

1- INTRODUÇÃO:

1.1- O carrapato e sua importância econômica

Os carrapatos são parasitos obrigatórios de grande parte dos vertebrados terrestres. Há 830 espécies de carrapatos distribuídas em três famílias principais: Argasidae com 170 espécies, Ixodidae, com 660 espécies e uma terceira família (Nuttalliellidae) que apresenta apenas uma espécie que vive na África. Todas as espécies descritas alimentam-se de sangue e durante este período transmitem uma grande variedade de agentes patogênicos (Norval *et al.*, 1991).

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini 1887; Acari: Ixodidae) (figura 1) é um ectoparasita hematófago originário da Ásia, cujo principal hospedeiro é o bovino. Encontra-se amplamente distribuído nos grandes rebanhos bovinos da América, África, Ásia e Oceania, entre os paralelos 32°N e 32°S (Jonsson *et al.*, 2000), sendo um dos principais parasitas que afetam a pecuária destas áreas. Seu desenvolvimento é favorecido pelas condições climáticas, principalmente temperatura e umidade elevadas (Jonsson *et al.*, 2000).



Figura 1: O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* parasitando seu hospedeiro, o boi (*Bos taurus*). Retirado de www.icb.usp.br/~marcelcp/Boophilus.htm.

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

O *R. microplus* acarreta diversos danos econômicos (Johnston, 1985), tornando-se o principal alvo de programas de controle e erradicação nos rebanhos da América do Sul (Nari, 1995). Um carrapato suga, em média, de 2 a 3 mL de sangue por dia do seu hospedeiro (Canal *et al.*, 1995) e isto se reflete em grandes perdas na produção de leite e de carne (Sutherst *et al.*, 1983), além de danos no couro causados por reações inflamatórias nos locais de fixação do carrapato (Seifert *et al.*, 1968). Este carrapato também pode atuar como vetor de doenças, como a tristeza parasitária bovina, causada por protozoários do gênero *Babesia* e pela rickétsia do gênero *Anaplasma* (Leal *et al.*, 2006).

Os métodos de controle do *R. microplus* baseiam-se, quase que exclusivamente, no uso de agentes químicos durante a fase parasitaria. Desta forma, apenas 5 % da população de carrapatos é afetada em uma propriedade rural. Além disso, a utilização deste método “tradicional” acontece de forma intensiva e desordenada. Estes produtos comerciais são aplicados de 12 a 24 vezes por ano (Leal *et al.*, 2006), acarretando prejuízos econômicos e favorecendo a seleção de carrapatos resistentes (Leal *et al.*, 2006). Além do risco de contaminação do leite, da carne, de intoxicação do manipulador, que pode até mesmo levá-lo à morte, danos consideráveis ao meio ambiente vêm sendo relatados com muita frequência (Leal *et al.*, 2006).

Estudos na Austrália estimam uma perda anual de 4 milhões de dólares na criação de gado, onde 49% deste prejuízo é devido aos custos com o controle do carrapato e 51% devido a perdas na produção de leite, carne e couro (Jonsson *et al.*, 2000). Segundo estimativas realizadas no ano de 1983, os prejuízos econômicos causados pelo *R. microplus* no Brasil atingiram a ordem de um bilhão de dólares por ano (Labruna *et al.*, 2001). Devido aos problemas causados pelos métodos químicos tradicionais a busca de novos mecanismos de controle deste parasito se torna inevitável e alvo de investigação de diversos grupos de pesquisa em todo o mundo. Um dos métodos mais promissores para controle de carrapato é o desenvolvimento de vacinas. Neste sentido, já existem duas no mercado que utilizam como alvo o aparelho digestivo do carrapato (Willadsen *et al.*, 1996). No Brasil também existem grupos que vem trabalhando no sentido de melhorar os antígenos comercializados (Patarroyo *et al.*, 2002) e outros que visam interferir com a

proliferação de novos indivíduos, com a interferência no processo de ovogênese e/ou embriogênese (Leal *et al.*, 2006).

1.2 - Ciclo biológico do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

O *R. microplus* é uma espécie de carrapato da família Ixodidae com um único hospedeiro no seu ciclo e normalmente parasita bovinos, sendo raramente encontrado em outros animais. No seu ciclo biológico a teleógina (fêmea ingurgitada) se desprende do hospedeiro e procura um esconderijo nas pastagens, onde põe de 2.500 a 3.000 ovos (figura 2). Ao terminar a postura, a fêmea morre. Os ovos são pequenos, esféricos e de coloração castanha. Os ovos eclodem e dão origem às larvas, que sobem pelas gramíneas e arbustos e esperam a passagem dos hospedeiros para iniciar a fase parasitária. Uma larva pode sobreviver, dependendo da temperatura, até 10 dias sem hospedeiro.

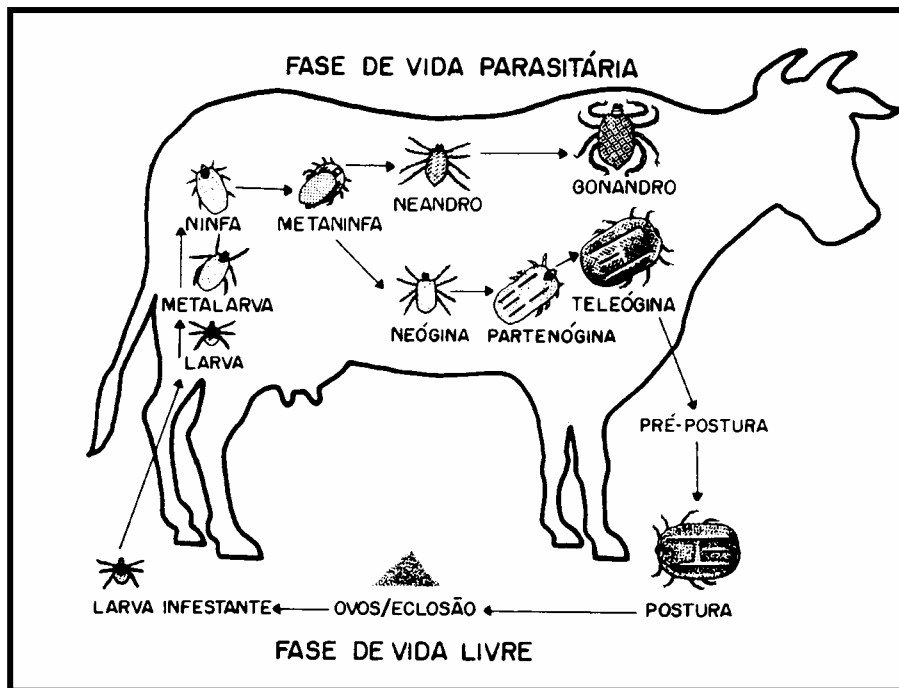


Figura 2: O ciclo biológico do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Seu desenvolvimento é dividido em duas fases: Uma fase de vida livre e outra parasitando seu hospedeiro, o boi (*Bos taurus*). (Retirado de Gonzales, 1974)

1.3- Ovogênese e Embriogênese

Em artrópodes existem dois tipos principais de ovários: 1) os ovários panoísticos, o próprio ovócito é responsável pela síntese de vários tipos de RNAs (rRNA, mRNA) e todos os constituintes necessários para o desenvolvimento, que são estocados para servir às necessidades futuras do embrião; 2) os ovários meroísticos podem ser subdivididos em politróficos e telotróficos. Neste caso, as macromoléculas são sintetizadas em células germinativas especializadas denominadas células nutrízes e posteriormente são transferidas para os ovócitos em crescimento (Büning, 1994). Este processo é muito bem caracterizado em ovários politróficos de *Drosophila melanogaster*, onde cada ovócito é abastecido por um grupo específico de células nutrízes. A função nutricional dessas células é facilitada pela presença de canais citoplasmáticos estáveis denominados “pontes intercelulares” responsáveis pela ligação dessas células ao ovócito. Desta forma, servem como rota de transporte para lipídeos, proteínas, carboidratos, mitocôndrias, retículo endoplasmático, RNAm, ribossomos que são produzidas por estas células e estocados no ovócito em crescimento (Büning, 1994 e Telfer, 1975).

Após este processo as células nutrízes entram em apoptose (Büning, 1994 e Telfer, 1975). Após a ovogênese os ovócitos são fecundados e corionados para dar início a embriogênese (Büning, 1994 e Telfer, 1975).

As principais modificações morfológicas que acontecem durante a embriogênese do carrapato bovino *R. microplus* foram recentemente elucidadas (anexo II, figura 1). Por meio de microscopia confocal de varredura a laser, observamos no primeiro dia de desenvolvimento que inicialmente o embrião deste carrapato é um organismo unicelular (anexo II, figura 1B). No quarto dia observa-se uma intensa proliferação nuclear acarretando na formação de uma estrutura denominada blastoderma sincicial, onde estes núcleos estão posicionados na região cortical do embrião (anexo II figura 1C). Neste momento o embrião é um organismo unicelular polinucleado. Entre o quarto e o sexto dia inicia-se a proliferação das células embrionárias, que culmina na formação do blastoderma celular (anexo II, figura 1D e figura 1 E). No sétimo dia de desenvolvimento o embrião já se apresenta segmentado (anexo II, figura 1F). Daí por diante inicia-se a organogênese culminando no décimo dia com a observação de estruturas mais complexas como a carapaça e patas (dado não mostrado).

Nesta tese foram estudados aspectos fundamentais do metabolismo energético relacionados ao desenvolvimento embrionário do carrapato bovino *R. microplus*. Neste sentido, observamos em que etapas da formação do embrião estão acontecendo modificações metabólicas relacionadas à utilização das moléculas energéticas estocadas nos ovos. Também estudamos uma triose fosfato isomerase clonada a partir de embriões desta mesma espécie de carrapato, a RBmTIM. A seqüência de nucleotídeos e aminoácidos foi depositada no banco de genes (GenBank) e suas principais características cinéticas, físico-químico e estruturais foram avaliadas mostrando grande semelhança com outras TIMs previamente descritas, porém encontramos algumas peculiaridade como o teor de cisteínas, o maior já descrito para todas as espécies e que nenhum destes resíduos de cisteínas forma pontes dissulfeto nesta estrutura.

1.4 - Aspectos Gerais Sobre Metabolismo Energético

No curso da evolução, os seres vivos desenvolveram a capacidade de degradar moléculas para disponibilizar energia, através de processos enzimáticos. Especula-se que a primeira via metabólica de obtenção de energia, que surgiu na natureza, tenha sido a glicólise anaeróbia, já que nas primeiras fases de adaptação no nosso planeta não existia oxigênio ou seus níveis eram muito baixo (Dudley & Winter, 2002).

Durante o processo evolutivo houve uma enorme mudança na composição química da atmosfera. A expansão das plantas terrestres com capacidade de fixação de dióxido de carbono e liberação de oxigênio no final da era paleozóica promoveu a elevação dos níveis de oxigênio atmosférico representando uma pressão evolutiva muito grande que favoreceu o surgimento de seres eucarióticos com capacidade de degradar oxidativamente glicose até CO_2 . Com isso, estes seres foram capazes de retirar uma quantidade muitas vezes maior de energia destas moléculas (Dudley & Winter, 2002).

O processo de elucidação da via glicolítica teve início no século XIX com os experimentos de Louis Pasteur em 1860 que observou que microrganismos são responsáveis pela fermentação (Kresge *et al.*, 2005). Em 1897 Eduard Buchner descobriu que extratos livres de células eram capazes de realizar fermentação (Kresge *et al.*, 2005). Em 1905 Arthur Harden e Willian Young mostraram que fosfato inorgânico era necessário para glicólise e que a fermentação requeria uma fração termoestável denominada “cozimase” (íons metálicos, ATP, ADP e co-fatores como NAD^+) e uma fração termo sensível denominada “zimase” (composta principalmente por enzimas). No entanto, a elucidação completa da via glicolítica foi realizada por um conjunto de pesquisadores liderados por Otto Fritz Meyerhof em 1940 (Kresge *et al.*, 2005).

Meyerhof também determinou que o glicogênio poderia ser convertido em ácido láctico no músculo na falta de oxigênio e que na presença de oxigênio apenas uma pequena parte do ácido láctico era oxidado. Mostrou ainda que o restante é re-convertido em glicogênio. A descoberta do ciclo do ácido láctico representou a primeira evidência da transformação cíclica de energia em células. Estes resultados, de análise do ciclo do ácido láctico e sua correlação com a respiração deram a Meyerhof e Hill o prêmio Nobel de fisiologia e medicina em 1922 (Kresge *et al.*, 2005)

Em 1932 Gustavo Embden construiu um modelo para as seqüências de reações que compõem a via glicolítica. Nos anos subseqüentes até o início da década de 40 Meyerhof e seus colaboradores trabalharam em detalhes da glicólise que por isso também passou a ser chamada de via de Embden-Meyerhof (Kresge *et al.*, 2005).

Os processos catabólicos, de uma forma geral, visam suprir os organismos de energia para manutenção de suas funções vitais. Esta energia, em seres heterotróficos, é retirada dos alimentos que fornecem os carboidratos, os lipídeos, as proteínas. Já em seres autotróficos a energia da luz é utilizada para converter água e dióxido de carbono (CO₂) em glicose. A utilização destas moléculas tem como objetivo principal a obtenção de energia na forma de ATP para as células. Quando o ATP é hidrolisado é capaz de liberar uma grande quantidade de energia, contida nas suas ligações de fosfato, permitindo que reações importantes, que “*in vitro*” são termodinamicamente desfavoráveis aconteçam com muita facilidade dentro dos seres vivos. No entanto, dentro das células a degradação de moléculas energéticas como a glicose não acontece em um único passo e sim, em múltiplas etapas reacionais coordenadas, denominadas vias metabólicas.

A glicólise, o ciclo de Krebs, a cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa têm papel central no fornecimento de energia. No catabolismo, os metabólitos convergem para um caminho central, que posteriormente poderão ser transformadas em um intermediário comum, acetil-CoA, que então é completamente oxidado a CO₂ e H₂O, através das reações do ciclo de Krebs, que é responsável pela principal produção de poder redutor, na forma de NADH e FADH₂, que transferem elétrons para cadeia transportadora de elétrons, que gera um gradiente eletroquímico de prótons o qual impulsiona a síntese de ATP pela F₀F₁ ATP sintase (figura 3).

