

**LUCIMAR SOARES MOTTA MAIA**

“PRÓTON-PIROFOSFATASE EM *RHODNIUS*  
*PROLIXUS* E *PERIPLANETA AMERICANA*:  
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E PARTICIPAÇÃO  
NA ACIDIFICAÇÃO DE COMPARTIMENTOS  
SUBCELULARES”

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO  
DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE  
DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho**  
**2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PRÓTON-PIROFOSFATASE EM *RHODNIUS PROLIXUS* E  
*PERIPLANETA AMERICANA*: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA  
E PARTICIPAÇÃO NA ACIDIFICAÇÃO DE  
COMPARTIMENTOS SUBCELULARES

**Lucimar Soares Motta Maia**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica) da Universidade Federal do Rio de Janeiro visando a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ednildo de A. Machado

Rio de Janeiro  
Junho de 2006

PRÓTON-PIROFOSFATASE EM *RHODNIUS PROLIXUS* E *PERIPLANETA AMERICANA*: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E PARTICIPAÇÃO NA ACIDIFICAÇÃO DE COMPARTIMENTOS SUBCELULARES

**Lucimar Soares Motta Maia**

**Orientador: Prof. Dr. Ednildo de Alcantara Machado**

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica).

Aprovada por:

---

Prof. Dr. Ednildo de Alcantara Machado  
Prof. Adjunto, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho / CCS / UFRJ

---

Presidente, Prof. Dr. Marcelo Einicker Lamas  
Prof. Adjunto, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho / CCS / UFRJ

---

Prof. Dr. Hatsaburo Masuda  
Prof. Titular, Instituto de Bioquímica Médica / CCS / UFRJ

---

Prof. Dr. Antônio Galina  
Prof. Adjunto, Instituto de Bioquímica Médica / CCS / UFRJ

Revisora:

---

Profa Dra. Jennifer Lowe  
Prof. Adjunto, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho / CCS / UFRJ

Rio de Janeiro  
Junho de 2006

# FICHA CATALOGRÁFICA

Motta, Lucimar Soares

Próton-Pirofosfatase em *Rhodnius prolixus* e *Periplaneta americana*: Caracterização Bioquímica e Participação na Acidificação de Compartimentos Subcelulares/ Lucimar Soares Motta Maia. Rio de Janeiro: UFRJ/ IBCCF, 2006.

xii, 154f.: il.; 31 cm.

Orientador: Ednildo de Alcantara Machado

Tese (Doutorado)–UFRJ / IBCCF / Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2006.

Referências Bibliográficas: f. 110-132.

1. *Rhodnius prolixus*, 2. *Periplaneta americana*, 3. Próton-pirofosfatase, 4. Ovogênese; 5. Embriogênese; 6. Grânulo de Vitelo; 7. Acidificação; 8. Acidocalcissomo. I.Machado, Ednildo de Alcantara. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). III. Título.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Entomologia Médica do Programa de Parasitologia e Biologia Celular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, em colaboração com o Laboratório de Bioquímica de Insetos, Laboratório de Bioenergética, Laboratório de Bioquímica de Artrópodos Hematófagos (ICB, UFRJ) e Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer (IBCCF, UFRJ), sob a orientação do professor Dr. Ednildo de Alcantara Machado, na vigência dos auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

*Aos meus pais, Lêda e Ilmar,  
que sempre se esforçaram em deixar para mim e  
meus irmãos uma das maiores heranças: educação,*

*Dedico*

# AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Ednildo, por ter sido sempre tão compreensivo e por ter me dado apoio, credibilidade e liberdade para realizar o meu trabalho da forma que eu acreditava e por ter sempre o seu “divã” disponível para as mais variadas conversas. Ainda te agradeço por tornar minhas escolhas tão fáceis (e muitas vezes por influenciá-las muito positivamente), sendo uma pessoa em quem sempre pude confiar.

À professora Suzete, que sempre teve muito boa vontade em responder todas as minhas perguntas (e não foram poucas!) e explicar-me com a maior paciência o complexo e amplo universo dos insetos. Obrigada pela amizade e gratificante convivência.

Aos meus mais que companheiros de trabalhos, meus amigos de todo dia, Marcelo e Danielle, fiés remanescentes de 1999, época em que o Laboratório só tinha boas idéias, pessoas competentes e muito dedicadas e diversos tubos de ensaio e cadeiras quebradas. Realmente nós fizemos parte de uma grande mudança, meus amigos.

À Isabela, Fábio, Bruno, Rodrigo e Luís, que são amigos maravilhosos, que admiro e gosto muito, cada um com suas características individuais marcantes que fazem do dia-a-dia do Laboratório um mini-mundo fascinante e muito prazeroso. Adoro vocês do fundo do coração e obrigada por fazerem do nosso Laboratório um excelente ambiente de trabalho. A propósito, Ed, você realmente tem um grande talento em selecionar pessoas!

Aos “ex-amigos” Eduardo, Mônica(s), Lize, Jucélio, Fernanda, Adriana, Breno, Vanessa, Mariana e Cecília (vulgo “falecidos”) que pelos mais variados motivos não fazem mais parte da equipe do Laboratório, valeu muito o tempo de convivência e até hoje as lembranças muito cômicas da passagem de cada um de vocês pelo Laboratório.

Em especial à Isabela, Fábio, Fernanda e Elaine, que tive o prazer em colaborar um pouquinho na “orientação” profissional e ver a superação de cada um (principalmente no pânico as baratas). Espero que tenha sido capaz de ensiná-los tanto quando pude aprender com cada um de vocês.

Aos meus alunos e ex-alunos (que não foram poucos!), meus mais sinceros agradecimentos por terem me ensinado muito nesses anos de convivência, me tornando uma pessoa mais paciente ainda, mais humilde e mais “ouvinte”. Obrigado por terem me mostrado a importância da individualização pessoal e por ter me feito mais atenta a extrair o que há de melhor em cada um de vocês, respeitando as suas limitações sem desacreditar que essas barreiras podem ser vencidas com trabalho e dedicação.

Ao Dr. Wagner Seixas da Silva, que mais que um co-orientador na minha Iniciação Científica, foi e é um grande amigo em quem sempre pude confiar para todos os meus questionamentos, além de um gênio, cujo brilhantismo científico criou novas perspectivas para o meu trabalho de IC, o que se tornou o cerne da minha tese de doutorado. Obrigada pelas inúmeras discussões sempre muito proveitosas e por todo o socorro que sempre me prestou com a maior boa vontade e dedicação, mesmo nos fins-de-semana das cansativas e longas preparações de membrana.

Ao Dr. Leopoldo e toda sua equipe (principalmente o técnico Carlinhos e o estudante Reinaldo que sempre atenderam meus inúmeros pedidos de muito boa vontade) que foram fundamentais na caracterização bioquímica da enzima, cedendo praticamente todos os c

Fang e Peter Rohloff por terem me auxiliado no aprendizado das técnicas de biologia molecular e dosagem de polifosfato, respectivamente.

À professora Narcisa, que no primeiro período da graduação, com toda sua paciência característica me orientou na leitura do meu primeiro artigo científico (transporte retrógrado da toxina Shiga, lembra?) e durante este processo me fez descobrir em mim uma pessoa muito capaz e esforçada. Obrigada por ter acreditado em mim. Acredite que seu gesto teve grande participação na minha formação pessoal e profissional.

Ao professor Maurício Luz, que me atura desde o meu estágio no CAp-UFRJ, durante a graduação. Obrigada por me permitir aprender tanto com sua experiência espetacular em ensino e por me mostrar uma forma muito mais interessante e eficiente de “ensinar” Biologia em geral e Bioquímica e Biologia Celular em especial. Obrigada por ter tido sempre tanta confiança no meu trabalho e por ter me proporcionado tantas oportunidades.

Aos meus fiés amigos Viviane, Giselle, Igor, Iraniaia, Andréa e Lucianna, pessoas que eu posso sempre confiar e que resistem bravamente a amizade com uma pessoa tão relapsa e sempre ocupada como eu sou. Prometo que daqui pra frente vou escrever mais e responder os e-mails de vocês com mais rapidez! Vocês são exemplos concretos da verdadeira amizade e mesmo sem o convívio diário que tínhamos sei que estamos sempre presentes nas vidas uns dos outros nos momentos necessários.

Aos meus pais Lêda e Ilmar por sempre me apoiarem, mesmo quando acreditam que não estou fazendo a melhor escolha. Por terem me criado num ambiente familiar seguro e com muito amor, que foi fundamental para o meu crescimento saudável. Apesar de discordarmos às vezes, vocês são exatamente os pais que eu gostaria de ter. Agradeço à minha mãe por sua dedicação desmedida, todo esforço em me proporcionar uma boa educação apesar das dificuldades e por ser a pessoa que posso sempre contar, independente do que possa acontecer. Obrigada pai, por me mostrar (mesmo através do seu jeito “durão”!) valores muito preciosos e que trabalho duro, perseverança e honestidade são as ferramentas ideais para atingirmos nossas metas.

À minha avó Jurandy e aos meus falecidos avós Andreza e Alcindo pelas inúmeras orações e torcida sempre presente em qualquer passo da minha jornada. Obrigada por todo o amor e ternura que sempre recebi, além das partidas de buraco e mingau de fubá que serão inesquecíveis.

Aos meus irmãos Letícia, Luciene, Leonardo e Rodrigo que são os melhores presentes que meus pais puderam me dar. Ter vocês como irmãos é saber que, não importa o que aconteça, nunca estarei sozinha. O tempo vai passando, cada um vai construindo sua própria

família à sua maneira e a distância nos separa fisicamente... No entanto sinto que a cada ano somos mais unidos e nos amamos ainda mais, pois o tempo e o amadurecimento nos faz

que só você mesmo pra dizer que estava ótimo), com pouco dinheiro, sem ter onde passar a primeira noite. Sei que você estava muito preocupado (te vi chorando escondido no aeroporto, hein!), mas todas as suas palavras foram tão positivas que eu passei realmente a acreditar que eu seria capaz de fazer aquilo tudo. Obrigada pela imensa prova de amor, ao abdicar um pouquinho de você e ter ido comigo para os Estados Unidos durante o “sandwich”, isso foi lindo e sem você acho que não teria conseguido. Obrigada por todas as vezes que você me resgata cochilando com a cara no computador ou no sofá e me leva pra cama altas horas da madrugada e pelos inúmeros lanchinhos que você prepara quando estou trabalhando no computador. E, principalmente, obrigada por me amar e aceitar do jeito que eu sou e ainda achar lindo as minhas manias mais esquisitas! Realmente tive muita sorte em te encontrar em meio àquela multidão, minha vida.

“Entre tantos outros, entre tantos anos, que sorte a nossa, hein? Entre tantas paixões, esse encontro, nós dois, esse amor”.

É muito difícil agradecer a todos sem esquecer, inevitavelmente, de alguém, mas aos que esqueci, meu pedido de perdão e meus agradecimentos sinceros!

## RESUMO:

### PRÓTON-PIROFOSFATASE EM *RHODNIUS PROLIXUS* E *PERIPLANETA AMERICANA*: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E PARTICIPAÇÃO NA ACIDIFICAÇÃO DE COMPARTIMENTOS SUBCELULARES

Lucimar Soares Motta Maia

Orientador: Prof. Dr. Ednildo de Alcantara Machado

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Compartimentos intracelulares que armazenam íons e macromoléculas são comuns em vários organismos pertencentes a diferentes *taxa*. Em insetos, durante a ovogênese, um grande número de proteínas de vitelo é incorporado pelos ovócitos e acumulado em estruturas chamadas Grânulos de Vitelo (GV). Durante a embriogênese, o conteúdo destes grânulos é hidrolisado, principalmente através de enzimas acídicas, como fosfatases, por exemplo. Acidocalcissomos são organelas ácidas, inicialmente descritas em protozoários, com elevada concentração de polifosfato (PoliP),  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e outros elementos e desempenham diferentes funções, incluindo o armazenamento de cálcio e fósforo. Neste trabalho nós observamos em frações da membrana de ovos de *Rhodnius prolixus*, obtidas por centrifugação diferencial, uma  $\text{H}^+$ -ATPase vacuolar que foi inibida por  $\text{KNO}_3$  e também capaz de transportar  $\text{H}^+$  através das membranas de vesículas. Posteriormente, nós medimos a atividade da enzima próton-pirofosfatase ( $\text{H}^+$ -PPase) nas mesmas frações de membrana de *R. prolixus* e também em frações de membrana de ovócitos de *Periplaneta americana*. Nestas preparações o pH ótimo foi aproximadamente 7,0 e as enzimas se mostraram dependentes de  $\text{Mg}^{2+}$  e inibidas por NaF, IDP e  $\text{Ca}^{2+}$ . As proteínas da membrana de ovos de *R. prolixus* foram analisadas por “Western blot” usando anticorpo anti- $\text{H}^+$ -PPase de planta, onde pudemos identificar um único polipeptídeo de aproximadamente 65 kDa, que foi localizado na periferia dos GV de *R. prolixus*. Nós descrevemos também a acidificação provocada pela hidrólise de PPI em GV de *R. prolixus* e *P.*

*americana* através da captação de Laranja de Acridina. Em ambos os insetos a enzima foi imunolocalizada em GV pequenos (menores que 3  $\mu\text{m}$ ) e, em GV do mesmo tamanho, nós pudemos observar uma grande concentração fósforo,  $\text{Ca}^{2+}$  e outros elementos, como encontrado em acidocalcissomos. Além disso, nós medimos a quantidade de PoliP em ovos frescos de *R. prolixus* e em ovários e ovos de *P. americana*. Por último nós observamos que o transporte de prótons em GV de *P. americana* está envolvido com a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  por estes grânulos. Nossos resultados mostraram pela primeira vez a presença de  $\text{H}^+$ -PPases envolvidas com a acidificação de compartimentos em ovos de insetos e estes resultados sugerem que alguns GV têm diversas similaridades estruturais com acidocalcissomos, indicando que podem ter as mesmas funções que estas organelas de protozoários.

Palavras-chave: *Rhodnius prolixus*, *Periplaneta americana*, Próton-pirofosfatase, Ovogênese, Embriogênese, Grânulo de Vitelo, Acidificação, Acidocalcissomo.

Abreviaturas: IDP= imidodifosfato

NaF= Fluoreto de Sódio

# ABSTRACT:

## PROTON-PYROPHOSPHATASE IN *RHODNIUS PROLIXUS* AND *PERIPLANETA AMERICANA*: BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND PARTICIPATION ON SUBCELLULAR COMPARTMENTS ACIDIFICATION

Lucimar Soares Motta Maia

Orientador: Prof. Dr. Ednildo de Alcantara Machado

*Abstract* da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Intracellular compartments that store ions and macromolecules are common in several organisms belonging to different *taxa*. In insects, during oogenesis, a large amount of yolk proteins is incorporated by oocytes and stored in structures called yolk granules (YG). During insect embryogenesis, the content of these granules is hydrolyzed, specially by acid enzymes, as phosphatases. Acidocalcisome are acid organelles, first found in protozoan, which has a high concentration of polyphosphate (PolyP),  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and other elements and this organelle has different functions, including the storage of calcium and phosphorous. In this work we observed in membrane fractions of *Rhodnius prolixus* eggs, prepared by differential centrifugation, a vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase activity that was inhibited by  $\text{KNO}_3$  and was able to transport  $\text{H}^+$  through vesicle membranes. After that, we have measured the proton-pyrophosphatase ( $\text{H}^+$ -PPase) activity in those fractions of *R. prolixus* and also in membrane fractions from *Periplaneta americana* oocytes. In these preparations the optimum pH was around 7.0 and the enzymes were dependent on  $\text{Mg}^{2+}$ , inhibited by NaF, IDP and  $\text{Ca}^{2+}$ . The membrane proteins of *R. prolixus* eggs were analyzed by Western blot using anti plant- $\text{H}^+$ -PPase, showing an immunostaining associated to a single 65 kDa polypeptide, which was immunolocalized on the periphery of *R. prolixus* yolk granules. We also described *R. prolixus*' and *P. americana*'s YG acidification by PPI using acridine orange uptake. In both insects the  $\text{H}^+$ -PPase-like immunoreactivity was present in small YG (less than 3  $\mu\text{m}$ ) and, in YG of the same size, we observed a high concentration of phosphorus, calcium and others elements, as

found in acidocalcisomes. In addition we have measured the polyphosphate content in *R. prolixus* fresh eggs and in *P. americana* ovaries and eggs. Finally, we have observed that proton transport in *P. americana* YG was responsible for calcium uptake by these granules. Our results showed for the first time a H<sup>+</sup>-PPase activity that promote acidification of compartments in insect eggs and the results together suggest that some YG have several structural similarities with acidocalcisomes, indicating that they may have the same functions as these protozoan organelles.

Keywords: *Rhodnius prolixus*, *Periplaneta americana*, Proton-pyrophosphatase, Oogenesis, Embryogenesis, Yolk Granule, Acidification, Acidocalcisome.

Abbreviations: IDP= imidodiphosphate

NaF= Sodium Fluoride

# SUMÁRIO

Abreviaturas Usadas.....	xvii
<b>I- Introdução.....</b>	<b>01</b>
<b>I.1. Os Insetos como Modelos de Estudo.....</b>	<b>01</b>
<b>I.2. Sistema Reprodutivo e Ovogênese de Insetos.....</b>	<b>04</b>
<b>I.3. Desenvolvimento Embrionário em Insetos.....</b>	<b>12</b>
I.3.1. Degradação do Vitelo.....	16
<b>I.4. Bombas de Próton e Próton-Pirofosfatases.....</b>	<b>20</b>
I.4.1. Pirofosfato como um doador de energia para as atividades celulares.....	20
I.4.2. Propriedades das H <sup>+</sup> -PPases.....	23
I.4.3. Aspectos evolutivos e distribuição das H <sup>+</sup> -PPases nos organismos.....	26
I.4.4. H <sup>+</sup> -PPases em organelas vegetais.....	29
I.4.5. H <sup>+</sup> -PPases em protozoários.....	32
I.4.5.1 Acidocalcissomos.....	33
I.4.6. H <sup>+</sup> -PPases em insetos.....	36
<b>II- Objetivo Geral.....</b>	<b>39</b>
<b>III- Objetivos Específicos.....</b>	<b>40</b>
<b>IV- Materiais e Métodos.....</b>	<b>41</b>
<b>IV.1. Insetos.....</b>	<b>41</b>
IV.1.1. <i>Rhodnius prolixus</i> .....	41
IV.1.2. <i>Periplaneta americana</i> .....	41
<b>IV.2. Obtenção das Frações de Membrana em Ovários e Ovos de <i>R. prolixus</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>IV.3. Preparação da Suspensão de Grânulos.....</b>	<b>43</b>
IV.3.1. <i>Rhodnius prolixus</i> .....	43

IV.3.2. <i>Periplaneta americana</i> .....	43
IV.4. Dosagem de Proteínas.....	44
IV.5. Hidrólise de Pirofosfato e ATP.....	44
IV.6. Gel de Eletroforese e “Western Blot” .....	45
IV.7. Localização da Enzima no Tecido por Microscopia Óptica.....	46
IV.8. Localização da Enzima no Tecido por Microscopia Eletrônica.....	46
IV.9. Acidificação dos Grânulos de Vitelo.....	47
IV.10. Bombeamento de Prótons.....	48
IV.11. Imunofluorescência Indireta.....	49
IV.12. Microanálise de raio-X.....	50
IV.13. Extração de Polifosfato (PoliP).....	50
IV.14. Determinação da Quantidade de Polifosfato (PoliP).....	52
IV.15. Determinação da Variação de Cálcio.....	52
<b>V - Resultados.....</b>	<b>54</b>
V.1. Hidrólise de ATP em Frações de Membrana de Ovos de <i>Rhodnius prolixus</i> ....	54
V.2. Transporte de Prótons em Microsossomos Obtidos de Frações de Membrana de Ovos de <i>R. prolixus</i> .....	54
V.3. Hidrólise de PPI e ATP nas frações de membrana de <i>R. prolixus</i> .....	55
V.4. Determinação do pH ótimo para a atividade da enzima <i>in vitro</i> e verificação da dependência de magnésio para a atividade da enzima em <i>R. prolixus</i> .....	60
V.5. Efeito de Diferentes Inibidores na Hidrólise de PPI em Frações de Membrana de Ovos e Ovários de <i>R. prolixus</i> .....	63
V.6. Determinação do pH ótimo para a atividade da enzima <i>in vitro</i> e verificação da dependência de magnésio para a atividade da enzima em <i>P. americana</i> .....	67

V.7. Efeito de Diferentes Inibidores na Hidrólise de PPI em Frações de Membrana de Ovócitos de <i>P. americana</i> .....	70
V.8. “Western Blot” para H <sup>+</sup> -PPase de <i>R. prolixus</i> .....	74
V.9. Transporte de Prótons Através de Membranas de Grânulos de Vitelo de Ootecas de <i>P. americana</i> .....	78
V.10. Acidificação de Grânulos de Vitelo de ovos de <i>R. prolixus</i> .....	80
V.11. Acidificação de Grânulos de Vitelo de ovos de <i>P. americana</i> .....	83
V.12. Imunofluorescência.....	85
V.13. Análise do Conteúdo de Elementos Químicos presentes nos Grânulos Pequenos.....	88
V.14. Dosagem de Polifosfato em Vesículas Presentes em Suspensões de Grânulos de <i>R. prolixus</i> e <i>P. americana</i> .....	91
V.15. Determinação da Captação de Cálcio por Vesículas Presentes em Suspensões de Grânulos de <i>P. americana</i> .....	91
VI- Discussão.....	96
VI- Conclusões.....	109
VIII- Referências Bibliográficas.....	110
IX- Anexo 1.....	133

## **ABREVIATURAS USADAS:**

ACMA – 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina

ATP – Adenosina Trifosfato

AMDP – Aminometilenodifosfonato

BSA – Soro Albumina Bovina

Ca<sup>2+</sup> – Íon Cálcio

CaCl<sub>2</sub> – Cloreto de Cálcio

DIC – Contraste Interferencial Diferencial

DTT – Ditioneitol

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

EGTA – Ácido Etilenoglicoltetracético

FCCP – Carbonilcianeto-p-trifluorometoxifenilhidrazona

GV – Grânulo de Vitelo

GVG – Grânulo de Vitelo Grande

GVP – Grânulo de Vitelo Pequeno

HEPES – N-[hidroxietil] piperazina-N'-[2ácido etanosulfórico]

HCl – Ácido Clorídrico

H<sup>+</sup>-ATPase – Próton ATPase

H<sup>+</sup>-PPase – Próton Pirofosfatase

IDP – Imidodifosfato

K<sup>+</sup> – Íon Potássio

KCl – Cloreto de Potássio

KNO<sub>3</sub> – Nitrato de Potássio

LA – Laranja de Acridina

Mg<sup>2+</sup> – Íon Magnésio

MgSO<sub>4</sub> – Sulfato de Magnésio

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio

MOPS – Ácido 3-N-morfolinopropano-sulfônico

NaCl – Cloreto de Sódio

NaF – Fluoreto de Sódio

NaHCO<sub>3</sub> – Bicarbonato de Sódio

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – Sódio Fosfato Monobásico

NaN<sub>3</sub> – Azida de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

NH<sub>4</sub>Cl – Cloreto de Amônio

OCT – “Optimal Cutting Temperature Compound”

PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

PBS – Tampão Fosfato de Sódio

PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonila

PPase – Pirofosfatase

Pi – Fosfato inorgânico

PPi – Pirofosfato inorgânico

SDS – Dodecil-Sulfato de Sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na Presença de SDS

TBS – Salina Tamponada com TRIS

TCA – Ácido Tricloroacético

TRIS – (Tris Hidroximetil)-Aminometano

UA – Unidade Arbitrária

Vt – Vitelina

VO<sub>4</sub> – Vanadato

# I- INTRODUÇÃO

## I.1. Os Insetos como Modelos de Estudo

A utilização de insetos como modelo biológico, principalmente em relação ao estudo de seu sistema reprodutivo, se justifica sob vários aspectos. Dentre eles podemos incluir o curto tempo de geração e as altas taxas reprodutivas destes animais. Conhecer as estratégias reprodutivas deste grupo é importante, visto que o mesmo atua como praga na agricultura e também está envolvido na transmissão de diversos patógenos que afetam outros animais, incluindo o homem (BÜNING, 1994).

Diversas espécies de insetos estão envolvidas na transmissão de vírus, bactérias, protozoários e helmintos parasitas que causam doenças em outros animais e vegetais (DEBBOUN *et al.*, 2005; MUNYANEZA *et al.*, 2006). Alguns insetos participam na transmissão de determinado patógeno como vetores biológicos, ou ainda podem atuar como vetores mecânicos. Os insetos que são definidos como **vetores biológicos** são aqueles cujos parasitos apresentam parte do seu ciclo biológico associado a estes animais. Dentre estes vetores podemos citar os hemípteros (vetores do *T. cruzi*, causador da doença de Chagas), dípteros (transmissores do vírus da febre amarela e plasmódios da malária, etc), sifonápteros (vetor da bactéria causadora da peste bubônica) entre outros. Os **vetores mecânicos**, por outro lado, são aqueles que apenas transportam o parasita, não tendo este nenhuma parte do seu ciclo de vida associado ao vetor. Bactérias, vírus e fungos são geralmente os causadores das doenças transmitidas através deste mecanismo por insetos com hábitos bastante urbanos, como as baratas e

formigas (REY, 1991). No presente estudo, utilizamos dois insetos como modelo: *Rhodnius prolixus* e *Periplaneta americana*.

*Rhodnius prolixus* é um artrópode hematófago da ordem Hemiptera, família Reduviidae (**Figura 1**). Este inseto é um importante vetor da Tripanossomíase Americana, mais conhecida como Doença de Chagas. Esta patologia afeta trezentas mil pessoas e mata cerca de vinte mil na América por ano (SILVEIRA, 2002). Além disso, se compararmos o número de pessoas que se tornam dependentes do governo devido a diversas doenças transmitidas por vetores, a doença de Chagas é a mais dispendiosa. Isto se deve ao fato de que pacientes com tripanossomíase sobrevivem, mas são inaptos ao trabalho o que os torna dependentes dos fundos governamentais (SILVEIRA, 2002). Até os dias de hoje não existe um tratamento satisfatório para esta doença.

*Periplaneta americana*, popularmente conhecida como barata de esgoto, pertence à ordem Dictyoptera, família Blattidae e é uma das espécies de barata mais conhecidas pelo homem. As baratas são insetos cosmopolitas que possuem hábitos alimentares bastante variados, podendo se alimentar de açúcares, gorduras, sangue, resíduos de lixo ou esgoto (MARICONI, 1999). Por ser um inseto extremamente urbano, as baratas participam como vetor mecânico na transmissão de vários patógenos, principalmente vírus causadores de gastroenterites e bactérias causadoras de infecções hospitalares (PAI *et al.*, 2003; SARINHO *et al.*, 2004; THYSSEN *et al.*, 2004; LEMOS *et al.*, 2006) (**Figura 01**).

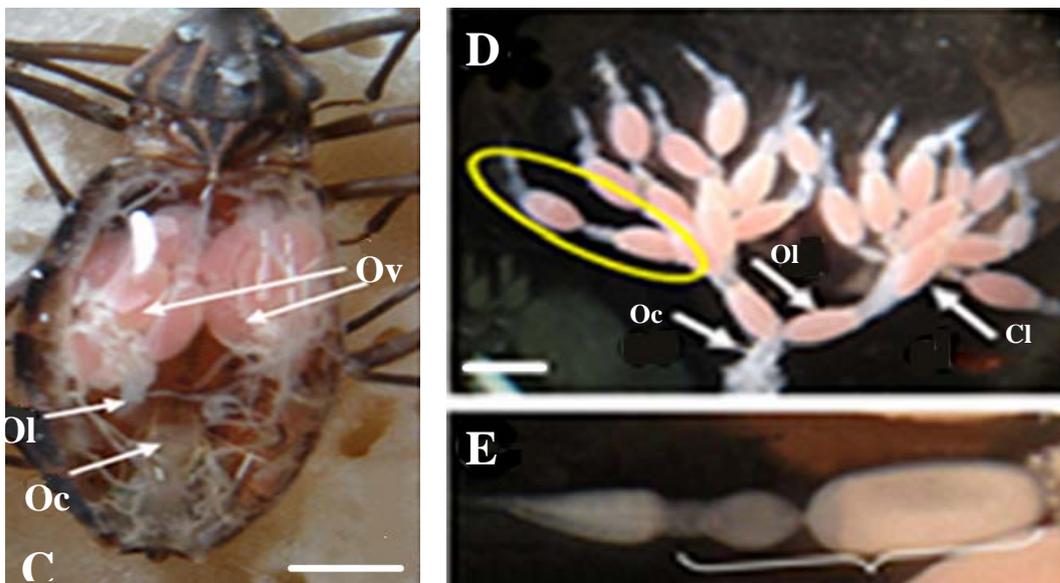
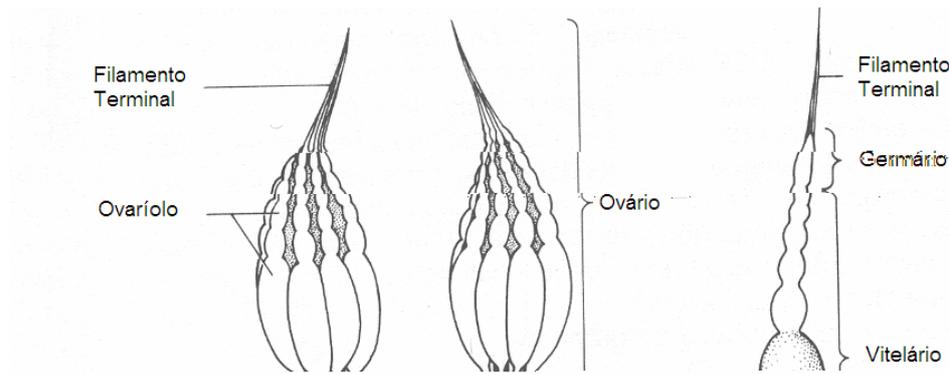


**Figura 01:** Fotografia dos insetos *R. prolixus* e *P. americana* (www.photovault.com).

## I.2. Sistema Reprodutivo e Ovogênese de Insetos

Um dos motivos responsáveis pelo grande sucesso evolutivo dos insetos e pela colonização rápida de diferentes ambientes, é a alta taxa reprodutiva destes organismos. Durante a vida adulta, as fêmeas dos insetos enfrentam um grande desafio metabólico, que consiste em produzir uma grande quantidade de ovos num curto espaço de tempo (CHAPMAN, 1982). O trato reprodutivo de uma fêmea de insetos, de forma geral, é composto por dois ovários, um de cada lado do corpo. Cada ovário é formado por um número variado de ovaríolos, que por sua vez apresentam duas regiões bem distintas: o *germário* (porção embrionária que originará todas as células do folículo ovariano), e o *vitelário* que é a região envolvida com o crescimento dos ovócitos propriamente ditos (**Figura 02**).

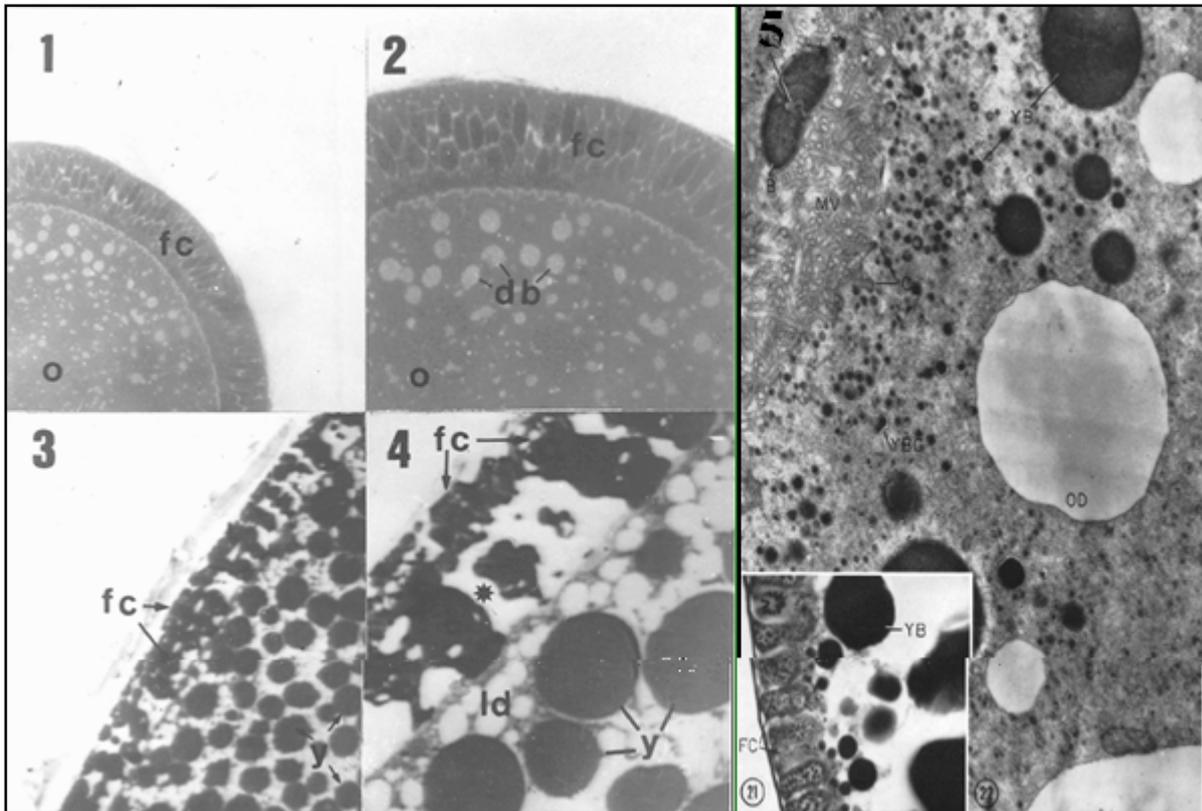
Os ovócitos atravessam três fases em seu desenvolvimento: a) pré-vitelogênese, onde o crescimento do ovócito é ainda muito lento; b) vitelogênese, fase de crescimento bastante acentuado durante a qual ocorre a formação dos grânulos de vitelo (**Figura 0 3**); c) coriogênese, onde as células do epitélio folicular (células que recobrem os ovócitos) iniciam a secreção do córion, uma camada quitinosa que protegerá os ovos postos contra ressecamento e lesões mecânicas (RUBENSTEIN, 1979; PAPASSIDERI e MARGARITIS, 1996).



