

**MARIA DO CARMO QUEIROZ FIALHO**

**CARACTERIZAÇÃO E IMUNOLOCALIZAÇÃO DAS PRINCIPAIS ENZIMAS  
DIGESTIVAS DO PREDADOR *Podisus nigrispinus* (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2010**

**MARIA DO CARMO QUEIROZ FIALHO**

CARACTERIZAÇÃO E IMUNOLOCALIZAÇÃO DAS PRINCIPAIS ENZIMAS  
DIGESTIVAS DO PREDADOR *Podisus nigrispinus* (HETEROPTERA: PENTATOMIDAE)

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 23 de setembro de 2010.

---

Prof. José Cola Zanuncio  
(Co-orientador)

---

Prof. Clóvis Andrade Neves  
(Co-orientador)

---

Dr. Anderson Martins Pilon

---

Prof. Richard Ian Samuels

---

Prof. José Eduardo Serrão  
(Orientador)

Dedico ao meu amado pai.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, oportunidades e principalmente pela força nos momentos mais difíceis desta jornada, e por colocar em meu caminho pessoas com as quais pude contar.

Aos meus familiares pelo incentivo e amor dedicados ao longo dos anos de minha vida, em especial a minha mãe, modelo de força; ao meu pai, por idealizar este sonho e a Maria Clara, por trazer alegria e renovar nossas vidas.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) do estado de Minas Gerais, à Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela oportunidade e condições de realização deste trabalho.

Ao professor e amigo José Eduardo Serrão por acreditar nos seus alunos e por ter me dado novas oportunidades que contribuíram muito para a minha formação. Um exemplo a seguir.

Ao Laboratório de Bioquímica de Insetos (LBI) da Universidade de São Paulo (USP) que me acolheu com muito carinho e proporcionou um período de novas experiências e ensinamentos fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Ao querido professor Walter Ribeiro Terra por ter me recebido em seu laboratório com respeito, carinho e confiança e a professora Clélia Ferreira.

Ao Núcleo de Microscopia Eletrônica e Microanálise pelas condições oferecidas para a realização do doutorado, em especial a Karla pela atenção e cuidado.

Aos co-orientadores Clóvis Andrade Neves e José Cola Zanuncio.

A secretária do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, Beth pelo carinho e atenção.

Ao técnico e amigo do Laboratório de Biologia Celular e Biofísica, José Luís Monteiro.

Às técnicas do LBI, Luiza, Ivanilde e Christiane.

Aos companheiros do LBI, Ivan, Fábio, André, Marcelo, Ciça, Daniela, Fabiane e em especial a Nathália que me ensinou e acompanhou meu trabalho no LBI, sendo fundamental para a realização deste trabalho e a minha estadia em São Paulo.

Aos amigos conquistados em São Paulo, Ana Laura, Gabriela, Nádia, Helena, pessoas que preencheram todos os vazios e que provaram que a amizade e o amor ainda existem.

Aos amigos Nélio, Maurício e Denilson, por toda a atenção e acolhida.

Aos amigos do laboratório de Biologia Celular e Biofísica, Dihego, Waléria, Douglas, Débora, Sthefanie, Luíza e Poliana.

Aos amigos, Vinícius, Sabrina, Lilian, Sílvia e Jane por tudo que vivemos nesses longos anos em Viçosa.

As amigas da república, Aline, Aline Gomes, Angélica, Mariana, Elba pela compreensão nos momentos difíceis e pelo companherismo.

Em especial ao Carlos, que me mostrou um novo modo de viver a vida. Obrigada por me amar, aceitar, compreender e por me fazer tão feliz.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA

Maria do Carmo Queiroz Fialho, filha de Antonio de Padua Fialho Medina (*in memoriam*) e de Maria das Graças Queiroz Fialho, nasceu no dia 31 de dezembro de 1979, na cidade de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

Iniciou a graduação em Bacharelado em Ciências Biológicas em 1999 na Universidade Federal de Ouro Preto, aonde veio a concluí-la em janeiro de 2004, quando obteve o título de Bacharel em Ciências Biológicas. Durante o período da graduação realizou estágio nos meses de férias no Laboratório de Controle Biológico de Pragas da Universidade Federal de Viçosa, vindo em janeiro de 2004 trabalhar no mesmo.

Em março de 2005 iniciou o mestrado em Entomologia no Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa, município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, onde trabalhou com ultra-estrutura do intestino de Pentatomidae, vindo a defender a dissertação em 23 de fevereiro de 2007.

Em março desse mesmo ano, iniciou o doutorado em Biologia Celular e Estrutural no Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, município de Viçosa, Minas Gerais, trabalhando com enzimas digestivas de Pentatomidae. Parte da pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Bioquímica de Insetos no Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo, no município de São Paulo, São Paulo, Brasil. Vindo a defender sua tese em 23 de setembro de 2010.

## SUMÁRIO

RESUMO-----	viii
ABSTRAT -----	x
1- Introdução e Revisão Bibliográfica -----	1
2- Material e Métodos -----	10
2.1-Animais e preparação das amostras dos intestinos médios e glândulas salivares -	10
2.2-Morfologia das glândulas salivares e do trato digestivo -----	11
2.3-Determinação do pH do conteúdo das glândulas salivares e do intestino médio -	11
2.4-Dosagem de proteínas -----	11
2.5-Ensaio para a determinação das atividades enzimáticas -----	12
2.6-Efeito de inibidores a atividade proteolítica -----	13
2.7-Cromatografia de troca iônica -----	14
2.8-Cromatografia de filtração em gel-----	14
2.9-Determinação do efeito do pH sobre a atividade das enzimas semi-purificadas --	15
2.10-Estudos cinéticos -----	16
2.11-Atividade das enzimas em gel de poliacrilamida em condições nativas (PAGE) e sua correlação com o Western blotting -----	16
2.12-Microscopia eletrônica de transmissão -----	18
2.13-Imunocitoquímica -----	19
2.14-Imunofluorescência -----	20
3-Resultados-----	20
3.1- Morfologia das glândulas salivares e do trato digestivo -----	20
3.2-pH das glândulas salivares e do intestino médio -----	21
3.3-Atividade das enzimas das glândulas salivares e do intestino médio -----	22
3.4-Efeito de inibidores na atividade proteolítica -----	26

3.5-Purificação de proteínas -----	27
3.5.1-Amilase -----	27
3.5.2-Aminopeptidase -----	28
3.5.3-Catepsina L -----	29
3.5.4- $\alpha$ -Glicosidase -----	30
3.6-Determinação do pH ótimo e $K_m$ das enzimas estudadas em <i>P. nigrispinus</i> -----	31
3.7-Atividades das enzimas no PAGE e sua correlação com o Western blotting -----	33
3.8-Imunolocalização das enzimas do intestino médio de <i>P. nigrispinus</i> -----	35
3.9-Ultra-estrutura das células do intestino médio de <i>P. nigrispinus</i> -----	39
4-Discussão -----	43
5-Referências Bibliográficas -----	53

## RESUMO

FIALHO, Maria do Carmo Queiroz, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2010. **Caracterização e Imunolocalização das Principais Enzimas Digestivas do Predador *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae)**. Orientador: José Eduardo Serrão. Co-orientadores: José Cola Zanuncio e Clóvis Andrade Neves.

Considerando a importância do predador *Podisus nigrispinus* em programas de controle biológico de pragas e a escassez de estudos sobre as enzimas digestivas deste inseto, este trabalho teve como objetivo identificar, caracterizar e localizar as principais enzimas digestivas das glândulas salivares e do intestino médio de *P. nigrispinus*. Machos adultos de *P. nigrispinus* foram dissecados sendo as glândulas salivares e o intestino médio (dividido em anterior, médio e posterior) submetidas a testes enzimáticos para amilase, aminopeptidase, catepsina L, tripsina e  $\alpha$ -glicosidase. Estas enzimas foram pré-purificadas e imunolocalizadas na região do intestino médio. O pH da glândula salivar foi 6,0 e do intestino médio foi de 5,6 na região anterior, 5,7 na mediana e 5,8 na posterior. A atividade específica das enzimas nas glândulas salivares e no intestino médio foi respectivamente: amilase 0,01, 21 mU/mg, aminopeptidase 0,19, 3 mU/mg, catepsina L 16, 3800 U/mg e  $\alpha$ -glicosidase 0,27, 147 mU/mg de proteína. Tripsina não apresentou atividade no intestino médio, porém na glândula salivar sua atividade específica foi de 7 U/mg de proteína. Catepsina L foi a principal proteinase encontrada em *P. nigrispinus* e apresentou dois picos de atividade com pH ótimo 5,5 e massa molecular de 14 e 17 e  $K_m$  de 32 e 11  $\mu$ M. Amilase, aminopeptidase,  $\alpha$ -glicosidase apresentaram um pH ótimo de 5,1, 5,5, 5,8;  $K_m$  de 0,1%, 0,03, 5 mM e massa molecular de 43, 125 e 90 respectivamente. Insetos alimentados há uma hora apresentaram diferenças na atividade enzimática de todas as enzimas analisadas e se manteve similar nos outros tempos. Os dados bioquímicos e da imunolocalização mostraram que a amilase, aminopeptidase e  $\alpha$ -glicosidase de membrana foram as enzimas mais ativas na região anterior do intestino; já nas regiões mediana e posterior todas as enzimas estão ativas, porém com uma maior atividade de catepsina L e  $\alpha$ -glicosidase solúvel. Estes dados mostram

que a digestão inicial de carboidratos inicia na região anterior do intestino médio e termina na anterior e mediana. Já a digestão de proteínas tem o início na região mediana e termina na anterior do intestino médio, sugerindo que a membrana perimicrovilar nestes insetos tem um papel na compartimentação da digestão, na qual a anterior está relacionada à absorção de água e também na absorção de aminoácidos obtidos do xilema por esses insetos zoofitófagos.

## ABSTRAT

FIALHO, Maria do Carmo Queiroz, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2010. **Characterization and Immunolocalization of Major Digestive Enzymes of the Predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae).** Adviser: José Eduardo Serrão. Co-advisers: José Cola Zanuncio and Clovis Andrade Neves.

Considering the importance of the predator *Podisus nigrispinus* in programs of biological control of pests and the poor studies on the digestive enzymes in Hemiptera, this study aimed to identify, locate and characterize the major digestive enzymes of the salivary glands and midgut of *P. nigrispinus*. Adult males of *P. nigrispinus* were dissected and the salivary glands and midgut (divided into anterior, middle and posterior) subjected to enzyme tests for amylase, aminopeptidase, cathepsin L, trypsin and  $\alpha$ -glucosidase. These enzymes were pre-purified and immunolocalized in the midgut regions. The pH was 6.0 in salivary gland and 5.6, 5.7 and 5.8 in the anterior, median and posterior regions of the midgut, respectively. The specific activity of enzymes in the salivary glands and midgut were respectively: amylase 0.01, 21 mU / mg, aminopeptidase 0.19, 3 mU / mg, cathepsin L 16, 3800 U / mg and  $\alpha$ -glucosidase 0.27, 147 mU / mg protein. Trypsin was not active in the midgut, whereas in salivary gland its specific activity was 7 U / mg protein. Cathepsin L was the major proteinase in *P. nigrispinus* and showed two peaks of activity with optimum pH 5.5 and molecular mass of 14 and 17 kDa and  $K_m$  32 and 11 mM. Amylase, aminopeptidase,  $\alpha$ -glucosidase had an optimum pH of 5.1, 5.5, 5.8,  $K_m$  of 0.1%, 0.03, 5 mM and the molecular mass of 43, 125 and 90 kDa respectively. One hour after feeding, *P. nigrispinus* showed differences in activity of all enzymes tested and remained similar at other periods after feeding. The biochemical and immunolocalization data showed that the amylase, aminopeptidase and  $\alpha$ -glucosidase membrane enzymes were more active in the anterior midgut, already in the middle and posterior all the enzymes were active, but with a higher activity of cathepsin L and soluble  $\alpha$ -glucosidase. These data show that the initial digestion of carbohydrates begins in the anterior midgut and ends at the anterior and middle midgut, whereas digestion of proteins has its beginning in the middle, and ends at the

anterior midgut, suggesting that the perimicrovillar membrane play a role in compartmentalization of digestion in which the anterior midgut is related to water absorption and amino acid uptake obtained from xylem in this zoophytophagous insects.

## 1 – Introdução e Revisão Bibliográfica

O gênero *Podisus* pertence a subfamília Asopinae (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) e o ciclo de vida dos membros dessa subfamília inclui a fase de ovo, ninfa (cinco estádios) e a fase adulta. Os Asopinae diferenciam-se daqueles pertencentes as demais famílias de pentatomídeos por seu hábito alimentar predador. Ninfas (exceto de primeiro instar) e adultos atacam principalmente insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Hymenoptera.

*Podisus nigripinus* (Dallas 1851) (Heteroptera: Pentatomidae) ocorre nas Américas do Sul e Central (Thomas 1992) e por ser um predador generalista é importante agente no controle biológico de lagartas desfolhadoras, sendo agressiva no combate a pragas agrícolas e florestais, principalmente Lepidoptera e Coleoptera (Zanuncio et al. 1994, De Clerque 2000).

O controle biológico de insetos utiliza inimigos naturais sobre uma população de pragas visando uma diminuição na densidade populacional da mesma até não causar mais danos econômicos à cultura, para isso, utilizam-se predadores, parasitóides ou patógenos (Parra et al. 2002). A utilização do controle biológico de pragas tem aumentado devido a busca pela diminuição do controle químico e o restabelecimento do equilíbrio ambiental, tendo os inimigos naturais um importante papel no manejo integrado de pragas (Jusselino-Filho et al. 2003).

Monoculturas de *Eucalyptus* abrangem áreas extensas e contíguas, e por isto, podem sofrer prejuízos econômicos por insetos, especialmente lepidópteros (Pereira et al. 1994). Isto ocorre pelo fato de todos os monocultivos constituírem ambiente favorável à adaptação e ao ataque de insetos-praga de mirtáceas nativas e pela menor sobrevivência de organismos benéficos, que atuam no controle biológico (Zanuncio et al. 1994, Bragança et al. 1997, Frago et al. 2000, Santos et al. 2000).

Insetos Asopinae (Heteroptera: Pentatomidae) são predadores importantes de pragas, com destaque para *Brontocoris tabidus* (Signoret, 1863), *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851), *Podisus rostralis* (Stal, 1860) e *Supputius cincticeps* (Stal, 1860) (Matos Neto et al. 2002, Oliveira et al. 2002, Vivian et al. 2003). *Podisus nigrispinus* e *B. tabidus* destacam-se entre os

predadores encontrados em surtos de Lepidoptera em eucalipto e são utilizados em programas de manejo integrado de pragas (Zanuncio et al. 1994, 2000).

Os Heteroptera são, predominantemente, sugadores de seiva, mas, espécies desse grupo desenvolveram hábito predatório, como os Asopinae (Assis Júnior et al. 1998). Apesar de predadores, alguns pentatomídeos também utilizam material vegetal em sua dieta (Valicente e O'Neil 1993). A alimentação mista (presa + planta), aparentemente, fornece aos predadores nutrientes essenciais ou aminoácidos não encontrados nesses alimentos isoladamente e água (Eubanks e Denno 1999, Sinia 2004), com melhorias nas características biológicas e reprodutivas desses insetos (Valicente e O'Neil 1993, Assis Júnior et al. 1998, Lemos et al. 2001, 2006, 2009, Coll e Guershon 2002, Oliveira et al. 2002, Zanuncio et al. 2000, 2004).

A onivoria fornece flexibilidade ecológica aos predadores e aumenta a sobrevivência dos mesmos quando os recursos em um nível trófico são de baixa qualidade ou indisponíveis (Gillespie e McGregor 2000). Insetos onívoros são classificados como oportunistas obrigatórios ou facultativos, em função da importância do material animal ou vegetal para os mesmos. Entre os onívoros oportunistas, destacam-se os fitozoófagos: herbívoros que eventualmente se alimentam de presas; e os zoofitófagos: carnívoros que eventualmente se alimentam de plantas (Coll e Guershon 2002).

A fitofagia em Heteroptera predadores (Eubanks e Denno 1999, Gillespie e McGregor 2000, Coll e Guershon 2002, Evangelista Jr. et al. 2004, Sinia et al. 2004, Zanuncio et al. 2004) pode ser considerada uma forma de onivoria denominada zoofitofagia (Coll e Guershon 2002). A zoofitofagia é importante no controle biológico por facilitar o estabelecimento do inimigo natural no campo antes do aparecimento das pragas e permitir sua sobrevivência durante escassez ou ausência de presas (Eubanks e Denno 1999).

Há três possíveis explicações funcionais para a alimentação em plantas por organismos zoofitófagos: (1) equivalência - o material vegetal fornece nutrição suficiente e substitui o tecido animal quando este é escasso, sendo as plantas consideradas uma fonte alimentar

subótima; (2) facilitação – o material vegetal fornece componentes nutricionais essenciais que suplementam a carnivoria e (3) independência – tecidos de plantas fornecem nutrientes essenciais não disponíveis nos tecidos animais (Gillespie e McGregor 2000). Além disso, insetos predadores podem obter água de plantas, especialmente, para a produção de saliva utilizada na digestão extra-oral da alimentação com presa (Gillespie e McGregor 2000; Sinia et al. 2004).

Alguns insetos iniciam o processo de digestão injetando saliva no alimento antes de ingerí-lo, esse processo é conhecido como digestão extra-oral. Nesse processo enzimas digestivas são injetadas para liquefazer o alimento e facilitar a absorção de nutrientes da presa, pois a liquefação inicial e adição de saliva diluída funcionam como manipulação redutora da presa (Cohen 1998, Cohen e Tang 1997). Essa forma de preparação aumenta o campo de ação dos predadores e permite o uso de presas de mesmo tamanho ou maiores que seu próprio corpo (Cohen 1995). No entanto, este comportamento pode estar associado aos altos custos de energia para a síntese de enzimas em grandes quantidades (Sinia et al. 2004).

Os heterópteros predadores, raramente, abandonam a presa antes de consumi-la completamente (Cohen 1995, 1998, Cohen e Tang 1997). O consumo parcial da presa é raro, pois a digestão extra-oral requer grande investimento na produção de enzimas digestivas. Por isto, é necessário recuperar enzimas associadas com a liquefação da presa e auxiliar na digestão no intestino (Cohen 1990, 1995, Cohen e Tang 1997). Desta forma, o processo digestivo em heterópteros predadores pode resultar em alta eficiência da digestão e utilização de nutrientes (Cohen 1990).

Toxinas e/ou enzimas digestivas da digestão extra-oral podem ser produzidas por estruturas especializadas como glândulas salivares e maxilares, ou no próprio intestino como em aranhas e besouros. Além disso, substâncias encontradas nas glândulas salivares podem ser utilizadas para caracterizar os hábitos alimentares de insetos (Zeng e Cohen 2000, Boyd 2003).

Estudos sobre a digestão de insetos tiveram início no século passado, mas foi reduzido com o surgimento dos inseticidas químicos na década de 40 (Terra e Ferreira 2005). No entanto, impactos sociais e ecológicos negativos do controle químico de pragas como a redução da população de inimigos naturais, contaminação ambiental e problemas com a saúde humana, tornaram necessárias novas abordagens, como o uso do controle biológico de pragas e o desenvolvimento de plantas transgênicas resistentes as pragas.

O fato do intestino médio ter uma interface grande e, relativamente, desprotegida entre o inseto e o ambiente estimulou novos estudos sobre a digestão. Dessa forma, o conhecimento do intestino e sua função são importantes para o desenvolvimento de novos métodos de controle de insetos (Terra e Ferreira 2005).

O trato digestivo dos insetos é dividido em três regiões principais: intestino anterior e intestino posterior, ambos de origem ectodérmica e intestino médio originado a partir da endoderme. No intestino anterior ocorre o armazenamento do alimento e algumas vezes a sua fragmentação antes que este alcance o intestino médio. No intestino médio, ocorre digestão química e absorção dos produtos da digestão, sendo, portanto, o sítio primário de produção de enzimas digestivas dos insetos. O intestino posterior conduz o alimento não digerido para o exterior e está relacionado com o equilíbrio hidroeletrólítico do organismo (Chapman 1998).