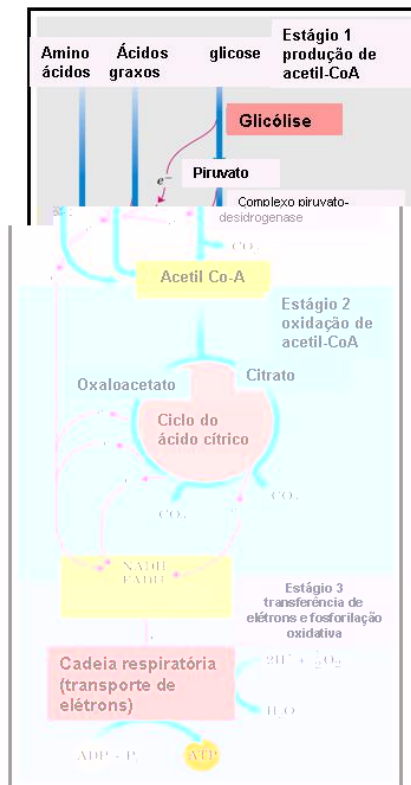


Figura 3: A glicólise, o ciclo de Krebs e a cadeia transportadora de elétrons têm função central para a obtenção de energia na forma de ATP.

1.5 – Estratégias de Mobilização de Energia em Artrópodes

Os trabalhos sobre metabolismo energético em insetos abordam, em alguns casos, aspectos adaptativos de determinadas situações às quais estes seres são submetidos. Uma dessas situações é o voo que requer demanda energética elevada e para melhor mobilização de moléculas há a necessidade de cooperação e coordenação de vários tecidos.

O sistema nervoso, através de neurohormônios, controla o metabolismo energético do músculo de voo e do corpo gorduroso. O neurohormônio octopamina tem função central no voo, pois coordena e estimula a contração muscular e incrementa o metabolismo energético devido à ativação da fosfofrutoquinase1, via frutose-2,6-bifosfato (Candy *et al.*, 1997). O músculo usa vários combustíveis, sendo o principal, o açúcar trealose, sintetizado pelo corpo gorduroso a partir de inúmeros precursores, como glicogênio, monossacarídeos e aminoácidos (Candy *et al.*, 1997). Estes estudos mostram que, durante o voo prolongado, o músculo inicialmente utiliza combustíveis

energéticos nele estocados como glicogênio e fosfoarginina, além de um suplemento de trealose proveniente da hemolinfa. Com o decorrer do vôo, o músculo passa a hidrolisar diacilgliceróis, o que resulta na liberação de ácidos graxos e glicerol, que imediatamente são oxidados por este tecido (Candy *et al.*, 1997).

Foi mostrado que o besouro africano *Pachnoda sinuata* consegue viver cerca de dois meses sem alimentar-se apresentando pequena diminuição da quantidade de proteína, com a utilização do glicogênio muscular e de ácidos graxos do corpo gorduroso (Gade & Auerswald, 2000). O controle de degradação das reservas energéticas pode estar relacionado com a estratégia proposto por Kolsch, (2001). O autor sugere que a diminuição da degradação das reservas energéticas do besouro *Agelastica alni* está relacionada à diminuição da sua atividade metabólica durante a anoxia.

No inseto *Bombyx mori* foi mostrado que a quantidade de glicogênio é reduzida significativamente de acordo com a administração de treazolina, um inibidor de trealase (Katagiri *et al.*, 1998). Em 2000, Mohamed, purificou e caracterizou uma α -amilase de ovos do carrapato de camelo *Hialomma dromedarii*. As α -amilases são enzimas digestivas capazes de hidrolisar amido, glicogênio, amilopectina e amilose liberando dissacarídeos e/ou trissacarídeos (Mohamed, 2000).

Recentes estudos têm como foco a participação de aminoácidos no metabolismo energético em mosquitos *Aedes aegypti*. Por exemplo, isto ocorre no período após a alimentação sanguínea do mosquito onde o aminoácido prolina tem sua concentração aumentada logo após a alimentação com sangue (Pennington *et al.*, 2003). Os autores sugerem que o amônio tóxico produzido durante o catabolismo de aminoácidos seja convertido temporariamente em prolina, uma forma não tóxica, sugerindo a existência de um mecanismo de eliminação neste mosquito (Pennington *et al.*, 2003).

Uma outra atividade em que o metabolismo de aminoácido está bastante envolvido nos insetos é o vôo. (Scaraffia & Wells, 2003) mostraram em *Aedes aegypti* que o músculo de vôo pode utilizar o aminoácido prolina produzido pelo corpo gorduroso como uma importante fonte de energia. Neste trabalho o autor propõe que a função da prolina seja levar unidades de acetil-Coa do corpo gorduroso para o músculo de vôo (Scaraffia & Wells, 2003). Este acetil-Coa é

derivado principalmente de ácidos graxos, glicose ou catabolismo de aminoácidos que são inicialmente convertidos a α -cetogluturato através do ciclo do ácido cítrico. O α -cetogluturato é posteriormente convertido em prolina ainda no corpo gorduroso. A prolina é secretada para a hemolinfa e transportada até o músculo de vôo, onde é re-convertida em α -cetogluturato que entra no ciclo de Krebs para ser oxidado e produzir ATP (Scaraffia & Wells, 2003).

Durante a embriogênese do carrapato de camelo *Hyalomma dromedari* no 12º dia de desenvolvimento deste carrapato, a prolina livre nos embriões apresenta níveis extremamente baixos, coincidentemente com os níveis extremamente altos de α -cetogluturato. Os autores sugerem que a prolina livre pode ser uma fonte de acúmulo de α -cetogluturato que estaria sendo utilizado no ciclo de Krebs, para posterior produção de energia na respiração, mostrando que a prolina pode ser uma importante fonte energética (Fahmy *et al.*, 2004) neste carrapato e também fazer parte do sistema de metabolização de amônio proveniente da deaminação de outros aminoácidos.

Em animais ovíparos não há trocas entre a mãe e os embriões, como nos placentários. Os trabalhos relacionados ao estudo do desenvolvimento de embriões em ovíparos se preocupam principalmente com aspectos relacionados a estratégias de reservas para o novo indivíduo. O metabolismo proteico é mais estudado, provavelmente devido ao fato das proteínas serem os constituintes mais abundantes destes ovos (Logullo *et al.*, 2002). Uma abordagem muito recorrente na literatura é a quantificação do conteúdo de vitelo nos ovos durante a embriogênese. Em *Musca domestica* foi mostrado que a ninfa eclode com 20% do vitelo (Ribolla & Debianchi, 1995). Já em *Rhodnius prolixus* este percentual é maior, eclodindo com 40% do vitelo (Oliveira *et al.*, 1985). No carrapato bovino *R. microplus* mostrou-se que sua prole eclode com cerca de 60% de vitelo (Logullo *et al.*, 2002). Acredita-se que o conteúdo de vitelo que permanece ao final da embriogênese esteja relacionado à estratégia adaptativa de cada um desses pequenos seres em função da disponibilidade de alimento na natureza. No caso da mosca ela voa e come diferentes substratos. O barbeiro voa menos e come especificamente sangue, necessitando assim de uma maior quantidade de vitelo e por último o carrapato que também se alimenta de sangue, e devido ao fato de não conseguir voar, precisa aguardar a passagem do seu hospedeiro, necessitando

assim de reservas que possam sustentar a ninfa recém eclodida por mais tempo.

1.6 – A TIM e suas propriedades estruturais e funcionais

A triose fosfato isomerase (TIM) é uma importante enzima da via glicolítica e da gliconeogênese, que catalisa a isomerização reversível de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) em gliceraldeído 3-fosfato (G3-P). Em insetos da família diptera a TIM tem função adicional de abastecimento do ciclo do - glicerofosfato, onde inicialmente a DHAP é reduzida a glicerol-fosfato que junto ao NADH formam um sistema de lançadeiras promovendo um transporte rápido de elétrons para mitocôndria e conseqüentemente reciclagem de NAD^+ para glicolise (Whyard *et al.*, 1994b).

As TIMs são consideradas catalisadores perfeitos com taxa de catalise 10^9 vezes mais rápida que na reação sem catalise (Knowles & Albery, 1977). O mecanismo de catálise desta reação envolve três resíduos que participam do sítio ativo e são essenciais para catálise: Glu 167, localizado no extremo amino da folha- 6, no qual seu grupamento carboxílico atua como base retirando um próton do substrato; a His 95 que está localizada no extremo amino da folha- 4, cujo anel imidazólico atua como eletrófilo polarizando o grupo carbonílico do substrato, permitindo sua enolização e por último a lys 13 que está localizada no extremo amino da folha- 1, sendo responsável pela especificidade da enzima pelo seu substrato (Field *et al.*, 1990; Lodi & Knowles, 1991; Ringe *et al.*, 1991) (Figura 4).

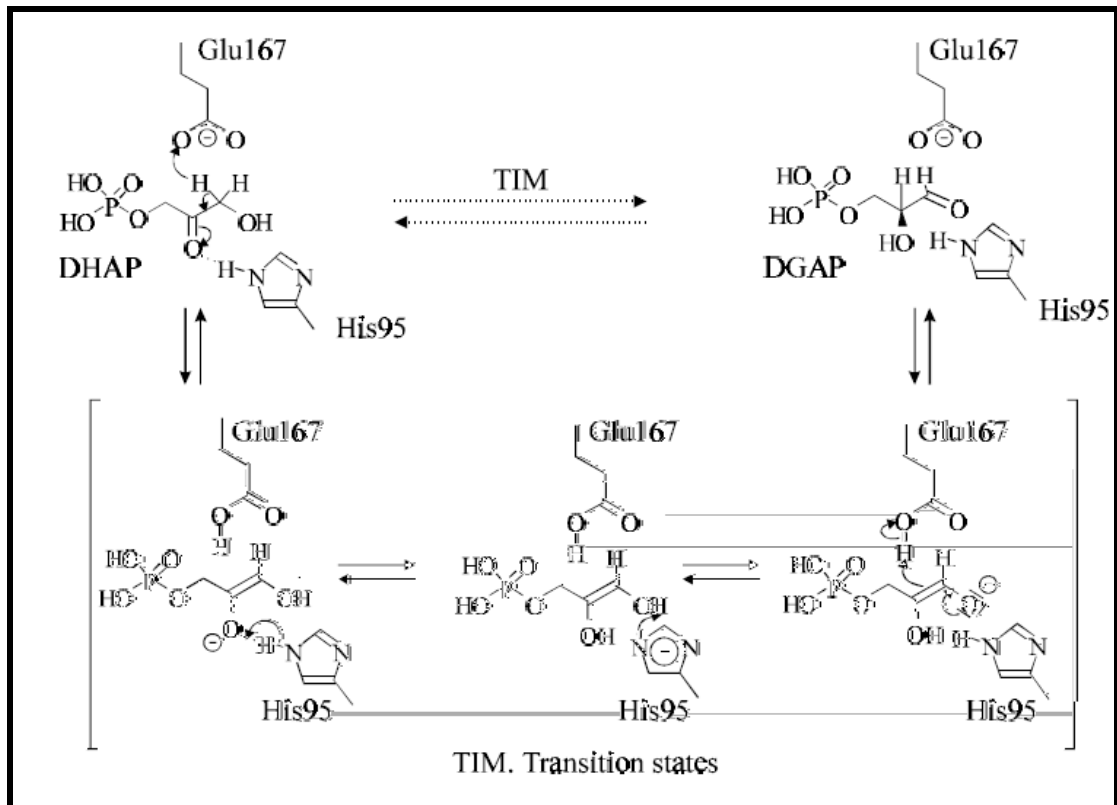


Figura 4: Mecanismo da reação catalisada pela Triose fosfato isomerase. (Adaptado de Wierenga, R.K. et al, 1991).

A maior parte das TIMs descritas são homodímeros com peso molecular de aproximadamente 27 kDa por subunidade. No entanto, em *Pyrococcus woesei* é um tetrâmero (Bell *et al.*, 1998) e em *Giardia lamblia* pode formar um tetrâmero ou até mesmo um oligômero maior devido a TIM desta espécie ter um resíduo de cisteína 202, que confere a esta molécula a possibilidade de fazer pontes dissulfeto entre dímeros (Reyes-Vivas *et al.*, 2007) Todas as TIMs são da família das proteínas barril / , onde cada monômero tem como característica principal ser formado por 8 folhas- unidas a 8 -hélices por alças (figura 5).

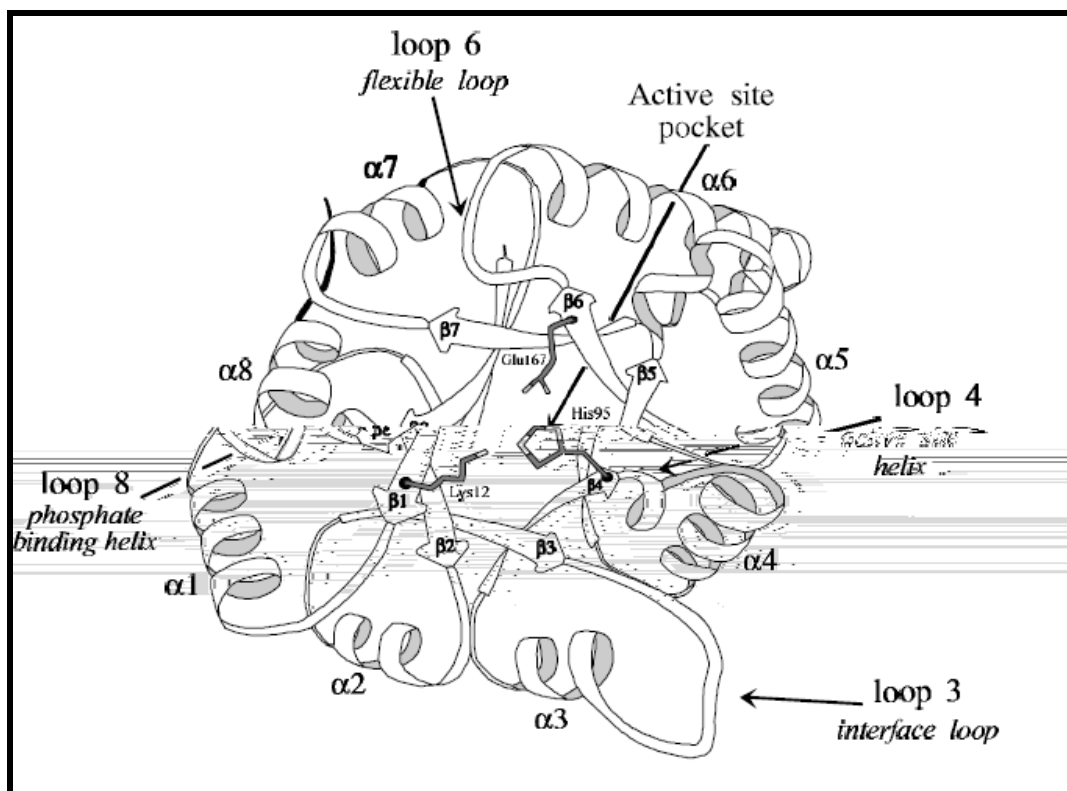


Figura 5: Esquema de uma subunidade de triose fosfato isomerase.