*Marcelo Medeiros 2004*

**Figura 02:** Sistema Reprodutivo de Fêmeas de Inseto. **A)** Diagrama dos ovários. **B)** Detalhe de um ovaríolo. Podemos notar as duas regiões do ovaríolo responsáveis pela produção de ovos: o *germário*, com células germinativas que originarão todas as células presentes no ovário; e também o *vitelário*, onde se encontram ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento (adaptado de SNODGRASS, 1935). **C)** Fêmea de *R. prolixus* dissecada dorsalmente evidenciando a localização dos ovários. Barra: 1,5cm. **D)** Ovário de *R. prolixus*. Circulado em amarelo um ovaríolo. Barra: 1,5 cm. **E)** Detalhe do Ovaríolo de *R. prolixus* mostrando as regiões do germário e vitelário.

(Ov) ovário; (Ol) Oviduto lateral; (Oc) Oviduto comum; (Cl) Cálice.



**Figura 03:** Cortes de ovócitos de *R. prolixus* e *P. americana* em diferentes fases do desenvolvimento. **1, 2, 3 e 4:** Ovócitos de *R. prolixus* (MACHADO, 1992); **5:** Ovócito vitelogênico de *P. americana* (ANDERSON, E., 1964). **1 e 2** – Ovócitos pré-vitelogênicos; **3, 4 e 5** – Ovócitos vitelogênicos. **fc:** Células Foliculares; **o:** ovócito; **db:** Corpos Densos; **y** ou **YB:** Grânulos de Vitelo e **ld** ou **OD:** Gotículas de Lipídeo; **MV:** microvilosidades

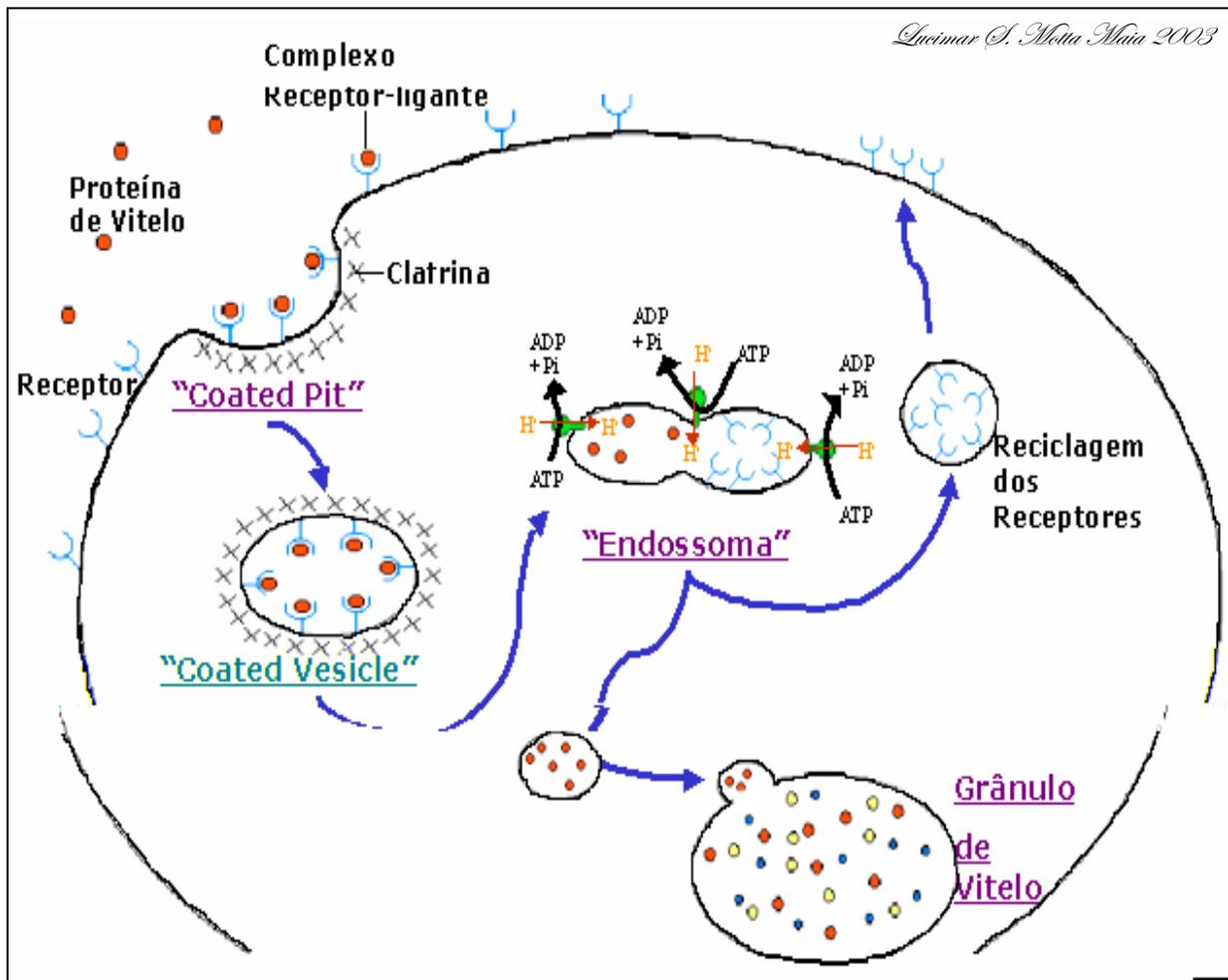
Durante a vitelogenese os ovócitos captam uma grande quantidade de macromoléculas extra-ovarianas, incluindo lipídeos e proteínas, que geralmente são produzidas no corpo gorduroso (órgão com função semelhante ao fígado de vertebrados) e secretadas para a hemolinfa (líquido que banha todos os órgãos dos insetos) (RAIKHEL e DHADIALLA, 1992). A internalização de proteínas, que são em conjunto denominadas proteínas de vitelo, é bastante conhecida em diversos insetos, onde ela ocorre, na maioria dos casos, através de endocitose mediada por receptores específicos (ROTH e PORTER, 1964; RAIKHEL e DHADIALLA, 1992; VALLE, 1993). Em *R. prolixus*, o processo de captação de proteínas para formação dos ovos foi inicialmente compreendido pela caracterização da incorporação da proteína majoritária do ovo, denominada vitelina (Vt), pelos ovários do inseto (OLIVEIRA, 1986). Com relação às proteínas de vitelo, a Vt é a principal fonte de aminoácidos para a construção dos polipeptídeos do embrião (RAIKHEL e DHADIALLA, 1992), porém, já foi descrita também a incorporação de outras proteínas não-vitelinicas pelos ovócitos em desenvolvimento como RHBP (“*Rhodnius* heme binding protein”) (OLIVEIRA *et al.*, 1995; MACHADO *et al.*, 1998), RCBP (“*Rhodnius* calcium-binding phosphoprotein”) (SILVA-NETO *et al.*, 1996) e carboxipeptidases (CHO, 1991). Todas estas proteínas são incorporadas de forma semelhante à observada para a Vt: através de endocitose mediada por receptores seletivos na membrana dos ovócitos.

Os receptores para estas proteínas encontram-se na superfície das membranas plasmáticas dos ovócitos dos insetos, particularmente nas microvilosidades, aumentando assim a superfície total de incorporação. Após a ligação da molécula que

será endocitada com o seu receptor, ocorre a aglomeração dos complexos receptor-ligante em domínios membranares denominados “coated pits”, que são revestidos na face citoplasmática por proteínas denominadas clatrininas (RAIKHEL e DHADIALLA, 1992). Esses domínios invaginam em direção ao citoplasma e se soltam da membrana, dando origem às “coated vesicles”. O desligamento das clatrininas transforma estas vesículas em endossomos iniciais que irão se fundir uns com os outros e darão origem aos endossomos tardios (GEUZE *et al.*, 1983; SNIGIREVSKAYA *et al.*, 1997), caracterizando assim um mecanismo muito similar a endocitose de proteínas em outros sistemas. Neste compartimento, o bombeamento de prótons realizado principalmente por próton-ATPases ( $H^+$ -ATPases) provoca a diminuição do pH interno, o que será fundamental para a dissociação do complexo receptor-ligante (GEUZE *et al.*, 1983; TURKEWITZ *et al.*, 1988; RAIKHEL E DHADIALLA, 1992; SNIGIREVSKAYA *et al.*, 1997). Após a reciclagem dos receptores, diferente do que ocorre num processo de digestão intracelular clássico, os ligantes não são enviados para o lisossomo, que daria prosseguimento à degradação dessas moléculas. Na endocitose realizada por ovócitos em crescimento, as moléculas endocitadas são acumuladas e armazenadas em estruturas denominadas *grânulos de vitelo* e serão degradadas mais tardiamente durante o desenvolvimento do embrião (KUNKEL e NORDIN, 1985; KANG *et al.*, 1995) (**Figura 04**). Estas moléculas incorporadas constituirão o vitelo, que é composto majoritariamente por lipídeos e proteínas (KAWOOYA *et al.*, 1988), cuja mobilização fornecerá moléculas primordiais (monossacarídeos, ácidos graxos e aminoácidos) para que o desenvolvimento embrionário ocorra (ENGELMAN, 1979; OLIVEIRA *et al.*, 1989). O processo de ovogênese é terminado com a deposição do córion sobre o

ovócito, havendo a seguir a fertilização com o espermatozóide, e finalmente a liberação do ovo do organismo materno.

Diferente do que acontece em *R. prolixus*, onde os ovos são depositados no ambiente de forma individual, fêmeas de *P. americana* depositam seus ovos (16 ovos) em uma estrutura denominada ooteca. Dentro deste compartimento os ovos são protegidos do estresse hídrico e também da predação por alguns animais, já que a casca da ooteca é bastante rígida e de difícil digestão (**Figura 05**).



**Figura 04:** Esquema representativo de endocitose mediada por receptores e formação dos Grânulos de Vitelo.



**Figura 05:** Fotografias de ovos de *R. prolixus* (A) e ootecas de *P. americana* (B).

### **I.3. Desenvolvimento Embrionário em Insetos**

A embriogênese de insetos, de uma forma geral, envolve a multiplicação de células por mitose e seu posterior crescimento e diferenciação em todos os tecidos e órgãos do futuro inseto. A formação destes tecidos, como será discutido mais adiante, ocorre à custa da degradação do vitelo, que irá fornecer a matéria prima necessária para a síntese dos órgãos embrionários.

No início deste processo (*“early embryogenesis”*), o núcleo fertilizado presente

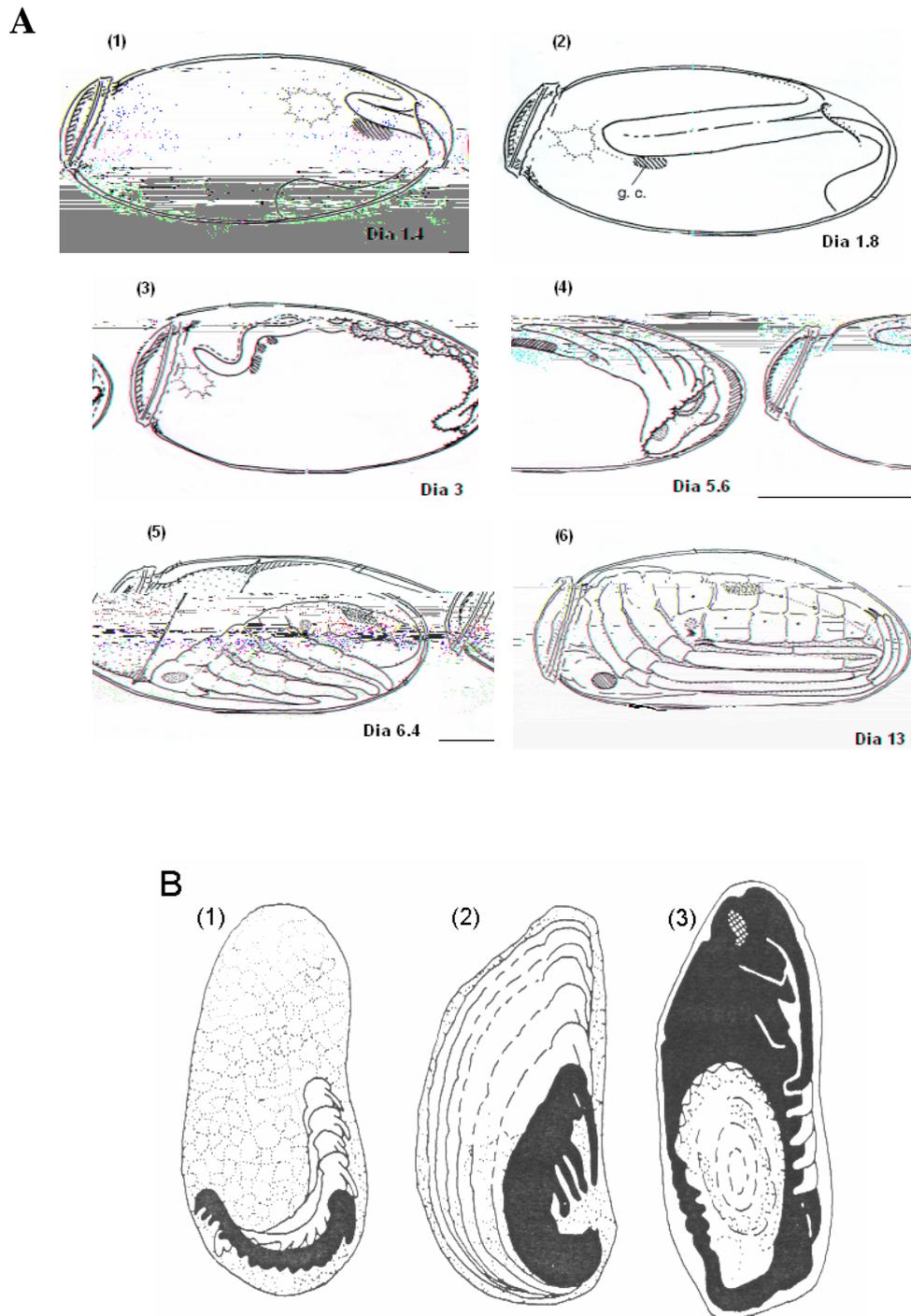
tecidoTT0 1 Tf5768006 Tc 097226 Tw 15idTT nov43o em 0 Td(s. )ção deste7 1 Tf5825006 [(E in

células da blastoderme formarão a camada serosa. Esta estrutura crescerá em torno da banda germinativa, envolvendo o embrião na membrana amniótica. O crescimento da banda germinativa origina uma estrutura composta por duas camadas: uma externa – denominada ectoderme – e uma interna – a mesoderme. Posteriormente uma outra camada germinativa, denominada endoderme é produzida. As células da ectoderme irão dar origem ao cérebro, sistema nervoso, órgãos sensoriais, epiderme, glândulas exócrinas, sistema respiratório, genitália externa e às porções iniciais e finais do tubo digestivo (intestinos anterior e posterior, respectivamente). Células mesodérmicas se diferenciarão em células do tecido sanguíneo, cardíaco, sistema respiratório, músculos, glândulas endócrinas, corpo gorduroso e gônadas. A terceira camada germinativa será responsável pela formação do intestino médio (CHAPMAN, 1982). Terminada a organogênese, uma vez que o desenvolvimento foi completado, os insetos estão aptos a eclodirem de seus ovos.

Todo o desenvolvimento embrionário de *R. prolixus* leva cerca de 14 dias a 27° C e 70% UR. A formação da blastoderme ocorre em aproximadamente 24 horas e entre 24 e 36 horas é formada a membrana amniótica. Ao final de aproximadamente 8 dias é completada a formação da pré-larva e durante os próximos dias que seguem a embriogênese, os órgãos e tecidos primordiais irão se diferenciar e se tornar ativos (HEMING e HUEBNER, 1994) (**Figura 06**).

Muito pouco é conhecido a respeito do desenvolvimento embrionário de *P. americana*. A embriogênese desta barata leva de 28 à 40 dias (DENBURG e FULOP, 1982), havendo uma forte influência da temperatura na duração de seu desenvolvimento. Durante as estações do ano em que a temperatura média é mais

elevada, o desenvolvimento embrionário desta espécie é acelerado, enquanto que o mesmo é mais longo em épocas mais frias (dados não publicados obtidos no laboratório) (**Figura 06**).



**Figura 06:** Esquemas simplificados do crescimento embrionário de *R. prolixus* e *P. americana*. **(A)** *R. prolixus*. Os dias ao longo da embriogênese estão indicados na figura. **1-2:** Invaginação do mesoderma; **3:** Gastrulação e início da organogênese; **4:** Organogênese, catatrepsia (movimento do pólo posterior para o lado ventral); **5:** Imago; **6:** Larva preste a eclodir. **(B)** *P. americana*. **1:** Embrião aproximadamente aos 8 dias de desenvolvimento, em gastrulação, catatrepsia; **2:** Embrião aproximadamente aos 18 dias de embriogênese, durante a organogênese; **3:** Nínta preste a eclodir, aos 31 dias de embriogênese. (Adaptado de HEMING e HUEBNER, 1994; DENBURG e FULOP, 1982).

### *1.3.1. Degradação do Vitelo*

Como já foi citado anteriormente, o desenvolvimento embrionário de insetos ocorre totalmente desconectado do organismo materno. Por este motivo, o ovo precisa conter todos os nutrientes necessários para a formação dos tecidos do inseto, bem como toda a maquinaria enzimática necessária para disponibilizar estes nutrientes durante a embriogênese.

Os grânulos de vitelo constituem o principal compartimento do ovo e nesta organela, em diferentes espécies, já foram identificadas proteínas de vitelo, principalmente a vitelina (Vt) e também hidrolases que atuam preferencialmente em pH ácido, como as glicosidases e fosfatases ácidas (PURCELL *et al.*, 1988; RIBOLLA *et al.*, 2001; FIALHO *et al.*, 2002).

Devido à presença de enzimas acídicas, vários autores sugerem que os grânulos de vitelo podem ser organelas semelhantes a lisossomos (FAGOTTO e MAXFIELD, 1994a; FAGOTTO, 1995). No entanto, se os grânulos de vitelo fossem como lisossomos, deveríamos esperar que a vitelina e outras proteínas endocitadas da hemolinfa seriam completamente processadas mesmo durante a vitelogênese. Contudo, o que é observado em várias espécies, incluindo o sapo *Xenopus laevis* (WALL e MELEKA, 1985), é que embora os grânulos de vitelo já contenham as hidrolases lisossomais, as proteínas de vitelo não são degradadas antes que se inicie a embriogênese, o que em algumas espécies pode levar semanas (FAGOTTO, 1995). Deste modo podemos esperar que exista algum mecanismo que regule a atividade destas enzimas nos grânulos de vitelo (FAGOTTO e MAXFIELD, 1994b).

Mesmo antes da identificação da Vt em grânulos de vitelo, proteases ácidas foram descritas em ovos de *Dociostaurus maroccanus* (LICHTHENSTEIN *et al.*, 1949), *Schistocerca gregaria* (KUK-MEIRI *et al.*, 1954) e *Locusta migratoria migratorioides* (SHULOV *et al.*, 1957). Em todas estas espécies estas enzimas se mostraram ativas em estágios iniciais da embriogênese, porém não foi evidenciada a relação das mesmas com a degradação do vitelo. Em 1980, Garesse e colaboradores demonstraram pela primeira vez a participação de proteases no processamento de proteínas de vitelo em ovos de *Artemia salina* (GARESSE *et al.*, 1980; PERONA e VALLEJO, 1982). A partir de então já foi demonstrada a presença de proteases ácidas participando da degradação do vitelo em diversos organismos (MEDINA *et al.*, 1988; LOGULLO *et al.*, 1998; FAUSTO *et al.*, 2001; ABREU *et al.*, 2004).

O que tem sido observado em ovos de vários insetos é que estas proteases encontradas nos grânulos de vitelo são estocadas nesta organela como uma pró-enzima, portanto, inativas (TAKAHASHI *et al.*, 1993; YAMAMOTO e TAKAHASHI, 1993; RIBOLLA *et al.*, 2001; YAMAHAMA *et al.*, 2003; ABREU *et al.*, 2004). Em *Drosophila*, por exemplo, foi sugerida a participação de serino proteases na ativação de uma cisteíno protease a partir da conversão de sua pró-enzima na forma ativa, o que iniciaria o processo de degradação de vitelo nesta espécie (MEDINA e VALLEJO, 1989).

A ativação de enzimas envolvidas na degradação do vitelo a partir de precursores inativos parece bastante difundida em diferentes espécies e tem se demonstrado um dos fatores responsáveis pela regulação da degradação do vitelo durante o desenvolvimento embrionário. O que não se sabe ao certo é que

mecanismo(s) estaria(m) envolvido(s) na ativação destas enzimas. Alguns pesquisadores apontam a fosforilação das proteínas de vitelo como um fator que controle a suscetibilidade destas moléculas a proteólise (TAKAHASHI *et al.*, 1993). Outra hipótese propõe que atividade protease pode ser regulada por mudanças transcricionais destas enzimas durante a embriogênese (IKEDA *et al.*, 1991), enquanto outros autores sugerem que estas enzimas poderiam ser ativadas por proteólise limitada ou por remoção de inibidores específicos (KUCERA e TURNER, 1981). Por último, existem amplas evidências que indicam que a acidificação dos grânulos de vitelo regulada durante o desenvolvimento é o fator responsável pela ativação destas proteases durante a embriogênese (FAUSTO *et al.*, 2001; YAMAHAMA *et al.*, 2003).

Em sua maioria, as proteases isoladas de grânulos de vitelo tornam-se ativas em pH na faixa de 3 à 5.8, o que já foi descrito tanto em vertebrados (FAGOTTO e MAXFIELD, 1994a e b) quanto em invertebrados (FAUSTO *et al.*, 2001), indicado assim que a acidificação dos grânulos de vitelo possa ser o mecanismo que controla a ativação destas enzimas (GIORGI *et al.*, 1999). Antes do início do processamento do vitelo, o pH dos grânulos é próximo à neutralidade, mas ele se torna ácido de forma coincidente com o início da ativação das proteases e da utilização do vitelo (FAGOTTO, 1991; NORDIN *et al.*, 1991). Esta variação de pH e sua relação com a embriogênese parece ser um fenômeno bastante difundido, tendo sido observado em artrópodes (NORDIN *et al.*, 1991), equinodermos (MALLYA *et al.*, 1992) e em anfíbios (FAGOTTO e MAXFIELD, 1994a e b)

Um aspecto bastante interessante que tem sido observado é que a variação do pH ocorre de forma heterogênea nos grânulos de vitelo, e que esta variação é

concomitante com a degradação da vitelina. Em ovos de *X. laevis*, o processamento da Vt é iniciado em uma população de grânulos pequenos, que tem o pH próximo à 5.6 e subsequentemente o pH diminui em grânulos grandes (maduros) ao mesmo tempo que ocorrem a digestão da VT e o crescimento do embrião (FAGOTTO e MAXFIELD, 1994a). Em *Carausius morosus*, foi mostrada que a acidificação dos grânulos de vitelo é um processo pontual, não ocorrendo em todos os grânulos e que existe uma perfeita correspondência entre a atividade das enzimas e a acidificação dos grânulos, enquanto que as pro-enzimas se distribuem, em sua maioria, em grânulos que não estão ácidos (FAUSTO *et al.*, 2001).

Então, se a acidificação é o evento chave na proteólise das proteínas de vitelo, o problema se torna entender o que provoca as diferentes taxas de acidificação em diferentes grânulos de vitelo.

## I4. Bombas de Próton e Próton-pirofosfatases

### 4.1. Pirofosfato como um doador de energia para as atividades celulares

Embora as ligações fosfoanidro da molécula de ATP sejam a principal fonte de energia para os seres vivos, existem outras moléculas cuja hidrólise pode fornecer energia para as atividades celulares. Neste contexto, recorrentes descobertas de enzimas que podem hidrolisar compostos fosfatados - como o pirofosfato, creatina fosfato e polifosfato - e o fato de que reservas de polifosfato já foram descritas em diversos organismos de diferentes *taxa*, têm sido um indicativo de que estas moléculas podem funcionar como uma importante alternativa energética (KORNBERG, 1999).

A hidrólise do ATP é utilizada em diversos processos celulares, tais como o transporte acoplado de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , a acidificação do lisossomo e a síntese de ácidos nucléicos que garantem, dentre outras coisas, a manutenção da osmolaridade, nutrição e replicação celular, respectivamente. Em contrapartida, o PPI é um substrato simples e de baixo custo para a célula, já que é formado como sub-produto de várias reações biossintéticas, que incluem a própria síntese dos ácidos nucléicos bem como a de proteínas, carboidratos e oxidação de lipídios (TAIZ, 1992). Sendo assim, a habilidade de utilizar PPI como fonte alternativa de energia pode garantir a manutenção de funções vitais quando a disponibilidade do ATP diminui e/ou quando sua demanda é alta.

Uma enzima específica que hidrolisa o PPI a fosfato inorgânico (Pi) foi descoberta em tecidos animais em 1928 (KAY, 1928) e foi denominada pirofosfatase

(PPase) inorgânica. Atualmente, PPases podem ser divididas em três classes: PPases solúveis, PPases associadas a membranas e próton-PPases ( $H^+$ -PPases).

As PPases solúveis estão amplamente distribuídas em todos os organismos, formando uma grande família de enzimas que desempenham papel fundamental na manutenção de reações biossintéticas por degradar o PPi liberado como subproduto destas reações como por exemplo na biossíntese de DNA. As PPases associadas a membranas foram descobertas recentemente na membrana tilacóide (JIANG *et al.*, 2001) e mitocôndria (ZANCANI *et al.*, 1995) de plantas. Estas enzimas são capazes de hidrolisar PPi, porém não realizam o transporte de prótons acoplado a esta hidrólise.  $H^+$ -PPases pertencem a uma categoria de bombas de próton distinta das  $H^+$ -ATPases por utilizar a hidrólise do PPi e não a do ATP para bombear prótons através de membranas biológicas (MAESHIMA e YOSHIDA, 1989; MAESHIMA, 1991; LUO *et al.*, 1999; JIANG *et al.*, 2001) (**Figura 07**).



#### *I.4.2. Propriedades das H<sup>+</sup>-PPases*

Como foi dito anteriormente, H<sup>+</sup>-PPases (EC 3.6.1.1) são enzimas que acoplam o transporte de prótons à hidrólise de PPi (REA e POOLE, 1993). H<sup>+</sup>-PPases descritas até então possuem peso molecular aparente variando entre 56 e 79 kDa (NYREN *et al.*, 1991; MCINTOSH e VAIDYA, 2002) e são aparentemente formadas por um único polipeptídeo (DROZDOWICZ *et al.*, 1999; DROZDOWICZ *et al.*, 2000; HILL *et al.*, 2000; NAKANISHI *et al.*, 2001), apesar de já ter sido sugerida a formação de dímeros *in vivo* (MAESHIMA, 1990b).

A atividade específica das H<sup>+</sup>-PPases pode variar de acordo não apenas com a espécie, mas também com o tecido, condições fisiológicas e condições de ensaio *in vitro*. Em hipocótilo de *Vigna radiata* L. (feijão-de-corda), por exemplo, a atividade da enzima está em torno de 1,1 μmol PPi/min/mg de proteína (MAESHIMA e YOSHIDA, 1989) enquanto que em cotilédone de abóbora este valor varia entre 0,22 a 0,71 μmol PPi/min/mg de proteína (MAESHIMA *et al.*, 1994b). O pH ideal para o melhor funcionamento da enzima varia dentro da faixa da neutralidade. H<sup>+</sup>-PPase purificada de *V. radiata*, por exemplo, alcança sua maior atividade em valores de pH que variam entre 6,5 e 7,5 (MAESHIMA e YOSHIDA, 1989).

Na maioria das espécies o substrato requerido para a atividade enzimática é o complexo Mg-PPi-Mg (2Mg<sup>2+</sup>:1PPi) (REA e POOLE, 1993; ZHEN *et al.*, 1997a). Em altas concentrações, no entanto, este complexo pode atuar como um inibidor não competitivo da enzima (LEIGH *et al.*, 1992). Apesar de fortes evidências que apontam para o complexo Mg<sub>2</sub>PPi como o real substrato da enzima (LEIGH *et al.*, 1992), foi

demonstrado que para a H<sup>+</sup>-PPase purificada de *V. radiata* esta relação é de 1:1 (MAESHIMA e YOSHIDA, 1989). O principal problema associado à dificuldade na definição de qual seria o real substrato das H<sup>+</sup>-PPases é a quantidade complexos metálicos que o PPI é capaz de formar em solução aquosa. Em um meio de reação contendo PPI, Mg<sup>2+</sup> e K<sup>+</sup>, por exemplo, os complexos e íons presentes incluiriam: Mg<sup>2+</sup> livre, PPI livre, K<sup>+</sup> livre, MgPPI, Mg<sub>2</sub>PPI e KPPI (LEIGH *et al.*, 1992). Além do Mg<sup>2+</sup> presente na formação do substrato, magnésio livre também é necessário para a estabilização e ativação da enzima, sendo, portanto, este cátion um co-fator fisiológico essencial (MAESHIMA, 1991). De fato, a prevenção de inativação química e proteólise das H<sup>+</sup>-PPases em função da presença do cátion Mg<sup>2+</sup> já foi demonstrada em diferentes organismos (MAESHIMA 1991; REA e POOLE, 1993; GORDON-WEEKS *et al.* 1996). Aparentemente, além do sítio para ligação do complexo Mg<sub>2</sub>-PPI, existem mais dois sítios para associação do Mg<sup>2+</sup> na enzima: um de baixa e outro de alta afinidade (BAYKOV *et al.*, 1993a; MAESHIMA, 2000).

Além do Mg<sup>2+</sup>, a maioria das H<sup>+</sup>-PPases de plantas bem como todas as H<sup>+</sup>-PPases presentes em protozoários descritas até o momento requerem potássio (K<sup>+</sup>) para alcançar sua máxima atividade (KARLSSON, 1975; REA *et al.*, 1992b; ZHEN *et al.*, 1997a, 1997b; JIANG *et al.*, 2001). Tal dependência tem levado a especulação de que a enzima seja também responsável pelo transporte de K<sup>+</sup> para o interior dos compartimentos (OBERMEYER *et al.*, 1996; STITT, 1998; RASHID *et al.*, 2000). Tal capacidade em H<sup>+</sup>-PPases de plantas poderia estar diretamente relacionada à abertura dos estômatos, bem como a regulação do turgor da célula vegetal como um todo (REA e POOLE, 1993;). No entanto, tal propriedade permanece incerta, visto que nem H<sup>+</sup>-

PPase (SATO *et al.*, 1994) purificada ou presente em membranas nativas (ROS, 1995) foram capazes de transportar  $K^+$ .

Alguns outros cátions monovalentes já foram mostrados como eficientes substitutos do  $K^+$ , como Rubídio e Manganês (MAESHIMA e YOSHIDA, 1989), enquanto outros não foram capazes de fazê-lo, Sódio e Lítio, por exemplo (OBERMEYER *et al.*, 1996; ZHEN *et al.*, 1997b).

Diferente das V-ATPases, cuja atividade não é influenciada pela presença de  $Ca^{2+}$  mesmo em concentrações próximas a 1 mM (MAESHIMA, 1991; REA *et al.*, 1992a),  $H^+$ -PPases presentes em diferentes organismos são inibidas por este cátion (MAESHIMA, 1991; REA *et al.*, 1992a), devido à formação do complexo Ca-PPi, que captura o PPi do meio, prevenindo a formação do substrato Mg-PPi (MAESHIMA, 1991). Além disso,  $Ca^{2+}$  livre pode também afetar a atividade da enzima (MAESHIMA, 1991; REA *et al.*, 1992a). No entanto, já foi descrito para alguns organismos, que a inibição causada por  $Ca^{2+}$  livre é dependente da concentração de  $Mg^{2+}$  citosólico, que acima de 1 mM é capaz de evitar o efeito inibitório do  $Ca^{2+}$  (MAESHIMA, 1991).

Além do  $Ca^{2+}$ , outros compostos podem atuar como inibidores das  $H^+$ -PPases. Como ocorre com a inibição por  $Ca^{2+}$ ,  $H^+$ -PPases de diferentes organismos possuem sensibilidade extremamente variável para cada inibidor testado. A pirofosfatase mitocondrial, por exemplo, sofre uma inibição de 95% a concentrações de fluoreto de potássio (KF) próximas a 0,5 mM (BAYKOV *et al.*, 1992), enquanto a enzima presente em vesículas de *V. radiata* ainda retém 15% de sua atividade em 10 mM de

KF (BAYKOV *et al.*, 1993b). Apesar do fluoreto ainda ser bastante utilizado como inibidor de  $H^+$ -PPases em diversos sistemas, ao longo da última década têm sido descritos vários análogos de PPI, denominados bifosfonatos, que agem de forma bem mais específica que o fluoreto (ZHEN *et al.*, 1994). Os bifosfonatos possuem o oxigênio central do pirofosfato substituído por um átomo de carbono, o que previne a quebra da ligação fosfoéster (MCINTOSH e VAIDYA, 2002). Dentre estes inibidores podemos citar o pamidronato, o residr

duas famílias não apresentam nenhuma similaridade uns com os outros (SHINODA *et al.*, 1998). Por sua vez, H<sup>+</sup>-PPases descritas até o momento também não apresentam semelhança significativa com membros de nenhuma.

como *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii* (SCOTT *et al.*, 1998; LUO *et al.*, 1999; RODRIGUES *et al.*, 2000).

Até recentemente (1998), quando foi clonada e sequenciada a H<sup>+</sup>-PPase da bactéria *R. rubrum* (BALTSCHIEFFSKY *et al.*, 1998) todas as seqüências publicadas para a enzima eram de plantas superiores e elas apresentavam 85% ou mais de similaridade e possuíam características específicas citadas anteriormente, como dependência total de magnésio e forte estímulo por potássio. No início de 2000 a descrição de uma outra seqüência divergente da anteriormente descrita e que só compartilhava com esta 36% de similaridade abriu novas perspectivas para a compreensão da evolução desta enzima. As duas seqüências estão presentes em *Arabidopsis thaliana* e são denominadas AVP1 (para a enzima já conhecida em plantas) e AVP2 (para a nova seqüência descoberta). A AVP2, diferente da AVP1, é insensível a potássio e altamente inibida por cálcio (DROZDOWICZ *et al.*, 2000).

A descoberta da existência de H<sup>+</sup>-PPases em arqueobactérias, um grupo tão divergente filogeneticamente de eubactéria como eubactéria é de eucariotos, sugere que as H<sup>+</sup>-PPases podem ter uma origem mais antiga do que se suspeitava. Na verdade, presume-se que estas enzimas tenham surgido antes da divergência dos três domínios: Archaea, Bactéria e Eukarya (DROZDOWICZ *et al.*, 2001). Apesar de sua distribuição em organismos presentes nos três reinos, até recentemente esta enzima era tida como inexistente em células animais (MCINTOSH e VAIDYA, 2002).