Os intestinos anterior e posterior, de origem ectodérmica, são revestidos internamente por uma cutícula denominada íntima, produzida pelas células epiteliais desta região e trocada a cada muda. A camada íntima não existe no intestino médio, mas esta região apresenta, na maioria dos insetos uma delicada película que separa o alimento do epitélio, denominada membrana peritrófica (Chapman 1985, 1998). Hemiptera e Thysanoptera, aparentemente, não apresentam membrana peritrófica, porém alguns Hemiptera possuem uma fina membrana lipoproteica externa, denominada membrana perimicrovilar, que se estende da base da microvilosidade celular até o lúmen e delimita um compartimento fechado, o espaço perimicrovilar (Terra 1988). Este espaço está entre a membrana microvilar e a perimicrovilar, e

sua função é semelhante à da membrana peritrófica, como compartimentação do processo digestivo, otimização da absorção de aminoácidos da dieta, imobilização de algumas enzimas e proteção do epitélio intestinal (Terra e Ferreira 2005).

O epitélio intestinal se apóia em uma lâmina basal e é envolvido pela musculatura responsável pelo peristaltismo, que movimenta o bolo alimentar ao longo do intestino (Snodgrass 1993).

O epitélio do intestino médio é formado por três tipos celulares com modificações estruturais de acordo com a função que desempenham: células digestivas ou principais, células regenerativas e células endócrinas. As células principais possuem tempo limitado de vida e são, regularmente, substituídas pelas células regenerativas. As células epiteliais do intestino médio são apoiadas por fibras musculares dispostas em duas camadas: uma interna circular e uma externa longitudinal (Chapman 1985, 1998, Cruz-Landim 1985). A estrutura das células principais depende da espécie, fase do ciclo alimentar e, particularmente, das múltiplas funções durante o ciclo de vida como, por exemplo, a secreção de enzimas, glicoproteínas, absorção e estoque de produtos orgânicos e inorgânicos (Cavalcanti e Cruz-Landim 1999, Billingsley e Lehane 1996, Serrão e Cruz-Landim 1996a, 1996b, 2000, Martins et al. 2006; Serrão et al. 2008, Fialho et al. 2009).

A digestão é o processo pelo qual as moléculas do alimento são clivadas em moléculas menores que podem ser absorvidas pelo tecido intestinal. Esse processo é controlado pelas enzimas digestivas e depende da localização das mesmas no intestino do inseto. O processo digestivo ocorre no canal alimentar que é responsável por todas as etapas do processamento do alimento.

A digestão nos insetos é dividida em três fases: a digestão inicial, intermediária e final. A digestão inicial consiste na diminuição das moléculas poliméricas do alimento em moléculas oligoméricas através da ação de hidrolases, tais como: amilases, celulasas, hemicelulasas e proteinases. Durante a digestão intermediária, os oligômeros resultantes da digestão inicial

continuam sendo hidrolisados por polímerohidrolases como amilase ou oligômero-hidrolases como aminopeptidase. Os produtos resultantes são dímeros tais como maltose, celobiose e dipeptídeos derivados. Os dímeros na digestão final são clivados em monômeros pelas dímero-hidrolases, exemplificadas pela maltase, celobiase e dipeptidase (Terra e Ferreira 2005).

A digestão de proteínas se inicia pela ação de proteinases (endopeptidases), a intermediária é realizada por exopeptidases e a final por dipeptidases. Já em carboidratos, a digestão inicial e intermediária é realizada pela  $\alpha$ -amilase e a digestão final das cadeias de glicogênio ocorre sobre a ação das  $\alpha$ -glicosidases (Terra e Ferreira 2005).

As proteases atuam na digestão inicial de proteínas e podem diferir na especificidade em relação à proteína alvo (substrato) sendo agrupadas de acordo com o aminoácido catalítico principal nas subclasses: serina, cisteína, aspartil e metaloproteinases. As proteases serínicas apresentam um resíduo de serina e um de histidina no sítio ativo, as proteases cisteínicas possuem um resíduo de cisteína no sítio ativo, as aspartil proteinases são ativas em pH ácido devido à presença de um resíduo carboxila, enquanto as metaloproteases necessitam de um íon metálico no sítio ativo (Terra e Ferreira 2005).

Proteases serínicas do tipo tripsina preferencialmente clivam cadeias de proteínas no lado carboxil de aminoácidos básicos como arginina e lisina, enquanto a quimotripsina cliva preferencialmente cadeias de proteínas no lado carboxil de aminoácidos aromáticos. A maioria das tripsinas de insetos possuem massa molecular entre 20 e 35 kDa e pH ótimo entre 8 e 10. Proteases serínicas são encontradas na maioria das espécies de insetos, mas importantes grupos desses organismos apresentaram exceções interessantes, como em Heteroptera, Cyclorrhapha (Diptera) e os Cucujiformia (Coleoptera) (Terra e Ferreira 1994, 2005), porém alguns Heteroptera possuem tripsina nas glândulas salivares (Zeng et al. 2002, Pascual-Ruiz et al. 2009).

As proteases cisteínicas foram classificadas em clãs e famílias baseado na sequência de aminoácidos. O termo família descreve um grupo de enzimas com proteínas que apresentam

similaridade na sequência responsável pela atividade catalítica, com pelo menos uma outra enzima do grupo. O clã compreende um grupo de famílias com sinais de relação evolutiva na sequência de aminoácidos, sendo que as proteases cisteínicas estão agrupadas em cinco clãs: CA, CB, CC, CD e CE (Rawlings e Barret 1993, 1994).

As proteases cisteínicas da família C1 do clã CA são as mais conhecidas. Esta família compreende a papaína e outras proteases de plantas e as catepsinas lisossomais também encontradas em animais. Essas enzimas são monômeros e possuem massa molecular entre 20 e 40 kDa e pH ótimo entre 5 e 6 (Rawlings e Barret 1994, Turk et al. 1997, 1998; Terra e Ferreira 2005), com exceção da catepsina C que é um tetrâmero com massa molecular de 200 kDa (Dolenc et al. 1995).

As proteases cisteínicas mais importantes são as catepsinas lisossomais B, H e L. A catepsina H atua como aminopeptidase, a B é mais importante como peptidil dipeptidase e a catepsina L atua somente como endopeptidase (Wiederanders 2003).

As proteases cisteínicas dos insetos podem ser digestivas (Terra e Ferreira 1994) ou estarem envolvidas na degradação embrionária de vitelogenina (Chow et al. 1999), na metamorfose (Takahashi et al. 1993) e no processo de ecdise (Liu et al. 2006).

A ocorrência de proteases cisteínicas como enzima digestiva, ao invés das proteases serínicas em Hemiptera (Houseman et al. 1984; Terra e Ferreira 1994; Cristofolletti et al. 2003) pode ser resultado de dois processos evolutivos diferentes. O primeiro seria a perda das proteases serínicas como uma adaptação de Hemiptera, semelhante aos Auchenorrhyncha (pulgões), a ingestão de seivas carentes de macromoléculas e o segundo seria o uso de uma protease lisossômica pelos Hemiptera sugadores de seiva ao retornar para um hábito alimentar rico em proteína (Houseman et al. 1985, Cristofolletti et al. 2003).

A catepsina L é uma endopeptidase que hidrolisa, preferencialmente, ligações peptídicas com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, enquanto as catepsinas B atuam sobre a arginina. Substratos como Z-FR-MCA e Z-RR-MCA facilitam a distinção entre as duas enzimas.

A cathepsina L é a única protease cisteínica em insetos quantitativamente importante, sendo inibida por E-64 e ativada com cisteína ou DTT (Terra e Ferreira 2005).

Exopeptidases, enzimas que removem aminoácidos do lado N-terminal (aminopeptidases) ou C-terminal (carboxipeptidases) dos oligopeptídios (fragmentos de proteínas), realizam a digestão intermediária de proteínas. As aminopeptidases são classificadas de acordo com a dependência de íons metálicos (geralmente  $Zn^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ ) e especificidade ao substrato. A aminopeptidase N possui ampla especificidade, apesar de remover preferencialmente resíduos de alanina e leucina, enquanto a aminopeptidase A atua sobre resíduos de ácido aspártico e glutâmico como substrato (Norén et al. 1986).

As aminopeptidases clivam oligopeptídeos, derivados da ação de proteases, a aminoácidos permitindo o transporte destes através do epitélio intestinal e, conseqüentemente, usados como substratos para a construção de proteínas endógenas do inseto (Taylor 1993). Estas enzimas possuem uma massa molecular entre 90 e 130 kDa e pH entre 7.2 e 9.0 e são metaloenzimas (Terra e Ferreira 2005).

Aminopeptidases na forma solúvel são encontradas em Orthoptera, Hemiptera e Coleoptera Adephaga, enquanto as aminopeptidases de Coleoptera Polyphaga, Diptera e Lepidoptera estão, geralmente, ligadas às membranas das microvilosidades das células do intestino médio (Terra e Ferreira 1994).

As glicosidases são classificadas de acordo com o substrato específico, mas podem ser divididas em duas categorias. Uma inclui as depolimerases, enzimas que clivam ligações internas em polissacarídeos e, usualmente, são nomeadas de acordo com o seu substrato como amilase, celulase, pectinase e quitinase. A segunda inclui enzimas que hidrolisam oligossacarídeos e dissacarídeos. Oligossacaridases e dissacaridases são usualmente nomeadas com base no monossacarídeo que doa o seu grupo redutor para a ligação glicosídica e a sua configuração ( $\alpha$  e  $\beta$ ) para a ligação (Terra et al. 1996, Terra e Ferreira 2005).

A  $\alpha$ -amilase é uma endoenzima que hidrolisa o  $\alpha$ -1,4-glucosídeo como o amido e o glicogênio. As amilases de insetos dependem de íons cálcio para atividade ou estabilidade, são ativadas por cloreto, suas massas moleculares estão entre 48-68 kDa e seus pHs variam dependendo do táxon do inseto. As amilases são geralmente purificadas pela formação de um complexo glicogênio-amilase seguida de precipitação em etanol (Terra e Ferreira 1994, 2005).

As  $\alpha$ -glicosidases removem, sequencialmente, moléculas de glicose das extremidades reductoras de oligomaltossacarídeos. Em insetos, as  $\alpha$ -glicosidases são encontradas na forma solúvel no lúmen intestinal ou ligadas ao glicocálix das células intestinais. Elas também são encontradas ligadas as membranas microvilares (Terra e Ferreira 1994) e as membranas perimicrovilares (Silva e Terra 1995). As  $\alpha$ -glicosidases possuem massa molecular entre 60 e 80 kDa e são inibidas por Tris.

As enzimas digestivas podem ser secretadas pelas células do intestino médio de três formas: secreção merócrina ou exocitose, secreção holócrina, secreção apócrina e na sua variação microapócrina. Esses diferentes tipos de secreções ocorrem de acordo com a forma na qual as enzimas são liberadas no lúmen, podendo ser através da junção da vesícula onde a enzima está empacotada com a membrana plasmática, através da liberação do conteúdo celular, liberação de pedaços da célula como microvilosidades ou por secreção das vesículas para fora das microvilosidades (Nation 2002).

A atividade enzimática varia com o estado alimentar do inseto, indicando que sua síntese e/ou secreção são reguladas por fatores humorais, neurais ou estimuladas por substâncias encontradas nos alimentos (Chapman 1985).

O aumento da atividade enzimática no lúmen do intestino envolve a síntese de enzimas nas células do intestino médio e sua secreção pelas mesmas. Em muitas espécies a quantidade de enzimas encontrada nas células antes da alimentação é baixa ou nula, em outras espécies as enzimas são estocadas nas células e liberadas quando os insetos se alimentam (Chapman 1985).

A primeira hipótese sobre mecanismos secretores das células intestinais de insetos foi baseada em observações citológicas em microscópio de luz. O uso do microscópio eletrônico e a combinação de procedimentos bioquímicos e citológicos foram importantes para os avanços nessa área (Cristofolletti et al. 2001), proporcionando um grande potencial para o entendimento da biologia celular desses organismos e para o desenvolvimento de métodos de controle de pragas.

Considerando a importância de *P. nigrispinus* em programas de controle biológico de pragas e a escassez de estudos sobre as enzimas digestivas deste inseto, este trabalho teve como objetivo identificar, caracterizar e localizar as principais enzimas digestivas das glândulas salivares e do intestino médio de *P. nigrispinus*, contribuindo para o entendimento da digestão nesses Heteroptera.

## **2 –Material e Métodos**

### **2.1 - Animais e preparação das amostras dos intestinos e glândulas**

As análises foram realizadas com machos adultos de *P. nigrispinus* da criação massal do Insetário da Universidade Federal de Viçosa, onde são mantidos a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotofase de 12 horas. Esses insetos foram deixados em jejum por 48 horas e, em seguida, alimentados por 24 horas com pupas de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae) *ad libitum*.

Para avaliar a atividade enzimática nas diferentes regiões do intestino médio de *P. nigrispinus*, esse foi dividido em três seções (anterior, médio e posterior) de acordo com sua morfologia (Guedes et al. 2007).

Para verificar se a alimentação influencia na atividade enzimática, os animais após 48 horas de jejum foram alimentados com pupas de *T. molitor*, e quando eles completaram uma, duas, três e quatro horas se alimentando, foram retirados da presa.

Os adultos de *P. nigrispinus* foram crio-anestesiados por cinco minutos, dissecados em solução salina para insetos (0,1M NaCl, 0,1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,2) tendo suas

glândulas salivares e intestinos médios removidos e congelados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análise da atividade enzimática.

As amostras das glândulas, dos intestinos inteiros e das regiões do intestino médio foram homogeneizados com água ultra-pura em gelo com o auxílio de um homogeneizador tipo Potter-Elvehjem e centrifugados a  $16100 \times g$  por 30 minutos à  $4^{\circ}\text{C}$ . O precipitado ressuspensionado em água e o sobrenadante foram utilizados para ensaios de atividades enzimáticas e determinação de proteínas.

## **2.2 – Morfologia das glândulas salivares e do trato digestivo**

Adultos de *P. nigrispinus* foram crio-anestesiados, dissecados em solução salina tendo seu trato digestivo e glândulas salivares removidos e observados em estereomicroscópio.

## **2.3 - Determinação do pH do conteúdo das glândulas salivares e do intestino médio**

Dez machos de *P. nigrispinus* foram imobilizados e dissecados em água ultra-pura. O intestino médio foi dividido em anterior, médio e posterior. O conteúdo das glândulas salivares e das seções do intestino médio foram diluídos em  $5 \mu\text{l}$  de água ultra-pura ao qual foi adicionado  $5 \mu\text{l}$  de indicador colorimétrico universal de pH (E. Merck, Darmstadt, pH 4-10) diluído cinco vezes. O pH das glândulas salivares e do intestino médio foi obtido por comparação das colorações dos homogeneizados com as colorações das soluções-padrão diluídas em  $5 \mu\text{L}$  de água ultra-pura.

## **2.4 - Dosagem de proteínas**

A concentração de proteínas totais nas amostras das glândulas salivares e do intestino médio de *P. nigrispinus* foi obtida pelo método de determinação de proteínas proposto por Smith et al. (1985) e modificado por Morton e Evans (1992) usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

## **2.5 - Ensaio para a determinação das atividades enzimáticas**

O ensaio de amilase foi realizado utilizando-se amido 0,5% em tampão citrato fosfato 50 mM (pH 6,0) como substrato. O volume de reação foi de 50 µl incubado em banho-maria termostatizado (30°C) por duas horas e a reação foi interrompida fervendo as amostras a cada 30 minutos, em seguida adicionou-se 200 µl de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) e novamente levados para ferver por cinco minutos. A atividade foi quantificada pela liberação do açúcar com poder redutor do amido, detectado pelo DNS, usando espectrofotômetro a 550 nm (Silva et al. 2001).

O ensaio de aminopeptidase foi realizado utilizando-se o substrato L-leucina p-nitroanilida (LpNA) (dissolvido em dimetilsulfóxido -DMSO) 1 mM em tampão citrato-fosfato 50 mM (pH 6,0). O volume de reação foi de 100 µl incubado em banho-maria termostatizado (30°C) e a reação foi interrompida com a adição de 50 µl de ácido acético 30% a cada 30 minutos num tempo total de ensaio de duas horas. A atividade foi quantificada pela liberação de p-nitrofenolato usando espectrofotômetro a 410 nm (Terra et al. 1979).

O ensaio para detecção de proteases serínicas foi realizado com o substrato carboxibenzoil-fenilalanil-arginil-7-amino-4-metil-coumarina (Z-FR-MCA) 1 mM (previamente dissolvido em DMSO) em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7,5) para detectar a atividade de tripsina e succinil-L-alanil-L-alanil-L-prolyl-L-fenilalanil-7-amino-4-metil-coumarina (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA) para quimiotripsina. O volume de reação foi de 204 µl incubado em banho-maria termostatizado (30°C) e a reação foi interrompida com a adição de 50 µl de ácido acético 30% a cada quatro minutos sendo o tempo total do ensaio de 16 minutos (Cristofolletti et al. 2003).

O ensaio de protease cisteínica foi realizado com o substrato Z-FR-MCA 1 mM (previamente dissolvido em DMSO) em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 6,0) contendo cisteína 3mM e ácido etilenodiaminotetraacético de sódio (EDTA) 3 mM. O volume de reação foi de 204 µl incubado em banho-maria termostatizado (30°C) e a reação foi interrompida com a adição de 50 µl de ácido acético 30% a cada quatro minutos, sendo o tempo total do ensaio de

16 minutos. O ensaio com o substrato carboxibenzoil-arginil-arginil-7-amino-4-metil-coumarina (Z-RR-MCA) 1 mM foi realizado com nas mesmas condições anteriores para determinar o tipo de protease cisteínica presente em *P. nigrispinus*.

Nos ensaios realizados para protease serínica e cisteínica a metil coumarina é liberada quando o substrato é hidrolisado e pode ser detectada por fluorescência medida com a excitação de 380 nm e emissão de 460 nm (Alves et al. 1996).

O ensaio de  $\alpha$ -glicosidase foi realizado utilizando-se o substrato p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucosídeo (pNP $\alpha$ Glc) 5 mM. O volume de reação foi de 50  $\mu$ l incubado em banho-maria termostatizado (30°C) e a reação foi interrompida com a adição de 200  $\mu$ l de tampão carbionato bicarbonato contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% a cada cinco minutos e o tempo total do ensaio foi de 20 minutos. A atividade foi quantificada pela liberação de p-nitrofenolato medida em espectrofotômetro a 420 nm (Terra et al. 1979).

Controles sem enzimas foram realizados nas mesmas condições dos ensaios.

A quantidade de enzima que hidrolisa um  $\mu$ mol de substrato por minuto foi definida como uma unidade (U).

## **2.6 - Efeito de inibidores na atividade proteolítica**

O homogeneizado do intestino médio de *P. nigrispinus* foi analisado com inibidores para verificar o efeito destes perante a atividade das proteases digestivas serínicas e cisteínicas deste inseto.

Foram utilizados como inibidores o L-trans-epoxisuccinil-L-leucil-amido (4-guanidinobutano) (E64), inibidor irreversível de protease cisteínica e benzamidina, inibidor de tripsina e “trypsin-like”.

Para verificar o efeito sobre as proteases serínicas e cisteínicas os testes enzimáticos foram realizados conforme descrito acima. Porém, antes dos testes, o homogeneizado foi pré-incubado em banho-maria termostatizado (30°C) com os inibidores por 15 minutos.

## **2.7 - Cromatografia de troca iônica**

Alíquotas de 1 ml do homogeneizado do intestino médio de quarenta indivíduos de *P. nigrispinus* foram submetidas à cromatografia de troca iônica.

Foi usada a coluna HiTrap Q XL (Amersham Biosciences) de 5,0 ml. A coluna foi acoplada ao sistema AKTA Prime (Amersham Pharmacia Biotech) e previamente equilibrada com cinco volumes de coluna com o tampão a ser utilizado na eluição da enzima. A amostra aplicada na coluna foi eluída com o tampão específico para cada enzima com um gradiente de NaCl de 0 a 1 M com fluxo de 2,0 ml/min e as frações coletadas de 2 ml.

A amostra utilizada para a cromatografia de aminopeptidase foi eluída em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7,0), para a cromatografia de catepsina L utilizou-se o tampão Tris-HCl 0,20 mM contendo 1 mM de metilmetanosulfonato (MMTS) (pH 7,0) e para a cromatografia da  $\alpha$ -glicosidase utilizou-se o tampão Imidazol 10 mM (pH 6,0).

