

PLINIO FAGUNDES CONTER

PURIFICAÇÃO E PROPRIEDADES DO INIBIDOR DE TREALASE DA HEMOLIN-
FA DE TRIATOMA INFESTANS

Tese apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Bioquímica, da Uni-
versidade Federal do Paraná, pa-
ra obtenção do grau de Doutor em
Ciências.

CURITIBA
1986

Orientador

Dr. Luiz Alberto Silva Veiga

Co-Orientador

Dra. Muriel Mourão Vieira

Aos Amigos

Alfredo

Cecy

e Edna

AGRADECIMENTOS

Aos professores Dr. Luiz Alberto Silva Veiga e Dra. Muriel Mourão Vieira pela orientação, e auxílio prestados na execução desta tese.

Ao Dr. Shigehiro Funayama, pelas sugestões e análise crítica desta tese.

A Dra. Kazuko Hishida do Nascimento pela análise crítica desta tese.

Aos professores Ionizete Garcia da Universidade Federal do Paraná, e José Jurberg do Instituto Osvaldo Cruz pelos insetos utilizados neste trabalho.

Ao professor Vanderlei Vasques Vieira da Universidade Federal de Pelotas, pelo auxílio prestado na obtenção das fotografias.

Ao Dr. Akio Sugihara do Osaka Municipal Technical Research Institute, pelo auxílio prestado na determinação da composição de aminoácidos.

Ao Dr. José Domingos Fontana pelo auxílio prestado na execução das eletroforeses em gel.

A professora Iraide Souza Gonçalves do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Paraná, pela dissecação dos insetos.

Ao Professor Adelino Pelisari, Diretor da Fazenda Canguiri, pelo apoio material.

A Doutoranda Márcia Helena Mendonça pelo auxílio na determinação de hexosaminas.

Ao Dr. Philip Albert James Gorin, pelo apoio e colaboração.

Ao Dr. Manoel Francisco Guimarães, pelo apoio e colaboração.

Ao Prof. Eduardo A. Osório da Universidade Federal de Pelotas pelo apoio.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná que direta e indiretamente contribuíram para tornar possível a realização deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

	Lista de Figuras	X
	Lista de Tabelas	XII
	Resumo	XIII
1	INTRODUÇÃO	1
2	MATERIAIS E MÉTODOS	11
	2.1. Reagentes químicos	11
	2.2. Insetos	11
	2.2.1. - Obtenção	11
	2.2.2. - Manutenção	11
	2.2.3. - Alimentação	11
	2.2.3.1. - Sangue de galinhas	12
	2.2.3.2. - Sangue de bovinos	12
	2.2.4. - Extração da hemolinfa	12
2.3.	Preparação dos extratos livres de células de dife - rentes tecidos	13
2.4.	Métodos quantitativos de análise	13
	2.4.1. - Determinação da atividade trealásica	13
	2.4.2. - Determinação da atividade anti-trealásica.	14
	2.4.3. - Unidade enzimática	15
	2.4.4. - Atividade específica	15
2.5.	Determinação da concentração de proteínas	15
2.6.	Análises cromatográficas	15

2.6.1.	Cromatografia em coluna de Sephadex G-50 ...	15
2.6.2.	Análise de aminoácidos por cromatografia líquida de alta resolução.	15
2.7.	Determinação de hexosaminas	16
2.8.	Ultrafiltração da hemolinfa	16
2.9.	Diálise	17
2.10.	Eletroforese analítica do inibidor B em gel de poli- acrilamida.	17
2.11.	Determinação do peso molecular do inibidor B em gel de poliacrilamida contendo SDS	18
2.12.	Determinação do espectro de absorção	19
3.	RESULTADOS	
3.1.	- Atividade trealásica e anti-trealásica da he- molinfa de Triatoma infestans no período in- ter-alimentar	20
3.2.	- Separação da trealase e purificação de seu inibidor em hemolinfa de Triatoma infestans	20
3.2.1.-	Tratamento da hemolinfa em Sephadex G-50	21
3.2.2.-	Tratamento da hemolinfa por ultra- filtração	21
3.3.	- Propriedades da trealase da hemolinfa de Triatoma infestans	21
3.3.1.-	Efeito do tempo de incubação sobre a atividade trealásica	22
3.3.2.-	Efeito da concentração de enzima so- bre a atividade trealásica	22

3.3.3.-	Influência da temperatura sobre a atividade trealásica	22
3.3.4.-	Estabilidade térmica da trealase da hemolinfa de Triatoma infestans a 60 ^o e 70 ^o	23
3.3.5.-	Efeito do pH sobre a atividade trea lásica	23
3.3.6.-	Determinação do pH ótimo de ativida de para trealases de hemolinfa de diferentes insetos vetores	23
3.3.7.-	Efeito da concentração de trealose sobre a atividade catalítica de trea lase: Determinação da constante de Michaelis-Menten	24
3.3.8.-	Efeito de íons inorgânicos sobre a atividade trealásica	24
3.4. -	Efeito da diluição da hemolinfa sobre a ati vidade trealásica	25
3.5. -	Homogeneidade do inibidor B	25
3.6. -	Características e propriedades do inibidor de trealase da hemolinfa de Triatoma infes- tans	26
3.6.1. -	Propriedades óticas do inibidor B .	26
3.6.2. -	Determinação do peso molecular do inibidor B	26
3.6.3. -	Composição em aminoácidos do inibi dor B	27

	3.6.4.- Influência da concentração do inibidor sobre atividade anti-trealásica.	28
	3.6.5.- Efeito do inibidor sobre a atividade trealásica e determinação da constante de inibição	28
	3.6.6.- Estabilidade térmica do inibidor de trealase	28
	3.6.7.- Efeito da diálise sobre o inibidor de trealase da hemolinfa de <i>Triatoma infestans</i>	29
	3.7. - Ocorrência da trealase e do inibidor em diferentes tecidos de <i>Triatoma infestans</i>	29
4	DISCUSSÃO	55
5	CONCLUSÕES	64
6	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

LISTA DE FIGURAS

1	Alimentador artificial	30
2	Separação da trealase e seu inibidor por cromatografia em coluna de Sephadex G-50	31
3	Efeito do tempo de incubação sobre a atividade trealásica	32
4	Efeito da concentração de enzima sobre a atividade trealásica	33
5	Influência da temperatura sobre a atividade trealásica	34
6	Estabilidade térmica da trealase da hemolinfa de Triatoma infestans	35
7	Efeito do pH sobre a atividade trealásica	36
8	Efeito da concentração de substrato sobre a atividade catalítica da trealase em pH 4,2 e 4,4. Determinação gráfica da constante de Michaelis-Menten .	37
9	Efeito da concentração de substrato sobre a atividade catalítica da trealase em pH 5,6 e 6,2. Determinação gráfica da constante de Michaelis-Menten .	38
10	Efeito da diluição da hemolinfa sobre a atividade trealásica	39
11	Eletroforese analítica do inibidor B em gel de poliacrilamida	40
12	Espectro de absorção do polipeptídeo inibidor B ..	41
13	Eletroforese do inibidor B em gel de poliacrilamida com SDS	42

14	Determinação gráfica do peso molecular do inibidor B	43
15 A	Análise realizada em (HPLC) cromatografia líquida de alta resolução de um hidrolisado do peptídeo inibidor B	44
15 B	Análise realizada em (HPLC) cromatografia líquida de alta resolução, de uma solução de aminoácidos conhecidos utilizados como padrão	44
16	Influência da concentração do inibidor sobre a atividade trealásica	45
17	Efeito da concentração de substrato sobre a atividade anti-trealásica. Determinação da constante de inibição	46

LISTA DE TABELAS

I	Atividade trealásica e anti-trealásica da hemolinfa de Triatoma infestans no período inter-alimentar ..	47
II	Análise das frações obtidas pela ultrafiltração da hemolinfa	48
III	pH Ótimo para atividade trealásica de diferentes insetos vetores	49
IV	Efeito de íons inorgânicos sobre a atividade trealásica	50
V	Análise de aminoácido em (HPLC) cromatografia líquida de alta resolução	51
VI	Estabilidade térmica do inibidor de trealase	52
VII	Efeito da diálise sobre o inibidor da trealase e a trealase	53
VIII	Ocorrência de trealase e seu inibidor em diferentes tecidos de Triatoma infestans	54

RESUMO

É sabido que a hemolinfa dos insetos geralmente contém uma enzima, a trealase, que tem a propriedade de hidrolisar trealose em duas moléculas de glucose. Em *Triatoma infestans*, em determinadas ocasiões isto não ocorre devido a presença de um polipeptídeo de peso molecular 20.000, que associado a uma molécula menor, tem a capacidade de inibir a trealase. Este polipeptídeo apresenta uma composição com predominância dos aminoácidos: ácido glutâmico 22,6%; prolina 12%; e alanina 10,4%; além de hexosaminas. A inibição obtida pela ação do polipeptídeo é do tipo competitivo puro.

INTRODUÇÃO

O dissacarídeo trealose (D-glucopiranosil D-glucopiranosídeo), geralmente é encontrado como: α,α trealose; α,β trealose ou neotrealose e β,β trealose ou isotrealose, que são os isômeros mais comuns. Destes o mais comum, sendo também o principal açúcar da hemolinfa dos insetos é o α ,D-glucopiranosil α ,D-glucopiranosídeo.

A trealose é um açúcar de ampla ocorrência e lhe são atribuídas as mais variadas funções biológicas, as quais estão relacionadas com suas características e propriedades químicas.

Pode ser encontrada em plantas, como substância de reserva⁷⁰; em leveduras atuando na osmoregulação e desempenhando um papel protetor na manutenção da estrutura de macromoléculas e do citoplasma em casos de "stress"⁵⁰; na membrana plasmática em casos de anidrobiose²⁰; como fonte de energia para a divisão celular⁶³; em fungos e leveduras^{9,40,42,60,64,65,86}; em esporos na germinação^{10,38}; em bacilos, no crescimento²; em esporozoários no crescimento⁸⁸; em bactérias^{61,77}; em crustáceos e anelídeos²⁷.

Nos insetos a trealose ocupa um papel fundamental, pois é encontrada na maioria dos tecidos, sendo o principal açúcar da circulação ocupando o lugar reservado a glucose nos mamíferos⁴⁸, também é encontrada nos músculos de vôo dos insetos⁵⁹.

Nos insetos a trealose está envolvida nos processos que

implicam em maior demanda de energia, como o é no caso da muda ²³, do jejum ⁷⁶, e do vôo ¹⁷, onde os níveis de trealose circulante estão diretamente relacionados com a frequência dos batimentos das asas.

Os níveis de trealose na hemolinfa dos insetos se situa em torno de 5% sendo que existem alguns casos especiais como em *Megoura viciae* ²⁶, onde atingem 8,1% e em *Trichiocampus populi* ¹ que na fase pré-pupal atingem 6,8%.

O mecanismo de absorção da trealose era desconhecido até cerca de trinta anos atrás, quando o problema começou a ser estudado por TREHERNE ⁸³ em baratas e posteriormente em *Schistocerca gregaria* ⁸⁵. O método utilizado por ele consistia em encher o intestino do inseto com uma solução de açúcar marcado com carbono 14 e um corante que não era absorvido e, posteriormente, medir a relação entre a radioatividade e a cor. RANDALL e DERR ⁶⁸, utilizando intestinos invertidos do gafanhoto *Melanoplus differentialis*, suspensos em meio contendo glucose, determinaram que não ocorria aumento na concentração interna de açúcar, contrariando o que ocorre normalmente quando a mesma técnica é utilizada com segmentos de intestinos de mamíferos. SHYAMALA e BHAT ⁷⁷, usando intestinos do bicho da seda, *Bombix mori*, verificaram que a glucose radioativa passava pelas paredes nos dois sentidos, indicando difusão. A adição de dinitrofenol não afetou a experiência, não havendo portanto evidência de transporte ativo. Resultados semelhantes foram obtidos por GELPERIM ³⁶, em *Phormia regina*. Ao contrário dos vertebrados, parece que os insetos não utilizam transporte ativo na absorção de açúcares, e estes experimentos sugerem que o mecanismo de transporte de açúcares através das paredes seja

por difusão passiva.

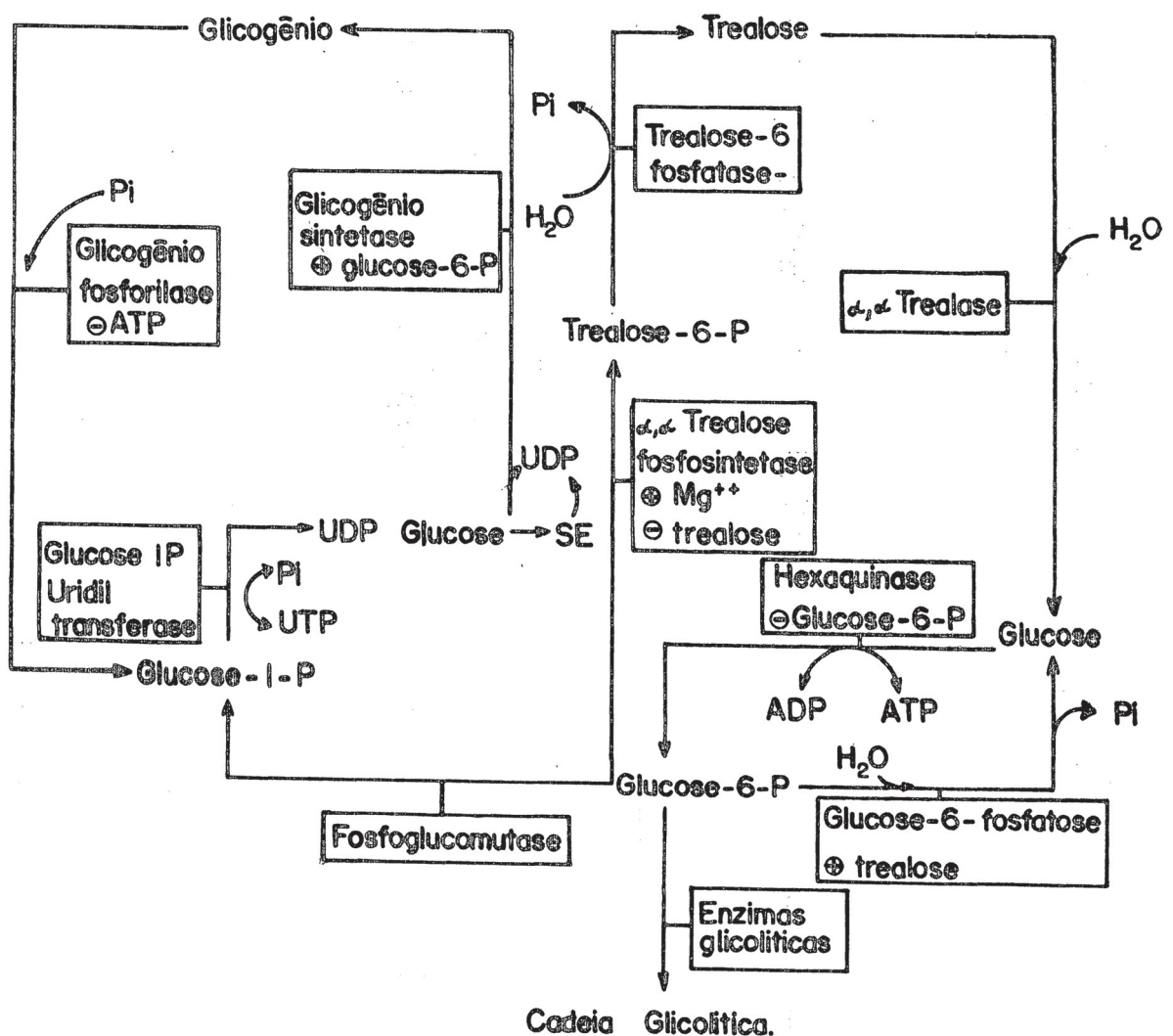
A absorção intestinal de frutose e manose bem como o seu aparecimento na hemolinfa são mais lentos do que a glucose, e também a sua conversão a trealose é mais lenta porque são primeiro convertidos a glucose ²¹. A glucose injetada na hemolinfa "in vivo" é rapidamente convertida a trealose e isto só não ocorre, quando a quantidade do açúcar é tal, que provoca a saturação do mecanismo enzimático de síntese de trealose.

TREHERNE ^{80,81}, verificou que a conversão de glucose a trealose é extremamente rápida. Tanto que uma injeção de 0,14 mg de glucose (C¹⁴) em adultos de **Schistocerca**, deixa um resíduo de apenas 8% da radioatividade inicial após 15 minutos. E CLEGG e EVANS ¹⁷ constataram que quando eram aplicados apenas traços de glucose radioativa, a mesma se reduz 50% após dois minutos da injeção e 90% em dez minutos.

A despeito das implicações que possa ter um mecanismo de absorção passiva de carboidratos, seja em consequência do meio em que vivem os insetos, como do suprimento alimentar, existe uma definida evidência de regulação, pelo menos no que diz respeito a trealose. Os níveis de trealose em insetos podem variar muito mas numa mesma espécie e num mesmo estágio de desenvolvimento parece existir um limiar característico, o qual tende a se manter constante mesmo que ocorram mudanças em seu tipo de nutrição. Entretanto as reservas de glicogênio podem sofrer uma queda sensível. Experiências realizadas com bicho da seda mostraram que, quando deixados em regime de baixa alimentação por uma semana, os níveis de trealose na hemolinfa se mantêm, mas os de glicogênio baixam até a metade dos normais ⁶.