1.2 - A TIM como alvo de desenho de drogas.

A possibilidade do uso de resíduos não conservados de aminoácidos para produzir inibição seletiva de enzimas homólogas de diferentes espécies tem sido amplamente explorado com a TIM (Gomez-Puyou *et al.*, 1995; Reyes-Vivas *et al.*, 2007; Lopez-Velazquez *et al.*, 2004; Zomosa-Signoret *et al.*, 2003b; Reyes-Vivas *et al.*, 2002; Reyes-Vivas *et al.*, 2001; Perez-Montfort *et al.*, 1999; Zomosa-Signoret *et al.*, 2003a; Hernandez-Alcantara *et al.*, 2002; Gag *et al.*, 1999; Maldonado *et al.*, 1998; Garza-Ramos *et al.*, 1997; Garza-Ramos *et al.*, 1998). Esta abordagem está baseada na reação de drogas com aminoácidos específicos que não se conservaram durante a evolução, possibilitando inibição espécie-específica da enzima (Gomez-Puyou *et al.*, 1995). O efeito do composto p-toluenotiosulfonato que reage com cisteínas estruturalmente expostas foi estudado em diferentes espécies. Esta droga não inibe as TIMs de *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli*, mas inibe as TIMs de galinha e de *Schizosaccharomyces pombe* por terem uma cisteína na posição 217 que as tornam mais susceptíveis a ação da droga devido a maior

exposição estrutural deste resíduo nestas espécies (Gomez-Puyou *et al.*, 1995).e (Garza-Ramos *et al.*, 1997; Garza-Ramos *et al.*, 1998)

Outro resíduo bastante explorado é o aminoácido 14, que está localizado no alça 3, tendo função central na estabilidade da TIM. Este resíduo não é conservado e varia em diferentes espécies: em humanos e coelhos temos uma metionina nesta posição; em leveduras uma leucina e em *T. cruzi* uma cisteína (Gomez-Puyou *et al.*, 1995). Esta modificação neste resíduo entre espécies tem sido usada com sucesso para inibir a TIM de *T. cruzi* sem inibir a TIM de humano (Tellez-Valencia *et al.*, 2002). O mecanismo de inibição baseia-se na reação específica entre drogas com a cisteína 14 do *T. cruzi*, provocando alteração estrutural de sua TIM e conseqüentemente perda da função biológica (Tellez-Valencia *et al.*, 2004).

A interfase ocupa uma grande porção do dímero, aproximadamente 1476 Å; com o alça 3 ocupando uma função central interligando os monômeros. Devido a este fato, os aminoácidos que formam esta região são extremamente importantes na estabilidade da TIM e conseqüentemente são alvos em potencial para o desenho de drogas como mecanismos de inibição seletiva desta enzima (Thanki *et al.*, 1997; Hernandez-Alcantara *et al.*, 2002).

1.3 – A TIM como alvo para desenvolvimento de vacinas.

Dentre os diversos antígenos contra schistosomíase a TIM de *Schistosoma mansoni* (SmTIM) foi considerada uma das seis prioridades como candidata à vacina pela Organização Mundial da Saúde (Bergquist, 1995). A SmTIM foi detectada por anticorpos monoclonais, que foram capazes de transferir uma proteção parcial contra desafio em ratos (Harn *et al.*, 1985b; Harn *et al.*, 1985a) e estes anticorpos foram capazes de inibir a atividade enzimática. Estudos iniciais de vacinação em ratos com SmTIM recombinante mostraram que esta vacina pode reduzir o número de vermes na forma adulta em 28%. Entretanto os resultados são mais expressivos em termos de transmissão, pois reduz o número de ovos no fígado em 54% (Zhu *et al.*, 2006). Foi mostrado que a TIM de *Schistosoma mansoni* é um potente indutor da produção de IL-2 e IFN- γ (resposta imune Th1) e conduz a produção destas citocinas nas mesmas populações celulares de animais infectados e também foi reportado aumento da resposta Th2 (Zhu *et al.*, 2006).

Recentemente plasmídeos contendo o gene da TIM de *Schistosoma japonicum* foram usados como vacina em porcos, sendo capazes de proteger contra desafios da infecção deste helminto (Zhu *et al.*, 2006). Neste estudo foi mostrado que esta vacina reduz em 43,8 % o número de vermes totais, em 53,6 % o número de vermes fêmeas e em 54 % o número de ovos no fígado, além de diminuir as patologias hepáticas associados aos ovos (Zhu *et al.*, 2006).

2 – OBJETIVO GERAL:

Esta tese teve como objetivo o estudo de aspectos fundamentais do metabolismo energético relacionados ao desenvolvimento embrionário do carrapato bovino *R. microplus* e também a caracterização molecular e estrutural da triose fosfato isomerase recombinante de embriões do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Objetivo específico 1- Análise dos aspectos gerais do metabolismo.

- A) Isolamento de mitocôndrias acopladas dos embriões,
- B) Determinação de atividade respiratória nas frações mitocôndrias e nos ovos,
- C) Determinação do peso seco, concentração de açúcar total, concentração de proteína total e lipídeos totais (anexo II).

Objetivo específico 2- Estudo do metabolismo glicídico.

- A) Estudo do metabolismo de glicose durante a embriogênese (anexo I),
- B) Monitoramento da TIM durante a embriogênese.

Objetivo específico 3- Estudo do metabolismo lipídico.

- A) Quantificação de lipídeos totais, fosfolipídeos e lipídeos neutros,
- B) Quantificação de corpos cetônicos,
- C) Monitoramento da enzima lipase durante a embriogênese.

Objetivo específico 4- Estudo do metabolismo de aminoácidos.

- A) Monitoramento da enzima aspartato aminotransferase (AAT) durante a embriogênese,
- B) Monitoramento da enzima glutamato desidrogenase (GDH) durante a embriogênese,
- C) Quantificação de aminoácidos livre nos ovos.

Objetivo específico 5-Estudo dos parâmetros moleculares da RBmTIM.

A) Clonagem, expressão e modelagem molecular da RBmTIM;

Objetivo específico 6- Estudo dos parâmetros cinéticos da RBmTIM.

A) Purificação, determinação do K_m e V_{max} da RBmTIM;

Objetivo específico 7- Estudo dos parâmetros estruturais da RBmTIM.

A) Análise da fluorescência intrínseca, dicroísmo circular; cristalização e resolução da estrutura.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1 – Animais

Os animais utilizados nesta tese são carrapatos da espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, criados em bovinos na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os carrapatos são desenvolvidos em bovinos isolados em estábulos, livres de qualquer contato com o campo. As larvas são colocadas no dorso dos bovinos e após 21 dias, no período modal de queda das teleóginas, o estábulo é lavado e as fêmeas adultas coletadas com auxílio de peneiras, sendo utilizadas para postura dos ovos que são usados nos experimentos.

3.2 – Manutenção dos ovos

Os ovos são coletados de fêmeas adultas ingurgitadas mantidas a 28°C e umidade de 80 %. Estes ovos desenvolvem-se nessa mesma condição. Os dias de desenvolvimento são contados a partir da oviposição e o desenvolvimento dos ovos é interrompido através de congelamento dos ovos à - 20°C.

3.3 - Dosagem de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), usando como padrão albumina sérica bovina.

3.4 - Medida de atividade lipásica (triacilglicerol acil hidrolase) nos ovos do carrapato bovino

A atividade desta enzima foi determinada através de titulação potenciométrica utilizando como substrato uma emulsão preparada a partir de óleo de oliva, goma arábica e água. A variação de pH quando for adicionado a emulsão homogeneizado de ovos foi medida em pHmetro e comparada a variação de hidrólise da emulsão por uma solução padronizada de NaOH 0,01 M.

3.5 - A extração e quantificação de lipídeos

Os lipídeos totais dos ovos foram extraídos segundo (Bligh & Dyer, 1959). As amostras descritas acima contendo 1 mg de proteína total em um volume final de 500 μ L foram desfosfolipidadas adicionando-se as amostras em tubos cônicos com 9 mL da mistura de clorofórmio:metanol:água (1:2:0,8; V:V:V). Após agitação com intervalos de 5 em 5 minutos perfazendo um total de 2 horas, a mistura foi centrifugada em uma centrífuga clínica por 10 minutos a 3.000 X g e os sobrenadantes contendo os lipídeos foram separados da fração glicoproteica. Os lipídeos eram então re-extraídos, agora por 1h onde se juntam os dois sobrenadantes e então se acrescenta 5 mL de clorofórmio e 5 mL de água. O material foi energicamente agitado e centrifugado por 15 minutos a 3000g, quando se separaram duas fases: orgânica e inorgânica. As fases orgânicas (parte inferior do tubo) eram removidas com uma seringa de vidro com agulha longa, secas sob uma atmosfera de nitrogênio no banho seco a 37 °C; ressuspensas em 0,1 mL de clorofórmio puro.

3.6 - Análise de lipídeos neutros e fosfolipídios por HPTLC

Os lipídeos totais extraídos segundo (Bligh & Dyer, 1959) foram ressuspensos em 0,1 mL de clorofórmio. Em seguida, 50 μ L deste material foi aplicado em uma placa de sílica (camada fina de alta resolução) de 10 cm de altura (Merck). Os fosfolipídios foram submetidos à cromatografia de acordo com um sistema de solventes contendo água, ácido acético, metanol, acetona, clorofórmio na seguinte proporção 16: 24: 26: 30: 80: v:v:v:v:v, respectivamente. Os lipídeos neutros foram cromatografados utilizando como eluente um sistema de solventes contendo hexano, éter etílico e ácido acético na proporção de 60: 40: 1, respectivamente. As placas foram reveladas em atmosfera saturada de iodo.

3.7 - Cromatografia de aminoácidos em papel

Cromatografia circular foi realizada em papel de filtro Warthman n^o 1. 10 μ L dos homogeneizados de ovos deproteinizados (200 mg/mL) foram aplicados no centro do disco. Na cromatografia foi utilizada uma mistura de

solventes contendo butanol, ácido acético e água (4:1:1, respectivamente). A cromatografia em papel foi corada com ninidrina em solução alcoólica 5 % (etanol 5 %).

3.8 - Determinação da atividade de aspartato aminotransferase

A atividade de aspartato aminotransferase foi medida em TRIS-HCl 50 mM pH 7,4, contendo L-aspartato (40 mM), NADH (0,15 mM), malato desidrogenase (0,63 U/mL). A reação foi iniciada com α -cetoglutarato (7 mM) e a oxidação NADH foi monitorada em espectrofotômetro a 340 nm. Uma unidade da enzima é a quantidade que utiliza 1 μ mol de substrato por minuto nas condições do ensaio (Scaraffia *et al.*, 1997).

3.9 - Determinação da atividade de glutamato desidrogenase

A atividade de glutamato desidrogenase foi medida em TRIS-HCl (80 mM), contendo EDTA (8mM), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (55mM), NADH (0.3 mM), ADP (2.5 mM), pH 7,6. A reação foi iniciada com α -ketoglutarato (4 mM) e oxidação do NADH foi monitorada espectrofotômetro a 340 nm. Uma unidade da enzima é a quantidade que utiliza 1 μ mol de substrato por minuto nas condições do ensaio (Scaraffia *et al.*, 1997).

3.10 - Isolamento de mitocôndrias

O material para medida da respiração mitocondrial foi preparado homogeneizando 200 mg de ovos em 0,5 mL de tampão de isolamento (HEPES 50 mM, pH 7,2 contendo 0,5 M de sacarose, 20 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA e albumina livre de ácidos graxos 1 %). O homogeizado foi centrifugado a 8000 X g por 15 minutos a 4°C. O excesso de gordura foi retirado da superfície da solução com auxílio de papel de filtro e em seguida o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi então re-homogenizado em 0,5 mL de tampão de isolamento e submetido a centrifugação a 500 X g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido, transferido para outro tubo e centrifugado a 7000 X g por 15 minutos a 4°C. O “precipitado mitocondrial resuspenso em 20 μ L do tampão de respiração.

3.11 – Determinação da atividade respiratória

Os parâmetros respiratórios foram determinados nas mitocôndrias isoladas (200 µg de proteína / mL) dos ovos em 1,5 mL de meio de respiração contendo 3 mM de HEPES pH 7,2, 120 mM de KCl, 1 mM de EGTA, 5 mM de KH_2PO_4 e albumina essencialmente livre de ácidos graxos a 28°C. Inicialmente foi utilizado 50 µL de uma mistura equimolar (100 mM) de piruvato e prolina como doadores de elétrons para o complexo I mitocondrial, em seguida foi adicionado 5 µL de ADP (100 mM). Após 5 minutos, 2 µL de rotenona (1 mM) foram adicionados ao meio para inibir o complexo I. Posteriormente, 12 µL succinato (0,6 M) foi usado para ativar o complexo II. O consumo de oxigênio foi totalmente inibido por 1 µL de oligomicina (1mg / mL) e 1 µL de FCCP (1 mM) restabelece o consumo de oxigênio. As análises foram realizadas com auxílio de um eletrodo de Clark pela inclinação da curva obtida em oxígrafo (Yellow Springs Instruments Co).