Mesmo estando as H<sup>+</sup>-PPases entre as bombas de próton mais bem caracterizadas bioquimicamente em plantas (MAESHIMA, 1991), a sua aparente

ausência em outros organismos limitou as descobertas e conhecimentos sobre sua biologia básica e fisiologia. É importante ressaltar que esta enzima coexiste com  $H^+$ -ATPase em plantas e organelas de parasitas como tonoplasto, acidocalcissomo e cloroplasto (REA e SANDERS, 1987; REA e POOLE; 1993; MCINTOSH *et al.*, 2001; RUIZ *et al.*, 2001a).

#### *1.4.4. $H^+$ -PPases em organelas vegetais*

O vacúolo é um dos mais notáveis compartimentos em uma célula vegetal. Esta organela realiza numerosas funções vitais para a homeostase celular, incluindo o acúmulo de aminoácidos, íons inorgânicos e intermediários metabólicos (BOLLER e WIEMKEN, 1986; TAIZ, 1992). Esta vesícula também contém diversas hidrolases ácidas, como proteases, RNases e glicosidases (NISHIMURA e BEEVERS, 1978). Próton-pirofosfatases já foram demonstradas em membranas vacuolares de monocotiledôneas, dicotiledôneas, plantas com metabolismo C3, C4 e MAC (MAESHIMA *et al.*, 1994b; REA, 1993) e, devido à sua localização específica, são consideradas marcadoras de membranas vacuolares em plantas (CHANSON, 1990).

O aspecto mais importante dos vacúolos de plantas é o seu papel no armazenamento de proteínas. Eles funcionam como sítios de depósito de polipeptídios em tecidos de reserva de plantas, tais como o cotilédone e o endosperma. Quando a semente germina, as proteínas armazenadas nos vacúolos de armazenamento protéico (PSV) são degradadas por hidrolases ácidas e utilizadas para o crescimento do embrião. Já é conhecido que a acidificação de vacúolos de sementes em

desenvolvimento é necessária para a hidrólise de proteínas armazenadas (MAESHIMA *et al.*, 1994a).

Em células vegetais, tem sido descrito que vacúolos de armazenamento de proteínas (PSV) e vacúolos líticos (LV) constituem organelas diferentes (DI SANSEBASTIANO *et al.*, 1998, 2001). Na maioria das sementes, PSVs contém três regiões distintas: a matriz e o cristalóide - que são conhecidos por conterem proteínas armazenadas - e o globóide, que contém cristais de ácido fítico, molécula rica em compostos fosforilados (LOTT e SPITZER, 1980; ). Recentemente, Jiang e cols demonstraram que PSVs de embriões de *Lycopersicon esculentum* possuem em seu interior um compartimento envolvido por membrana que contém cristais de ácido fítico, além de proteínas que são características de LV e H<sup>+</sup>-PPases (JIANG *et al.*, 2001). Estas características sugerem que os globóides podem ser compartimentos internos “LV-like”. A membrana globóide deve então separar o compartimento de armazenamento – na matriz do PSV - das potenciais funções de lise do interior do globóide (JIANG *et al.*, 2001). Estes compartimentos intravacuolares devem existir pelas mesmas razões que organelas envoltas por membranas existem nas vias secretórias: delimitar um meio ambiente especializado que é requerido para certa função sem interferir em um processo que esteja ocorrendo em outra organela. No caso específico das cavidades globóides no interior dos vacúolos proteináceos nas células de *L. esculentum*, a presença das H<sup>+</sup>-PPases na membrana desta estrutura mantém um ambiente interno ácido, ideal para formação dos cristais de ácidos fítico.

Estes estudos indicam que Próton-pirofosfatases podem estar presentes em compartimentos membranares específicos em vegetais, associados provavelmente a

estas enzimas que podem ser requeridas para funções vacuolares especiais (JIANG *et al.*, 2001). Esta sugestão também explicaria porque em parasitas kinetoplastidas como tripanossomas e *Leishmania*, H<sup>+</sup>-ATPase está presente em vacúolos lisossomais, enquanto H<sup>+</sup>-PPase está presente na membrana de acidocalcissomos (SCOTT *et al.*, 1998).

Um aspecto interessante demonstrado para esta enzima em hipocótilo de *V. radiata* e também na pêra (a fruta) é que seus níveis de transcrito e proteína são muito maiores nas regiões onde está havendo o desenvolvimento do embrião. Nestes tecidos, a atividade pirofosfatásica é muitas vezes maior do que a atividade ATPásica (MAESHIMA, 1990a; SHIRATAKE *et al.*, 1997). Este fenômeno é facilmente justificado se considerarmos que em tecidos em desenvolvimento macromoléculas são ativamente sintetizadas para a construção dos tecidos vegetais e, como resultado desta síntese, uma grande quantidade de PPI é produzida. Na maioria dos tecidos vegetais jovens a H<sup>+</sup>-PPase é a principal bomba encontrada. No entanto, durante o crescimento do tecido, enquanto os níveis de H<sup>+</sup>-PPase diminuem, os níveis de H<sup>+</sup>-ATPase continuam sempre constante e, como resultado, estas enzimas passam a ser a principal bomba de prótons nos tecidos maduros (MAESHIMA, 2000).

O crescimento do vegetal é apenas um dos fatores que são capazes de regular a expressão e atividade das H<sup>+</sup>-PPases em células vegetais. Somados a este estão as situações de estresse vegetal onde já foram demonstrados aumentos significativos na atividade H<sup>+</sup>-PPásica em vegetais crescidos em meios deficientes em minerais, ou mesmo submetidos a anoxia ou resfriamento (CARYSTINOS *et al.*, 1995; DARLEY *et al.*, 1995; KASAI *et al.*, 1998).

#### *I.4.5. H<sup>+</sup>-PPases em protozoários*

A hidrólise de PPI em tripanossomatídeos foi demonstrada pela primeira vez em 1997 por Michels e cols (MICHELIS *et al.*, 1997). No entanto, no referido trabalho, não foi esclarecido se esta hidrólise, presente nas frações lisossomais e da bolsa flagelar, era causada por PPases apenas associadas às membranas ou por H<sup>+</sup>-PPases. O primeiro trabalho a evidenciar o transporte de prótons proveniente da hidrólise de PPI foi realizado por SCOTT *et al.*, 1998. Neste trabalho os autores mostraram a presença de uma H<sup>+</sup>-PPase em membrana plasmática e acidocalcissomos de *T. cruzi*. Nestas células a enzima apresentou propriedades semelhantes às aquelas encontradas na enzima vegetal, como estímulo por K<sup>+</sup> e inibição por fluoreto e análogos de PPI (AMDP e IDP). Além disso, a enzima foi reconhecida pelo anticorpo produzido contra H<sup>+</sup>-PPases da planta *A. thaliana*.

A partir de então Próton-pirofosfatases já foram descritas em diferentes protozoários, incluindo os dos gêneros *Trypanosoma* (SCOTT *et al.*, 1998), *Leishmania* (RODRIGUES *et al.*, 1999b), *Plasmodium* (LUO *et al.*, 1999) e *Toxoplasma* (RODRIGUES *et al.*, 2000). Próton-pirofosfatases nestes organismos unicelulares já foram encontradas em membrana plasmática, vacúolo digestivo, flagelo, bolsa flagelar, complexo de Golgi, vacúolo contrátil e acidocalcissomos (organela ácida envolvida com o armazenamento de cálcio e outros microelementos).

#### I.4.5.1 Acidocalcissomos

Acidocalcissomos são organelas densas e ácidas com uma grande concentração de fósforo presente na forma de pirofosfato e polifosfato complexados com cálcio e outros elementos (DOCAMPO e MORENO, 1999). Aparentemente, estas organelas estão relacionadas a organelas descritas em 1904 como grânulos de volutina. Tripanossomatídeos foram os primeiros organismos no qual acidocalcissomos foram identificados (VERCESI *et al.*, 1994; DOCAMPO *et al.*, 1995). Após sua identificação nestas células, esta organela já foi descrita em diferentes microorganismos como *T. gondii* (MORENO e ZHONG, 1996), *Plasmodium spp* (LUO *et al.*, 1999; MARCHESINI *et al.*, 2000), na alga *Chlamydomonas reinhardtii* (RUIZ *et al.*, 2001a), na ameba *Dictyostelium discoideum* (MARCHESINI *et al.*, 2002), em bactérias (SEUFFERHELD *et al.*, 2003; SEUFFERHELD *et al.*, 2004) e em plaquetas humanas (RUIZ *et al.*, 2004a). Nestes tipos celulares acidocalcissomos podem ser identificados por marcadores de compartimentos ácidos, como a laranja de acridina (VERCESI *et al.*, 1994; DOCAMPO *et al.*, 1995). A morfologia deste vacúolo varia de acordo com a espécie e o meio de cultura, tendo sido encontrados acidocalcissomos com diâmetros de entre 0,05 até 0,6  $\mu\text{m}$  (SCOTT e DOCAMPO, 2000; RUIZ *et al.*, 2004a; RUIZ *et al.*, 2004b). A distribuição destas organelas também pode variar, apesar de haver uma localização preferencial na porção central da célula (SZAJNMAN *et al.*, 2003).

Diferentes enzimas já foram identificadas na membrana de acidocalcissomos de diferentes espécies. Dentre elas, uma aquaporina (ROHLOFF *et al.*, 2004), um sistema de contra-transporte  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -ATPase para a captação de  $\text{Ca}^{2+}$ , sensível a vanadato

(VERCESI *et al.*, 1994; DOCAMPO *et al.*, 1995) e trocadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ , sendo este último importante na liberação de cálcio por estas organelas (VERCESI e DOCAMPO, 1996; VERCESI *et al.*, 1997; RODRIGUES *et al.*, 1999; VERCESI *et al.*, 2000). Além destes trocadores, duas bombas envolvidas com o transporte de prótons foram caracterizadas: uma  $\text{H}^+$ -ATPase vacuolar, sensível a bafilomicina A1 (VERCESI *et al.*, 1994; DOCAMPO *et al.*, 1995) e uma  $\text{H}^+$ -PPase (SCOTT *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 1999). Próton-pirofosfatases identificadas em acidocalcissomos são capazes de promover a acidificação destes compartimentos e têm sua atividade estimulada por íons  $\text{K}^+$  e inibida por  $\text{Na}^+$  e análogos de PPI. Estruturas fracionadas de epimastigotas ricas em cálcio, com a atividade  $\text{H}^+$ -PPásica e que não foram reconhecidas por marcadores para mitocôndria, lisossomos, glicossomos, citoplasma e membrana plasmática, foram isoladas e tiveram reação positiva para a marcação com anticorpos produzidos contra a  $\text{H}^+$ -PPase de plantas (SCOTT *et al.*, 1998). Apesar de não serem exclusivas a acidocalcissomos, o fato das  $\text{H}^+$ -PPases estarem concentradas nestes vacúolos as têm feito moléculas marcadoras desta organela (RODRIGUES *et al.*, 1999; RUIZ *et al.*, 2001a; LEMERCIER *et al.*, 2002).

Estudos realizando principalmente microanálise de raio-X e ressonância magnética nuclear demonstraram acúmulo de alguns elementos químicos no interior dos acidocalcissomos. Apesar da frequência e quantidade destes elementos variar em função da espécie e meio de cultura, são comumente encontradas grandes concentrações de oxigênio, fósforo, cálcio, sódio, zinco, potássio e, em menor quantidade, ferro (DVORAK *et al.*, 1988; LEFURGEY *et al.*, 1990; SCOTT *et al.*, 1997; MIRANDA *et al.*, 2000; RUIZ *et al.*, 2001a; MARCHESINI *et al.*, 2002; RUIZ

*et al.*, 2004b). No entanto, enxofre é encontrado em concentrações extremamente baixas, indicando que estas organelas não estão envolvidas com o armazenamento de proteínas (ROHLOFF *et al.*, 2003).

Em acidocalcissomos grande parte do fósforo se encontra sob a forma de PPI e polifosfato (PoliP). PoliP é uma cadeia linear formada pela ligação desde alguns até centenas de resíduos de fosfato unidos por ligações fosfoanidro e podem ser encontrados tanto em bactérias quanto em células de mamíferos. Tripanossomatídeos e *T. gondii* possuem principalmente PoliP com poucos resíduos de fosfato (PoliP<sub>3</sub>, PoliP<sub>4</sub>, PoliP<sub>5</sub>), que em conjunto são chamados PoliP de Cadeia Curta. Apesar disso, PoliP de Cadeia Longa também são detectados. Nos diferentes tipos celulares, PoliP pode desempenhar diversas funções, incluindo o armazenamento de fósforo, participação em reações anabólicas como doador de energia, seqüestro e armazenamento de cátions (como Ca<sup>2+</sup>, por exemplo), controle transcricional, dentre outros (CASTRO *et al.*, 1995; KORNBERG, 1999; KULAEV e KULAKOVSKAYA, 2000). A síntese e hidrólise de PoliP em diferentes organismos têm sido atribuída, respectivamente, às enzimas polifosfatocinase e endo e exopolifosfatase (CASTRO *et al.*, 1995; AULT-RICHE *et al.*, 1998; KORNBERG, 1999; KULAEV e KULAKOVSKAYA, 2000).

Em adição à função de armazenamento, acidocalcissomos participam do controle do pH intracelular, em parte devido a liberação de H<sup>+</sup> proveniente da hidrólise de PoliP e também devido ao transporte de H<sup>+</sup> realizado pelas H<sup>+</sup>-ATPases e H<sup>+</sup>-PPases (CASTRO *et al.*, 1999; LEMERCIER *et al.*, 2002). Outro papel desempenhado pelos acidocalcissomos é o controle da osmolaridade. De fato, epimatigotas de *T. cruzi*

quando submetidos a um estresse hiposmótico têm redução do conteúdo de polifosfato, enquanto que sob condições hiperosmóticas o fenômeno inverso pode ser observado (RUIZ *et al.*, 2001b) e este metabolismo garantiria a sobrevivência do parasita frente aos desafios lançados pelos hospedeiros invertebrados e vertebrados. Estes resultados podem ser explicados levando-se em consideração que quando o PoliP é degradado o Pi não é liberado para o citosol, o que resulta no turgor da organela (ROHLOFF *et al.*, 2004).

As descobertas de próton-pirofosfatases nestes protistas parasitas têm sido bastante exploradas, visto que a ausência dessa enzima em hospedeiros vertebrados faz com que a mesma possa ser utilizada como um alvo específico para construção de drogas eficazes no tratamento de doenças causadas por estes patógenos (RODRIGUES *et al.*, 2000; RODRIGUEZ *et al.*, 2002; SZAJNMAN *et al.*, 2003).

#### 1.4.6. $H^+$ -PPases em insetos

Até recentemente, quando nosso grupo demonstrou a presença de  $H^+$ -PPases em vesículas de ovos e ovócitos de *R. prolixus* (MOTTA *et al.*, 2004), não existia evidência para a existência destas enzimas em células humanas ou qualquer outra espécie do reino animal (MCINTOSH e VAIDYA, 2002).

Os processos celulares do desenvolvimento embrionário de insetos é algo que varia entre as diferentes ordens e até mesmo entre espécies do mesmo gênero. Infelizmente, como já foi dito anteriormente, o desenvolvimento embrionário de *R. prolixus* e *P. americana* não é muito conhecido. Em contrapartida, muito se sabe sobre

a embriogênese de *D. melanogaster*. Neste inseto, nas primeiras horas do desenvolvimento embrionário ocorrem sucessivas divisões nucleares no centro do vitelo, caracterizando a fase sincicial da embriogênese desta espécie. Mais tarde, estes núcleos sem delimitação migram para a periferia e membranas se formam entre eles, originando células separadas (celularização da blastoderme) (GILBERT, 2000).

Em tecidos com altas taxas proliferativas, conforme observado no desenvolvimento embrionário de insetos, ocorre a síntese de várias moléculas como ácidos nucleicos, glicogênio, lipídeos e etc (GILBERT, 2000). Durante a fase sincicial, as sucessivas divisões nucleares e a conseqüente síntese de DNA, RNA e proteínas libera diretamente no citoplasma da célula o PPi sub-produto destas reações anabólicas. Acreditamos que nesta fase esta molécula torna-se abundante e devido ao seu contato direto com os grânulos de vitelo as H<sup>+</sup>-PPases poderiam utilizar o PPi como substrato para promover o bombeamento de prótons para o interior dos grânulos, e assim possibilitar a ativação das enzimas responsáveis pela degradação do vitelo ainda na fase inicial da embriogênese. De fato, em *R. prolixus*, a adição de PPi em frações contendo grânulos de vitelo extraídos de ovos após um dia de ovopostura promoveram a acidificação desta organela que inicialmente encontravam-se com pH próximo à neutralidade (MOTTA *et al.*, 2004).

A participação das H<sup>+</sup>-PPases na ativação das enzimas dos grânulos de vitelo pode representar uma nova forma de acidificação de compartimentos em células animais. Este seria um modelo interessante para a compreensão do metabolismo energético na embriogênese de insetos, onde a hidrólise do PPi, gerado pelas reações biossintéticas, pode ser utilizada pelas H<sup>+</sup>-PPases como fonte de energia para o

transporte de prótons para o interior dos grânulos e conseqüente promoção da mobilização do vitelo.

## II- OBJETIVO GERAL

Esta tese teve como objetivo geral caracterizar bioquimicamente próton-pirofosfatases presentes em ovócitos e ovos de *Rhodnius prolixus* e *Periplaneta americana*, além de avaliar a participação desta enzima na acidificação de vesículas presentes no interior destas células. Esta caracterização pode contribuir para a compreensão de aspectos relacionados à formação dos ovos e desenvolvimento embrionário nestes organismos. Um melhor conhecimento destes fenômenos pode favorecer o avanço de pesquisas básicas que envolvam a reprodução deste tão bem sucedido grupo, bem como pesquisas aplicadas relacionadas ao controle populacional de insetos que atuem como pragas na agricultura ou como vetores de doenças, como é o caso de *R. prolixus* e *P. americana*.

### III- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar a  $H^+$ -PPase presente em ovos e ovócitos de *R. prolixus*, bem como em ovócitos corionados de *P. americana* de acordo com parâmetros cinéticos;
2. Testar os principais inibidores de  $H^+$ -PPase, tanto nos ovos como nos ovócitos de *P. americana* e *R. prolixus*;
3. Localizar a enzima nos ovócitos destes insetos, utilizando anticorpos anti- $H^+$ -PPases provenientes de  $H^+$ -PPase vegetal através de diferentes técnicas de microscopia;
4. Correlacionar a atividade da enzima com a acidificação dos grânulos de vitelo, utilizando para tal marcadores específicos de compartimentos ácidos;
5. Analisar o conteúdo de microelementos presentes nos grânulos de vitelo de *R. prolixus* e *P. americana* através de microanálise de raio-X;
6. Dosar o conteúdo de polifosfato presente em ovócito e ovos de *P. americana*, bem como em ovos de *R. prolixus*;
7. Verificar a variação de cálcio em função da acidificação promovida pela hidrólise de PPI.

## IV- MATERIAIS E MÉTODOS

### IV.1. Insetos

#### IV.1.1. *Rhodnius prolixus*

Foram utilizadas fêmeas de uma colônia mantida no Laboratório de Bioquímica de Insetos, chefiado pelo Dr. Hatisaburo Masuda, a 28° C e 70% umidade relativa. Para obtenção dos ovários, fêmeas acasaladas eram alimentadas com sangue de coelho em um aparato artificial e três dias depois seus ovários eram cuidadosamente dissecados com auxílio de um microscópio estereoscópico. A coleta dos ovos era realizada até 24 horas após a limpeza das gaiolas onde os insetos adultos permaneciam, garantindo assim que todos os ovos coletados tinham de zero a 24 horas de postura.

#### IV.1.2. *Periplaneta americana*

As baratas foram cultivadas em aquários de vidro no Laboratório de Entomologia Médica a uma temperatura ambiente e 60% umidade relativa, com uma dieta à base de ração canina e água. Os ovários foram obtidos após dissecação de fêmeas, também com auxílio de um microscópio estereoscópico. Além dos ovários totais, neste trabalho também foram usados ovócitos em estágio final de vitelogênese,

que foram adquiridos após cuidadosa remoção destas células da porção final do ovariolo, com auxílio de pinças de dissecação. As ootecas utilizadas nos experimentos foram coletadas a partir de placas de isopor colocadas dentro dos aquários. Da mesma forma que em *R. prolixus*, a coleta das ootecas era realizada até 24 horas após a limpeza dos aquários. Estas ootecas, por convenção foram nomeadas ootecas de dia zero.

#### **IV.2. Obtenção das Frações de Membrana em Ovários e Ovos de *R. prolixus* e *P. americana***

A fração enriquecida em membranas foi obtida dos ovários e/ou ovos das fêmeas de *R. prolixus* e/ou *P. americana*, utilizando centrifugação diferencial. Para *R. prolixus* eram usados em média 0,3 g de ovos ou cerca de 30 ovários, enquanto que para *P. americana* ovócitos corionados foram retirados de aproximadamente 50 ovários. Nestas proporções, era obtido material suficiente para a realização de até cinco experiências. Esses materiais foram colocados em um tampão contendo glicerol 10%; albumina bovina 0,26%; DTT 3,3 mM; PMSF 1 mM; KCl 150 mM; EDTA 5 mM e Tris-HCl 0,1M pH 8.0 e rompidos em um homogeneizador de tecidos (IKA-Euoturrax T25 Basic – Probe S25N-186). O homogenato obtido foi centrifugado a 10.000 g por 20 minutos a 4° C. O sobrenadante formado foi centrifugado a 100.000 g durante 40 minutos a 4° C. O precipitado obtido foi ressuspenso em 40 mL de tampão gelado contendo glicerol 10%; DTT 1 mM; EDTA 1 mM e Tris-HCl 10 mM pH 7,5; e

centrifugado novamente a 100.000 g durante 40 minutos a 4° C. O precipitado foi ressuspenso num pequeno volume do último tampão (FAÇANHA e DE MEIS, 1995).

### IV.3. Preparação da Suspensão de Grânulos

#### IV.3.1- *Rhodnius prolixus*

Para obter frações contendo grânulos de vitelo, 3 mg de ovos recolhidos após um dia de postura foram rompidos delicadamente em 1 mL de salina Ringer para *Rhodnius* modificada (NaCl 130 mM, KCl 8,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 8,6 mM, NaHCO<sub>3</sub> 10,2 mM, glicose 34 mM e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4 mM pH 7,2. Este conteúdo foi centrifugado a 500g por 5 minutos a 4° C, ressuspenso na mesma salina e centrifugado nas mesmas condições. Ao final foi obtido um precipitado enriquecido de grânulos de vitelo. A este precipitado foi adicionado o coquetel inibidor de proteases (Sigma, P 2714) e esta solução foi utilizada para análise.

#### IV.3.2- *Periplaneta americana*

Para frações de grânulos de vitelo de barata, uma ooteca foi comprimida em 1 mL de salina de barata modificada (KCl 3.1 mM, NaCl 0.214 M, sacarose 5 mM e HEPES 5.0 mM pH 7.2), e o microtubo contendo este homogenato foi manualmente e delicadamente agitado. Após 30 segundos de repouso, ao sobrenadante removido foi

adicionado o coquetel inibidor de proteases (Sigma, P 2714) e esta solução foi utilizada como suspensão de grânulos.

#### **IV.4. Dosagem de Proteínas**

A concentração de proteínas obtidas nas preparações de membrana foi determinada pelo método de Lowry e cols. (LOWRY *et al.*, 1951).

#### **IV.5. Hidrólise de Pirofosfato e ATP**

A atividade próton-pirofosfatásica e próton-ATPásica foi determinada por medida da liberação de Pi colorimetricamente (FISKE e SUBBAROW, 1925) num meio de reação contendo  $MgCl_2$  2,5 mM; KCl 100 mM; PPi 0,3 mM ou ATP 1 mM e MOPS-Tris 50 mM pH 7,5. A reação foi iniciada pela adição da amostra obtida na fração de membrana (40  $\mu g/mL$ ). Alíquotas do meio de reação foram paralisadas pela adição de 10% (concentração final) de ácido tricloroacético gelado e utilizadas para determinar a quantidade total de Pi liberado (FAÇANHA e DE MEIS, 1995).

A hidrólise destes compostos fosforilados foi realizada na presença de diferentes meios de reação, que diferiram quanto ao tipo de componente cujo efeito se desejava analisar. O branco das reações foi feito colocando-se ácido tricloroacético no meio de reação antes da adição de proteína.

#### IV.6. Gel de Eletroforese e “Western Blot”

As frações de membrana de ovos de barbeiro e raiz de milho foram separadas por eletroforese em um gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% (LAEMMLI, 1970; O'FARREL, 1975), fazendo-se duas aplicações de amostras simultaneamente. Os géis obtidos foram eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose e uma delas foi corada com vermelho de Ponceau. A outra membrana foi preparada para a imunomarcção com anticorpo preparado a partir de um polipeptídio sintético produzido a partir de uma sequência de H<sup>+</sup>-PPase de *Arabidopsis thaliana* que é conservada em outros organismos, gentilmente cedido pelo Dr. Roberto Docampo (University of Georgia) e Dr. Masaoshi Maeshima (Nagoya University). Após a transferência para membrana, estas foram incubadas em TBS-TWEEN Leite 5% por 12 horas. As membranas retiradas do bloqueio foram incubadas com o anticorpo primário (1:500) por 18 horas. Após este período, as membranas foram lavadas, e incubadas por 2 horas com anticorpo secundário conjugado à fosfatase alcalina (1:1000). A revelação das membranas foi realizada utilizando-se Kit para fosfatase alcalina (“Amplified Alkaline Phosphatase Immun-Blot Kit” Bio Rad N° 170-6432). Os controles foram obtidos a partir da incubação das membranas apenas com anticorpo secundário.

#### **IV.7. Localização da Enzima no Tecido por Microscopia Óptica**

Devido a impossibilidade de realizar os procedimentos padrões de preparação de material para microscopia com ovos, para a imunolocalização da enzima foram utilizados ovócitos vitelogênicos de *R. prolixus* no fim desta fase do desenvolvimento. Os ovócitos foram fixados por 18 horas em paraformaldeído 4% a 4° C e então imersos em PBS contendo sacarose 20% e embebidos em OCT. Posteriormente, os ovócitos foram seccionados e aderidos a lâminas cobertas com poli-L-lisina. Os cortes foram então incubados por 30 minutos em peróxido de hidrogênio 3% a fim de eliminar a atividade peroxidásica endógena. Após serem lavados, os cortes foram incubados em tampão de bloqueio (BSA 2%, leite em pó desnatado 0,2%, soro normal de cabra 2% e Triton X-100 0,8%, todos diluídos em PBS) por 1 hora à temperatura ambiente. Após este período os cortes foram incubados com o anticorpo primário (anti H<sup>+</sup>-PPase de *A. thaliana*) por 18 horas a 4° C. O anticorpo secundário (acoplado a peroxidase) foi adicionado após a lavagem dos cortes e a revelação foi feita com um kit HRP-ABC (Vectastain, Vector Labs). O controle foi realizado na ausência do anticorpo primário.

#### **IV.8. Localização da Enzima no Tecido por Microscopia Eletrônica**

Nesta preparação também foram utilizados ovócitos no final da fase vitelogênica de *R. prolixus*. Os ovócitos foram fixados por 18 horas em paraformaldeído 4% e glutaraldeído 0,5% a 4° C e então incubados em PBS contendo

$\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM por 60 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem, o material foi desidratado em acetona e embebido em resina hidrofílica (LR White). Posteriormente, os ovócitos foram seccionados em cortes de 80 nm e montados em grades de cobre de 300 mesh. Estas grades foram incubadas em tampão de bloqueio (leite em pó desnatado 5% diluído em PBS) por 1 hora a temperatura ambiente. A incubação com o anticorpo anti  $\text{H}^+$ -PPase de planta durou 20 horas, 4° C. Após três séries de lavagem em PBS para a retirada do anticorpo primário, o material foi incubado com anticorpo secundário conjugado a ouro coloidal (Sigma Chemical Co) por 2 horas. O controle foi realizado na ausência do anticorpo primário. O material foi visualizado em microscópio eletrônico (Zeiss 900).

#### IV.9. Acidificação dos Grânulos de Vitelo

A Laranja de Acridina (LA) é uma amina terciária que se concentra em compartimentos intracelulares ácidos, tornando-se protonada e formando dímeros sob estas condições. Esta dimerização provoca mudanças em suas propriedades de absorvância e fluorescência, fazendo desta molécula um marcador de compartimentos ácidos (ANDERSON, R. G. e ORCI, 1988; PALMGREN, 1991).

Para observar a acidificação promovida pela  $\text{H}^+$ -PPase, as frações de grânulos de vitelo, preparadas conforme descrito anteriormente, foram incubadas no escuro em salina Ringer para *Rhodnius* ou salina de barata com Laranja de Acridina 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por 10 minutos. Após esta incubação os grânulos de vitelo foram depositados em lâminas e

observados em um microscópio confocal equipado com filtro para rodamina, sob um comprimento de onda de excitação 488 nm e de emissão de 514 nm. No meio de incubação, além do indicador, foram adicionados o substrato da enzima e seus cofatores e/ou inibidores, como especificado nas figuras.

#### IV.10. Bombeamento de Prótons

O acúmulo de  $H^+$  proveniente da hidrólise de ATP nas frações de membrana de ovos de *R. prolixus* foi determinado pela diminuição da fluorescência emitida pelo ACMA usando um fluorímetro (modelo F-3010, Hitachi, Tokyo) (ISHMUKHAMETOV *et al.*, 2005). A excitação foi feita à 415 nm e a emissão à 485 nm. O meio de reação continha 3  $\mu$ M ACMA, 5 mM  $MgCl_2$ , 100 mM KCl e 10 mM MOPS-Tris, pH 7.5. Nos locais indicados na figura, ATP 1 mM e FCCP 1  $\mu$ M foram adicionados. O FCCP é um ácido fraco que funciona como ionóforo de prótons, aumentando a condutância deste íon através de membranas biológicas (BENZ e MCLAUGHLIN, 1983).

A acidificação dos grânulos de vitelo contidos nas suspensões de grânulos de *P. americana* foi medida através da mudança de absorbância da LA nos pares de comprimento de onda 493–530 nm em um espectrofotômetro (SLM-Aminco DW2000) (PALMGREN, 1991). O meio de reação utilizado continha KCl 130 mM,  $MgCl_2$  2 mM, EGTA 50  $\mu$ M, HEPES 10 mM pH 7.2. Nos momentos indicados na

figura foram adicionados LA 3  $\mu$ M, 0,1 mM PPI (curva **a**), 0,3 mM PPI (curva **b**) e 40  $\mu$ M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

#### IV.11. Imunofluorescência Indireta

Para imunofluorescência ovos *R. prolixus* e ootecas de 0 dias de *P. americana* foram rompidos em salina Ringer para *Rhodnius* e salina para barata, respectivamente e deixados em repouso por 3 minutos, para decantação de restos celulares. O sobrenadante foi fixado em paraformaldeído 4% por 30 minutos. Após fixação o material foi centrifugado a 14000 g por 15 segundos e o precipitado foi ressuspenso em PBS. Este procedimento foi repetido três vezes. Ao término destas lavagens o material foi colocado sobre lamínulas (previamente cobertas com etilenimida) e aderidos por 10 minutos. Em seguida, as lamínulas foram tratadas com  $\text{NH}_4\text{Cl}$  100 mM e incubadas por 30 minutos em tampão de bloqueio (BSA 1,5%, gelatina de peixe 0,5% e TBS Tween 0,02%). As lamínulas foram então incubadas por 1 hora com o anticorpo primário 1:500 produzido em coelho (anti- $\text{H}^+$ -PPase de *A. thaliana*), lavadas em tampão de bloqueio e posteriormente incubadas (por 1 hora) com anticorpo secundário conjugado à fluoresceína (1:100). Ao final, as lamínulas foram lavadas e observadas em microscópio confocal (Zeiss CLSM 310). O controle foi realizado sem incubação com anticorpo primário.

#### IV.12. Microanálise de Raios-X

Ovos de *R. prolixus* e ootecas de 0 dias de *P. americana* foram rompidos em HEPES 10 mM pH 7.2 e deixados em repouso por 3 minutos, para decantação de restos celulares. Grânulos de vitelo presentes no sobrenadante foram aderidos a grades de cobre cobertas com Formvar e carbono. Espectros de raios-X por energia dispersiva foram coletados concentrando-se o feixe de elétrons nos grânulos de vitelo encontrados em diferentes regiões das grades. Como controle, espectros foram coletados de regiões adjacentes aos grânulos e também do filme de formvar/carbono. As amostras foram analisadas em um microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200 EX operando a 80 kV. Os raios-X foram contados por 150 segundos utilizando-se um detector de Si(Li) com janela Norvar, 0-10 Kev de dispersão de energia e com resolução de 10 eV por canal. As análises foram feitas utilizando-se um microscópio de transmissão-varredura (Leo-912) equipado com filtro de energia e sistema de mapeamento de raios-X por energia dispersiva (Leo-electron microscope).

#### IV.13. Extração de Polifosfato (PoliP)

A dosagem de polifosfato foi realizada em extratos totais de ovário de ooteca de 0 dias de *P. americana* e em ovos de *R. prolixus*.

A dosagem de PoliP *cadeia curta* (“short chain”) foi realizada conforme descrita por RUIZ et al., 2001. Os ovários e o conteúdo dos ovos e ootecas foram

colocados em um microtubo contendo 0.3 ml de ácido perclórico 0,5 M, homogeneizados e mantidos no gelo. Após 30 minutos, o homogenato foi centrifugado em centrífuga “spin” a 14.000 g durante 1 minuto. O sobrenadante foi neutralizado pela adição de KOH 0,72 M e KHCO<sub>3</sub> 0,6 M. Após nova centrifugação a 14.000 rpm por 1 min, o sobrenadante obtido foi reservado para posterior determinação da quantidade de PoliP.

Para dosagem de PoliP *cadeia longa* (“long chain”) foi realizada conforme AULT-RICHE, 1998. Os ovários e o conteúdos dos ovos e ootecas foram colocados em um microtubo contendo 0,5 mL de tampão de lise (guanidina isotiocianato 4 M, Tris-HCl 50 mM pH 7.0 previamente aquecido a 95° C. O material foi vigorosamente agitado e incubado por 4 minutos a 95° C. Foram retirados 50 µL do homogenato obtido para posterior dosagem de proteína e ao restante do conteúdo do microtubo foram adicionados 30µL de SDS 10%, 0,5 mL de etanol 95% e 5µL “Glassmilk”. O material foi então homogeneizado e centrifugado em centrífuga “spin” a 13.000 g por 15 seg. O precipitado foi ressuspensão em 0,5 mL de tampão de lavagem (NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, etanol 50% e Tris-HCl 5 mM pH 7.5) gelado. A amostra foi centrifugada e lavada mais duas vezes nas mesmas condições. Ao final, o precipitado foi ressuspensão em 50 µL do tampão de digestão (MgCl<sub>2</sub> 10 mM, DNase 20 µg/mL, RNase 20 µg/mL e Tris-HCl 50mM pH 7.4) e incubado por 10 min a 37° C. A amostra foi centrifugada a 13.000 g por 15 segundos e o precipitado formado foi lavado em 150 µL de tampão de lise e 150 µL de etanol 95%. Após centrifugação a 13.000 g por 15 seg e o precipitado foi lavado duas vezes em 0,5 mL de tampão de lavagem. O precipitado final foi ressuspensão em 50 µL Tris-HCl 50 mM pH 8.0 e

incubado por 2 minutos a 95° C para eluição do PoliP, com posterior centrifugação a 13.000 g por 15 seg. Esta etapa final foi repetida duas vezes e os sobrenadantes obtidos após cada centrifugação foram acondicionados em microtubos e reservados a -80° C para posterior dosagem do PoliP.