A regulação enzimática via metabólitos, íons e hormônios controla a velocidade de interconversão de glicogênio, trealo

se e glucose nos insetos. Este tipo de controle tem sido mais intensivamente estudado em preparações de corpo gorduroso e de músculo, sendo especialmente importante na manutenção da homeostasia dos açúcares da hemolinfa. Vários ativadores e inibidores enzimáticos que regulam o fluxo de substratos durante a síntese e degradação de glicogênio e trealose tem sido identificados ⁷⁴. Alguns pontos deste controle metabólico e a importância central de Glucose-1-fosfato e Glucose-6-fosfato no controle do metabolismo de carboidratos estão sumarizados abaixo:



Além destes pontos de controle metabólico, um hormônio hiperglicêmico semelhante ao glucagon e talvez um hipoglicêmico semelhante à insulina podem estar regulando o metabolismo de carboidratos em insetos. A presença de um hormônio hiperglicêmico, originário do sistema neuroendócrino dos insetos foi descrito por STEELE⁸⁰, que demonstrou que extrato salino de "Corpora cardíaca" de *Periplaneta americana* causa um aumento no nível de trealose da hemolinfa e um concomitante decréscimo no glicogênio do corpo gorduroso deste inseto. Desde então atividade hiperglicêmica têm sido demonstrada existir também em outras espécies como *Locusta migratória*, *Calliphora erythrocephala* e *Apis mellifera*¹⁶.

Este hormônio foi parcialmente caracterizado e sugerido ser um peptídeo secretado por células neurosecretoras na "corpora cardíaca" ou por células neurosecretoras cerebrais. Aparentemente este hormônio age através do AMP cíclico ativando a glicogênio fosforilase.

O principal alvo deste hormônio hiperglicêmico é o corpo gorduroso, onde ocorre degradação do glicogênio provocando um aumento na velocidade de síntese de trealose, mantendo ótima a concentração de trealose na hemolinfa. Este hormônio pode mobilizar o glicogênio do cordão nervoso parecendo ter pequeno efeito mobilizador sobre o glicogênio de reserva do músculo e intestino.

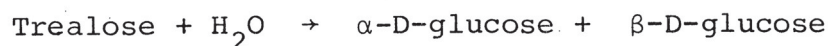
A formação de glucose-1-P a partir do glicogênio de reserva presente no cordão nervoso de *Periplaneta americana* mostrou ser regulada por uma amina fenólica (octopamina) e por um hormônio hiperglicêmico. A octopamina, como ocorre com o hormônio hiperglicêmico, parece ativar a glicogênio fosforilase, aumentan-

do a velocidade de síntese de AMP cíclico, parecendo ser um agente glicogenolítico primário no cordão nervoso. A glucose-1-P liberada do glicogênio permanece no cordão nervoso, sendo utilizada como fonte de energia para o metabolismo nervoso ¹⁶.

Começam a aparecer evidências de que os insetos secretam um hormônio hipoglicêmico em sua "corpora cardíaca". Como exemplo pode ser citado que foi possível detectar, por radioimunoensaio, um material que desempenha propriedades idênticas a insulina em larvas de **Drosophila melanogaster** e na largata do tabaco **Manduca sexta** que, aparentemente, provoca um abaixamento na concentração da trealose da hemolinfa. Assim como acontece nos vertebrados, este hormônio hipoglicêmico deve funcionar facilitando o transporte de glucose através da membrana celular e permitindo a síntese do glicogênio ¹⁶.

O envolvimento preciso destes hormônios hipo e hiperglicêmicos no metabolismo de carboidratos nas diferentes ordens de insetos ainda está para ser completamente elucidado.

Após a absorção ou síntese, a trealose pode ser cataliticamente hidrolisada a glucose para ser então utilizada nas principais vias do metabolismo de carboidratos. Esta hidrólise assim passa a exercer um mecanismo regulador destas vias metabólicas, e é realizada por uma única enzima a trealase (α, α 1-D-glucosidase E.C.3.2.1.28), cuja equação geral é representada abaixo:

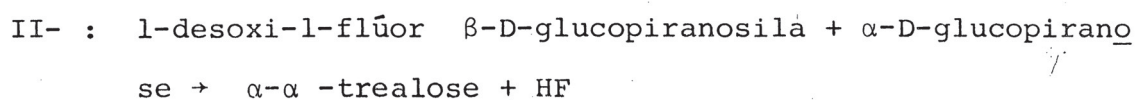
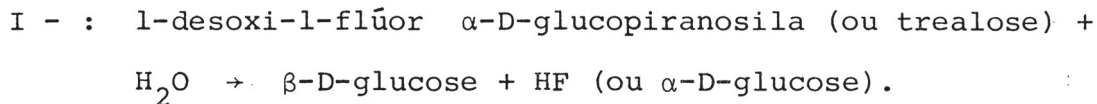


A análise cromatográfica dos produtos da reação catalisada pela trealase renal de porco mostram duas moléculas de α -D-glucose ⁴⁹, a mesma hidrólise catalisada pela trealase de **Sarcophaga barbata** ¹⁸ mostra uma inversão parcial de configuração, ou

seja libera quantidades equimoleculares de α -D-glucose e β -D-glucose. Resultado idêntico foi descrito com trealase de levedura ⁴¹.

A trealase é conhecida como sendo uma enzima altamente específica para a hidrólise de trealose, HEHRE et al, ⁴¹no entanto relatam que trealases isoladas do córtex renal de coelho e de **Candida tropicalis**, parcialmente purificadas, podem hidrolisar l-desoxi-l-flúor α -D-glucopiranosila ou l-desoxi -l-flúor β -D-glucopiranosila, bem como catalisar a transferência do grupamento glucosila de l-desoxi-l-flúor β -D-glucopiranosila para o acceptor α -D-glucopiranose, formando α,α -trealose como um intermediário que é rapidamente hidrolisado. O sítio ativo, responsável pela hidrólise desses substratos, parece ser comum a trealose, uma vez que eles inibem a enzima competitivamente.

Assim, a trealase pode catalizar as duas reações:



Recentemente Kasumi et al, ⁴⁷ relataram que a trealase possui atividade de transglicosilase, em que promove a síntese de α -D-glucopiranosil α -D-xilopiranosídeo a partir de β -D-glucosil-fluoride e α -D-xilose. A trealase tem sido encontrada a exemplo da trealose numa grande variedade de organismos inclusive em alguns que não armazenam e nem sintetizam a trealose, porém a ingerem na dieta. A demonstração desta enzima em insetos foi feita em cabeça, torax e abdômen de caruncho de batata por FREREJAQUE ²⁹.

O intestino dos insetos possuem trealases bastante ativas, apesar deles normalmente não ingerirem trealose ^{7,91}, ou ingerirem em quantidades muito pequenas, acredita-se que sua presença possa estar relacionada a um mecanismo de absorção de açúcares, que visa prevenir a perda de trealose por difusão. Evidências da perda de trealose pelo intestino são dadas pelos manãs ^{52,53} e por sua presença ocasional em mel de abelha.

No corpo gorduroso dos insetos, ocorre a conversão de glucose e glicogênio à trealose, que desta forma é liberada na hemolinfa para atender às funções que demandam energia através de sua hidrólise à glucose por ação da trealase. SACKTOR E WORMSER-SHAVIT ⁷², estudando a via glicolítica em músculo de vôlei de **Phormia regina**, concluíram que a clivagem enzimática da trealose pela trealase é limitante na regulação da glicólise. Posteriormente, SACKTOR ⁷³ observou que, a trealase está envolvida no transporte de glucose na mucosa da parede intestinal e no tecido renal de mamíferos ^{22,73}.

Em corpo gorduroso a trealase normalmente apresenta baixa atividade ⁴⁴, apenas CHANG et al ^{12,13}, relataram uma trealase em corpo gorduroso de **Samia ricini**, que é bastante ativa no tempo de muda.

Foram encontradas múltiplas formas de trealase em tecidos de um mesmo inseto e até em um mesmo tecido. A trealase de músculo tem sido encontrada associada a partículas celulares ocorrendo também em forma solúvel (que é característica da hemolinfa e intestino), mas são distintas eletroforeticamente ³².

Em **Phormia regina** ³³, foram descritas trealases eletroforeticamente e cineticamente distintas em função dos diferen-

tes tecidos. E ainda demonstradas duas isoenzimas A e B, sendo a primeira característica de intestino e hemolinfa e a segunda de cabeça, músculo e papila retal do inseto. Em *Vespa orientalis*, existe referências a sete isoenzimas de trealase³⁴ em midgut de larvas. Na hemolinfa a ocorrência de trealase foi primeiramente descrita por HOWDEN e KILBY⁴⁴, que verificaram altos valores de atividade enzimática em *Schistocerca gregaria*.

FRIEDMAN^{30,31,33} estudando trealase em hemolinfa de *Phormia regina*, observou inicialmente que a atividade trealásica aumentava quando submetia a hemolinfa à diluições crescentes, sugerindo a presença de um inibidor que teria natureza proteica, associado a um ion metálico. Estas suposições foram baseadas na característica termolabil do inibidor e na suspensão da inibição, por diálise contra EDTA. MATTHEWS et al⁵⁸ sugerem que a ativação por diluição seria decorrente da lise dos hemócitos, verificada em função da quebra do equilíbrio osmótico, uma vez que detectou a enzima em soro e hemócitos de *Periplaneta americana*. KATAGIRI⁴⁹, trabalhando com trealase de soro livre de hemocitos, empregando técnicas cromatográficas e radioautográficas, confirmou que a mesma estava realmente localizada nos hemócitos.

FRIEDMAN³³, observou que os tratamentos empregados para aumentar a atividade trealásica da hemolinfa i.e., aquecimento a 55° por dois minutos e diálise contra EDTA 50 Mm, são ineficazes quando empregados em outros tecidos, mas constatou entre tanto que o inibidor existente na hemolinfa era capaz de atuar sobre estas formas de trealase. Foram também relatadas a presença de inibidores de trealase em *Phormia regina*³⁰, em *Triatoma vitticeps*^{8,19} e em *Neurospora crassa*⁸¹, da qual foi iso

lado um inibidor de trealase de natureza proteica.

Considerando a importância do papel desempenhado pela trealase no metabolismo de carboidratos em insetos, pareceu-nos oportuno estudar o mecanismo de regulação da referida enzima de **Triatoma infestans**, visto que esse triatomídeo se constitui num dos hospedeiros do **Trypanosoma cruzi** agente etiológico da doença de Chagas.

Neste trabalho nos propomos a isolar a trealase de **Triatoma infestans**, do seu inibidor bem como, purificar e identificar bioquimicamente este inibidor.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. - REAGENTES QUÍMICOS

Os reagentes químicos empregados neste trabalho eram de grau de pureza analítico e foram obtidos das melhores fontes comerciais.

2.2. INSETOS

2.2.1. - OBTENÇÃO

Os insetos utilizados neste trabalho para obtenção da trealase e do inibidor, foram adultos e ninfas de quinto estágio de *Triatoma infestans*, *Triatoma vitticeps*, *Rhodnius prolixus*, *Panstrongilus megistus* e *Diphetalogaster maximus*, que foram gentilmente cedidos pelo Dr. José Jurberg do Instituto Osvaldo Cruz (Fiocruz), do Rio de Janeiro e pelo Prof. Ionizete Garcia do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná.

2.2.2. - MANUTENÇÃO

Os insetos foram mantidos a uma temperatura média de 25° e umidade de 80%, acondicionados em frascos plásticos de 9 cm x 13 cm, fechados na extremidade superior com uma tela para permitir a alimentação.

2.2.3. - ALIMENTAÇÃO

A alimentação era realizada em média a cada trinta dias e foram utilizados sangue de bovinos e galinhas, adotando-

se o seguinte procedimento:

2.2.3.1. - SANGUE DE GALINHAS

As aves tinham a penugem do peito removida e eram contidas em um cavalete especialmente preparado para esta finalidade que possibilitava encostar o frasco contendo os insetos, diretamente na superfície depenada, permitindo aos mesmos alimentarem-se através da tela.

2.2.3.2. - SANGUE DE BOVINOS

O sangue era previamente coletado com citrato a 3,8% (p/V). Para efetuar a alimentação em laboratório era utilizado um aparelho de vidro, figura 1, desenvolvido por GARCIA et al ³⁵, acoplado a um banho-maria circulante para manter o sangue a temperatura conveniente (37 - 40°). Todo o sistema era montado em uma bancada contendo vários aparelhos (alimentadores), permitindo a alimentação simultânea em igual número de frascos contendo os insetos.

2.2.4. - EXTRAÇÃO DA HEMOLINFA

A hemolinfa dos insetos anteriormente citados era extraída por secção dos espinhos pronotais laterais e coletada diretamente a um capilar. Toda a operação era efetuada em banho de gelo (0-4°). O volume médio obtido por inseto era de 20 a 30 microlitros por inseto adulto e cerca de 40% a mais nas ninfas de quinto estágio. Este volume de hemolinfa pode ser extraído sem sacrificar o inseto que, se necessário, pode ser utilizado para outras extrações.

A hemolinfa pode ser armazenada a -5° por vários meses que a enzima e o inibidor permanecem estáveis.

2.3. - PREPARAÇÃO DE EXTRATOS LIVRES DE CÉLULAS DE DIFERENTES TECIDOS DO *TRIATOMA INFESTANS*.

Os insetos foram dissecados com auxílio de lupa, em placa de Petri e os órgãos lavados em tampão McIlvaine gelado, pH 5,6.

Os tecidos foram macerados isoladamente em tubos de ensaio de (0,9cm x 7 cm), com bastão de vidro, e a extração foi feita utilizando três volumes do mesmo tampão.

Os homogenados eram centrifugados a 17.300 x g por 15 minutos em centrífuga Sorval RC-5 da Dupont Instruments, e o sobrenadante era dialisado por uma noite contra água destilada, com agitação em câmara fria. Após a diálise os extratos livres de células foram armazenados a -15°C, sob estas condições a trealase e o inibidor permaneciam por vários meses, sem perda significativa de suas atividades.

2.4. - MÉTODOS QUANTITATIVOS DE ANÁLISE

2.4.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE TREALÁSICA

O sistema de incubação padrão continha: 10 µl de tampão McIlvaine pH 5,6 (ácido cítrico 0,1M e fosfato de sódio dibásico 0,2 M), preparação de enzima conforme indicado e água destilada num volume final de 50 µl. Após uma hora a 37°C a reação era parada pela adição de 0,5 ml do reativo de SOMOGYI⁷⁸, mais 0,45 ml de água destilada e aquecido a 100°C por quinze minutos. Os tubos eram resfriados em banho de gelo e adicionados 0,5 ml do reativo de NELSON⁶². O volume final era ajustado para 2.5 ml com água destilada, e a densidade ótica lida a 535nm em espectrofotômetro Coleman JR., modelo 6A de Coleman Instruments, α-D-glucose foi utilizada como padrão.

Todos os ensaios foram feitos em duplicata acompanhados de um tubo controle, ao qual o substrato era adicionado após a incubação.

A trealase utilizada nos experimentos deste trabalho, salvo indicação em contrário, corresponde a fração retida por ultrafiltração empregando membrana PM 30, conforme descrito a diante.

2.4.2. - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-TREALÁSICA

Os métodos aqui descritos para avaliação da atividade anti-trealásica são baseados na inibição da hidrólise da trealose misturando as preparações em estudo, que contém o inibidor, e a enzima.

A atividade anti-trealásica é medida pela diferença entre os graus de hidrólise de uma concentração conhecida de trealose, por uma quantidade determinada de enzima e outro sistema contendo a mesma quantidade de enzima acrescida de uma quantidade conveniente do inibidor.

Existem diversos modos de expressar a atividade anti-trealásica. A maneira adotada neste trabalho é pela porcentagem de inibição.

$$\% \text{ inibição} = \frac{(T) - (T + I)}{(T)} \times 100$$

onde (T) = velocidade da reação não inibida

(T + I) = velocidade da reação inibida

A hemolinfa utilizada para obtenção do inibidor era extraída 18 dias após a alimentação, nas ninfas de 5º estágio e 22 dias, nos adultos.

2.4.3. - UNIDADE ENZIMÁTICA

Definiu-se como uma unidade de atividade trealásica, a quantidade de enzima que libera 1 nanomol de glucose por minuto nas condições padrão do ensaio.

2.4.4. - ATIVIDADE ESPECÍFICA

É o número de unidades de enzima por miligramas de proteína, ou seja nmoles de glucose liberados. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

2.5. - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas das preparações foram medidas pelo método de LOWRY et al ⁵⁶, empregando soro albumina bovina (Sigma) como padrão.

2.6. - ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

2.6.1. CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE SEPHADEX G-50

Foram aplicados 0,5 ml de hemolinfa em uma coluna de Sephadex G-50 de 0,8 cm x 12 cm, previamente lavada com KCl 0,1M e com água destilada e equilibrada com tampão McIlvaine pH 5,6.

A eluição foi feita com o mesmo tampão e frações de 0,3 ml foram coletadas com fluxo de 0,5 ml por minuto. Para detectar as frações que continham inibidor foram realizados ensaios cruzados usando o sistema padrão de incubação acrescido de 10 μl do material das frações que não apresentavam atividade trealásica.

2.6.2. ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO

A análise da composição em amino ácidos do inibidor foi executada, submetendo o peptídeo a uma hidrólise ácida em HCl 6N a 110° por 96 horas, e analisando os resíduos obtidos por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Foi empregado para análise o método de formação de produtos fluorescentes obtidos pela combinação de amins primarias e secundárias com o-Phthaldeido (OPA) e hipoclorito de sódio (NaCl O) na presença de 2-mercaptoetanol, conforme técnica descrita por ISHIDA et al⁴⁵.

A detecção do triptofano foi executada utilizando o reativo de ERHLICH²⁴ (Solução a 2% (P/V) de 4-dimetil amino benzaldeido em uma solução de HCl a 20% (V/V) em acetona pura).

2.7. - DETERMINAÇÃO DE HEXOSAMINAS

As hexosaminas foram determinadas quimicamente pelo método de Elson-Morgan, modificado por BOAS⁵.

2.8. - ULTRAFILTRAÇÃO DA HEMOLINFA

As hemolinfas de adultos e ninfas de 5º estágio de *Triatoma infestans* previamente dialisadas foram submetidas a ultrafiltração. O procedimento adotado foi filtrar uma vez usando ultrafiltro Diaflo PM 10. da Amicon, que filtra substâncias com peso molecular até 10.000 daltons, repor o material retido ao seu volume original, com água destilada, e repetir a ultrafiltração usando filtro Diaflo PM 30, que filtra substâncias com peso molecular até 30.000 daltons. Estas operações foram realizadas em banho de gelo.

