiteliais e o alimento ingerido, o qual pode vir acompanhado por microrganismos. É interessante notar que este mesmo autor propôs que mosquitos hematófagos adultos produzindo MP tipo-II raramente são vetores de doenças arbovirais, doenças transmitidas por artrópodes, enquanto muitos outros Diptera produzindo MP tipo-I os são.

Considerando a diversidade de funções desempenhadas pela MP no ventrículo dos insetos, podemos correlacioná-la sob um contexto filogenético. Isto é, que sua função de proteção contra o atrito do alimento sobre o epitélio seria a condição ancestral, e as funções mais complexas apareceram durante a evolução dos processos de alimentação e digestão. Estas adaptações incluiriam: a) prevenir de ligações não-específicas de partículas alimentares não digeridas com hidrolases na membrana plasmática das células e/ou com proteínas transportadoras; b) prevenção da excreção de enzimas digestivas, permitindo a recirculação endo-ectoperitrofica destas; e c) permitir a produção de monômeros somente junto à superfície das células epiteliais, estando esta última adaptação presente somente nos panorpóides (Terra, 1989 e 1990).

Quanto à origem da MP, percebe-se muitas divergências. Diversos autores acreditam que ela seja formada por secreções das células epiteliais do ventrículo. Outros sugerem que a MP é uma continuação da íntima quitinosa (cutícula) que reveste o esôfago, secretada por células situadas na junção do intestino anterior com o ventrículo.

De acordo com Peters (1992), larvas de todos os Diptera sintetizam MP tipo-II, mas no estágio adulto os mosquitos hematófagos produzem MP tipo-I depois de ingerirem uma refeição de sangue (Freyvogel & Stäubli, 1965; Richards & Richards, 1971). Assim, ambos os tipos de MP podem ser sintetizados em diferentes estágios do desenvolvimento em uma mesma espécie.

Em relação à origem da MP nos Hymenoptera há muitas divergências. Para Green (1931), Mercer & Day (1952), Hassanein (1953), Mello et al. (1971), Cruz-Landim & Mello (1981) e Jimenez & Gilliam (1990), a MP é

sintetizada por todas as células epiteliais do ventrículo. Snodgrass (1956) sugere que tanto a MP tipo-I quanto a tipo-II são sintetizadas em larvas de abelhas melíferas e somente a tipo-II em abelhas adultas. Porém, Butt (1934) sugere que células situadas na base da válvula estomodeal secretam a MP tipo-II em larvas de *Sciara* (Diptera) e *Apis mellifera*. Serrão & Cruz-Landim (1996a) observaram que a MP nas abelhas sem ferrão apresenta uma única camada, sugerindo que sua origem ocorre na região anterior do ventrículo ou cárdia. Por outro lado, Snodgrass (1956) sugere que nas abelhas melíferas (*Apis mellifera*) adultas a MP apresenta diversas camadas concêntricas e finas que envolvem o alimento. A MP forma um envelope acelular que reveste o lúmen do ventrículo, onde sua composição química envolve glicosaminoglicanas e proteínas embebidas numa rede frouxa de fibrilas de quitina (Mercer & Day, 1952; Richards & Richards, 1977).

Nas abelhas o ventrículo apresenta duas regiões distintas: a região anterior onde encontra-se a cárdia, sem anelações externas e, o restante com anelações pronunciadas (Serrão & Cruz-Landim, 1995). Segundo Serrão & Cruz-Landim (1996a), no ventrículo de várias espécies de *Trigona* a cárdia é formada por células epiteliais de origem endodérmica, as quais são prismáticas, altas e estreitas com borda estriada pouco evidente. Após a região da cárdia as células, ainda altas, tem o ápice alargado, exibindo na superfície muitas microvilosidades (Snodgrass, 1956).

Segundo Serrão & Cruz-Landim (1996b) e Cruz-Landim et al. (1997) o número de microvilosidades por  $\mu\text{m}^2$  varia de 30 a 40 em *M. quadrifasciata anthidioides* e em *A. mellifera*, respectivamente, cujos valores correspondem em um aumento na área superficial da célula entre 135 e 200 vezes. Estes

valores de aumento de área superficial foram considerados 3 vezes maiores quando comparados com dados de Noirot & Noirot-Timothee (1972) e Bignell et al. (1982) obtidos em outras espécies como baratas (*Periplaneta americana* e *Blaberus craniifer*), cupins (*Cephalotermes rectangularis*, *Microcerotermes edentatus*, *Cubitermes severus* e *Kaloterms flavicolis*) e besouro (*Tenebrio molitor*).

Ainda, Cruz-Landim et al. (1997) sugerem que o grande aumento na área superficial do ventrículo, proporcionada por numerosas microvilosidades, está relacionada à absorção de nutrientes, uma vez que nas abelhas não há cecos gástricos, uma especialização do ventrículo para absorção de nutrientes. Estes mesmos autores, acreditam que alguns aspectos morfológicos das microvilosidades com comprimento extremamente alongado (17-22  $\mu\text{m}$ ), pequeno diâmetro nas pontas, ausência de microfilamentos no seu ápice e ondulações podem ter confundido as observações de autores como Snodgrass (1956), Vecchi & Bragaglia (1965), Davidson (1970), Mello et al. (1971) e Cruz-Landim & Mello (1981), como sendo diversas camadas com diferentes eletrodensidades o daria a falsa impressão de delaminações dos ápices das células epiteliais tomadas como camadas de MP tipo-I em abelhas.

Em relação aos tipos celulares do epitélio ventricular em abelhas, Serrão & Cruz-Landim (1995) em *Scatotrigona postica* e Neves et al. (2002) em *M. quadrifasciata anthidioides* caracterizaram quatro tipos: as células da região anterior, ou cárdia, as células digestivas, situadas no restante do ventrículo, as células regenerativas na porção basal de todo o epitélio e as células endócrinas espalhadas ao longo do ventrículo.

Jimenez & Gilliam (1990) observaram em *Apis mellifera* que na região anterior as células epiteliais apresentam membrana plasmática basal pouco invaginada, com poucas mitocôndrias associadas a estas invaginações, e presença de vesículas membranosas no ápice, sugerindo que esta região do ventrículo está envolvida na síntese e secreção da MP e não propriamente na digestão. Enquanto que a região mediana do ventrículo corresponde ao principal sítio de digestão terminal e absorção de nutrientes e a porção mediana e posterior responsável pela síntese e secreção das enzimas digestivas. Entretanto, estudos histológicos anteriores em relação ao sítio de síntese e secreção da MP em *Bombus pennsylvanicus* (Swingle, 1927) e *Apis mellifera* (Cruz-Landim, 1985) sugeriram que a MP seja sintetizada pela válvula estomodeal.

Considerando a região da cárdia um carácter mais derivado dentro da evolução das abelhas, Peixoto & Serrão (2001) correlacionaram a presença dela como um carácter multi-estado para as abelhas, sugerindo que a cárdia longa, em Meliponini e a ausência de cárdia em Bombini e Apini sejam caracteres derivados da cárdia curta em Euglossini que evoluíram independentemente. Porém, a função desta região do ventrículo permanece desconhecida, embora Serrão & Cruz-Landim (1996a) tenham sugerido que ela esteja envolvida na produção da MP em um mecanismo semelhante ao descrito em Diptera por King (1988).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Obtenção da Membrana Peritrófica para Produção do Antissoro Policlonal**

Foram utilizadas 300 larvas de 4<sup>o</sup> instar pré-defecantes de *M. quadrifasciata anthidioides*, coletadas em ninhos no apiário da Universidade Federal de Viçosa. Estas larvas foram dissecadas em solução salina (NaCl 125 mM, pH 7,2). Após a retirada do trato digestivo, de cada larva, separou-se a MP contendo alimento em seu interior, a qual era rompida e sucessivamente lavada na mesma solução salina para retirada do conteúdo alimentar. As membranas peritróficas obtidas foram acondicionadas em tubos tipo Eppendorf (1,5 mL), contendo em cada tubo aproximadamente 300 µL de solução salina 125 mM e 100 unidades de MP que foram armazenadas a -20° C para posterior processamento visando a obtenção de extratos protéicos, para verificação do perfil eletroforético das proteínas e isolamento da proteína que foi utilizada como imunógeno.

#### **3.2. Extração das Proteínas**

Para seleção de um extrato contendo as peritrofinas da classe 3 as amostras de membrana peritrófica foram submetidas ao seguinte processo de extração:

- 1) Aproximadamente 100 MP imersas em solução salina (NaCl 125 mM), passaram por uma rápida centrifugação a 10000 g por 5 minutos, para

sedimentação das membranas. Em seguida, foram homogeneizadas por 5 minutos com auxílio de um 'Potter'. O homogenizado obtido foi centrifugado em centrífuga refrigerada Beckmann a 20000 g, a 4 °C por 30 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi coletado, armazenado a -20 °C e designado 1ª fase da extração da MP;

2) O precipitado da extração acima foi ressuspenso em 200 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0, contendo SDS (para o imunógeno) ou CHAPS (para a eletroforese) 65 mM em NaCl 125 mM, seguindo-se por homogeneização e centrifugação como descrito acima, sendo o sobrenadante obtido, coletado, armazenado a -20 °C e designado 2ª fase da extração da MP;

3) Ao último precipitado adicionou-se 100 µL de uréia 12 M em tampão Tris-HCl 40 mM, seguindo-se nova homogeneização e centrifugação, sendo este último sobrenadante coletado, armazenado a -20 °C e designado 3ª fase da extração da MP.

Para efeitos gerais de comparação dos perfis eletroforéticos das proteínas da MP também foram realizadas extrações a partir dos ventrículos de larvas pré-defecantes e de adultos de *M. quadrifasciata anthidioides*, seguindo-se os mesmos moldes da extração de proteínas da MP. Sendo as respectivas frações obtidas designadas 1ª, 2ª e 3ª extrações dos ventrículos de larva e adultos.

Todos os extratos foram dialisados por 24 horas a 4 °C utilizando-se membrana de diálise para proteínas com peso molecular acima de 12 kDa (Sigma, USA), contra 1000 volumes de água destilada e deionizada. Em seguida, estas mesmas amostras foram armazenadas a -20 °C.

### **3.3. Dosagem de Proteína e Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Os teores protéicos dos extratos da MP (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> extrações) e dos ventrículos de larva (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> extrações) e adulto (1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> extrações) foram determinados em espectrofotômetro Hitachi ( $\lambda = 595 \text{ nm}$ ), utilizando o procedimento de Bradford (1976) e, como padrão de peso molecular, soro albumina bovina.

Posteriormente, as amostras de proteínas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> extrações de MP e dos epitélios larval e adulto foram submetidas à análise eletroforética sob condições desnaturantes em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE), em um sistema de pH descontínuo (Laemmli, 1970), utilizando-se o equipamento Mini-Protean 3 Cell (Bio-Rad, USA). As amostras de proteínas foram misturadas com tampão de amostra na proporção 1:2, formado por tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, SDS a 10%, glicerol 25%, azul de bromofenol 0,5% (m/v) e 0,71 M de  $\beta$ -mercaptoetanol, seguindo-se aquecimento em banho-maria a 95 °C por 4 minutos antes de serem aplicadas no gel.

A eletroforese foi conduzida a 150 V até a frente de corrida (azul de bromofenol), chegar a base do gel. Logo após a corrida, o gel foi corado com solução de prata conforme descrito por Blum et al. (1987).