Para realizar a cromatografia para detecção de amilase foi necessário realizar antes uma pré-purificação. O homogeneizado foi tratado com etanol, tampão TAPS 400 mM, glicogênio e centrifugado a 9300 g por quatro vezes de cinco minutos cada e o sobrenadante foi separado do precipitado. As amostras foram dialisadas utilizando-se membranas com limite de exclusão de 12400 Da em tampão Tris-HCl 20 mM (pH 7,0) sob agitação por 16 horas. As amostras foram ensaiadas como descrito acima utilizando o amido como substrato. A amostra que apresentou maior atividade enzimática foi aplicada a coluna Hitrap Q e eluída com tampão imidazol 10 mM (pH 6,0).

A atividade, das frações obtidas de cada cromatografia, foi analisada para as enzimas conforme o descrito acima utilizando os substratos: LpNA, Z-FR-MCA, pNP $\alpha$ Glc e amido.

## **2.8 – Cromatografia de filtração em gel**

As frações eluídas da HiTrap Q com maior atividade sobre os substratos específicos de cada enzima foram reunidas. Esse material foi concentrado de um volume inicial de 1,5 ml para

aproximadamente 500 µl com o auxílio do concentrador de amostras Amicon Ultra (Millipore). Esta amostra concentrada foi então aplicada numa coluna de filtração em gel Superdex 200 10/30 (Pharmacia) para detectar aminopeptidase e Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia) para detectar amilase, catepsina L e  $\alpha$ -glicosidase. O fluxo utilizado foi de 0,5 ml/min e as frações coletadas foram de 0,4 ml. A coluna foi previamente equilibrada com dois volumes (50 mL) de tampão antes das cromatografias.

A amostra utilizada para a cromatografia de aminopeptidase foi eluída em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7,0). Para a cromatografia de catepsina L utilizou-se o tampão Tris-HCl 0,20 mM contendo 1 mM de MMTS (pH 7,0) e para a cromatografia da amilase e  $\alpha$ -glicosidase utilizou-se o tampão Imidazol 10 mM (pH 6,0).

A atividade das enzimas analisadas foram ensaiadas nas frações obtidas da filtração em gel de acordo com o procedimento descrito acima, utilizando os substratos LpNA, Z-FR-MCA, pNP $\alpha$ Glc e amido.

O volume de eluição das frações com atividade possibilita obtermos o valor da massa molecular através de uma curva de calibração, obtida pelas cromatografias de amostras contendo proteínas com massa molecular conhecida que foram aplicadas as colunas.

Para determinar a massa molecular das enzimas estudadas, utilizou-se como marcadores:  $\beta$ -amilase (200 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (29 kDa) e citocromo C (12,4 kDa). A coluna foi calibrada com “blue dextran” (2000 kDa).

## **2.9 - Determinação do efeito de diferentes pH sobre a atividade das enzimas semi purificadas**

A determinação do efeito do pH foi realizada utilizando as frações obtidas da filtração em gel. Foram utilizados os tampões citrato-fosfato 50 mM para pH entre 2,5 e 7,0 e o Tris-HCl 50 mM para pH entre 7,0 e 9,5, ambos contendo 0,2 M de NaCl.

Os ensaios foram realizados a 30° C e os intervalos de pH variaram em 0,2 unidades.

Para determinar o pH ótimo da catepsina L adicionou-se aos tampões 3 mM de cisteína e 3 mM de EDTA.

### **2.10 - Estudos cinéticos**

Os ensaios cinéticos foram realizados usando as frações obtidas na filtração em gel com maior atividade. Para a determinação da constante de Michaelis ( $K_m$ ), a velocidade de hidrólise foi determinada usando pelo menos dez concentrações diferentes dos substratos específicos para cada enzima. Os substratos utilizados foram LpNA (0,95 mM) em tampão citrato fosfato 50 mM (pH 6,0), Z-FR-MCA 300  $\mu$ M pico 1 e 100  $\mu$ M pico 2 em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 6,0) contendo cisteína 3 mM e EDTA 3 mM, pNP $\alpha$ Glc (30 mM) em tampão carbobato-bicarbonato contendo SDS e amido (1%) em citrato fosfato 50 mM (pH 6,0).

As velocidades de hidrólise dos diferentes substratos foram determinadas e usadas para traçar o gráfico de Lineweaver-Burk com o programa de computador Enzfitter (Elsevier Biosoft, Cambridge, UK) usado para determinar a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ).

### **2.11 - Atividades das enzimas em gel de poliacrilamida em condições nativas (PAGE) e sua correlação com o Western blotting**

Amostras dos intestinos médio de *P. nigrispinus* foram submetidas à separação eletroforética utilizando um equipamento Mini Protean II (Bio Rad, EUA) em placa fina (1 mm) em condições nativas. Foi usado gel de corrida na concentração de 12% de poliacrilamida para catepsina L e  $\alpha$ -glicosidase e na concentração de 7,5% para amilase e aminopeptidase e o gel de empilhamento na concentração de 4 % para todas as enzimas.

As eletroforeses foram realizadas a 100 V a 4°C por duas horas. Após este período, o gel foi dividido em duas partes, uma para monitorar a atividade enzimática e as proteínas da

outra parte foram transferidas para membrana de nitrocelulose para a detecção imunológica das enzimas.

O gel foi incubado a 30°C por um minuto utilizando como reagente os substratos fluorogênicos: Z-FR-MCA 0,1 mM para monitorar a atividade da catepsina, 4-metilumbeliferil  $\alpha$ -D glucosídeo (MU $\alpha$ Glu) 2 mM para monitorar a atividade de  $\alpha$ -glicosidase por dois minutos e o L-leucina- 7-amino-4-metil-coumarina (Leu-MCA) 100  $\mu$ M por dois minutos para monitorar a atividade de aminopeptidase. O produto da atividade enzimática foi evidenciado em transiluminador de UV (Transilluminator 2040 EV – Stratagene) e fotografado.

Para monitorar a atividade de amilase utilizou-se gel de poliacrilamida na concentração de 10% sem SDS contendo 1% de amido. Foi feito um sanduíche com o gel de amido e o gel de poliacrilamida e deixado em banho termostatizado (30°C) por 30 minutos. O gel de atividade foi imerso numa solução de 0,15% de cloreto 2,3,5 trifenil tetrazolio (TTC) em 1 M de NaOH e levado ao microondas para ferver até aparecer a banda.

O método de transferência de proteínas para membranas de nitrocelulose foi realizado conforme Towbin et al. (1979) com o sistema de proteínas semi-seco (Bio Rad) na presença de tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20%, nas condições indicadas fabricante do aparelho. A eficácia da transferência das proteínas foi monitorada por marcadores de peso molecular pré-corados (Bio Rad) aplicados na eletroforese.

As membranas foram bloqueadas após a transferência com solução 5% (p/v) de leite em pó desnatado dissolvido em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4 contendo NaCl 0,15 M (TBS) e em seguida lavadas com TBS contendo Tween-20 0,05% (v/v) (TBST) e incubadas por duas horas com o anticorpo das enzimas ensaiadas (1:200) em TBS-T. As membranas foram lavadas novamente com TBST e incubadas por duas horas com solução de anti-IgG de coelho acoplada a peroxidase diluída 1:1000 em TBST. As membranas foram lavadas em TBS e reveladas com uma solução de 20 mg de 4-cloro-1-naftol dissolvido em 4 ml de metanol, à qual foram

adicionados 20 ml de TBS aquecido a 37<sup>0</sup> C e 15 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, até que as bandas escuras foram visualizadas.

Os anticorpos anti amilase, catepsina L, aminopeptidase e α-glicosidase foram produzidos em coelhos e fornecidos pelo Laboratório de Bioquímica de Insetos da Universidade de São Paulo.

Os géis de atividade e o Western blotting foram utilizados para confirmar a eficácia destes anticorpos às enzimas de *P. nigrispinus* por serem anticorpos heterólogos. Os anticorpos anti aminopeptidase, amilase, catepsina lisossomal e digestiva foram obtidos de *T. molitor*, e o anticorpo anti α-glicosidase de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae).

### **2.12 - Microscopia eletrônica de transmissão**

Os indivíduos de *P. nigrispinus* foram imobilizados a frio por cinco minutos, em seguida, dissecados sob esteriomicroscópio tendo seu trato digestivo removido em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) contendo 0,2 M de sacarose. A seguir, o intestino médio foi dividido nas porções anterior, média e posterior, e transferido para glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) e ácido pícrico por duas horas.

A seguir, os fragmentos do intestino médio foram lavados com o tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) contendo 0,2 M de sacarose e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão por duas horas. Depois de lavado duas vezes no tampão, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de etanol (70%-100%), em seguida, embebidos em solução de resina LR White e álcool 70% (2:1) por uma hora e embebidas em resina pura por uma hora. Posteriormente, as amostras foram embebidas em resina pura e deixadas por 16 horas em temperatura ambiente, seguindo-se da polimerização em cápsulas de gelatina (Eletron Microscopy Sciences) a 60°C por 24 horas.

Seções ultrafinas obtidas em ultramicrotomo com navalha de diamante foram colocadas em grades de cobre e contrastadas por 20 minutos com acetato de uranila aquosa 1% e citrato de

chumbo (Reynolds, 1963) por mais oito minutos. As amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 no núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

### **2.13 - Imunocitoquímica**

Para imunolocalizar as enzimas estudadas em nível ultra-estrutural, os indivíduos de *P. nigrispinus* foram imobilizados a frio, em seguida, dissecados sob esteriomicroscópio tendo seu trato digestivo removido em solução salina para insetos. A seguir, o intestino médio foi dividido nas porções anterior, média e posterior, e fixado em glutaraldeído 0,1%, formol 4% em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,2) por 30 minutos.

A seguir, os fragmentos do intestino médio foram lavados com o tampão cacodilato de sódio 0,1 M e desidratadas em álcool 70% duas vezes por 30 minutos cada. Em seguida, as amostras foram embebidas em solução de resina LR White e álcool 70% (2:1) por uma hora e em resina pura por mais uma hora. Posteriormente, as amostras foram embebidas em resina pura e deixadas por 16 horas em temperatura ambiente, seguindo-se da polimerização em cápsulas de gelatina (Eletron Microscopy Sciences) a 60°C por 24 horas.

Seções ultrafinas, cortadas em ultramicrotomo com navalha de diamante, foram colocadas em grades de níquel. As grades foram umedecidas com TBS (0,2 M, pH 7,2), lavadas com TBS contendo albumina sérica bovina (TBSB) e neutralizadas com soro normal de coelho (1:30) em TBST 0,1%. Em seguida as amostras foram incubadas com anticorpos primários das enzimas (1:1000) em TBSB por duas horas em temperatura ambiente. Em seguida as grades foram lavadas com TBSB e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com ouro coloidal (10 nm) diluído em TBS (1:30) por uma hora. Posteriormente, as grades foram lavadas em TBSB, TBS e por fim em água ultra-pura. Cada grade foi incubada em um anticorpo primário específico. Os anticorpos utilizados foram anti: amilase, aminopeptidase, catepsina lisossomal, catepsina digestiva e  $\alpha$ -glicosidase.

As amostras foram observadas e fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109 no núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

#### **2.14 - Imunofluorescência**

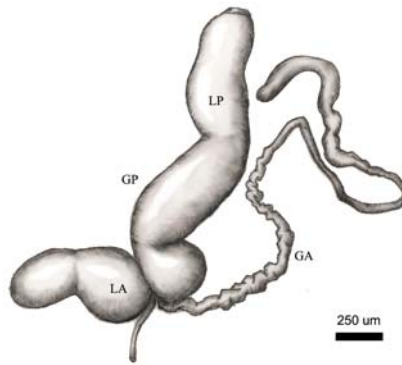
Os indivíduos de *P. nigrispinus* foram imobilizados a frio, em seguida, dissecados sob esteriomicroscópio e as regiões do seu intestino foram removidas e fixadas por 16 horas a 4°C em fixador Zamboni (Stefanini et al. 1967). As amostras foram lavadas em PBS e embebidas em “Tissue Freezing Medium” (Jung), seccionadas a 14 µm no criostato Leica CM1850. As amostras foram colocadas em lâminas cobertas com solução de polilisina (Sigma), hidratadas com PBST 1% por duas horas, lavadas com PBS e incubadas com anticorpos primários (1:1000) em PBS contendo BSA 0,1% por 16 horas a 4°C. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS e incubados com anticorpo secundário (FITC, Sigma) diluído 1:100 em PBS contendo BSA 0,1% por uma hora em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados com PBS e contracorados com iodeto de propídeo por uma hora. Em seguida, lavados com PBS e montados com sacarose 50% e examinados no microscópio confocal a laser Zeiss LSM 510 Meta.

### **3 – Resultados**

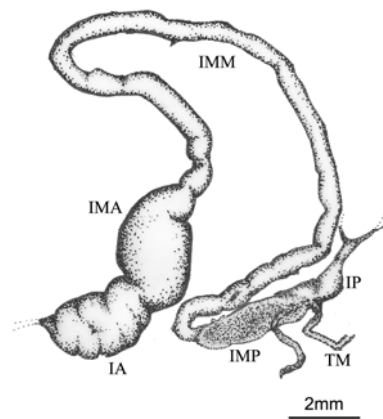
#### **3.1. – Morfologia das glândulas salivares e do trato digestivo**

O complexo salivar de *P. nigrispinus* é formado por um par de glândulas salivares principais com dois lobos: anterior e posterior e um par de glândulas acessórias tubulares (Figura 1).

O intestino médio de *P. nigrispinus* é morfológicamente dividido em três regiões: anterior com formato de uma bolsa dilatada, médio caracterizado por um tubo longo ligado ao posterior que também é dilatado (Figura 2).



**Figura 1:** Desenho esquemático do complexo salivar de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) mostrando a glândula principal (GP) dividida em lobo anterior (LA) e lobo posterior (LP) e a glândula acessória (GA).



**Figura 2:** Desenho esquemático do trato digestivo de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) evidenciando suas divisões. IA: intestino anterior; IMA: intestino médio anterior; IMM: intestino médio mediano; IMP: intestino médio posterior; IP: intestino posterior; TM: túbulos de Malpighi.

### 3.2 – pH das glândulas salivares e do intestino médio

O pH da glândula salivar foi de  $6,0 \pm 0,09$  e do intestino médio de *P. nigrispinus* de  $5,6 \pm 0,1$  na região anterior,  $5,7 \pm 0,1$  na mediana e  $5,8 \pm 0,1$  na posterior.

### 3.3 – Atividades das enzimas das glândulas salivares e do intestino médio

A falta de atividades de tripsina e quimotripsina no intestino médio de *P. nigrispinus* indica que o mesmo não apresenta proteases serínicas. Por outro lado, as enzimas amilase, aminopeptidase, catepsina L e  $\alpha$ -glicosidase apresentaram atividade.

A presença de quimotripsina não foi detectada nas glândulas salivares, mas observou-se atividade específica de tripsina (7 U/mg).

A atividade específica das enzimas no intestino médio foram: amilase 21 mU/mg, aminopeptidase 3 mU/mg, catepsina L 3800 U/mg e  $\alpha$ -glicosidase 147 mU/mg de proteína (Tabela 1).

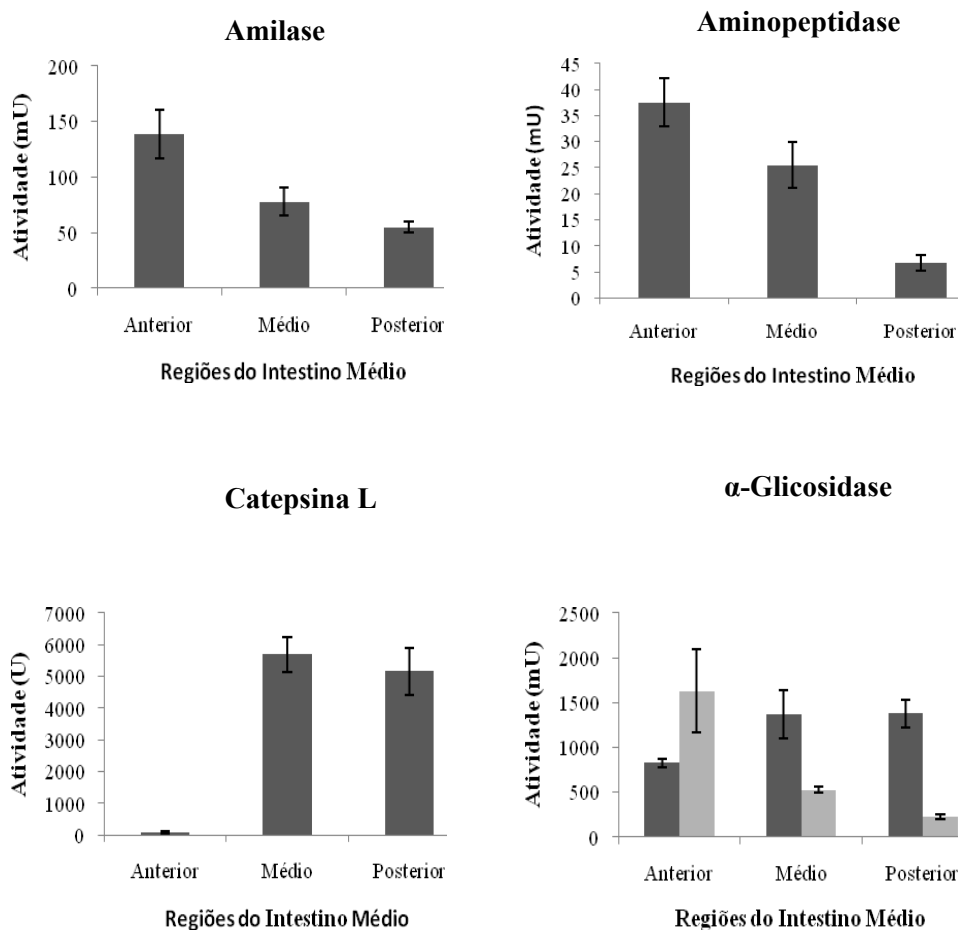
**Tabela 1:** Atividade enzimática total e específica por animal das enzimas digestivas das glândulas salivares e do intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae).

Enzima	Substrato	Glândulas Salivares		Intestino Médio	
		Atividade Total	Atividade Específica	Atividade Total	Atividade Específica
Amilase	Amido	0,23±0,03 mU	0,01±0,001mU/μg	360±70 mU	20±4 mU/μg
Aminopectidase	LpNA	4±2 mU	0,19±0,08 mU/μg	50±4 mU	3,0±0,5 mU/μg
Catepsina L	Z-FR-MCA	370±40 U	16±2 U/μg	121000±16000 U	3800±290 U/μg
α-glicosidase	pNPαGlc	6±2 mU	0,27±0,12 mU/μg	2300±200 mU	150±18 mU/μg
Tripsina	Z-FR-MCA	178±12 U	7±0,3 U/μg	-	-
Quimiotripsina	Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-MCA	-	-	-	-

Os valores são média e desvio padrão calculados de ensaios realizados em seis diferentes preparações obtidas de 10 animais cada.

A atividade enzimática de amilase e aminopeptidase do intestino médio de *P. nigrispinus* foi mostrada ao longo de todo o ventrículo, porém com maior valor na região anterior (Figura 3), sendo que a atividade de aminopeptidase na região posterior foi menor que nas demais regiões (Figura 3). A atividade enzimática da catepsina L foi maior na região mediana, enquanto que na anterior sua atividade foi praticamente nula (Figura 3).

A atividade enzimática da  $\alpha$ -glicosidase foi analisada no sobrenadante e no precipitado. As atividades encontradas foram diferentes para as duas amostras. Na fração solúvel houve maior atividade na região mediana e na posterior (Figura 3), enquanto que no sedimento foi observada uma maior atividade na região anterior e atividades mais baixas nas outras regiões (Figura 3).