As ultrafiltrações foram efetuadas em células de

ultrafiltração Amicon, usando filtros de 25mm de diâmetro e as especificações já descritas acima. A pressão de ultrafiltração foi de $2,5 \text{ Kg/cm}^2$ utilizando nitrogênio gasoso pressurizado.

Os filtrados resultantes da ultrafiltração em filtros PM10 e PM30 foram denominados respectivamente de inibidor A e inibidor B. O material retido na membrana PM30 contém a enzima. Quando tratarmos da ação do inibidor sem indicar a fração estaremos tratando da mistura das frações A e B do inibidor.

2.9. - DIÁLISE

Os extratos de diferentes tecidos (0,4-0,5 ml), bem como a hemolinfa foram dialisados contra 500 ml de água destilada em camara fria, com agitação, por doze horas, com três trocas de líquido, salvo quando indicado em contrário.

2.10. - ELETROFORESE ANALÍTICA DO INIBIDOR B EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Foi utilizado como suporte de corrida gel de poliacrilamida a 8% em tubos de vidro de (0,7 cm x 10 cm), com persulfato de amônio como catalisador.

A operação foi realizada em câmara fria a 4°C durante três horas, usando aparelho Ortec Mod. 4200 a 300 V e 5mA por tubo usando-se um sistema descontínuo de tampão Tris-glicina pH 8,2, 50 mM. Como marcador foi utilizado azul de bromofenol (ABF) a 0,1%.

Foram empregados como marcadores moleculares fosforilase B (94.000), soro albumina bovina (67.000), ovo albu-

mina (43,000), anidrase carbônica (30,000), inibidor de tripsina (20.100), e lacto albumina (14.400).

As bandas de proteínas foram reveladas com Coomassie Azul Brilhante R-250 a 0,1%, em uma mistura aquosa contendo 10% de ácido acético e 25% de metanol.

Após a eletroforese o eletroforograma não tratado com Coomassie foi comparado com um padrão de migração para localização das bandas de proteína e cortado em fatias de 2mm na porção correspondente a banda de proteína, homogeneizado em tampão McIlvaine pH 5,6, centrifugado a 12.000 x g por cinco minutos, para determinação da atividade anti-trealásica.

2.11. - DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DO INIBIDOR B EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO SDS.

Foi utilizado como suporte de corrida, gel de poliacrilamida a 12% em tubos de 0,7 cm x 10 cm, usando per - sulfato de amônio como catalisador.

Antes da aplicação os marcadores moleculares e a amostra foram submetidas a tratamento com o tampão de desnaturação, que consistia de SDS a 4%, glicerol a 40%, Tris-HCl 125 mM pH 6,8, EDTA 10 mM, beta-mercaptoetanol a 10% e azul de bromofenol a 0,004 %; e fervidas durante seis minutos.

A corrida foi realizada a temperatura ambiente num aparelho ORTEC Mod. 4200, a 60V a 3mA por tubo, usando tampão Tris-glicina pH 8,2 50 mM contendo 0,1% de SDS.

2.12. - DETERMINAÇÃO DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO

As frações A e B do inibidor de trealase da hemolinfa de **Triatoma infestans** foram analisadas em espectrofotometro Varian, modelo 635, usando faixa de comprimento de onda de 160 a 700 nm.

RESULTADOS

3.1. - ATIVIDADE TREALÁSICA E ANTI-TREALÁSICA DA HEMOLINFA DE **TRIATOMA INFESTANS** NO PERÍODO INTER-ALIMENTAR

A variação na atividade trealásica e anti-trealásica da hemolinfa em função do intervalo entre duas alimentações é mostrada na Tabela I.

A alimentação dos insetos foi feita conforme descrito em Materiais e Métodos, sendo a hemolinfa extraída de lotes de cinquenta insetos, para cada intervalo de tempo.

Os resultados apresentados mostram que para o inseto adulto a atividade trealásica no início do período é de 0,141 UE, decrescendo até os vinte e dois dias (0,85 UE) e aumentando novamente para atingir níveis máximos aos quarenta dias (0,606 UE). Situação inversa ocorre com o inibidor que apresenta uma atividade máxima aos vinte e dois dias, decrescendo depois até atingir valor nulo aos 40 dias.

Quanto às ninfas de quinto estágio o comportamento é semelhante, observando-se entretanto a menor atividade enzimática aos 18 dias após a alimentação, que corresponde aos níveis máximos de inibidor.

3.2. - SEPARAÇÃO DA TREALASE E PURIFICAÇÃO DE SEU INIBIDOR PRESENTES NA HEMOLINFA DE **TRIATOMA INFESTANS**

3.2.1. - TRATAMENTO DA HEMOLINFA EM SEPHADEX G-50

Para se comprovar que a baixa atividade trealásica encontrada na hemolinfa era ocasionada por uma substância inibidora e também para tentar obter esta substância em frações diferentes a da enzima, submeteu-se a hemolinfa a cromatografia em Sephadex G-50.

Os resultados apresentados na figura 2, demonstram a presença efetiva de um inibidor de trealase presente na hemolinfa o qual foi separado da enzima.

3.2.2. - TRATAMENTO DA HEMOLINFA POR ULTRAFILTRAÇÃO

A ultrafiltração da hemolinfa empregando membranas Diaflo PM-10. e PM-30, conforme descrito em Materiais e Métodos resulta em três frações distintas, inibidor A, inibidor B e a enzima (trealase).

Os resultados apresentados na Tabela II mostram que a atividade anti-trealásica sobre a trealase do fungo **Scopulariopsis brevicaulis**, somente se manifesta quando as frações A e B do inibidor são empregadas ao mesmo tempo, conseguindo assim uma inibição da ordem de 56%. Por outro lado quando a trealase é de **Triatoma infestans** ambas as frações possuem capacidade inibitória: sendo de 15 a 17% quando era empregado o inibidor A e 40 a 41% quando o inibidor era a fração B, esta inibição foi potencializada pelo emprego simultâneo das duas frações, atingindo de 80 a 90% de inibição.

3.3. - PROPRIEDADES DA TREALASE DA HEMOLINFA DE **TRIATOMA INFESTANS**

3.3.1. - EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE TREALÁSICA

Os resultados obtidos na figura 3 mostram que a velocidade da hidrólise é linear até 120 minutos de incubação .

Em ensaios posteriores foi adotado o tempo de 60 minutos de incubação porque, neste tempo a quantidade de glucose liberada, estava dentro da faixa de sensibilidade do método de dosagem adotado.

3.3.2. - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA SOBRE A ATIVIDADE TREALÁSICA

Foi empregado o sistema padrão de incubação descrito em Materiais e Métodos, variando a concentração de proteínas (enzima), conforme indicado na figura 4.

Os resultados obtidos mostram uma linearidade entre a quantidade de enzima e a atividade.

3.3.3. - INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE TREALÁSICA

Os ensaios foram realizados empregando o mesmo sistema de incubação para a atividade trealásica, descrito em Materiais e Métodos, variando a temperatura de incubação como demonstra a figura 5.

Os resultados indicam que a temperatura ótima para a atividade trealásica é de 50°. A temperatura de trabalho aqui adotada, 37° apresenta uma atividade em torno de 75% da máxima

xima. A uma temperatura de 60° ocorre inativação total de enzima.

3.3.4. - ESTABILIDADE TÉRMICA DA TREALASE DA HEMOLINFA DE *TRIAATOMA INFESTANS* A 60 E 70°

Os ensaios foram realizados com hemolinfa previamente ultrafiltrada e dialisada conforme descrito em Materiais e Métodos. A hemolinfa foi aquecida a 60 ou 70° conforme indicado na figura 6 e posteriormente incubada, empregando o sistema padrão de incubação para atividade trealásica.

Com base nos valores de atividade obtidos, constatamos que a 60° o tempo necessário para que o decréscimo de velocidade da reação enzimática seja correspondente a metade da velocidade inicial ($t^{1/2}$), é de 3 minutos, este tempo se reduz em 50% aproximadamente com um aumento de 10° na temperatura.

3.3.5. - EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE TREALÁSICA

Os dados apresentados na figura 7 mostram a influência da concentração de H^+ sobre a atividade da trealase obtida da hemolinfa de *Triatoma infestans*. Observa-se a ocorrência de uma curva bifásica com picos de atividade em pH 4,2 e 6,2 para as ninfas de 5° estágio e pH 4,4 e 5,6 para os adultos, sugerindo a existência de diferentes formas moleculares da enzima.

3.3.6. - DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO DE ATIVIDADE PARA TREALASES DE HEMOLINFA DE DIFERENTES INSETOS VETORES

Com o objetivo de verificar se outros insetos vetores da doença de chagas apresentavam trealases com comportamento semelhante ao observado em *Triatoma infestans* com relação ao efeito do pH, foi realizado este experimento.

Como pode ser observado pelos dados apresentados na tabela III, apesar de ocorrerem variações quanto aos valores de pHs ótimo, em todos os casos ocorreram curvas bifásicas.

3.3.7. - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE TREALOSE SOBRE A ATIVIDADE CATALÍTICA DE TREALASE: DETERMINAÇÃO DA CONSTATANTE DE MICHAELIS-MENTEN

As figuras 8 e 9 mostram o efeito da concentração de trealose sobre a atividade da trealase. A influência da concentração de substrato sobre a atividade enzimática foi determinada em ambos os valores de pH ótimo pelo método gráfico dos duplo recíprocos de LINEWEAVER e BURK⁵⁵, os valores de Km obtidos foram de 0,94 mM em pH 6,2 para as ninfas e pH 5,6 para os adultos e de 1,16 mM em pH 4,2 para as ninfas e pH 4,4 para os adultos.

Foram efetuadas também curvas de concentração de substrato a 10 e 20 minutos para determinação da velocidade inicial, sendo coincidentes os resultados obtidos para a constante cinética.

3.3.8.- EFEITO DE ÍONS INORGÂNICOS SOBRE A ATIVIDADE TREALÁSICA

A hemolinfa foi submetida aos procedimentos usuais para separar o inibidor e a enzima, posteriormente esta foi incubada para medida da atividade trealásica utilizando o sistema padrão descrito em Materiais e Métodos acrescido dos metais indicados na tabela IV.

Os resultados apresentados mostram que, com exceção do Ca^{++} , os outros metais interferem na atividade trealásica sendo que o Fe^{+++} , tem o maior efeito inibidor.

3.4 - EFEITO DA DILUIÇÃO DA HEMOLINFA SOBRE A ATIVIDADE TREALÁSICA.

Com a finalidade de averiguar se a localização da trealase é preferencialmente intracelular foi alterado o equilíbrio osmótico para romper os hemócitos e liberar a trealase que porventura estivesse localizada nestes.

A hemolinfa foi coletada como descrito em Materiais e Métodos e diluída contra água destilada empregando as diluições indicadas na figura 10.

Os resultados obtidos mostram que ocorre um aumento linear na atividade trealásica à medida que duplicamos a diluição, este aumento na atividade ocorre até uma determinada diluição, sugerindo que provavelmente houve rompimento de todos os hemócitos atingindo-se o máximo de atividade enzimática.

3.5 - HOMOGENEIDADE DO INIBIDOR B

O inibidor B foi submetido a uma eletroforese analítica usando o gel de poliacrilamida a 8% e uma amostra de 20 μg de proteína,

conforme técnica descrita em Materiais e Métodos.

A figura 11 mostra presença de uma única banda proteica, o que indica a homogeneidade do material.

A presença de atividade anti-trealásica foi constatada cortando o gel em fatias de 2 mm na região correspondente banda proteica e seguindo os procedimentos descritos em Materiais e Métodos.

3.6 - CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES DO INIBIDOR DE TREALASE DA HEMOLINFA DE **TRIATOMA INFESTANS**

3.6.1 - PROPRIEDADES ÓTICAS DO INIBIDOR B

O espectro de absorção mostrado na figura 12, relativo ao inibidor B, evidencia uma intensa absorção de luz na faixa do ultravioleta em 280 nm, esta absorção é característica de alguns aminoácidos (tirosina e triptofano), o que sugere a natureza proteica do inibidor.

Procedimento semelhante foi aplicado ao inibidor A, este porém não absorveu luz dentro da faixa ultravioleta, bem como na visível.

3.6.2 - DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DO INIBIDOR B

Com o objetivo de verificar se o inibidor B é constituído de uma única cadeia proteica e ainda para determinar o seu peso molecular foi realizada a eletroforese analítica em gel de poliacrilamida com SDS (Dodecil Sulfato de Sódio), empregando-se as condições descritas em Materiais e Métodos.

Foi constatada a presença de uma única banda eletroforética indicando tratar-se de um polipeptídeo de cadeia única (figura 13).

Foi realizado, simultaneamente, uma corrida empregando proteínas de peso molecular conhecido: fosforilase B (94.000); soro albumina bovina (67.000); ovo albumina (43.000); anidrase carbônica (30.000); inibidor de tripsina (20.100); lacto albumina (14.400), utilizadas como padrão para, com base em sua mobilidade relativa, calcular graficamente o peso molecular do peptídeo inibidor, que, por este método, foi estimado em aproximadamente, 20.000 daltons, como mostra a figura 14.

3.6.3 - COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDOS DO INIBIDOR B

A análise dos resíduos de aminoácidos do inibidor B, efetuada por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) está apresentada na tabela V e mostra uma predominância dos aminoácidos ácido glutâmico 22,6%, prolina 12% e alanina 10,4%.

A hidrólise ácida provocou a destruição do triptofano mas sua presença na proteína foi detectada pelo emprego do reativo de ERHLICH²⁴, conforme técnica descrita em Materiais e Métodos.

O cromatograma mostrado na fig. 15.a. apresenta picos semelhantes aos de hexosaminas. Para confirmar o ocorrido foi realizada uma análise química qualitativa. O método empregado foi o de ELSON-MORGAN modificado por BOAS⁵, que revelou a presença de 5,76% de hexosaminas na composição do inibidor.

3.6.4 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO INIBIDOR SOBRE A ATIVIDADE TREALÁSICA

Os resultados da figura 16 mostram que 0,25 µg do inibidor B provocou 55 a 60% de inibição, enquanto que 0,5 µg inibiu somente 75 a 80% a reação, permanecendo neste nível mesmo aumentando a concentração do inibidor.

3.6.5 - EFEITO DO INIBIDOR SOBRE A ATIVIDADE TREALÁSICA E DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE INIBIÇÃO

Para determinar a constante de inibição foi usado o método dos duplos recíprocos e a relação de Massey⁵⁷. A trealase utilizada era da hemoninfa de ninfas de quinto estágio e a incubação foi realizada em pH 5,6 (fig. 17).

Os resultados obtidos mostram uma inibição do tipo competitiva, com uma constante de inibição de $2,34 \times 10^{-4}$ mM em relação ao inibidor B.

3.6.6 - ESTABILIDADE TÉRMICA DO INIBIDOR DE TREALASE

As duas frações do inibidor obtidas por ultrafiltração foram submetidas a aquecimento, individualmente, como mostrado na tabela VI e incubadas conforme o sistema padrão para atividade anti-trealásica.

Os resultados obtidos mostram que o inibidor B quando submetido a um aquecimento de 55° por dois minutos reduziu em 90% sua capacidade inibidora frente a trealase, enquanto que o inibidor A submetido as mesmas condições não foi afetado.

3.6.7 - EFEITO DA DIÁLISE SOBRE O INIBIDOR DE TREALASE DA HEMOLINFA DE *TRITOMA INFESTANS*

A hemolinfa foi repartida em três frações que foram dialisadas respectivamente contra EDTA 50 mM pH 7,0, água gelada e tampão fosfato 50 mM pH 6,2. Posteriormente, foram submetidos a ultrafiltração conforme descrito em Materiais e Métodos.

Os resultados apresentados na tabela VII mostram que o inibidor A quando dialisado contra 50 mM de EDTA pH 7,0 tem sua capacidade inibitória reduzida em 100% tratamento este que não afeta o inibidor B. Na diálise contra tampão fosfato ocorre apenas uma diminuição do efeito inibidor que é mais prontamente notada quando misturamos as duas frações do inibidor. A adição de 0,1 e 0.01 M de $MgCl_2$, $MnCl_2$, $CuCl_2$, $FeCl_3$ $CaCl_2$ à fração que continha o inibidor A, não foi capaz de reverter o efeito do EDTA.

3.7 - OCORRÊNCIA DA TREALASE E DO INIBIDOR EM DIFERENTES TECIDOS DE *TRITOMA INFESTANS*

A obtenção dos extratos livres de células foi efetuada conforme descrito em materiais e métodos.

Os resultados apresentados na tabela VIII, mostram que todos os tecidos pesquisados apresentam atividade trealásica. Porém com exceção da hemolinfa, apenas o proctodeo apresenta atividade anti-trealásica.

Tanto o inibidor obtido da hemolinfa, como o do proctodeo, foram capazes de inibir a trealase de todos os tecidos testados.