#### **IV.14. Determinação da Quantidade de Polifosfato (PoliP)**

A quantidade de PoliP presente nas amostras preparadas como descrito anteriormente, foi estimada a partir da determinação da quantidade de Pi liberado a partir do tratamento com excesso de exopolifosfatase recombinante de levedura. Alíquotas (5 µL) de extratos de PoliP de cadeia curta e longa foram incubadas por 15 minutos a 37°C em meio de reação contendo MgCl<sub>2</sub> 6.0 mM e Tris-HCl 60 mM pH 7.5, além da enzima, em um volume final de 75 µL. A liberação do Pi foi monitorada de acordo com o método de Lanzetta (LANZETTA *et al.*, 1979).

#### **IV.15. Determinação da Variação de Cálcio**

A dosagem da concentração de cálcio livre foi monitorada pela medida da mudança do espectro de absorbância do Arsenazo utilizando um espectrofotômetro (CINTRA 20 spectrophotometer) nos comprimentos de onda 675-685 nm a temperatura ambiente (SCARPA, 1979). A suspensão de grânulos (0,1 mL) foi

adicionada a cubeta contendo 1,3 mL do meio de reação (KCl 130 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, EGTA 50 μM, HEPES 10 mM pH 7.2) e Arsenazo 4 μM. A calibração da leitura da absorbância foi feita utilizando-se cálcio titulado 3 μM. Em diferentes ensaios foram adicionados PPI 1 mM, ATP 1 mM, NaF 10 mM, como indicado na figura. Os resultados obtidos das leituras nos dois comprimentos de onda foram devidamente subtraídos e os valores apresentados no gráfico se referem a proporção de aumento ou diminuição da quantidade de cálcio no meio levando em consideração a quantidade deste cátion imediatamente antes da adição do composto em questão.

## V- RESULTADOS

### V.1. Hidrólise de ATP em Frações de Membrana de Ovos de *Rhodnius prolixus*

Nossos primeiros resultados mostram a presença de H<sup>+</sup>-ATPases de diferentes classes nas frações de membrana de ovos de *Rhodnius prolixus*. Nestas frações, a atividade H<sup>+</sup>-ATPásica foi comprometida por inibidores específicos de H<sup>+</sup>-ATPases vacuolares (nitrato – KNO<sub>3</sub> 50 mM), H<sup>+</sup>-ATPases mitocondriais (azida – NaN<sub>3</sub> 5 mM) e H<sup>+</sup>-ATPases de membrana plasmática (vanadato – VO<sub>4</sub> 1 mM). Como mostra a **Figura 08**, a hidrólise de ATP foi totalmente inibida quando todos os inibidores foram adicionados ao meio de reação.

### V.2. Transporte de Prótons em Microsossomos Obtidos de Frações de Membrana de Ovos de *R. prolixus*.

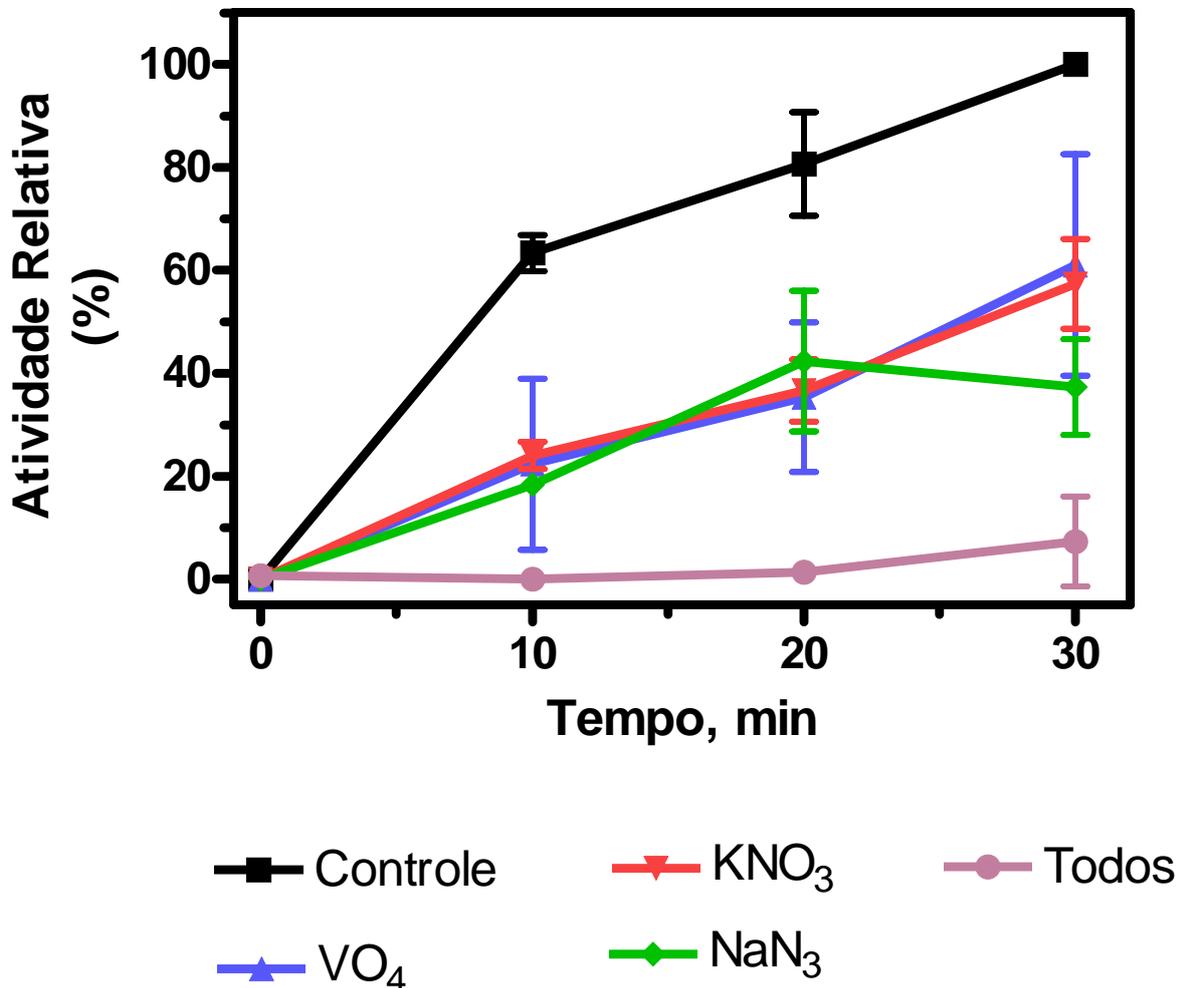
A fim de verificar o bombeamento de prótons a partir da hidrólise de ATP, procedemos a ensaios de transporte de prótons, nas mesmas frações de membrana preparadas anteriormente, na presença do fluoróforo ACMA. Como mostra a **Figura 09**, houve diminuição da fluorescência do ACMA após a adição de ATP, o que indica que houve diminuição do pH das vesículas. O acréscimo do ionóforo de prótons (FCCP) provocou a saída de íons H<sup>+</sup> do interior dos microsossomos, provocando o aumento da fluorescência.

### V.3. Hidrólise de PPI e ATP nas frações de membrana de *R. prolixus*

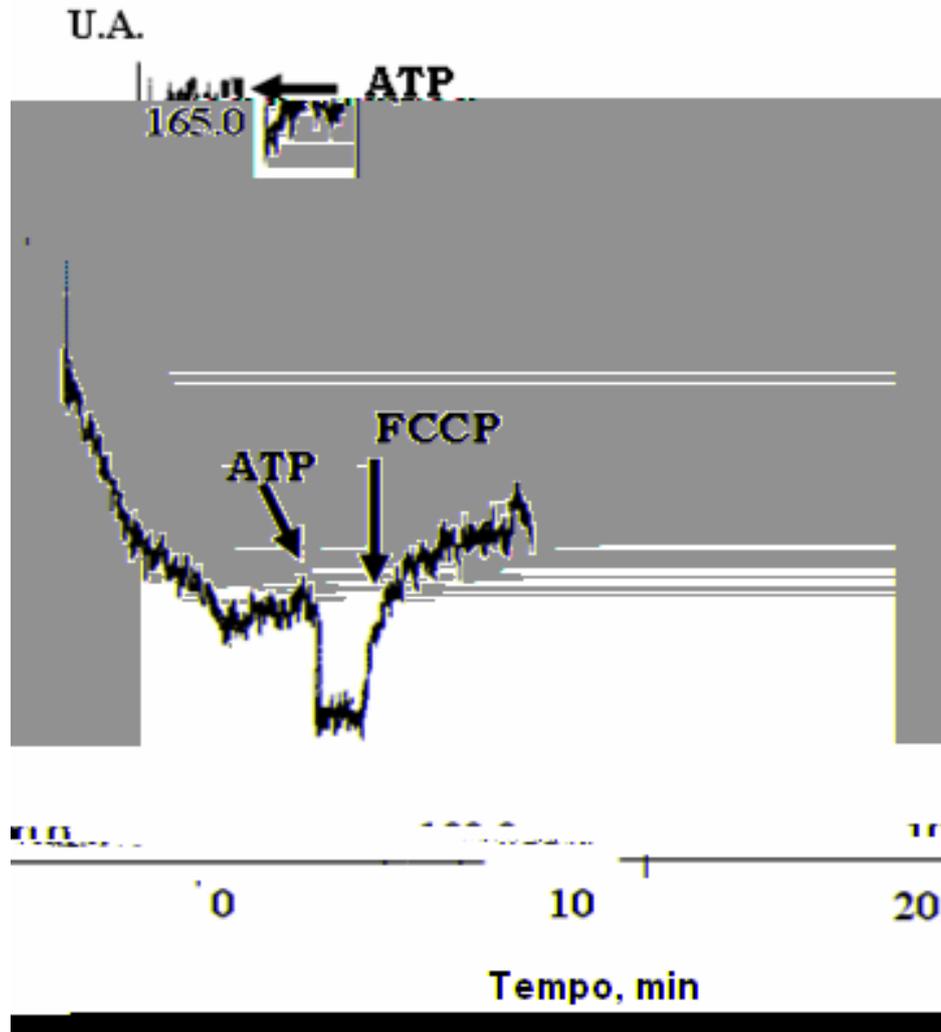
Surpreendentemente, nestas frações de membrana, além da hidrólise de ATP foi constatada a presença de enzimas capazes de hidrolisar PPI (**Figura 10**). Esses resultados foram inesperados, visto que nunca havia sido descrita a presença de pirofosfatases em membranas biológicas de células animais. De posse deste dado, prosseguimos na caracterização bioquímica das pirofosfatases presentes nas membranas de ovos e ovários de insetos.

Em todos os ensaios realizados a atividade específica encontrada foi bastante variável. Por este motivo, todos os resultados foram expressos em atividade relativa.

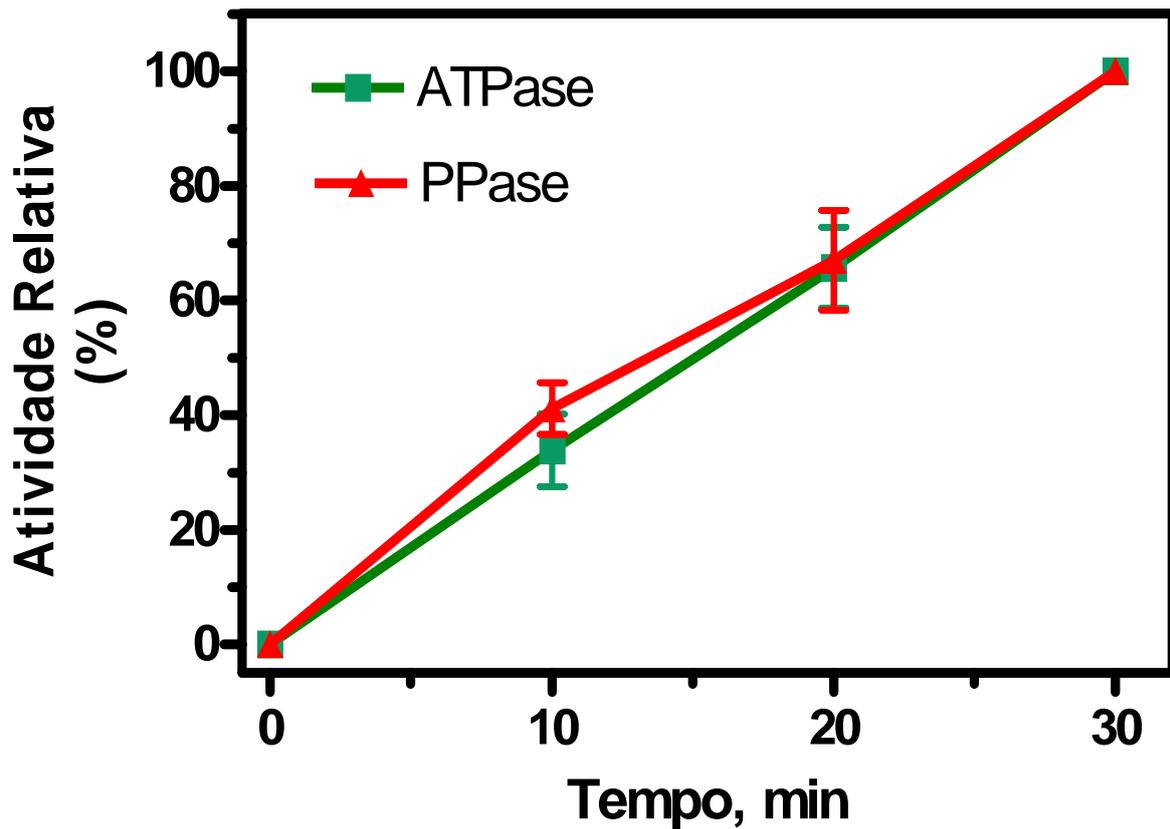
A **Tabela 1** apresenta os valores em atividade específica para os percentuais presentes na **Figura10**.



**Figura 08: Efeito de diferentes inibidores na hidrólise de ATP:** A liberação de fosfato foi estimada como descrito em materiais e métodos. O meio de reação continha MgCl<sub>2</sub> 0,6 mM, KCl 100 mM, ATP 1 mM e MOPS-Tris 50 mM ph 7,5. Em cada curva apresentada foi adicionado ao meio de reação os seguintes inibidores: VO<sub>4</sub> 1 mM (▲), KNO<sub>3</sub> 50 mM (▼), NaN<sub>3</sub> 5mM (◆) ou todos os inibidores ao mesmo tempo (●). O controle foi realizado na ausência de qualquer inibidor (■).



**Figura 09 - Transporte de prótons através de membranas vesiculares ovos de *R. prolixus*:** O acúmulo de  $H^+$  pelas vesículas foi determinado como descrito em Materiais e Métodos. A reação foi iniciada pela adição de ATP 1 mM. O ionóforo de prótons (FCCP, 5  $\mu$ M) foi adicionado como mostrado na figura.



**Figura 10:** Hidrólise de ATP e PPi em frações de membrana de *R. prolixus*: A liberação de fosfato foi estimada como descrito em Materiais e Métodos. O meio de reação continha MgCl<sub>2</sub> 0,6 mM, KCl 100 mM, e MOPS-Tris 50 mM pH 7,5. A hidrólise de PPi foi realizada na presença de PPi 0,3 mM (—▼—) e a hidrólise de ATP em um meio de reação contendo ATP 1 mM (—■—).

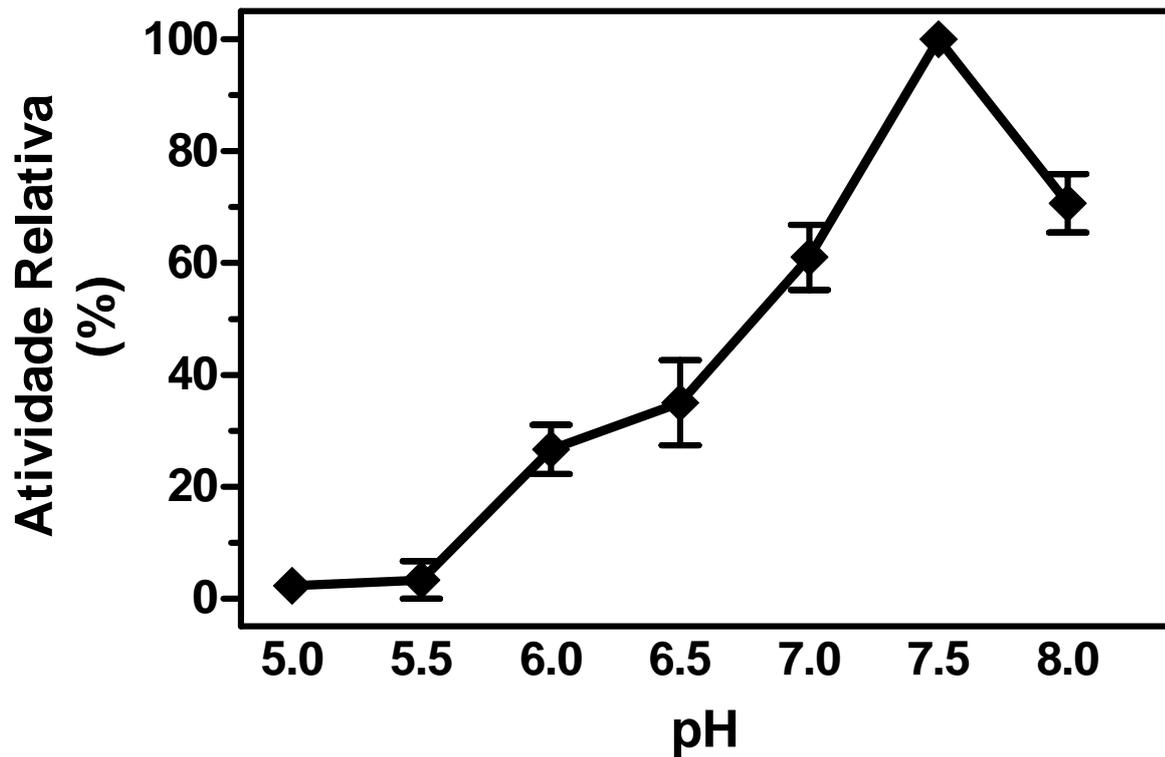
**Tabela 1: Atividade específica da hidrólise de ATP e PPi em frações de membrana de *R. prolixus*:** Os valores apresentados na tabela correspondem às atividades específicas utilizadas para o cálculo da atividade relativa mostrada na Figura 10. A atividade foi calculada em  $\mu$ moles de PPi ou ATP hidrolisado por cada mg de proteína 10, 20 ou 30 minutos após a adição da fração de membrana. O controle (tempo 0) foi obtido adicionando-se TCA 50% logo após a adição da fração de membranas.

Substrato para Hidrólise	Replicatas	$\mu$ moles de PPi ou ATP hidrolisado/mg ptn/0 min	$\mu$ moles de PPi ou ATP hidrolisado/mg ptn/10 min	$\mu$ moles de PPi ou ATP hidrolisado/mg ptn/20 min	$\mu$ moles de PPi ou ATP hidrolisado/mg ptn/30 min
ATP	1	0	0,18	0,38	0,54
	2	0	0,41	0,96	1,52
	3	0	0,03	0,05	0,08
	4	0	0,59	1,36	2,03
	5	0	0,37	0,87	1,32
	6	0	0,30	0,40	0,76
	7	0	0,23	0,39	0,52
PPi	1	0	0,29	0,35	0,59
	2	0	0,02	0,03	0,05
	3	0	0,70	1,49	1,79
	4	0	1,10	1,81	2,63
	5	0	0,10	0,17	0,24
	6	0	0,19	0,30	0,47
	7	0	0,81	1,29	2,13

#### V.4. Determinação do pH ótimo para a atividade da enzima *in vitro* e verificação da dependência de magnésio para a atividade da enzima em *R. prolixus*

A hidrólise de PPi foi realizada em diferentes valores de pH a fim de se estabelecer um pH ótimo para as reações (**Figura 11**). Com esta análise, observamos que o pH ótimo para a enzima *in vitro* se encontra próximo à neutralidade, como é visto também para H<sup>+</sup>-PPases de outros organismos (MAESHIMA, 2000). A partir de então todos os ensaios foram realizados em pH 7,5.

Para verificar a dependência do magnésio (cofator descrito como essencial para todas as PPases descritas), realizamos ensaio enzimático na ausência de magnésio e na presença de concentrações crescentes deste cátion. A atividade da PPase de membrana mostrou-se estritamente dependente de magnésio nas frações de membrana preparadas a partir de ovos de *R. prolixus* (**Figura 12**). Com o objetivo de investigar a origem da PPase presente nestas frações realizamos o mesmo ensaio a partir de preparações de membrana produzidas utilizando ovários de fêmeas três dias após serem alimentadas. Os resultados apresentados na **Figura 12** sugerem que a enzima encontrada nos ovos destes insetos seja produzida pela fêmea e incorporada pelo ovócito em crescimento. Em ambas as amostras a enzima foi incapaz de realizar a hidrólise de PPi na completa ausência de magnésio. Em concentrações de MgCl<sub>2</sub> próximas a 500 µM pudemos observar atividades máximas para as enzimas de ovário e ovo.



**Figura 11: Efeito do pH na hidrólise do PPi pelas PPases associadas à membrana de ovos de *R. prolixus*:** O meio de reação continha  $MgCl_2$  0,6 mM, KCl 100 mM, PPi 0,3 mM e tampões específicos para cada pH a uma concentração de 50 mM. Para pH 5,0 e 5,5 foi utilizado HEPES como tampão, para pH entre 6,0 e 7,5 foi usado MOPS-Tris e para pH 8,0 glicil-glicina.

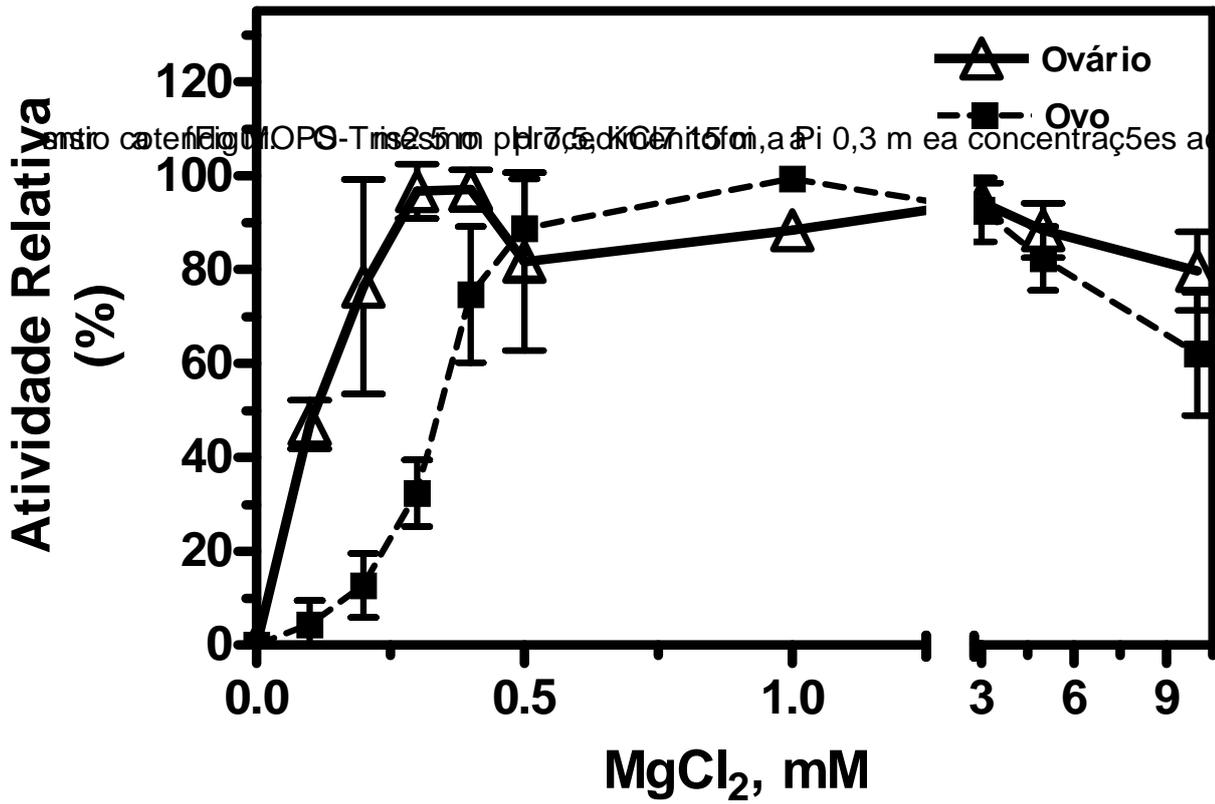


Figura 12. Efeito da concentração de íons de magnésio na atividade da PPase associada à membrana do ovário e do ovo.

### V.5. Efeito de Diferentes Inibidores na Hidrólise de PPi em Frações de Membrana de Ovos e Ovários de *R. prolixus*

A hidrólise de PPi foi comprometida na presença do cátion divalente  $\text{Ca}^{2+}$ , que é um conhecido inibidor de PPases (**Figura 13**). Este íon, na maioria das vezes em concentrações bem acima da fisiológica, compete com o  $\text{Mg}^{2+}$  pela ligação ao PPi e forma o complexo Ca-PPi que inibe a enzima (MAESHIMA, 2000). Tanto a enzima presente nas frações de membrana dos ovos, como as de frações de ovócitos, se mostraram fortemente inibidas mesmo em presença de pequenas concentrações do cátion (95% de inibição em 0,1mM).

O fluoreto de sódio se mostrou bastante eficiente na inibição da PPase de *R. prolixus* (**Figura 14**). Em nossas frações (de ovos e ovócitos) 0,5 mM de NaF foram suficientes para abolir totalmente a atividade da enzima associada à membrana. Na frações solúveis a hidrólise de PPi foi inibida apenas em concentrações muito superiores, próximas à 3,0 mM (dados não mostrados).

O imidodifosfato (IDP), molécula análoga ao PPi, foi utilizado em concentrações crescentes a fim de competir com o substrato da enzima pela ligação ao seu sítio ativo (**Figura 15**). Através deste resultado podemos observar que 100  $\mu\text{M}$  de IDP inibiu 80% da atividade da enzima e concentrações superiores foram ainda mais eficientes.

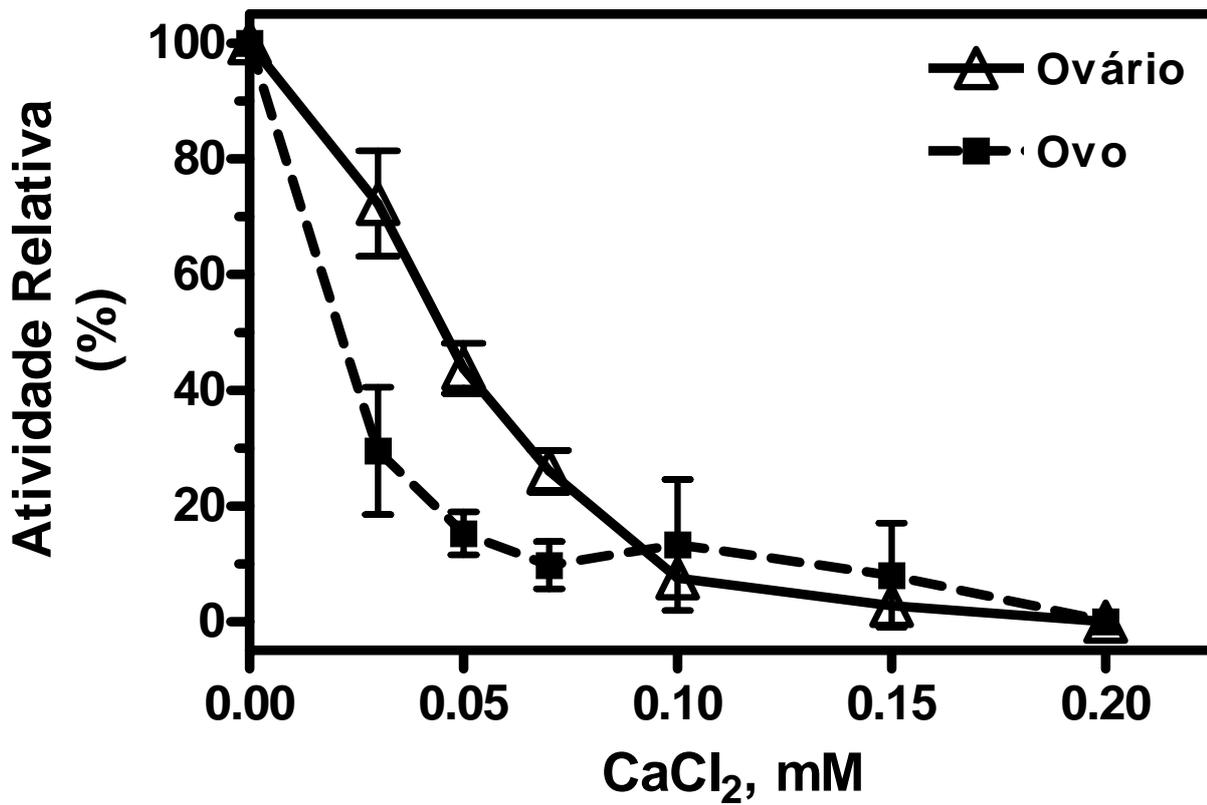


Figura 13: Efeito do  $\text{Ca}^{2+}$  na hidrólise de  $\text{PPi}$  pelas PPases associadas à membrana de ovários e ovos de *R. prolixus*: O meio padrão continha MOPS-Tris 50 mM 7,5,  $\text{MgCl}_2$  0,6 mM, 1 KCl 100 mM e  $\text{PPi}$  0,3 mM. A atividade máxima da enzima foi vista no controle, sem inibidor (100%).

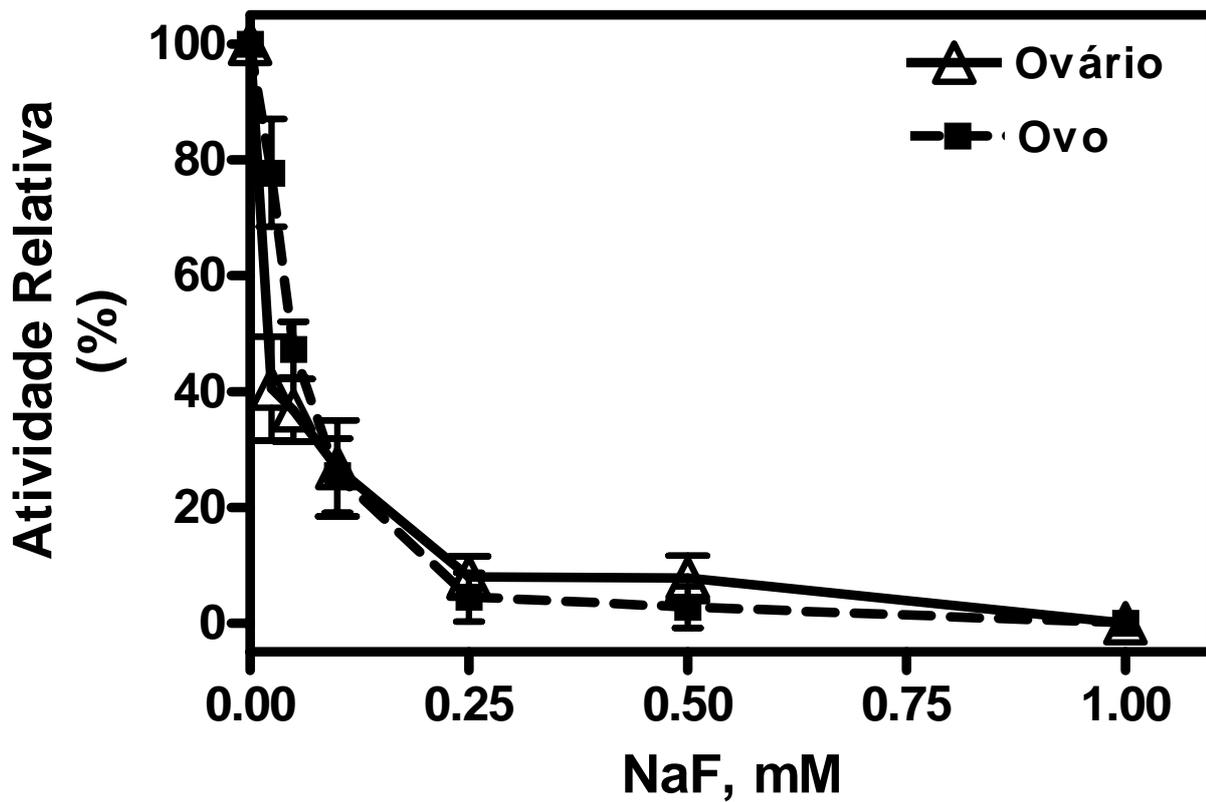
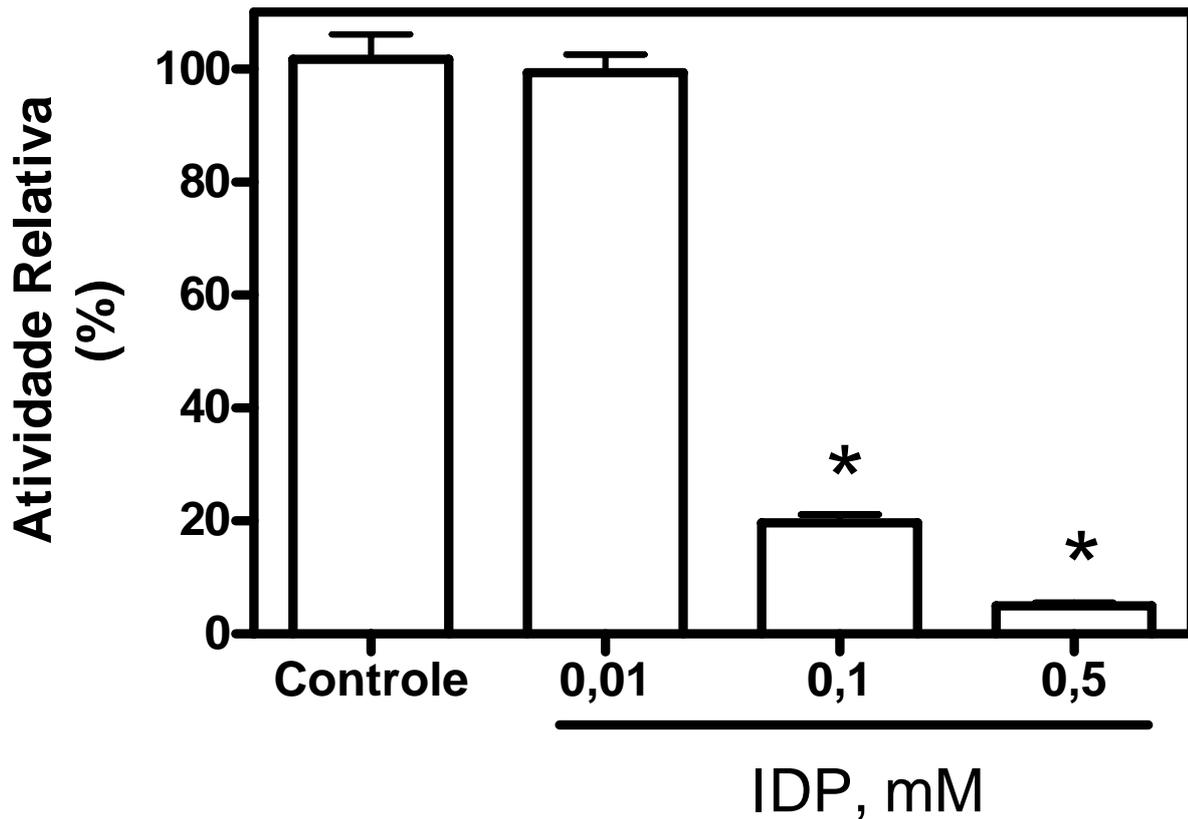


Figura 14: Efeito do Fluoreto de Sódio na hidrólise de PPi pelas PPases associadas à membrana de ovários e ovos de *R. prolixus*: O meio de reação padrão continha MOPS-Tris 50 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 0,6 mM, KCl 100 mM e PPi 0,3 mM.