O peso molecular dos polipeptídeos foi estimado pela regressão linear dos logaritmos da mobilidade relativa ( $M_r = \text{distância migrada pela proteína} / \text{distância migrada pelo corante}$ ), tendo como padrões: fosforilase b, soro albumina bovina, ovalbumina, anidrase carbônica, inibidor de tripsina da soja e lisozima (Bio-Rad, cat. n. 161-0304).

### 3.4. Produção do Antissoro Policlonal

Foram utilizados cinco camundongos albinos suíços obtidos do biotério da Universidade Federal de Viçosa, sendo três para tratamento e dois para controle. O imunógeno da MP utilizado correspondeu às proteínas presentes no 3º extrato (50 µg), correspondendo à amostra contendo peritrofinas, emulsificada com saponina (20 µg/170 µL de água ultrapura). As inoculações nos três camundongos foram por via subcutânea, na base do pescoço entre as escápulas, sendo que o volume total do emulsificado aplicado correspondeu a 0,2 ml em cada animal. Foram aplicadas três doses do imunógeno com intervalos de 10 dias entre elas e após a terceira inoculação foram feitas sangrias nos três camundongos-tratamento para verificação dos níveis de anticorpos, bem como nos camundongos-controle, através do teste Imuno “dot blot”.

Após obtenção de resultados positivos para a titulação dos antissoros, os camundongos, anestesiados em câmara de éter, foram submetidos à coleta total do sangue com auxílio de pipetas Pasteur esterilizadas, puncionando-se a região do plexo retro-orbital, sem uso de anticoagulantes.

As amostras de sangue foram deixadas em repouso por 12 horas a 4 °C, para separação do soro contendo anticorpos anti-peritrofina da MP e, então, os frascos contendo os coágulos foram centrifugados a 5000 g a 4 °C por 5 minutos. Posteriormente, os anti-soros foram coletados e aliquotados em tubos Eppendorf e armazenados a – 20 °C e designados como AS<sub>1</sub>, AS<sub>2</sub> e AS<sub>3</sub> de acordo com o camundongo que o produziu. Os soros obtidos nos

camundongos controle também foram coletados, aliquotados e armazenados a -20 °C.

### **3.5. Imuno “Dot Blot”**

O procedimento da técnica imunoenzimática, conforme Dracz (1996), consistiu na diluição do antígeno correspondente ao 3º extrato da MP (250 ng de proteína para cada disco de membrana de nitrocelulose). Os discos de membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) foram acondicionados em microplaca, seguindo-se aplicação de 1 µL do antígeno sobre os mesmos. Após 10 minutos fez-se o bloqueio com PBS 0,1 M, pH 7,2 + Tween 20 a 0,5% (PBST) + BSA 1,0% (300 µL/disco) por 15 minutos. Em seguida, foram aplicados 250 µL dos anti-soros diluídos na proporção de 1:100, 1:200 e 1:400 em PBS sobre os discos de membrana de nitrocelulose, os quais foram deixados sob agitação lenta por uma hora. A seguir foram realizadas 3 lavagens com PBST 0,5% de 5 minutos cada, para retirada do excesso de anticorpos. Depois desta fase os discos de membrana de nitrocelulose foram tratados com anticorpo de coelho anti-IgG de camundongo, conjugado com peroxidase (Sigma) e diluído em PBS (1:6000), durante 30 minutos. Seguiram-se, novamente, 3 lavagens com PBST 0,5%. A revelação da reação foi realizada utilizando-se solução contendo 5 mg de diaminobenzidina (DAB), 5 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, 5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% e 250 µL cloreto de níquel a 0,3%. Posteriormente, fez-se o bloqueio da reação aplicando-se sobre os discos água destilada.

### **3.6. “Western Blotting”**

Após eletroforese em gel de poliacrilamida 12% as proteínas das amostras de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> extrações foram transferidas eletroforeticamente para uma membrana de nitrocelulose com diâmetro do poro de 0,45 µm (Bio-Rad). Antes de iniciar o processo, todos os materiais utilizados foram equilibrados em tampão de transferência Tris/Glicina/Metanol. A seguir, foi montado um ‘sanduíche’ composto por 3 folhas de papel-filtro, a membrana de nitrocelulose o gel e mais 3 folhas de papel-filtro, sendo que a posição do gel foi voltada para o pólo negativo durante a eletroforese. O ‘sanduíche’ foi colocado numa cuba vertical de transferência úmida (Mini Trans-Blot Transfer Cell, Bio-Rad, USA), preenchida com tampão de transferência, sendo a eletroforese executada a 30 V, a 4 °C por 12 horas.

A eficiência da transferência foi avaliada observando-se o padrão de peso molecular pré-corado (Bio-Rad) sobre a membrana de nitrocelulose. Logo após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi cortada em tiras, as quais foram lavadas e bloqueadas em PBST 0,5% + BSA 1,5% em temperatura ambiente por 15 minutos, sob agitação lenta. Depois as mesmas foram incubadas com anticorpo primário diluído em PBS (1:200) por uma hora em temperatura ambiente e sob agitação lenta. Em seguida, as tiras foram lavadas em PBST 0,5% e incubadas em anticorpo secundário de coelho anti-IgG de camundongo, conjugado com peroxidase e diluído em PBS (1:6000), por uma hora em temperatura ambiente e sob agitação lenta. O processo foi finalizado lavando-se as tiras com PBST 0,5% e submetendo-as à revelação com a solução contendo DAB, semelhante à utilizada no “dot blot”.

O controle foi realizado em tiras de membrana de nitrocelulose que após a transferência foram submetidas ao mesmo procedimento, exceto pela omissão da incubação em anticorpo primário.

### **3.7. Imunohistoquímica**

Larvas pré-defecantes e adultos de abelhas foram dissecados para retirada do trato digestivo. Nas larvas o ventrículo foi dividido em duas regiões: anterior e posterior e também foi separada a MP de alguns ventrículos. O ventrículo das operárias adultas foi dividido em três partes aproximadamente iguais: porção anterior, incluindo a cárdia, porção mediana e porção posterior. Todas as peças foram fixadas em solução de Zamboni (Stefanini et al., 1967) por 24 horas a 4 °C.

As peças foram transferidas para solução de fenilhidrazina a 1% por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, as peças foram lavadas em PBS 0,1 M pH 7,4, 3 vezes por 5 minutos cada lavagem, e transferidas para uma solução de soro albumina bovina (BSA) 1,5% em PBS 0,1 M + Tween 20 a 1% durante 12 horas a 4 °C. Após lavadas com PBST 1%, 3 vezes por 5 minutos cada lavagem, as peças foram incubadas em soro normal de camundongo a 2% em PBST 1% por uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas três lavagens com PBST 1% por 30 minutos cada, e incubação em anticorpo primário diluído 1:100 em PBST 1% por 24 horas a 4° C. Novamente, as peças foram lavadas três vezes com PBST 1% (30 minutos cada), seguindo-se incubação em anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo, conjugado com peroxidase (Sigma), cuja diluição foi de 1:20 em PBST 1%. A

revelação foi realizada com a transferência das peças em DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mg de DAB, 5 mL de Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, 5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%).

O controle foi realizado com peças que não passaram pela etapa de incubação em anticorpo primário, usando para isto o soro normal dos camundongos-controle.

Posterior ao tratamento com anticorpos as peças passaram por desidratação em série alcoólica (70, 80, 90 e 95%) e posterior inclusão em historesina JB-4. As secções com 5 µm de espessura foram obtidas em micrótomo manual (Leica), contrastadas em solução de hematoxilina a 1% e após secagem, as lâminas foram montadas com Entelam (Merck) e lamínulas para posterior análise em microscópio de luz.

Um segundo teste imunohistoquímico foi utilizado, porém com o anticorpo secundário conjugado com isoticianato de fluoresceína (FITC). As amostras do ventrículo de larvas (porções anterior e posterior, e MP) foram dissecadas e fixadas como descrito anteriormente. Primeiramente as amostras passaram por 3 lavagens de 15 minutos cada em PBST 1,0% seguindo-se por incubação numa solução de BSA 1,5% em tampão PBST 1,0% por 10 minutos e, novamente, seguiram para outra lavagem por 10 minutos em PBST 1,0%. Posteriormente, as amostras foram incubadas em anticorpo primário diluído 1:100 em PBST 1,0% por 24 horas a 4 °C. Após esta incubação as peças foram lavadas em tampão PBST 1,0% por 3 vezes durante 30 minutos, seguindo-se por incubação em anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, produzido em coelho, conjugado com FITC, diluído em PBST 1,0% na proporção de 1:20 por 24 horas a 4 °C. Em seguida, as peças foram lavadas em PBS, 2 vezes por 10 minutos cada, para então passarem por série de

desidratação alcoólica (70, 80, 90, 95%), embebição e inclusão em historesina JB-4. As secções de 6 µm de espessura foram colocadas sobre lâminas e montadas com sacarose 2,3 M em PBS/NaN<sub>3</sub> a 0,01% lamínulas para posterior análise em microscópio de epifluorescência.

Algumas peças de MP foram transferidas diretamente para lâminas após o término da técnica, montadas com sacarose 2,3 M em PBS/NaN<sub>3</sub> a 0,01% e lamínulas, e analisadas em microscópio de epifluorescência.

### **3.8. Detecção de Quitina**

Larvas pré-defecantes de *M. quadrifasciata anthidioides* foram dissecadas separando-se o ventrículo e a MP que foram fixados em solução de Zamboni. Estas peças passaram por desidratação em uma série alcoólica (70, 80, 90 e 95%) e foram incluídas em historesina JB-4.

As secções com 6 µm de espessura foram submetidas à técnica de detecção de quitina Peters & Latka (1986), modificada por Terra (2001), que consiste em submeter as secções à duas lavagens em PBS 0,1 M, pH 7,2 por 10 minutos, seguindo-se bloqueio em solução de BSA 0,05% em PBS por 10 minutos e lavagem em PBS por 10 minutos. Em seguida, as secções são incubadas em uma solução de WGA-FITC em presença de 0,2 mM de N-acetilglicosamina na proporção de 1:5. Posteriormente, as seções passam por lavagem com água destilada por 5 minutos, sendo que após a secagem elas são montadas com sacarose 2,3 M em PBS/NaN<sub>3</sub> e lamínulas, e analisadas em microscópio de fluorescência.

### 3.9. Imunocitoquímica

Ventrículos de larvas pré-defecantes foram fixados em uma solução de glutaraldeído 0,1% e formaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por 4 horas, seguindo-se lavagem no mesmo tampão, desidratação em série alcoólica (70, 80 e 90%) e inclusão em resina acrílica LR-White. Secções ultrafinas foram coletadas em telinhas de ouro (300 mesh) e submetidas ao tratamento imunocitoquímico.

As telinhas contendo os cortes ultrafinos foram umedecidas com TBS (tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,2). Em seguida, as amostras passaram por lavagem no mesmo tampão contendo BSA a 1% (TBSB). A neutralização da ligação dos anticorpos conjugados com ouro entre si foi realizada através do uso de soro normal de cabra diluído 1:30 em TBS com Tween 20 a 0,1%. Em seguida, as amostras destinadas ao tratamento foram incubadas em anticorpo primário (1:5) em TBSB por 12 horas a 4 °C. As amostras controle não passaram pela incubação em anticorpo primário, permanecendo em TBSB. Posteriormente, todas as amostras foram lavadas em TBSB e incubadas em anticorpo secundário de cabra anti-IgG de camundongo conjugado com ouro coloidal (IgG/ouro 10 nm, Sigma), 1:30 em TBSB, por uma hora em temperatura ambiente.

Posteriormente, seguiram-se lavagens sucessivas das amostras, em TBSB sendo 4 lavagens por 10 minutos cada uma, em TBS por 4 vezes durante 3 minutos cada, em água ultrapura por 4 vezes por 5 minutos cada, e contração com acetato de uranila a 1% e citrato de chumbo. Após a

secagem as amostras foram analisadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109.