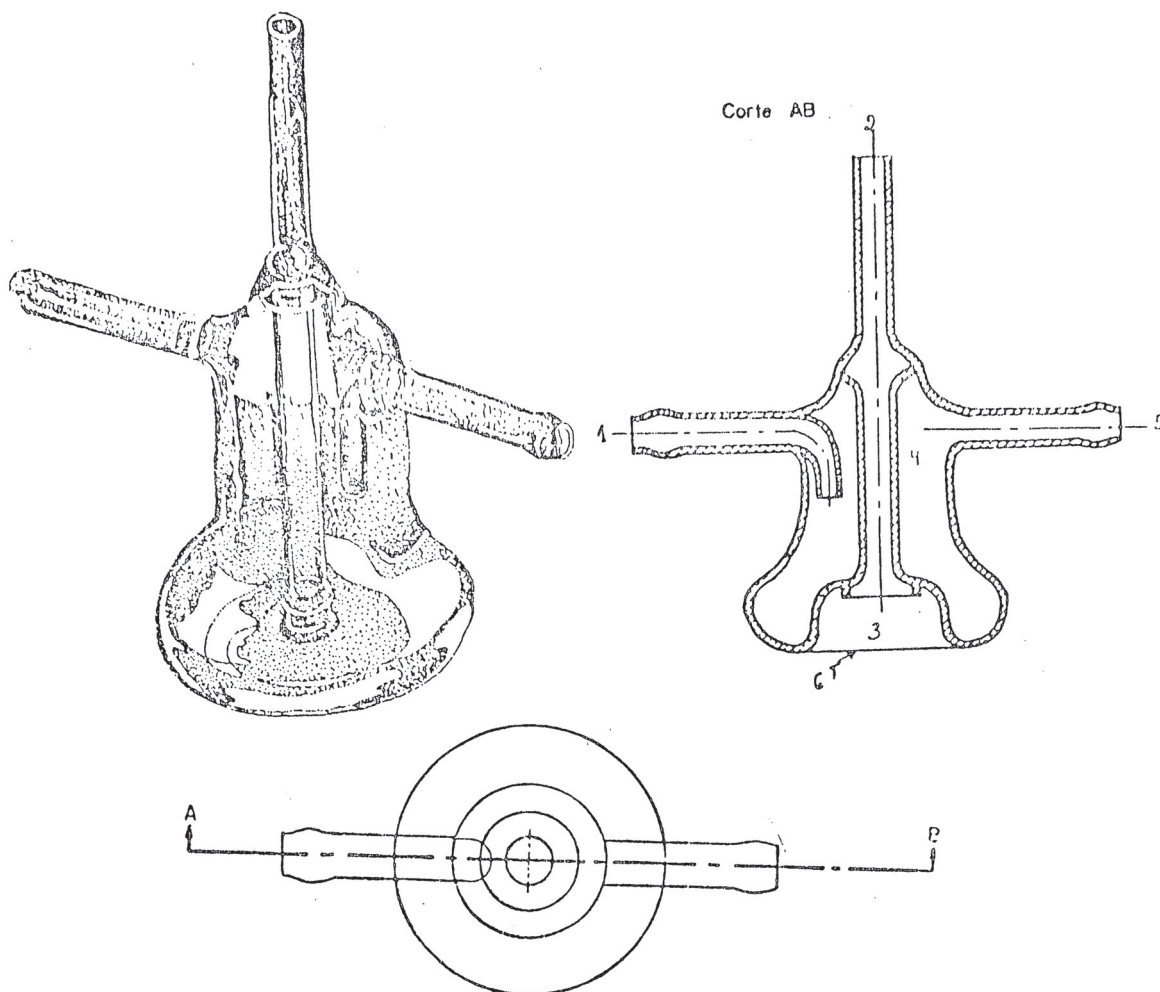


FIGURA 1 - ALIMENTADOR ARTIFICIAL (Aparelho confeccionado em vidro Pirex)

- 1 - Entrada de água aquecida;
- 2 - Orifício para injeção de sangue;
- 3 - Câmara para o sangue;
- 4 - Câmara para circulação de água quente;
- 5 - Saída de água aquecida;
- 6 - Membrana para alimentação.

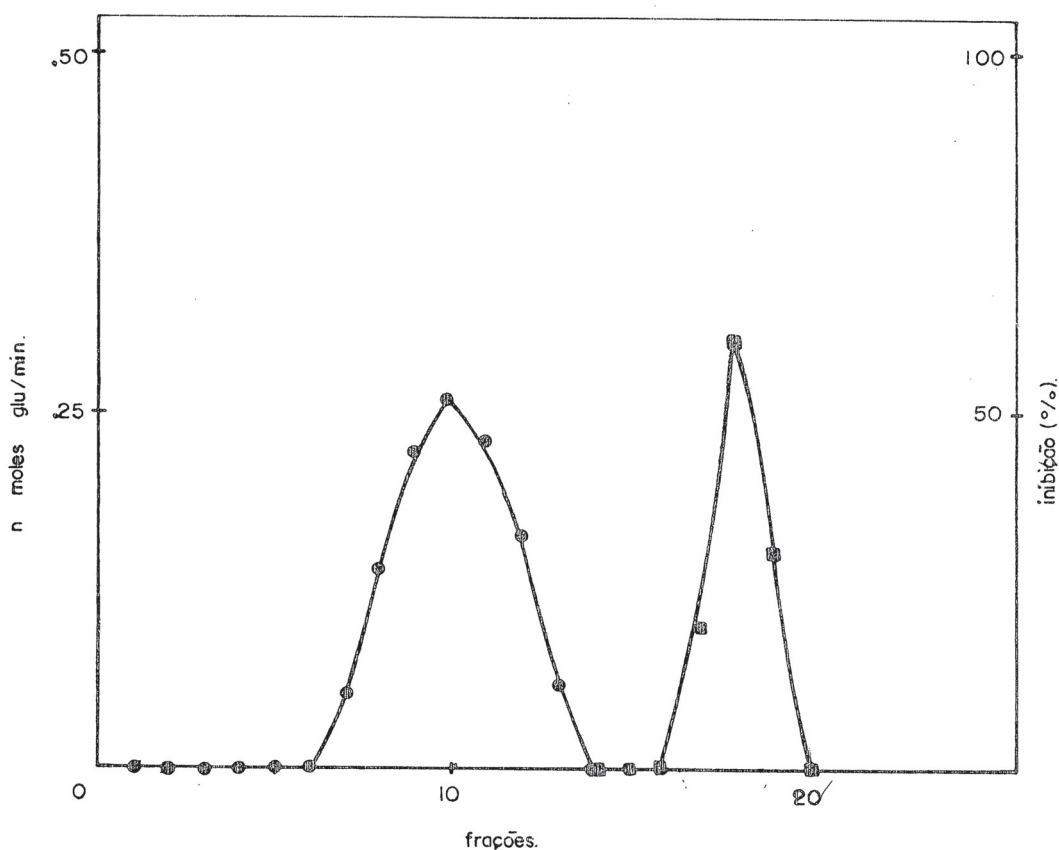


FIGURA 2 - SEPARAÇÃO DA TREALASE E SEU INIBIDOR POR CROMATO - GRAFIA EM COLUNA DE SEPHADEX G-50.

Uma amostra de 0,5 ml de hemolinfa foi aplicada a uma coluna de Sephadex G-50 (0,8 cm x 12 cm), equilibrada e eluída como descrito em Materiais e Métodos. Foram coletadas frações de 0,3 ml.

A análise das frações que continham o inibidor foi feita através de ensaios cruzados, usando-se o sistema padrão de incubação para atividade trealásica, descrito em Materiais e Métodos, acrescido de 10 μ l das respectivas frações que não apresentavam atividade trealásica.

(■) inibidor

(●) trealase

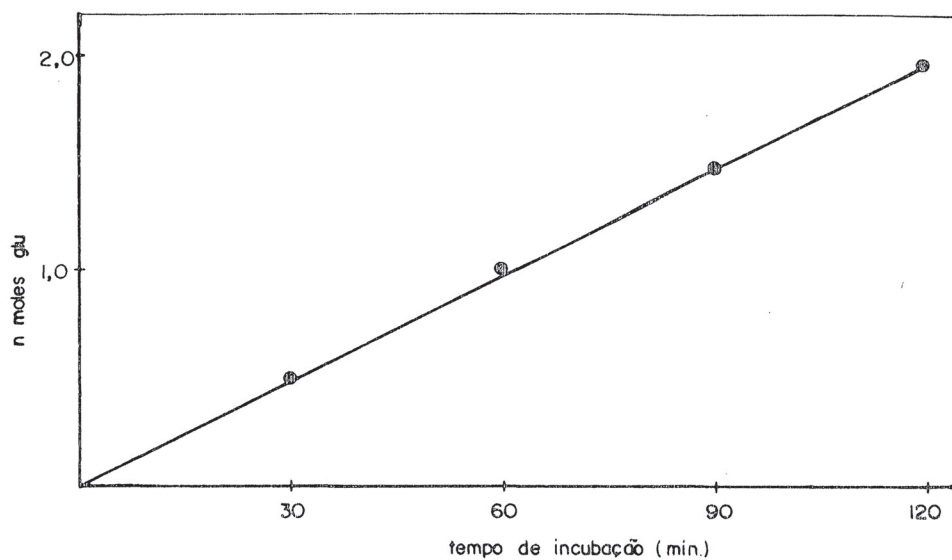


FIGURA 3 - EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE A ATIVIDADE TREALÁSICA

Sistema de incubação - 10 μ l de tampão McIlvaine pH 5,6; 2,0 μ moles de trealose; 0,88 mg de proteína (enzima) e água destilada suficiente para 0,05 ml. O sistema foi incubado a 37 $^{\circ}$ variando o tempo de incubação como indicado. A glicose liberada foi medida pelo método de SOMOGYI-NELSON conforme técnica descrita em Materiais e Métodos.

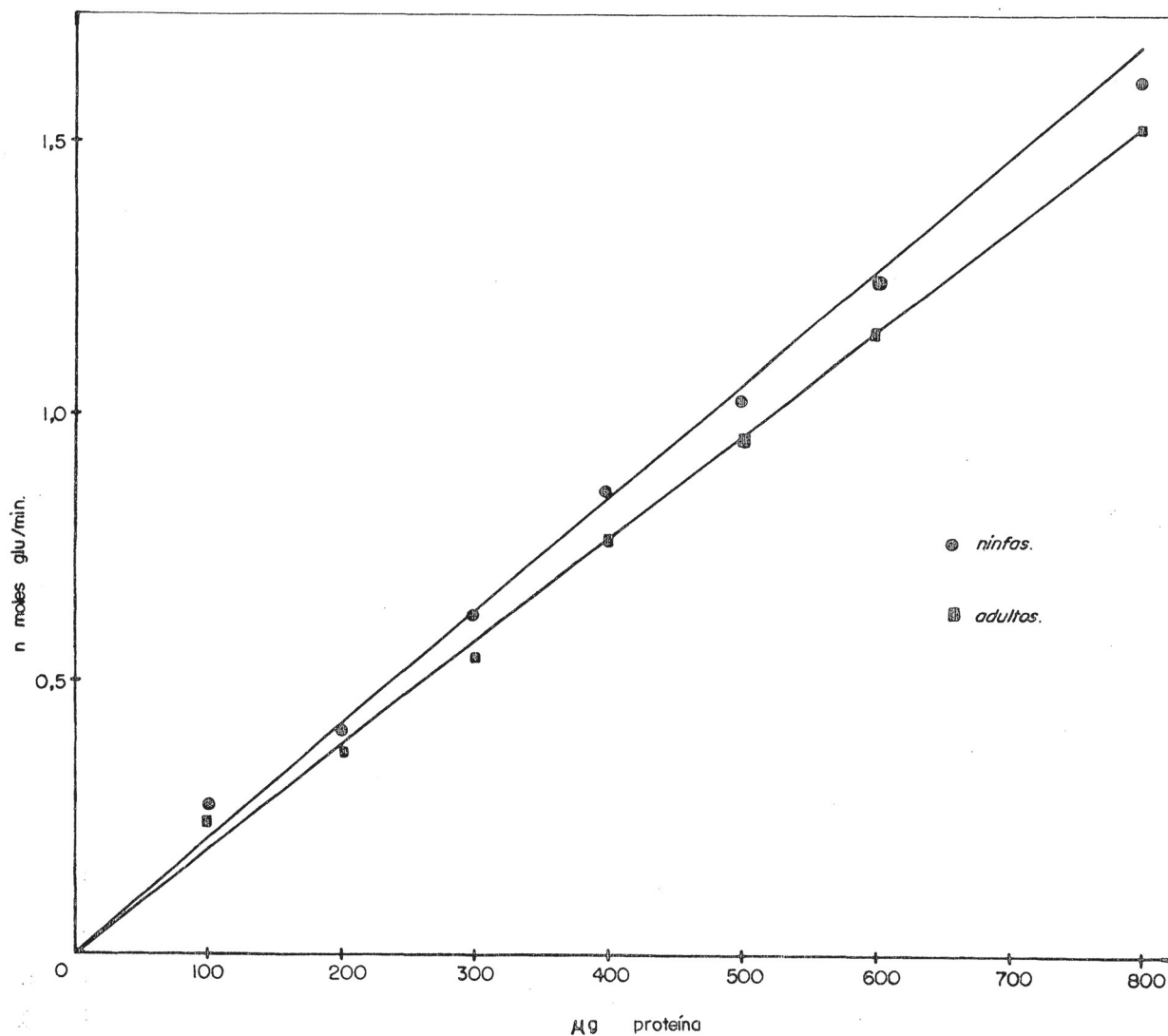


FIGURA 4 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ENZIMA SOBRE A ATIVIDADE TREALÁSICA

Sistema de incubação - 2 μ moles de trealose; 10 μ l de tampão McIlvaine pH 5,6 enzima nas concentrações indicadas e água destilada suficiente para 0,05 ml. O sistema foi incubado 1 hora a 37° e a glucose liberada foi medida pelo método de SOMOGYI-NELSON conforme técnica descrita em Materiais e Métodos.

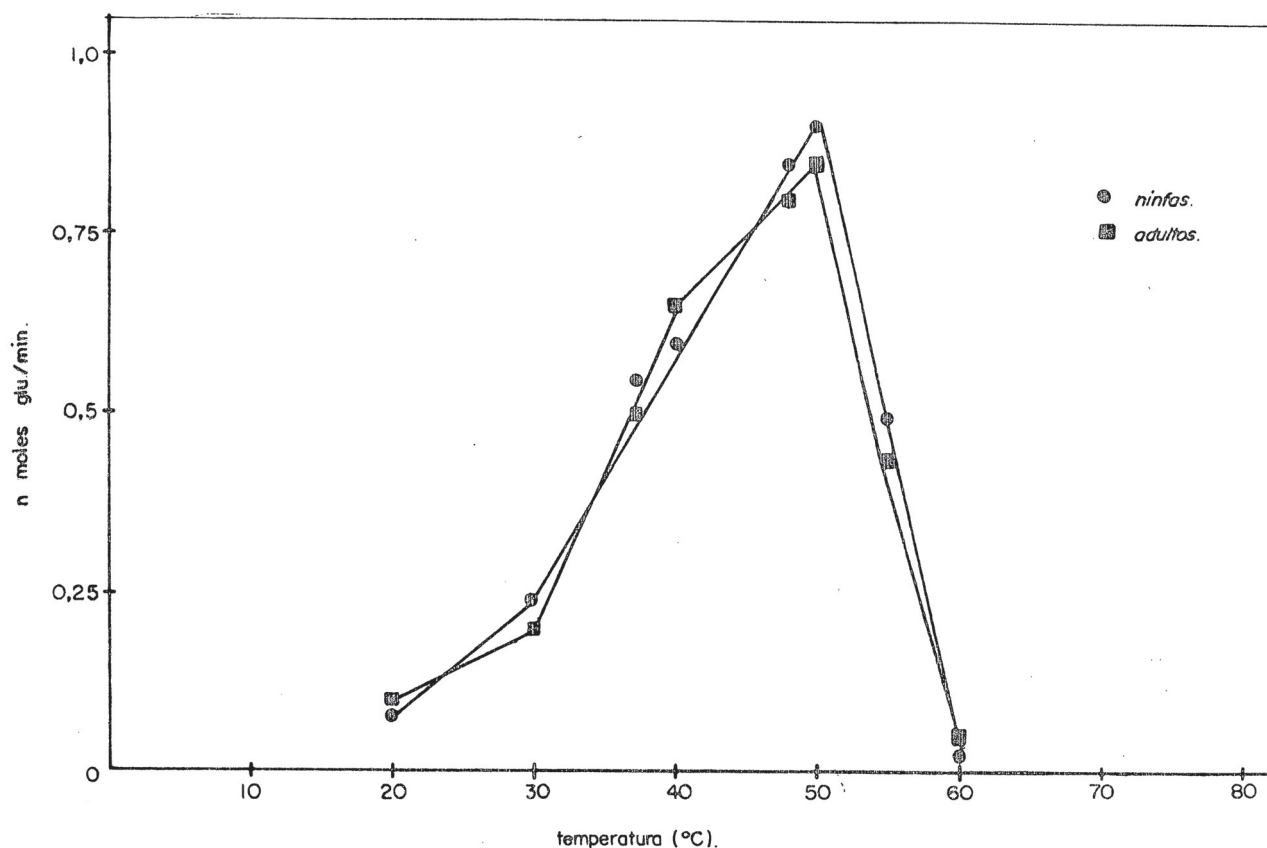


FIGURA 5 - INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE TREALÁSICA

Sistema de incubação - 10 μ l de tampão McIlvaine pH 5,6; 2 μ moles de trealose; trealase (0,60 mg de proteína) e água destilada suficiente para 0,05 ml. O sistema foi incubado durante uma hora empregando as temperaturas indicadas, e a glicose liberada foi medida pelo método SOMOGYI-NELSON conforme descrito em Materiais e Métodos.

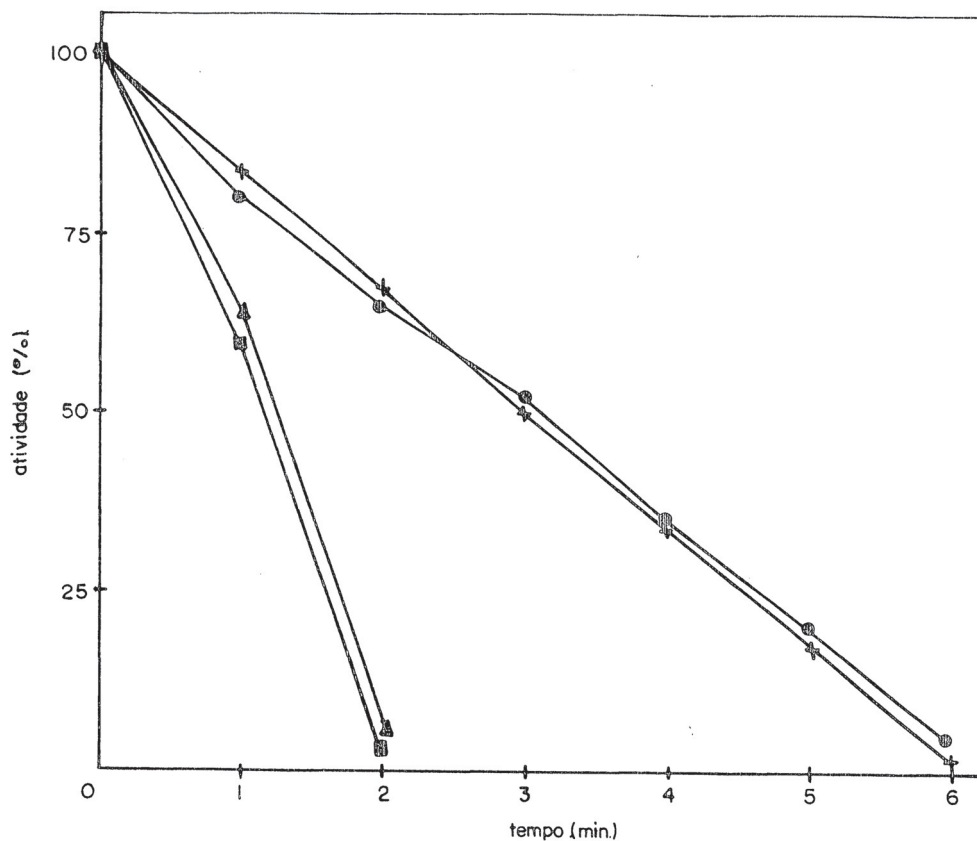


FIGURA 6 - ESTABILIDADE TÉRMICA DA TREALASE DA HEMOLINFA DE *T. infestans* a 60° e 70°.