**Figura 15: Inibição competitiva da enzima realizada pela adição de concentrações crescentes de imidodifosfato (IDP) em frações de membrana de ovos de *R. prolixus*:** O meio de reação padrão continha MOPS-Tris 50 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 0,6 mM, KCl 100mM e PPI 0,3 mM. O controle foi realizado na ausência de IDP.

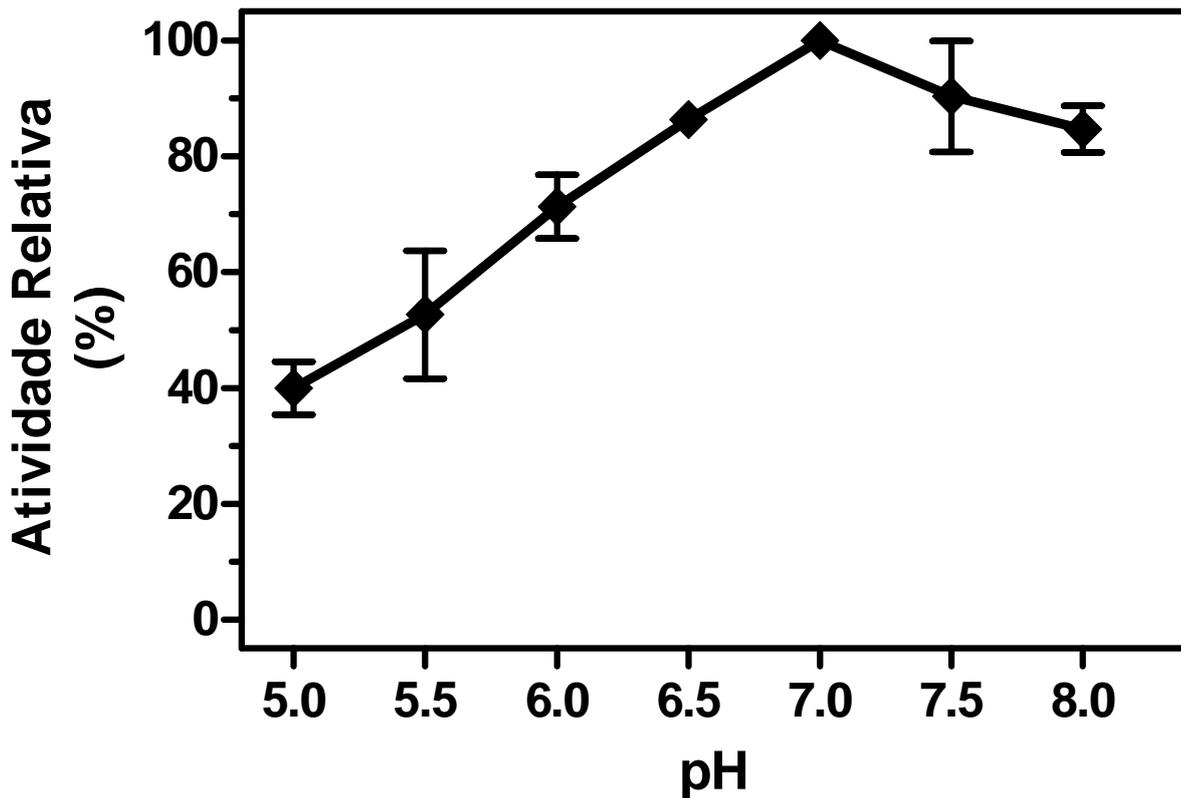
\* estatisticamente diferentes do controle (teste t P = 0,0979 e 0,0169)

## V.6. Determinação do pH ótimo para a atividade da enzima *in vitro* e verificação da dependência de magnésio para a atividade da enzima em *P. americana*

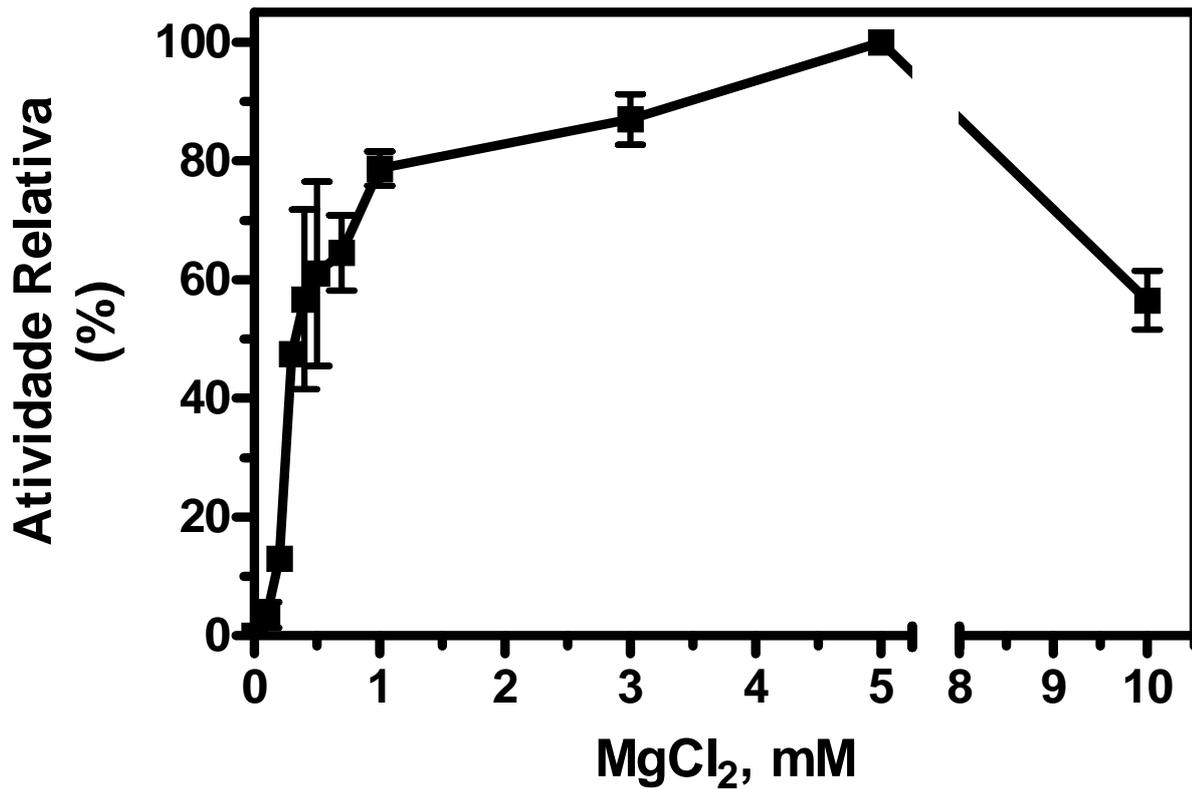
Devido a dificuldades técnicas encontradas na preparação de frações de membrana utilizando ovos (ootecas) de *P. americana*, toda a caracterização bioquímica da enzima nesta espécie foi realizada a partir de frações de membranas de ovócitos corionados, como descrito em Materiais e Métodos.

Como visto em amostras de *R. prolixus* a hidrólise de PPi em *P. americana* foi máxima em pH neutro (**Figura 16**). Porém, diferente do que foi observado em barbeiro, a enzima de barata parece ser mais resistente a variações de pH, já que ainda retém atividade em pH 5,0 e 5,5, por exemplo.

Da mesma forma que a enzima de *R. prolixus*, a PPase de *P. americana* foi totalmente dependente de magnésio. No entanto, nos ensaios realizados nesta última espécie, a enzima requer uma maior concentração deste cofator (5 mM) para que possa atingir sua atividade máxima (**Figura 17**).



**Figura 16:** Efeito do pH na hidrólise do PPI pelas PPases associadas à membrana de ovócitos de *P. americana*: O meio padrão continha  $MgCl_2$  0,6 mM, KCl 100 mM, PPI 0,3 mM e tampões específicos para cada pH a uma concentração de 50 mM. Para pH 5,0 e 5,5 foi utilizado HEPES como tampão, para pH entre 6,0 e 7,5 foi usado MOPS-Tris e para pH 8,0 glicil-glicina.



**Figura 17: Efeito da concentração de magnésio na atividade das PPases associadas à membrana de ovócitos de *P. americana*:** A atividade da enzima foi analisada em um meio contendo MOPS-Tris 50 mM pH 7,5, KCl 100 mM, PPi 0,3 mM e concentrações crescentes de cloreto de magnésio, como mostra a figura.

### V.7. Efeito de Diferentes Inibidores na Hidrólise de PPi em Frações de Membrana de Ovócitos de *P. americana*

Os mesmos inibidores utilizados na caracterização da PPase em *R. prolixus* foram empregados para a análise da enzima em *P. americana*. A hidrólise de PPi também foi reduzida na presença de cálcio (Figura 18). No entanto, a inibição total da enzima em barata só foi alcançada em concentrações superiores às necessárias para inibição da hidrólise de PPi em *R. prolixus*.

Porém, constatamos índices de inibição bastante semelhantes nas PPases dos dois insetos em decorrência da presença de fluoreto (**Figura 19**). Enquanto que inibição total da hidrólise de PPi em ovário e ovos de *R. prolixus* foram observadas a aproximadamente 0,5 M, em *P. americana* esta mesma concentração inibiu a enzima em 90%.

Em *R. prolixus* a inibição competitiva realizada pelo IDP foi realizada unicamente na presença de PPi 0,3 mM. Em *P. americana*, no entanto, realizamos a cinética enzimática em concentrações crescentes de IDP em três meios de reação diferentes, contendo PPi nas seguintes concentrações: 0,05 mM, 0,15 mM e 0,3 mM. (**Figura 20**). Em nossas amostras, 0,5 mM de IDP foi capaz de inibir totalmente a enzima quando a concentração de PPi presente no meio era de 0,05 mM. Esta mesma concentração do inibidor foi capaz de reduzir em aproximadamente 80% e 50% a hidrólise de PPi quando PPi estava presente nas concentrações 0,15 mM e 0,3 mM, respectivamente.

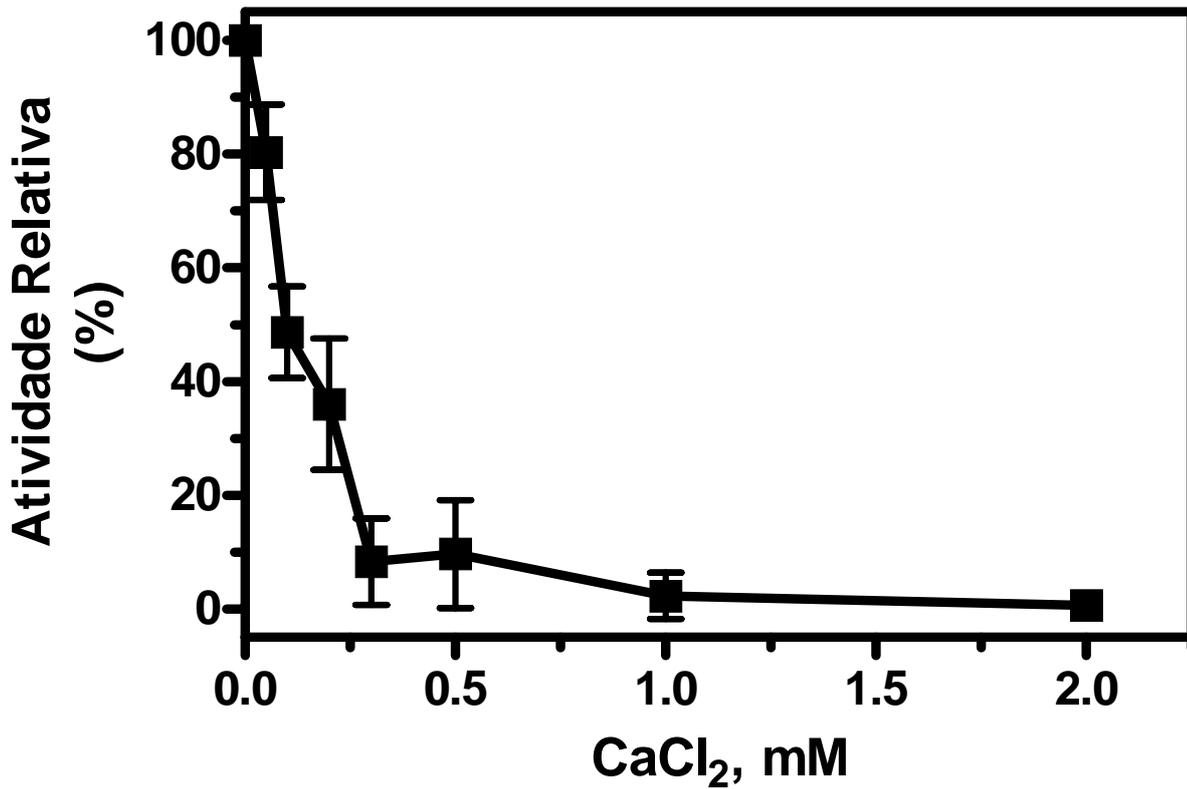


Figura 18: Efeito do  $\text{Ca}^{2+}$  na hidrólise de PPi pelas PPases associadas à membrana de ovócitos de *P. americana*: O meio padrão continha MOPS-Tris 50 mM pH 7,5,  $\text{MgCl}_2$  0,6 mM, 1 KCl 100 mM e PPi 0,3 mM. A atividade máxima da enzima foi vista no controle, sem inibidor (100%).

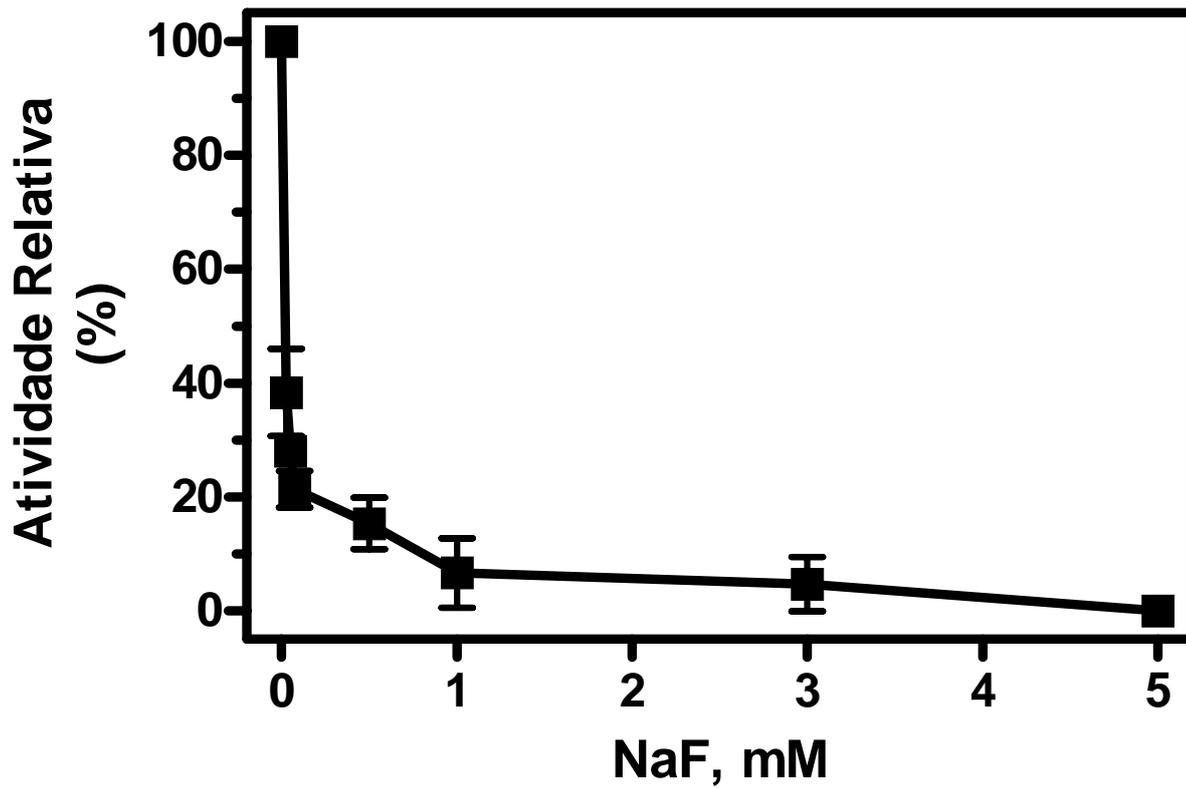
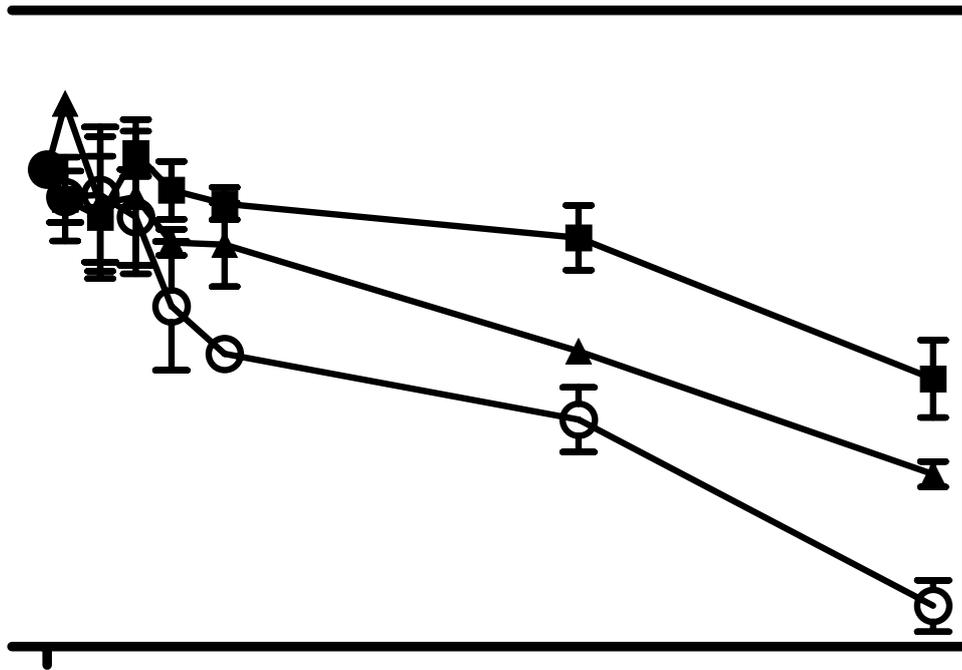


Figura 19: Efeito do Fluoreto de Sódio na hidrólise de PPi pelas PPases associadas à membrana de ovócitos de *P. americana*: O meio de reação padrão continha MOPS-Tris 50 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 0,6 mM, KCl 100 mM e PPi 0,3 mM.

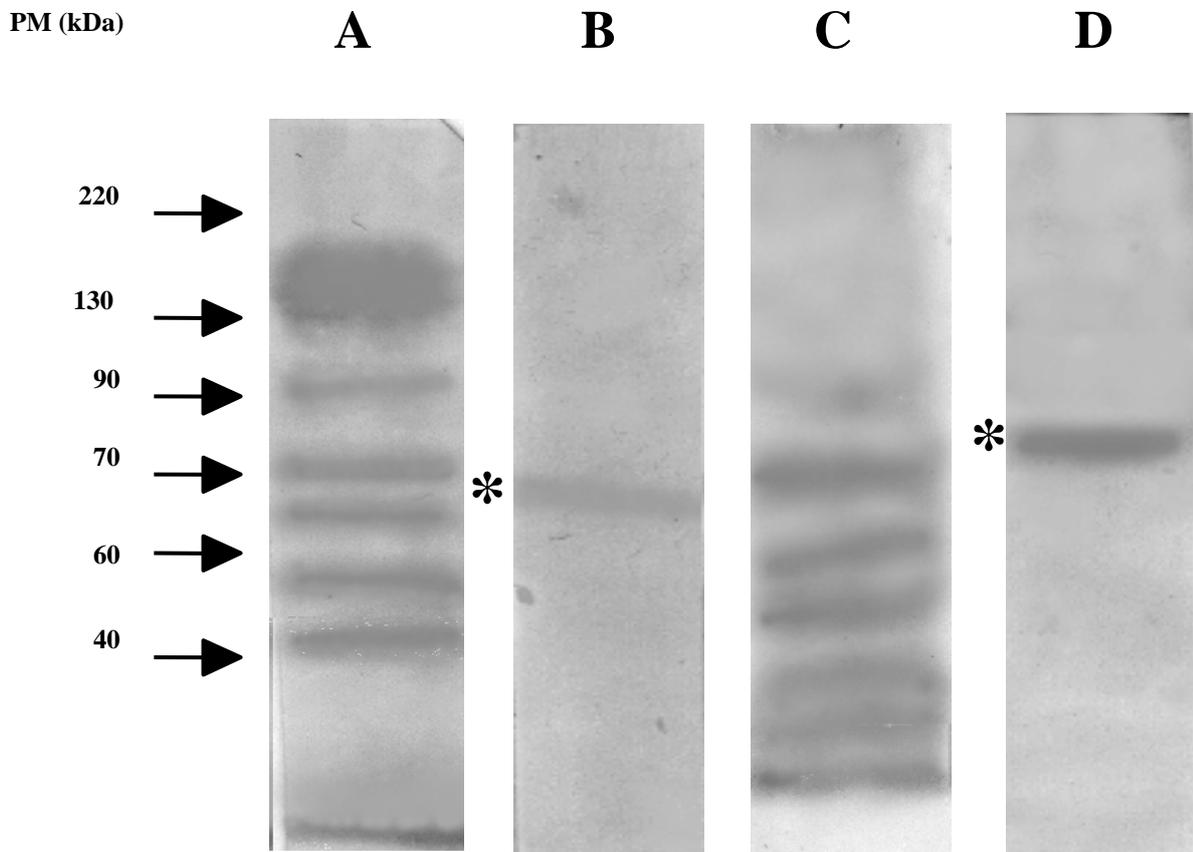


### V.8. “Western Blot” para H<sup>+</sup>-PPase de *R. prolixus*:

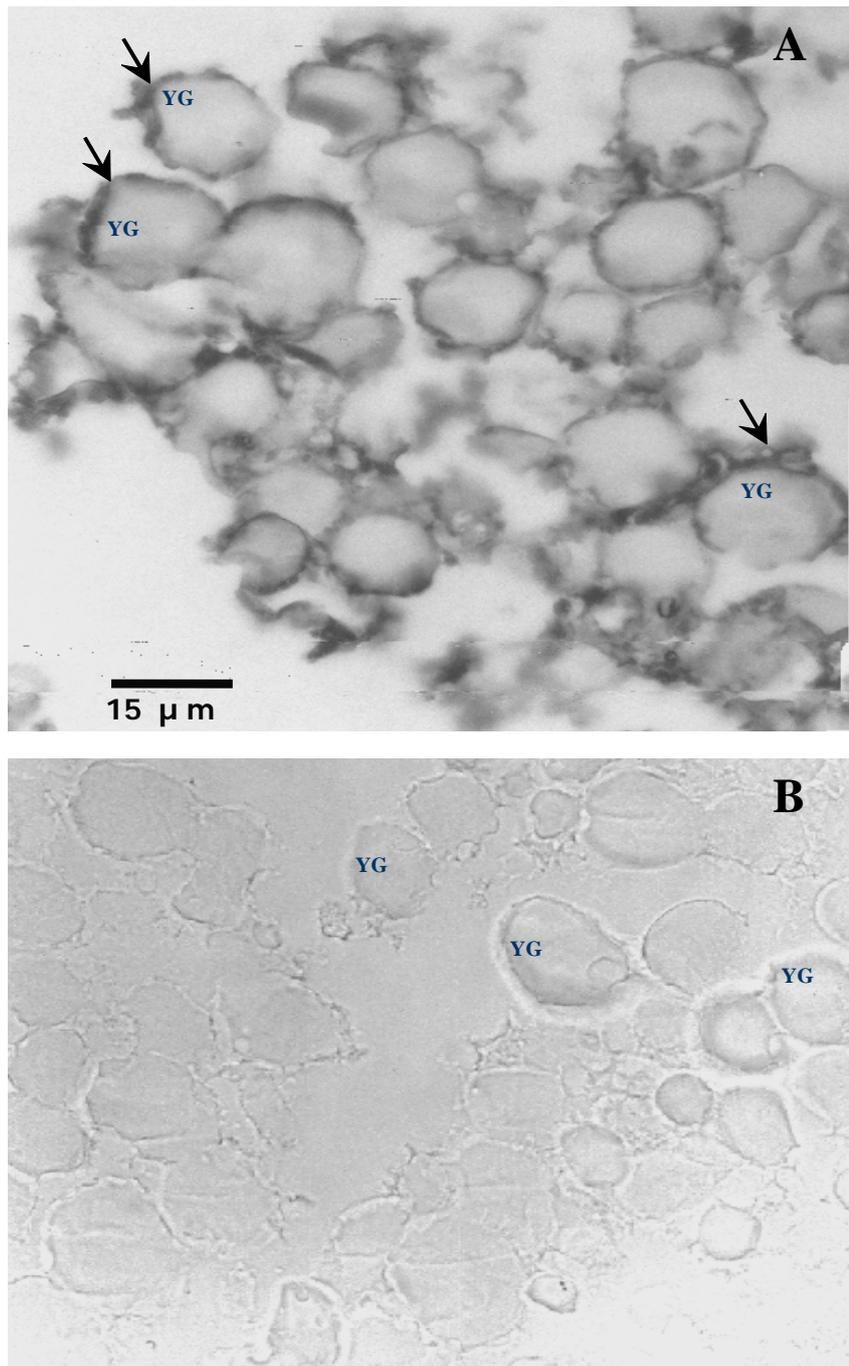
A fim de verificar se existem semelhanças entre a enzima em *R. prolixus* e a enzima encontrada em plantas, foi realizada uma imunomarcação utilizando um anticorpo produzido contra H<sup>+</sup>-PPase de *A. thaliana*. A **Figura 21** mostra que o anticorpo anti- H<sup>+</sup>-PPase de planta foi capaz de reconhecer um polipeptídeo de aproximadamente 65 kDa nas frações de membrana de ovos de *R. prolixus* (B). Como controle, utilizamos o mesmo anticorpo em frações de membrana de raiz de milho (*Zea mays*) (D). O mesmo procedimento foi realizado em frações de membrana de cordão umbilical humano e PPase solúvel purificada de levedura e em ambas as amostras não houve reconhecimento de polipeptídeos (dados não mostrados).

A localização da enzima nos ovócitos de *R. prolixus* foi determinada pela observação do material preparado para microscopia óptica (**Figura 22**) e eletrônica (**Figura 23**) como foi descrito em Materiais e Métodos. Na **Figura 22A** verificamos através da atividade peroxidásica intensa marcação na periferia dos grânulos e não dentro dos mesmos. No controle (**22B**), onde os cortes foram incubados apenas na presença do anticorpo secundário, notamos a ausência de qualquer marcação ao redor dos grânulos.

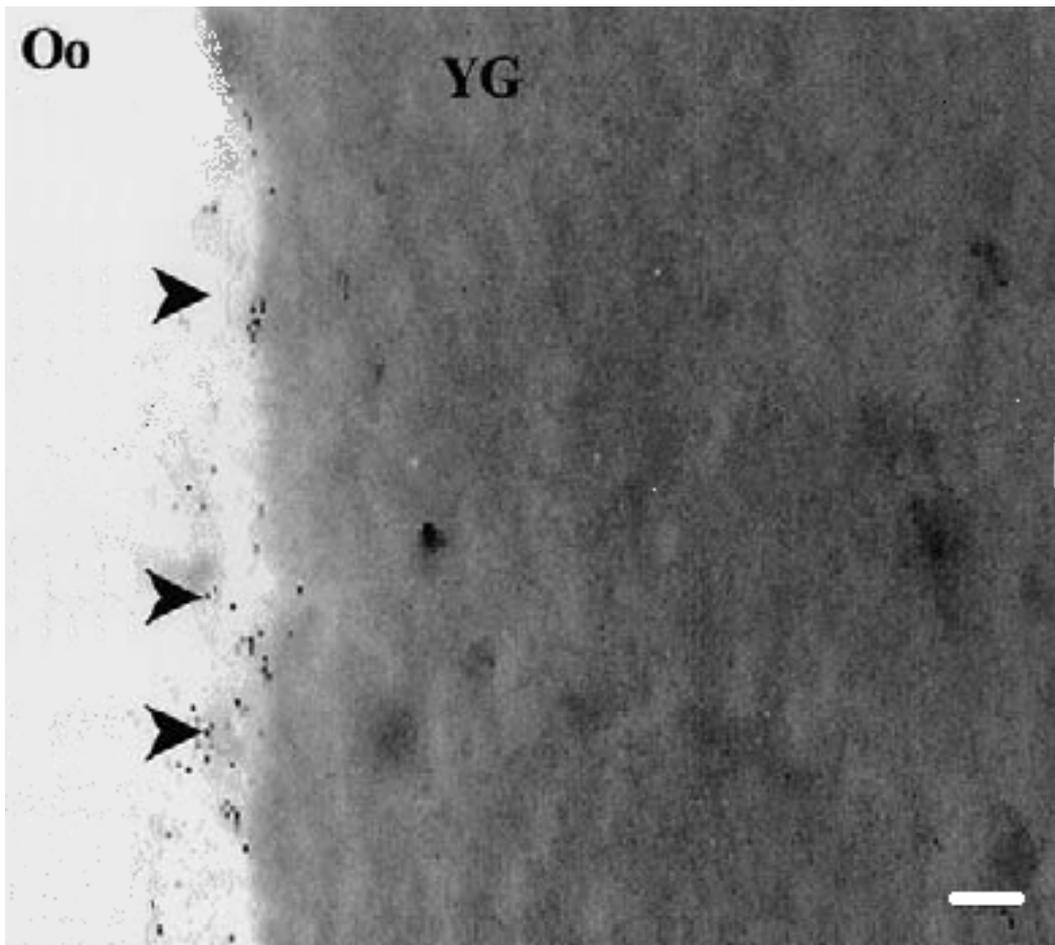
Com o objetivo de visualizar com maior detalhamento a localização da enzima no tecido, foi utilizada a técnica de imunolocalização por microscopia eletrônica de transmissão dos cortes tratados com o mesmo anticorpo utilizado anteriormente (**Figura 23**). Com este resultado podemos notar a presença do ouro exatamente na superfície de um grânulo de vitelo e nenhuma marcação no interior deste grânulo.



**Figura 21: “Western Blot” para PPase de *Rhodnius prolixus* utilizando anticorpo produzido contra a enzima de planta:** As frações de membrana de ovo de *R. prolixus* e de raiz de milho foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% e então eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. Lanes **A** e **C** representam a fração total de membranas de *R. prolixus* e *Zea mays*, respectivamente, corados com vermelho de Ponceau. Lanes **B** e **D** revelam a imunomarcagem das mesmas frações anteriores (B: *R. prolixus* e D: *Zea mays*), realizadas após incubação com anticorpo anti-  $H^+$ -PPase de planta (1:500), seguido da adição de um anticorpo secundário associado a fosfatase alcalina (1:1000).