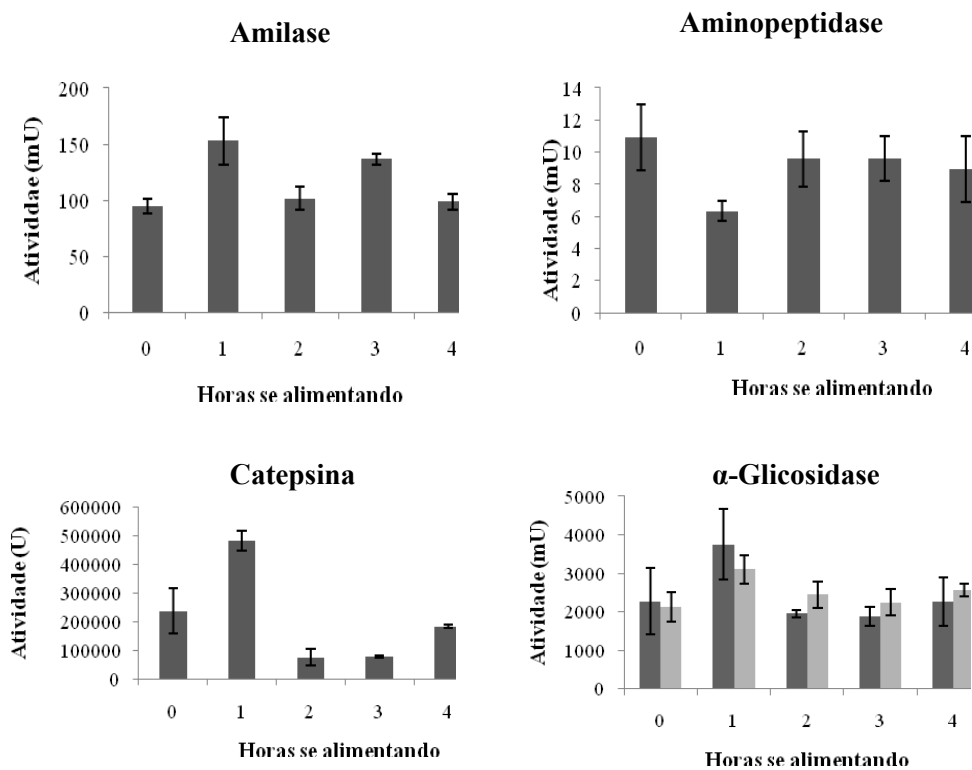
**Figura 3:** Distribuição das principais enzimas digestivas nas regiões anterior, média e posterior do intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae).  $\alpha$ -Glicosidase sobrenadante ■ e sedimento▒.

Os substratos específicos mostraram o perfil da atividade enzimática de cada enzima de acordo com o período de alimentação com variações evidentes quando *P. nigrispinus* está na primeira hora de alimentação (Figura 4).

A atividade da amilase foi maior na primeira hora de alimentação enquanto a atividade de aminopeptidase foi menor neste mesmo período (Figura 4).

A atividade da catepsina L variou entre o estado de jejum e das horas de alimentação. Esta enzima apresentou pico de atividade quando *P. nigrispinus* estava se alimentando há uma hora, com queda na atividade com duas e três horas de alimentação e novo aumento na atividade com quatro horas de alimentação (Figura 4).

As atividades da  $\alpha$ -glicosidase nas frações solúvel e do precipitado foram semelhantes (Figuras 4). No entanto, a atividade foi maior no precipitado para insetos com uma hora de alimentação (Figura 4). Na fração solúvel, no intervalo de jejum, duas, três e quatro horas as atividades de  $\alpha$ -glicosidase foram semelhantes, porém aumentou após uma hora de alimentação (Figura 4).

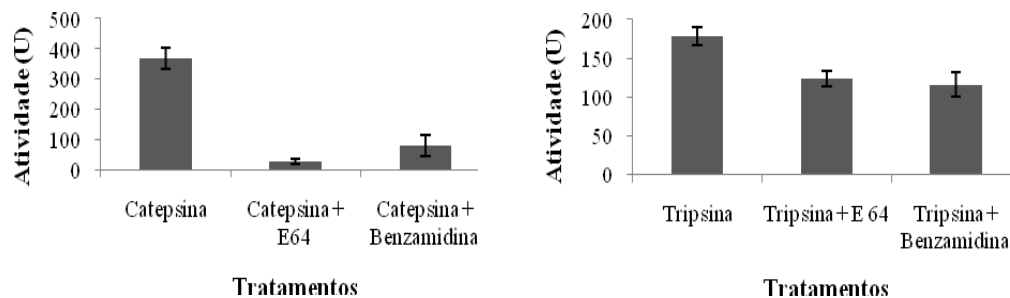


**Figura 4:** Atividade das enzimas estudadas no intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) em jejum (0) e em diferentes horas após o início de sua alimentação. α-glicosidase: ■ sobrenadante e ■ sedimento.

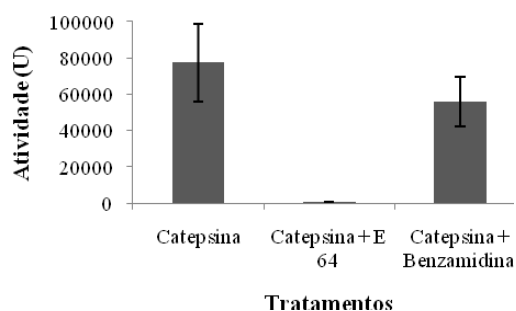
### 3.4 - Efeito de inibidores na atividade proteolítica

A inibição da atividade de proteases nas glândulas salivares pelos inibidores E 64 e benzamidina variou com a enzima analisada. O E 64 inibiu em 93% a atividade e a benzamidina em 77% a atividade da catepsina (Figura 5). Para a atividade de tripsina, a inibição pelo E 64 e pela benzamidina foi de 32% (Figura 5).

No intestino médio, a inibição da atividade de proteases foi de 99% para o inibidor de proteases cisteínicas (E-64) e de 30% para o de proteases serinínicas (benzamidina) (Figura 6).



**Figura 5:** Atividade de proteases serínicas e cisteínicas nas glândulas salivares de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) na presença dos inibidores E64 e benzamidina em relação aos controles (catepsina L e tripsina).



**Figura 6:** Atividade da catepsina no intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) na presença dos inibidores E64 e benzamidina.

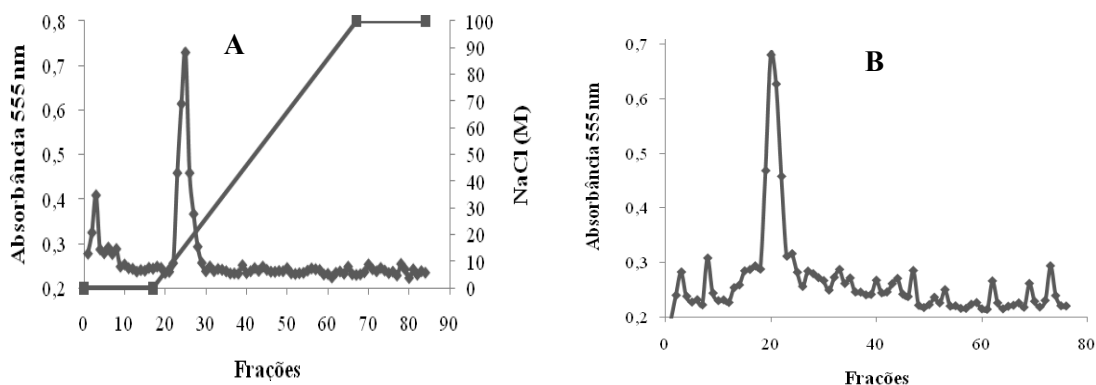
### 3.5 – Purificação de proteínas

O sobrenadante do homogeneizado do intestino médio do *P. nigrispinus* (40 animais) foi utilizado para a purificação das enzimas em estudo.

#### 3.5.1 – Amilase

Para a separação da amilase o sobrenadante foi aplicado em uma coluna de troca iônica HitrapQ. A atividade desta enzima foi monitorada e observamos um pico de atividade na fração 25, ou seja esta proteína foi eluída da coluna durante o gradiente com 200 mM de NaCl (Figura

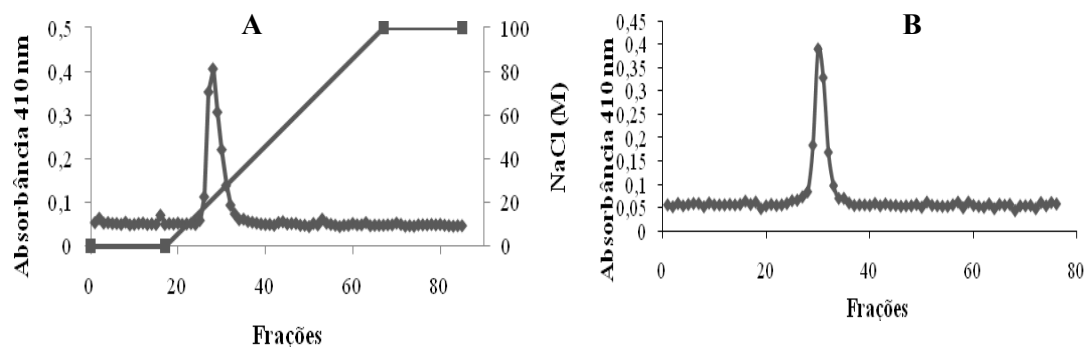
7). Esta fração 25 foi recromatografada na Superdex 75, uma coluna de filtração em gel e com pico de atividade na fração 20 (Figura 7), apresentando massa molecular de 43 kDa.



**Figura 7:** Perfil cromatográfico para amilase do intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). (A) Hitrap Q com um gradiente de NaCl de 0 a 1,0 M. (B) Gel filtração em Superdex 75. O imidazol 10 mM, pH 6,0 foi o tampão utilizado nas cromatografias. A atividade enzimática foi determinada usando o substrato amido em 555 nm.

### 3.5.2 – Aminopeptidase

Para a separação de aminopeptidase utilizamos a coluna HiTrap Q e a aminopeptidase foi eluída da coluna durante o gradiente de NaCl na concentração de 200 mM e a fração de maior atividade foi a 28 (Figura 8), a qual foi submetida a uma filtração em gel na coluna Superdex 200 apresentando pico de atividade na fração 30 (Figura 7) representando uma massa molecular de 125 kDa.

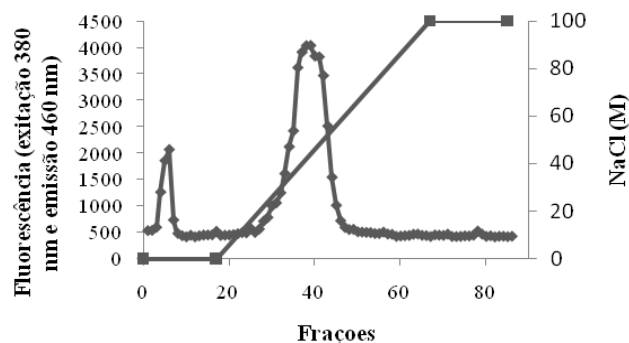


**Figura 8:** Perfil cromatográfico para aminopeptidase do intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). (A) A fração solúvel do homogeneizado do intestino aplicada em uma coluna Hitrap Q com um gradiente de NaCl de 0 a 1,0 M em tampão Tris-Hcl 0,1 M pH 7,0. (B) Filtração em gel utilizando uma Superdex 200 no mesmo tampão da cromatografia anterior. A atividade enzimática foi determinada para o substrato LpNA em 410 nm.

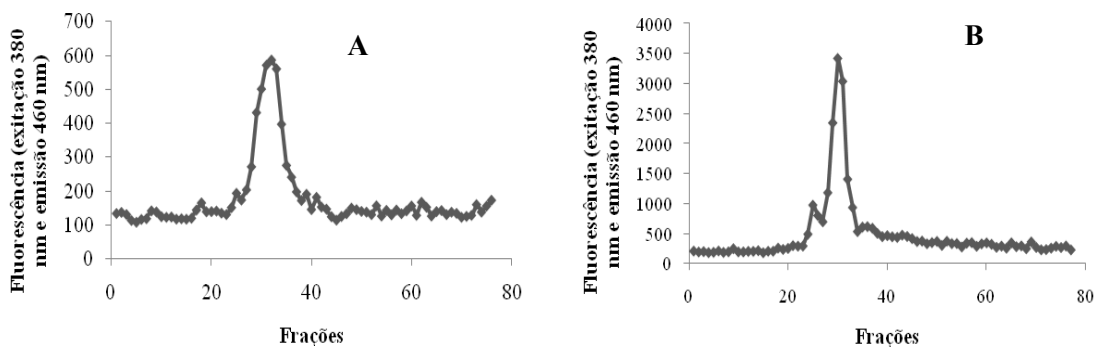
### 3.5.3 – Catepsina L

A enzima catepsina L foi separada em uma coluna HiTrap Q e apresentou dois picos de atividade, o da fração seis correspondeu ao primeiro pico, e o segundo foi eluído da coluna durante o gradiente na concentração de 400 mM e coletado nas frações 38 e 39 (Figura 9).

Os dois picos de catepsina L encontrados foram concentrados, separadamente, e submetidos à cromatografia de filtração em gel mostrando que o primeiro pico de atividade foi composto por, apenas, uma enzima (Figura 10) com massa molecular de 14 kDa. O segundo pico representou duas isoformas da enzima (Figura 10) e a massa molecular do pico principal foi de 17 kDa.



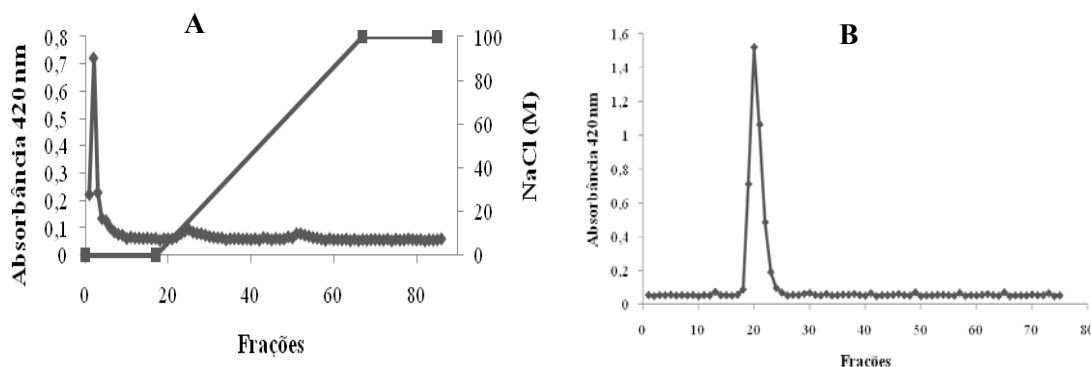
**Figura 9:** Perfil cromatográfico para catepsina L. Cromatografia HiTrap Q com gradiente de NaCl de 0 a 1,0 M em tampão Tris-Hcl 20 mM contendo 1 mM de MMTS pH 7,0. A atividade enzimática foi determinada para o substrato Z-FR-MCA em excitação 380 nm e emissão 460 nm.



**Figura 10:** Perfil cromatográfico para a catepsina L em coluna de filtração em gel Superdex 75. Foi utilizado o tampão Tris-Hcl 20 mM contendo 1 mM de MMTS pH 7,0. (A) primeiro pico da coluna HiTrap Q, fração 6 e (B) segundo pico, fração 38 e 39. A atividade enzimática foi determinada para o substrato Z-FR-MCA em excitação a 380 nm e emissão a 460 nm.

### 3.5.4 – $\alpha$ -Glicosidase solúvel

A  $\alpha$ -glicosidase foi separada aplicando-se o sobrenadante na coluna HiTrap Q e sua atividade foi detectada na fração número 2, ou seja a enzima não teve interação com a coluna e saiu no “void” (Figura 11). Em seguida esta fração foi aplicada numa filtração em gel e sua atividade foi detectada na fração 20 (Figura 11) com massa molecular de 90 kDa.



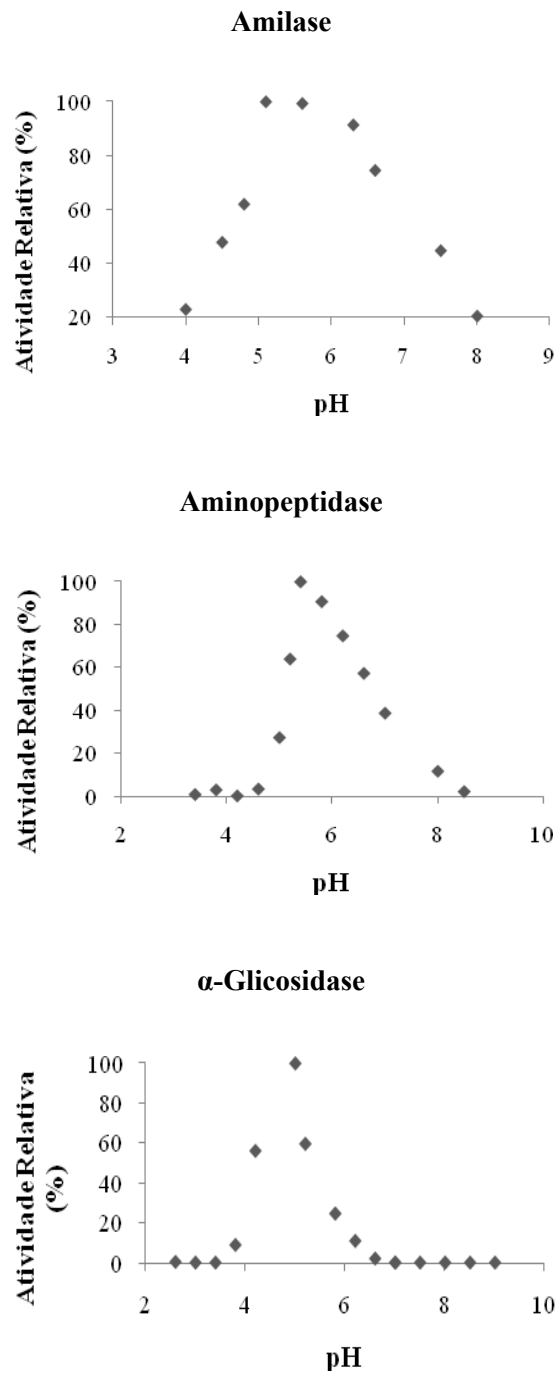
**Figura 11:** Perfil cromatográfico para  $\alpha$ -glicosidase no intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). (A) Hitrap Q com gradiente de NaCl de 0 a 1,0 M. (B) Filtração em gel com Superdex 75. Cromatografia em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,0. O tampão utilizados nas cromatografias foi imidazol 10 mM, pH 6,0. A atividade enzimática foi determinada para o substrato pNP $\alpha$ Glc em 420 nm.

### 3.6 – Determinação do pH ótimo e $K_m$ aparente das enzimas estudadas no intestino médio de *P. nigrispinus*

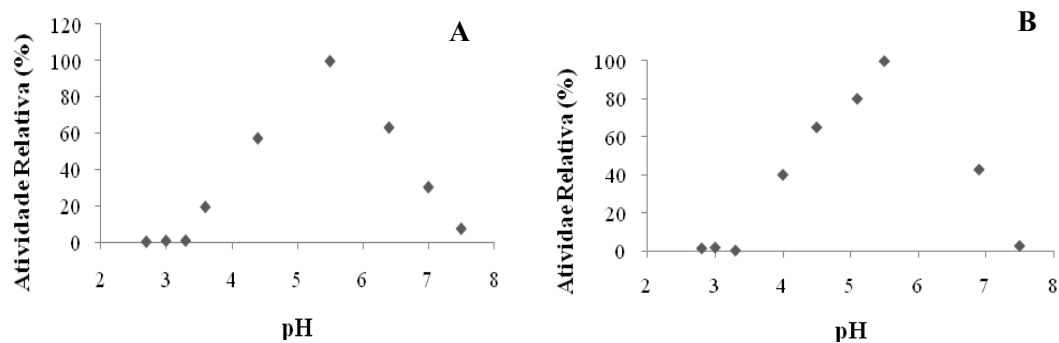
As enzimas amilase, aminopeptidase e  $\alpha$ -glicosidase apresentaram atividade máxima em pH 5,1; 5,4 e 5,0 respectivamente (Figura 12).

Os valores aparentes de  $K_m$  para amilase, aminopeptidase e  $\alpha$ -glicosidase foram 0,1%; 0,03 e 5 mM, respectivamente.

O pH ótimo da atividade de catepsina L de *P. nigrispinus* foi de 5,5 nos dois picos obtidos na cromatografia de filtração em gel (Figura 13) e os valores aparentes de  $K_m$  foram de 32 e 11  $\mu$ M para o primeiro e segundo picos de atividade, respectivamente.