A enzima mantida em tampão McIlvaine pH 5,6 foi aquecida conforme indicado, resfriada em banho de gelo e incubada a 37° conforme descrito em Materiais e Métodos.

- (x-x) Enzima aquecida a 60° ninfas 5º estágio
- (o-o) Enzima aquecida a 60° adultos
- (m-m) Enzima aquecida a 70° adultos
- (A-A) Enzima aquecida a 70° ninfas 5º estágio

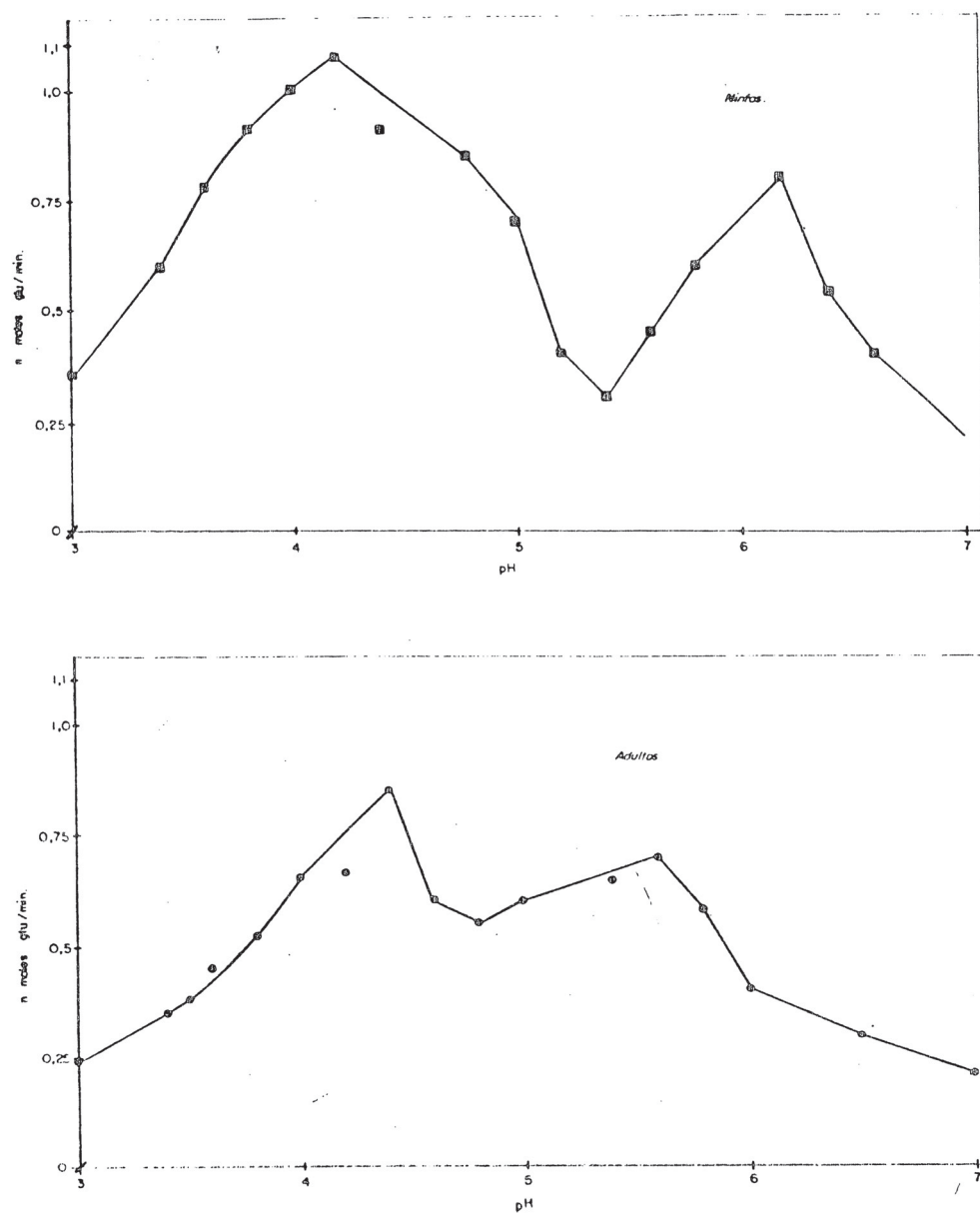


FIGURA 7 - EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE TREALÁSICA

Sistema de incubação: 4 μ moles de trealose; 1,8 mg de proteínas (enzima); 20 μ l de tampão McIlvaine nos pHs indicados e água destilada num volume final de 0,1 ml. O sistema foi incubado 1 hora a 37 $^{\circ}$ e a glucose liberada foi medida pelo método de SOMOGYI-NELSON, conforme técnica descrita em Materiais e Métodos. Metade do volume incubado foi utilizado para verificação do pH final.

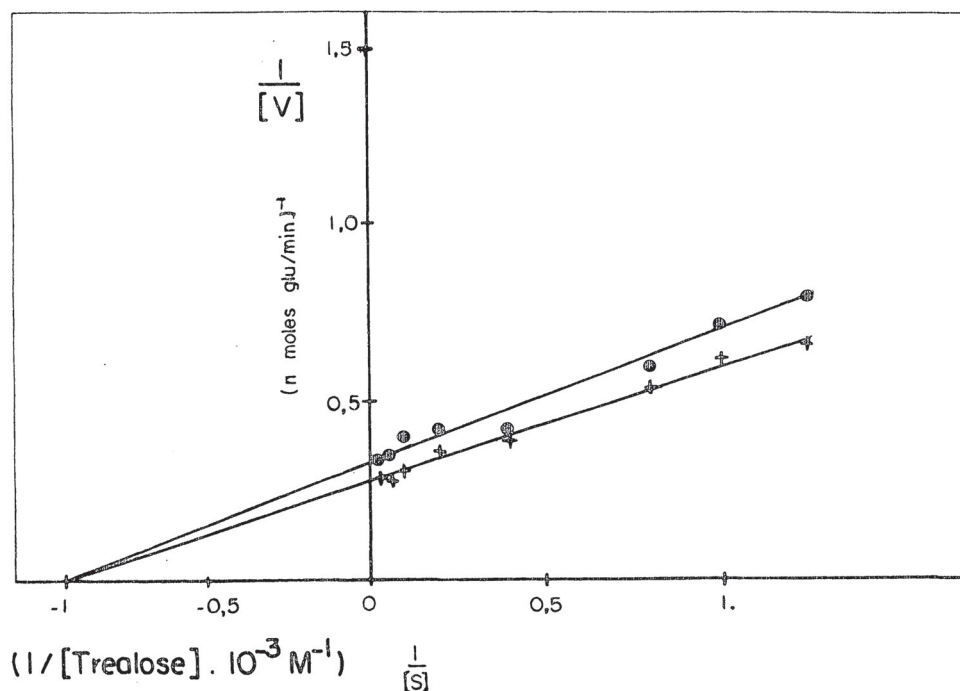


FIGURA 8 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO SOBRE A ATIVIDADE CATALÍTICA DA TREALASE EM pH 4,2 e 4,4. DETERMINAÇÃO GRÁFICA DA CONSTANTE DE MICHAELIS MENTEN.

Sistema de incubação - 10 μ l de tampão McIlvaine pH 4.2 para ninfas e 4,4 para adultos; trealose em concentrações variáveis conforme indicado, 0,26 mg de proteína (enzima); água destilada num volume final de 0,05 ml. O sistema foi incubado a 37° e a glucose liberada foi medida pelo método de SOMOGYI-NELSON, utilizando a técnica descrita em Materiais e Métodos.

(●—●) trealase de ninfas de quinto estágio

(×—×) trealase de adultos

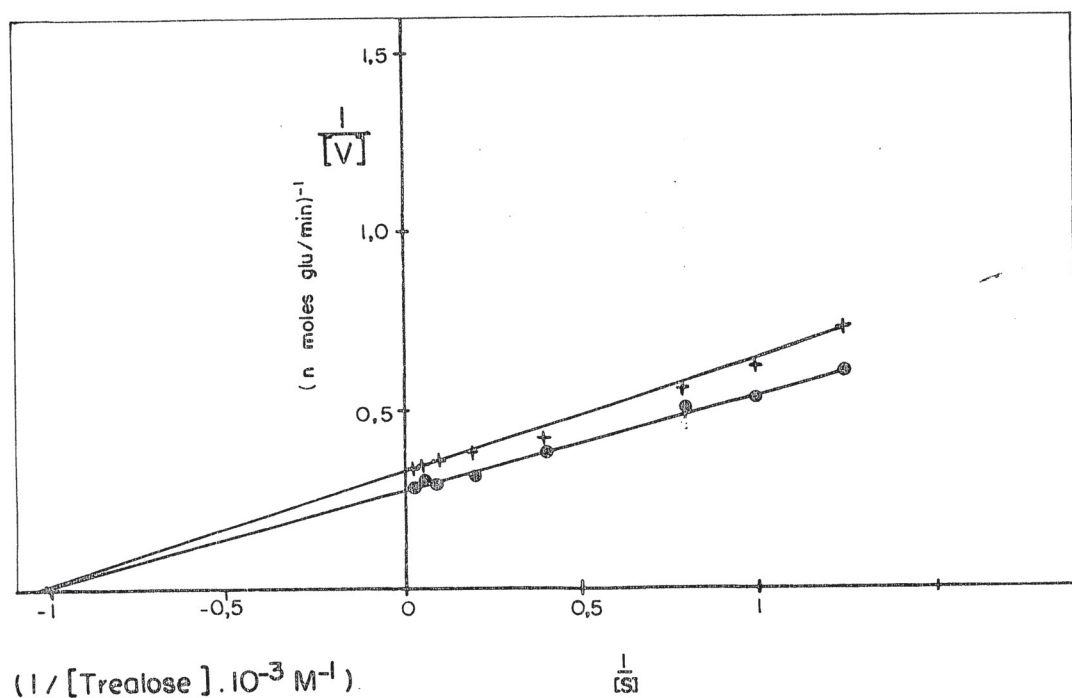


FIGURA 9 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO SOBRE A ATIVIDADE CATALÍTICA DA TREALASE em pH 5,6 e 6.2. DETERMINAÇÃO GRÁFICA DA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN.

Sistema de incubação: 10 μ l de tampão de McIlvaine pH 6,2 para ninfas e 5,6 para adultos; trealose em concentrações variáveis, conforme indicado: 0,26 mg de proteína (enzima); água destilada suficiente para um volume final de 0,05 ml. O sistema foi incubado a 37 $^{\circ}$ durante 1 hora e a glucose liberada foi medida pelo método de SOMOGYI NELSON, utilizando a técnica descrita em Materiais e Métodos.

(+—+) trealase de adultos

(o—o) trealase de ninfas de quinto estágio

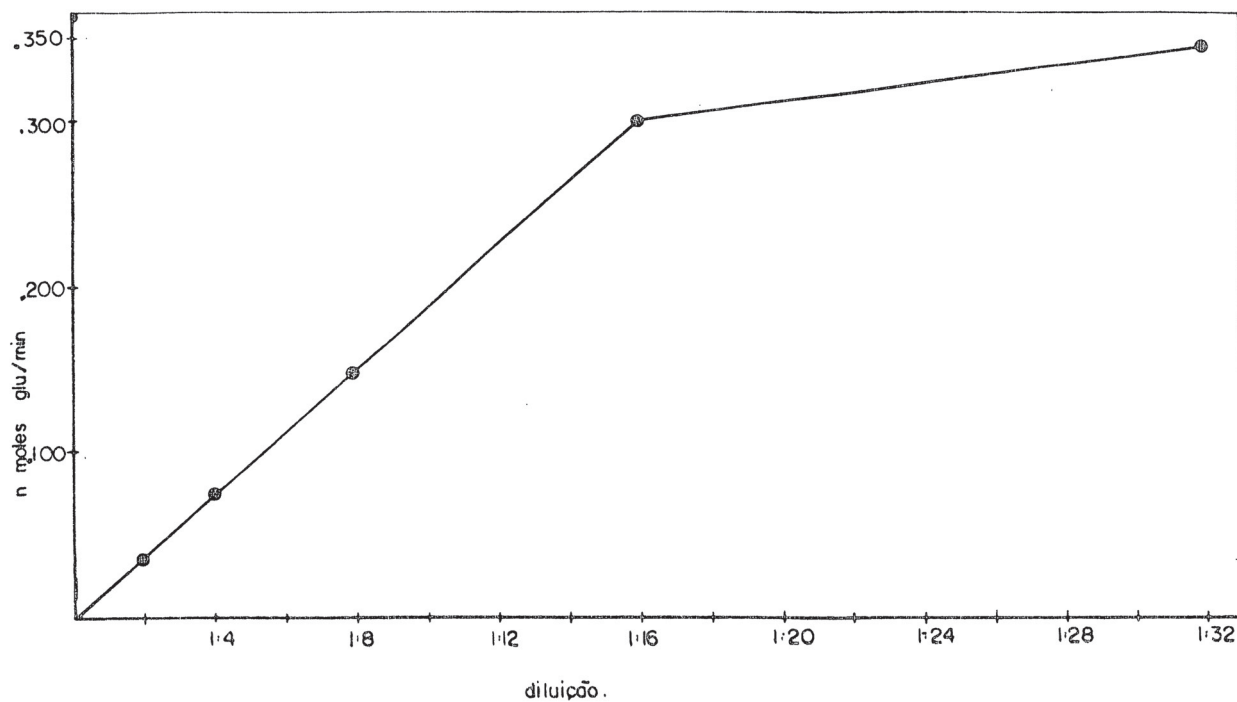


FIGURA 10 - EFEITO DA DILUIÇÃO DA HEMOLINFA SOBRE A ATIVIDADE TREALÁSICA.

Foram empregados 10 μ l de hemolinfa sem tratamento (0,3 mg de proteína), que foram diluídos como indicado e incubados conforme descrito em Materiais e Métodos para medida da atividade trealásica.

FIGURA 11 - ELETROFORESE ANALÍTICA DO INIBIDOR B EM GEL DE POLIACRILAMIDA.

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida a 8%, em condições não desnaturantes. Foi empregado tampão Tris-glicina pH 8,3, conforme descrito em Materiais e Métodos.

A atividade anti-trealásica foi medida cortando o gel em fatias e incubando em tampão McIlvaine pH 5,6 e empregando o sistema padrão de incubação para atividade trealásica, descrito em Materiais e Métodos, usando gel como inibidor.

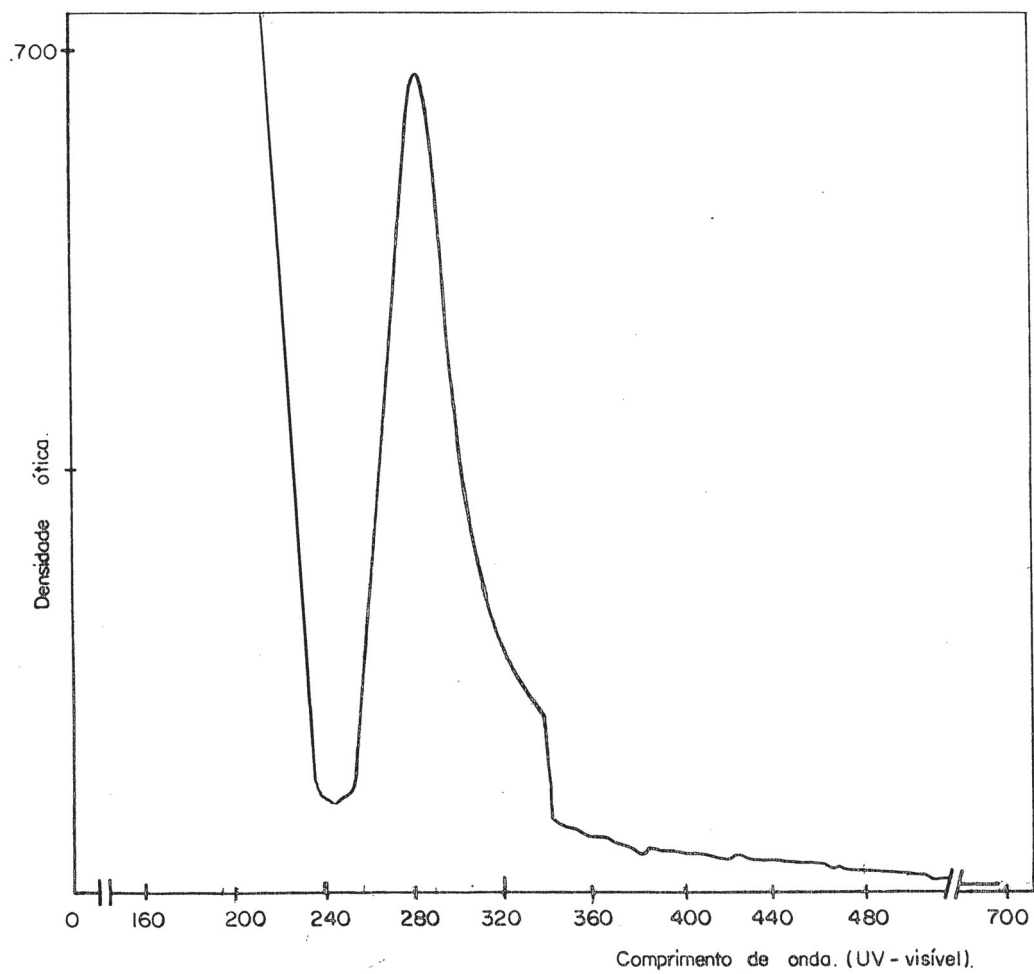


FIGURA 12 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO POLIPEPTÍDEO INIBIDOR B

Espectro correspondente a fração inibidor B, realizado em uma faixa com comprimento de onda 160 nm a 700 nm, que abrange a região do ultravioleta e do visível.