#### 4. RESULTADOS

Durante os procedimentos de dissecação, observou-se que a MP de larvas de *M. quadrifasciata anthidioides* (Figura 1) apresenta aspecto de um filme peritrófico, porém notou-se a presença de uma substância viscosa sobre a sua superfície externa, conferindo uma aparência esbranquiçada e opaca em quase toda sua extensão. A MP mostrou alguma resistência ao rompimento durante as lavagens para retirada do alimento de seu interior, o que também acabou promovendo a perda por solubilização de parte da substância viscosa sobre ela. Pode-se observar que a MP é mais estreita do que o epitélio do ventrículo e que, na sua superfície externa, o material viscoso toma a forma do topo das células ventriculares como se fossem suas “impressões digitais”. Isto foi mais marcante e visível nas extremidades da MP, cuja porção posterior termina em fundo cego até o fim do estágio larval (Figura 1).

A MP em adultos mostrou-se mais frágil, fina e quase transparente em relação àquela da larva. Tanto que não foi possível preparar um extrato de proteínas a partir somente de MP de adultos, devido à dificuldade de separá-la do ventrículo, onde muitas vezes rompiam-se e fragmentavam-se durante a dissecação.

A tabela 1 sumariza os valores do teor protéico obtidos nas amostras, em cada extração, a partir da membrana peritrófica, dos ventrículos de larvas e de operárias adultas de *M. quadrifasciata anthidioides*. Observou-se que os teores de proteínas mais elevados estão presentes no 2º extrato da membrana peritrófica, na 2º e 3º extratos dos ventrículos de larvas, e na 1º extrato do ventrículo completo de abelhas adultas.

O perfil eletroforético das amostras de proteínas da MP e dos ventrículos larvais e adultos, com base nos três tipos de extrações diferenciais empregados está ilustrado na figura 2. A 3ª extração da membrana peritrófica mostrou a presença de dois polipeptídios com massas moleculares (Mr) estimadas em 55 e 20,7 kDa. Sendo que o polipeptídio de 55 kDa está aparentemente presente nos extratos de 3ª extração de larva e de adulto e o polipeptídio de 20,7 kDa está presente somente nos extratos da MP.

Os antissoros obtidos em camundongos, a partir da inoculação com a proteína-55 kDa de 3ª extração da MP de larvas de *M. quadrifasciata anthidioides*, resultaram em anticorpos policlonais anti-peritrofina.

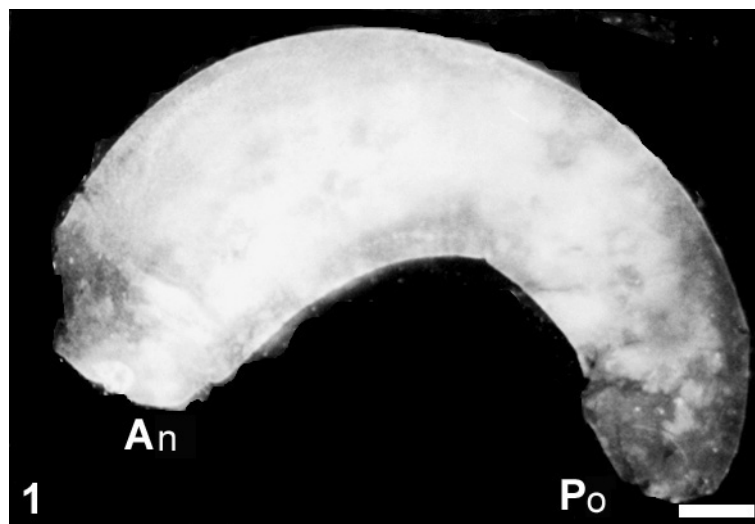


Figura 1. Membrana peritrófica da larva de *Melipona quadrifasciata anthidioides* em 4º instar. An - extremidade anterior; Po - extremidade posterior. Barra = 100  $\mu$ m.

Tabela 1. Teor protéico da membrana peritrófica (MP) de larvas de 4<sup>o</sup> instar e dos ventrículos das larvas e de operárias adultas de *Melipona quadrifasciata anthidioides*

| <b>Amostras</b>                                     | <b>(µg) de prots./inseto</b> |
|---|------------------------------|
| MP – 1 <sup>a</sup> extração                        | 1,00                         |
| MP – 2 <sup>a</sup> extração                        | 2,50                         |
| MP – 3 <sup>a</sup> extração                        | 1,00                         |
| ventrículo de larva – 1 <sup>a</sup> extração       | 0,55                         |
| ventrículo de larva – 2 <sup>a</sup> extração       | 1,45                         |
| ventrículo de larva – 3 <sup>a</sup> extração       | 1,40                         |
| ventrículo + MP de adulto - 1 <sup>a</sup> extração | 0,90                         |
| ventrículo + MP de adulto – 2 <sup>a</sup> extração | 0,65                         |
| ventrículo + MP de adulto - 3 <sup>a</sup> extração | 0,55                         |

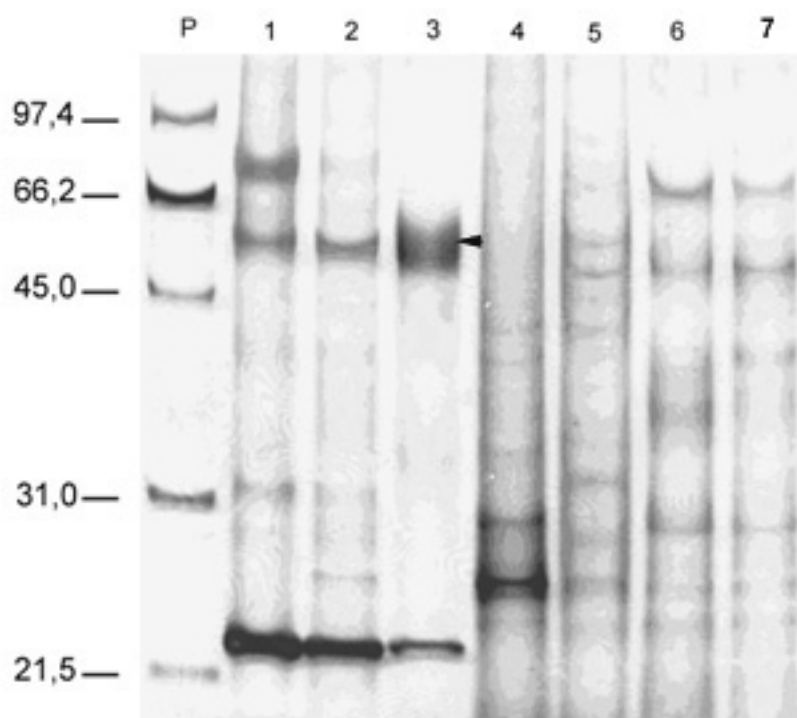














Figura 2. Gel de poliacrilamida a 12% corado com prata de três extrações da membrana peritrófica de larvas de 4º instar (1 = 1ª extração; 2 = 2ª extração; 3 = 3ª extração), ventrículos de larvas (4 = 1ª extração; 5 = 2ª extração; 6 = 3ª extração 4-6) e da 3ª extração dos ventrículos de operárias adultas (7) de *Melipona quadrifasciata anthidioides*. P - padrão de peso molecular. \* - Peritrofina-55kDa.

Os resultados obtidos através do teste “dot blot” mostraram reação positiva para os anti-soros dos 3 camundongos até a diluição de 1:400 (Quadro 1) em relação às peritrofinas da 3ª extração da MP de larvas. Porém, deve-se ressaltar que foram obtidos títulos mais altos de até 1:1600 dos anticorpos anti-peritrofina em testes western blotting.

A proteína de interesse designada peritrofina-55 foi encontrada apenas no 3º extrato da MP e sendo assim, está associada somente à membrana peritrófica de larvas de *M. quadrifasciata anthidioides*, uma vez que apenas esta proteína reagiu no western blotting (Figura 4). Entretanto, as outras

proteínas encontradas nos extratos 1 e 2 da MP que pareciam ter peso molecular semelhante ao da peritrofina-55 não reagiram positivamente ao anticorpo. O mesmo também aconteceu para os extratos de 1ª e 2ª extrações do ventrículo de larvas bem como para a 3ª extração de operárias adultas. Já a 3ª extração do ventrículo de larva mostrou reação positiva do anticorpo para uma proteína com peso molecular similar aquele encontrado no 3º extrato de MP (Figura 4).

Quadro 1. Imuno “dot blot” sobre discos de membrana de nitrocelulose demonstrando reação positiva antígeno-anticorpo em todas as diluições dos antissoros obtidos dos 3 camundongos inoculados com o 3º extrato da MP de *M. quadrifasciata anthidioides* (AS<sub>1</sub>, AS<sub>2</sub> e AS<sub>3</sub>) e ausência de reação no controle, utilizando-se antissoro dos camundongos não inoculados

| <b>Anti-soro</b> | <b>1:100</b>   | <b>1:200</b>   | <b>1:400</b>   |
|------------------|--|--|--|
| <b>AS 1</b>      | 1   | 2   | 3   |
| <b>AS 2</b>      | 4   | 5   | 6   |
| <b>AS 3</b>      | 7   | 8   | 9   |
| <b>CONTROLE</b>  | 10  | 11  | 12  |

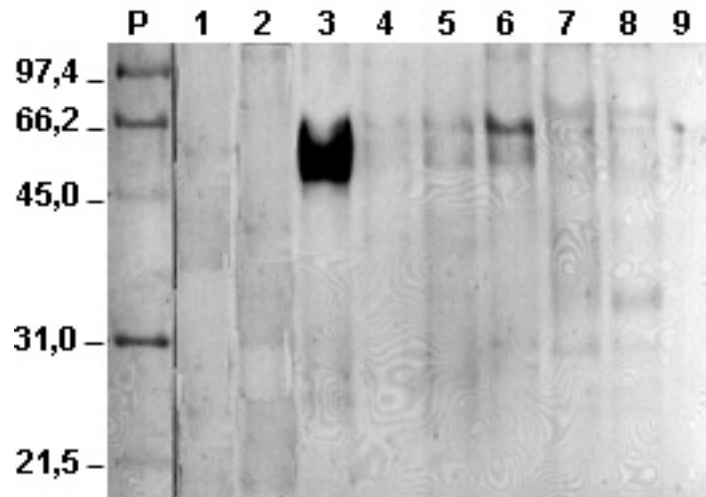


Figura 4. “Western blotting” com anticorpo anti-peritrofina 55 kDa, mostrando reação positiva na linha 3 correspondendo ao 3º extrato da MP e na linha 6 que corresponde ao 3º extrato do ventrículo de larva 4º instar de *M. quadrifasciata anthidioides*. Linha P, padrão de peso molecular; Para as demais linhas a reação foi negativa: linha 1, 1º extrato da MP; linha 2, 2º extrato da MP; linha 4, 1º extrato dos ventrículos de larvas; linha 5, 2º extrato dos ventrículos de larvas; linha 7, 1º extrato dos ventrículos de adultos; linha 8, 2º extrato dos ventrículos e adultos; linha 9, 3º extrato dos ventrículos de adultos.