**Figura 12:** Efeito do pH na taxa de hidrólise dos substratos amido, LpNA e pNP $\alpha$ Glc pelas enzimas amilase, aminopeptidase e  $\alpha$ -glicosidase do intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). As frações foram obtidas da cromatografia de filtração em gel e os pontos do ensaio de triplicatas e os resultados estão em função da maior atividade.



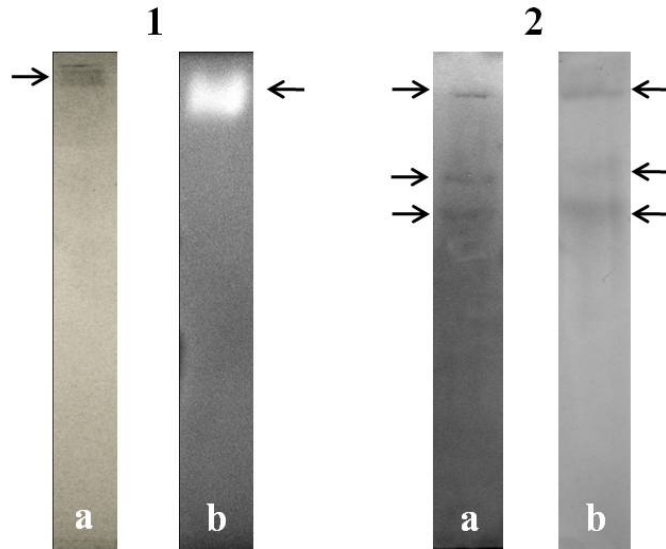
**Figura 13:** Efeito do pH na taxa de hidrólise do Z-FR-MCA pela catpsina L do intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Os pontos foram obtidos no ensaio de triplicatas e os resultados estão em função da maior atividade. As frações vieram da cromatografia de filtração em gel. (A) pico um; (B) pico dois.

### 3.7 – Atividades das enzimas no PAGE e sua correlação com o Western blotting

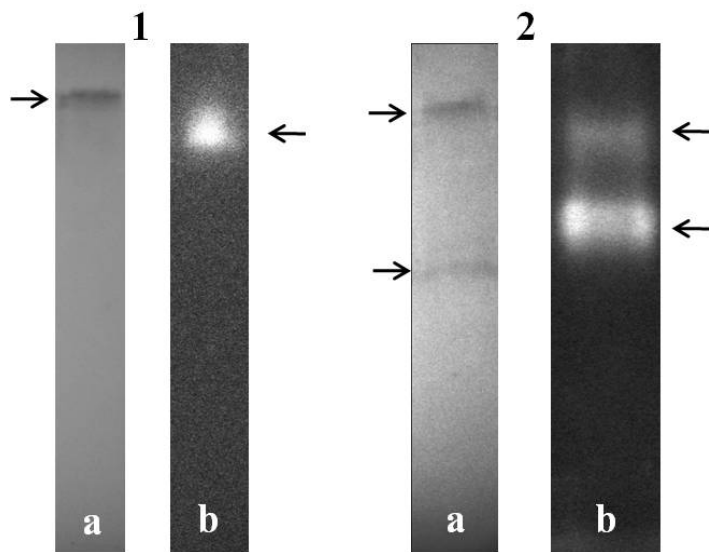
As análises de Western blotting associadas ao gel nativo do sobrenadante do intestino médio de *P. nigrispinus* comprovaram a atividade das enzimas analisadas neste inseto.

Os anticorpos anti-aminopeptidase e anti- $\alpha$ -glicosidase (Figura 14 e 15) reconheceram uma banda no Western blotting, enquanto o antissoro anti-amilase reconheceu (Figura 14) três bandas e o anti-catepsina L duas bandas, sendo uma mais intensa (Figura 15).

As bandas obtidas do PAGE correspondem as do Western blotting em todas as enzimas analisadas.



**Figura 14:** Gel nativo de poliacrilamida 7,5% do homogeneizado do intestino médio de *Podisus nigripinus* (Heteroptera: Pentatomidae). (1a) incubado com anticorpo anti-aminopeptidase (1:200); (1b) atividade da aminopeptidase. (2 a) incubado com anticorpo anti-amilase (1:200); (2b) atividade da amilase.



**Figura 15:** Gel nativo de poliacrilamida 12% do homogeneizado do intestino médio de *Podisus nigripinus* (Heteroptera: Pentatomidae). (1a) incubado com anticorpo anti- $\alpha$ -glicosidase (1:200); (b) atividade de  $\alpha$ -glicosidase. (2a) incubado com anticorpo anti-catepsina L (1:200); (b) atividade de catepsina L.

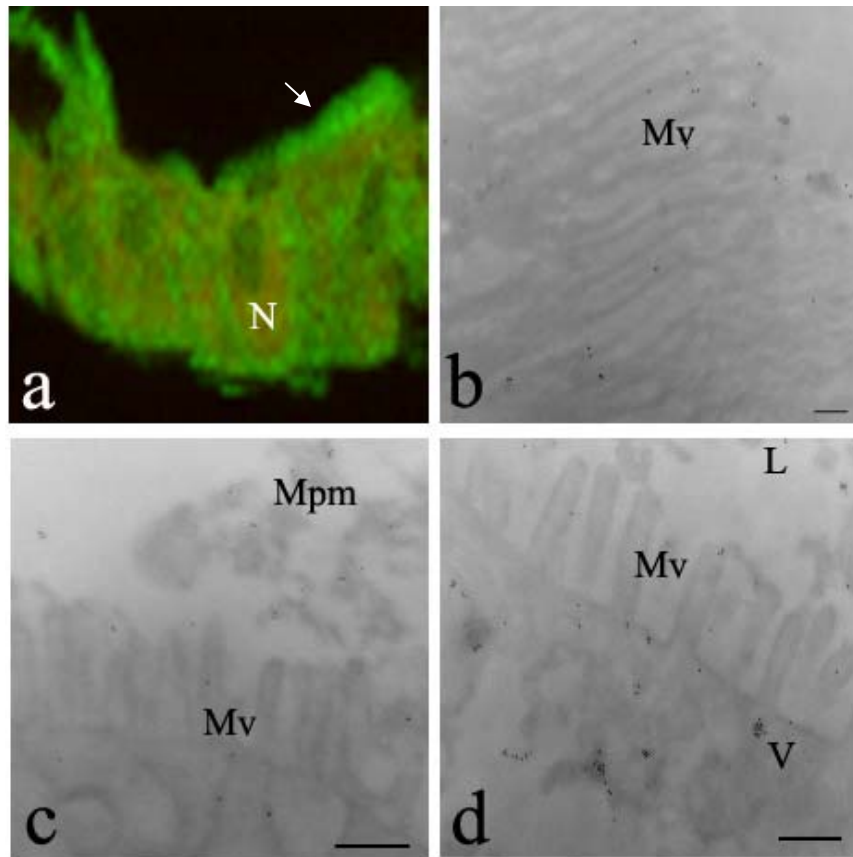
### 3.8 – Imunolocalização das enzimas do intestino médio de *Podisus nigrispinus*

A amilase foi imunolocalizada nas três regiões do intestino médio de *P. nigrispinus*. A enzima foi localizada no interior de vesículas de secreção que estão presentes no ápice celular, nas microvilosidades e no lúmen do intestino (Figura 16).

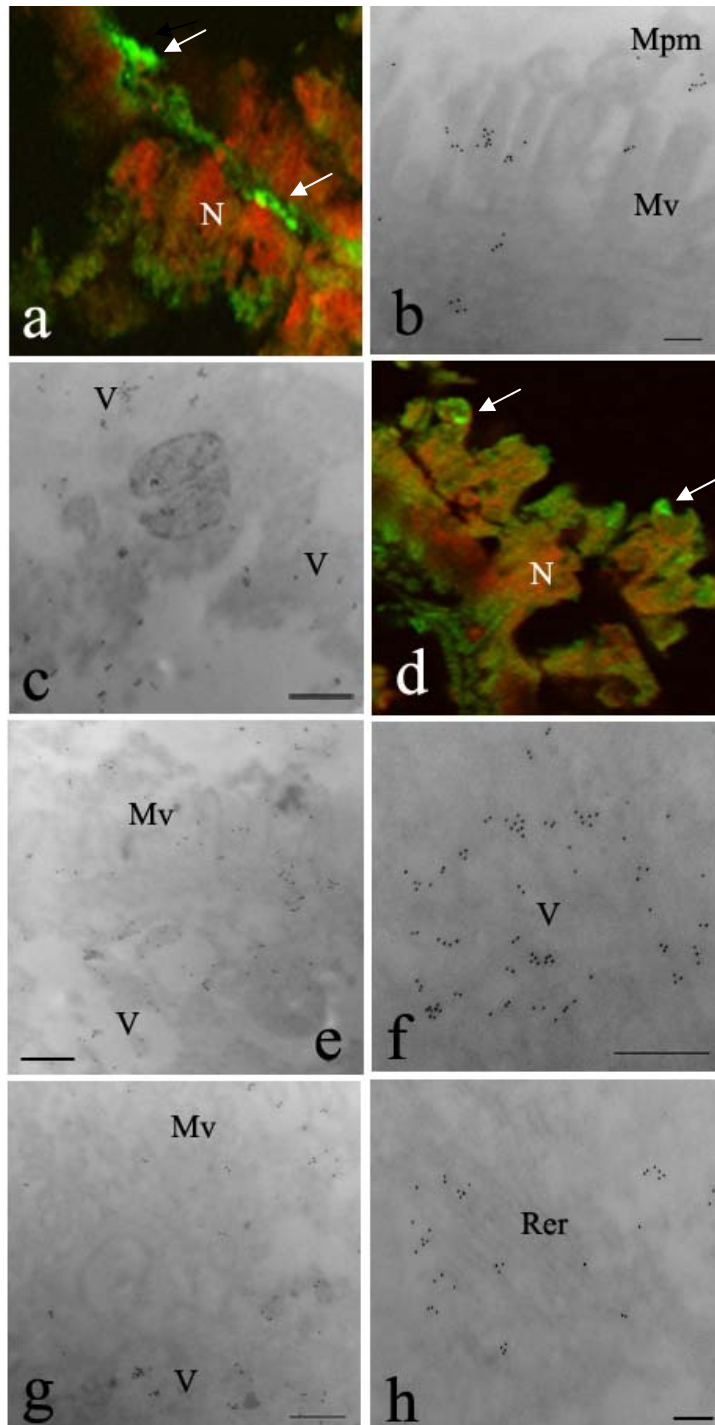
A aminopeptidase foi imunolocalizada nas três regiões do intestino médio e está presente no interior de vesículas distribuídas na região apical e média das células digestivas, mas também foi encontrada nas microvilosidades, no lúmen e na membrana perimicrovilar. As regiões média e posterior do intestino médio apresentaram maior quantidade de vesículas contendo aminopeptidase próximo a região do retículo endoplasmático rugoso (Figura 17).

Anticorpos para catepsina digestiva e lisossomal foram utilizados na imunolocalização e estiveram presentes principalmente na região mediana e posterior do intestino médio de *P. nigrispinus* tanto no interior de vesículas como nas microvilosidades e lúmen, sendo que na região anterior foi identificada quantidade insignificante das catepsinas (Figura 18).

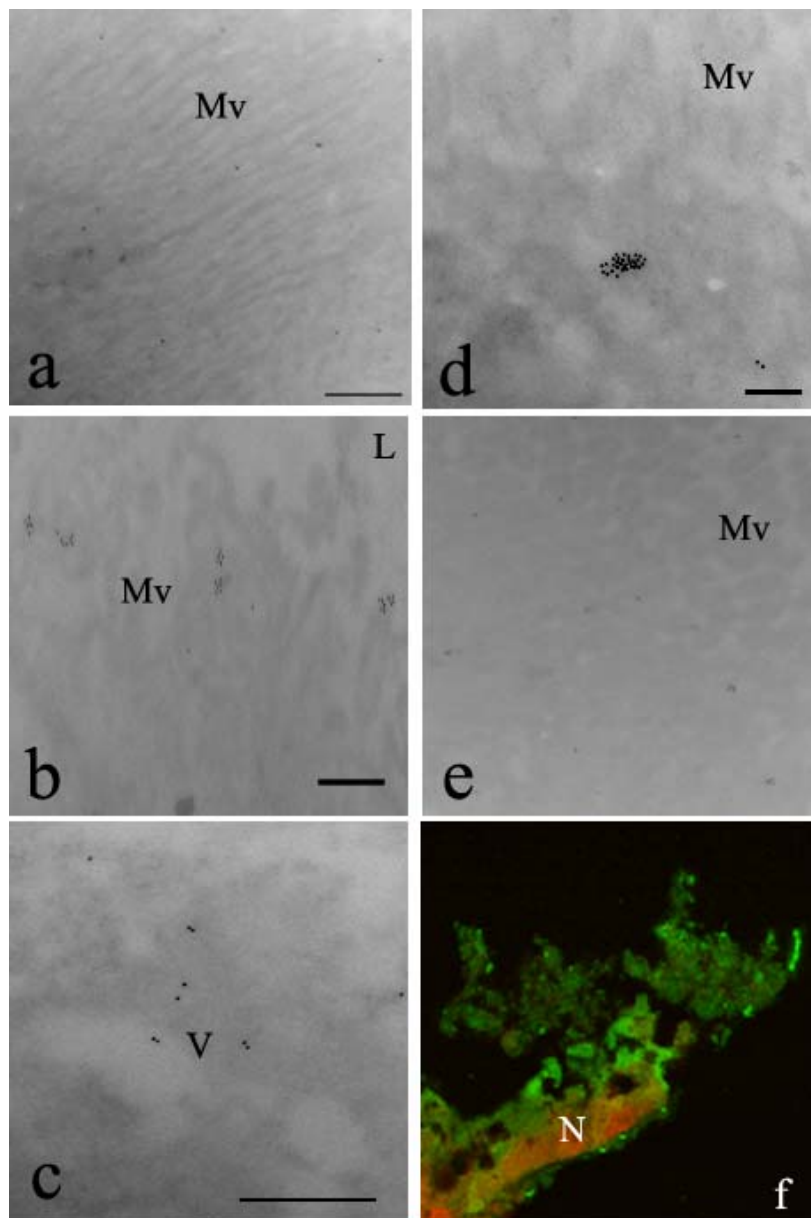
A  $\alpha$ -glicosidase foi imunolocalizada nas três regiões do intestino médio, porém com menor marcação na região mediana. Na região anterior do intestino médio ela esteve presente nas microvilosidades e principalmente no lúmen. A região posterior possui algumas vesículas marcadas no ápice e próximas ao retículo endoplasmático rugoso (Figura 19).



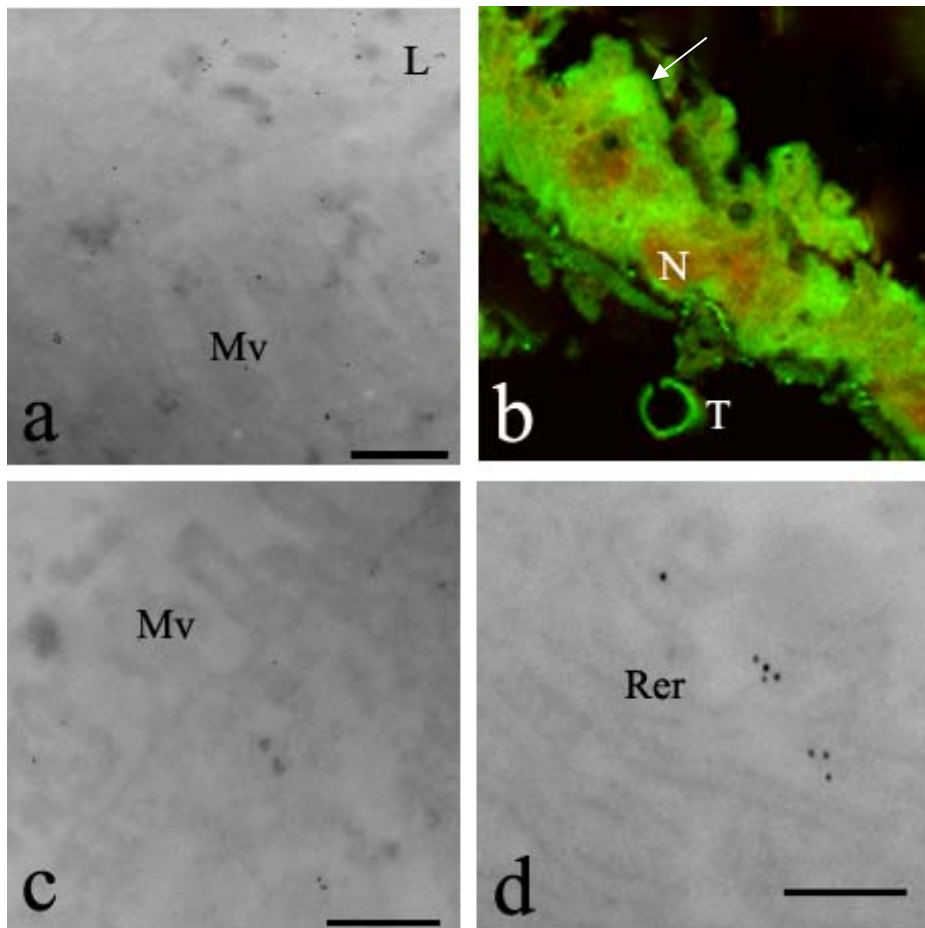
**Figura 16:** Imunolocalização da amilase no intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). (a) imunoflorescência na região anterior (seta); micrografia eletrônica da (b) região anterior; (c) região mediana; (d) região posterior. Mv, microvilosidades; Mpm, membrana perimicrovilar; N, núcleo; L, lúmen; setas, vesículas. Barras = 1  $\mu$ m.



**Figura 17:** Imunolocalização da aminopeptidase no intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). (a) imunofluorescência na região anterior (seta); micrografia eletrônica da região anterior (b, c); (d) imunofluorescência na região mediana (seta); micrografia eletrônica da região mediana (e, f); região posterior (g, h). Mv, microvilosidades; Mpm, membrana perimicrovilar, V, vesícula; Rer, retículo endoplasmático rugoso; L, lúmen. Barras = 500 nm (b, f); 1  $\mu$ m (d, e, f, g).



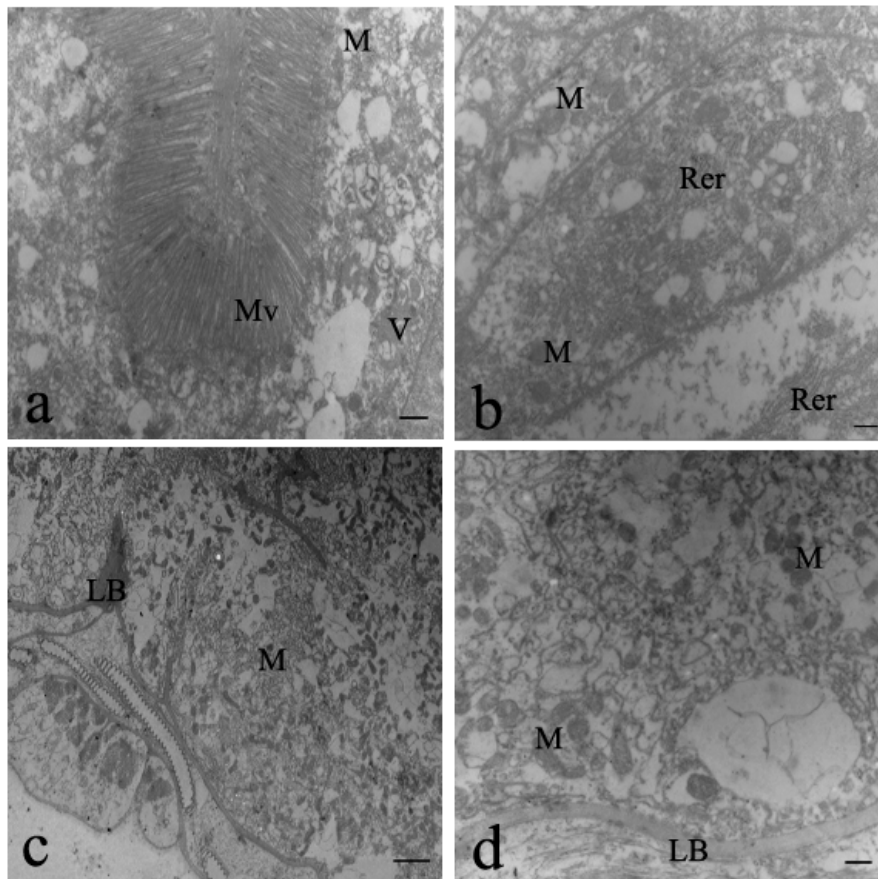
**Figura 18:** Imunolocalização da catepsina L no intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Micrografia eletrônica da catepsina lissossomal (a) porção anterior; (b) porção mediana; (c) porção posterior; (e) catepsina digestiva na região mediana; (f) imunofluorescência da catepsina digestiva na região mediana (seta). Mv, microvilosidades; V, vesícula de secreção; Barras = 1  $\mu$ m.