FIGURA 13 - ELETROFORESE DO INIBIDOR B EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida a 12% e 0,1g% de SDS, nas condições descritas em Materiais e Métodos, foram aplicados 20 µg do inibidor B.

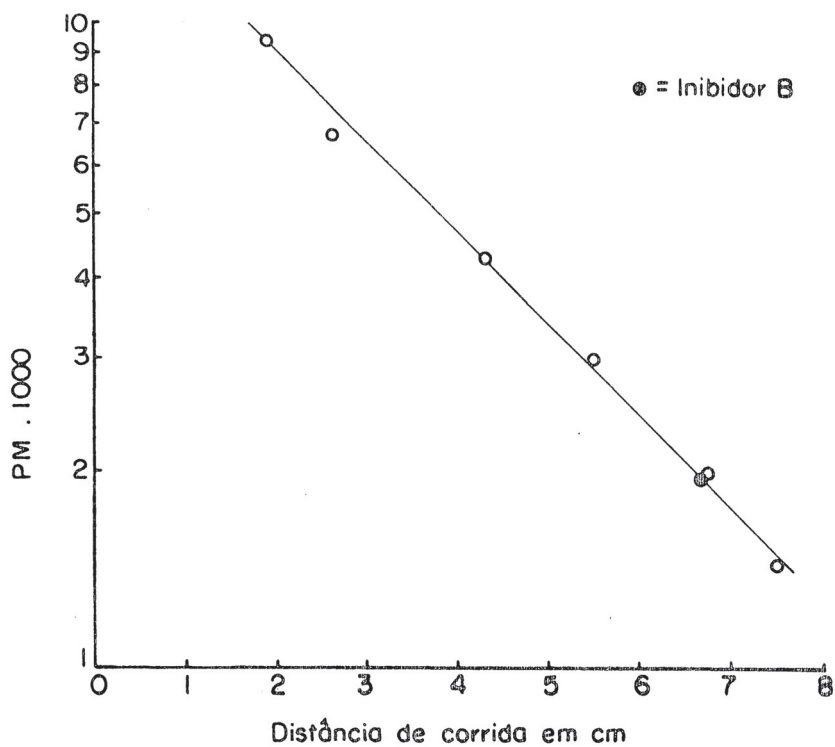


FIGURA 14 - DETERMINAÇÃO GRÁFICA DO PESO MOLECULAR DO INIBIDOR B

Para determinação do peso molecular do peptídeo inibidor B foi feita uma eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS conforme técnica descrita em Materiais e Métodos. Foram empregados os seguintes padrões de proteínas: fosforilase B (94.000); Soro albumina bovina (BSA) (67.000); ovo albumina (43.000); anidrase carbônica (30.000); inibidor de tripsina (20.100); lacto albumina (14.000).

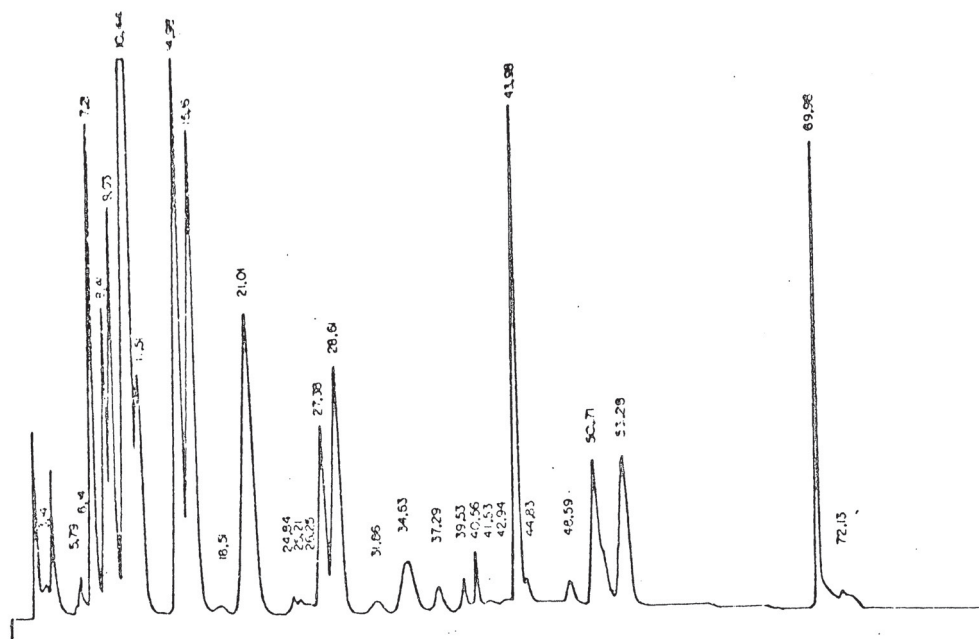


FIGURA 15 A

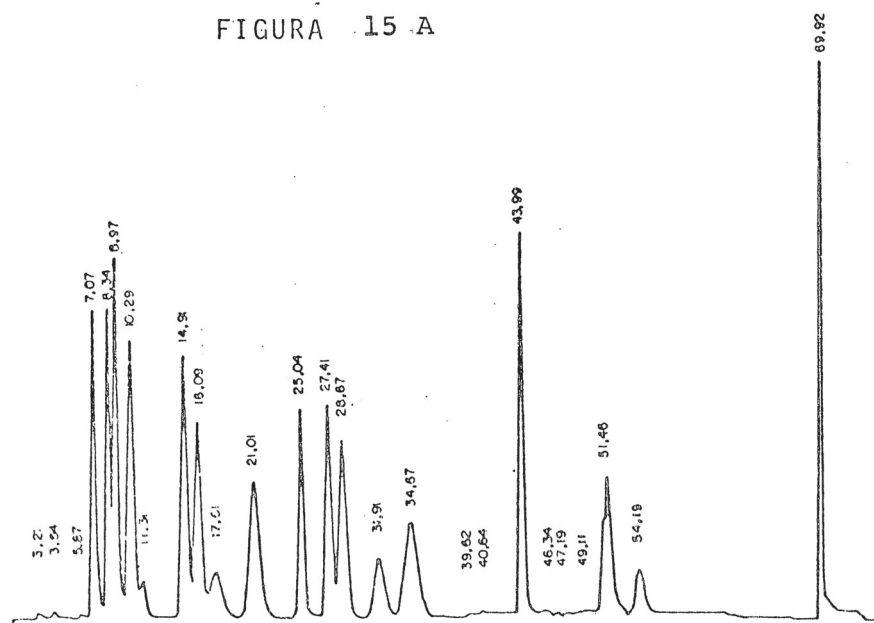


FIGURA 15 B

FIGURA 15. A - Análise realizada em (HPLC) cromatografia líquida de alta resolução de um hidrolisado do peptídeo inibidor B.

FIGURA 15. B - Análise realizada em (HPLC) cromatografia líquida de alta resolução de uma solução de aminoácidos conhecidos utilizados como padrão, Tabela V.

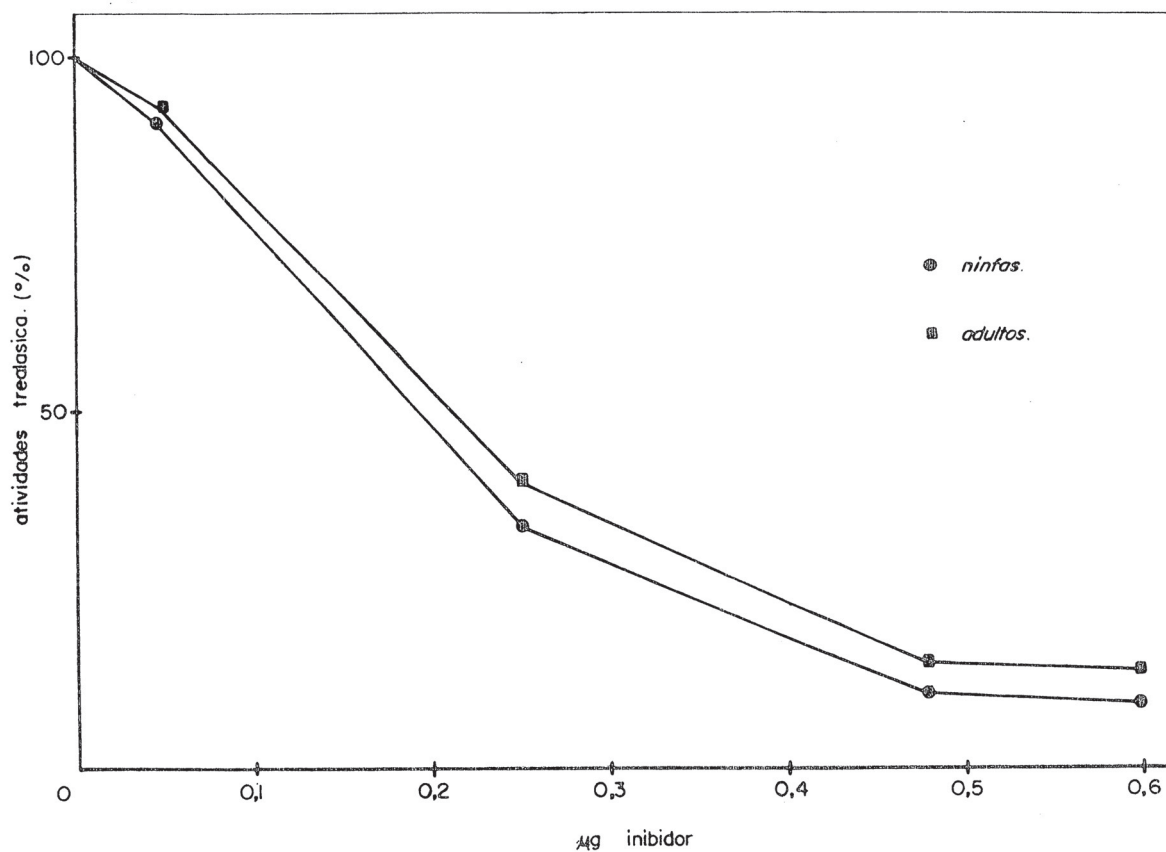


FIGURA 16 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO INIBIDOR SOBRE A ATIVIDADE TREALÁSICA.

Sistema de incubação: 2 moles de trealose; 10 μl de tampão McIlvaine pH 5,6; 0,88 mg de proteína (enzima); inibidor B nas concentrações indicadas mais 10 μl de inibidor A para cada 0,24 μg de B e água destilada suficiente para um volume final de 0,05 ml. O sistema foi incubado 1 hora a 37 $^{\circ}$, e a glucose liberada foi medida pelo método de SOMOGYI-NELSON, conforme técnica descrita em Materiais e Métodos.

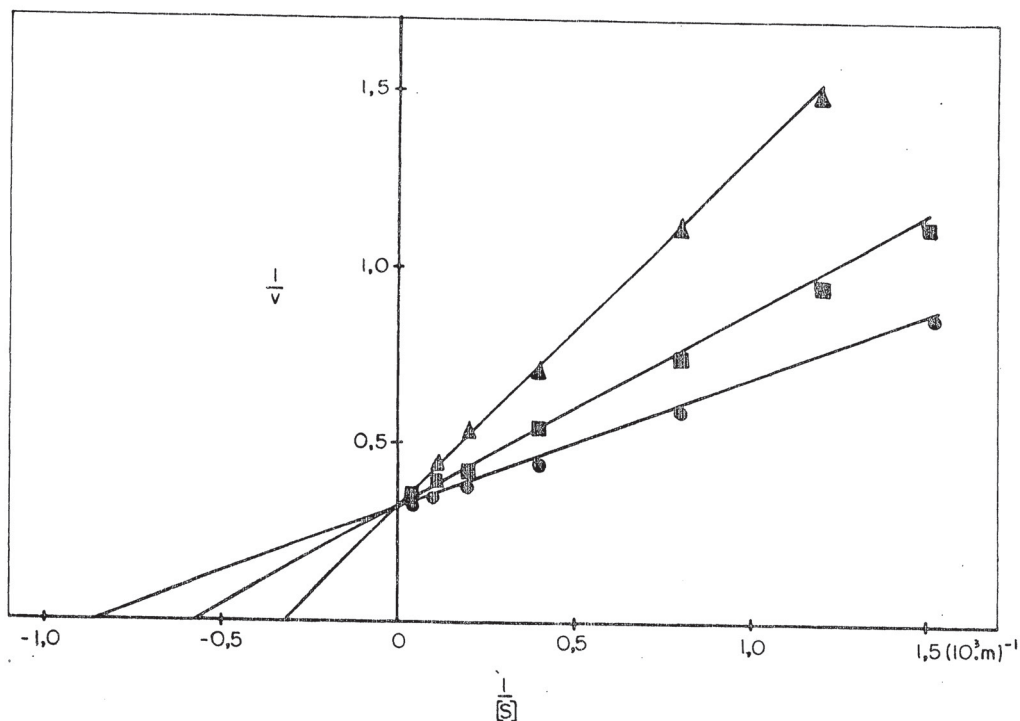


FIGURA 17 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SUBSTRATO SOBRE A ATIVIDADE DE ANTI-TREALÁSICA. DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE INIBIÇÃO.

Sistema de incubação: 10 μ l de tampão McIlvaine pH 5,6; trealose em concentrações variáveis conforme indicado: 0,26 μ g de proteína (enzima) e água destilada suficiente para 0,05ml. O sistema foi incubado a 37° durante 1 hora e a glucose liberada foi medida pelo método de SOMOGYI-NELSON conforme descrito em Materiais e Métodos.

(●) sem inibidor

(◻) com 0,24 μ g de inibidor B + 10 μ l do inibidor A

(▲) com 0,48 μ g de inibidor B + 20 μ l do inibidor A

Período inter-alimentar / dias	Atividade trealásica n moles glu / min		% inibição	
	Adultos	Ninfas	Adultos	Ninfas
04	0,141	0,138	77	79
06	0,131	0,134	78	79
10	0,127	0,127	79	80
14	0,121	0,112	81	83
18	0,111	0,060	82	91
20	0,111	0,070	82	90
22	0,085	0,075	86	89
25	0,121	0,130	81	80
26	0,161	0,180	74	73
28	0,181	0,250	71	62
35	0,393	0,450	36	31
40	0,606	0,650	00	00

TABELA I - ATIVIDADE TREALÁSICA E ANTI-TREALÁSICA DA HEMOLINFA DE *Triatoma infestans* NO PERÍODO INTER-ALIMENTAR

Sistema de incubação - 10 μ l de tampão McIlvaine pH 5,6 2 μ moles de trealose; enzima (0,60 mg de proteína); inibidor em concentrações adequadas e água destilada suficiente para um volume final de 0,05 ml. O sistema foi incubado conforme descrito em Materiais e Métodos.

ENSAIO	ADULTOS		NINFAS	
	n moles glu/min	% inibição	n moles glu/min	% inibição
A	0	-	0	-
Y	0,417	0	0,680	0
B	0	-	0	-
AX	0,365	1	0,370	0
BX	0,365	1	0,370	0
ABX	0,174	52	0,148	60
AY	0,355	15	0,560	17
BY	0,250	40	0,401	41
ABY	0,083	80	0,061	90

TABELA II - ANÁLISE DAS FRAÇÕES OBTIDAS PELA ULTRAFILTRAÇÃO DA HEMOLINFA

Sistema de incubação - 10 μ l de tampão McIlvaine pH 5,6, 20 μ moles de trealose, enzima e inibidor conforme indicado abaixo e água destilada num volume final de 0,05 ml. O sistema foi incubado durante 1 hora a 37 $^{\circ}$ e a glucose foi medida pelo método de SOMOGYI-NELSON empregando a técnica descrita em Materiais e Métodos.

- X - enzima de *S.brevicaulis* (0,38 unidades);
- A - inibidor A (10 μ l da fração);
- y - enzima de *Triatoma Infestans* (0,38 mg de proteínas para adultos e 0.60 mg de proteínas para ninfas);
- B - inibidor B (0,6 μ g).

INSETOS VETORES	pH ótimo			
	ADULTOS		NINFAS	
<i>Triatoma infestans</i>	4,4	5,6	4,2	6,2
<i>Triatoma vitticeps</i>	4,4	5,7	4,2	6,0
<i>Diphetalogaster maximus</i>	3,0	6,0		
<i>Rhodnus prolixus</i>	4,2	5,6	4,4	5,8
<i>Panstrongilus megistus</i>	3,6	5,2		

TABELA III - pH ÓTIMO PARA ATIVIDADE TREALÁSICA DE DIFERENTES INSETOS VETORES

Sistema de incubação - 4.0 μ moles de trealose; enzima em quantidade suficiente; 20 μ l de tampão McIlvaine, a partir de pH 3,0 e variando de 0,2 unidades até pH 7,0 e água destilada num volume final de 0,1 ml. O sistema foi incubado por 1 hora a 37° e a glucose liberada foi medida pelo método de SOMOGYI - NELSON conforme técnica descrita em Materiais e Métodos. Meta-de do volume incubado foi utilizado para verificação do pH final.