3.12 - Determinação do potencial de membrana mitocondrial

A determinação do potencial de membrana mitocondrial foi realizada usando o sinal catiônico da safranina-O em espectrofluorímetro com excitação em 495 nm (abertura de 5 nm) e emissão em 586 nm (abertura de 5 nm). A safranina O é acumulada dentro da mitocôndria. Inicialmente ao meio de respiração (1 mL) foi adicionado 10 µM de safranina O, em seguida foram adicionadas as mitocôndrias isoladas (200 µg de proteína / mL). Piruvato (4 mM) e succinato (1,2 mM) foram usados para ativar o potencial de membrana e ADP (0,4 mM) foi usado para diminuir o potencial de membrana e FCCP (8 µM) foi usado como controle.

3.13 - Dosagem de corpos cetônicos durante a embriogênese

Cem miligramas de ovos foram homogeneizados em 1 mL de ácido tricloroacético 5%. Em seguida, o material foi centrifugado a 2000 X g por 10 minutos, o sobrenadante foi recolhido e 500 µL foram transferidos para outro tubo. Subseqüentemente, foi adicionado neste tubo 500 µL de acetato de sódio 1,4 M e 500 µL de diazoreagente (nitrato de sódio 0,5 %, p-nitro anilina 0,05 % e acetato de sódio 0,25 M na proporção de 6:40:14). O material foi incubado

em banho de gelo por 30 minutos, posteriormente, foi adicionado 500 μ L de HCl 5 N, seguido imediatamente de 500 μ L de acetato de etila. O material foi misturado vigorosamente. A fase orgânica foi recolhida e lida em um espectrofotômetro a 340 nm e comparada a uma curva padrão de acetoacetato.

3.14 - Extração de RNA

Inicialmente, o gral e o pistilo foram esterilizados por aquecimento em forno a 300 °C por 1 hora e antes do uso foram banhados em NaOH por 30 minutos para eliminação de possíveis RNAses. Um grama de ovos foi macerado em nitrogênio líquido, subsequentemente, a amostra foi homogeneizada em 10 mL do reagente TRIzol. A amostra foi centrifugada a 12000 X g por 10 minutos, o material insolúvel foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado 500 μ L de clorofórmio. Em seguida, o material foi homogeneizado por inversão, incubado a temperatura ambiente por 3 minutos, submetido à centrifugação 12000 X g por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e adicionado 500 μ L de isopropanol. Posteriormente, a amostra foi homogeneizada por inversão e incubada a -20 °C por 40 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12000 X g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado, a amostra foi lavada com 100 μ L de etanol 75 % e após a evaporação do etanol residual, o RNA foi utilizado para amplificação da fita de cDNA.

3.15 - Síntese da primeira fita de cDNA

O precipitado de RNA foi resuspenso em 20 μ L de água ultra pura esteril. Em outro tubo próprio para PCR, foram adicionados 2 μ L de oligo(dT)₁₂₋₁₈ e em seguida 10 μ L da solução de RNA. A amostra foi aquecida a 70 °C por 10 minutos e imediatamente incubada em gelo por 2 minutos. Posteriormente, foi adicionado 4 μ L do tampão (first strand buffer) fornecido pelo fabricante para a enzima transcriptase reversa SUPERSRIPT II (GibcoBRL cat nº 18064-014), 2 μ L de DTT 0,1 M e 2 μ L de DNTP 10 mM (10 mM de ATP, 10 mM de CTP, 10 mM de GTP e 10 mM de TTP). A amostra foi homogeneizada por inversão e incubada em banho-maria a 42 ° C por 2 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 μ L da enzima SUPERSRIPT II (200 unidades) e o material foi

incubado a 42 °C por 1 hora. A enzima foi inativada por aquecimento a 70 °C por 15 minutos.

3.16 – Amplificação do cDNA por PCR

Para a reação de amplificação do fragmento de cDNA por PCR foram adicionados em um tubo (0,5 mL) 10 µL de tampão para PCR (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4 contendo 500 mM de KCl), 3 µL de MgCl₂ (50 mM), 2 µL de dNTP's (10 mM), 1,0 µL do Primer (ATGGCCGCACGCAGATTTTG) (10 µM), 1,0 µL do Primer (CTAACCTGCATAGCATTAAATGA) (10 µM), 1,0 µL de Taq (5 U/ mL) , 5 µL do cDNA e 80 µL H₂O estéril. O programa utilizado foi o seguinte: 94 °C – 5 min; 30 ciclos de (94 °C – 40 s; 59,8 °C – 1 min; 72 °C – 2 min) e 1 ciclo (72 °C – 5 min).

3.17– Eletroforese em gel de agarose

A solução de agarose 1 % (p/v) em TAE (tampão Tris-acetato 40 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) foi aquecida em forno de microondas até completa dissolução da agarose. Em seguida, a agarose foi colocada na cuba e após completa solidificação, as amostras foram aplicadas e submetidas a uma voltagem de 100 V por 30 minutos. Os géis foram retirados da cuba, incubados em solução de brometo de etídio (10 mg / mL) por aproximadamente 1 minuto. O fragmento correspondente ao DNA da TIM no gel foi visualizado e comparado com marcador de DNA.

3.18– Purificação do fragmento de DNA do gel de agarose

A extração do fragmento de DNA do gel de agarose foi efetuada utilizando Kit QIAGEN. A banda referente ao tamanho de pares de bases da RBmTIM foi cortada do gel de agarose. Em seguida, foram adicionado três volumes de tampão QG para um volume de gel e incubado a 50 °C até completa dissolução da agarose. Posteriormente, foi adicionado um volume de isopropanol e aplicado na coluna do kit. A coluna com a amostra foi centrifugada a 13000 X g por 1 minuto, O DNA se adere a resina da coluna e a agarose dissolvida é descartada. Em seguida, à coluna contendo DNA foi lavada com aplicação de 750 µL de tampão PE e submetida a centrifugação de

13000 X g por 1 minuto (duas vezes) e após secagem da coluna a temperatura ambiente o DNA é eluído com 50 µL de água estéril.

3.19– Purificação de DNA plasmidial com kit QIAGEN

Uma colônia de bactéria isolada foi inoculada em 10 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg / mL), incubada a 37 °C por 16 horas, sob agitação constante (200 rpm). A suspensão de bactéria foi centrifugada a 3000 X g por 20 minutos à temperatura ambiente. O precipitado bacteriano foi ressuspenso em 250 µL de tampão P1, transferido para um tubo de 1,5 mL. Posteriormente, foi adicionado 250 µL de tampão P2, homogeneizado levemente por inversão, adicionou-se tampão N3 e agitou-se suavemente por imersão. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 13000 X g por 10 minutos, o sobrenadante foi recolhido, aplicada na coluna do kit e centrifugado a 13000 X g por 30 segundos. Posteriormente, foi adicionado 750 µL de tampão PE, centrifugado a 13000 X g por 30 segundos, o material eluído foi descartado, a coluna foi centrifugada duas vezes a 13000 X g por 30 segundos para tirar o tampão PE residual. O DNA plasmidial é eluído da coluna aplicando 100 µL de água ultra pura no centro da resina com posterior incubação a temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugação a 13000 X g por 1 minuto.

3.20 - Desfosforilação do vetor pET 3a linearizado

Ao vetor pET 3a linearizado (10 µL) foi adicionado 1 µL de tampão (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3, MgCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 2 mM), 1 µL (1 U) da enzima CIAP (fosfatase alcalina de intestino bovino) e 26 µL de água ultra pura estéril. A mistura foi incubada à 37 °C por 2 horas, aplicada em gel de agarose e purificada de acordo com o item 3.5.

3.21– Reação de ligação

As reações de ligação foram realizadas em volume final de 20 µL, utilizando a proporção de 1:20 (vetor : fragmento). À mistura de DNA foi adicionado 1 µL de tampão de reação da T4 DNA ligase (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM, BSA 25 µg / mL), 1 U de T4DNA ligase (promega) e avolumado a 20 µL com água ultra pura estéril. A mistura de

ligação foi incubada por 16 horas a 18 °C e utilizada na transformação de bactérias.

3.22– Transformação de bactérias por choque térmico

As bactérias competentes foram retiradas do freezer – 80 °C, colocadas imediatamente em gelo, permanecendo nestas condições por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado 10 µL do produto de ligação e a mistura permaneceu em gelo por 30 minutos. Em seguida, a mistura foi incubada a 42 °C por 30 segundos e imediatamente a amostra foi reconduzida ao gelo. Após 5 minutos foi adicionado 250 µL de meio SOC, incubado a 37 °C por 1 hora sob agitação constante e posteriormente as células foram plaqueadas em meio LB-agar contendo 100 µg ampicilina / mL.

3.23 - Expressão da triose fosfato isomerase (TIM)

O vetor TOPO contendo o gene da TIM foi tratado com a enzima de restrição EcoR1 para liberação do gene que foi reamplificado com primers para as enzimas BamHI e NdeI e posteriormente ligado ao vetor de expressão pET-3a (novagen) que foi inserido nas células por choque térmico. Para a expressão da RBmTIM as células (bactérias BL 21 (DE3) pLysS) foram crescidas a 37 °C em meio LB suplementado com 100 µg / mL de ampicilina. O monitoramento do crescimento foi realizado em espectrofotômetro a 600 nm até atingir o valor de 0,6. Neste momento adicionamos 1,2 mM do agente indutor IPTG (isopropil -D-tiogalactopiranosídeo). Após 12 horas de crescimento as células foram usadas para purificação da RBmTIM.

3.24 - Purificação da RBmTIM

As células foram centrifugadas a 6000 X g por 15 minutos a 4 °C, posteriormente foram ressuspensas em 40 mL de tampão de lise (MES / NaOH 25 mM pH 6,5, DTT 1 mM e coquetel de inibidores de proteases). Em seguida, o material foi sonificado com cinco ciclos de 40 segundos cada com intervalo de 1 minuto e centrifugado a 45000 X g por 1 hora. Ao sobrenadante foi adicionado 45 % de (NH₄)₂SO₄ e centrifugado a 10000 X g por 10 minutos a 4 °C. A este segundo sobrenadante foi acrescentado (NH₄)₂SO₄ até 75 % de saturação e centrifugado a 10000 X g por 10 minutos a 4 °C. O precipitado foi

ressuspensão em 2 mL de tampão A (TEA 25 mM pH 8,0 contendo 1 mM de DTT e 1 mM de EDTA).

Em seguida, o material foi submetido a 2 diálises contra 500 mL de tampão A por 6 horas e 12 horas, respectivamente. O dialisado foi usado para cromatografia em HPLC usando a coluna Mono-Q. O grau de pureza foi acompanhado em SDS-PAGE 15 % com posterior coloração por com coomassie blue.

3.25 - Determinação da atividade de triose fosfato isomerase (TIM)

A atividade de triose fosfato isomerase foi medida na direção da formação de dihidroxiacetona fosfato. O ensaio foi realizado em meio reacional contendo trietanolamina pH 7,4 (100 mM), EDTA (10mM), NADH (0,2 mM), gliceraldeído-3-fosfato (1mM) e 0,9 unidades de -glicerol fosfato desidrogenase. A reação foi iniciada com 2,4 ng da enzima e a oxidação do NADH foi monitorada em espectrofotômetro a 340 nm. Uma unidade da enzima é a quantidade que utiliza 1 μ mol de substrato por minuto nas condições do ensaio (Tellez-Valencia *et al.*, 2004).

3.26- Espectro de fluorescência intrínseca

O espectro de fluorescência da enzima RBmTIM, na concentração de 50 μ g/mL, foi realizado a 25 °C em um espectrofluorímetro RF-5000 Shimadzu com uma célula de quartzo de 1,0 cm excitando em 280 nm e medindo a emissão entre 300 e 500 nm.

3.27- Dicroísmo circular

O espectro de dicroísmo circular foi realizado a 25 °C em um espectropolarímetro A VIV (Lakewood-NJ) 62 HDS usando cubeta de quartzo de 0,1 cm de espessura, 1,0 cm de caminho óptico. Para determinação do espectro foi utilizada a enzima na concentração de 100 μ g/mL em 25 mM de tampão fosfato pH 7,4 contendo 20 mM de NaCl. O espectro final é resultado da média de 5 repetições subtraído de 5 repetições do espectro do tampão fosfato.

3.28 -Análise de seqüências

As análises das seqüências de nucleotídeos e deduzida de aminoácidos foi realizada usando programa BioEdit versão 7.0.5.2 (Hall, 1999). O alinhamento das seqüências foi feito usando o programa Clustal W. O múltiplo alinhamento foi visualizado no programa GENEDOC 2.6.003. Os programas InterProScan (Zdobnov & Apweiler, 2001) e o Conserved Domain Database (Marchler-Bauer *et al.*, 2005) foram usados para analisar as regiões conservadas da seqüência primária da RBmTIM. Os números de acesso no GenBank das sequências usadas são respectivamente: AAH07086 (*Homo sapiens*), AAK85202 (*Danio rerio*), AAI02904 (*Bos taurus*) XP975493 (*Tribolium castaneum*) and XP321467 (*Anopheles gambiae*).

3.29 - Estrutura tridimensional

Para a obtenção da estrutura modelada foi realizada a comparação entre a seqüência prevista de aminoácidos da RBmTIM com todas as seqüências de TIM depositadas no PDB (protein data base). A TIM de humano foi utilizada como base para modelagem por apresentar o maior grau de identidade com a RBmTIM e ter a estrutura determinada a 2,8 Å. Com o emprego do programa Deep View Swing PDB viewer (<http://www.expasy.org/spdbv/>) e do servidor Swiss Model para proteínas oligoméricas (<http://swissmodel.expasy.org/>) foi gerado um modelo por homologia. Com este modelo inicial foi realizado minimização de energia (20 ps) para obtenção da estrutura mais estável com o programa GROMACS (<http://www.gromacs.org/>).