Secções da região anterior do ventrículo, exceto a região da cárdia, de larvas de *M. quadrifasciata anthidioides* submetidas à técnica imunohistoquímica mostram extensivas reações positivas no interior das células epiteliais, principalmente na periferia e acima da borda estriada, sugerindo que a peritrofina-55 está sendo secretada em direção à membrana peritrófica (Figuras 5-7, 10). Observa-se também a presença de muitos grânulos de secreção de tamanhos variados corados pela hematoxilina situados acima da borda estriada, porém estes são maiores que as imunomarcações da peritrofina-55 (Figuras 6, 7) e os grânulos maiores encontram-se em maior abundância na região posterior do ventrículo (Figura 9).

Pode-se observar ainda, nas células digestivas de larvas, que o núcleo apresenta regiões com heterocromatina distribuída ao acaso e o citoplasma geralmente filamentososo (Figuras 5 e 6).

As secções da região posterior do ventrículo de larva de *M. quadrifasciata anthidioides* confirmam a presença de peritrofina-55, porém esta peritrofina parece ser menos abundante do que na região anterior do ventrículo, podendo-se também observar imunomarcações positivas acima da borda estriada das células digestivas, próximas aos grânulos de secreção (Figura 9).

Os controles demonstraram reação negativa tanto na MP como no citoplasma das células digestivas do ventrículo *M. quadrifasciata anthidioides* (Figura 8).

A imunofluorescência da MP em montagem total mostra a superfície externa esculpida em um arranjo aleatório, evidenciando reações positivas em relação para peritrofina-55 kDa associadas às fibrilas de quitina (figs. 11, 12).

Os resultados nas amostras controle tanto da MP como nas regiões anterior e posterior dos ventrículos de larvas foram negativos.

Os resultados obtidos para a imunohistoquímica tanto com peroxidase como com fluoresceína foram negativos nas secções do ventrículo de abelhas adultas, confirmando os resultados obtidos com os extratos protéicos de ventrículos de abelhas adultas submetidas ao teste “western blotting”.

Os resultados obtidos através do teste de WGA-FITC com ventrículos de larvas de *M. quadrifasciata anthidioides* mostram fluorescência na MP, no terço superior da borda estriada e em alguns grânulos de secreção situados no espaço ectoperitrófico imerso em um material amorfo que talvez seja a própria

matriz protéica da MP (Figuras 13 e 15). Na figura 14 nota-se uma linha fluorescente adjacente o epitélio, sendo esta correspondente à membrana peritrófica, demonstrando assim a presença de quitina em sua composição química.

Os resultados em relação ao teste imunocitoquímico realizado em secções ultrafinas do ventrículo de larvas mostrou reações positivas a 'peritrofina-55 kDa' no citoplasma, nas microvilosidades (Figura 16), bem como na MP (Figura 17) e ao longo de todo o ventrículo, porém com maior intensidade na porção anterior do ventrículo. Ainda na figura 16 pode-se observar que algumas marcações positivas da 'peritrofina-55 kDa' estão em pequenas vesículas no interior de uma microvilosidade, onde uma destas vesículas parece estar se fundindo com a membrana plasmática da microvilosidade.

Figuras 5-8. Secções tangenciais do ventrículo de larvas de 4º instar de *Melipona quadrifasciata anthidioides* submetidas ao teste imunohistoquímico com peroxidase para 'peritrofina-55 kDa'. 5 e 6. Secções contracoradas com hematoxilina. Células da região anterior do ventrículo mostrando marcações positivas no citoplasma e no espaço ectoperitrófico (setas). Barra = 3 µm. 7. Porção apical de uma célula digestiva mostrando grânulos marcados positivamente na região onde encontra-se a substância viscosa que recobre a MP (seta). Barra = 3 µm. 8. Controle negativo mostrando uma célula da região anterior do ventrículo com ausência de reação. Barra = 3 µm. MP - membrana peritrófica; CD - célula digestiva; N - núcleo; Pontas de seta - aspecto filamentososo do citoplasma; BE - borda estriada.

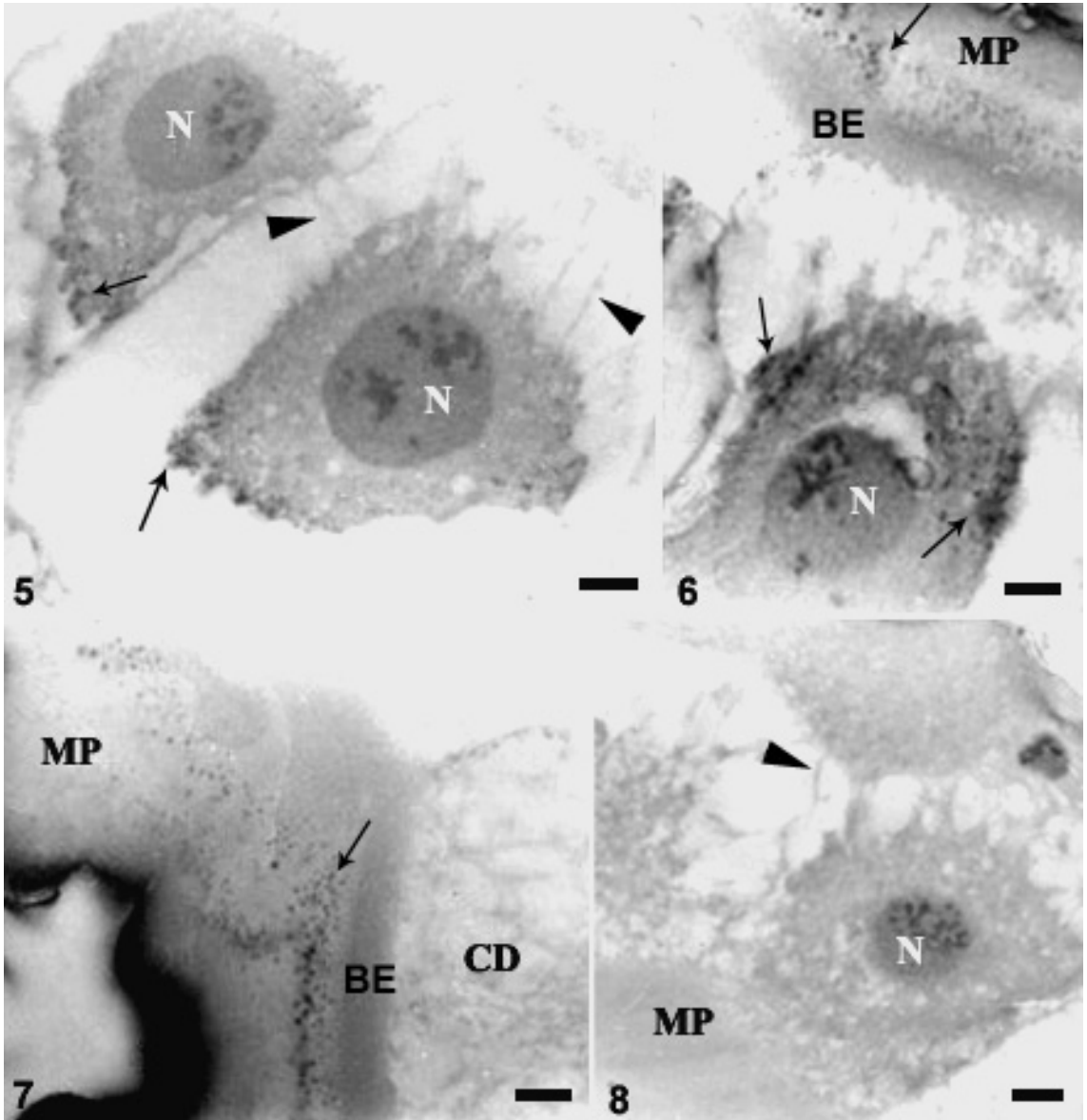
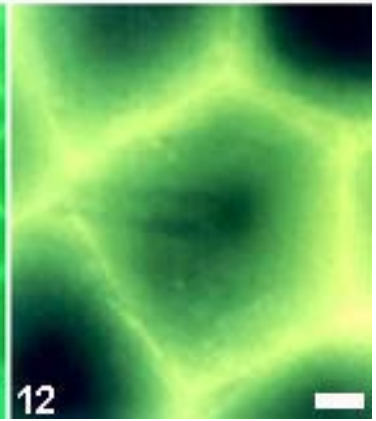
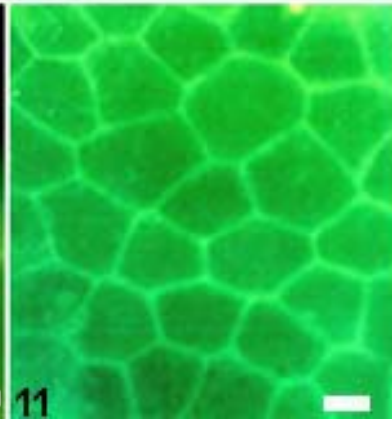
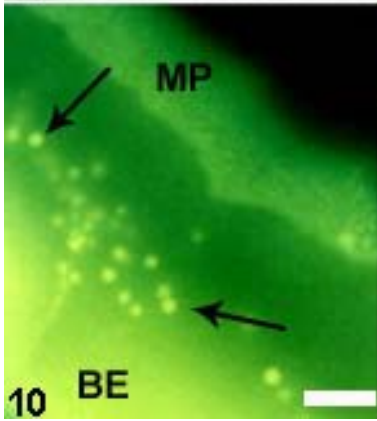
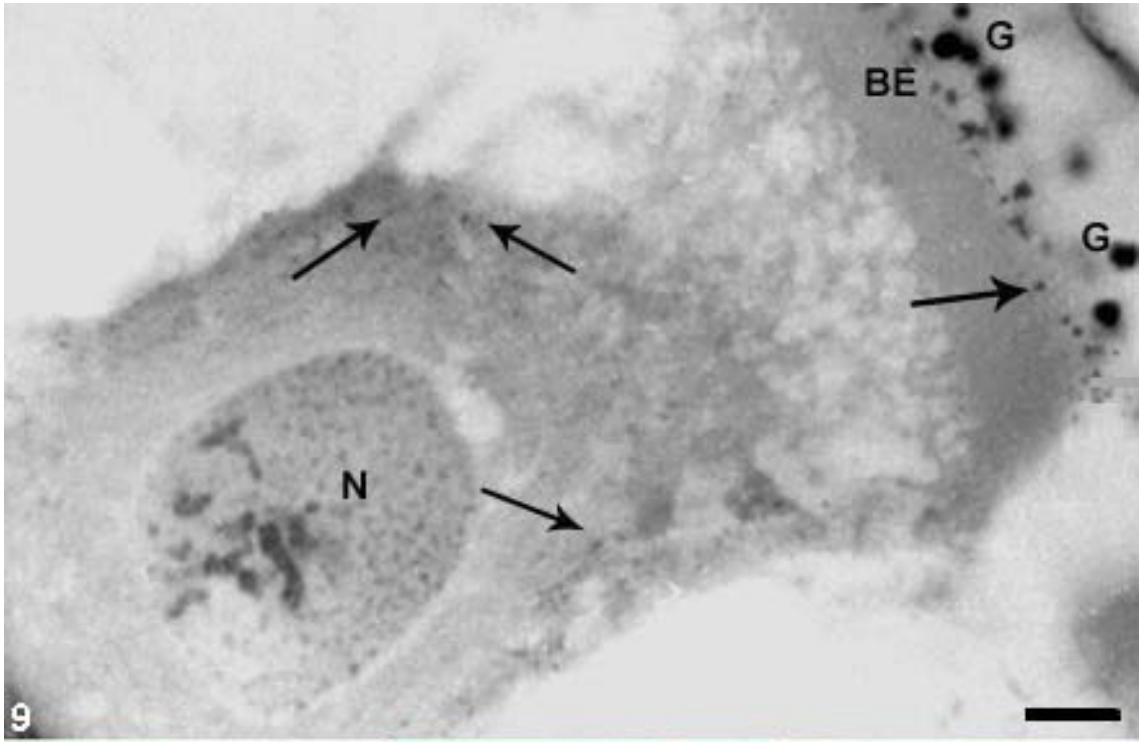