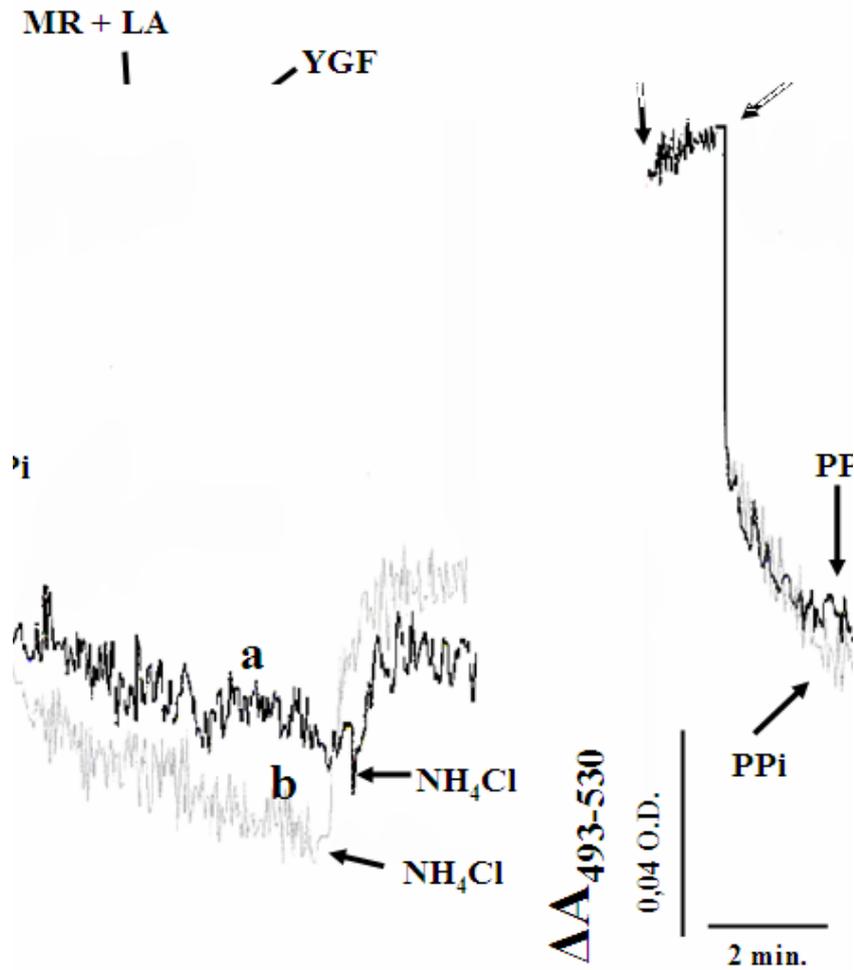
**Figura 22: Imunolocalização de PPase em grânulos de vitelo de *R. prolixus* evidenciada por microscopia óptica: A-** Corte de ovócitos de *R. prolixus* incubados com anticorpo anti-  $H^+$ -PPase de planta (1:500) e posteriormente com anticorpo secundário conjugado a peroxidase (1:100). **B-** Controle realizado na ausência do anticorpo primário. Barra equivale a 15 μm. Setas: Membranas de Grânulos de Vitelo. **YG:** Grânulo de vitelo.



**Figura 23: Imunolocalização de PPase em grânulos de vitelo de *R. prolixus* evidenciada por microscopia eletrônica:** Imagem parcial do corte de um grânulo de vitelo evidenciando a presença das marcações com ouro coloidal (cabeça de seta). Barra equivale a 125 nm. **Oo:** Ooplasma. **YG:** Grânulo de vitelo.

### V.9. Transporte de Prótons Através de Membranas de Grânulos de Vitelo de Ootecas de *P. americana*

A fim de verificar o bombeamento de prótons a partir da hidrólise de PPi, realizamos ensaios de transporte de prótons utilizando suspensões de grânulos preparadas a partir de ootecas de 2 dias, conforme descrito em Materiais e Métodos. Nesta experiência, 0,2 mL da suspensão de grânulos foram adicionados no meio de reação (KCl 130 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, EGTA 50 μM e Hepes 10 mM (pH 7.2) e LA 3 μM) (**Figura 24**). Pudemos verificar que em ootecas de dois dias já existem alguns grânulos ácidos, visto que a absorbância da LA presente no meio de reação diminuiu, em função de sua dimerização no interior dos compartimentos ácidos. No entanto, a adição de PPi (0,1 mM) intensificou a acidificação das vesículas presentes no meio (curva **a**). Quando adicionamos 0,3 mM de PPi (concentração utilizada nos demais experimentos) a diminuição do pH dos grânulos foi máxima (curva **b**), visto que adições superiores a estas (PPi 0,6, 1,0 e 1,5 mM) não aumentaram a inclinação da curva em **b** (dados não mostrados). Conforme mostrado na figura, a alcalinização do meio (adição de NH<sub>4</sub>CL) provocou a saída da LA e o conseqüente aumento de sua forma desprotonada no meio exterior aos grânulos.

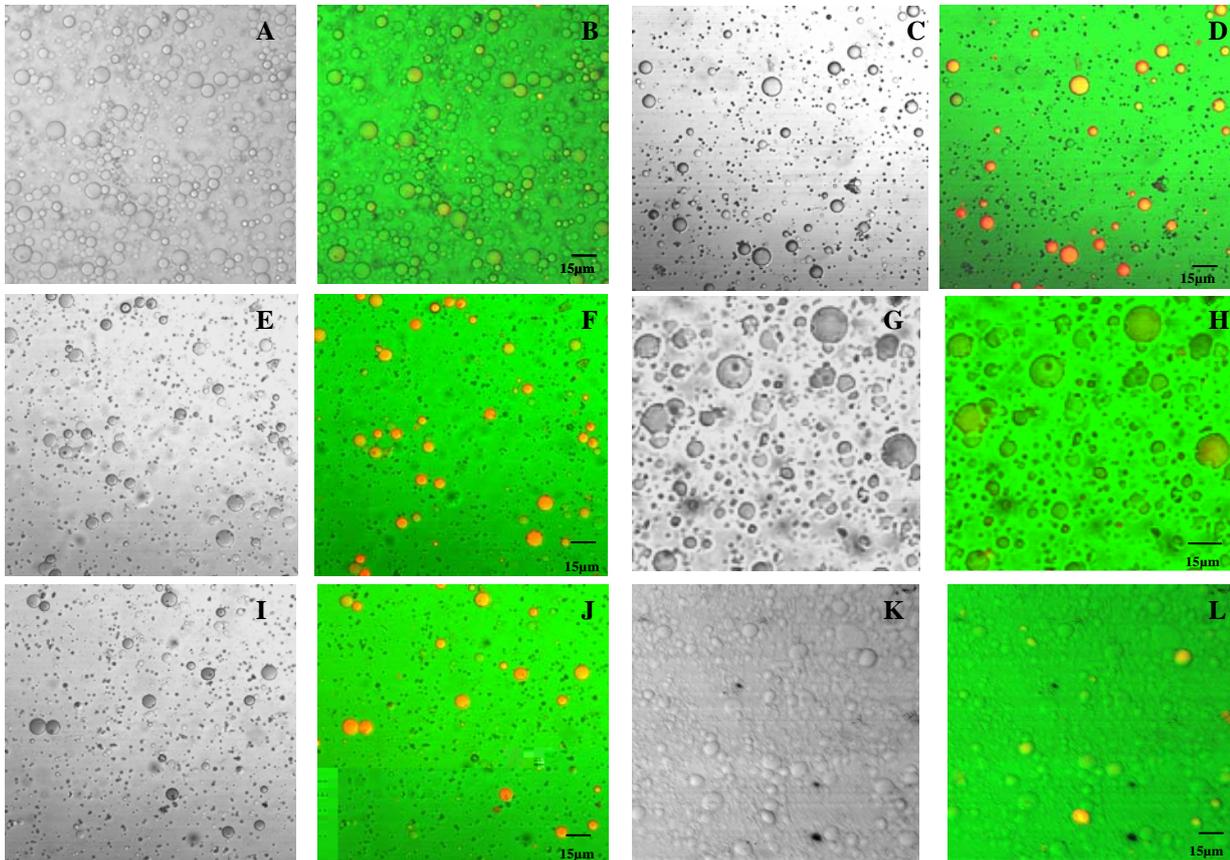


**Figura 24: Efeito do PPI no bombeamento de prótons para o interior de vesículas de ootecas de *P. americana*:** Frações de grânulos de vitelo (0,2 mL) foram adicionadas ao meio de reação contendo o tampão KCl 130 mM,  $\text{MgSO}_4$  2 mM, EGTA 50  $\mu\text{M}$  e HEPES 10 mM (pH 7.2) e LA 3  $\mu\text{M}$  como indicado na figura. PPI (0,1 mM na curva *a* e 0,3 mM na curva *b*) e  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 mM foram adicionados onde indicado pelas setas.

### V.10. Acidificação de Grânulos de Vitelo de ovos de *R. prolixus*

A fim de verificar se a enzima capaz de realizar a hidrólise de PPi nos ensaios enzimáticos discutidos previamente (**Figuras 10 – 15**) e também reconhecida pelo anticorpo anti-H<sup>+</sup>-PPase de planta (**Figuras 21 – 23**) era capaz de acoplar esta hidrólise ao transporte de prótons monitoramos a acidificação dos grânulos de vitelo através da utilização de Laranja de Acridina (LA). Como descrito em Materiais e Métodos, quando presente em vesículas com pH neutro ou alcalino a LA emite fluorescência em comprimento de onda que é percebido como cores variando do verde ao amarelo. No entanto, uma vez encontrada em ambientes ácidos a LA essas tonalidades variam do laranja ao vermelho. A **Figura 25** mostra a variação de pH no interior dos grânulos de vitelo a partir da hidrólise de PPi e ATP, além de apresentar o efeito de inibidores destas enzimas na acidificação destas organelas. Como pode ser observado na imagem **25B**, quando adicionamos apenas a suspensão de grânulos e LA encontramos grânulos com pH próximo a neutralidade ou levemente ácidos. Ao aguardarmos 10 minutos após adição de PPi notamos intensa acidificação dos grânulos (**25D**) e o mesmo também pode ser notado após tratamento com ATP (**25F**). No entanto, se procedermos a uma pré-incubação destes grânulos com NaF (inibidor das H<sup>+</sup>-PPases), mesmo após adição de PPi não ocorre acidificação destes compartimentos (**25H**). Através da imagem **25J**, onde os grânulos foram incubados inicialmente com um potente inibidor de H<sup>+</sup>-ATPases (bafilomicina) e depois com o substrato para H<sup>+</sup>-PPases, podemos concluir que a hidrólise de PPi ocorre independentemente da atividade das H<sup>+</sup>-ATPases. Por fim, notamos uma forte depleção da acidificação

proveniente da hidrólise de PPi quando os grânulos eram pré-incubados com o mesmo anticorpo anti-H<sup>+</sup>-PPases usado nas imunolocalizações (25L).



**Figura 25: Acidificação dos grânulos de vitelo de *R. prolixus*:** A suspensão de grânulos foi preparada conforme descrito em Materiais e Métodos. As imagens **A**, **C**, **E**, **G**, **I** e **K** são micrografias de contraste de fase correspondentes às imagens de fluorescência **B**, **D**, **F**, **H**, **J** e **L**, respectivamente. Os grânulos foram incubados na presença de LA 5 µg/ml, PPI 0,3 mM (ou ATP 1 mM) e diferentes compostos como será descrito adiante. **A** e **B**: Controle (sem adição de PPI); **C** e **D**: PPI; **E** e **F**: ATP; **G** e **H**: NaF 10mM e PPI; **I** e **J**: bafilomicina 15 nM e PPI; **K** e **L**: anti- H<sup>+</sup>-PPases de planta (1:100) e PPI.

### V.11. Acidificação de Grânulos de Vitelo de ovos de *P. americana*

A acidificação dos grânulos de vitelo promovida pela hidrólise do PPi também foi monitorada em grânulos de vitelo de *P. americana*, da mesma forma que em *R. prolixus*. Como podemos observar na **Figura 26B**, grânulos de vitelo não incubados com PPi se encontram neutros. No entanto, após a adição do substrato da enzima (PPi), podemos notar a acidificação de alguns grânulos (**26D**). A incubação prévia dos grânulos com NaF inibe a acidificação destes compartimentos (**26F**). O que podemos notar com o conjunto dos dados obtidos neste experimento é que a acidificação proveniente da hidrólise do PPi é feita de forma bastante pontual. Apenas grânulos pequenos (de cerca de 1  $\mu\text{m}$ ) são acidificados (seta na **Figura 26B**) e mesmo assim não são todos os grânulos deste tamanho que se tornam ácidos após adição de PPi (cabeça de seta na **Figura 26B**). Estes resultados sugerem que a distribuição das H<sup>+</sup>-PPases é feita de forma específica nas vesículas presentes nos ovos, indicando possivelmente uma especialização destes compartimentos.

F F r a ç ã o e s d e g r â n u l o

correspondents as imagens de fluorescência B, D e F, respectivamente. Barra 15µm. **A e B** –

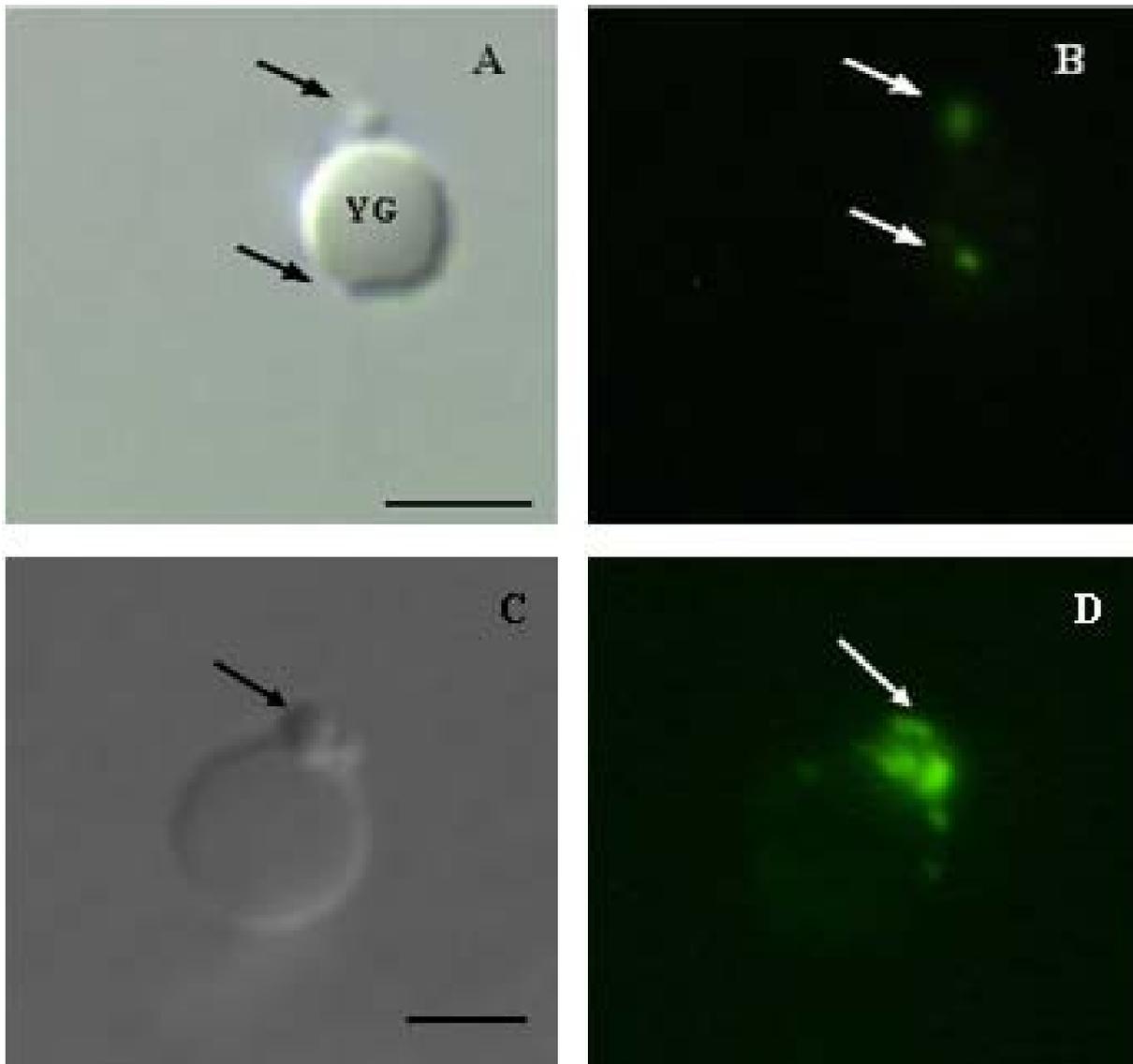
Controle: grânulos foram incubados apenas com LA. **C e D** – Após incubação com LA os

grânulos foram incubados por 10 minutos com 0,3 mM PPI. **G r â n u l o**

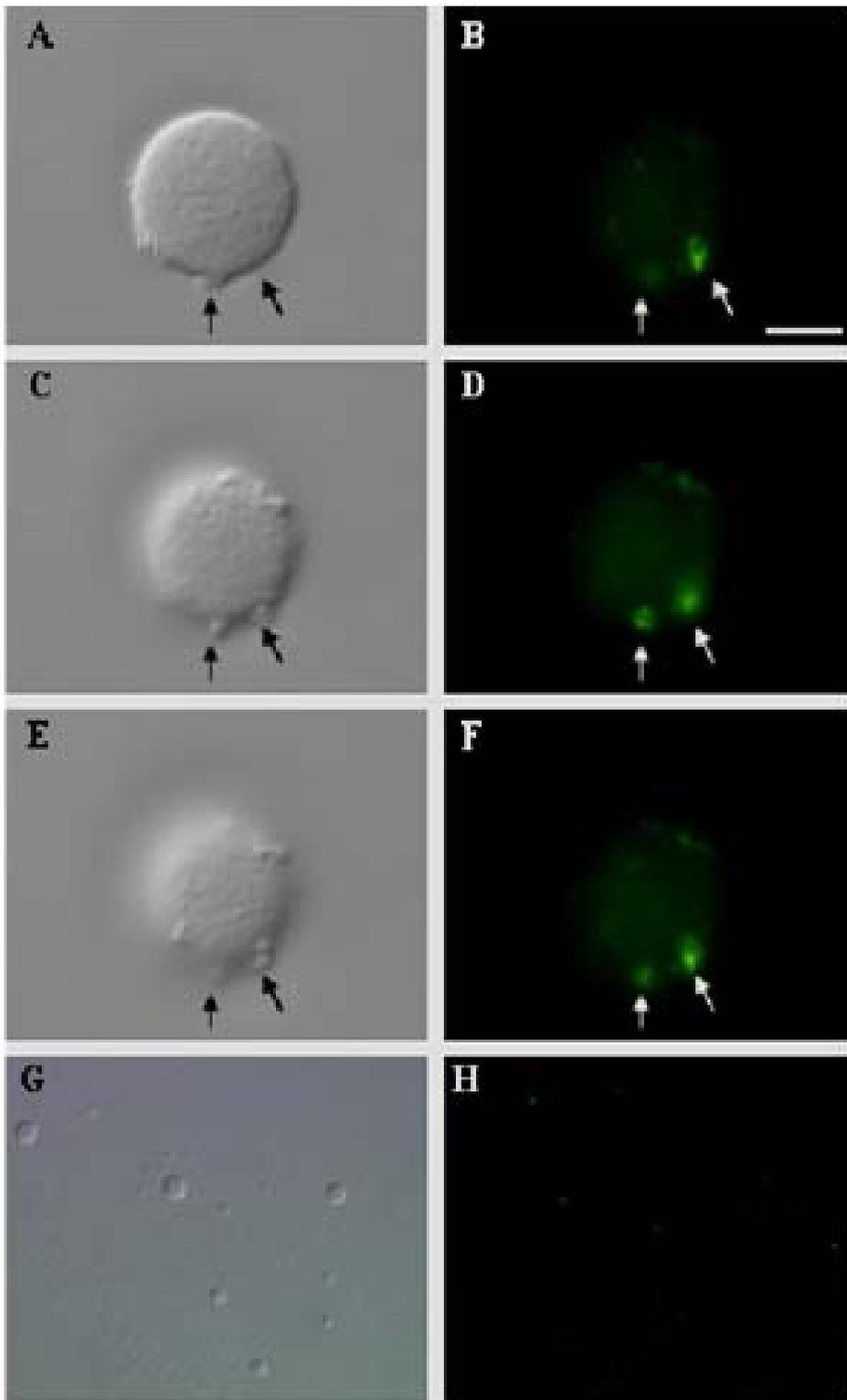
**o incubado por mais 10 minutos com LA 0,3 mM** i n u t o s c o m

## V.12. Imunofluorescência

A fim de investigar se realmente há uma distribuição heterogênea e específica das H<sup>+</sup>-PPases nos grânulos de vitelo, conforme nos sugerem os resultados apresentados nas **Figuras 25 e 26**, realizamos ensaios de imunofluorescência indireta em suspensões de grânulos de vitelo de *P. americana* (**Figura 27 A e B**) e *R. prolixus* (**Figuras 27 C e D e 28**). Para ambas as amostras, o grupo controle foi processado sem incubação com o anticorpo primário e não encontramos fluorescência em nenhum dos campos observados (dados não apresentados). Como era esperado, a fluorescência proveniente do anticorpo secundário não foi observada em todos os grânulos presentes na suspensão de *P. americana* (**Figura 27 A e B**). Como podemos verificar (**27B**), vesículas muito pequenas (menores que 1 µm) foram identificadas pelo anticorpo, indicando a presença da enzima na membrana destas estruturas, enquanto que grânulos maiores não foram positivos para a presença da proteína. Em grânulos de *R. prolixus* observamos resultados muito semelhantes (**Figura 27 C e D e 28**): a marcação fluorescente foi observada em grânulos menores que 1 µm (**27 D e 28 B, D e F**). A **Figura 28** foi realizada a fim de melhor visualizarmos os grânulos marcados com fluorescência, visto que o ajuste da imagem num foco que fosse capaz de observar claramente os grânulos dos diferentes tamanhos não era possível. Nesta figura, constatamos facilmente que as regiões marcadas pela fluorescência na membrana dos maiores grânulos (**28B**) correspondem perfeitamente aos pequenos grânulos observados em **28C** e E. Em conjunto, estas imagens confirmam a hipótese de que a H<sup>+</sup>-PPase se distribui preferencialmente em grânulos de aproximadamente 1 µm.



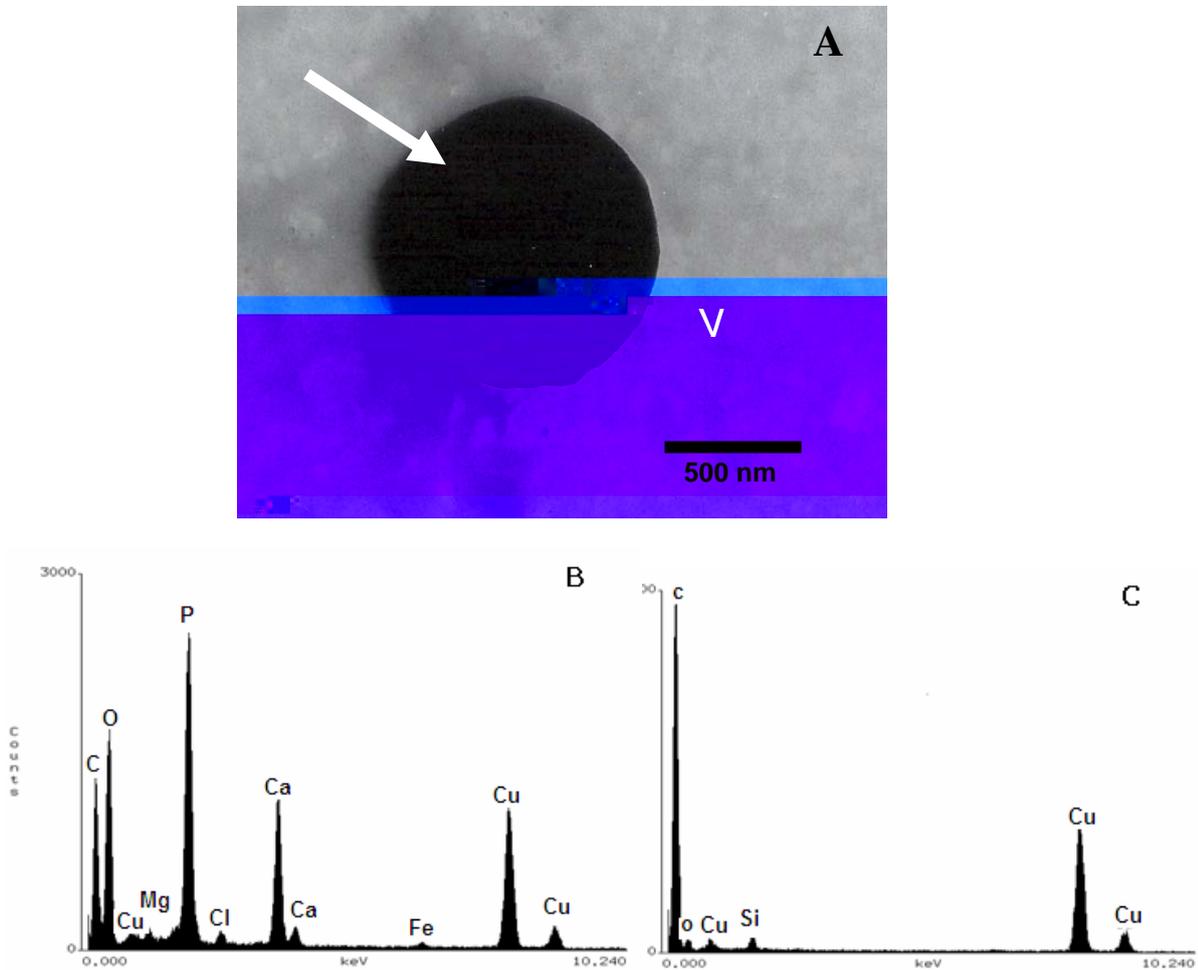
**Figura 27: Imunolocalização de  $H^+$ -PPase em grânulos de *P. Americana* e *R. prolixus* –** As imagens **A** e **C** são micrografias de contraste interferencial diferencial (DIC), correspondentes as imagens de fluorescência **B** e **D**, respectivamente. Barra 3  $\mu$ m. **A** e **B**: *P. americana*; **C** e **D**: *R. prolixus*. O experimento foi realizado como descrito em Materiais e Métodos. Setas: pequenas vesículas onde a  $H^+$ -PPase está presente.



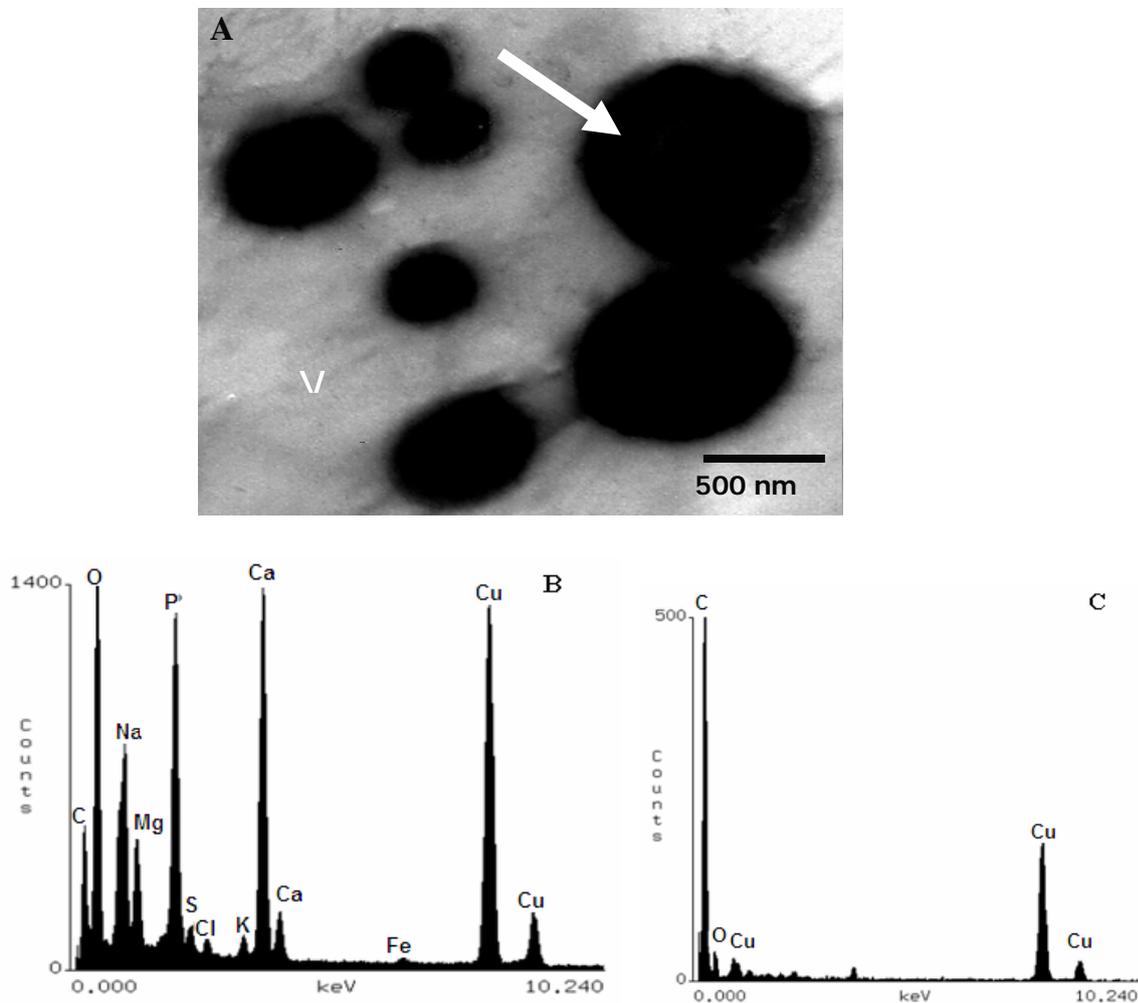
**Figura 28: Imunolocalização de H -PPase em grânulos de *R. prolixus*** – As imagens **A**, experimento foi realizado da mesma forma que o anterior. **A a F** – Experimentais incubados com anticorpo anti-H

### V.13. Análise do Conteúdo de Elementos Químicos presentes nos Grânulos Pequenos

O fato da H<sup>+</sup>-PPase estar distribuída de maneira específica no grânulos de vitelo tanto de *R. prolixus* quanto de *P. americana*, nos arremeteu a especulação da natureza dos grânulos de vitelo em geral e dos pequenos grânulos em específico. Como discutido na Introdução desta tese, H<sup>+</sup>-PPases são encontradas em organelas de reserva de macromoléculas - como nos proteoplastos vegetais - e também em vesículas com alto conteúdo de microelementos - como nos acidocalcissomos de protozoários. Nesta última organela as H<sup>+</sup>-PPases são utilizadas como marcadores específicos já que se encontram concentradas nestas estruturas. Acidocalcissomos são organelas ácidas inicialmente destacadas pela alta concentração de cálcio no seu interior. Atualmente, nos diferentes tipos celulares onde são encontrados, os acidocalcissomos são amplamente descritos também pelo alto conteúdo de fósforo, magnésio, sódio e outros elementos encontrados em menor proporção (potássio, ferro, cloro, etc). A fim de identificar os elementos contidos nos grânulos de vitelo com tamanhos equivalentes àqueles onde a H<sup>+</sup>-PPase estava presente, realizamos análises de espectro de emissão de raio-X de acordo com o que foi descrito em Materiais e Métodos. Encontramos resultados semelhantes em *R. prolixus* (**Figura 29**) e *P. americana* (**Figura 30**). Nos pequenos grânulos de *R. prolixus* encontramos grande quantidade de oxigênio, fósforo e cálcio e quantidades menores de magnésio, cloro e ferro (**29B**). Já no grânulo de *P. americana* foram altos os picos correspondentes aos elementos oxigênio, fósforo, cálcio, sódio e magnésio, enquanto que enxofre, cloro, potássio e ferro foram detectados em menores proporções (**30B**).



**Figura 29:** Análise do conteúdo de microelementos presentes vesículas de ovos de *R. prolixus* com aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ . **A** - grânulo submetido ao feixe de elétrons observado em microscópio eletrônico. **B** - espectro de microanálise de raio-X do grânulo observado em A. **C** - espectro do controle realizado próximo ao grânulo (apontado pela cabeça de seta em A). Os picos de cobre são provenientes da grade utilizada para suportar a amostra.



**Figura 30: Análise do conteúdo de microelementos presentes vesículas de ovos de *P. americana* com aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ . A - grânulo submetido ao feixe de electrons observado em microscópio eletrônico. B - espectro de microanálise de raio-X do grânulo observado em A. C - espectro do controle realizado próximo ao grânulo (apontado pela cabeça de seta em A).**

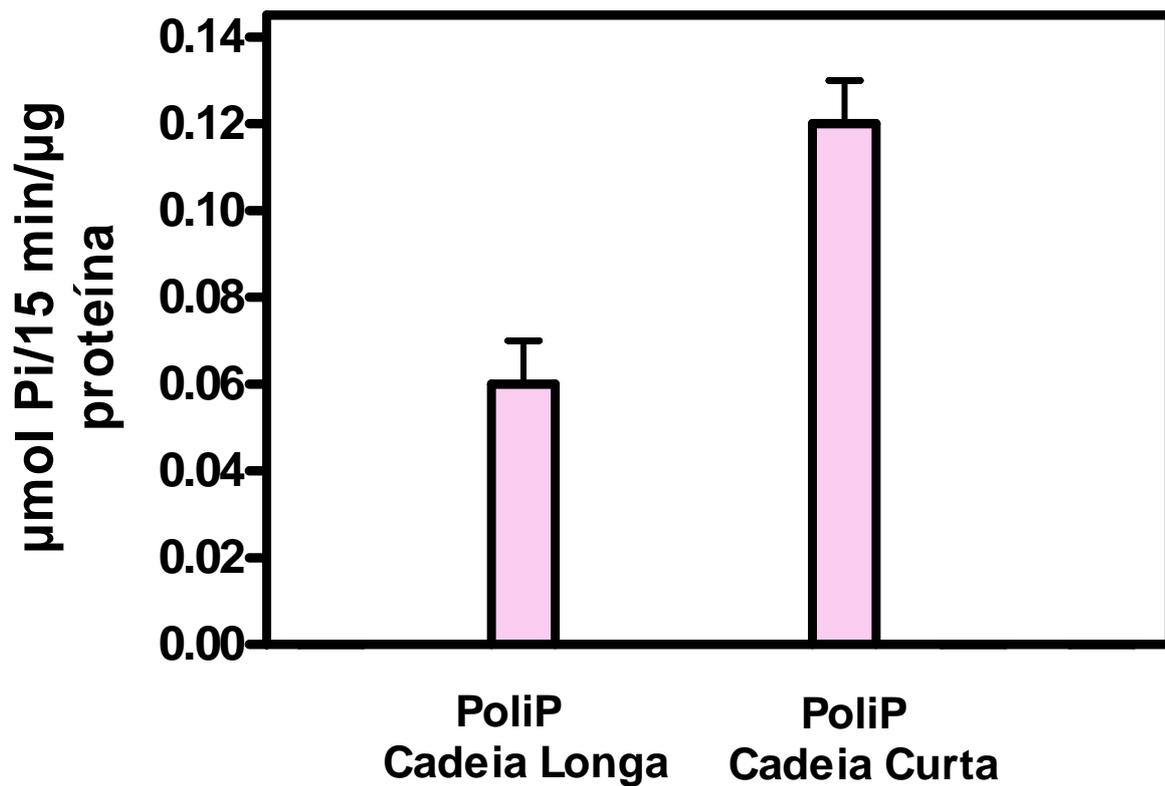
Os picos de cobre são provenientes da grade utilizada para suportar a amostra.