3.30 – Cristalização da RBmTIM

Para cristalização desta proteína foi utilizado o método “hanging-drop” com os kites de cristalização Crystal Screen I e II (Hampton Research). Inicialmente, 5 µL da solução da proteína 10mg

uma determinada condição de cristalização e então, os poços foram selados com silicone. Em seguida, as placas foram incubadas por 12 horas a 277 K e posteriormente transferida para temperatura de 291 K.

3.31 – Coleta dos dados da difração de Raios-X

Um cristal de proteína foi difratado em fluxo de nitrogênio usando o equipamento “Rigaku rotation anode source” e os dados foram coletados usando detector R-AXIS III. Para o criocongelamento dos cristais foi usado glicerol (30% v/v) como crioprotetor. Os cristais difrataram com resolução máxima de 2.4 Å.

3.32 – Redução dos dados da difração de Raios-X

Os dados de difração de raios-X foram integrados usando o programa Denso e as escalas feitas com o programa CCP4 suite versão 5.0.2. Os cristais apresentam sistema hexagonal, com provável grupo especial $P6_522$, com parâmetros de célula $a = b = 52.65$, $c = 278.27$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$. A substituição molecular foi realizado através do programa Molrep do CCP4 usando modelo 1HTIPDB da triose fosfato isomerase humana por ter 69 % de identidade com a RBmTIM e estrutura muito bem conhecida. Outras informações sobre o cristal da RBm-TIM estão na tabela 2.

4- RESULTADOS:

4.1- Metabolismo de glicose

O metabolismo de glicose tem papel essencial na fisiologia e desenvolvimento de todos os organismos vivos. A embriogênese do *R. microplus* é dividida metabolicamente em duas fases, baseando-se no balanço de glicose dentro do embrião (anexo I, figura 5): a primeira fase abrange da oviposição até a formação das células embrionárias caracterizada pelo consumo total de glicogênio armazenado no ovo (anexo I, figura 4) e a segunda fase, deste momento até a eclosão das larvas, caracterizada por intensa gliconeogênese provocando acúmulo de glicose (anexo I, figura 3A), guanina (produto de excreção de nitrogênio em aracnídeos) (anexo I, figura 3C) e glicogênio (anexo I, figura 4). A atividade específica de uma das enzimas fundamentais da gliconeogênese, a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), aumenta consideravelmente após a formação das células embrionárias no sexto dia de desenvolvimento (anexo I, figura 3B), reforçando a hipótese de que o acúmulo de glicogênio e glicose nesta fase seria provocado por intensa gliconeogênese.

A HK (anexo I, figura 1), a primeira enzima da via glicolítica, foi monitorada durante a embriogênese deste artrópode. A atividade desta enzima é alta até o terceiro dia, quando se inicia um declínio contínuo da atividade até o nono dia. Em seguida a atividade aumenta progressivamente até o vigésimo dia. A PK (anexo I, figura 1) tem a atividade específica baixa na primeira fase da embriogênese e após a formação das células torna-se progressivamente elevada. A principal enzima da via das pentoses-fosfato, a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (anexo I, figura 2), tem sua atividade máxima no quinto dia de desenvolvimento e posteriormente diminui a atividade específica a níveis basais até o final da embriogênese. A análise em conjunto das atividades de HK, PK e G6PDH leva à conclusão que a glicose-6-fosfato (G6P) formada pela HK ou proveniente da degradação do glicogênio na primeira fase segue preferencialmente a via das pentoses-fosfato gerando poder redutor (NADPH) para biossínteses redutivas e unidades fundamentais para síntese de nucleotídeos necessária para a formação das células embrionárias no sexto

dia. Após a formação do blastoderma celular acredita-se que o destino da G6P seja preferencialmente a glicólise para obtenção de energia na forma de ATP (anexo I).

4.2- Cinética de utilização de reservas energéticas

A cinética de utilização de macromoléculas como lipídeos totais (anexo II, figura 4 A), proteínas (anexo II, figura 5) e carboidratos totais (anexo II, figura 4 B) durante a embriogênese do *R. microplus* apresentam importantes correlações com eventos morfológicos marcantes da embriogênese deste carrapato.

O conteúdo total de lipídeos (anexo II, figura 4 A) permanece estável até o quinto dia. Posteriormente ocorre um decréscimo de aproximadamente 50 % no sétimo dia, permanecendo sem mudanças significativas até o final da embriogênese. Esta abrupta diminuição do conteúdo de lipídeos totais coincide com as modificações morfológicas que ocorrem do blastoderma celular até a segmentação do embrião. Com relação ao conteúdo de carboidratos totais (anexo II, figura 4 B) observa-se uma cinética de mobilização semelhante aos dos lipídeos totais. No entanto o conteúdo de açúcares permanece constante até o sétimo dia e posteriormente a concentração diminui 36,6 % até o nono dia permanecendo estável até a eclosão.

Interessantemente o conteúdo de proteínas totais (anexo II, figura 5) permanece constante durante toda embriogênese. No entanto, a concentração da vitelina (VT), a proteína majoritária de embriões ovíparos, que no *R. microplus* representa aproximadamente 80 % do conteúdo de proteínas totais no primeiro dia, apresenta um decréscimo em torno de 15 % do primeiro para o quarto dia momento onde ocorre a formação do sincício acelular e outro declínio de 20 % do décimo quinto para o décimo oitavo dia de desenvolvimento, a larva eclode com aproximadamente 60 % do conteúdo de vitelo inicial (anexo II figura 5 e (Logullo *et al.*, 2002).

4.3 - Parâmetros respiratórios dos embriões de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Recentemente mostramos que os ovos de *R. microplus* consomem oxigênio de forma diferenciada durante o desenvolvimento embrionário (anexo II, Figura 2). Este consumo aumenta significativamente após a formação das células embrionárias (anexo I Figura 5).

Posteriormente isolou-se mitocôndrias acopladas do nono dia do desenvolvimento, ou seja, o gradiente eletroquímico de prótons acoplado a síntese de ATP. Neste ensaio, usamos como substratos oxidativos: o piruvato e a prolina que vem foram descritos como um importante combustível energético para insetos (Scaraffia & Wells, 2003). No entanto, não há relato na literatura mostrando que esta molécula sirva como substrato energético para carrapatos. Rotenona foi utilizada para inibir o complexo I mitocondrial e como consequência, observa-se a inibição do consumo de oxigênio. Quando adiciona-se succinato (substrato para o complexo II) e ADP vê-se um elevado consumo de oxigênio provocado pela intensa síntese de ATP, este momento é conhecido como estado 3. O consumo de oxigênio nesta fase é inibido por oligomicina que bloqueia a porção F_o da F_oF_1 ATP sintase. O ionóforo FCCP é capaz de restabelecer o consumo de oxigênio, pois provoca dissipação do gradiente eletroquímico de prótons (figura 6).

O potencial de membrana mitocondrial foi medido usando safranina O e mostrou-se que os substratos piruvato, prolina e succinato aumentam o potencial de membrana e que o ADP causa um decréscimo do potencial de membrana, FCCP foi usado para promover o colapso do potencial de membrana (figura 7).

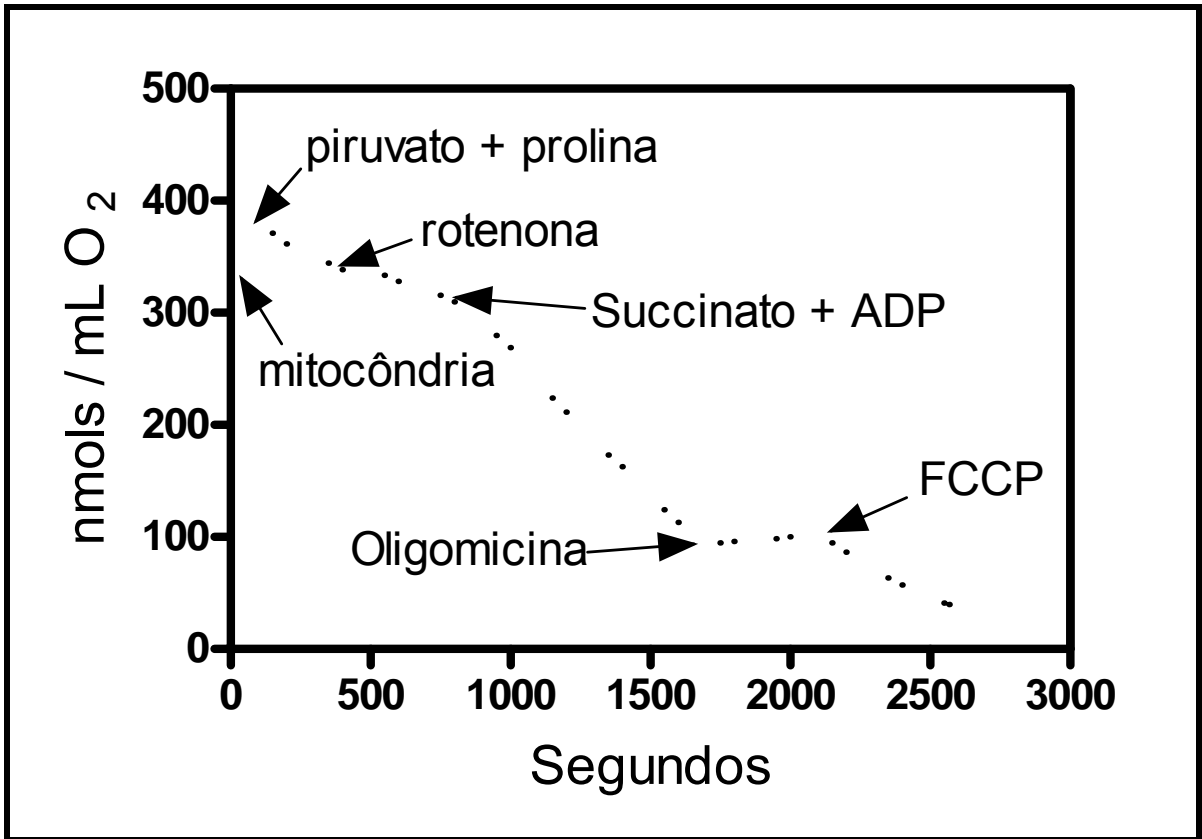


Figura 6: Respiração mitocondrial de embriões de *R. microplus* no 9^o dia de desenvolvimento.

Os parâmetros respiratórios foram determinados em mitocôndrias isoladas dos ovos em meio de respiração contendo albumina sérica bovina essencialmente livre de ácidos graxos a 28^oC. O consumo de oxigênio foi monitorado através de um eletrodo sensível a oxigênio (eletrodo de Clark) em pH 7,2.

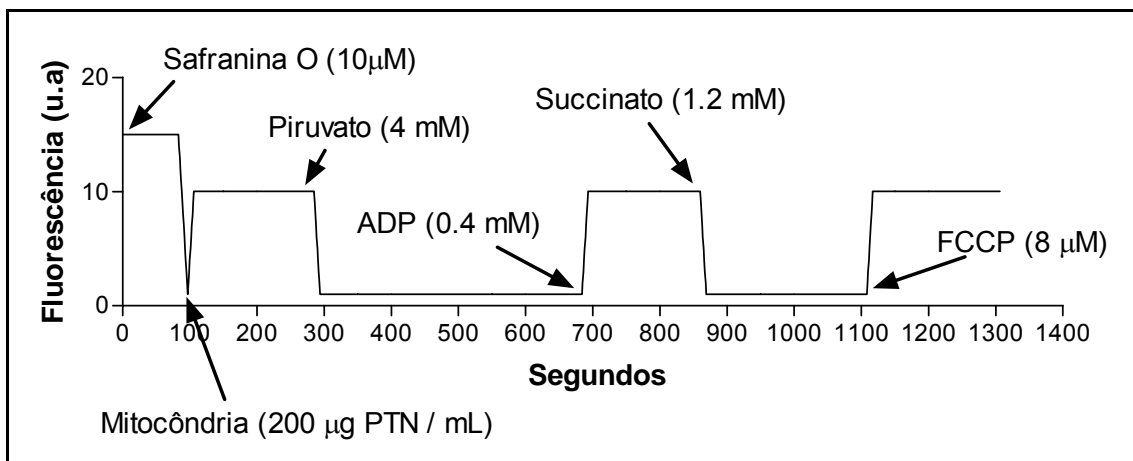


Figure 7: Potencial de membrana mitocondrial de embriões de *R. microplus*.

O potencial de membrana da mitocôndria foi medido usando o sinal catiônico da safranina-O em embriões com 14 dias de desenvolvimento. Piruvato (4 mM) e succinato (1,2 mM) foram usados para ativar o potencial de membrana e ADP (0,4 mM) foi usado para diminuir o potencial de membrana e FCCP (8 μM) foi usado como controle.

4.4- Metabolismo de aminoácidos.

No metabolismo de aminoácidos foi monitorada a atividade de duas enzimas importantes do catabolismo de aminoácidos. A aspartato aminotransferase (AAT), que é capaz de converter o aspartato diretamente a oxaloacetato, para ser utilizado pela gliconeogênese, não apresenta atividade detectável na primeira fase do desenvolvimento embrionário. Após a formação das células embrionárias, a atividade de aspartato aminotransferase (AAT) torna-se progressivamente elevada (figura 8). A glutamato desidrogenase (GDH) (figura 9), responsável pela deaminação oxidativa dos aminoácidos, apresenta-se com um padrão semelhante à AAT, reforçando nossa hipótese de que realmente após a celularização, inicia-se uma intensa degradação de aminoácidos.

A análise de aminoácidos livres foi realizada em cromatografia circular em papel que nos permite avaliar suas variações por grupos. Os resultados mostram que há variação da quantidade de todos os grupos durante a embriogênese. O íon amônio (NH_4^+), aumenta seus níveis na primeira fase da embriogênese e na segunda fase seus níveis ficam constantes (figura 10). O grupo 2 representado pelos aminoácidos histidina, arginina e lisina aumenta seus níveis entre o primeiro e o quinto dia, em seguida seus níveis decaem progressivamente até o final da embriogênese (figura 11). O grupo 3 representado pelos aminoácidos, glicí



Figure 8: Atividade de aspartato aminotransferase durante a embriogênese do *R. microplus*.