SOLUÇÃO SALINA 0.01 M	% INIBIÇÃO
MgCl ₂	18
MnCl ₂	20
CaCl ₂	0
CuSO ₄	22
FeCl ₃	40
CuCl ₂	29

TABELA IV - EFEITO DE ÍONS INORGÂNICOS SOBRE A ATIVIDADE TREA
LÁSICA

Sistema de incubação - 2 μ moles de trealose; 10 μ l tam-
pão McIlvaine pH 5,6; 0,7 unidades de trealase (0,60 mg de
proteína); 0,01 M da respectiva solução salina; água destila-
da suficiente para um volume final de 0,05 ml. O sistema foi
incubado por 1 hora a 37 ϕ e a glucose liberada foi medida pe-
lo método de SOMOGYI-NELSON, empregando a técnica descrita em
Materiais e Métodos.

TABELA V - ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS EM (HPLC) CROMATOGRÁFICA
LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO

AMINOÁCIDOS	SOLUÇÃO PADRÃO		HIDROLISADO PM 30		
	TEMPO RETENÇÃO	ÁREA	TEMPO DE RETENÇÃO	ÁREA	% AMINOÁCIDOS
Asp	7,07	101,578	7,21	157,374	6,01
Thr	8,34	98,788	8,41	93,992	3,69
Ser	8,97	119,479	9,03	131,914	4,27
Glu	10,29	110,894	10,44	648,532	22,66
Pro	11,31	5,527	11,51	120,638	12,07
Gly	14,91	96,055	14,98	214,386	8,65
Ala	16,09	75,331	16,16	202,627	10,42
Cys	17,61	24,208			
Val	21,01	120,894	21,01	271,315	8,70
Met	25,04	88,275			
Ile	27,41	96,342	27,38	77,984	3,14
Leu	28,67	91,809	28,61	131,152	5,53
Tyr	31,91	55,717	31,86	11,618	0,80
Phe	34,67	105,695	34,63	57,550	2,11
His	43,99	129,301	43,98	157,688	4,73
Lys	51,46	95,651	50,71	102,906	4,17
Arg	69,92	132,173	69,98	103,752	3,04
TOTAL		1.590,946		2.733,838	100,00

ENSATO	ADULTOS		NINFAS	
	n moles de glu/min	% inibição	n moles de glu/min	% inibição
Y	0,417	-	0,680	-
Y	0,419	-	0,680	-
AY	0,325	22	0,489	28
AY	0,321	23	0,487	28
BY	0,252	39	0,401	41
BY	0,405	3	0,655	4
ABY	0,100	77	0,610	90
A'BY	0,102	77	0,610	90
AB'Y	0,312	25	0,492	28

TABELA VI - ESTABILIDADE TÉRMICA DO INIBIDOR DE TREALASE

Sistema de incubação - 2 μ moles de trealase; 10 μ l de tampão McIlvaine pH 5,6; enzima (0,60 mg de proteínas); quantidades apropriadas de inibidor; água destilada suficiente para 0,50 ml. O sistema foi incubado 1 hora a 37 $^{\circ}$ e a glucose liberada medida pelo método de SOMOGYI-NELSON conforme descrito em Materiais e Métodos.

Y - trealase

A - inibidor A

B - inibidor B

(') - fração aquecida a 55 $^{\circ}$ por 2 minutos.

ENSAIO	ADULTOS		NINFAS	
	n moles de glu/min	% inibição	n moles de glu/min	% inibição
Y (ÁGUA)	0,410	-	0,680	-
Y (EDTA)	0,407	-	0,680	-
Y (FOSFATO)	0,413	-	0,680	-
AY (ÁGUA)	0,315	23	0,523	23
AY (EDTA)	0,407	0	0,678	0
AY (FOSFATO)	0,340	18	0,580	15
BY (ÁGUA)	0,246	40	0,414	39
BY (EDTA)	0,246	40	0,417	40
BY (FOSFATO)	0,246	40	0,420	40
ABY (ÁGUA)	0,102	75	0,170	75
ABY (EDTA)	0,245	40	0,420	40
ABY (FOSFATO)	0,164	60	0,272	60

TABELA VII - EFEITO DA DIÁLISE SOBRE O INIBIDOR DA TREALASE E A TREALASE

A hemolinfa foi dividida em três frações que foram submetidas a diálise contra água destilada; EDTA 50 mM pH 7,0; e tampão fosfato 50 mM pH 6,2; e posteriormente submetidas a ultrafiltração conforme descrito em Materiais e Métodos.

Sistema de incubação - 2 μ moles de tampão McIlvaine pH 5,6; 0,60 mg de proteínas (enzima); 2 μ moles de trealase; 0,24 μ g do inibidor, conforme indicado e água destilada suficiente para 0,05 ml. O sistema foi incubado 1 hora a 37° e a glicose liberada medida pelo método SOMOGYI-NELSON conforme técnica descrita em Materiais e Métodos.

Y - trealase; A - inibidor A; B - inibidor B

TECIDOS	n moles glucose / min			% inibição	proteínas mg / ml
	A	B	C		
proctodeo	0,141	0,067	0,083	42	64
ovário	0,047	0,047	0,029	39	24
mesontero I	0,235	0,225	0,096	60	74
mesontero II	0,141	0,141	0,058	59	146
aorta	0,141	0,137	0,055	41	10
estomodeo	0,051	0,050	0,026	40	30
músculo	0,286	0,280	0,132	54	-
exoesqueleto	0,329	0,333	0,132	60	144

TABELA VIII - OCORRÊNCIA DE TREALASE E SEU INIBIDOR EM DIFERENTES TECIDOS DE *TRITOMA INFESTANS*

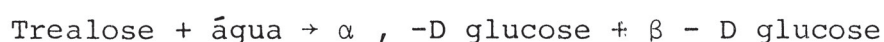
Sistema de incubação - 2 μ moles de trealose; 10 μ l de tampão McIlvaine pH 5,6; quantidades suficientes de enzima e inibidor; água destilada suficiente para 0,05 ml. O sistema foi incubado 1 hora a 37 $^{\circ}$ e a glucose liberada foi medida pelo método SOMOGYI-NELSON, conforme técnica descrita em Materiais e Métodos.

- A - atividade trealásica nos extratos livres de células aquecidas 2 min. a 55 $^{\circ}$.
- B - atividade trealásica dos extratos livres de células, sem tratamento.
- C - atividade anti-trealásica do inibidor obtido da hemolinfa contra a trealase obtida dos extratos livres de células.

DISCUSSÃO

A trealose possui três isômeros, destes o mais conhecido e mais comum na natureza é o (α , D glucopiranosil, α , D glucopiranosideo), que é um dissacarideo não redutor, devido ao comprometimento dos dois carbonos anômeros na ligação glicosídica. Este isômero é também o principal açúcar da hemolinfa dos insetos.

A trealose no organismo pode ser hidrolisada enzimaticamente à glucose, participando assim das principais vias metabólicas de carboidratos. Esta hidrólise é catalisada pela trealase (α , α trealose 1-D-glucosidade E.C.3.2.1.28), que desta forma fica sendo a responsável pela regulação das vias metabólicas de carboidratos que utilizam glucose. Esta reação é representada pela seguinte equação:



Considerando a importância da trealose no metabolismo dos insetos é de fundamental interesse o estudo dos mecanismos capazes de regular este metabolismo. Assim foram detectados inibidores da trealase: em *Phormia regina*³¹; em *Triatoma Vitticeps*^{8,19}; *Panstrongilus megistus*^{14,81} e em *Neurospora crassa*⁸¹.

Apesar de sabermos pouco sobre os inibidores da trealase dos insetos, nos vegetais os inibidores de sistemas enzimáticos foram estudados e estão caracterizados, como polipeptídeos

de baixo peso molecular , aproximadamente 10.000 daltons. Estes inibidores são resistentes a ação da maioria dos agentes desnaturantes, como uréia; altas temperaturas ; baixos pHs e também a ação de algumas enzimas proteolíticas⁶⁹ .

FRIEDMAN³¹ relatou que a presença de inibidor de trealase na hemolinfa de *Phormia regina* não está relacionada com a alimentação . O mesmo foi observado por CANDIDO⁸ et al, para o *Triatoma vitticeps* e por CHANDELIER et al¹⁴ em *Panstrongilus megistus*. Em *Triatoma infestans* os resultados da tabela I indicaram justamente o contrário, isto é , que a presença do inibidor está diretamente relacionada com a alimentação, que os níveis máximos de inibidor são encontrados aos 18 e 22 dias após a alimentação, respectivamente, para as ninfas e adultos.

Observou-se também que a retirada da hemolinfa neste período é bastante facilitada, pois a cavidade abdominal não está tão repleta com o conteúdo intestinal como acontece logo após alimentação, e o volume de hemolinfa é bastante satisfatório.

Em *Phormia regina*³⁰ foi observado que tratando hemolinfa sem atividade trealásica com resinas de troca iônica ou Sephadex, aquela se torna ativa. Fenômeno de reversão semelhante foi observado por CANDIDO et al⁸ em *Triatoma vitticeps*. No presente trabalho foi separada a trealase do seu inibidor a partir de hemolinfa de *Triatoma infestans* empregando coluna de Sephadex G-50. A figura 2 mostra a perfeita separação destes componentes, entretanto o inibidor assim obtido é pouco estável. Com o objetivo de obter preparações estáveis do inibidor separado da trealase tentou-se métodos alternativos de separação e ou puri

ficação uma vez que o tratamento com Sephadex G-50 mostrou-se inadequado, porque embora tendo-se conseguido boa separação, a diluição excessiva do material tornou-o instável.

O processo de separação e/ou purificação que melhor se adaptou no caso foi a ultrafiltração, no qual a hemolinfa era filtrada respectivamente em membranas Diaflo PM 10 e PM 30.

Os resultados da tabela II mostram claramente que houve separação entre a trealase e as duas frações do inibidor, indicando que estes componentes possuem pesos moleculares distintos. Por outro lado as figuras 11 e 13 mostram a homogeneidade da preparação do inibidor B.

FRIEDMAN³¹, na hemolinfa de *Phormia regina*, havia sugerido a presença de um inibidor de trealase composto por duas frações, uma de natureza proteica, de baixo peso molecular e uma segunda, provavelmente um ion metálico.

A diálise das frações A e B do inibidor da trealase de *Triatoma infestans* e também da enzima contra EDTA 50 mM mostrou que somente a fração A é sensível a este tratamento, sendo inativada. Com o intuito de recuperar a capacidade inibitória daquela fração, foram adicionados ions metálicos como Mg^{++} , Mn^{++} , Cu^{++} , Fe^{+++} e Ca^{++} , em concentrações que variaram de 0,01 a 0,1 M sem sucesso. Por outro lado a diálise da fração A contra água destilada ou tampão fosfato 50 mM pH 6,2, não alterou sua capacidade inibitória. Estes resultados comprovam que o inibidor A não é simplesmente um ion metálico, como sugeriu FRIEDMAN³¹, quando trabalhou com preparações de hemolinfa de *Phormia regina*. A presente preparação, que deve ter um metal co

mo componente, pois o tratamento com EDTA faz com que perca sua capacidade inibitória, é provavelmente um metal associado a uma molécula maior, uma vez que este não atravessa a membrana de diálise.

FRIEDMAN³¹ e CANDIDO et al⁸, constataram que o inibidor da trealase era inativado pelo aquecimento a 55º por dois minutos, entretanto no presente trabalho, após a separação do inibidor em duas frações, constatamos que apenas uma delas (inibidor B) é termolábil.

A comprovação de que o inibidor B (fração termolábil) poderia ser um polipeptídeo foi feita pelo seu espectro de absorção a 280 nm, da eletroforese em gel de poliacrilamida e, finalmente através da análise de seus aminoácidos, por cromatografia líquida de alta resolução.

A presença de uma única banda de proteína na eletroforese em gel de poliacrilamida e a constatação de que esta banda tinha atividade anti-trealásica demonstram a homogeneidade do inibidor B e a sua natureza proteica.

Através da eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) foi possível, empregando proteínas de peso molecular conhecido, determinar o peso molecular do inibidor B, que foi estimado em 20.000 daltons, além de esclarecer que o mesmo é formado de uma única cadeia polipeptídica.

A análise dos aminoácidos do inibidor B da trealase de *Triatoma infestans* mostra uma predominância de ácido glutâmico, semelhante a composição de alguns inibidores proteicos das proteínas isoladas de vegetais, cuja composição apresenta

uma predominância de ácido aspártico, glutâmico, e cisteína ⁴, 45,52,63,65,67. Foi demonstrado ainda fazer parte de sua composição, 5,6% de hexosaminas. Como a hidrólise ácida realizada para determinar a composição em aminoácidos do peptídeo inibidor, destrói o triptofano, o mesmo foi detectado qualitativamente pelo método de ERHLICH ²⁴.

Analisando-se a atividade trealásica em função da temperatura de incubação, foi constatado que a temperatura ótima para a atividade da trealase da hemolinfa do *Triatoma infestans* é de 50°. Resultados semelhantes foram obtidos para trealases de hemolinfa de *Triatoma vitticeps* ⁷, de intestino de abelha ⁷⁸, de hemolinfa de *Phormia regina* ³⁰ e de *Panstrongilus megistus* ¹⁴.

CANDIDO et al ⁷, observaram que aquecendo a hemolinfa de *Triatoma vitticeps* ocorria um aumento da atividade trealásica até o primeiro minuto de incubação, sendo posteriormente inativada até atingir a quase totalidade após 10 minutos nesta temperatura.

No presente trabalho, figura 6 utilizando hemolinfa de *Triatoma infestans* sem o inibidor da trealase, verificamos que este fenômeno não ocorre, evidenciando desta forma a possibilidade da ativação inicial obtida por CANDIDO ser devida à presença do inibidor em suas preparações, e foi demonstrado o mesmo é mais termolábil que a enzima, sendo portanto inativado primeiro nesta temperatura.

A análise da atividade trealásica da hemolinfa de *Triatoma infestans* em função da variação do pH, resulta em uma curva bifásica, o mesmo acontecendo quando foram utilizadas hemolinfas de *Rhodnius prolixus* e *Diphetalogaster maximus*. Estes

resultados sugerem a possibilidade da existência de pelo menos duas formas moleculares de trealase ou que o estado de ionização dos grupamentos essenciais à atividade enzimática possuem pKs heterogêneos.

VAN ASPEREN et al ⁸⁹, estudando a atividade trealásica da hemolinfa de baratas, observaram que em seu pH fisiológico, que se situa em torno de 7,4, a quantidade de glucose livre era bastante pequena. O início de qualquer atividade física provoca uma queda no pH da hemolinfa, ativando a trealase e liberando glucose para satisfazer a demanda energética.

Em *Triatoma infestans*, verificamos que o pH fisiológico da hemolinfa também é 7,4 e um abaixamento do mesmo " in vitro " leva a um aumento de aproximadamente 75% na atividade trealásica. Sugerindo que " in vivo " ocorra um fenômeno semelhante ao observado em baratas .

Foi constatado que não ocorre nenhuma ação do inibidor sobre a atividade trealásica quando se trabalha com valores de pH inferiores a 5,0.

Como hipótese de trabalho é provável que devido a grande porcentagem de ácido glutâmico 22%, cujas carboxilas livres não se dissociariam naqueles pH e, portanto, não se ligariam a trealase. Em consequência disso o inibidor não poderia mesmo atuar nesta faixa de pH.

FRIEDMAN ^{30,31,33}, em *Phormia regina*, observou que a diluição da hemolinfa intacta provocava um aumento na atividade trealásica, sugerindo que este fenômeno provavelmente seria devido à presença de um inibidor de trealase presente na hemolinfa. MATTHEWS et al ⁵⁸ observaram o mesmo fenômeno em *P. americana* e o atribuíram a uma lise de hemócitos, uma vez que verificaram a presença da enzima tanto em soro como em hemócitos

Esta ocorrência foi posteriormente confirmada por KATAGIRI ⁴⁹, em soro de *Periplaneta americana* livre de hemócitos e utilizando técnicas cromatográficas e radioautográficas. Em hemolinfa de *Triatoma infestans* sem a presença do inibidor constatamos que ocorre o mesmo fenômeno, evidenciando a possibilidade do aumento na atividade trealásica, em decorrência da diluição, ser devido a localização da enzima tanto no soro como nos hemócitos.

A presença do inibidor de trealase na hemolinfa de *Triatoma infestans* pode estar relacionada a um mecanismo que visa prevenir a hidrólise da trealose para manter os níveis circulantes deste açúcar, quando não ocorre demanda energética. Acreditamos que no proctodeu possa estar relacionada a presença do inibidor a um mecanismo de absorção de açúcares existente no intestino dos insetos com a finalidade de prevenir a perda da trealose por difusão ⁹¹.

O inibidor de trealase da hemolinfa de *Triatoma infestans* foi capaz de inibir a atividade trealásica de trealases obtidas de vários tecidos deste inseto (tabela III), além de atuar sobre trealases de outra fonte, como a do fungo *Scopulariopsis brevicaulis*.

Sabemos que o inibidor de trealase extraído de hemolinfa de *Triatoma infestans* é constituído de duas frações, uma de natureza glicoproteica, com peso molecular de 20.000 daltons, com predominância de ácido glutâmico e 5,6% de hexosaminas, outra que provavelmente é constituída de um íon metálico associado a uma molécula maior, uma vez que a fração A é não dialisável. Ambas as frações têm efeito inibitório quando incubadas isoladamente contra trealase da mesma fonte, no entanto quando associadas o efeito de uma das frações é potencializado pela presença da outra, como mostra a tabela II.

Existem estudos de controle da atividade trealásica em insetos que enfatizam a regulação através de um mecanismo hormonal⁸⁰. A possibilidade da trealase de hemolinfa de *Triatoma infestans* ser um hormônio é descartada pelo fato de se obterem valores de inibição semelhantes, quando o inibidor é ensaiado contra hemolinfa intacta como fonte de trealase ou contra trealase purificada do fungo *Scopulariopsis brevicaulis*.

Quando medimos a inibição da atividade trealásica em função da variação da concentração do inibidor, em uma concentração fixa do substrato, observamos que a mesma é quase totalmente anulada (figura 15). Via de regra necessita-se de $I' = \frac{I}{K_i} = 100$ para a velocidade cair até 10% da máxima e $I' = 1000$ para chegar a zero na inibição competitiva pura.