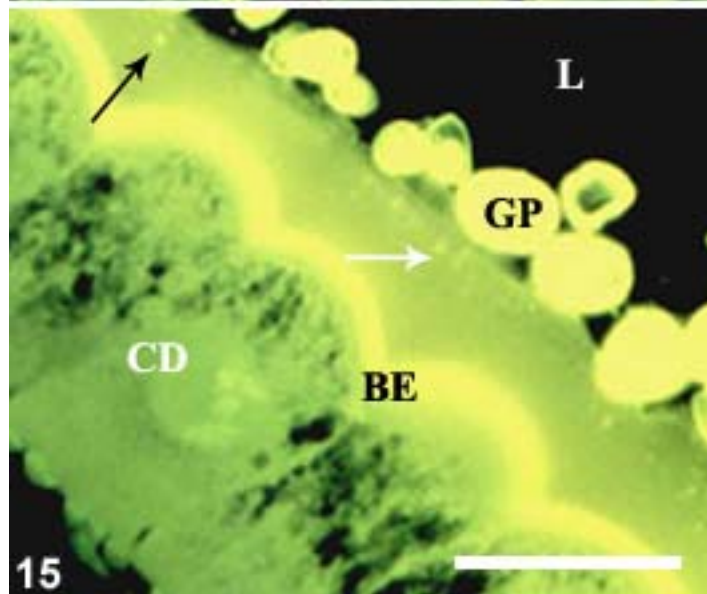
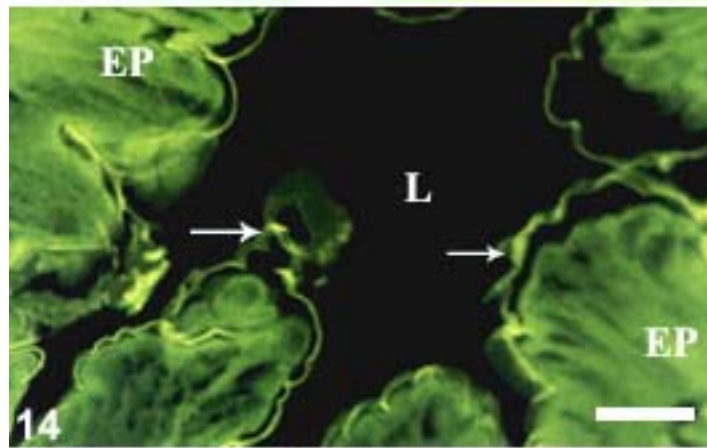
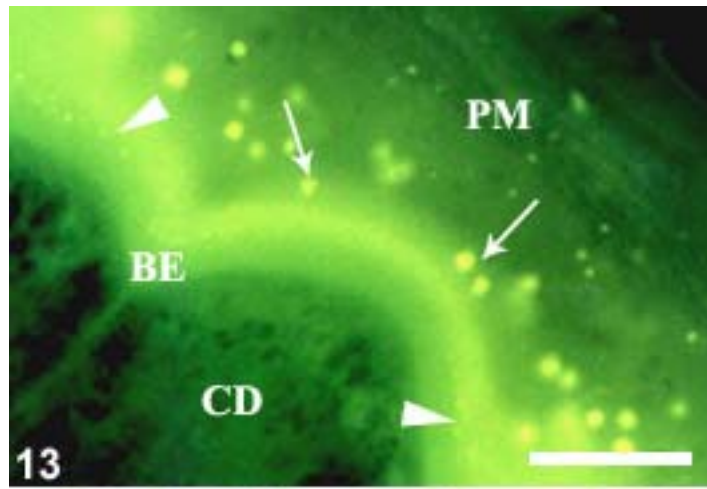
Figura 9. Imunohistoquímica com peroxidase de uma célula , em posição tangencial, da região posterior do ventrículo de larva de 4º instar de *M. quadrifasciata anthidioides* mostrando fraca marcação positiva para 'peritrofina-55 kDa' (setas) e vários grânulos de secreção (G) além da borda estriada (BE). Contracoloração com hematoxilina. Barra = 1 µm.

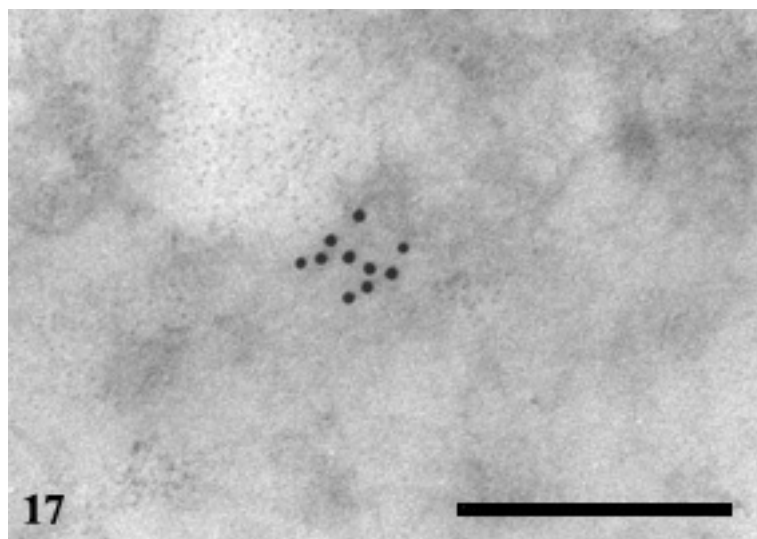
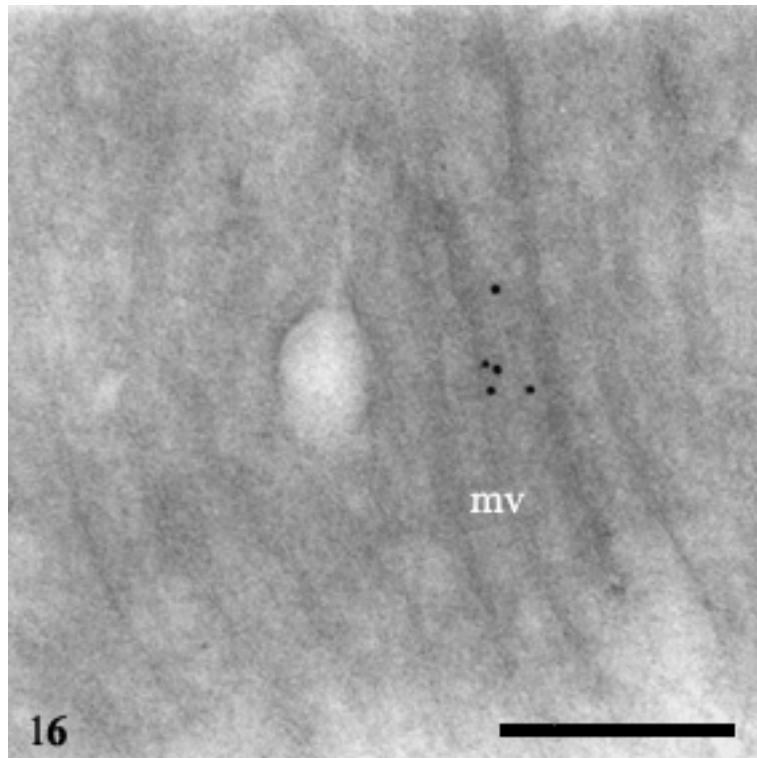
Figura 10. Secção da região anterior do ventrículo da larva, submetida à imunofluorescência com FITC, mostrando parte da borda estriada (BE) com reação positiva ao anticorpo (setas). Barra = 3 µm.

Figuras 11-12. Montagem total da MP de larva de 4º instar, submetida a imunofluorescência com FITC, mostrando a presença da 'peritrofina-55 kDa'. 11. Distribuição da 'peritrofina-55 kDa' na membrana peritrófica, possivelmente associada à fibrilas de quitina. Barra = 15 µm. 12. Detalhe de uma região marcada pela peritrofina-55kDa na membrana peritrófica. Barra = 3 µm.



Figuras 13-15. Secções do ventrículo de larvas de *M. quadrifasciata anthidioides* submetidas ao teste de WGA-FITC. 13. Secção anterior do ventrículo mostrando a borda estriada (BE) e grânulos grandes (seta) e pequenos (pontas de setas) marcados positivamente. Barra = 6  $\mu\text{m}$ . 14. Secção da região posterior mostrando a membrana peritrófica marcada por WGA-FITC (setas). Barra = 15  $\mu\text{m}$ . 15. Secção da região posterior mostrando a borda estriada (BE) e grânulos de secreção (setas) marcados positivamente. Barra = 6  $\mu\text{m}$ . MP - membrana peritrófica; EP - epitélio; GP - grão de pólen; CD - célula digestiva; L - lúmen.





Figuras 16-17. Imunocitoquímica, com anticorpo secundário conjugado com ouro coloidal, em secções ultrafinas em células epiteliais do ventrículo em larvas de 4<sup>o</sup> instar de *M. quadrifasciata anthidioides*. 16. 'Peritrofina-55' marcada positivamente no interior de vesículas em uma microvilosidade (mv) de uma célula da região anterior do ventrículo. Barra = 0,1  $\mu$ m. 17. Membrana peritrófica mostrando um pequeno agregado de 'peritrofina-55' marcada positivamente. Bar. = 0,1  $\mu$ m.

## 5. DISCUSSÃO

Em relação à consistência da MP, Terra (2001) sugere que esta estrutura nos insetos pode apresentar duas formas distintas: como um filme homogêneo ou como um gel peritrófico dependendo se pode ser ou não pinçada. A MP de larvas de *M. quadrifasciata anthidioides* tem consistência de um filme peritrófico sendo pouco espesso em relação ao epitélio, Entretanto, deve-se enfatizar a presença de uma camada de substância viscosa e amorfa sobre a MP, camada esta que durante os processos de dissecação são consideravelmente perdidas, pois solubilizam-se em solução salina. Diferentemente, Nelson (1924) e Snodgrass (1956) descreveram que a MP de *Apis mellifera* pode ser de duas a três vezes mais espessa do que o epitélio e apresenta uma consistência gelatinosa. Já Mello et al. (1971) sugerem que a MP de larvas de 3º e 4º instars de *M. quadrifasciata anthidioides* pode ser menos espessa do que o epitélio quando comparada ao instares larvais precedentes, confirmando os resultados aqui apresentados para o 4º instar larval.

A MP de abelhas adultas de *M. quadrifasciata anthidioides* também possui a consistência de filme peritrófico, porém mais fino e transparente que a MP de larva e sem a presença de material viscoso recobrando-a externamente. Como a MP de larva de 4º instar que é mais espessa e esbranquiçada que a do adulto, pode-se sugerir que talvez isto seja em função de que até o final do estágio larval o inseto não elimina os restos alimentares não digeridos bem como o excesso de MP produzido, o que estaria causando o acúmulo dos constituintes sobre esta estrutura. Alternativamente, talvez a presença de uma

MP mais espessa e viscosa no estágio larval também esteja relacionada a mecanismos de defesa contra danos mecânicos nas células, lubrificando a passagem do alimento através do intestino.