A atividade de aspartato aminotransferase foi medida em TRIS-HCl 50 mM pH 7.4, contendo L-aspartato (40 mM), NADH (0.15 mM), malato desidrogenase (0.63 U / mL). A reação foi iniciada com α -ketoglutarato (7 mM) e a oxidação NADH foi monitorada em espectrofotômetro a 340 nm. Uma unidade da enzima é a quantidade que utiliza 1 μ mol de substrato por minuto nas condições do ensaio. As barras indicam desvio padrão de quatro medidas independentes.

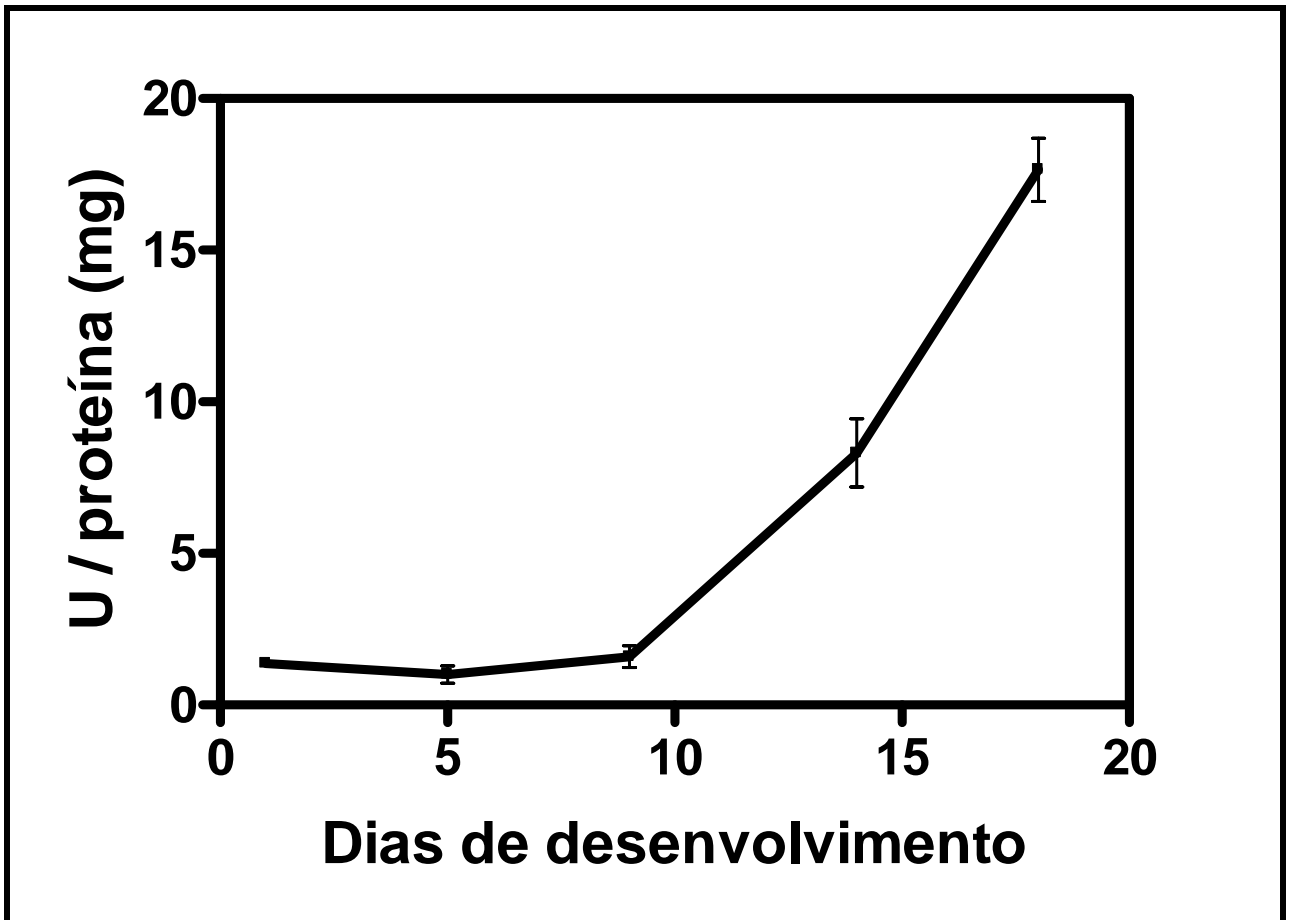


Figure 9: Atividade de glutamato desidrogenase durante a embriogênese do *R. microplus*.

A atividade de glutamato desidrogenase foi medida em TRIS-HCl (80 mM), contendo EDTA (8mM), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (55mM), NADH (0.3 mM), ADP (2.5 mM), pH 7.6. A reação foi iniciada com α -cetogluturato (4 mM) e oxidação do NADH foi monitorada espectrofotômetro a 340 nm. Uma unidade da enzima é a quantidade que utiliza 1 μmol de substrato por minuto nas condições do ensaio. As barras indicam desvio padrão de três medidas independentes.

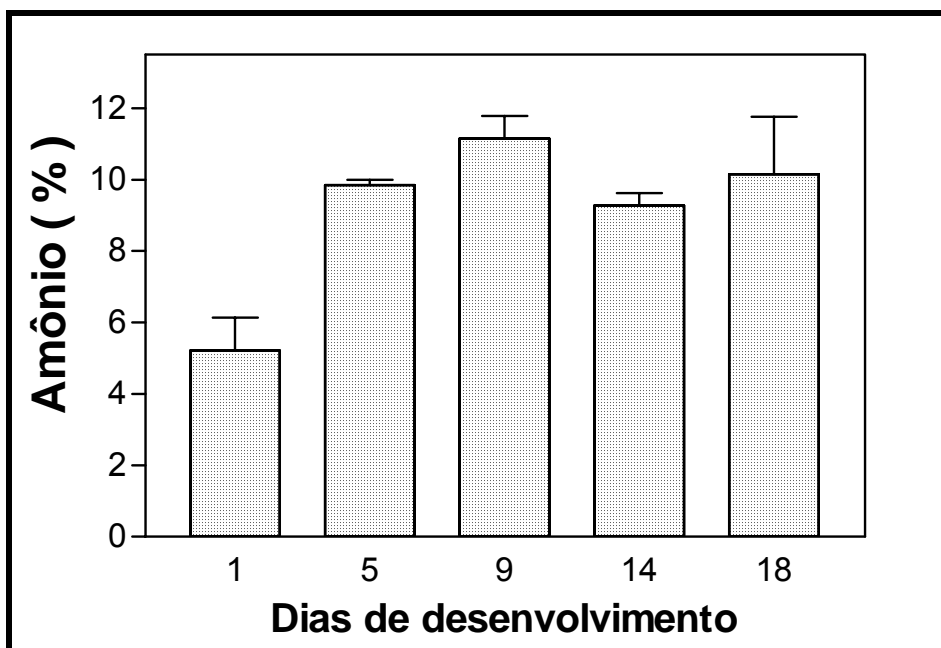


Figure 10: Análise de aminoácidos livres por grupos.

O íon amônio foi cortado do aminograma, transferido para tubos de ensaio e extraídos com 3 mL da solução extratora (solvente da ninidrina). A eluição dos grupos foi realizada com agitação rotatória na completa ausência de luz por 30 minutos e a absorbância foi lida em 520 nm. As barras indicam erro percentual de quatro medidas independentes.

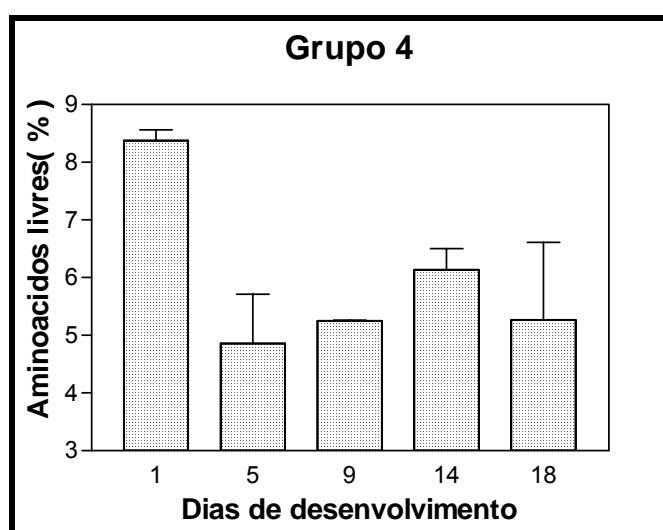
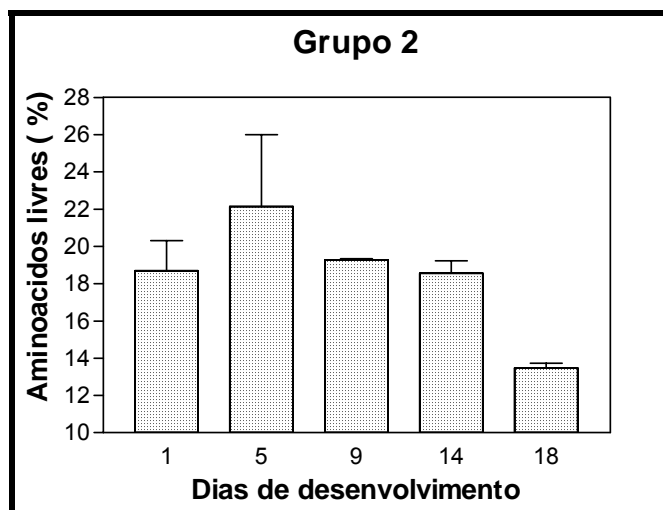


Figura 11: Análise de aminoácidos livres dos grupos 2 e 4.

Cada grupo cromatográfico foi cortado do aminograma, transferido para tubos de ensaio e extraídos com 3 mL da solução extratora (solvente da ninidrina). A eluição dos grupos foi realizada com agitação rotatória na completa ausência de luz por 30 minutos e a absorbância foi lida em 520 nm. O grupo 2 é composto pelos aminoácidos argina, histidina e lisina. O grupo 4 é composto pelos aminoácidos ácido glutâmico e treonina. As barras indicam erro percentual de quatro medidas independentes.

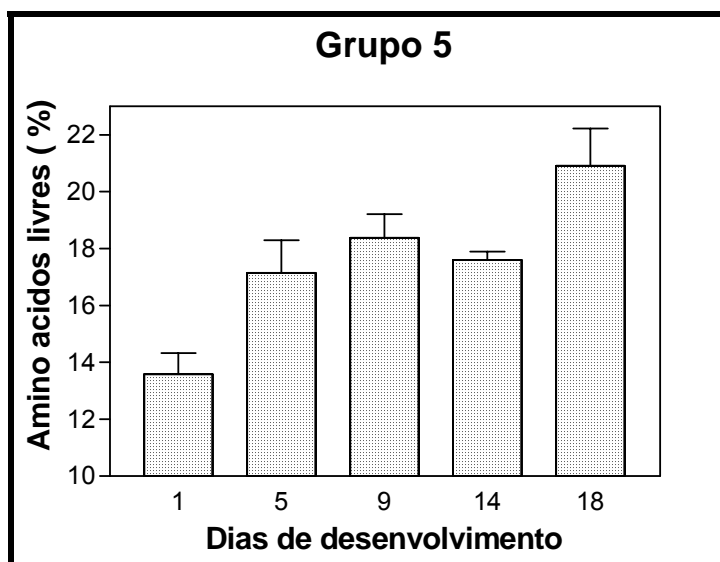
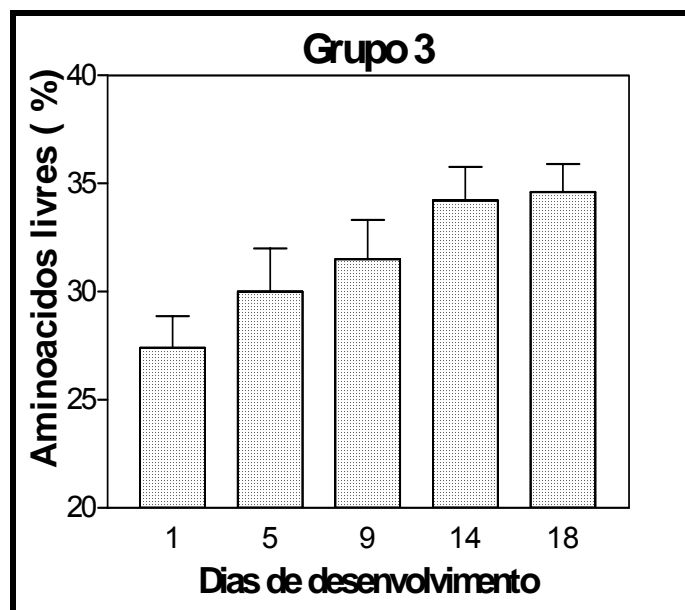


Figure 12: Análise de aminoácidos livres dos grupos 3 e 5.

Cada grupo cromatográfico foi cortado do aminograma, transferido para tubos de ensaio e extraídos com 3 mL da solução extratora (solvente da ninidrina). A eluição dos grupos foi realizada com agitação rotatória na completa ausência de luz por 30 minutos e a absorbância foi lida em 520 nm. O grupo 3 é composto pelos aminoácidos glicina, serina, ácido aspártico, asparagina, glutamina e hidroxiprolina. O grupo 5 é composto pelos aminoácidos prolina, alanina, tirosina e triptofano. As barras indicam desvio padrão de quatro medidas independentes.