#### V.14. Dosagem de Polifosfato em Vesículas Presentes em Suspensões de Grânulos de *R. prolixus* e *P. americana*

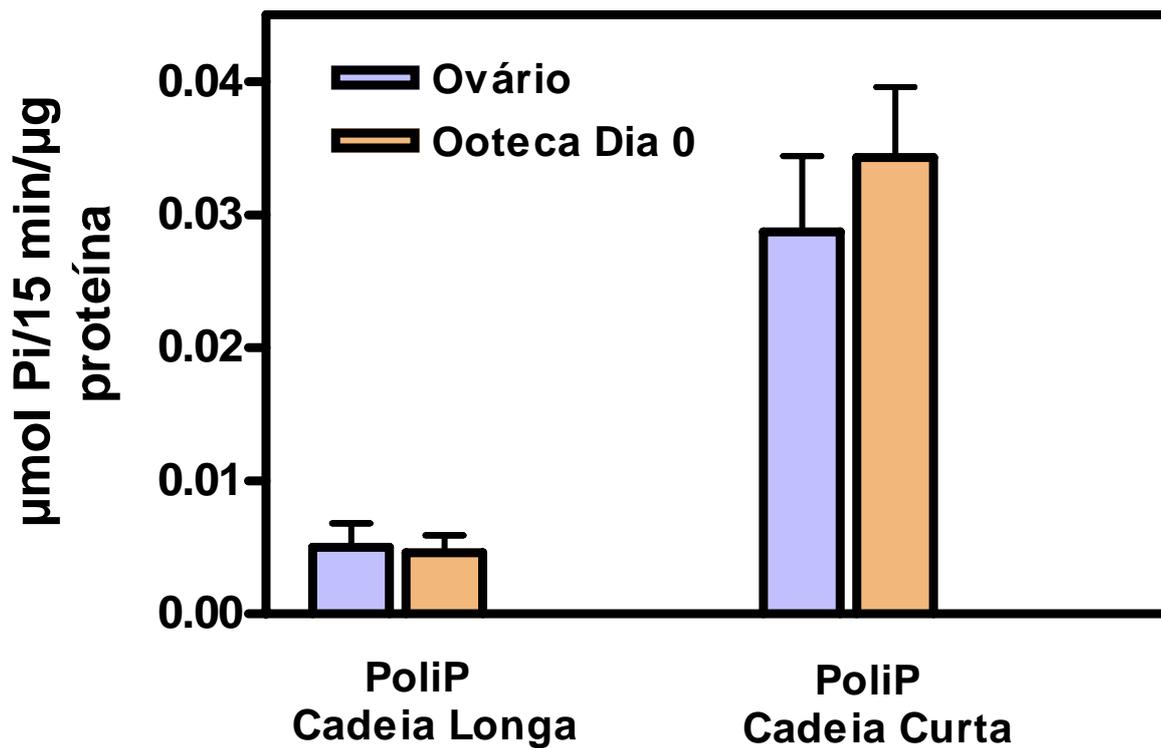
Para verificar se parte do fosfato identificado no interior dos grânulos de vitelo (Figuras 29B e 30B) está complexado na forma de polifosfato, como ocorre em acidocalcissomos de diferentes organismos, realizamos exatidão e d[ 1

a destes organismos está diretamente relacionada a alcalinização dos acidocalcissomos e degradação de PoliP (RUIZ *et al.*, 2001b). Desta forma, a acidificação desta organela promove a síntese de PoliP e a entrada de cálcio para o

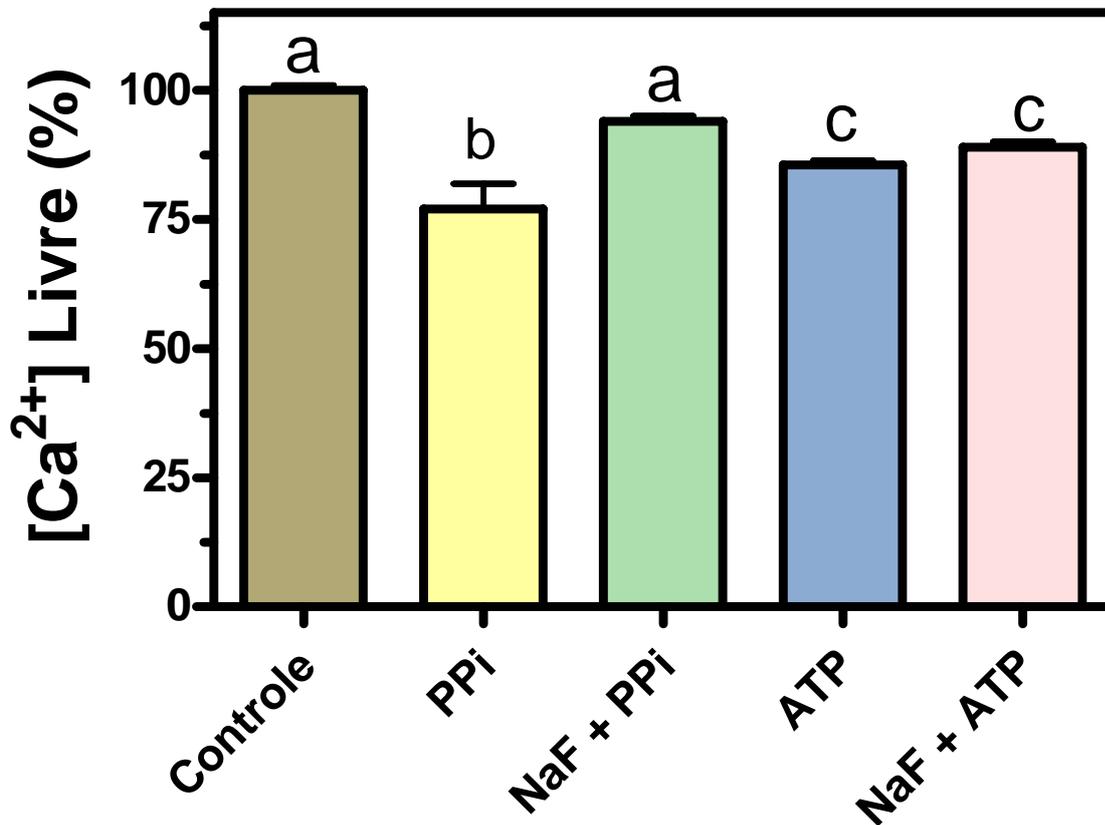
lúmen desta vesícula. Para verificar se a captação de cálcio pelos grânulos de *P. americana* está relacionado a acidificação destes compartimentos a partir da hidrólise do PPI, realizamos um ensaio de medição da variação de cálcio livre a partir de medidas das mudanças no espectro de absorbância do Arsenazo, como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados apresentados na **Figura 33** mostram que a quantidade de cálcio livre foi reduzida em aproximadamente 25% quando PPI foi adicionado (■). Diminuição da quantidade de cálcio também ocorreu na presença de ATP (■). No entanto, quando adicionamos NaF ao meio de reação 5 minutos antes da adição de PPI, esta reduç



**Figura 31: Dosagem de Polifosfato em ovos de *R. prolixus*:** O conteúdo de PoliP cadeias curta e longa foi determinado em ovos de *R. prolixus* após extração desta molécula conforme descrito em Materiais e Métodos. A quantidade de PoliP presente neste tecido foi expressa em µmoles de Pi liberados por 15 minutos em cada µg de proteína após incubação da amostra com exopolifosfatase recombinante (3000 à 5000 unidades).



**Figura 32: Dosagem de Polifosfato em ovário e ooteca de 0 dias de *P. americana*:** O conteúdo de PoliP cadeias curta e longa foi determinado em ovário e ovos de *P. americana* após extração desta molécula como descrito em Materiais e Métodos. A quantidade de PoliP foi expressa em  $\mu\text{moles}$  de Pi liberados por 15 minutos em cada  $\mu\text{g}$  de proteína após incubação da amostra com exopolifosfatase recombinante (3000 à 5000 unidades).



**Figura 33: Dosagem de Cálcio Livre na Suspensão de Grânulos de Ootecas de 0 Dias de *P. americana*:** A medida da variação da concentração de cálcio livre foi inferida pela variação da absorvância do Arsenazo. O meio de reação utilizado continha KCl 130 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, EGTA 50 µM, HEPES 10 mM (pH 7.2) e Arsenazo 4 µM. A concentração de cálcio tida como controle foi determinada após adição de 0,1 mL da suspensão de grânulos (■). As demais concentrações foram obtidas após tratamentos com diferentes compostos, como mostra a figura, considerando como 100% a quantidade de cálcio presente imediatamente antes da adição do referido reagente.

Letras iguais indicam valores estatisticamente semelhantes. Teste t ( $P < 0,05$ ).

## VI- DISCUSSÃO

O pirofosfato (PPi) é uma molécula produzida principalmente como subproduto de reações anabólicas e a hidrólise deste composto faz com que estas reações sejam termodinamicamente favoráveis. Sua degradação pode ser realizada por PPases

podemos citar a deficiência de nutrientes - incluindo o fosfato - em vegetais e a exposição a ambientes extremos, no caso da

necessitam para sobrevivência, o que justificaria a retenção, ao longo da evolução, da habilidade de gerar energia a partir da quebra de uma molécula simples e abundante como o PPi (JIANG *et al.*, 2001).

Na maioria dos organismos onde está presente, o papel desempenhado por esta enzima ainda é pouco conhecido, mas existem fortes evidências de que a presença das  $H^+$ -PPases esteja associada à função de armazenamento desempenhada pelas estruturas onde elas se encontram. Em vegetais superiores, por exemplo,  $H^+$ -PPases foram caracterizadas em vacúolos proteináceos que têm como principal função disponibilizar sua reserva protéica durante a germinação (MAESHIMA *et al.*, 1994b; HOH *et al.*, 1995; SUZUKI *et al.*, 1999; JIANG *et al.*, 2001). Em protozoários, a presença desta bomba de prótons em acidocalcissomos também pode estar contribuindo com a regulação da osmolaridade, utilização de  $Ca^{2+}$ , polímeros de fosfato (polifosfatos) e com a regulação do pH citosólico (DOCAMPO e MORENO, 2001; LEMERCIER *et al.*, 2004).

Durante a germinação de sementes e em tecidos jovens de alguns vegetais, como pêra e feijão, ocorre um grande número de reações anabólicas, que contribuem com intensa liberação de PPI. Nestes casos pode-se observar que a atividade  $H^+$ -PPásica é bastante superior àquela promovida pela hidrólise do ATP (SHIRATAKE *et al.*, 1997) e que quando as reações biossintéticas diminuem, com a maturidade do vegetal, as  $H^+$ -ATPases tornam-se as bombas de próton mais abundantes (NAKANISHI *et al.*, 2002). Este processo pode, então, ser comum a outros tecidos em desenvolvimento durante o crescimento de outros organismos, como é o caso do desenvolvimento embrionário de insetos.

Em se tratando do desenvolvimento de insetos, a principal organela encontrada nos ovos nas fases iniciais da embriogênese é o grânulo de vitelo. Estes compartimentos desempenham papel fundamental no armazenamento e,

posteriormente, na disponibilização do vitelo ao embrião em desenvolvimento. A regulação precisa da utilização do vitelo é essencial para fornecer nutrientes no momento adequado para o desenvolvimento dos tecidos e garantir a sobrevivência do embrião até que ele possa sair do ovo e buscar alimento por si só (FAGOTTO, 1995). Tem sido observado em diversas espécies, tanto em invertebrados quanto em vertebrados, que durante a formação dos ovos ocorre armazenamento nos grânulos de vitelo não só das proteínas, mas também das enzimas que as hidrolisarão, como diferentes proteases. Como estas últimas são geralmente estocadas como pró-enzimas, algum fator deve atuar na ativação destas enzimas no momento em que elas se fazem necessárias. Estas pró-enzimas, na maioria dos casos onde foram caracterizadas se tornam ativas geralmente em pH ácido. Então, a acidificação dos grânulos de vitelo pode ser o sinal que desencadeia o processo de disponibilização do vitelo para o embrião (GIORGI *et al.*, 1999). De fato, a relação entre a acidificação dos grânulos e a degradação do vitelo já foi reportada em diversas espécies (NORDIN *et al.*, 1991; SILVA-NETO *et al.*, 1996), porém, até a publicação do nosso artigo em 2004 (ANEXO I), a acidificação de compartimentos celulares em células animais era atribuída exclusivamente a  $H^+$ -ATPases e trocadores de  $H^+$ .

Dentro deste contexto, o trabalho desenvolvido durante o meu doutoramento teve como objetivo principal caracterizar  $H^+$ -PPases em duas espécies de insetos (*Rhodnius prolixus* e *Periplaneta americana*) a fim de proporcionar uma maior compreensão do metabolismo energético realizado no interior do ovo durante principalmente os estágios iniciais da embriogênese destes insetos, onde o PPi gerado pelas reações biossintéticas pode estar sendo utilizado pelas  $H^+$ -PPases como fonte de

energia para o transporte de prótons para o interior dos grânulos e conseqüente mobilização do vitelo.

Inicialmente em *R. prolixus* observamos a presença de H<sup>+</sup>-ATPases em microsossomos originados de membranas totais de ovos (**Figura 09**). O fato da hidrólise do ATP, em frações de membrana, ocorrer conjuntamente com a hidrólise do PPi nos chamou atenção, já que a hidrólise de PPi em células animais era exclusivamente atribuída às PPases solúveis. De fato, a enzima responsável pela hidrólise do PPi nestas frações de membrana de ovos e também de ovários de *R. prolixus*, bem como em frações de membrana de ovos de *P. americana* possuem características semelhantes àquelas já descritas para esta enzima em outras espécies.

Em frações de membrana de ovário e ovos de *R. prolixus* e de ovos de *P. americana*, o pH ótimo observado para a atividade enzimática foi em torno do fisiológico: 7,5 (**Figuras 11 e 16**). A hidrólise de PPi em pH neutro por uma enzima associada à membrana de compartimentos ácidos sugere a presença de sítios catalíticos voltados para o citoplasma da célula, como acontece em feijão (TAKASU *et al.*, 1997). Como observado para todas as PPases, podemos notar claramente a dependência do íon Mg<sup>2+</sup> para a atividade da enzima tanto em *R. prolixus* (**Figura 12**), quanto em *P. americana* (**Figura 17**). A concentração deste cofator onde a hidrólise de PPi foi máxima (próxima à 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>) é a mesma observada para H<sup>+</sup>-PPase de feijão (MAESHIMA 1989) e outros organismos (MAESHIMA, 2000). PPases nos dois insetos se mostraram mais sensíveis a cálcio que a enzima comumente descrita em plantas (MAESHIMA, 1991). Em *R. prolixus*, a enzima, tanto em ovo quanto em ovário foi capaz de manter apenas 10% de sua atividade na presença de 0,1 mM de

$\text{CaCl}_2$  (**Figura 13**), enquanto que a enzima de barata se mostrou mais resistente a inibição por este cátion (**Figura 18**). Se associarmos este resultado ao fato de que não houve alteração da atividade da enzima pela presença de potássio ( $\text{K}^+$ ) em nossas preparações (dados não mostrados), podemos sugerir que a enzima de insetos se assemelha àquele segundo tipo de  $\text{H}^+$ -PPases (AVP2) encontrado em vegetais, bactérias, arqueobactérias e *P. falciparum*. Outros inibidores característicos de  $\text{H}^+$ -PPase utilizados para a caracterização das enzimas dos insetos foram o fluoreto (**Figuras 14 e 19**) e o IDP (**Figuras 15 e 20**) e em nossas frações de membrana ambos se mostraram bastante eficientes. A PPase em *R. prolixus* e *P. americana*, quando comparada a enzima de parasitas, mostrou-se bem mais sensível ao fluoreto do que  $\text{H}^+$ -PPases encontradas em outros organismos.

Em *Typanosoma cruzi*, agente causador da Doença de Chagas, uma  $\text{H}^+$ -PPase presente em acidocalcissomos tem sua atividade totalmente inibida a KF 5,0 mM (MARTINEZ *et al.*, 2002b). Já em *Toxoplasma gondii* NaF 2,0 mM inibiu 60% da atividade  $\text{H}^+$ -PPásica (RODRIGUES, 2000). Esta inibição também é observada em diversas  $\text{H}^+$ -PPases de células vegetais (JIANG *et al.*, 2001) e levedura (POHJANJOKI *et al.*, 2001). O imidodifosfato (IDP), também foi bastante eficiente na inibição das PPases de *R. prolixus* e *P. americana* (**Figuras 15 e 20**). A inibição de  $\text{H}^+$ -PPases causada pelo IDP, assim como a inibição causada pelos outros inibidores (como cálcio e fluoreto), varia bastante entre os diferentes organismos onde a enzima já foi descrita. Em *Plasmodium berghei berghei*, por exemplo, este inibidor inibe apenas 60% da hidrólise de PPI quando presente na concentração de 0,2 mM (MARCHESINI *et al.*, 2000), enquanto que na alga *Chlamydomonas reinhardtii*, esta

mesma concentração provoca redução de aproximadamente 90% da atividade da enzima (RUIZ *et al.*, 2001a). Não podemos afirmar se as diferenças nos índices de inibição causados pelos diferentes inibidores em frações de membrana de *R. prolixus* e *P. americana* são de fato um reflexo de modificações moleculares sofridas por estas enzimas ao longo da evolução divergente da mesma nos dois insetos ou se ela se deve apenas a variações na disponibilidade do PPi para sua ligação a enzima, já que esta molécula é capaz de formar um grande número de complexos metálicos em solução aquosa (LEIGH *et al.*, 1992).

Uma dificuldade enfrentada durante a caracterização bioquímica desta enzima foi a variação nos níveis de atividade específica encontrada nas amostras. Independente de utilizarmos sempre a mesma massa tecidual inicial para a realização da preparação de membranas, ao final dos ensaios da atividade enzimática obtínhamos valores para atividade específica bastante variáveis. Mesmo quando duas amostras diferentes eram preparadas simultaneamente e testadas exatamente sob as mesmas condições, os resultados das atividades específicas não eram os mesmos. Nas nossas amostras, acreditamos que esta variação é fruto de variações individuais dos tecidos utilizados nas diferentes preparações.

Em diferentes espécies de ovíparos já foi demonstrado que macromoléculas sintetizadas pelos tecidos maternos, principalmente o tecido ovariano, são transferidas para o ovócito em crescimento e atuam de maneira crucial durante o desenvolvimento do embrião. Dentre estas moléculas podemos citar RNAs que estão relacionados, dentre outras funções, a padronização dos eixos dorso-ventral e antero-posterior do embrião (GILBERT, 2000) e proteínas que atuam como reservas nutricionais e

também como enzimas envolvidas com a degradação do vitelo (OLIVEIRA, 1989; RIBOLA, 2001, FAUSTO, 2001). A transferência destas moléculas pela mãe é extremamente importante principalmente nas primeiras etapas do desenvolvimento embrionário, visto que neste momento o embrião ainda não é capaz de assumir a síntese destas substâncias. Em *R. prolixus*, além de medirmos a hidrólise do PPi em ovos postos, utilizamos a mesma abordagem em ovários e pudemos observar que as enzimas presentes em ambos os tecidos possuem características bioquímicas muito semelhantes, sugerindo que a enzima encontrada nos ovos deste inseto seja produzida pela mãe e então captada pelo ovócito em desenvolvimento. Em *P. americana*, no entanto, a composição química da ooteca, de alguma forma, impossibilitou a preparação de frações de membrana a partir desta estrutura e a análise bioquímica foi realizada apenas em ovócitos. Contudo, considerando os resultados obtidos através das experiências de imunolocalização e acidificação (**Figuras 26 e 27 A e B**), é muito provável que, assim como em *R. prolixus*, a PPase presente nos ovos seja àquela observada nos ovócitos.

Através da utilização de um anticorpo policlonal contruído a partir de uma região conservada da H<sup>+</sup>-PPase da planta *A. thaliana*, fomos capazes de identificar nas frações de membrana de ovo de *R. prolixus* um polipeptídeo com massa molecular de aproximadamente 65 kDa, que estava presente na periferia dos grânulos de vitelo deste inseto e também em grânulos de vitelo de *P. americana*. A obtenção de reação cruzada entre a proteína de inseto e o anticorpo produzido contra a proteína de plantas sugere que a enzima presente em *R. prolixus* e *P. americana* possua regiões que foram conservadas ao longo da evolução destas espécies.

Em *P. americana* o transporte de prótons proveniente da hidrólise do PPi demonstrou-se dependente da concentração do substrato (**Figura 24**). Em frações de grânulos de vitelo obtidos de ootecas de 0 dia, a variação da absorbância da LA em função da acidificação dos grânulos foi muito sutil (dados não apresentados) talvez porque neste momento da embriogênese, a maior parte dos grânulos que se tornam ácidos são grânulos de diâmetro muito pequeno (**Figura 26D**). No entanto, foi possível observar a acidificação em ootecas de 2 dias. Nestes grânulos a acidificação foi aumentada substancialmente quando aplicamos a mesma concentração de substrato (0,3 mM) que utilizamos nos ensaios enzimáticos anteriores e concentrações superiores a estas não provocaram variação no nível de acidificação (dados não mostrados). A adição de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  provocou a alcalinização dos grânulos e conseqüente saída da LA destes compartimentos ratificando que a variação da absorbância da LA foi provocada pela acidificação dos grânulos.

A variação das propriedades químicas da LA em decorrência do pH também foi utilizada para a observação da acidificação dos grânulos de vitelo em função da hidrólise do PPi. Em frações de grânulos de vitelo de *R. prolixus* e *P. americana* a adição de PPi foi responsável pela acidificação de alguns grânulos de vitelo (**Figuras 25D e 26D**, respectivamente). Porém de forma bastante clara, a acidificação destes compartimentos não foi difundida para todos os grânulos. Estes resultados mostraram pela primeira vez em células de metazoários, que  $\text{H}^+$ -PPases coexistem com  $\text{H}^+$ -ATPases nestas vesículas e que o bombeamento de  $\text{H}^+$  realizado pelas  $\text{H}^+$ -PPases é independente da atividade  $\text{H}^+$ -ATPásica (**Figuras 25F e 25J**, respectivamente). A presença de  $\text{H}^+$ -PPases e  $\text{H}^+$ -ATPase atuando em conjunto na acidificação de

compartimentos já foi descrita para diferentes organismos (SHIRATAKE, 1997). A razão de existirem dois sistemas de transporte bombeando o mesmo íon para o mesmo compartimento intracelular ainda não foi totalmente esclarecido. Uma resposta simples é que  $H^+$ -PPases utilizam a energia livre do pirofosfato, que é um subproduto, enquanto reciclam o fosfato. Embora a pirofosfatase solúvel simplesmente dissipe a energia livre da hidrólise do pirofosfato termicamente, a  $H^+$ -PPase conserva esta energia formando um gradiente de prótons. Tal conservação de energia pode não ser crítica sobre condições metabólicas ótimas, mas pode ser vital sob condições de estresse, tais como anóxia, quando o suprimento normal de ATP é drasticamente reduzido (CARYSTINOS *et al.*, 1995). Considerando que o desenvolvimento dos insetos no interior do ovo é um processo que leva a síntese abundante de macromoléculas, incluindo ácidos nucleicos que são necessários para a formação de novas células através de mitoses, a presença de  $H^+$ -PPases nos grânulos de vitelo neste momento específico pode representar uma alternativa interessante. Neste momento, o ATP certamente tem sua demanda aumentada pelas inúmeras reações anabólicas que estão ocorrendo, enquanto que o PPi está sendo produzido em grande quantidade pela mesma razão. Então, seria extremamente econômico se a fonte de energia para a acidificação dos grânulos e conseqüente ativação das proteases fosse a hidrólise PPi e do ATP e não apenas a do ATP.

Além da acidificação dos grânulos em decorrência da hidrólise do PPi, os resultados apresentados nas **Figuras 25 e 26**, principalmente nesta última, nos proporcionaram uma outra observação. Sem dúvida, a acidificação dos grânulos presentes nas amostras testadas não parece ser randômica. Se observarmos

principalmente a **Figura 26D**, vemos que apesar de existirem grânulos dos mais variados tamanhos, apenas os grânulos pequenos (com aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ ) se tornam ácidos após a adição do PPI. Além disso, se observarmos com mais cautela vemos que na mesma imagem existem inúmeros grânulos com o mesmo tamanho destes que não foram acidificados. Tais observações podem indicar uma especialização dos grânulos de vitelo, com uma distribuição específica das  $\text{H}^+$ -PPases nas membranas dos mesmos. A fim de confirmarmos nossa hipótese incubamos esses grânulos de vitelo com o anticorpo anti- $\text{H}^+$ -PPase de planta e em seguida com um anticorpo secundário ligado a fluoresceína. Como foi mostrado nas **Figuras 27 e 28** a enzima foi localizada exatamente nos grânulos de vitelo pequenos, sugerindo que as  $\text{H}^+$ -PPases estão distribuídas especificamente na membrana dos grânulos de vitelo, preferencialmente na membrana dos grânulos pequenos. Além disso, estas pequenas vesículas, em praticamente todos os campos observados estavam presentes nas proximidades dos maiores grânulos. Como demonstrado em *D. melanogaster* (GIORGI *et al.*, 1999) grânulos de vitelo muitas vezes são vistos associados à pequenas vesículas, e durante a degradação do vitelo, estas vesículas se encontram no interior deste grânulos. A relação entre os pequenos e grandes grânulos de vitelo de *R. prolixus* e *P. americana* pode ser semelhante ao observado em *D. melanogaster*.

Esses resultados nos remeteram diretamente aos acidocalcissomos de protozoários, visto que  $\text{H}^+$ -PPases têm sido consideradas moléculas marcadoras desta organela (RODRIGUES *et al.*, 1999; RUIZ *et al.*, 2001a; LEMERCIER *et al.*, 2002). Os acidocalcissomos, também encontrados em outras espécies não-protistas, estão envolvidos com diferentes funções indispensáveis a vida destes parasitos, como a

regulação do pH intracelular e o armazenamento de micronutrientes. A composição destes micronutrientes no interior desta organela já foi determinada em vários organismos, e os elementos majoritários são oxigênio, sódio, potássio e principalmente fósforo e cálcio (SCOTT, 1997 e 2000). Grande parte deste fosfato se encontra na forma de polifosfato e este polímero está envolvido na complexação de cálcio, sendo então a hidrólise do polifosfato parcialmente responsável pela liberação deste cátion no citoplasma da célula.

Nesta tese, mostramos que grânulos de vitelo de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  contidos em ovos de *R. prolixus* e *P. americana* possuem composição química bastante semelhante àquela presente nos acidocalcissomos, indicando que os pequenos grânulos de vitelo, podem ser estruturas análogas a esta organela. Outra informação interessante que podemos obter através da análise das **Figuras 29 e 30** é que diferente do que se espera de um grânulo de vitelo, estas pequenas vesículas devem possuir funções outras que não o armazenamento de proteínas, visto que enxofre não foi detectado nos grânulos de *R. prolixus* e foi encontrado em concentrações extremamente baixas em *P. americana*. O mesmo resultado é encontrado nos acidocalcissomos de protozoários (ROHLOFF *et al.*, 2003). Porém a ausência de fracionamento destes pequenos grânulos não nos permitiu definir qual o percentual destas organelas apresenta uma estrutura “acidocalcissomo-like”. Nestas espécies e em outros ovíparos onde já foi demonstrada a separação espacial da acidificação e presença de proteases inativas (FAUSTO, 2001), estas pequenas vesículas poderiam, ser responsáveis pela acidificação inicial que posteriormente é responsável pela

degradação do vitelo, o que é perfeitamente justificável pela presença específica das  $H^+$ -PPases nestas vesículas.

Além da composição de elementos químicos dos grânulos pequenos ser bastante semelhante àquela dos acidocalcissomos, detectamos grande quantidade de polifosfato presente tanto em ovos de *R. prolixus* quanto em ovário e ooteca de *P. americana*. Nesta última espécie o conteúdo de polifosfato presente em um ovário é igual àquele presente em uma ooteca, resultado que sugere que a síntese deste polímero ocorre ainda antes da fecundação e não requer, portanto, a participação do embrião. Apesar de o polifosfato ser uma molécula ubíqua, ainda não havia sido considerado a sua presença em ovos de insetos. Desta forma, o estoque de fosfato no interior dos grânulos tem sido atribuído a proteínas fosforiladas que já foram encontradas em todas as espécies estudadas. Contudo, a demonstração de que existem polímeros com grande quantidade de fosfato no interior dos grânulos de ovos de insetos abre novas perspectivas para o entendimento do metabolismo deste elemento, que é de fundamental importância pra todos os seres vivos. No caso dos grânulos de ovos de *P. americana*, por exemplo, este polímero parece estar envolvido também com a variação na concentração de cálcio livre presente nestes ovos, assim como ocorre em protozoários. Em protozoários, a liberação de cálcio do interior do acidocalcissomo está diretamente relacionada à hidrólise de polifosfato de cadeia curta e longa, o que ocorre quando há alcalinização desta organela (RUIZ *et al.*, 2001b). Desta forma, a síntese de polifosfato em decorrência da acidificação da organela é responsável pela retenção de cálcio no interior da mesma, como observamos nos nossos ensaios. Através da análise destes dados, podemos concluir que a diminuição do pH no interior

dos grânulos está diretamente relacionada à diminuição da concentração de cálcio do lado de fora destas vesículas. Encontramos resultados semelhantes em *P. americana* (**Figura 33**) e a regulação da concentração de cálcio fora dos grânulos, regulada pela síntese e degradação do polifosfato, pode ser responsável por eventos posteriores de fusão dos diferentes grânulos (por exemplo, grânulos ácidos não protéicos com grânulos ricos em proteínas de vitelo e hidrolases inativas). A união destas diferentes estruturas pode ser o evento que inicia a ativação das proteases e que leva à degradação do vitelo e, sendo assim, a acidificação iniciada pelas  $H^+$ -PPases nos grânulos de menor diâmetro pode enfim desencadear o processo de proteólise nos grânulos maiores.

A caracterização da  $H^+$ -PPase em *R. prolixus* forneceu dados bastante consistentes para a publicação de um artigo científico (**ANEXO 1**) que apresentou a primeira evidência para a presença de  $H^+$ -PPases associadas à membrana de organelas de células animais. Os outros resultados apresentados nesta tese sugerem uma especialização dos diferentes grânulos de vitelo presentes em ovos de *R. prolixus* e *P. americana* e estão sendo utilizados na elaboração de um manuscrito que se encontra em fase final de preparação. Dentre estas estruturas, algumas estariam envolvidas com o armazenamento de macromoléculas a serem degradadas para a formação dos tecidos embrionários e outras seriam responsáveis pelo armazenamento de micronutrientes e/ou com a acidificação responsável pela ativação das enzimas encarregadas da hidrólise do vitelo. Atuando em conjunto estes grânulos poderiam então realizar de forma coordenada a mobilização do vitelo, propiciando o adequado desenvolvimento dos embriões de insetos.

## VII- CONCLUSÕES

- Existe uma atividade  $H^+$ -PPásica associada à acidificação de compartimentos subcelulares em células animais;
- As propriedades cinéticas das  $H^+$ -PPases em membranas de ovários e ovos de *Rhodnius prolixus* e *Periplaneta americana* estão de acordo com resultados encontrados em diferentes espécies de plantas, bactérias e protozoários.
- O reconhecimento de um único polipeptídeo nas membranas de ovos de *Rhodnius prolixus* por um anticorpo anti- $H^+$ -PPase de planta sugere que possa existir uma similaridade entre as enzimas de inseto e vegetal;
- $H^+$ -PPases de *R. prolixus* e *P. americana* estão localizadas nas membranas de organelas dos ovos destes animais, onde em conjunto com uma  $H^+$ -ATPases são capazes de promover a acidificação destes compartimentos;
- $H^+$ -PPases, tanto em *R. prolixus* quanto em *P. americana*, parecem estar preferencialmente localizadas em grânulos pequenos (até 10  $\mu m$ );
- Grânulos pequenos de *R. prolixus* e *P. americana*, possuem um conteúdo elementar semelhante ao encontrado em acidocalcissomos de protozoários e outros organismos;
- Ovários e ovos de *R. prolixus* e *P. americana* possuem polifosfato de cadeias curta e longa;
- A acidificação dos grânulos está relacionada à captação de cálcio por estas organelas.

## VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L. A.; VALLE, D.; MANSO, P. P.; FACANHA, A. R.; PELAJOMACHADO, M.; MASUDA, H.; MASUDA, A.; VAZ, I., JR.; LENZI, H.; OLIVEIRA, P. L.; LOGULLO, C. Proteolytic activity of *Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.34, p.443-449, 2004.

ANDERSON, R. G.; ORCI, L. A view of acidic intracellular compartments. **Journal of Cell Biology**, v.106, p.539-543, 1988.

ANDERSON, E. Oocyte Differentiation and Vitellogenesis in the Roach *Periplaneta americana*. **Journal of Cell Biology**, v.20, p.131-155, 1964.

AULT-RICHE, D.; FRALEY, C. D.; TZENG, C. M.; KORNBERG, A. Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.1841-1847, 1998.

BALTSCHIEFFSKY, M.; NYREN, P. Membrane-bound inorganic pyrophosphatase. **Progress in Clinical and Biological Research**, v.164, p.199-207, 1984.

BALTSCHIEFFSKY, M.; NADANACIVA, S.; SCHULTZ, A. A pyrophosphate synthase gene: molecular cloning and sequencing of the cDNA encoding the inorganic pyrophosphate synthase from *Rhodospirillum rubrum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1364, p.301-306, 1998.

BAYKOV, A. A.; ALEXANDROV, A. P.; SMIRNOVA, I. N. A two-step mechanism of fluoride inhibition of rat liver inorganic pyrophosphatase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.294, p.238-243, 1992.

BAYKOV, A. A.; BAKULEVA, N. P.; REA, P. A. Steady-state kinetics of substrate hydrolysis by vacuolar H<sup>(+)</sup>-pyrophosphatase. A simple three-state model. **European Journal of Biochemistry**, v.217, p.755-762, 1993a.

BAYKOV, A. A.; DUBNOVA, E. B.; BAKULEVA, N. P.; EVTUSHENKO, O. A.; ZHEN, R. G.; REA, P. A. Differential sensitivity of membrane-associated pyrophosphatases to inhibition by diphosphonates and fluoride delineates two classes of enzyme. **FEBS Letters**, v.327, p.199-202, 1993b.

BENZ, R.; MCLAUGHLIN, S. The molecular mechanism of action of the proton ionophore FCCP (carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone). **Biophysical Journal**, v.41, p.381-398, 1983.

BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Dynamics of vacuolar compartmentation. **Annual Review of Plant Physiology**, v.37, p.137-164, 1986.

BÜNING, J. **The Insect Ovary**. Chapman & Hall 1<sup>a</sup> ed. (Londres) v.c. 1, p.p. 1, 1994.