**Figura 19:** Imunolocalização da  $\alpha$ -glicosidase no intestino médio de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera; Pentatomidae). (a) micrografia eletrônica da região anterior; (b) imunofluorescência da  $\alpha$ -glicosidase na região mediana; (c) micrografia eletrônica da região mediana; (d) região posterior. Mv, microvilosidades. Barras = 1  $\mu$ m.

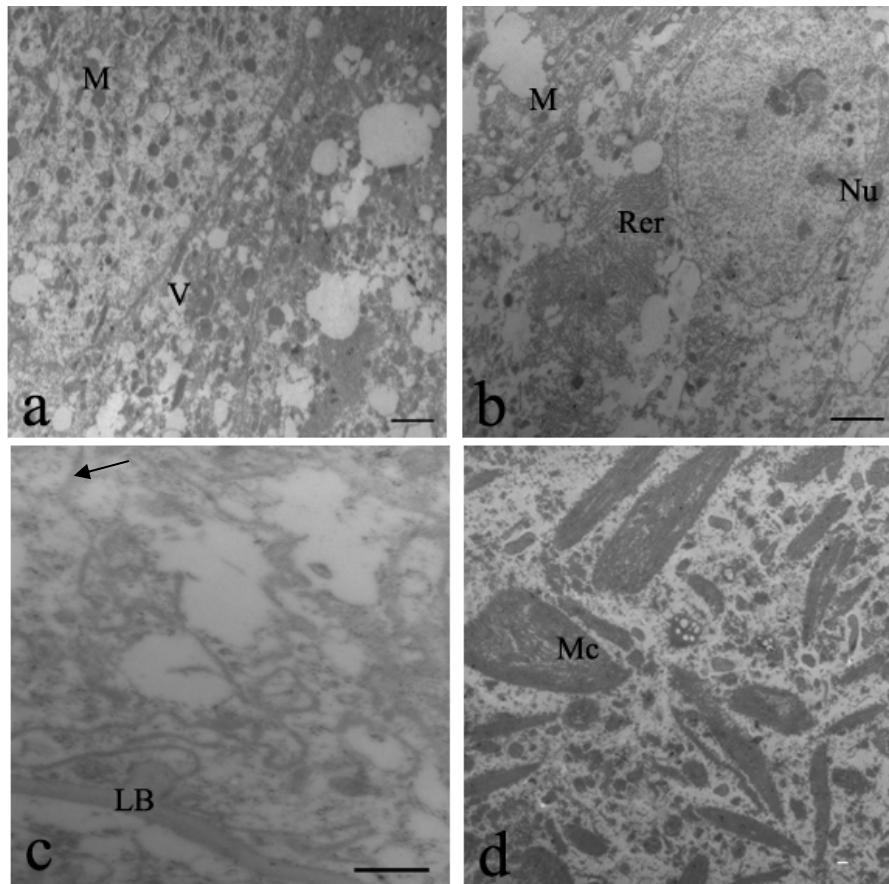
### 3.9 – Ultra-estrutura das células do intestino médio de *Podisus nigrispinus*

As células digestivas da porção anterior do intestino médio de *P. nigrispinus* são cúbicas com inúmeras microvilosidades as quais há uma rede de membrana perimicrovilar bem desenvolvida e com o citoplasma apical composto por vesículas de secreção com diferentes eletrodensidades e inclusões lipídicas (Figura 20). A região mediana da célula é rica em retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e vesículas de secreção (Figura 20). A região basal da célula possui grande número de mitocôndrias associadas a longas e estreitas invaginações da membrana basal, as quais apresentam poucas aberturas para hemocele (Figura 20).



**Figura. 20:** Micrografia eletrônica do intestino médio anterior de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). (a) região apical; (b) região mediana; (c,d) região basal. Mv, microvilosidades; M, mitocôndria; V, vesícula de secreção; Rer, retículo endoplasmático rugoso; LB, lâmina basal. Barra= 1  $\mu\text{m}$  (b,d); 2  $\mu\text{m}$  (a); 5  $\mu\text{m}$  (c).

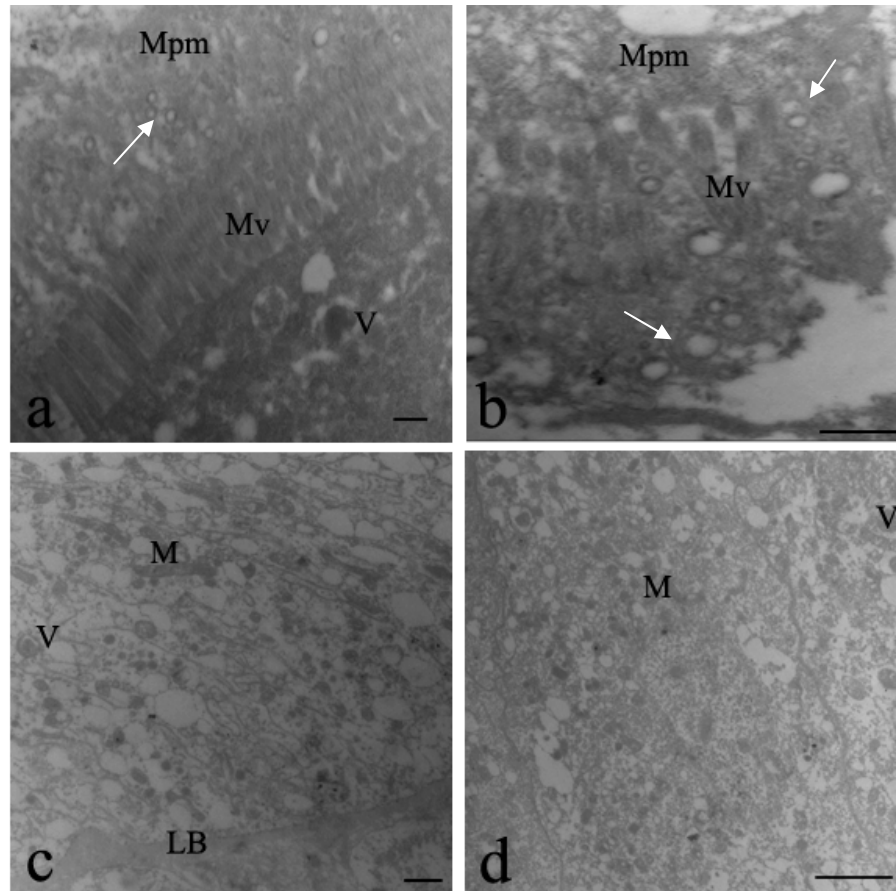
A porção mediana do intestino médio de *P. nigrispinus* é composta por células digestivas colunares com ápice contendo microvilosidades e grande número de mitocôndrias e vesículas de secreção no citoplasma apical (Figura 21). Na região mediana o retículo endoplasmático rugoso é bem desenvolvido, além da presença de mitocôndrias e vesículas de secreção (Figura 21). A porção basal dessas células é composta por um labirinto basal pouco desenvolvido (Figura 21). No lúmen desta região do intestino médio além da membrana perimicrovilar, foi possível identificar o conteúdo alimentar parcialmente digerido, com presença de tecido muscular não digerido (Figura 21).



**Figura 21:** Micrografia eletrônica do intestino médio mediano de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). (a) região apical; (b) região mediana; (c) região basal. Mv, microvilosidades; M, mitocôndria; V, vesícula de secreção; Rer, retículo endoplasmático rugoso; LB, lâmina basal; N, núcleo, Mc, músculo e a seta, invaginações da membrana basal. Barra= 1  $\mu$ m (c); 5  $\mu$ m (a,b,d).

O epitélio da porção posterior do intestino médio de *P. nigrispinus* é formado por células cúbicas com microvilosidades apical e membrana perimicrovilar no lúmen. O citoplasma apical das células digestivas mostrou a presença de vesículas com diferentes eletrodensidades e vesículas de dupla membrana (Figura 22), as quais atravessam as microvilosidades e se encontram dispostas na membrana perimicrovilar (Figura 22), enquanto na região mediana da célula além das vesículas há uma grande quantidade de mitocôndrias (Figura 22). A porção basal possui extensas invaginações da membrana basal associadas a poucas mitocôndrias e com

poucas aberturas para hemocele (Figura 22) quando comparadas com a região basal das células presentes na região anterior do intestino médio.



**Figura. 22:** Micrografia eletrônica do intestino médio posterior de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). (a, b) região apical; (c) região mediana; (d) região basal. Mv, microvisolidae; M, mitocôndria; V, vesícula de secreção; Rer, retículo endoplasmático rugoso; LB, lâmina basal; Mpm, membrana perimicrovilar; setas, vesículas de dupla membrana. Barra= 1  $\mu$ m (a,b); 2  $\mu$ m (d); 5  $\mu$ m (c).

#### 4 - Discussão

O intestino médio de *P. nigrispinus* é anatomicamente dividido em diferentes regiões como observado em outros Hemiptera. Nesse inseto, o intestino médio é dividido em três regiões distintas como em *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) (Fialho et al. 2009). A morfologia das glândulas salivares é caracterizada por dois pares de glândulas principais e dois pares de glândulas tubulares acessórias, semelhante ao relatado para *B. tabidus* (Azevedo et al. 2007) e *Brachynema germani* (Heteroptera: Pentatomidae) (Bigham e Hosseininaveh 2010).

O pH ácido nas três regiões do intestino médio de *P. nigrispinus* é semelhante ao relatado para *B. germani* (Hemiptera: Pentatomidae) (Bigham e Hosseininaveh 2010), evidenciando a predominância de proteases ácidas no intestino de Heteroptera (Terra e Ferreira 1994), uma vez que, insetos com pH neutro a alcalino possuem atividade de proteases serínicas e insetos com pH ácido possuem atividade de proteases cisteínicas (Murdock et al. 1987).

A digestão em Hemiptera pode ser catalisada por ambas, proteases cisteínicas e serínicas (Colebatch et al. 2001, Zhu et al. 2003, Bigham e Hosseininaveh 2010). O pH ácido do intestino de *P. nigrispinus*, o efeito inibidor do E-64 e a pouca inibição ao se usar inibidor de proteases serínicas (benzamidina) indica que protease cisteínica é a enzima majoritária no intestino médio desse inseto, semelhante ao encontrado no intestino médio de *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae) (Bell et al. 2005, Alvarez-Alfageme et al. 2007, Pascual-Ruiz et al. 2009). O E-64 é um inibidor não competitivo, irreversível, de proteases que possui um grupo tiol das famílias calpaina e papaína (Barret et al. 1982). Proteases cisteínicas tem participação digestiva majoritária em Coleoptera e o E-64 inibiu a atividade proteolítica tanto *in vitro* (Wolfson e Murdock 1990) como *in vivo* (Hines et al. 1990). Além disto, o E-64 não inibiu a atividade proteolítica em insetos com proteases serínicas como em Lepidoptera, Hymenoptera, Orthoptera e Diptera (Wolfson e Murdock 1990, Purcel et al. 1992, Christeller et al. 1992).

A protease cisteínica encontrada em *P. nigrispinus* é uma catepsina L, confirmando a hipótese de que estas proteases cisteínicas em insetos tem sido reconhecidas como catepsina L (Terra e Ferreira 2005, Koiwa et al 2000, Gruden et al 2003, Cristofolletti et al. 2003, 2005). As primeiras proteases cisteínicas intestinais de insetos foram indicadas como enzimas catepsinas “B-like”, porém, a catepsina B, apesar de possuir atividade endopeptídica, é mais importante como uma peptidil-dipeptidase (Aronson e Barret 1978). A catepsina B pode ser separada de outras proteases cisteínicas, pela habilidade de clivar substratos com resíduo de arginina em P2 (Hasnain et al. 1993, Jia et al. 1995). A catepsina L é uma endopeptidase verdadeira que cliva ligações peptídicas contendo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos em P2 (Barret et al. 2004). Portanto, é possível distinguir entre catepsina B e catepsina L utilizando os substratos Z-FR-MCA e Z-RR-MCA, respectivamente (Terra e Ferreira 2005). Não houve atividade quando se utilizou o substrato Z-RR-MCA, entretanto a atividade enzimática foi alta quando utilizado o substrato Z-FR-MCA, comprovando a presença da catepsina L no intestino médio de *P. nigrispinus*.

A maior atividade de catepsina L nas regiões mediana e posterior do intestino médio de *P. nigrispinus* é semelhante ao encontrado para *D. peruvianus* (Silva e Terra 1994, Bifano 2008), mas difere de *B. germani* (Bigham e Hosseinaveh 2010) e *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) (Cristofolletti et al 2003), que possuem atividade de catepsinas B e L na região anterior do intestino médio, *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) possui catepsinas B e L apenas na região posterior do intestino médio (Houseman e Downe 1983) e *T. molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) com catepsina L nas regiões anterior e mediana do intestino médio (Cristofolletti et al. 2005).

Os dois picos de catepsina L do intestino médio de *P. nigrispinus* possuem o mesmo pH ótimo (5,5), mas diferem na massa molecular e no  $K_m$ . O pH ótimo encontrado é semelhante aos daqueles para as proteases cisteínicas de insetos, entre cinco e seis (Terra e Ferreira 2005). Larvas de *T. molitor* também apresentaram dois picos de atividade de protease cisteínica com

diferentes valores de massa molecular (Terra e Cristofolleti 1996). As duas bandas de catepsina L obtidas no gel de atividade e no Western blotting a partir do homogeneizado de intestino médio de *P. nigrispinus* podem ser atribuídas à presença de famílias multigenes, o que é frequentemente observado no genoma dos insetos (Peterson et al. 1994, Gatehouse et al. 1997) devido a presença de múltiplas isoformas de proteases no intestino dos mesmos (Reeck et al. 1999). Isoenzimas podem ser importantes para o organismo por aumentarem a capacidade de adaptação a diferentes recursos alimentares e para dominar, derrotar ou superar a atividade de inibidores de proteases das plantas (Wagner et al. 2002), indicando adaptações fisiológicas ao alimento. Isto pode ocorrer para *P. nigrispinus*, pois esse predador pode ser considerado como zoofitófago uma vez que também se alimenta de plantas (Valicente e O'Neil 1993, Zanuncio et al. 2000, Oliveira et al. 2002).

A amilase encontrada em *P. nigrispinus* apresentou pH ótimo ácido (5,1) como encontrado para *Morimus funereus* (Coleoptera: Cerambycidae) (Dojnov et al. 2008) e *Pheropsophus aequinoctialis* (Coleoptera: Carabidae) (Ferreira e Terra 1989), o  $K_m$  neste besouro foi próximo ao encontrado para *P. nigrispinus* (0,03 %), abaixo da média de amilases isoladas de outros Coleoptera. O  $K_m$  obtido para a amilase de *P. nigrispinus* indica alta eficiência desta enzima neste predador.

A ocorrência de três isoformas de amilase no intestino médio de *P. nigrispinus* é fato comum, pois em outros insetos como *Rhyzopertha Dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) (Cinco-Moroyoqui et al. 2006), *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae) (Franco et al. 2005) e *M. funereus* (Dojnov et al. 2008) é comum a existência de várias isoformas ao contrário da larva de *T. molitor* na qual somente uma isoforma de amilase foi visualizada (Cristofolleti et al. 2001, Genta et al. 2006).

Em *P. nigrispinus* a amilase apresentou uma maior atividade na região anterior do intestino médio, reduzindo ao longo das outras regiões como observado em larva de *T. molitor* (Ferreira et al. 1990, Cristofolleti 2001) e em *D. peruvianus* (Silva e Terra 1994).

A aminopeptidase solúvel de *P. nigrispinus* corrobora o encontrado para *D. peruvianus* (Damasceno-Sá et al. 2007) e *Psoroptes cuniculi* (Acarina: Psoroptidae), indicando que essa enzima possui distribuição citosólica ou luminal (Nisbet e Billingsley 2002). A aminopeptidase é encontrada principalmente associada à membrana microvilar em insetos como *T. molitor* (Ferreira et al. 1990), *Rhynchosciara americana* (Diptera: Sciaridae) (Ferreira et al. 1993) e *P. aequinoctialis* (Ferreira e Terra 1989). Esta enzima em *P. nigrispinus* e *D. peruvianus* (Damasceno-Sá et al. 2007) foi encontrada na forma solúvel na região anterior do intestino médio, mas é geralmente predominante nas regiões mediana e posterior de *T. molitor* (Terra et al 1985), *R. prolixus* (Ferreira et al. 1988) e *P. aequinoctialis* (Ferreira e Terra 1989).

A massa molecular da aminopeptidase do intestino médio de *P. nigrispinus* foi 125 kDa, semelhante as aminopeptidases de *P. cuniculi* (Nisbet e Billingsley 2002) que variou de 85-116 kDa (Nisbet e Billingsley 2002), 123 kDa de *Anopheles stephensi liston* (Diptera: Culicidae) (Billingsley 1990) e 100 kDa de larvas de *Morimus funereus* (Coleoptera: Cerambycidae) (Bozic et al. 2003). Aminopeptidases são representadas por um amplo espectro de enzimas exibindo uma variação de peso molecular de 53-140 kDa por subunidades e existem monômeros, hexâmeros e octâmeros (Taylor 1993).

O pH ótimo da aminopeptidase foi ácido (5,4) condizente com o pH do intestino médio de *P. nigrispinus*, mas diferente do normalmente encontrado em outros insetos como *R. americana* (Ferreira et al. 1993), *M. funereus* (Bozic et al. 2008) e *P. aequinoctialis* (Ferreira e Terra 1989) com maior atividade em pH neutro ou básico. A maioria dos insetos nos quais os ensaios foram realizados com LpNA o  $K_m$  teve valores baixos e muito próximos:  $K_m$  0,09 mM em *P. cuniculi* (Nisbet e Billingsley 2002), semelhante ao valor de *P. nigrispinus* (0,03 mM). Em ambos os casos essa enzima expressa alta preferência por aminoácidos não polares (leucina e metionina) que por aqueles aminoácidos básicos, como a lisina (*P. nigrispinus*, dados não mostrados).

Frações do sedimento e do sobrenadante apresentaram atividade de  $\alpha$ -glicosidase indicando a presença de uma  $\alpha$ -glicosidase solúvel como observado em Coleoptera (Ferreira e Terra 1989) e outra ligada à membrana como em Diptera (Jordão e Terra 1991). A presença dessa enzima no sedimento do intestino médio de *P. nigrispinus* está relacionada ao fato de ser um marcador de membrana perimicrovilar em Hemiptera (Silva et al. 1995, 2004).

O pH ótimo da  $\alpha$ -glicosidase (5,0), sua distribuição no intestino médio de *P. nigrispinus* e o aumento da atividade dessa enzima na fração solúvel e sedimento após o início da alimentação também foi observado em *D. peruvianus* (Silva e Terra 1995) suportando a hipótese de que a compartimentação da  $\alpha$ -glicosidase está relacionada com a filogenia (Silva e Terra 1995).

A  $\alpha$ -glicosidase foi inibida em *P. nigrispinus* como relatado para *D. peruvianus* (Silva e Terra 1995) na presença do Tris que é um inibidor competitivo linear simples dessa enzima quando ensaiada com o substrato pNP $\alpha$ Glc (Silva e Terra 1995). A reação de inibição do substrato nas glicosidases podem resultar de reações de transglicosilação, na qual parte do produto não é liberado na solução, ficando ligado ao substrato formando um oligosacarídeo (Cristofolletti et al. 2003).