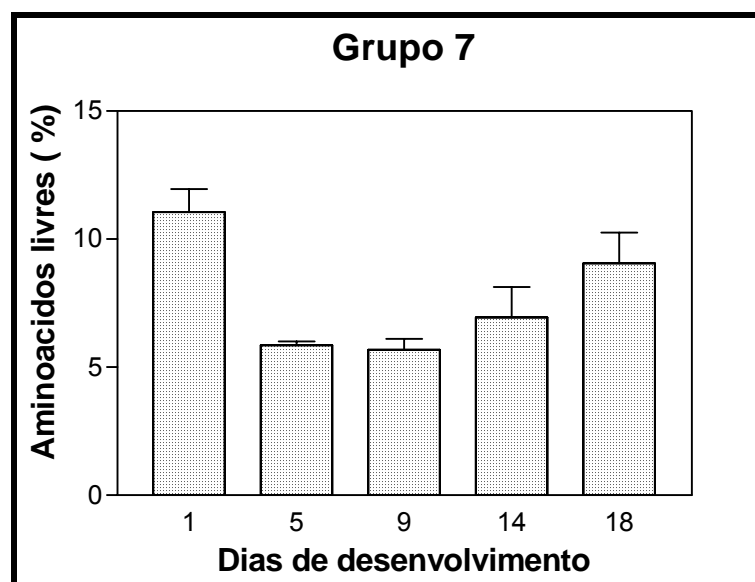
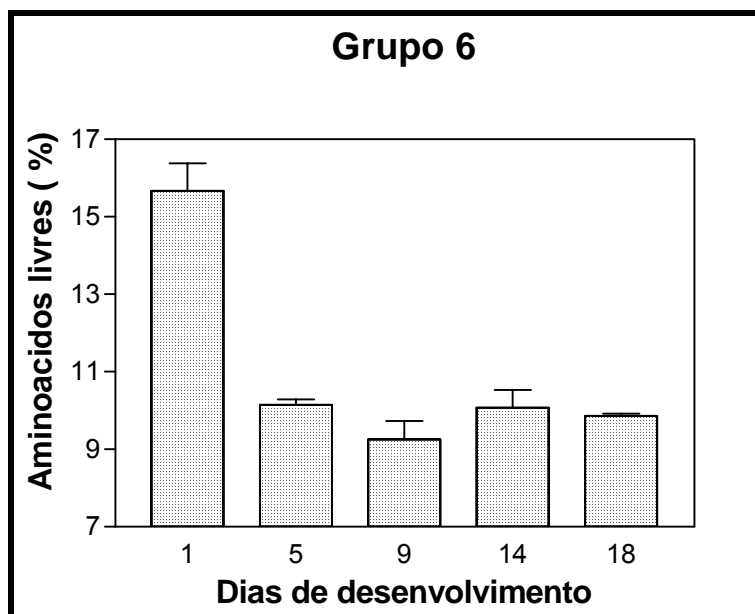


Figura 13: Análise de aminoácidos livres dos grupos 6 e7.

Cada grupo cromatográfico foi cortado do aminograma, transferido para tubos de ensaio e extraídos com 3 mL da solução extratora (solvente da ninidrina). A eluição dos grupos foi realizada com agitação rotatória na completa ausência de luz por 30 minutos e a absorbância foi lida em 520 nm. O grupo 6 é composto pelos aminoácidos valina, metionina e fenilalanina. O grupo 7 é composto pelos aminoácidos leucina e isoleucina. As barras indicam desvio padrão de quatro medidas independentes.

4.5 - Metabolismo de lipídeos.

Em relação ao metabolismo de lipídeos determinou-se a variação de concentração de lipídeos totais, que mostra grande diminuição na passagem da primeira para segunda fase do desenvolvimento, entre o quinto e o sétimo dia (anexo II, figura 4A).

Monitorou-se também a variação da concentração de acetoacetato (corpo cetônico) (figura 14) que mostra uma significativa diminuição na primeira fase da embriogênese e posteriormente um aumento do quinto para o sétimo dia. Isto coincide com o momento de maior consumo de lipídeos (anexo II, figura 4A) observado durante a embriogênese deste artrópode. A partir do nono dia ocorre um constante aumento nas concentrações de corpos cetônicos (figura 14).

A enzima lípase, que tem função fundamental na mobilização de triacilgliceróis, também foi medida durante a embriogênese do *R. microplus* (Figura 15). Observamos um acentuado aumento da atividade desta enzima do quarto até o décimo quinto dia. A partir do décimo segundo dia a atividade lipásica torna-se constante até o final da embriogênese (figura 15). Também monitorou-se a os principais lipídeos neutros e carregados, onde verifica-se que vários tipos de lipídeos estão sendo utilizados nas diferentes fases do desenvolvimento embrionário deste carrapato (figuras 16, 18).

As investigações mostram que os lipídeos neutros (Figura 16) detectados nos embriões em desenvolvimento são: monoacilglicerol (MAG), 1,3 - diacilglicerol (1,3 - DAG), 1,2 - diacilglicerol (1,2 - DAG), ácidos graxos (AG), triacilglicerol (TAG) e colesterol esterificado (CE). Os lipídeos polares (Figura 18) são formados por fosfatidilinositol (FI), fosfatidilcolina (FC), ácido fosfatídico (AF) e outros fosfolipídeos que não conseguimos determinar. A variação percentual dos lipídeos foi monitorada através de análise densitométrica computacional das TLCs para os lipídeos neutros 1,2-DAG e 1,3-DAG (figura 13).

Os níveis de 1,3-DAG apresentam aumento progressivo do primeiro ao décimo segundo dia, quando se inicia uma queda na concentração que dura até o final da embriogênese (figura 17). A concentração de 1,2-DAG está abaixo do limite de detecção do método entre o primeiro e quinto dia, no entanto, apresenta aumento do sétimo ao nono e queda entre o nono e o

décimo segundo dia, permanecendo constante até o décimo quinto dia, em seguida, a concentração aumenta entre o décimo quinto e o décimo oitavo dia da embriogênese (figura 17).

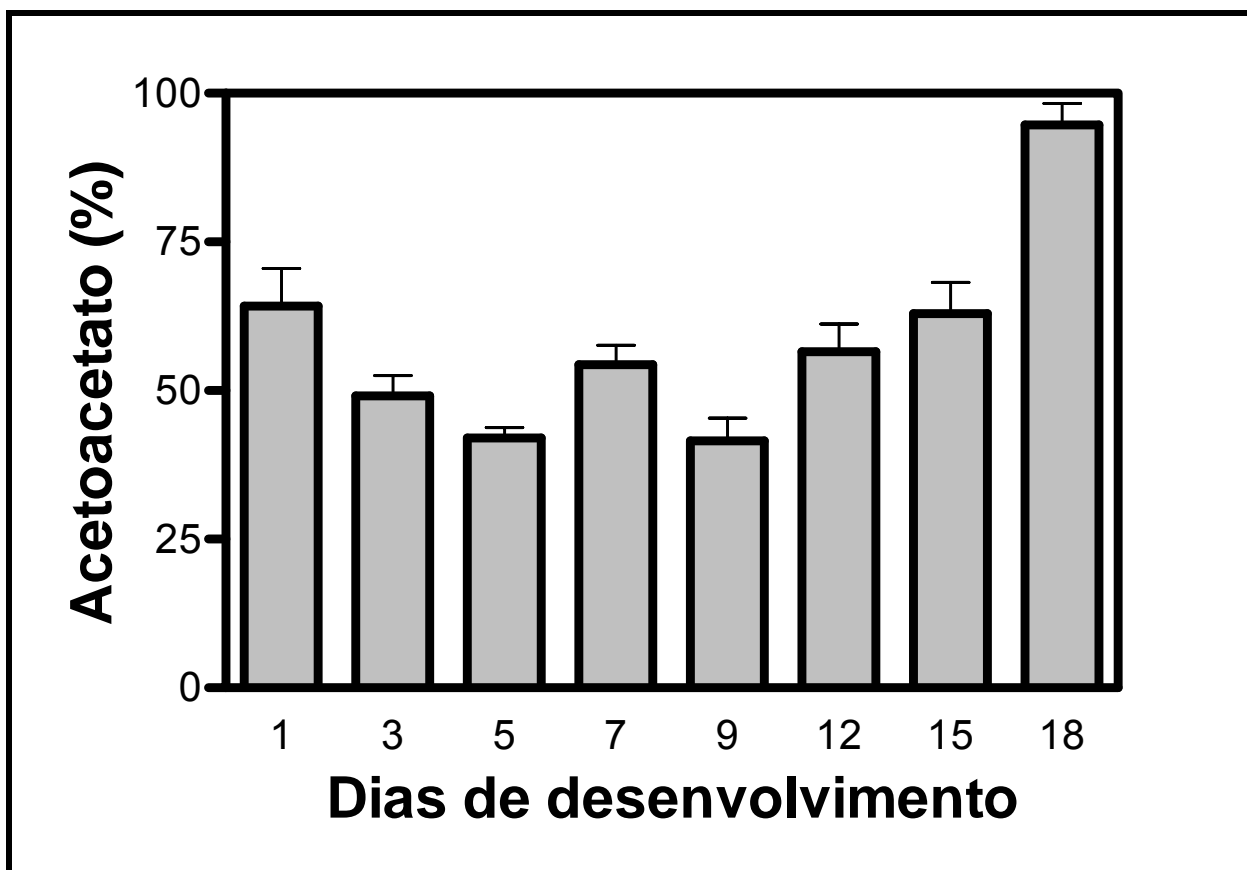


Figura 14 – Dosagem de acetoacetato nos ovos durante a embriogênese do *R. microplus*.

Ovos de diferentes dias foram homogeneizados em TCA 5 %, em banho de gelo, e centrifugados a 3000 X g por 10 min. 1 mL do sobrenadante foi utilizado para a reação, iniciada com 0,5 mL de acetato de sódio 1,4 M, seguido de 3 mL de diazoreagente (Materiais e Métodos). Após incubação por 30 min a temperatura ambiente, a reação foi interrompida com 1 mL de HCl 5 N, seguido da adição de 2 mL de acetato de etila. A porcentagem de acetoacetato foi determinada a 460 nm. As barras indicam desvio padrão de três medidas independentes.

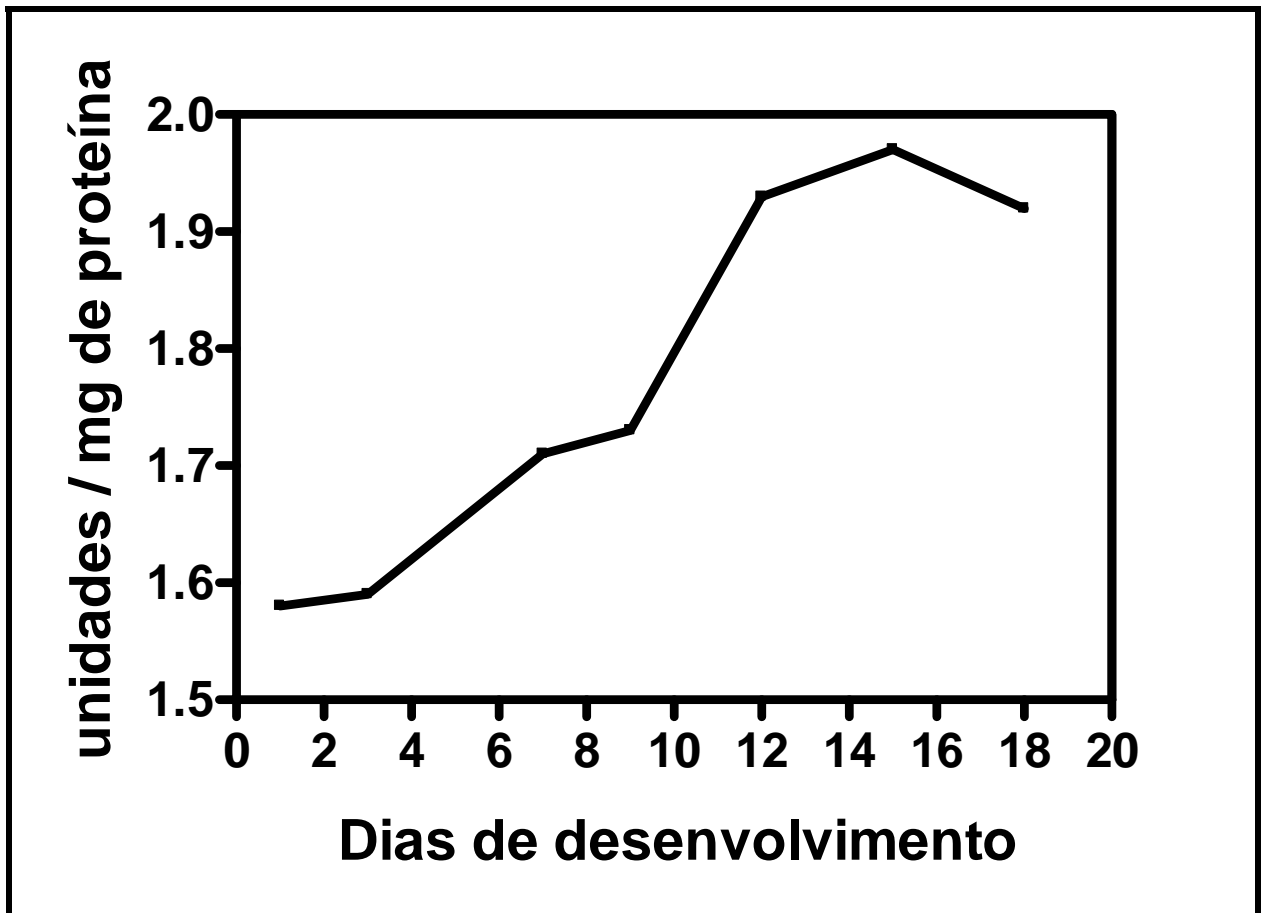


Figura 15 – Dosagem da atividade lipásica nos ovos do carrapato bovino *R. microplus* em diferentes dias do desenvolvimento embrionário.

A atividade desta enzima foi determinada através de titulação potenciométrica (Materiais e Métodos). As barras indicam média de duas medidas independentes.