CARYSTINOS, G. D.; MACDONALD, H. R.; MONROY, A. F.; DHINDSA, R. S.; POOLE, R. J. Vacuolar H<sup>(+)</sup>-translocating pyrophosphatase is induced by anoxia or chilling in seedlings of rice. **Plant Physiology**, v.108, p.641-649, 1995.

CASTRO, C. D.; MEEHAN, A. J.; KORETSKY, A. P.; DOMACH, M. M. In situ <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance for observation of polyphosphate and catabolite responses of chemostat-cultivated *Saccharomyces cerevisiae* after alkalization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.4448-4453, 1995.

CASTRO, C. D.; KORETSKY, A. P.; DOMACH, M. M. NMR-observed phosphate trafficking and polyphosphate dynamics in wild-type and *vph1-1* mutant *Saccharomyces cerevisiae* in response to stresses. **Biotechnology Progress**, v.15, p.65-73, 1999.

CHANSON, A.; FICHMANN, J.; SPEAR, D.; TAIZ, L. Pyrophosphate-Driven Proton Transport by Microsomal Membranes of Corn Coleoptiles. **Plant Physiology**, v.79, p.159-164, 1985.

CHANSON, A. Use of the pyrophosphatase activity as a reliable tonoplast marker in maize roots. **Plant Science**, v.71, p.199-207, 1990.

CHAPMAN, R. F. **The Insects**. 3<sup>a</sup> ed., Harvard, 1982.

CHO, W.L., DEITSCH, K.W., RAIKHEL, A.S. An extraovarian protein accumulated in mosquito oocytes is a carboxypeptidase activated in embryos. **Proceedings of the National Academics of Science in U S A** v. 88, 10821-10824, 1991.

DARLEY, C. P.; DAVIES, J. M.; SANDERS, D. Chill-Induced Changes in the Activity and Abundance of the Vacuolar Proton-Pumping Pyrophosphatase from Mung Bean Hypocotyls. **Plant Physiology**, v.109, p.659-665, 1995.

DEBBOUN, M.; GREEN, T. J.; RUEDA, L. M.; HALL, R. D. Relative abundance of tree hole-breeding mosquitoes in Boone County, Missouri, USA, with emphasis on the vector potential of *Aedes triseriatus* for canine heartworm, *Dirofilaria immitis* (Spirurida: Filariidae). **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.21, p.274-278, 2005.

DENBURG, J. L.; FULOP, Z. Formation of the leg neuromuscular system in embryos of the cockroach, *Periplaneta americana*: I. Light microscope studies. . **The Journal of Experimental Zoology.**, v.219, p.323-328, 1982.

DI SANSEBASTIANO, G. P.; PARIS, N.; MARC-MARTIN, S.; NEUHAUS, J. M. Specific accumulation of GFP in a non-acidic vacuolar compartment via a C-terminal propeptide-mediated sorting pathway. **Plant Journal**, v.15, p.449-457, 1998.

DI SANSEBASTIANO, G. P.; PARIS, N.; MARC-MARTIN, S.; NEUHAUS, J. M. Regeneration of a lytic central vacuole and of neutral peripheral vacuoles can be visualized by green fluorescent proteins targeted to either type of vacuoles. **Plant Physiology**, v.126, p.78-86, 2001.

DOCAMPO, R.; SCOTT, D. A.; VERCESI, A. E.; MORENO, S. N. Intracellular Ca<sup>2+</sup> storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal**, v.310 (Pt 3), p.1005-1012, 1995.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. Acidocalcisome: A novel Ca<sup>2+</sup> storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. **Parasitology Today**, v.15, p.443-448, 1999.

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. The acidocalcisome. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.114, p.151-159, 2001.

DROZDOWICZ, Y. M., Y. P. LU, et al. "A thermostable vacuolar-type membrane pyrophosphatase from the archaeon *Pyrobaculum aerophilum*: implications for the origins of pyrophosphate-energized pumps." **FEBS Lett** **460**(3): 505-12, 1999.

DROZDOWICZ, Y. M., J. C. KISSINGER, et al.. "AVP2, a sequence-divergent, K(+)-insensitive H(+)-translocating inorganic pyrophosphatase from *Arabidopsis*." **Plant Physiology** **123**(1): 353-62, 2000.



development in the stick insect *Carausius morosus*. **Cell and Tissue Research**, v.305, p.433-443, 2001.

FIALHO, E., SILVEIRA, A.B., MASUDA, H., SILVA-NETO, M.A.C. Oocyte fertilization triggers acid phosphatase activity during *Rhodnius prolixus* embryogenesis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, 871-880, 2002.

FISKE, C. F.; SUBBAROW, Y. The Colorimetric Determination of Phosphorus . **Journal of Biological Chemistry**, p.375-400, 1925.

GARESSE, R.; PERONA, R.; MARCO, R.; VALLEJO, C. G. The unmasking of proteolytic activity during the early development of *Artemia salina*. Identification of a precursor after hatching. **European Journal of Biochemistry**, v.106, p.225-231, 1980.

GEUZE, H. J.; SLOT, J. W.; STROUS, G. J.; LODISH, H. F.; SCHWARTZ, A. L. Intracellular site of asialoglycoprotein receptor-ligand uncoupling: double-label immunoelectron microscopy during receptor-mediated endocytosis. **Cell**, v.32, p.277-287, 1983.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. 6<sup>a</sup> ed., Sinauer, 2000.

GIORGI, F.; BRADLEY, J. T.; NORDIN, J. H. Differential Vitellin Polypeptide Processing in Insect Embryos. **Micron**, v.30, p.579-596, 1999.

GORDON-WEEKS, R.; STEELE, S. H.; LEIGH, R. A. The Role of Magnesium, Pyrophosphate, and Their Complexes as Substrates and Activators of the Vacuolar H<sup>+</sup>-Pumping Inorganic Pyrophosphatase (Studies Using Ligand Protection from Covalent Inhibitors). **Plant Physiology**, v.111, p.195-202, 1996.

GRAY, M. W. Organelle origins and ribosomal RNA. **Biochemistry and Cell Biology**, v.66, p.325-348, 1988.

HEMING, B. S.; HUEBNER, E. Development of the Germ Cells and Reproductive Primordia in Male and Female Embryos of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). **Canadian Journal of Zoology**, v.72, p.1100-1119, 1994.

HILL, J. E.; SCOTT, D. A., LUO, S. and DOCAMPO, R. Cloning and functional expression of a gene encoding a vacuolar-type proton-translocating pyrophosphatase from *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical Journal** 351(Pt 1): 281-8, 2000.

HOH, B.; HINZ, G.; JEONG, B. K.; ROBINSON, D. G. Protein storage vacuoles form de novo during pea cotyledon development. **Journal of Cell Science**, v.108 ( Pt 1), p.299-310, 1995.

IKEDA, M.; SATOH, S.; MAESHIMA, M.; MUKOHATA, Y.; MORITANI, C. A vacuolar ATPase and pyrophosphatase in *Acetabularia acetabulum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1070, p.77-82, 1991.

ISHMUKHAMETOV, R. R.; GALKIN, M. A.; VIK, S. B. Ultrafast purification and reconstitution of His-tagged cysteine-less *Escherichia coli* F1Fo ATP synthase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1706, p.110-116, 2005.

JIANG, L.; PHILLIPS, T. E.; HAMM, C. A.; DROZDOWICZ, Y. M.; REA, P. A.; MAESHIMA, M.; ROGERS, S. W.; ROGERS, J. C. The protein storage vacuole: a unique compound organelle. **Journal of Cell Biology**, v.155, p.991-1002, 2001.

KANG, Y.; KULAKOSKY, P. C.; VAN-ANTWERPEN, R.; LAW, J. H. Sequestration on Insecticyanin, a Blue Hemolymph Protein, Into Egg of the Hawkmoth *Manduca sexta*: Evidence for Receptor Mediated Endocytosis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.25, p.503-510, 1995.

KARLSSON, J. Membrane-bound potassium and magnesium ion-stimulated inorganic pyrophosphatase from roots and cotyledons of sugar beet (*Beta vulgaris* L). **Biochimica et Biophysica Acta**, v.399, p.356-363, 1975.

KASAI, M.; NAKAMURA, T.; KUDO, N.; SATO, H.; MAESHIMA, M.; SAWADA, S. The activity of the root vacuolar H<sup>(+)</sup>-pyrophosphatase in rye plants grown under conditions deficient in mineral nutrients. **Plant Cell Physiology**, v.39, p.890-894, 1998.

KAWOOYA, J. K.; OSIR, E. O.; LAW, J. H. Uptake of the major hemolymph lipoprotein and its transformation in the insect egg. **Journal of Biological Chemistry**, v.263, p.8740-8747, 1988.

KAY, H. D. Phosphatases of mammalian tissues II. Pyrophosphatase. **Biochemical Journal**, v.22, p.1446-1448, 1928.

KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**, v.23, p.1-18, 1999.

KUCERA, M.; TURNER, R. B. Purification and Properties of Protease Inhibitors from Developing Embryos of *Hemileuca oliviae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.611, p.379-383, 1981.

KUK-MEIRI, S.; SHULOV, A.; LICHTHENSTEIN, N. Proteases of the Eggs of the Desert Locust (*Schistocerca gregaria* Förskal). **Bulletin of Research Council of Israel**, v.4, p.66-68, 1954.

KULAEV, I.; KULAKOVSKAYA, T. Polyphosphate and phosphate pump. **Annual Review of Microbiology**, v.54, p.709-734, 2000.

KUNKEL, J. G.; NORDIN, J. H. Yolk Proteins. **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v.1, p.83-111, 1985.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LANZETTA, P. A.; ALVAREZ, L. J.; REINACH, P. S.; CANDIA, O. A. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. **Analytical Biochemistry**, v.100, p.95-97, 1979.

LEFURGEY, A.; INGRAM, P.; BLUM, J. J. Elemental composition of polyphosphate-containing vacuoles and cytoplasm of *Leishmania major*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.40, p.77-86, 1990.

LEIGH, R. A.; POPE, A. J.; JENNINGS, I. R.; SANDERS, D. Kinetics of the Vacuolar H<sup>+</sup>-Pyrophosphatase: The Roles of Magnesium, Pyrophosphate, and their Complexes as Substrates, Activators, and Inhibitors. **Plant Physiology**, v.100, p.1698-1705, 1992.

LEMERCIER, G.; DUTOYA, S.; LUO, S.; RUIZ, F. A.; RODRIGUES, C. O.; BALTZ, T.; DOCAMPO, R.; BAKALARA, N. A vacuolar-type H<sup>+</sup>-pyrophosphatase governs maintenance of functional acidocalcisomes and growth of the insect and mammalian forms of *Trypanosoma brucei*. **Journal of Biological Chemistry**, v.277, p.37369-37376, 2002.

LEMERCIER, G.; ESPIAU, B.; RUIZ, F. A.; VIEIRA, M.; LUO, S.; BALTZ, T.; DOCAMPO, R.; BAKALARA, N. A pyrophosphatase regulating polyphosphate metabolism in acidocalcisomes is essential for *Trypanosoma brucei* virulence in mice. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.3420-3425, 2004.

LEMOS, A. A.; LEMOS, J. A.; PRADO, M. A.; PIMENTA, F. C.; GIR, E.; SILVA, H. M.; SILVA, M. R. Cockroaches as carriers of fungi of medical importance. **Mycoses**, v.49, p.23-25, 2006.

LICHTHENSTEIN, N.; BODENHEIMER, F. S.; SHULOV, A. Proteolytic Enzymes of Insects. II. Proteases of the Eggs of the Moroccan Locust (*Dociostaurus maroccanus* Thnbg). **Enzymologia**, v.13, p.276-280, 1949.

LOGULLO, C.; VAZ IDA, S.; SORGINE, M. H.; PAIVA-SILVA, G. O.; FARIA, F. S.; ZINGALI, R. B.; DE LIMA, M. F.; ABREU, L.; OLIVEIRA, E. F.; ALVES, E. W.; MASUDA, H.; GONZALES, J. C.; MASUDA, A.; OLIVEIRA, P. L. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. **Parasitology**, v.116 ( Pt 6), p.525-532, 1998.

LOTT, J. N.; SPITZER, E. X-ray analysis studies of elements stored in protein body globoid crystals of *Triticum* grains. **Plant Physiology**, v.66, p.494-499, 1980.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.

LUO, S.; MARCHESINI, N.; MORENO, S. N.; DOCAMPO, R. A plant-like vacuolar H<sup>(+)</sup>-pyrophosphatase in *Plasmodium falciparum*. **FEBS Letters**, v.460, p.217-220, 1999.

MACHADO, E.A. **Participação da Vitelogenina, Hemeproteína e Lipoforina na Formação de Ovócitos em *Rhodnius prolixus*: Um Estudo Imunocitoquímico.** 1992 60 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, 1992.

MACHADO, E. A.; OLIVEIRA, P. L.; MOREIRA, M. F.; DE SOUZA, W.; MASUDA, H. Uptake of *Rhodnius* heme-binding protein (RHBP) by the ovary of *Rhodnius prolixus*. **Arch Insect Biochem Physiol**, 39, 133-43, 1998

properties of vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase from mung bean. **Journal of**

vacuolar membranes during elongation of cells in mung bean hypocotyls. **Plant and Cell Physiology**, v.31, p.311-317, 1990a.

**and Biophysical Research Communications**, v.168, p.1157-1162, 1990b.

pyrophosphatases. **European Journal of Biochemistry**, v.196, p.11-17, 1991.

MAESHIMA, M. Vacuolar H<sup>(+)</sup>-pyrophosphatase.

MALLYA, S. K.; PARTIN, J. S.; VALDIZAN, M. C.; LENNARZ, W. J. Proteolysis of the major yolk glycoproteins is regulated by acidification of the yolk platelets in sea urchin embryos. **Journal of Cell Biology**, v.117, p.1211-1221, 1992.

MARCHESINI, N.; LUO, S.; RODRIGUES, C. O.; MORENO, S. N.; DOCAMPO, R. Acidocalcisomes and a vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase in malaria parasites. **Biochemical Journal**, v.347 Pt 1, p.243-253, 2000.

MARCHESINI, N.; RUIZ, F. A.; VIEIRA, M.; DOCAMPO, R. Acidocalcisomes are functionally linked to the contractile vacuole of *Dictyostelium discoideum*. **Journal of Biological Chemistry**, v.277, p.8146-8153, 2002.

MARICONI, F. A. M. **Insetos e Outros Invasores de Residências.**, FEALQ, 1999.

MARTINEZ, R.; WANG, Y.; BENAÏM, G.; BENCHIMOL, M.; DE SOUZA, W.; SCOTT, D. A.; DOCAMPO, R. A proton pumping pyrophosphatase in the Golgi apparatus and plasma membrane vesicles of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.120, p.205-213, 2002.

McINTOSH, M. T.; DROZDOWICZ, Y. M.; LAROIYA, K.; REA, P. A.; VAIDYA, A. B. Two classes of plant-like vacuolar-type H<sup>(+)</sup>-pyrophosphatases in malaria parasites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.114, p.183-195, 2001.

MCINTOSH, M. T.; VAIDYA, A. B. Vacuolar type H<sup>+</sup>-pumping pyrophosphatases of parasitic protozoa. **International Journal of Parasitology**, v.32, p.1-14, 2002.

MEDINA, M.; LEON, P.; VALLEJO, C. G. Drosophila cathepsin B-like proteinase: a suggested role in yolk degradation. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.263, p.355-363, 1988.

MEDINA, M.; VALLEJO, C. G. A Serine Proteinase in *Drosophila* Embryos: Yolk Degradation and Developmental Activation. **Insect Biochemistry**, v.19, p.687-691, 1989.

MICHELS, P. A.; CHEVALIER, N.; OPPERDOES, F. R.; RIDER, M. H.; RIGDEN, D. J. The glycosomal ATP-dependent phosphofructokinase of *Trypanosoma brucei* must have evolved from an ancestral pyrophosphate-dependent enzyme. **European Journal of Biochemistry**, v.250, p.698-704, 1997.

MIRANDA, K.; BENCHIMOL, M.; DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W. The fine structure of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v.86, p.373-384, 2000.

MORENO, S. N.; ZHONG, L. Acidocalcisomes in *Toxoplasma gondii* tachyzoites. **Biochemical Journal**, v.313 ( Pt 2), p.655-659, 1996.

MOTTA, L. S.; DA SILVA, W. S.; OLIVEIRA, D. M.; DE SOUZA, W.; MACHADO, E. A. A new model for proton pumping in animal cells: the role of pyrophosphate. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.34, p.19-27, 2004.

MUNYANEZA, J. E.; CROSSLIN, J. M.; UPTON, J. E. *Beet leafhopper* (Hemiptera: Cicadellidae) transmits the Columbia Basin potato purple top phytoplasma to potatoes, beets, and weeds. **Journal of Economic Entomology**, v.99, p.268-272, 2006.

NAKANISHI, Y.; SAIJO, T.; WADA, Y.; MAESHIMA, M. Mutagenic analysis of functional residues in putative substrate-binding site and acidic domains of vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. **Journal of Biological Chemistry**, 276, 7654-60, 2001

NAKANISHI, Y.; UEOKA-NAKANISHI, H.; YUASA, K.; MIMURA, H.; MAESHIMA, M. Calcium accumulation system and proton pumps in plant vacuoles. **Tanpakushitsu Kakusan Koso**, v.47, p.1777-1782, 2002.

NISHIMURA, M.; BEEVERS, H. Hydrolases in Vacuoles from Castor Bean Endosperm. **Plant Physiology**, v.62, p.44-48, 1978.

NORDIN, J. H.; BEAUDOIN, E. L.; LIU, X. D. Acidification of Yolk Granules in *Blattella germanica* Eggs Coincides with Proteolytic Processing of Vitellin. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.18, p.177-192, 1991.

NYREN, P.; NORE, B. F.; STRID, A. Proton-pumping N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-sensitive inorganic pyrophosphate synthase from *Rhodospirillum rubrum*: purification, characterization, and reconstitution. **Biochemistry**, v.30, p.2883-2887, 1991.

O'FARREL, P. H. High-resolution Two-dimensional Electrophoresis of Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, p.4007-4021, 1975.

OBERMEYER, G.; SOMMER, A.; BENTRUP, F. W. Potassium and voltage dependence of the inorganic pyrophosphatase of intact vacuoles from *Chenopodium rubrum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1284, p.203-212, 1996.

OLIVEIRA, P. L.; GONDIM, K. C.; GUEDES, D.; MASUDA, H. Uptake of yolk Protein in *Rhodnius prolixus*. **Journal of insect Physiology**, 32, 859-866, 1986

OLIVEIRA, P. L.; PETRETSKI, M. D. A.; MASUDA, H. Vitellin Processing and Degradation During Embryogenesis in *Rhodnius prolixus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 19, 489-498, 1989

OLIVEIRA, P. L.; KAWOoya, J. K.; RIBEIRO, J. M.; MEYER, T.; POORMAN, R.; ALVES, E. W.; WALKER, F. A.; MACHADO, E. A.; NUSSENZVEIG, R. H.; PADOVAN, G. J.; ET AL. A heme-binding protein from hemolymph and oocytes of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. Isolation and characterization. **Journal of Biological Chemistry**, 270, 10897-901, 1995

PAI, H. H.; KO, Y. C.; CHEN, E. R. Cockroaches (*Periplaneta americana* and *Blattella germanica*) as potential mechanical disseminators of *Entamoeba histolytica*. **Acta Tropica**, v.87, p.355-359, 2003.

PALMGREN, M. G. Acridine orange as a probe for measuring pH gradients across membranes: mechanism and limitations. **Analytical Biochemistry**, v.192, p.316-321, 1991.

PAPASSIDERI, I. S.; MARGARITIS, L. H. The eggshell of *Drosophila melanogaster*: IX. Synthesis and morphogenesis of the innermost chorionic layer. **Tissue and Cell**, v.28, p.401-409, 1996.

PERONA, R.; VALLEJO, C. G. The lysosomal proteinase of *Artemia*. Purification and characterization. **European Journal of Biochemistry**, v.124, p.357-362, 1982.

POHJANJOKI, P.; FABRICHIY, I. P.; KASHO, V. N.; COOPERMAN, B. S.; GOLDMAN, A.; BAYKOV, A. A.; LAHTI, R. Probing essential water in yeast pyrophosphatase by directed mutagenesis and fluoride inhibition measurements. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.434-441, 2001.

PURCELL, J. P.; QUINN, T. M.; KUNKEL, J. G.; NORDIN, J. H. Correlation of Yolk Phosphatase Expression with the Programmed Proteolysis of Vitellin in *Blattella germanica* During Embryonic Development. . **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.9, p.237-251, 1988.

RAIKHEL, A. S.; DHADIALLA, T. S. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. **Annual Review of Entomology**, v.37, p.217-251, 1992.

RASHID, M. H.; RUMBAUGH, K.; PASSADOR, L.; DAVIES, D. G.; HAMOOD, A. N.; IGLEWSKI, B. H.; KORNBERG, A. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*.

**Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.97, p.9636-9641, 2000.

REA, P. A.; BRITTEN, C. J.; JENNINGS, I. R.; CALVERT, C. M.; SKIERA, L. A.; LEIGH, R. A.; SANDERS, D. Regulation of Vacuolar H-Pyrophosphatase by Free Calcium : A Reaction Kinetic Analysis. **Plant Physiology**, 100, 1706-1715, 1992a

REA, P. A.; KIM, Y.; SARAFIAN, V.; POOLE, R. J.; DAVIES, J. M.; SANDERS, D. Vacuolar H<sup>(+)</sup>-translocating pyrophosphatases: a new category of ion translocase. **Trends in Biochemical Science**, 17, 348-53, 1992b

REA, P. A.; POOLE, R. J. Vacuolar H<sup>+</sup>-Translocating Pyrophosphatase. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 44, 157-80, 1993

REA, P. A.; SANDERS, D. Tonoplast energization: two H<sup>+</sup> pumps, one membrane. **Physiol. Plant**, 71, 131-41, 1987

REY, L. **Parasitologia**. 2<sup>a</sup> ed., Guanabara Koogan, 1991.

RIBOLLA, P. E.; BIJOVSKY, A. T.; DE BIANCHI, A. G. Procathepsin and acid phosphatase are stored in *Musca domestica* yolk spheres. **Journal of insect Physiology**, v.47, p.225-232, 2001.

RODRIGUES, C. O.; SCOTT, D. A.; DOCAMPO, R. Characterization of a vacuolar pyrophosphatase in *Trypanosoma brucei* and its localization to acidocalcisomes. **Molecular and Cellular Biology**, v.19, p.7712-7723, 1999a.

RODRIGUES, C. O.; SCOTT, D. A.; DOCAMPO, R. Presence of a vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase in promastigotes of *Leishmania donovani* and its localization to a different compartment from the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. **Biochemical Journal**, 340 ( Pt 3), 759-66, 1999b

RODRIGUES, C. O.; SCOTT, D. A.; BAILEY, B. N.; DE SOUZA, W.; BENCHIMOL, M.; MORENO, B.; URBINA, J. A.; OLDFIELD, E.; MORENO, S. N. Vacuolar proton pyrophosphatase activity and pyrophosphate (PPi) in *Toxoplasma gondii* as possible chemotherapeutic targets. **Biochemical Journal**, v.349 Pt 3, p.737-745, 2000.

RODRIGUES, C. O.; RUIZ, F. A.; VIEIRA, M.; HILL, J. E.; DOCAMPO, R. An acidocalcisomal exopolyphosphatase from *Leishmania major* with high affinity for short chain polyphosphate. **Journal of Biological Chemistry**, v.277, p.50899-50906, 2002.

RODRIGUEZ, N.; BAILEY, B. N.; MARTIN, M. B.; OLDFIELD, E.; URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Radical cure of experimental cutaneous leishmaniasis by the bisphosphonate pamidronate. **Journal of Infectious Disease**, v.186, p.138-140, 2002.

ROGERS, M. J.; WATTS, D. J.; RUSSELL, R. G.; JI, X.; XIONG, X.; BLACKBURN, G. M.; BAYLESS, A. V.; EBETINO, F. H. Inhibitory effects of bisphosphonates on growth of amoebae of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. **Journal of Bone and Mineral Research**, 9, 1029-39, 1994

ROHLOFF, P.; RODRIGUES, C. O.; DOCAMPO, R. Regulatory volume decrease in *Trypanosoma cruzi* involves amino acid efflux and changes in intracellular calcium. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.126, p.219-230, 2003.

ROHLOFF, P.; MONTALVETTI, A.; DOCAMPO, R. Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.52270-52281, 2004.

ROS, R.; ROMIEU, C.; GIBRAT, R.; GRIGNON, C. The plant inorganic pyrophosphatase does not transport K<sup>+</sup> in vacuole membrane vesicles multilabeled

with fluorescent probes for H<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and membrane potential. **Journal of Biological Chemistry**, 270, 4368-74, 1995

ROTH, T. F.; PORTER, K. R. Yolk Protein Uptake in the Oocyte of the Mosquito *Aedes aegypti*. L. **Journal of Cellular Biology**, v.20, p.313-332, 1964.

RUBENSTEIN, E. C. The role of an epithelial occlusion zone in the termination of vitellogenesis in *Hyalophora cecropia* ovarian follicles. **Developmental Biology**, v.71, p.115-127, 1979.

RUIZ, F. A.; MARCHESINI, N.; SEUFFERHELD, M.; GOVINDJEE; DOCAMPO, R. The polyphosphate bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* possess a proton-pumping pyrophosphatase and are similar to acidocalcisomes. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.46196-46203, 2001a.

RUIZ, F. A.; RODRIGUES, C. O.; DOCAMPO, R. Rapid changes in polyphosphate content within acidocalcisomes in response to cell growth, differentiation, and environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.26114-26121, 2001b.

RUIZ, F. A.; LEA, C. R.; OLDFIELD, E.; DOCAMPO, R. Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.44250-44257, 2004a.

RUIZ, F. A.; LUO, S.; MORENO, S. N.; DOCAMPO, R. Polyphosphate content and fine structure of acidocalcisomes of *Plasmodium falciparum*. **Microscopy Microanalysis**, v.10, p.563-567, 2004b.

RUSSEL, R. G.; ROGERS, M. J. Biphosphonates: from the Laboratory to the Clinic and Back Again. **Bone**, v.25, p.97-106, 1999.

SARAFIAN, V.; KIM, Y.; POOLE, R. J.; REA, P. A. Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump of *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.89, p.1775-1779, 1992.

SARINHO, E.; SCHOR, D.; VELOSO, M. A.; RIZZO, J. A. There are more asthmatics in homes with high cockroach infestation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.503-510, 2004.

SATO, M. H.; KASAHARA, M.; ISHII, N.; HOMAREDA, H.; MATSUI, H.; YOSHIDA, M. Purified vacuolar inorganic pyrophosphatase consisting of a 75-kDa polypeptide can pump H<sup>+</sup> into reconstituted proteoliposomes. **Journal of Biological Chemistry**, v.269, p.6725-6728, 1994.

SCARPA, A. Measurements of cation transport with metallochromic indicators. **Methods in Enzymology**, v.56, p.301-338, 1979.

SCOTT, D. A.; DOCAMPO, R.; DVORAK, J. A.; SHI, S.; LEAPMAN, R. D. In situ compositional analysis of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.28020-28029, 1997.

SCOTT, D. A.; DE SOUZA, W.; BENCHIMOL, M.; ZHONG, L.; LU, H. G.; MORENO, S. N.; DOCAMPO, R. Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.22151-22158, 1998.

SCOTT, D. A.; DOCAMPO, R. Characterization of isolated acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.24215-24221, 2000.

SEUFFERHELD, M.; VIEIRA, M. C.; RUIZ, F. A.; RODRIGUES, C. O.; MORENO, S. N.; DOCAMPO, R. Identification of organelles in bacteria similar to

acidocalcisomes of unicellular eukaryotes. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, p.29971-29978, 2003.

SEUFFERHELD, M.; LEA, C. R.; VIEIRA, M.; OLDFIELD, E.; DOCAMPO, R. The H<sup>(+)</sup>-pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum* is predominantly located in polyphosphate-rich acidocalcisomes. **Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.51193-51202, 2004.

SHINTANI, T.; UCHIUMI, T.; YONEZAWA, T.; SALMINEN, A.; BAYKOV, A. A.; LAHTI, R.; HACHIMORI, A. Cloning and expression of a unique inorganic pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*: evidence for a new family of enzymes. **FEBS Letters**, v.439, p.263-266, 1998.

SHIRATAKE, K.; KANAYAMA, Y.; MAESHIMA, M.; YAMAKI, S. Changes in H<sup>(+)</sup>-pumps and a tonoplast intrinsic protein of vacuolar membranes during the development of pear fruit. **Plant and Cell Physiology**, v.38, p.1039-1045, 1997.

SHULOV, A.; PENNER, M. P.; KUK-MEIRI, S.; LICHTHENSTEIN, N. Proteolytic Enzymes in Various Embryonic Stages of the Eggs of *Locusta migratoria migratorioides* (R&F). **Journal of insect Physiology**, v.1, p.279-285, 1957.

SILVA-NETO, M. A.; ATELLA, G. C.; FIALHO, E.; PAES, M. C.; ZINGALI, R. B.; PETRETSKI, J. H.; ALVES, E. W.; MASUDA, H. Isolation of a calcium-binding phosphoprotein from the oocytes and hemolymph of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.30227-30232, 1996.

SILVEIRA, A. C. **O Controle da Doença de Chagas nos Países do Conesul da América**. História de uma Iniciativa Internacional 1991/2001. 2002.

SNIGIREVSKAYA, E. S.; SAPPINGTON, T. W.; RAIKHEL, A. S. Internalization and recycling of vitellogenin receptor in the mosquito oocyte. **Cell and Tissue Research**, v.290, p.175-183, 1997.

STITT, M. Pyrophosphate as an energy donor in the cytosol of plant cells: an enigmatic alternative to ATP. **Botanica Acta**, v.111, p.167-175, 1998.

SUZUKI, Y.; MAESHIMA, M.; YAMAKI, S. Molecular cloning of vacuolar H<sup>(+)</sup>-pyrophosphatase and its expression during the development of pear fruit. **Plant and Cell Physiology**, v.40, p.900-904, 1999.

SZAJNMAN, S. H.; MONTALVETTI, A.; WANG, Y.; DOCAMPO, R.; RODRIGUEZ, J. B. Bisphosphonates derived from fatty acids are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v.13, p.3231-3235, 2003.

TAIZ, L. The Plant Vacuole. **Journal of Experimental Biology**, v.172, p.113-122, 1992.

TAKAHASHI, S. Y.; YAMAMOTO, Y.; SHIONOYA, Y.; KAGEYAMA, T. Cysteine proteinase from the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*: identification of a latent enzyme and characterization of activation and proteolytic processing in vivo and in vitro. **The Journal of Biochemistry**, v.114, p.267-272, 1993.

TAKASU, A.; NAKANISHI, Y.; YAMAUCHI, T.; MAESHIMA, M. Analysis of the substrate binding site and carboxyl terminal region of vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase of mung bean with peptide antibodies. **The Journal of Biochemistry**, v.122, p.883-889, 1997.

THYSSEN, P. J.; MORETTI TDE, C.; UETA, M. T.; RIBEIRO, O. B. The role of insects (*Blattodea*, *Diptera*, and *Hymenoptera*) as possible mechanical vectors of

helminths in the domiciliary and peridomiciliary environment. **Caderno de Saúde Pública**, v.20, p.1096-1102, 2004.

TURKEWITZ, A. P.; SCHWARTZ, A. L.; HARRISON, S. C. A pH-dependent reversible conformational transition of the human transferrin receptor leads to self-association. **Journal of Biological Chemistry**, v.263, p.16309-16315, 1988.

VALLE, D. Vitellogenesis in insects and other groups--a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.88, p.1-26, 1993.

VERCESI, A. E.; MORENO, S. N.; DOCAMPO, R.  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. **Biochemical Journal**, v.304 ( Pt 1), p.227-233, 1994.

VERCESI, A. E.; DOCAMPO, R. Sodium-proton exchange stimulates  $\text{Ca}^{2+}$  release from acidocalcisomes of *Trypanosoma brucei*. **Biochemical Journal**, v.315 ( Pt 1), p.265-270, 1996.

VERCESI, A. E.; GRIJALBA, M. T.; DOCAMPO, R. Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  release from *Trypanosoma brucei* acidocalcisomes by 3,5-dibutyl-4-hydroxytoluene: role of the  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  exchanger. **Biochemical Journal**, v.328 ( Pt 2), p.479-482, 1997.

VERCESI, A. E.; RODRIGUES, C. O.; CATISTI, R.; DOCAMPO, R. Presence of a  $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$  exchanger in acidocalcisomes of *Leishmania donovani* and their alkalization by anti-leishmanial drugs. **FEBS Letters**, v.473, p.203-206, 2000.

WALL, D. A.; MELEKA, I. An unusual lysosome compartment involved in vitellogenin endocytosis by *Xenopus* oocytes. **Journal of Cell Biology**, v.101, p.1651-1664, 1985.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v.51, p.221-271, 1987.

YAMAHAMA, Y.; UTO, N.; TAMOTSU, S.; MIYATA, T.; YAMAMOTO, Y.; WATABE, S.; TAKAHASHI, S. Y. In vivo activation of pro-form *Bombyx* cysteine protease (BCP) in silkworm eggs: localization of yolk proteins and BCP, and acidification of yolk granules. **Journal of insect Physiology**, v.49, p.131-140, 2003.

YAMAMOTO, Y.; TAKAHASHI, S. Y. Cysteine proteinase from *Bombyx eggs*: role in programmed degradation of yolk proteins during embryogenesis. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B**, v.106, p.35-45, 1993.

ZANCANI, M.; MACRI, F.; DAL BELIN PERUFFO, A.; VIANELLO, A. Isolation of the catalytic subunit of a membrane-bound  $H^{(+)}$ -pyrophosphatase from pea stem mitochondria. **European Journal of Biochemistry**, v.228, p.138-143, 1995.

ZHEN, R. G.; BAYKOV, A. A.; BAKULEVA, N. P.; REA, P. A. Aminomethylenediphosphonate: A Potent Type-Specific Inhibitor of Both Plant and Phototrophic Bacterial  $H^{+}$ -Pyrophosphatases. **Plant Physiology**, v.104, p.153-159, 1994.

ZHEN, R. G.; KIM, E. J.; REA, P. A. The Molecular and Biochemical Basis of Pyrophosphate-energized Proton Translocation at the Vacuolar Membrane. **Advances in Botanical Research**, v.25, p.297-337, 1997a.

ZHEN, R. G.; KIM, E. J.; REA, P. A. Acidic residues necessary for pyrophosphate-energized pumping and inhibition of the vacuolar  $H^{+}$ -pyrophosphatase by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.22340-22348, 1997b.

# ANEXO I

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)