No presente caso foi reduzida a velocidade até 10% com uma relação $I' = 2,0$ que mostra uma grande possibilidade de que se fosse utilizada uma relação $I' = 20$, conseguiríamos a inibição total da reação. Dentro desta linha de raciocínio po

de-se aventar a possibilidade de que a inibição da trealase verificada no presente trabalho seja do tipo competitivo puro. A constante de inibição (K_i) é da ordem de $2,34 \times 10^{-4}$ mM.

CONCLUSÕES

1 - A trealase da hemolinfa de **Triatoma infestans** se caracteriza por apresentar uma curva bifásica de pH com os seguintes pHs ótimos 4,2 e 5,6 nas ninfas de 5º estágio e 4,4 e 5,6 para adultos. Nos dois picos os valores de Km são coincidentes nos adultos e ninfas, assim temos um Km para a trealose de 1,16 mM em pH 4,2 e 4,4 e de 0,94 mM em pH 6,2 e 5,6, nas ninfas e adultos, respectivamente.

2 - O inibidor é encontrado na hemolinfa também no proctodeo.

3 - O inibidor de trealase presente na hemolinfa de **Triatoma infestans** é constituído por duas frações, uma de natureza proteica com peso molecular de aproximadamente 20.000 daltons e outra que provavelmente é um íon metálico associado a uma molécula maior não dialisável.

4 - A composição em aminoácidos da fração proteica do inibidor da trealase, mostrou uma predominância em ácido glutâmico, prolina e alanina.

5 - Foi constatado que o inibidor B é uma glicoproteína com 5,6% de hexosaminas.

6 - A inibição provocada pelo inibidor da trealase da hemolinfa de **Triatoma infestans** é do tipo competitivo puro, sen

do o K_i da ordem de $2,34 \times 10^{-4}$ mM.

7 - O inibidor da trealase da hemolinfa atua sobre as trealases dos diferentes tecidos de *Triatoma infestans* e também sobre trealase de *S.brevicaulis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASAHINA, E. & TANNO, K. A large amount of trehalase in a frost-resistant insect. Nature, London 204: 1222, 1964.
2. BHUMIRATANA, A.; ANDERSON, R.L.; COSTILOW, R.N. Trehalose metabolism by *Bacillus pupilliae*. J. Bacteriol., 119: 484-93, 1974.
3. BIRCH, G.C. Trehalases. Adv. Carb. Chem., 18: 201-25, 1963.
4. BIRK, Y. Proteinase inhibitors from plant sources. Methods in Enzymol., 45(B) : 695, 1976.
5. BOAS, N.F. Method for the determination of hexosamines in tissues. J. Biol. Chem., 204: 553-63, 1953
6. BRICTEUX - GREGOIRE, S.; JEAUNIAUX, C.H. e FLORKIN, M. biochimie du ver à soie XXX. biosynthèse de trehalose et de glycogène à partir de glucose-1-phosphate. Comp. biochem. Physiol., 16: 333-40, 1965.
7. CANDIDO, L.M.; MARECHAL, L.R.; VEIGA, L.A. Comparative studies of trehalase from different tissues of *Triatoma vitticeps*. Arq. Biol. Tecnol. 23(3): 349-61, 1980.
8. CANDIDO, L.M.; MARECHAL, L.R.; VEIGA, L.A. Trehalase inhibitor present in the haemolymph of *Triatoma vitticeps*. Arq. Biol. Tecnol., 24(2): 231-39, 1981.

9. CATLEY, B.J. & KELLY, P.J. Metabolism of trehalose and pullulan during the growth cycle of *Aureobasidium pullulans*. Biochem. Soc. Trans., 3: 1079-81, 1975.
10. CECCARINI, C. Trehalose from *Dictyostelium discoideum*: purification and properties. Science., 151: 454-6, 1966.
11. CACCARINI, C. The biochemical relationship between trehalase and trehalose during growth and differentiation in the cellular slime mold, *Dictyostelium discoideum*. Biochem. Biophys. Acta., 148: 114-24, 1967.
12. CHANG, C.; LIU, F.; FENG, H. Metabolism of eri-silkworm during metamorphosis. I. Changes in the chief constituents of the fat body and haemolymph before and after pupation. Acta. Ent. Sin. 12: 412-22, 1963.
13. CHANG, C.; LIU, F.; FENG, H. Metabolism of eri-silkworm during metamorphosis. II. The properties of trehalase and its effect on metabolism. Acta. Ent. Sin., 13: 494-502, 1964.
14. CHANDELIER, E.L.; MARECHAL, L.R.; VEIGA, L.A. Trehalose activity of *Panstrongilus megistus* haemolymph. Arg. Biol. Tecnol., 19: 91-94, 1976.
15. CHEFURKA, W. Some comparative aspects of the metabolism of carbohydrates in insects. Ann. Rev. Ent., 10: 345-82, 1965.
16. CHIPPENDALE, G.M. Biochemistry of insects. In Rookstein, Morris, ed. N.Y., Academic Press, 1972 p. 32-4.
17. CLEGG, J.S. & EVANS, D.R. The physiology of blood trehalose and its function during flight in the blowfly. J. Exptl. Biol. 38: 771-92, 1961
18. CLIFFORD, K.H. Stereochemistry of the hydrolysis of trehalose by the enzyme trehalase prepared from the flesh

- fly ~~Sarcophaga~~ *barbata*. Eur. J. Biochem., 106: 337-40, 1980.
19. CONTER, P.F. & VEIGA, L.A. Isolation of a trehalase inhibitor from the haemolymph of *Triatoma vitticeps*. Arq. Biol. Tecnol., 27(4): 549-53, 1984.
 20. CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CHAPMAN, D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. Science, 223: 701-3, 1984.
 21. DADD, R.H. The nutritional requirements of locusts. III. Carbohydrate requirements and utilization. J. Insect. Physiol., 5: 301-16, 1960.
 22. DAHLQVIST, A. Heat inactivation of intestinal invertase, maltase, and trehalase. Acta. Chem. Scand., 13:945-53, 1959.
 23. DUCHATEAU-BOSSON, G.; JEUNIAUX, CH.; & FLORKIN, M. Contributions à la biochimie du ver à soie. XXVII. Trêhalose, trêhalase et mue. Archs. Int. Physiol. Biochim., 71: 566-76, 1963.
 24. DAWSON, R.M.C.; ELLIOTT, D.C ; ELLIOTT, W.H.; JONES, K. M. ed Date for biochemical research. 2. ed. Oxford, University Press, 1972. 654p. p. 522.
 25. ELBEIN, A.D. The metabolism of trehalose. Adv. Carb. Chem., 30: 227-256, 1974.
 26. ERHARDT, P. Untersuchungen Zur Stoffwechsephysiologie von *Megoura viciae* Burkt. Einer phloemsaugenden. Aphide. Z. Vergl. Physiol., 46: 169-211, 1962.
 27. FAIRBAIN, D. & PASSEY, R.F. Occurrence and distribution of trehalose and glycogen in the eggs and tissues of *Ascaris lumbricoides*. Exp. Parasitol., 6: 566-74, 1957.

28. FLORKIN, M. & JEAUNIAUX, CH. Haemolymph: composition Physiol. Insects., 3: 109-54, 1964.
29. FREREJACQUE, M. Trêhalose et trêhalase. C.R. Séanc. Soc. Biol., 213: 88-90, 1941.
30. FRIEDMAN, S. The purification and properties of trehalase isolated from *Phormia regina* meig. Arch. Biochem. Biophys., 87: 252-58, 1960.
31. FRIEDMAN, S. Inhibition of trehalase activity in the haemolymph of *Phormia regina* meig. Arch. Biochem. Biophys., 93: 550-54, 1961.
32. FRIEDMAN, S. & ALEXANDER, S. Multiple forms of trehalase in *Phormia regina*. Bioch. Biophys. Res. Commun. 42(5): 818-23, 1971.
33. FRIEDMAN, S. Multiple forms of trehalase in *Phormia regina*. Partial purification, tissue specificities, and some kinetic properties of adult enzymes. Insect Biochem., 5: 151-64, 1975.
34. FRISCHL, J.; ISHAY, J.; TALMOR, N. Trehalose: extraction from the midgut of larvae of the oriental hornet and its use in microdetermination of trehalose. Insect Biochem., 6: 53-58, 1976.
35. GARCIA, E.S.; MACARINI, J.D.; GARCIA, M.L.; UBATUBA, F. B. Alimentação de *Rhodnius prolixus* no laboratório. An. Acad. Brasil. Cienc., 47: 537-45, 1975.
36. GELPERIN, A. Control of crops emptying in the blowfly. J. Insects Physiol., 12: 331-45, 1966.
37. GLASZION, K.T. and GAILER, K.R. Sugar transport: occurrence of trehalase activity in sugarcane. Planta., 85: 299-302, 1969.

38. HEY-FERGUSON, A.; MITCHELL, M.; ELBEIN, A.D. Trehalose metabolism in germinating spores of *Streptomyces hygroscopicus*. J. Bacteriol., 116: 1984-5, 1973.
39. HEMMINGSEN, A.M. The blood sugar of some invertebrates. Scand.Arch.Physiol., 45: 204-10, 1924.
40. HECKER, L.I. & SUSMANN, A. Localization of trehalose in the ascospores of *Neurospora*: relation to ascospore dormancy and germination. J. of Bacteriol., 115(2): 592-99, 1973.
41. HERE, E.J.; SAWAI, T.; BREWER, C.F.; NAKANO, M.; KANDA, T. Trehalase: stereocomplementary hydrolytic and glucosyl transfer reactions with α - and β -D-glucosyl fluoride. Biochemistry., 21: 3090-7, 1982.
42. HORIKOSHI, K. & IKEDA, Y. Trehalase in conidia of *Aspergillus oryzae*. J. Bact., 2: 1883, 1966.
43. HOWDEN, G.F. & KILBY, B.A. Trehalose and trehalase in the locust. Chem. & Ind., 48: 1453-54, 1956.
44. HOWDEN, G.F. & KILBY, B.A. Biochemical studies on insect haemolymph. I. Variations in reducing power with age and effect of diet. J. Insect.Physiol., 4: 258-69, 1960.
45. ISHIDA, Y.; FUJITA, T.; ASAI, K. New detection and separation method for amino acids by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography., 204: 143-8, 1981.
46. KASSEL, B. Naturally occurring inhibitors of proteolytic enzymes. Methods in Enzymol., 19: 839, 1970.
47. KASUMI, T.; BRENER, C.F.; REESE, E.T.; HERE, E.J. Catalytic versatility of trehalase: synthesis of α -D-glucopyranosyl- α -D-xylopyranoside from β -D-glucosyl flour-

- ide and α -D-xylose. Carbohydr. Res., 146: 39-49, 1986.
48. KALF, G.F. & RIEDER, S.V. The purification and properties of trehalase. J. Biol. Chem., 230: 691-8, 1958.
49. KATAGIRI, C. Localization of trehalase in the haemolymph of the American cockroach. Periplaneta americana. Insect Biochem., 7: 351-53, 1977.
50. KELLER, F.; SCHELLENBERG, M.; WIEMKEN, A. Localization of trehalase in vacuoles and of trehalose in the cytosol of yeast Saccharomyces cerevisiae. Arch. Microbiol., 131: 298-301, 1982.
51. LABAT, J.; BAUMANN, F. & COURTOIS, J.E. La trèhalase rénale du porc et de l'homme: purification et quelques propriétés. Biochimie, 56: 805-13, 1974.
52. LEIBOWITZ, J.A. A new source of trehalose. Nature, London, 152 (387): 414-15, 1943.
53. LEIBOWITZ, J.A. Isolation of trehalose from desert manna. Biochem. J., 38(3): 205-06, 1944.
54. LIENER, I.E. & KOKADE, M.L. Toxic Constituents of Plant Foodstuffs. In LIENER, I.E., ed. New York, Academic Press, 1969 p.
55. LINEWEAVER, H. & BURK, D. The determination of the enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc., 56: 658-666, 1934.
56. LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-75, 1951.

57. MASSEY, V. Studies on fumarase. Biochem. J., 55: 173-76, 1953.
58. MATTHEWS, J.R.; DOWNER, R.G.H. and MORRISON, P.E. -Glucosidase activity in haemolymph of the American cockroach *Periplaneta americana*. J. Insect Physiol., 22: 157-63, 1976.
59. MARZLUF, G.A. Studies on trehalase and sucrose of *Drosophila melanogaster*. Arch. Biochem. Biophys., 134: 8-18, 1969.
60. MERDINGER, E.; LANGE, C.F. & BOOKER, B.F. Isolation and identification of trehalase from *Pullularia pullulans*. J. Bacteriol., 106(3): 1034-5, 1971.
61. NARUMI, K. & TSUMITA, T. The isolation and identification of α, α' -trehalose-6,6'-diphosphate, a subunit of the phosphorylated polysaccharides of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Biol. Chem., 240: 2271-6, 1965.
62. NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem., 153(2) 375-80, 1944.
63. PANEK, A. Function of trehalose in baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Biochem. Biophys., 100: 422-5, 1963.
64. PANEK, A.D. & MATTOON, J.R. Regulation of energy metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: relationships between catabolite repression trehalose synthesis and mitochondrial development. Arch. Biochem. Biophys., 183: 306 - 16, 1977.
65. PANEK, A.D. Trehalose metabolism in yeast: an overview. Arch. Biol. Technol., 25: 261-71, 1982.

66. PANEK, A.D. & BERNARDES, E.J. Trehalose: its role in hermination of **Saccharomyces cerevisiae**. Curr. Genet. 7: 393-7, 1983.
67. PUSZTAI, A. Trypsin inhibitors of plant origin, their chemistry and potential role in animal nutrition. Nutrit. Abstracts Rev., 37: 1-9, 1967.
68. RANDALL, D.D. & BERR, R.F. Trehalose: occurrence and relation to egg diapause and active transport in the differential grasshopper. **Melanoplus differentialis**. J. Insect Physiol., 1: 329-35, 1965.
69. RICHARDSON, M. The proteinase inhibitors of plants on micro-organism. Phytochemistry., 16(2): 159-69, 1977.
70. ROBERTS, R.M. & TOVEY, K.C. Trehalase activity in **Selaginella martensii**. Arch. Biochem. Biophys., 133: 408-12, 1969.
71. RYAN, C.A. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. Ann. Rev. Plant. Physiol., 24: 173, 1973.
72. SACKTOR, B. & WORMSER-SHAVIT, E. Regulations of metabolism in working muscle in vivo. Concentrations of some glycolytic, tricarboxylic acid cycle, and amino acid intermediates in insect flight muscle during flight. J. Biol. Chem., 241(3). 624-31, 1966.
73. SACKTOR, B. Trehalase and the transport of glucose in the mammalian kidney and intestine. Proc. Nat. Acad. Sci., 60: 1007-14, 1968.
74. SACKTOR, B. Regulation of intermediary metabolism, with special reference to the control mechanism in flight muscle. Adv. Insect Physiol., 7: 267-347, 1970.
75. SAITO, S. Trehalose in the body fluid of the silkworm, **Bombix mori**, L. J. Insect Physiol., 9: 509-19, 1963.

76. SENN, M.; IONEDA, T.; PUDLES, L. & LEDERER, E. Spectrométrie de masse de glycolipides. 1. Structure du "cord factor" de *Corynebacterium diphtheriae*. Aur. J. Biochem., 1: 353-56, 1967.
77. SHYMALA, M.R. BHAT, J.V. Intestinal transport of glucose in the silkworm, *Bombix mori*. Indian J. Biochem., 2: 101-4, 1965.
78. SOMOGYI, M. A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem., 160(1): 61-8, 1945.
79. SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195: 19-23, 1952.
80. STEELE, J.E. Occurrence of a hyperglycemic factor in the corpus cardiacum of an insect. Nature, London. 192: 680-1, 1961.
81. SUSSMAN, A.S.; GARRETT, K.M.; SARGENT, M.; SHIH-AN YU. Isolation, mapping, and characterization of trehalase mutants of *Neurospora crassa*. J. Bacteriol., 108: 59-68, 1971.
82. TALBOT, B.G. & HUBER, R.E. Partial purification, stabilization and characterization of adult honey bee midgut trehalase and a new trehalose specific disc gel stain method. Insect Biochem., 5: 337-47, 1975.
83. TREHERNE, J.E. Glucose absorption in the cockroach. J. Exp. Biol., 34: 478-85, 1957.
84. TREHERNE, J.E. Facilitated diffusion and exchange in the absorption of glucose by the locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk). Nature, London, 181: 1280-1, 1958.
85. TREHERNE, J.E. The absorption and metabolism of some sugars in the locust. *Schistocerca gregaria* (Forsk). J. Exp. Biol., 35: 611-25, 1958.

86. THREVELEIN, J.M.; VAN LAERE, A.J.; BEULLENS, M.; VAN ASSCHE, J.A.; CARLIER, A.R. Glucose-induced trehalase activation and trehalose mobilization during early germination of *Phycomyces blakesleanus* spore. J. Gen. Microbiol., 129: 719-26, 1983.
87. VANEY, C. & MAIGNON, F. Contribution à l'étude physiologique des metamorphoses du ver à soie. Rapp Lab. Étud., Soie, Lyon, 12: 13-68, 1903-6.
88. VANDERMEER, J.W. & COCHNAUER, T.A. Trehalase activity associated with spores of *Nosema apis*. J. Invertebr. Pathol., 17: 38-41, 1971
89. VAN ASPEREN, K. & VAN ESCH, I. The chemical composition of the haemolymph in *Periplaneta* with special reference to the mineral constituents. Arch. Neerl Zool., 11:342-60, 1956.
90. WYATT, G.R. The biochemistry of insect haemolymph. Ann. Rev. Ent., 6: 85-7, 1961.
91. WYATT, G.R. The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects. Adv. Insect Physiol., 4:287-360 , 1967.
92. ZEBE, E.C. & MacSHAN, W.H. Trehalase in the thoracic muscles of the woodroach, *Leucophaea maderae*. J. Cell. Comp. Physiol., 53: 21-30, 1959.