Além disso, deve-se considerar que o alimento dentro das células de cria em Meliponini encontram-se estratificado, ou seja, uma porção mais sólida no fundo, onde está o pólen, e uma porção mais líquida na superfície constituída por uma mistura de mel e secreção glandular (Sakagami & Zucchi, 1966). Assim, partículas sólidas como os grãos de pólen poderiam causar lesões no epitélio se a MP fosse fina e se rompesse em decorrência do acúmulo de grãos de pólen no interior do ventrículo. Como nos insetos em geral a MP atua como uma barreira protetora contra infecções por microrganismos (Snodgrass, 1935; Smith, 1968), então, uma MP mais espessa na fase larval pode ser considerada como uma proteção a mais às células ventriculares, pois é comum a presença de bactérias e fungos no alimento estocado no interior de colônias de abelhas (Machado, 1971; Gilliam, 1979; Gilliam et al., 1990), o qual é fornecido para as larvas. Já nos adultos uma MP espessa não seria necessária, uma vez que os materiais não digeridos são rapidamente eliminados juntamente com a MP e microrganismos ligados a ela, obedecendo o movimento do alimento ao longo do ventrículo.

Cruz-Landim (1985) sugere que a MP de adultos de *A. mellifera* é um tubo com aspecto semelhante a um papel celofane com a extremidade anterior envolvendo a válvula estomodeal sendo mais esbranquiçada e opaca do que o restante desta estrutura, e a região posterior demonstrando um aspecto alveolar na superfície que seria resultado da impressão do topo das células do epitélio ventricular. A MP de adultos de *M. quadrifasciata anthidioides*

apresenta características similares em relação à MP de *A. mellifera*, exceto pelo aspecto alveolar, o qual foi notado somente nas extremidades anterior e posterior da MP de larvas de 4º instar de *M. quadrifasciata anthidioides*.

As amostras obtidas durante as extrações da membrana peritrófica, submetidas à eletroforese, foram consideradas como: extrato 1 correspondendo às proteínas solúveis da membrana peritrófica onde, segundo Tellam et al. (1999), podem estar contidas proteínas em trânsito para ou do ventrículo e outras proteínas fracamente ligadas ou adsorvidas à membrana peritrófica; no extrato 2 encontram-se aquelas proteínas que apresentam ligações fracas entre proteína-proteína, proteína-oligossacarídeo e proteína-quitina que foram rompidas por ação detergente; e no extrato 3 as chamadas peritrofinas, consideradas como fortemente ligadas à membrana peritrófica, onde as ligações destas com as fibrilas de quitina são rompidas pela ação de desnaturantes fortes como uréia.

A proteína utilizada como imunógeno para produção de anticorpos contra proteínas da MP foi encontrada somente no extrato 3, ou seja, aquela que foi extraída utilizando-se solução de uréia a 12 M para extrair somente aquelas proteínas fortemente ligadas estruturalmente à MP. Então, por isto o extrato 3 foi considerado como um extrato purificado, mesmo percebendo-se que o perfil eletroforético obtido a partir dos três extratos da MP de larvas de *M. quadrifasciata anthidioides* tenham apresentado polipeptídios com pesos moleculares semelhantes entre as proteínas de 2ª e 3ª extrações da MP.

Tellam et al. (1999) sugere que as proteínas da primeira extração da membrana peritrófica correspondem a aproximadamente 1% das proteínas totais da membrana peritrófica. Então, é possível que a maioria das proteínas

encontradas possam pertencer ao ventrículo, uma vez que a atividade enzimática neste órgão é alta (Terra et al., 1979, Ferreira et al., 1994). Entretanto, na 2ª extração da MP de *M. quadrifasciata anthidioides* nota-se um valor alto comparado aos demais, o que pode ser devido à ação do detergente “zwiteriônico” utilizado durante o processo de extração ou ainda, talvez muitas destas proteínas possam ser consideradas como contaminantes da 1ª extração, pois o processo de extração utilizado não foi tão rigoroso como por exemplo o sugerido por Cristofolletti et al. (2003) na obtenção de uma fração pura de proteínas, em que utilizou-se de vários ciclos de centrifugação a 100000 g durante 1 hora.

Tellam et al. (1999) analisando as proteínas de 2ª extração em larvas de *Lucilia cuprina* (Diptera), extraídas utilizando-se um detergente suave, sugeriram que estas correspondem a 2% da massa total de proteínas da membrana peritrófica. Porém, em larvas de *M. quadrifasciata anthidioides* a percentagem para essa amostra pode corresponder a cerca de 55%, e as proteínas de 1ª e 3ª extrações correspondem cada uma a aproximadamente 22% do total de proteínas.

Considerando que as peritrofinas de 3ª extração de *M. quadrifasciata anthidioides* correspondem à cerca de 22% do total dos extratos protéicos obtidos da MP, pode-se inferir que na larva destas proteínas a síntese é contínua tanto para reposição de MP, em locais onde houve rompimento, como para síntese de novas camadas. Entretanto, as proteínas da classe 3, presentes na 3ª extração da MP de *L. cuprina*, foram consideradas como o grupo mais abundante, onde corresponderam a cerca de 11% do total das proteínas desta estrutura (Tellam et al., 1999). Isto talvez seja porque nesta

espécie a MP é do tipo-II, na qual seus componentes são sintetizados continuamente mesmo que a larva esteja em jejum.

Possivelmente, em larvas de 4º instar pré-defecantes de *M. quadrifasciata anthidioides* os componentes da MP sejam sintetizados continuamente também, pois de acordo com os resultados imunohistoquímicos apresentados foram detectadas imunomarcações em todo o epitélio ventricular então, a síntese contínua de peritrofinas pode ser em resposta à distensão do mesmo, já que a larva se alimenta continuamente até o fim do período larval.

O teste “dot blot” foi eficiente para verificar o título de até 1:400 dos anticorpos anti-peritrofina-55 kDa da MP de larvas de *M. quadrifasciata anthidioides*, porém em ensaios com o teste “western blotting” os anticorpos diluídos até 1:1600 responderam positivamente. Muitos trabalho nesta área têm obtido títulos em média entre 1:500 e 1:1000, como por exemplo, o título de 1:1000 utilizado para “western blotting” com anticorpos anti-peritrofina-33 kDa da MP de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) (Bolognesi et al., 2001).

Durante o processo de extração para obtenção de amostras da ‘peritrofina-55 kDa’ para inoculação nos camundongos, não foi detectada em nenhuma amostras de 3ª extração da MP a presença do polipeptídeo com massa molecular de 20,7 kDa, observado nos resultados apresentados no gel de poliacrilamida. Devendo-se enfatizar que foram tomadas determinadas frações das amostras destinadas às imunizações para testes prévios em SDS-PAGE a 12%, para então injetar o restante destas nos animais. Assim, este polipeptídeo foi considerado como um contaminante, mesmo porque de acordo com os resultados do “western blotting” pode-se observar que este polipeptídeo não reagiu positivamente com o anticorpo anti-peritrofina.

Como todas as amostras de proteínas da MP, bem como dos epitélios ventriculares de larvas e adultos foram submetidas ao teste “western blotting”, verificou-se que somente houve reação positiva para a 3ª extração da MP e do epitélio larval, sugerindo que as peritrofinas presentes na MP de operárias adultas de *M. quadrifasciata anthidioides* são diferentes daquelas encontradas em larvas, concordando assim, com a sugestão de Wigglesworth (1972) de que a MP pode mostrar-se diferente em relação à origem e natureza nos diferentes estágios do desenvolvimento nos insetos.

Em relação a peritrofina isolada na MP de *M. quadrifasciata anthidioides* com peso molecular estimado em 55 kDa, presente somente na 3ª extração, a qual foi extraída com uréia 12 M, Tellam et al. (2003) coincidentemente, isolou uma ‘peritrofina-55 kDa’ em larvas de *Lucilia cuprina* (Diptera), proteína esta que foi extraída utilizando-se guanidina-HCl 6 M, um forte agente desnaturante assim como a uréia. Porém, estas também foram encontradas nas amostras de 2ª extração da MP de *L. cuprina*, extração esta que foi submetida à ação de um detergente “zwiteriônico”. Então, estes autores consideram que esta proteína não está associada com uma única condição de extração, presumivelmente refletindo seu envolvimento e interações com outros componentes dentro da MP, contrariando os resultados obtidos neste trabalho, pois a peritrofina detectada foi encontrada somente na última extração da MP e também na última extração do epitélio larval.

Existem diversos trabalhos sobre as proteínas integrantes da MP ou peritrofinas, caracterizadas em diversas espécies (Casu et al., 1997; Elvin et al., 1996; Shen & Jacobs-Lorena, 1998, Wang & Granados, 1997). Interessantemente percebe-se que parte destas proteínas foram extraídas e

isoladas a partir da MP de larva, as quais foram encontradas geralmente em epitélios larvais através de testes bioquímicos e imunocitoquímicos, ou então extraídas a partir da MP do inseto adulto e encontradas somente no ventrículo também do inseto adulto.

Tellam et al. (2003) produziram anticorpos anti-peritrofina-55 kDa da MP de larvas de *L. cuprina* e obtiveram resultados positivos tanto para o 2º quanto para o 3º extrato de proteínas da MP. Novamente contrariando, os resultados aqui obtidos, onde o anticorpo anti-peritrofina-55 kDa de *M. quadrifasciata anthidioides* não reconheceu as proteínas presentes na 2ª extração que possuíam o mesmo peso molecular, pelo menos aparentemente em gel de uma dimensão.

De acordo com os resultados aqui obtidos através dos testes imunohistoquímicos e imunocitoquímico, reações positivas para presença da 'peritrofina-55 kDa' foram encontradas somente na MP e no epitélio de larvas de *M. quadrifasciata anthidioides*, não sendo observada sua presença na MP e no epitélio ventricular de abelhas adultas. Este resultado sugere que a 'peritrofina-55 kDa' purificada a partir da MP de larvas de *M. quadrifasciata anthidioides* esteja presente especificamente na fase larval, pois esta proteína não foi encontrada nas células digestivas e na MP de operárias adultas,. Coincidentemente, os resultados obtidos por Elvin et al. (1996) e Schorderet et al. (1998) foram similares, pois encontraram as peritrofinas 44 e 48 kDa de *L. cuprina* somente na fase larval, e também em relação aos resultados de Casu et al. (1997) com a peritrofina-95 kDa, extraída da mesma espécie citada, e que também foi expressa somente na fase larval.

Segundo Elvin et al. (1996) e Schorderet et al. (1998) as peritrofinas 44 e 48 kDa pertencem a uma família de genes que expressam proteínas fortemente conservadas estruturalmente. Porém, eles alegam que pouco se conhece sobre as funções desta família de genes, sugerindo que talvez estes estejam relacionados com o rápido crescimento da MP durante a fase larval. Outro dado interessante é a taxa de crescimento da MP, onde segundo Waterhouse (1954), esta estrutura cresce aproximadamente 10 mm/h para os insetos que possuem MP tipo-II, embora estes autores ressaltem que este valor pode variar de espécie para espécie e também em função do tipo de MP sintetizado.

A 'peritrofina-55 kDa' de *M. quadrifasciata anthidioides* foi localizada no interior de vesículas tanto no citoplasma como nas microvilosidades das células epiteliais do ventrículo, entretanto estas vesículas não são completamente distinguíveis uma vez que não utilizou-se tetróxido de ósmio no procedimento da imunocitoquímica, o que poderia ter mantido a integridade da membrana plasmática. Algumas vesículas contendo a 'peritrofina-55 kDa' marcada parecem estar se fundindo com a membrana plasmática das microvilosidades, podendo-se sugerir que estas vesículas são eliminadas através das microvilosidades ou então que o conteúdo destas é eliminado no lúmen do ventrículo. Jordão et al. (1999) sugerem que enzimas como a tripsina são secretadas através de secreção microapócrina em lagartas, consistindo na eliminação de pequenos pedaços das microvilosidades na forma de vesículas com membrana única ou dupla. Este mesmo mecanismo de secreção para a 'peritrofina-55 kDa' também pode ocorrer em abelhas, pois de acordo com Jimenez & Gilliam (1990) a secreção de enzimas digestivas pode ocorrer por

diferentes rotas, como a secreção merócrina e a microapócrina dependendo da natureza da enzima e de sua função específica na digestão, bem como da idade da abelha e dieta utilizada. Assim, talvez as vesículas contendo 'peritrofina-55 kDa' também pode estar transportando enzimas digestivas.