A atividade de catepsina L em *P. nigrispinus* foi maior no início da alimentação e deve-se ao processo de digestão estar se iniciando pela ação das endopeptidases, neste caso uma protease cisteínica, o que explicaria o aumento da atividade de catepsina L. O início do processo digestivo não apresenta grandes quantidades de oligopeptídeos para serem hidrolisados pelas exopeptidases, o que explica a baixa atividade de aminopeptidase nesse período. Esses dados concordam com o modelo da digestão de proteína em insetos proposto por Ferreira e Terra (1989), no qual oligopeptídeos gerados pela ação das endoproteínases são hidrolisados por exopeptidases solúveis ou ligadas à membrana e dipeptidases para produzir aminoácidos livres. No final os aminoácidos livres passam pela membrana luminal e são levados para as células

principais por sistemas de transportes exclusivos (Parenti et al. 1992, Hong et al. 1995, Neal et al. 1996).

A digestão de proteínas em *P. nigrispinus* começa com a ação da catepsina L no lúmen das regiões média e posterior do intestino e é finalizada pela aminopeptidase no espaço perimicrovilar das regiões anterior, mediana e posterior. Já a digestão inicial e intermediária de carboidratos é iniciada pela amilase na região anterior se estendendo até a posterior o que também ocorre na digestão final, já que a  $\alpha$ -glicosidase possui maior atividade na porção anterior, diminuindo a atividade ao longo do intestino médio.

A distribuição das enzimas digestivas encontradas nas regiões do intestino médio de *P. nigrispinus* é igual à encontrada em *D. peruvianus* (Silva e Terra 1994), sugerindo uma alimentação descontínua (Chapman 1985), na qual a quantidade das enzimas digestivas varia de acordo com a presença de alimento.

As glândulas salivares de *P. nigrispinus* apresentaram quantidades insignificantes de enzimas digestivas, principalmente se comparado às atividades das mesmas no intestino médio deste inseto. No entanto, a presença de tripsina-like, amilase e lipase foi demonstrada nas glândulas salivares de Heteroptera (Azevedo et al. 2007, Oliveira et al. 2006), mas estes estudos não comparam as atividades destas enzimas com aquelas presentes no intestino médio. A atividade de proteases encontradas nas glândulas salivares de *P. nigrispinus*, *D. peruvianus* (Silva e Terra 1995) e *B. germani* (Bigam e Hosseinaveh 2010) foi também insignificantes comparado às atividades encontradas no intestino.

Nas glândulas salivares de *Deraeocoris nebulosus* (Hemiptera: Miridae) (Boyd 1991), *P. maculiventris* (Bell et al. 2005), *B. tabidus* (Azevedo et al. 2007) e *P. nigrispinus* (Oliveira et al. 2006) a protease serínica foi a principal enzima encontrada, porém estes estudos não realizaram análises de inibição de proteases cisteínicas ou os ensaios foram realizados com pH alcalino, aquele ótimo para proteases serínicas. A principal protease das glândulas salivares de *P. nigrispinus* foi a protease cisteínica catepsina L, comprovada pela alta inibição com E64. Ao

avaliar as proteases serínicas nas glândulas salivares não foi detectada a presença de quimotripsina e somente resquícios de tripsina foram observados ao utilizar inibidores que apresentaram baixa taxa de inibição.

Como observado, a saliva de *P. nigrispinus* é complexa, principalmente em relação às proteases que podem estar ligadas a efeitos diversos em relação às presas e, talvez, outras enzimas devam ser avaliadas e outros inibidores testados. Neste sentido, enzimas como colagenase, elastase e fosfolipase devem ser estudadas nas glândulas salivares de *P. nigrispinus*, pois estas atuam na matriz extracelular dos órgãos das presas, liberando fragmentos de tecidos que seriam ingeridos pelo predador, os quais foram encontrados ainda a região mediana do intestino médio deste inseto.

A presença de enzimas digestivas nas glândulas salivares de Hemiptera predadores tem sido utilizada para comprovar a existência de digestão extra-oral nestes insetos (Cohen 1990, 1995, 1998), porém a baixa atividade de amilase e de protease das glândulas salivares de *P. nigrispinus*, 0,04% e 0,5% da atividade específica encontrada no intestino médio, respectivamente, e a presença de fragmentos de tecido muscular da presa no lúmen da região mediana do intestino médio sugere que a injeção de saliva na presa não leva a uma digestão química dos seus órgãos e tecidos antes da sua ingestão pelo predador colocando em dúvida a existência de digestão extra-oral nestes insetos.

As enzimas amilase, aminopeptidase e  $\alpha$ -glicosidase foram imunolocalizadas nas três regiões do intestino médio de *P. nigrispinus*. As catepsinas L digestiva e lisossomal não foram encontradas na região anterior do intestino médio em conformidade com os dados bioquímicos, porém a presença de catepsina L lisossomal no lúmen pode ser um indício de uma reação cruzada. A amilase está localizada principalmente na região apical da célula como observado para *T. molitor* (Cristofolletti et al. 2001), enquanto aminopeptidase e  $\alpha$ -glicosidase estão distribuídas por toda a porção celular.

Enzimas imunolocalizadas no interior de vesículas no citoplasma, nas membranas microvilares, perimicrovilares e no lúmen, sugere que o mecanismo de secreção dessas enzimas em *P. nigripinus* é microapócrina como ocorre com a amilase em larvas de *T. molitor* (Cristofolletti 2001), tripsina em *S. frugiperda* (Jordão et al. 1999), glicosidases, amilase e tripsina em larva de *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae ) (Santos e Terra 1986 a,b) e em abelhas (Cruz-Landim et al., 1996, Serrão e Cruz-Landim, 2000).

As três regiões do intestino médio de *P. nigripinus* apresentaram o citoplasma apical repleto de vesículas, sugerindo intensa atividade secretora como observado nos dados bioquímicos desse trabalho.

As invaginações da membrana basal na região anterior do intestino médio de *P. nigripinus* são mais extensas, com poucas aberturas para a hemocele e estão associadas a grande quantidade de mitocôndria se comparado às células da região posterior do intestino médio, como observado para *B. tabidus* (Fialho et al. 2009). Invaginações da membrana plasmática basal estão relacionadas com o transporte ativo de íons e o fluxo de água através do epitélio (Terra et al. 1988, Ribeiro et al. 1990). Além disso, constituem um compartimento extracelular com acesso restrito a hemolinfa quando há poucas aberturas e dessa forma, a célula concentra soluto criando um gradiente osmótico entre a célula e o lúmen, promovendo a absorção de água (Cavalcante e Cruz-Landim 1999, Biagio et al. 2009). A região posterior do intestino médio *P. nigripinus* poderia atuar no transporte de água para o interior do intestino médio, enquanto a anterior seria responsável pela absorção de água do lumen.

As regiões mediana e posterior do intestino médio de *P. nigripinus* apresentam grande quantidade de mitocôndrias na região apical e mediana da célula digestiva, semelhante ao encontrado para *Diatraea saccharalis* Fabr. (Lepidoptera: Pyralidae) (Pinheiro e Gregório 2003) e *B. tabidus* (Fialho et al. 2009), sugerindo que nestas regiões do intestino podem estar ocorrendo os principais eventos de absorção de nutrientes.

Vesículas de dupla membrana visualizadas na região posterior do intestino médio são formadas nas áreas do Golgi, provavelmente, por rearranjo das cisternas do complexo, e migram para o ápice da célula onde se fundem (Terra e Ferreira 1994). A membrana externa da vesícula se funde com a membrana plasmática e a interna com a perimicrovilar. A membrana perimicrovilar é originada da membrana interna de vesículas de dupla membrana ou vesículas multimembranosas (Silva et al. 1995, Cristofolletti et al. 2003). A presença de vesículas de dupla membrana no intestino médio posterior de *P. nigrispinus* indica que essa região seja responsável pela formação da membrana perimicrovilar (Cristofolletti et al. 2003). Essas vesículas foram também observados em *B. tabidus* (Fialho et al. 2009), *D. peruvianus* (Silva et al. 1995) e *Nepa cinerea* (Andries e Torpier 1982). A membrana perimicrovilar dos Hemiptera atua na compartimentação do processo digestivo, otimiza a absorção de aminoácidos, imobiliza algumas enzimas e protege o epitélio intestinal (Terra e Ferreira 2005).

A ultra-estrutura do intestino médio de *P. nigrispinus* é semelhante à de *R. prolixus*, corroborando a hipótese de que Asopinae predadores evoluíram de um Hemiptera fitófago que perdeu a membrana peritrófica associada com a falta de digestão no lúmen (Terra 1990), e adquiriu a membrana perimicrovilar devido à necessidade de absorção eficiente de dietas diluídas e de manter a compartimentação do processo digestivo. (Terra 1988, Ribeiro et al. 1990). O predador zoofitófago, *P. nigrispinus*, que se alimenta de presa e do xilema de plantas (Torres et al 2010), possui distribuição enzimática entre as regiões do intestino médio iguais as do fitófago *D. peruvianus* (Silva et al 1995).

O hábito de se alimentar de planta dos Hemiptera predadores é uma questão intrigante cuja importância permanece sem ser esclarecida, mas o material de plantas poderia fornecer nutrientes em períodos de escassez de presa (equivalência), fornecer componentes nutricionais complementares (facilitação), fornecer componentes essenciais não obtidos da presa (independência) ou ainda fornecer água (Gillespie e McGregor 2000, Sinia et al. 2004). Entretanto a descoberta de que *P. nigrispinus* alimenta-se, apenas, da seiva circulante no xilema

(Torres et al. 2010), pode sugerir que a fitofagia em Hemiptera predadores tem papel importante no processo de absorção de aminoácidos no intestino médio. No processo digestivo de insetos que possuem membrana perimicrovilar, esta membrana delimita um compartimento (ectomicrovilar) entre o lúmen do intestino médio e as células digestivas, sendo que as células absorvem ativamente  $K^+$  deste compartimento, gerando um gradiente entre o lúmen do intestino e o compartimento ectomicrovilar e o aumento da concentração de  $K^+$  no lúmen do intestino forneceria o gradiente eletroquímico para a absorção de aminoácidos por simporte com  $K^+$  (Ferreira et al. 198, Silva e Terra 1994, Terra e Ferreira 2005). O processo de absorção de aminoácidos em insetos fitófagos é dependente de  $K^+$  (Silva e Terra 1995, Ferreira et al. 1988), mas em outros insetos como *Periplaneta americana* a absorção de aminoácidos é dependente de sódio  $Na^+$  (Terra et al. 2006). Por isto, o alto conteúdo de  $K^+$  do xilema (Cheung e Marshall 1973) forneceria a quantidade necessária deste íon para a manutenção deste gradiente eletroquímico e contribuiria para absorção de aminoácidos.

O fato da estrutura do intestino médio do predador *P. nigrispinus* ser semelhante a de um hematófago (*R. prolixus*) e a distribuição das enzimas igual a encontrada em fitófagos (*D. peruvianus*) sugerem que a morfologia e a compartimentação da digestão não pode ser atribuída à dieta, mas às adaptações adquiridas por ancestrais em conformidade com o fato dos padrões digestivos estarem correlacionados mais com a filogenia que com o hábito alimentar do inseto (Terra, 1988, 1990, Ribeiro et al. 1990, Schumaker et al. 1993).

Além disto, podemos concluir também que esses predadores zoofitófagos podem ser utilizados em programas de manejo integrado de pragas na presença de plantas transgênicas, pois essas plantas possuem inibidores de proteases serínicas e sendo a protease cisteínica catepsina L predominante em *P. nigrispinus*, não impedirá o crescimento e desenvolvimento desse predador em campo, desta forma, ele pode ser utilizado como mais um meio de controle de pragas além das plantas transgênicas.

## 5 - Referências Bibliográficas

- Álvarez-Alfageme, F., Martínez, M., Pascual-Ruiz, S., Castañera, P., Diaz, I. and Ortego, F., 2007. Effects of potato plants expressing a barley cystatin on the predatory bug *Podisus maculiventris* via herbivorous prey feeding on the plant. *Transgenic Research*, 16: 1-13.
- Alves, J.C., Almeida, P.C., Franzoni, L., Juliano, L. and Juliano, M.A. 1996. Synthesis of N-alfa-protected aminoacyl 7-amino-4-methyl-coumarin amide by phosphorous oxychloride and preparation of specific fluorogenic substrates for papain. *Journal of Peptide Research*, 9: 92-96.
- Andries, J. and Torpier, G. 1982. An extracellular brush border coat of lipid membranes in the midgut of *Nepa cinera* (Insecta: Heteroptera): Ultrastructure and genesis. *Biology of the Cell*, 46: 195-220.
- Aronson, N.N. and Barrett, A.J., 1978. The specificity of cathepsin B. Hydrolysis of glucagons at the C-terminus by a peptidyl dipeptidase mechanism. *Biochemical Journal*, 171: 759-765.
- Assis Júnior, S.L., Zanuncio, T.V., Santos, G.P. and Zanuncio, J.C. 1998. Efeito da suplementação de folhas de *Eucalyptus urophylla* no desenvolvimento e reprodução do predador *Supputius cincticeps* (Stal) (Heteroptera: Pentatomidae). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 27: 245-253.
- Azevedo, D.O., Zanuncio, J.C., Zanuncio Jr, J.S., Martins, G.F., Marques-Silva, S., Sossai, M.F. and Serrão, J.E. 2007. Biochemical and Morphological Aspects of Salivary Glands of the Predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50: 469-477.
- Barret, A.J., Rawlins, N.D. and Woessner, J.F. (Eds). 2004. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 2<sup>a</sup> ed. Elsevier, Oxford, 2140pp.
- Barret, A.J., Kembhavi, A.A., Brown, M.A., Krischke, H., Knight, C.G., Tamai, M. and Hanada, K. 1982. L-trans-epoxysuccinylleucylamido (4-guanidino) butane (E-64) and its

- analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochemical Journal*, 201: 189-198.
- Bell, H.A., Down, R.E., Edwards, J.P., Gatehouse, J.A. and Gatehouse, A.M.R. 2005. Digestive proteolytic activity in the gut and salivary glands of the predatory bug *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae); effect of proteinase inhibitors. *European Journal of Entomology*, 102: 139-145.
- Biagio, F.P., Tamaki, F.K., Terra, W.R. and Ribeiro, A.F. 2009. Digestive morphophysiology of *Gryllodes sigillatus* (Orthoptera: Gryllidae). *Journal of Insect Physiology*, 55: 1125-1133.
- Bifano, T.D. 2008. Fisiologia Molecular Intestinal de *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera). São Paulo, USP, 167p. (Tese de Doutorado).
- Bigham, M. and Hosseiniaveh, V. 2010. Digestive proteolytic activity in the pistachio green stink bug, *Brachynema germane* Kolenati (Hemiptera: Pentatomidae), *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13: 221-227.
- Billingsley, P.F. 1990. Blood digestion in the mosquito, *Anopheles stephensi liston* (Diptera:Culicidae): partial characterization and post-feeding activity of midgut aminopeptidase. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 15: 149-163.
- Billingsley, P.F. and Lehane, M.J. 1996. Structure and ultrastructure of the insect midgut. In: Billingsley, P.F. and Lehane, M.J. *Biology of the Insect Midgut*. London: Chapman & Hall, p. 3-30.
- Boyd, D.W.Jr., Cohen, A.C. and Alverson, D.R. 2003. Digestive Enzymes and Stylet morphology of *Deraeocoris nebulosus* (Hemiptera: Miridae), a Predacious Plant Bug. *Annals of the Society of America*, 95: 395-401.
- Bozic, N., Vujcic, Z., Nenadovic, V. and Ivanovic, J. 2003. Partial purification and characterization of midgut leucyl aminopeptidase of *Morimus funereus* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 134(B): 231-241.

- Bozic, N., Ivanovic, J., Nenadovic, V., Bergstrom, J., Larsson, T. and Vujcic, Z. 2008. Purification and properties of major midgut leucyl aminopeptidase of *Morimus funereus* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 149(B): 454-462.
- Bragança, M., De Souza, O. and Zanuncio, J.C. 1997. Environmental heterogeneity as a strategy for pest management in *Eucalyptus* plantations. *Forest Ecology and Management*, 102: 9-12.
- Cavalcante, V.M. and Cruz-Landim, C. 1999. Types of cells present in the midgut of the insects: a review. *Naturalia*, 24: 19-40.
- Chapman, R.F. 1985. Coordination of Digestion. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Oxford: Pergamon Press, 4: 213-240.
- Chapman, R.F. 1998. *The insects – Structure and Function*. Cambridge Press, Cambridge. 769p.
- Cheung, W.W.K. and Marshall, A.T. 1973. Water and ion regulation in cicadas in relation to xylem feeding. *Journal of Insect Physiology*, 19: 1801-1816.
- Chow, W.L., Tsao, S.M., Hays, A.R., Walters, R., Chen, J.S., Snigirevskaya, E.S. and Raikhel, S. 1999. Mosquito Cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 13311-13321.
- Christeller, J.T., Laing, W.A., Markwick, N.P. and Burgess, E.P.J. 1992. Midgut protease activities in twelve phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22: 735-746.
- Cristofolletti, P.T., Ribeiro, A.F., Deraison, C., Rahbé, Y. and Terra, W.R. 2003. Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology*, 49: 11-24.
- Cinco-Moroyoqui, F.J., Rosas-Burgos, E.C., Borba-Flores, J. and Cortez-Rocha, M.O. 2006.  $\alpha$ -Amylase Activity of *Rhyzopertha Dominica* (Coleoptera: bostrichidae) Reared on Several

- Wheat Varieties and Its Inhibition with Kernel Extracts. *Journal of Economic Entomology*, 99: 2146-2150.
- Cohen, A.C. 1990. Feeding adaptations of some predaceous Hemiptera. *Annals of the Entomological Society of America*, 83: 1215-1223.
- Cohen, A.C. 1995. Extra-oral digestion in predaceous terrestrial Arthropoda. *Annual Review of Entomology*, 40: 85-104.
- Cohen, A.C. 1998. Biochemical and morphological dynamics and predatory feeding habits in terrestrial Heteroptera. In: Coll, M., Ruberson, J.R. *Predatory Heteroptera: their Ecology and use in Biological Control*. Lanhan: Thomas Say Publications/ Entomological Society of America, 21-32.
- Cohen, A.C. and Tang, R. 1997. Relative prey weight influences handling time and biomass extraction in *Sinea confusa* and *Zelus renardii* (Heteroptera: Reduviidae). *Environmental Entomology*, 26: 559-565.
- Colebatch, G.M., East, P. and Cooper, P. 2001. Preliminary characterization of digestive proteases of the green mirid, *Creontiades dilutus* (Hemiptera: Miridae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 415-423.
- Coll, M. and Guershon, M. 2002. Omnivory in terrestrial arthropods: mixing plant and prey diets. *Annual Review of Entomology*, 47: 267-297.
- Cristofoletti, P.T., Ribeiro, A.F. and Terra, W.R. 2001. Apocrine secretion of amylase and exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *Journal of Insect Physiology*, 47: 143-155.
- Cristofoletti, P.T., Ribeiro, A.F. and Terra, W.R. 2005. The cathepsin L-like proteinases from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae: Sequence, properties, immunocytochemical localization and function. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35: 883-901.

- Cristofolletti, P.T., Ribeiro, A.F., Deraison, C., Rahbé, Y and Terra, W.R. 2003. Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology*, 49: 11-24.
- Cruz-Landim, C. 1985. Ultra-estrutura e função do tubo digestivo dos insetos. *Aciesp*, 44: 28-41.
- Cruz-Landim, C., Serrão, J.E. and Silva de Moraes, R.L.M. 1996. Cytoplasmic protrusions from digestive cells of bees. *Cytobios*. 88: 95 - 104.
- Damasceno-Sá, J.C., Carneiro, C.N.B., DaMatta, R.A., Samuels, R.I., Terra, W.R. and Silva, C.P. 2007. Biphasic perimicrovillar membrane production following feeding by previously starved *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera:Pyrrhocoridae). *Journal of Insect Physiology*, 53: 592-600.
- De Clercq, P. 2000. Predaceous Stinkbugs (Pentatomidae: Asopinae). In: Schaefer, C.W., Panizi, A.R. (Ed) *Heteroptera of Economic Importance*. Washington: CRC Press, 737-789.
- Dojnov, B., Bozic, N., Nenadovic, V., Ivanovic, J. and Vujcic, Z. 2008. Purification and properties of midgut  $\alpha$ -amylase isolated from *Morimus funereus* (Coleoptera: ceramycidae) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 149(B): 153-160.
- Evangeslista Junior, W.S., Gondim Junior, M.G.C., Torres, J.B., Marques, E.J. 2004. Fitofagia de *Podisus nigrispinus* em algodoeiro e plantas daninhas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 413-420.
- Eubanks, M. and Denno, R.F. 1999. The ecological consequences of variation in plants and prey for an omnivorous insect. *Ecology*, 80: 1253-1266.
- Ferreira, C. and Terra, W.R. 1989. Spatial organization of digestion, secretory mechanisms and digestive enzyme properties in *Pheropsophus aequinoctialis* (Coleoptera: Carabidae). *Insect Biochemistry*, 19: 383-391.
- Ferreira, C., Ribeiro, A.F., Garcia, E.S. and Terra, W.C. 1988. Digestive enzymes trapped between and associated with the double plasma membranes of *Rhodnius prolixus* posterior midgut cells. *Insect Biochemistry*, 18: 521-530.