Uma peritrofina-33 KDa da MP de *S. frugiperda* foi isolada e o anticorpo produzido contra esta proteína mostrou sua localização em vesículas no interior das células digestivas da região anterior do ventrículo (Bolognesi et al., 2001). Estes autores sugerem que a peritrofina-33 kDa ocorra nas mesmas vesículas que contêm tripsina e amilase, e que estas enzimas estão associadas à membrana vesicular e a peritrofina encontra-se livre no interior da vesícula. Quanto ao mecanismo de secreção foi sugerido pelos autores uma rota microapócrina formando-se vesículas de membrana dupla, as quais se fundem formando uma membrana única, onde durante este processo ocorre a liberação das peritrofinas-33 kDa e de algumas enzimas como a amilase.

Em relação ao teste para detecção de quitina, os resultados encontrados por Mello et al. (1971) sugeriram que a MP de larvas de *M. quadrifasciata anthidioides* não possui quitina, onde o teste empregado foi o de Schuzze's. Talvez os resultados foram negativos em função da sensibilidade do teste empregado, pois o teste histoquímico aqui utilizado foi eficaz para detectar quitina na MP de larvas em 4º instar desta espécie. Conforme Peters & Latka (1986), a lectina WGA, em presença de excesso de N-acetilglicosamina, liga-se somente à domínios específicos nas moléculas de quitina, a qual também é constituída por resíduos de N-acetil-D-glicosamina, suportando assim, que os resultados obtidos para MP de larvas da espécie em questão possui quitina.

Tellam et al. (1999) contestam o uso do teste histoquímico com WGA por acreditar que esta lectina liga-se também à proteínas glicosiladas. Eles sugerem que testes para detecção de quitina na MP seriam aqueles que empregam a ação de quitinases. Contudo, estes mesmos autores concordam que muitas análises feitas para a detecção de quitina na MP dos insetos devem ser reavaliadas, pois tem-se percebido que os testes reagem diferentemente nos dois tipos de MP. Um exemplo disso, seria quando Tellam & Eisemann (2000) utilizando quitinase de *Streptomyces* em MP de *L. cuprina* não obtiveram resultados satisfatórios que indicassem a presença de quitina, concluindo que no caso da MP tipo-II da espécie em questão este teste, considerado por estes autores como ideal, deixou lacunas quanto se há quitina na estrutura química da MP de *L. cuprina*, a qual possui MP tipo-II na fase adulta. Portanto, deve-se avaliar cuidadosamente o método a ser empregado para detecção de quitina na MP dos insetos, pois aparentemente a quantidade desta pode ser ínfima em algumas espécies, como *L. cuprina* que possui MP tipo-II, e pode ser um dos principais componentes na MP tipo-I, segundo Tellam & Eisemann (2000).

Quanto ao arranjo tipo-rede observado da 'peritrofina-55 kDa' imunomarcada com FITC na MP de larvas pré-defecantes, talvez sugerindo que esta proteína esteja estabelecendo ligações com as fibrilas de quitina que encontram-se no lúmen e juntas participam do processo de condensação na formação da MP. Pode-se perceber ainda, que a disposição destas marcações ocorrem randomicamente, porém seriam necessários mais estudos, como testes imunocitoquímicos que possam demonstrar como ocorre a secreção,

formação ou a polimerização da rede de quitina bem como a relação existente entre esta e as peritrofinas.

Martin & Kirkham (1989) sugeriram, através de métodos imunocitoquímicos, que a quitina é secretada através da membrana plasmática na base das microvilosidades das células do ventrículo de *Glomeris marginata* (Diplopoda), sendo que a disposição destas obedecem o arranjo das microvilosidades, ou seja, a rede de fibrilas localiza-se entre ou na extremidade das microvilosidades enquanto estão em processo de formação. Entretanto, não foi possível estabelecer o sítio de síntese de quitina, pois não foram detectadas marcações nas células que indicassem a presença de quitina/WGA-FITC, uma vez que a quitina no citoplasma encontra-se na forma do seu precursor, ou seja, uridina difosfo N-acetilglicosamina (UDP-NAGA). Este precursor ao ser secretado transforma-se, provavelmente na membrana plasmática da célula através de uma enzima ligada a esta, em uma cadeia de quitina fora da célula (Cohen, 1987; Hepburn, 1985). Talvez por isto não tenha ocorrido o reconhecimento da WGA em relação ao precursor da quitina no interior das células.

Considerando que a MP em larvas de *M. quadrifasciata anthidioides* é composta por quitina e peritrofinas, pode-se supor que realmente estes componentes possuem alguma interação. Terra (2001) propôs que durante a evolução as células do ventrículo sintetizavam quitina e peritrofinas inicialmente, os quais adquiriram a capacidade de ligarem-se entre si permitindo assim a formação da MP. Então, sugere-se que a MP seja sintetizada pelas células digestivas ao longo de todo o ventrículo, porém sendo

a região anterior deste a responsável pela maior parte desta síntese, pois foi onde a 'peritrofina-55 kDa' foi encontrada em abundância.

Dados bioquímicos obtidos por Schumaker et al. (1993), para a abelha sem ferrão *Scaptotrigona bipunctata*, sugerem que as enzimas digestivas exceto a tripsina, são sintetizadas na região anterior do ventrículo, corroborando então, que esta região também possa ser caracterizada como secretora da 'peritrofina-55 kDa' em outra espécie de Meliponini, neste caso *M. quadrifasciata anthidioides*.

A MP de larvas de *M. quadrifasciata anthidioides* pode ser classificada como tipo-I, sendo sintetizada ao longo do epitélio ventricular. Desta forma, estes dados discordam daqueles obtidos por alguns autores que sugeriram que em abelhas a MP seria sintetizada na região da cárdia, a qual a MP tipo-II é atribuída. Butt (1934) e Snodgrass (1956) sugeriram que em *A. mellifera* a MP seria produzida por um anel de células anteriores que envolve a válvula estomodeal, caracterizando-se assim como uma MP tipo-II. Além disso, este último autor sugeriu que tanto MP tipo-I quanto a MP tipo-II podem ser sintetizadas em larvas de abelhas. Em adição, Cruz-Landim & Mello (1970) sugeriram que em larvas de *M. quadrifasciata anthidioides* a MP seria produzida por um anel de células em volta da base da válvula estomodeal. Mas, Cruz-Landim (1985) sugeriu que em *A. mellifera* ambas as camadas epiteliais, interna e externa, da válvula estomodeal sintetizam a MP. E ainda, Serrão & Cruz-Landim (1996a) sugerem que em *Trygona hypogea* a MP seria produzida pela cárdia, embora esta estrutura seja mais desenvolvida apenas no adulto.

Finalizando, os resultados aqui obtidos concordam com Green (1931), Mercer & Day (1952), Hassanein (1953), Mello et al. (1971), Cruz-Landim & Mello (1981) e Jimenez & Gilliam (1990) que sugeriram que a MP em abelhas é sintetizada ao longo do ventrículo. Em adição, Jimenez & Gilliam (1990) sugerem que a secreção da MP é maior na região anterior do ventrículo em *A. mellifera*, novamente corroborando com os resultados aqui obtidos, onde a 'peritrofina-55 kDa' a principal proteína integrante da MP de *M. quadrifasciata anthidioides* foi localizada principalmente nas células da região do ventrículo. Entretanto, permanece uma lacuna quanto à MP em adultos da espécie aqui estudada, já que não houve resposta quanto à reação do anticorpo anti-peritrofina-55 kDa de larva em relação ao ventrículo de operárias, o que poderia caracterizar talvez um tipo diferente de MP nesta fase, ou então, somente que a expressão das peritrofinas possam ser diferentes no decorrer da fase larval para o adulto.

## 6. CONCLUSÃO

As evidências apresentadas neste trabalho indicaram que o anticorpo obtido em camundongos a partir de inoculações contendo a 'peritrofina-55 KDa' da membrana peritrófica de larvas de 4º instar de *M. quadrifasciata anthidioides* é específico somente para a membrana peritrófica e epitélio ventricular de larvas. A presença de quitina na constituição química da membrana peritrófica de larvas, através do teste com WGA, também foi confirmada. De acordo com as análises de imunohistoquímica e imunocitoquímica das secções do ventrículo de larvas, ficou evidenciada que a 'peritrofina-55 kDa' é sintetizada ao longo do epitélio ventricular, mas sendo as células da região anterior deste órgão o principal sítio de produção. Portanto, a membrana peritrófica de larvas de *M. quadrifasciata anthidioides* pertence ao tipo-I.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIGNELL, D.E.; OSKARSSON, H.; ANDERSON, J.M. Formation of membrane-bounded secretory granules in the midgut epithelium of a termite, *Cubitermis severus*, and possible intercellular rout of discharge. **Cell Tiss. Res.**, v. 222, p. 291-311, 1982.
- BILLINGSLEY, P.F.; DOWNE, A.E.R. Ultrastructural changes in posterior midgut cells associated with blood feeding in adult female *Rhodinus prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). **Can. J. Zool.**, v. 61, p. 2574-2586, 1983.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.
- BOLOGNESI, R.; RIBEIRO, A.F.; TERRA, W.R.; FERREIRA, C. The peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda*: secretion of peritrophins and role in immobilization and recycling digestive enzymes. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 47, p. 62-75, 2001.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 24-254, 1976.
- BUTT, F.H. The origin of the peritrophic membrane in *Sciara* and the honey bee. **Psyche**, v. 41, p. 51-56, 1934.
- CASU, R. et al. Antibody-mediated inhibition of the growth of larvae from an insect causing cutaneous myiasis in a mammalian host. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 94, p. 8939-8944, 1997.
- COHEN, E. Chitin biochemistry: synthesis and inhibition. **Ann. Rev. Ent.**, v. 32, p. 71-93, 1987.
- CRISTOFOLETTI, P.T.; RIBEIRO, A.F.; DERAISON, C.; RAHBÉ, Y.; TERRA, W.R. Midgut adptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. **J. Insect Physiol.**, v. 49, p.11-24, 2003.