- Ferreira, C., Ribeiro, A.F. and Terra, W.R. 1993. Ultrastructural and biochemical aspects in the imagoes of the fly *Rhynchosciara americana*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 66: 135-143.
- Ferreira, C., Bellinello, G.L., Ribeiro, A.F. and Terra, W.R. 1990. Digestive enzymes associated with the glycocalyx, microvillar membranes and secretory vesicles from midgut cells of *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochemistry*, 20: 839-847.
- Fialho, M.C.Q., Zanuncio, J.C., Neves, C.A., Ramalho, F.S. and Serrão, J.E. 2009. Ultrastructure of the Digestive Cells in the Midgut of the Predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera:Pentatomidae) After Different Feeding Periods on Prey and Plants. *Annals of the Entomological Society of America*, 102: 119-127.
- Fragoso, D.B., Zanuncio, T.V., Zanuncio, J.C. and Filho, P.J. 2000. Dinâmica populacional de lepidópteros em plantios de *Eucalyptus grandis* em Santa Bárbara, Minas Gerais. *Revista Árvore*, 24: 253-259.
- Franco, O.L., Melo, F.R., Mendes, P.A., Paes, N.S., Yokoyama, M., Coutinho, M.V., Bloch Jr. C. and Grossi-de-Sá, M.F. 2005. Characterization of Two *Acanthoscelides obtectus*  $\alpha$ -amylases and Their Inactivation by Wheat Inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 1585-1590.
- Gatehouse, L.N., Shannon, A.L., Burgess, E.P.J. and Christeller, J.T. 1997. Characterization of major midgut proteinase cDNAs from *Helicoverpa armigera* larvae and changes in gene expression in response to four proteinase inhibitors in the diet. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 27: 929-944.
- Genta, F.A., Dillon, R.J., Terra, W.R. and Ferreira, C. 2006. Potential role for gut microbiota in cell wall digestion and glucoside detoxification in *Tenebrio molitor* larvae. *Journal of Insect Physiology*, 52: 593-601.

- Gillespie, D.R. and McGregor, R.R. 2000. The functions of plant feeding in the omnivorous predator *Dicyphus hesperus*: water places limits on predation. *Ecological Entomology*, 25: 380-386.
- Gruden, K., Popovic, T., Cimerman, N., Krizaj, I. and Strukelj, B. 2003. Diverse enzymatic specificities of digestive proteases, “intestains”, enable Colorado potato beetle larva to counteract the potato defense mechanism. *Biological Chemistry*, 384: 305-310.
- Guedes, B.A.M., Zanuncio, J.C., Ramalho, F.S. and Serrão, J.E. 2007. Midgut morphology and enzymes of the obligate zoophytophagous stinkbug *Brontocoris tabidus* (Signoret, 1963) (Heteroptera: Pentatomidae). *The Pan-Pacific Entomologist*, 83: 229-235.
- Hasnain, S., Hiram, T., Huber, C.P., Mason, P. and Mort, J.S. 1993. Characterization of cathepsin B specificity by site-directed mutagenesis. The importance of Glu245 in the S2-P2 specificity for arginine and its role in transition state stabilization. *Journal of Biological Chemistry*, 268: 235-240.
- Hines, M.E., Nielsen, S.S., Shade, R.E. and Pomeroy, M.A. 1990. The effect of two proteinase inhibitors, E-64 and the Bowman-Birk inhibitor, on the developmental time and mortality of *Acanthoscelides obtectus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 57: 201-207.
- Hong, Y.S., Reuveni, M. and Neal, J.J. 1995. A sodium and potassium-stimulated tyrosine transporter from beetle midguts. *Journal of Insect Physiology*, 41: 527-533.
- Houseman, J.G. and Downe, A.E.R. 1983. Cathepsin D-like activity in the posterior midgut of hemipteran insects. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 75: 509-512.
- Houseman, J.G., MacNaughton, W.K. and Downe, A.E.R. 1984. Cathepsin B and aminopeptidase in the posterior midgut of *Euchistus euchistoides* (Hemiptera: Pentatomidae). *Canadian Entomologist*, 116: 1393-1396.
- Houseman, J.G., Morrison, P.E. and Downe, A.E.R., 1985. Cathepsin B and aminopeptidase in the posterior midgut of *Pymata wolfii* (Hemiptera: Phymathidae). *Canadian Journal of Zoology*, 63: 1288-1291.

- Jia, Z., Hasnain, S., Hiramata, T., Lee, X., Mort, J.S., To, R. and Huber, C.P. 1995. Crystal structure of recombinant rat cathepsin B and a cathepsin B-inhibitor complex. Implications for structure-based inhibitor design. *The Journal of Biological Chemistry*, 270: 5527-5533.
- Jordão, B.P. and Terra, W.R. 1991. Regional distribution and substrate specificity of digestive enzymes involved in terminal digestion in *Musca domestica* hind-midguts. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 17: 157-168.
- Jordão, B.P., Capella, A.N., Terra, W.R., Ribeiro, A.F. and Ferreira, C. 1999. Nature of the anchors of membrane-bound aminopeptidase, amylase, and trypsin and secretory mechanisms in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) midgut cells. *Journal of Insect Physiology*, 45: 29-37.
- Jusselino-Filho, P., Zanuncio, J.C., Fragoso, D.B., Serrão, J.E. and Lacerda, M.C. 2003. Biology of *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) fed with *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) larvae. *Brazilian Journal of Biology*, 63: 463-468.
- Knight, P.J.K., Knowles, B.H. and Eller, D.J., 1995. Molecular cloning of an insect aminopeptidase N that serves as a receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry 1a (c) toxin. *J. Biol. Chem.*, 270: 17765-17770.
- Koiwa, H., Shade, R.E., Zhu-Salzman, K., D'Urzo, M.P., Murdock, L.L., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. 2000. A plant defensive cystatin (soyacystatin) target cathepsin L-like digestive cysteine proteinase (DvCALs) in the larval midgut of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). *FEBS Letters*, 471: 67-70.
- Lemos, W.P., Ramalho, F.S., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C. and Bauce, E. 2006. Diet affects reproduction and number of oocytes per ovary on the predator *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). *Animal Biology*, 56: 279-287.
- Lemos, W.P., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C., Lacerda, M.C., Zanuncio, V.V. and Ribeiro, R.C. 2009. Body weight and protein content in the haemolymph of females of the

- zoophytophagous predator *Brontocoris tabidus* (Heteroptera: Pentatomidae) with different diets and ages. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 116: 218-222.
- Lemos, W.P., Medeiros, R.S., Ramalho, F.S and Zanuncio, J.C. 2001. Effects of plant feeding on the development, survival and reproduction of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). *International Journal of Pest Management*, 47:89-93.
- Liu, J., Shi, G.P., Zhang, W.Q., Zhang, Z.J. and Xu, W.H. 2006. Cathepsin L function in insect moulting: molecular and functional analysis in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *Insect Molecular and Biology*, 15 : 823-834.
- Matos Neto, F.C., Zanuncio, J.C., Cruz, I. and Torres, J.B. 2002. Nymphal development of *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) preying on larvae of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) fed with resistant and susceptible soybeans. *Revista Brasileira de Entomologia*, 46: 237-241.
- Martins, G.F., Neves, C.A., Campos, L.A.O. and Serrão, J.E. 2006. The regenerative cells during the metamorphosis in the midgut of bess. *Micron*, 37: 161-168.
- Morton, R.A. and Evans, 1992. Modification of the bicinchoninic acid protein assay to eliminate lipid interference in determining lipoprotein protein content. *Analytical Biochemistry*, 204: 332-334.
- Murdock, L.L., Brookhart, G., Dunn, P.E., Foard, D.E., Kelley, S., Kitch, L., Shade, R.E., Shukle, R.H. and Wolfson, J.L. 1987. Cysteine digestive proteinase in Coleoptera. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 87:783-787.
- Nation, J.L. 2002. *Insect Physiology and Biochemistry*. Washington: CRC Press. 485p.
- Neal, J.J., Wu, D., Hong, Y.S. and Reuveni, M., 1996. High affinity transport of histidine and methionine across *Leptinotarsa decemlineata* midgut brush border membrane. *Journal of Insect Physiology*, 42: 329-335.
- Nisbet, A.J. and Billingsley, P.F. 2002. Characterisation of aminopeptidase activity in scab mites (*Psoroptes spp.*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 1123-1131.

- Norén, O., Sjortrom, H., Danielsen, E.M., Cowel, G.M. and Skovbjerg, H. 1986. The enzymes of the enterocyte plasma membrane. In: Molecular and Cellular Basis of Digestion. (Eds. Desnuelle, P., Sjortrom, Norén, O.), Elsevier, Amsterdam, 335-365.
- Oliveira, J.A., Oliveira, M.G.A., Guedes, R.N. and Soares, M.J. 2006. Morphology and preliminary enzyme characterization of the salivary glands from the predatory bug *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Bulletin of Entomological Research, 96: 251-258.
- Oliveira, J.E.M., Torres, J.B., Carrano-Moreira, A.F. and Barros, R. 2002. Efeito de plantas do algodoeiro e do tomateiro, como complemento alimentar, no desenvolvimento e na reprodução do predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). Neotropical Entomology, 31: 101-108.
- Parra, J.R.P., Botelho, P.S.M., Corrêa-Filho, B.S., Bento, J.M.S (Eds). 2002. Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo, Ed. Manole.
- Parenti, P., Villa, M. and Hanozet, G., 1992. Kinetics of leucine transport in brush border membrane vesicles from lepidopteran larvae midgut. The Journal of Biological Chemistry, 267: 15391-15397.
- Pascual-Ruiz, S., Carrillo, L., Álvarez-Alfageme, F., Ruiz, M., Castañera, P. and Ortego, F. 2009. The effects of different prey regimes on the proteolytic digestion in nymphs of the spined soldier bug, *Podisus maculiventris* (Hemiptera: Pentatomidae). Bulletin of Entomological Research, 99: 487-491.
- Pereira, J.M.M., Zanuncio, J.C. and Schoereder, J.H. 1994. Índices faunísticos dos principais lepidópteros daninhos ao eucalipto nas regiões de Abaeté e Ibitira, Minas Gerais. Científica, 22: 255-262.
- Peterson, A.M., Barilas, M.C. and Wells, M.A. 1994. Sequence of three cDNAs encoding an alkaline midgut trypsin from *Manduca sexta*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 24: 463-471.

- Pinheiro, D. and Gregorio, E.A. 2003. Ultrastructure of the columnar epithelial cell along the midgut of the *Diatrea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Acta Microscopica*, 12: 27-30.
- Purcell, J.P., Greenplate, J.T. and Sammons, R.D., 1992. Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22: 41-47.
- Rawlings, N.D. and Barret, A.J., 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*, 290: 205-218.
- Rawlings, N.D. and Barret, A.J. 1994. Families of cysteine peptidases. *Methods in Enzymology*, 244: 461-486.
- Reeck, G., Oppert, B., Denton, M., Kanost, M., Baker, J.E. and Kramer, K.J. 1999. Insect proteinases, In: Turk, V. (Ed), *Proteases: New perspectives*. Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, pp. 125-148.
- Ribeiro, A.F., Ferreira, C. and Terra, W.R. 1990. Morphological basis of the insect digestion. *Comparative Physiology*, 5: 96-105.
- Santos, C.D. and Terra, W.R. 1996a. Distribution and characterization of oligomeric digestive enzymes from *Erinnyis ello* caterpillars and inferences concerning secretory mechanisms and the permeability of the peritrophic membrane. *Insect Biochemistry*, 16:691-700.
- Santos, C.D. and Terra, W.R. 1996b. Midgut alpha-glucosidase and beta-fructosidase from *Erinnyis ello* larvae and imagoes: physical and kinetic-properties. *Insect Biochemistry*, 16:819-824.
- Santos, G.P., Zanuncio, T.V. and Zanuncio, J.C. 2000. Desenvolvimento de *Thyrinteina arnobia* Stoll, (Lepdoptera: Geometridae) em folhas de *Eucalyptus urophylla* e *Psidium guajava*. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 29: 13-22.

- Serrão, J.E. and Cruz-Landim, C. 1996a. A comparative study of digestive cells in different midgut regions of stingless bees (Hymenoptera Apidae: Meliponinae). *Journal of Advanced Zoology*, 17: 01-06.
- Serrão, J.E. and Cruz-Landim, C. 1996b. Ultrastructure of digestive cells in stingless bees of various ages (Hymenoptera, Apidae:Meliponinae). *Cytobios*, 88: 161-171.
- Serrão, J.E. and Cruz-Landim, C. 2000. Ultrastructure of the midgut epithelium of Meliponinae larvae with different developmental stages and diets. *Journal of Apicultural Research*, 39: 9-17.
- Serrão, J.E., Ronnau, M., Neves, C.A., Campos, L.A.O. and Zanuncio, J.C. 2008. Ultrastructure of anterior midgut region of corbiculate bees (Hymenoptera:Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 101: 915-921.
- Silva, C.P. and Terra, W.R., 1994. Digestive and absorptive sites along the midgut of the cotton seed sucker *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 24: 493-505.
- Silva, C.P. and Terra, W.R., 1995. An  $\alpha$ -Glucosidase from Perimicrovillar Membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) Midgut Cells. Purification and Properties. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 24: 493-505.
- Silva, C.P.R.; Ribeiro, A.F.; Gulbenkian, S. and Terra, W.R. 1995. Organization, origin and function of the outer microvillar (perimicrovillar) membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera) midgut cells. *Journal of Insect Physiology*, 41: 1093-1103.
- Silva, P.S., Silva, J.R., Vasconcelos, F.F., Petretski, M.D.A., DaMatta, R.A., Ribeiro, A.F and Terra, W.R. 2004. Occurrence of midgut perimicrovillar membranes in paraneopteran insect orders with comments on their function and evolutionary significance. *Arthropod Structure & Development*, 33: 139-148.
- Silva, C.P., Terra, W.R., deSá, M.F.G., Samuels, R.I., Isejima, E.M., Bifano, T.D. and Almeida, J.S. 2001. Induction of digestive  $\alpha$ -amylase in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera:

- Bruchidae) in response to ingestion of common bean  $\alpha$ -amylase inhibitor. *Journal of Insect Physiology*, 47: 1283-1290.
- Sinia, A., Roitberg, B., McGregor, R.R. and Gillespie, D.R. 2004. Prey feeding increases water stress in the omnivorous predator *Dicyphus hesperus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 110: 243-248.
- Schumaker, T.T.S., Cristofolletti, P.T. and Terra, W.R. 1993. Properties of compartmentalization of digestive carbohydrases and proteases in *Scaptotrigona bipunctata* (Apidae: Meliponinae) larvae. *Apidologie*, 24: 3-17.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fuzimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150: 76-85.
- Snodgrass, R.E. 1993. *Principles of Insect Morphology*. Coronell University Press, Ithaca and London, 667p.
- Stefanini, M., De Martino, C., Zamboni, L. 1967. Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy. *Nature*, 216: 173-174.
- Takahashi, N., Kurata, S. and Natori, S. 1993. Molecular cloning of cDNA for the 29 kDa proteinase participating in decomposition of the larval fat body, during metamorphosis of *Sarcophaga peregrine* (flesh fly). *FEBS Letters*, 334: 153-157.
- Taylor, A. 1993. Aminopeptidase: structure and function. *FASEB Journal*, 7: 290-298.
- Terra, W.R. 1988. Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 21: 675-734.
- Terra, W.R. 1990. Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review of Entomology*, 35: 181-200.
- Terra, W.R. and Cristofolletti, P.T. 1996. Midgut proteinases in three divergent species of Coleoptera. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 113: 725-730.

- Terra, W.R. and Ferreira, C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 109: 1-62.
- Terra, W.R. and Ferreira, C. 2005. Biochemistry of Digestion. In: Gilbert, L.I., Iatrov, K., Gill, S. (Eds), *Comprehensive Molecular Insect Science*, 4:171-224.
- Terra, W.R., Costa, R.H. and Ferreira, C. 2006. Plasma membranes from insect midgut cells. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 78: 255-269.
- Terra, W.R., Ferreira, C. and Bastos, F. 1985. Phylogenetic considerations of insect digestion: disaccharidases and the spatial organization of digestion in the *Tenebrio molitor* larvae. *Insect Biochemistry*, 15: 443-449.
- Terra, W.R., Ferreira, C. and De Bianchi, A.G. 1979. Distribution of the digestive enzymes among the endo and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. *Journal of Insect Physiology*, 25: 487-494.
- Thomas, D.B. 1992. Taxonomic synopsis of the Asopinae Pentatomidae (Heteroptera) of the Western Hemisphere. Maryland: Thomas Say Monographs, Entomological Society of American, Lanham, 147p.
- Torres, J.B., Barros, E.M., Coelho, R.R. and Pimentel, R.M.M. 2010. Zoophytophagous pentatomids feeding on plants and implications for biological control. *Arthropod-Plant Interactions*, DOI 10.1007/s11829-010-9095-2.
- Turk, B., Turk, V. and Turk, D. 1997. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol. Chem*, 378: 141-150.
- Turk, D., Guncar, G., podobnik, M and Turk, B. 1998. Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biol Chem*, 379: 137-147.
- Valicete, F.H. and O'Neil, R.J. 1993. Effects of two host plants on selected life history characteristics of *Podisus maculiventris* (Say) (Heteroptera: Pentatomidae). 1. Without access to prey. *Environmental Entomology*, 23: 1254-1259.

- Vivian, L.M., Torres, J.B. and Veiga, A.F.S.L. 2003. Development and reproduction of the predatory stinkbug *Podisus nigrispinus*, in relation to two different prey types and environmental conditions. *Biocontrol*, 48: 155-168.
- Wagner, W., Möhrlein, F. and Schnetter, W. 2002. Characterization of the proteolytic enzymes in the midgut of the European Cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32: 803-814.
- Wiederanders, B. 2003. Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. *Acta Biochemica Polonica*, 50: 691-713.
- Wolfson, J.L. and Murdock, L.L., 1990. Diversity in digestive proteinase activity among insects. *Journal of Chemical Ecology*, 16: 1089-1102.
- Zanuncio, J.C., Alves, J.B., T.V. Zanuncio and Garcia, J.F. 1994. Hemipterous predators of eucalypt defoliator caterpillars. *Forest Ecology and Management*, 65: 65-73.
- Zanuncio, J.C., Guedes, R.N.C. and Ramalho, F.S. 2000. Effect of feeding on three Eucalyptus species on the development of *Brontocoris tabidus* (Het.: Pentatomidae) fed with *Tenebrio molitor* (Col.: Tenebrionidae). *Biocontrol Science and Technology*, 10: 443-450.
- Zanuncio, J.C., Lacerda, M.C., Zanuncio Júnior, J.S., Zanuncio, T.V., Silva, A.M.C and Espíndula, M.C. 2004. Fertility table and rate of population growth of the predator *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae) on one plant of *Eucalyptus cloeziana* in the field. *Annals of Applied Biology*, 144: 357-361.
- Zeng, F. and Cohen, A.C. 2000. Comparison of  $\alpha$ -amylase and protease activities of a zoophytophagous and two phytozoophagous Heteroptera. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 126: 101-106.
- Zeng, F., Zhu, Y. and Cohen, A.C. 2002. Partial characterization of trypsin-like protease and molecular cloning of a trypsin-like precursor cDNA in salivary glands of *Lygus lineolaris*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 131: 453-463.

Zhu, Y.C., Zeng, F. and Oppert, B. 2003. Molecular cloning of trypsin-like cDNAs and comparison of protease activities in the salivary glands and gut of the tarnished plant bug *Lygus lineolaris* (Heteroptera: Miridae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33: 889-899.