- CRUZ-LANDIM, C. Origin of the peritrophic membrane of adult *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). **Rev. Bras. Biol.**, v. 45, n. 3, p. 207-219, 1985.
- CRUZ-LANDIM, C.; MELLO, M.L. Post-embryonic changes in *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lep. IV. Development of the digestive tract. **Bolm. Zool. Biol. Mar.**, v. 27 p. 229-262, 1970.
- CRUZ-LANDIM, C.; MELLO, R.A. Desenvolvimento e envelhecimento de *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera: Apidae). Aspectos histológicos e histoquímicos. In: Anais do Simpósio Anual, 4, 1981, São Paulo. **Aciesp.** São Paulo, v. 31, p.p. 1-118.
- CRUZ-LANDIM, C.; SERRÃO, J.E.; MORAES, R.L.M.S. On the ultrastructure of the striated border of midgut digestive cells of *Apis mellifera* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae). **Iheringia**, v. 82, p. 127-132, 1997.
- DAVIDSON, E.W. Ultrastructure of peritrophic membrane development in larvae of the worker honey bee (*Apis mellifera*). **J. Invert. Pathol.**, v. 15, p. 451-454, 1970.
- DAY, M.F.; WATERHOUSE, D.F. Functions of alimentary systems. In: Roeder, K.D. (Editor). **Insect Physiol.**, p. 299-310, 1953.
- DETRA, R.; ROMOSER, W.S. Permeability of *Aedes aegypti* larval peritrophic membrane to proteolytic enzyme. **Mosquito News**, v. 39, p. 582-585, 1979.
- DRACZ, S. **Desenvolvimento de um método imunoenzimático para análise do soro de queijo em leite.** Viçosa, MG: UFV, 1996. 63p. Tese (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- EDWARDS, M.J. & LORENA-JACOBS, M. Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. **J. Insect Physiol.**, v. 46, p. 1313-20, 2000.

- ELVIN, C. et al. Characterization of a major peritrophic membrane protein, peritrophin-44, from the larvae of *Lucilia cuprina*: cDNA and deduced amino acid sequences. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 8925-8935, 1996.
- FERREIRA, C.; CAPELLA, A.N.; SITNIK, R.; TERRA, W.R. Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 107a, p. 631-640, 1994.
- FERREIRA, C.; RIBEIRO, A.F.; TERRA, W.R. Fine structure of the larval midgut of the fly *Rhynchosciara* and its physiological implications. **J. Insect Physiol.**, v. 27, n. 8, p. 559-570, 1981.
- FREYVOGEL, T.; STÄUBLI, W. The formation of peritrophic membranes in Culicidae. **Acta Trop.**, v. 22, p. 118-147, 1965.
- GILLIAM, M. Microbiology of pollen and bee bread: *Bacillus*. **Apidologie**, v. 10, p. 269-74, 1979.
- GILLIAM, M., ROUBIK, D.W., LORENZ, B.J. Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona quadrifasciata*. **Apidologie**, v. 21, p. 89-97, 1990.
- GREEN, T.L. The anatomy and histology of the alimentary canal in the common wasp (*Vespa vulgaris*). **Proc. Zool. Soc.**, p. 1041-66, 1931.
- HASSANEIN, M.H. Studies on the normal and pathological histology of the alimentary canal of the honey-bee *Apis mellifera* L. **Bull. Soc. Fouad. I<sup>er</sup> Entom.**, v. 8, p. 345-357, 1953.
- HEPBURN, H.R. Structure of the integument. In: **Compr. Ins. Physiol. Bioch. Pharm.**, v. 3, 1985, p. 1-58.
- JACOBS-LORENA, M.; Oo, M.M. The peritrophic matrix of insects. In: **Biology of disease vectors: a molecular, physiological, and populational approach**. Ed. Beaty B, Marquardt W. Denver: University Press of Colorado, 1996. p. 318-332.
- JIMENEZ, D.R.; GILLIAM, M. Ultrastructure of the ventriculus of the honeybee, *Apis mellifera* (L.): cytochemical localization of acid phosphatase, alkaline

- phosphatase and nonspecific esterase. **Cell Tiss. Res.**, v. 261, p. 431-443, 1990.
- JORDÃO, B.P.; TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Chemistry of microvillar membranes purified from brush borders isolated from the larval midgut from one Coleoptera and two Diptera species. **Insect Bioch. Molec. Biol.**, v. 25, p. 417-426, 1995.
- KING, P.G. Cellular organization and peritrophic membrane formation in the cardia (Proventriculus) of *Drosophila melanogaster*. **J. Morphol.**, v. 196, p. 253-282, 1988.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T<sub>4</sub>. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEHANE, M.J. Peritrophic matrix structure and function. **Ann. Rev. Ent.**, v. 42, p. 525-550, 1997.
- MACHADO, J.O. Simbiose entre as abelhas sociais brasileiras (Meliponinae, Apidae) e uma espécie de bactérias. **Ciênc. Cult.**, v. 23, p. 625-633, 1971.
- MARTIN, J.S.; KIRKHAM, J. Dynamic role of microvilli in peritrophic membrane formation. **Tiss. Cell**, v. 21, n. 4, p. 627-638, 1989.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C.; VALDRIGHI, L. The larval peritrophic membrane of *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera Apoidea). **Protoplasma**, v. 73, p. 349-365, 1971.
- MERCER, E.H.; DAY, M.F. The fine structure of peritrophic membrane of certain insects. **Biological Bull**, v. 103, p. 383-394, 1952.
- NELSON, J.A. Morphology of the honeybee larva. **J. Agric. Res.**, v. 28, p. 1167-1272, 1924.
- NEVES, C. A.; BHERING, L.L.; SERRÃO, J.E.; GIRITANA, L.B. FMRFamide-like midgut endocrine cells during the metamorphosis in *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera, Apidae). **Micron**, v. 33, n. 5, p. 453-460, 2002.

- NOIROT, C.; NOIROT-TIMOTHÉE, C. Structure fine de la bordure en brosse de l'intestin moyen chez les insectes. **J. Microsc.**, v. 13, p. 85-96, 1972.
- PEIXOTO, E.B.M.I.; SERRÃO, J.E. A comparative study of the cardia and cardiac valves in corbiculate bees (Hymenoptera, Apinae). **Sociobiology**, v. 37, n. 3B, p. 707-721, 2001.
- PETERS, W. Peritrophic membranes. **Zoophysiol. Series**, v. 30. 238 p, 1992.
- PETERS, W.; LATKA, I. Electron microscopic localization of chitin using gold labeled with wheat germ agglutinin. **Histochem.**, v. 84, p.155-160, 1986.
- REID, G.D.F.; LEHANE, M.J. Peritrophic membrane formation in three temperate simuliids, *Simulium ornatum*, *S. equinum* and *S. lineatum* with respect to the migration of onchocercal microfilariae. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 78, p. 527-539, 1984.
- RICHARDS, A.G.; RICHARDS, P.A. Origin and composition of the peritrophic membrane of the mosquito, *Aedes aegypti*. **J. Insect Physiol.**, v. 17, p. 2253-75, 1971.
- RICHARDS, A.G.; RICHARDS, P.A. The peritrophic membranes of insects. **Ann. Rev. Ent.**, v. 22, p. 219-240, 1977.
- SAKAGAMI, S.F.; ZUCCHI, R. Estudo comparativo de várias espécies de abelhas sem ferrão com especial referência ao processo de provisionamento e postura das células de cria. **Ciênc. Cult.**, v. 18, n. 3, p. 283-285, 1966.
- SCHORDERET, S. et al. cDNA and deduced amino acid sequences of a peritrophic membrane glycoprotein, 'peritrophin-48', from the larvae of *Lucilia cuprina*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 28, p. 99-111, 1998.
- SCHUMAKER, T.T.S.; CRISTOFOLETTI, P.T.; TERRA, W.R. Properties and compartmentalization of digestive carbohydrases and proteases in *Scaptotrigona bipunctata* (Apidae: Meliponinae) larvae. **Apidologie**, v. 24 p. 3-17, 1993.

- SERRÃO, J.E.; CRUZ-LANDIM, C. A specialized midgut region in stingless bees midgut (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). **Biocell**, v. 20, p. 227-234, 1996a.
- SERRÃO, J.E.; CRUZ-LANDIM, C. A comparative study of digestive cells in different midgut regions of stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). **J. Adv. Zool.**, v. 17, n. 1, p. 1-6, 1996b.
- SERRÃO, J.E.; CRUZ-LANDIM, C. Gut structures in adult workers of necrophorous Neotropical stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae). **Entomol. Gen.**, v. 19, p. 261-265, 1995.
- SHEN, Z.; JACOBS-LORENA, M. A type I peritrophic matrix protein from the vector *Anopheles gambiae* binds to chitin. Cloning, expression and characterization. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 17665-17670, 1998.
- SMITH, D.S. **Insect cells. Their structure and function**. Edinburgo: Oliver and Boyd, 1968. 334 p.
- SNODGRASS, R.E. **Anatomy of the Honey Bee**. Ithaca, New York: Comstock Publishing Associates, 1956. 334 p.
- SNODGRASS, R.E. **Principles of Insect Morphology**. New York and London: McGraw-Hill Book Company, 1935. 667 p.
- STEFANINI, M.; DE MARTINO, C. ZAMBONI, L. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. **Nature**, v. 216, p. 173-174, 1967.
- SWINGLE, J. The alimentary canal of the common bumble-bee *Bombus pennsylvanicus*. **Ohio Journ. Sci.**, 1927.
- TELLAM, R.L. et al. Identification of an immuno-protective mucin-like protein, peritrophin-55, from the peritrophic matrix of *Lucilia cuprina* larvae. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 33, p. 239-252, 2003.
- TELLAM, R.L. The peritrophic matrix. In: **Biology of the insect midgut**. Ed. Lehane M.J. & Billingsley, P.F. London: Chapman & Hall, 1996. p. 86-114.

- TELLAM, R.L.; EISEMANN, C. Chitin is only minor component of the peritrophic matrix from larvae of *Lucilia cuprina*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 30, n. 12, p. 1189-1201, 2000.
- TELLAM, R.L.; WIJFFELS, G. & WILLADSEN, P. Peritrophic matrix proteins. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 29, p. 87-101, 1999.
- TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Further evidence that enzymes involved in the final stages of digestion by *Rhynchosciara* do not enter the endoperitrophic space. **Insect Biochem.**, v. 13, p. 143-150, 1983.
- TERRA, W.R. Evolution of digestive systems of insects. **Ann. Rev. Ent.**, v. 35, p. 181-200, 1990.
- TERRA, W.R. Physiology and biochemistry of insect digestion. An evolutive perspective. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 21, p. 675-734, 1989.
- TERRA, W.R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, v. 47, p. 47-61, 2001.
- TERRA, W.R.; FERREIRA, C. The physiological role of the peritrophic membrane and trehalase: digestive enzymes in the midgut and excreta of starved larvae of *Rhynchosciara*. **J. Insect Physiol.**, v. 27, p. 325-331, 1981.
- TERRA, W.R.; FERREIRA, C.; BAKER, J.E. Compartmentalization of digestion. In: **Biology of the Insect Midgut**. Ed. Lehane M.J. & Billingsley, P.F. London: Chapman & Hall, 1996. p. 206-235.
- TERRA, W.R.; FERREIRA, C.; DE BIANCHI, A.G. Distribution of digestive enzymes among the endo and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara americana* and its physiological significance. **J. Insect Physiol.**, v. 25, p. 487-497, 1979.
- VECCHI, M.A.; BRAGAGLIA, M.M. Osservazioni preliminary sull'ultrastruttura del mesointestino dell'ape mellifica (*Apis m. ligustica*, Spin). **Arch. Zool. Ital.**, v. 50, p. 19-24, 1965.

WANG, P.; GRANADOS, R.R. Molecular cloning and sequencing of a novel invertebrate intestinal mucin cDNA. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 16663-16669, 1997.

WATERHOUSE, D.F. The rate of production of the peritrophic membrane in some insects. **Aust. J. Biol. Sci.**, v. 7, p. 59-72, 1954.

WINGGLESWORTH, V.B. **The Principles of Insect Physiology**. 7. ed. London: Methuen, 1972.

ZIMMERMANN, U.; MEHLAN, D.; PETERS, W. Investigations on the transport function and structure of peritrophic membranes; V – Amino acid analysis and electron microscopic investigations of the peritrophic membranes of the blowfly *Calliphora erythrocephala*. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 51, p. 181-186, 1975.