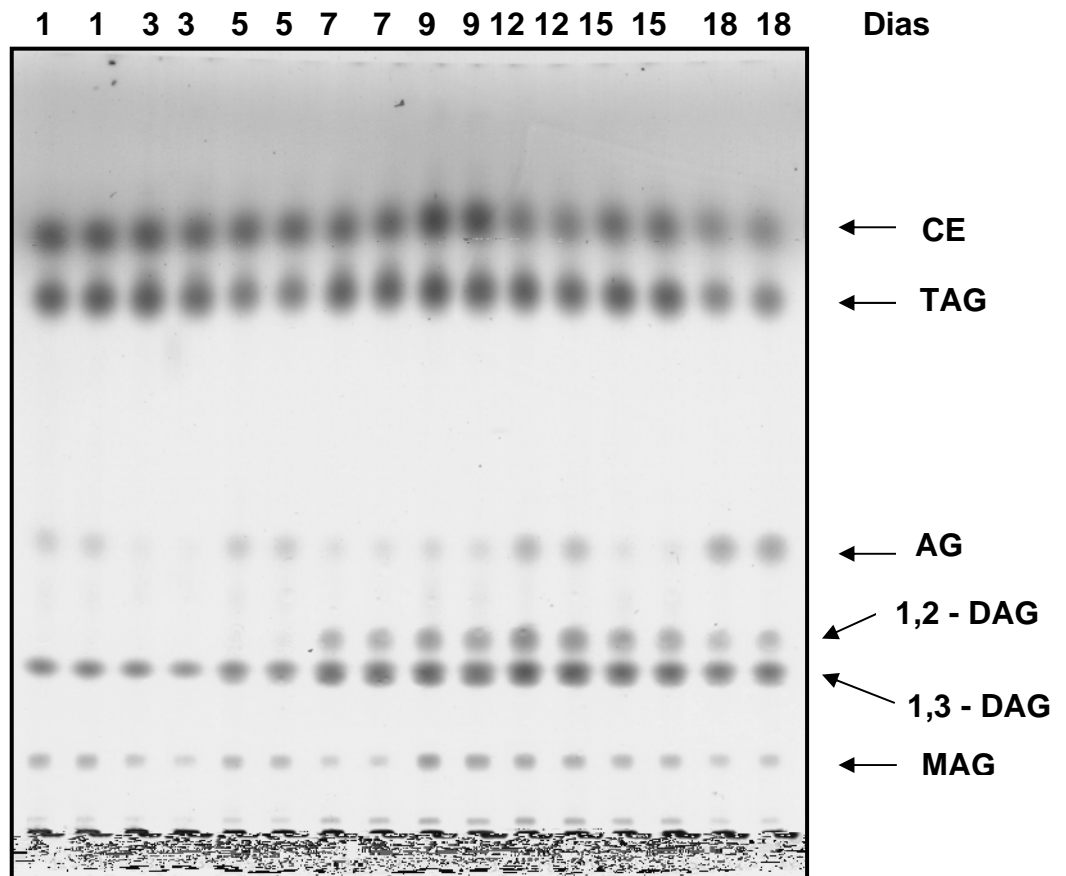
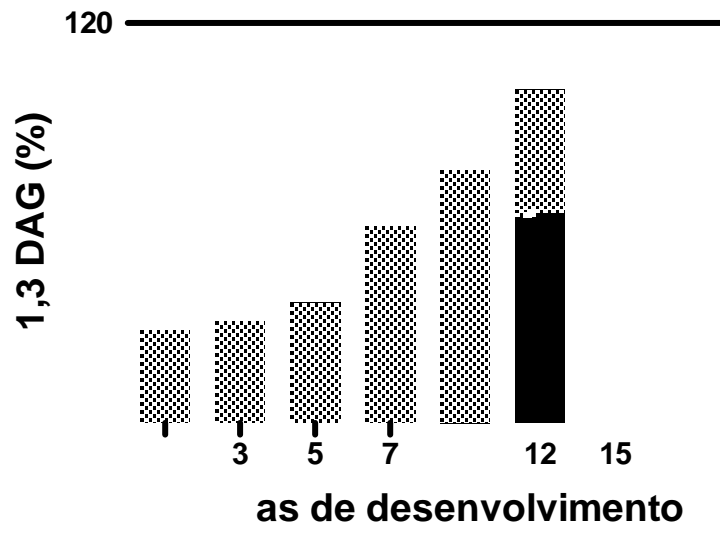


Figura 16 – Análise de lipídeos neutros presentes nos ovos em desenvolvimento do carrapato bovino *R. microplus*.

Os lipídeos foram extraídos e analisados através de cromatografia de camada fina em sílica, utilizando uma mistura de solventes para análise de lipídeos neutros. As amostras foram aplicadas em duplicata. Os números indicados nas raias representam os dias ao longo do desenvolvimento embrionário. **MAG**, monoacilglicerol; **1,3 - DAG**, 1,3 - diacilglicerol; **1,2 - DAG**, 1,2 - diacilglicerol; **AG**, ácidos graxos; **TAG**, triacilglicerol; **CE**, colesterol esterificado.



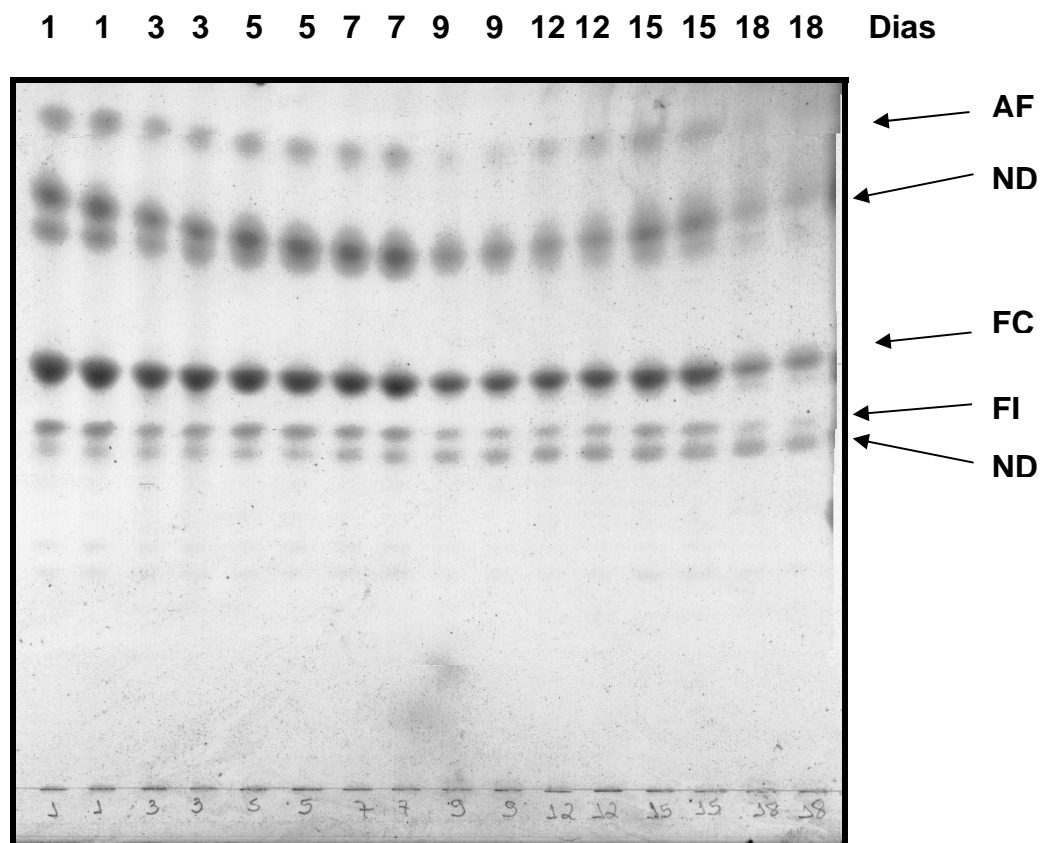


Figura 18 – Análise de fosfolipídeos presentes nos ovos em desenvolvimento do carrapato bovino *R. microplus*.

Os lipídeos foram extraídos e analisados através de cromatografia de camada fina em sílica, utilizando uma mistura de solventes para análise de fosfolipídeos (Materiais e Métodos). As amostras foram aplicadas em duplicata. Os números acima da figura indicam os dias ao longo do desenvolvimento embrionário. **FI**, fosfatidilinositol; **FC**, fosfatidilcolina; **AF**, ácido fosfatídico; **ND**, não determinado.

4.6 – A TIM de embriões de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

A atividade específica da TIM no primeiro dia da embriogênese é aproximadamente 20 U diminuído até o quinto dia quando atinge 10 U, ou seja, reduz em 50 %. Após a formação das células embrionária a atividade específica da TIM aumenta progressivamente, de 15 U no sétimo dia até atingir aproximadamente 60 U no vigésimo dia. Nossa hipótese para este aumento é que nesta segunda fase da embriogênese a TIM está acompanhando o fluxo preferencial da gliconeogênese (figura 19).

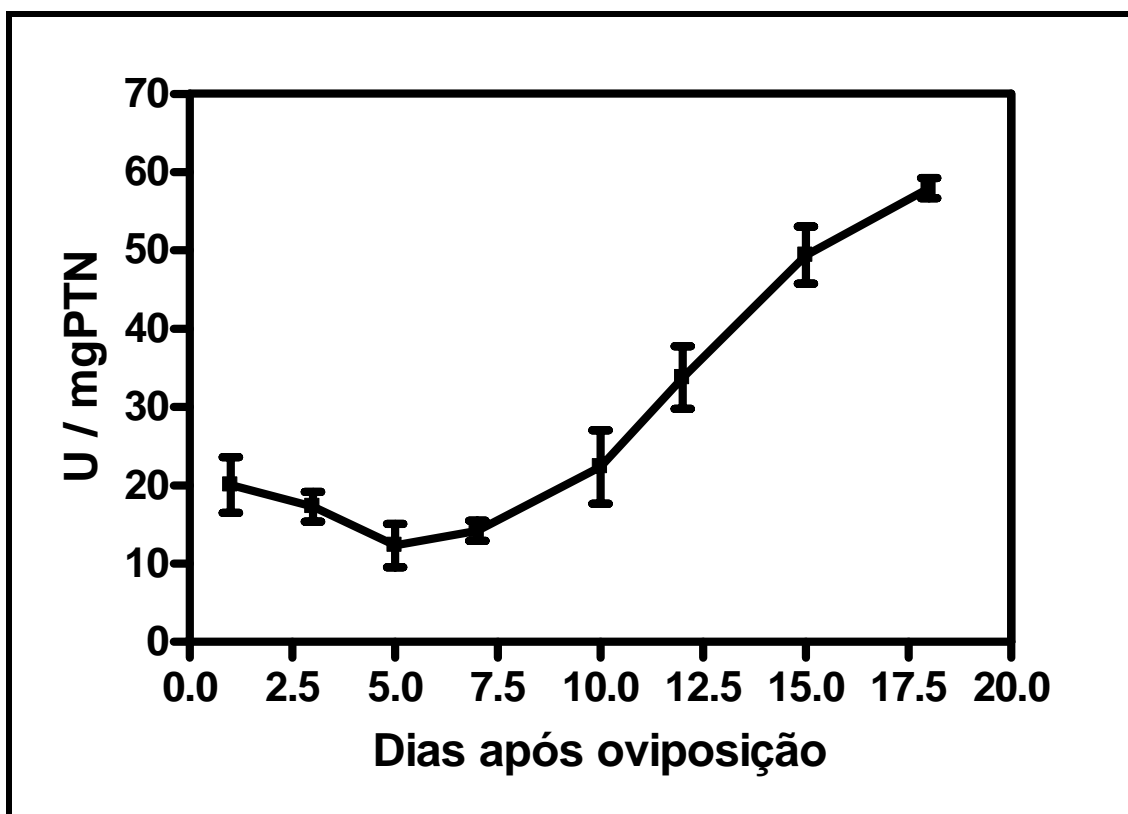


Figura 19: Atividade da Triose fosfato isomerase durante a embriogênese do *R. microplus*.

A atividade de triose fosfato isomerase foi medida na direção da formação de dihidroxiacetona fosfato como descrito em materiais e métodos. A reação foi iniciada com 2,4 ng da enzima e a oxidação do NADH foi monitorada em espectrofotômetro a 340 nm. Uma unidade da enzima é a quantidade que utiliza 1 μ mol de substrato por minuto nas condições do ensaio. As barras indicam desvio padrão de quatro medidas independentes.

4.7 – Clonagem, análise da seqüência e modelagem molecular da RBmTIM

A estratégia para clonagem do gene da RBmTIM foi utilizar a técnica de RT-PCR e utilizar par de primers específicos para o ATG inicial (start codon) e TAG final (stop codon). O produto de 750 pb foi amplificado a partir do cDNA obtido de ovos do décimo dia de desenvolvimento. Este produto foi seqüenciado e encontramos total identidade com uma seqüência da TIM presente no TIRG *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Gene Index e com alta similaridade com TIMs de diferentes organismos (figura 20). A seqüência da triose fosfato isomerase foi depositada no GenBank com número de acesso EF014474 (anexo IV).

A seqüência deduzida da RBmTIM contém 249 aminoácidos com peso molecular de 27,188 kDa por subunidade e ponto isoelétrico 7,69. Usando a ferramenta “domain research” do programa InterProScan foram detectados domínios característicos da superfamília das proteínas TIM. Esta seqüência também mostra que esta proteína apresenta nove resíduos de cisteína por monômero, o maior teor deste resíduo em todas as TIMs conhecidas.

Obtivemos algumas informações importantes da estrutura modelada: Das 18 cisteínas existentes no dímero, apenas o par cisteína 43 e cisteína 51 estão em uma distância de 3.8 Å, que permitiria a estes resíduos fazerem pontes dissulfetos intramonômeros (Figura 21) e o resíduo conservado cisteína 217 é o mais exposto a solventes (Figura 22). O grau de identidade com outras TIMs é em torno de 60-80% (dados não mostrados) e 66,3 % idêntica a seqüência da TIM de bovino da espécie *Bos taurus* depositada no GenBank.

O monômero da RBmTIM foi comparado com o monômero da TIM de boi e analisado o posicionamento espacial das cisteínas, onde observa-se que os resíduos de cisteína 43, 66, 126 e 217 da RBmTIM têm um resíduo correspondente na TIM de boi e que os resíduos 7, 25, 51, 86 e 143 são resíduos não conservados exclusivamente presentes na RBmTIM (figura 23).

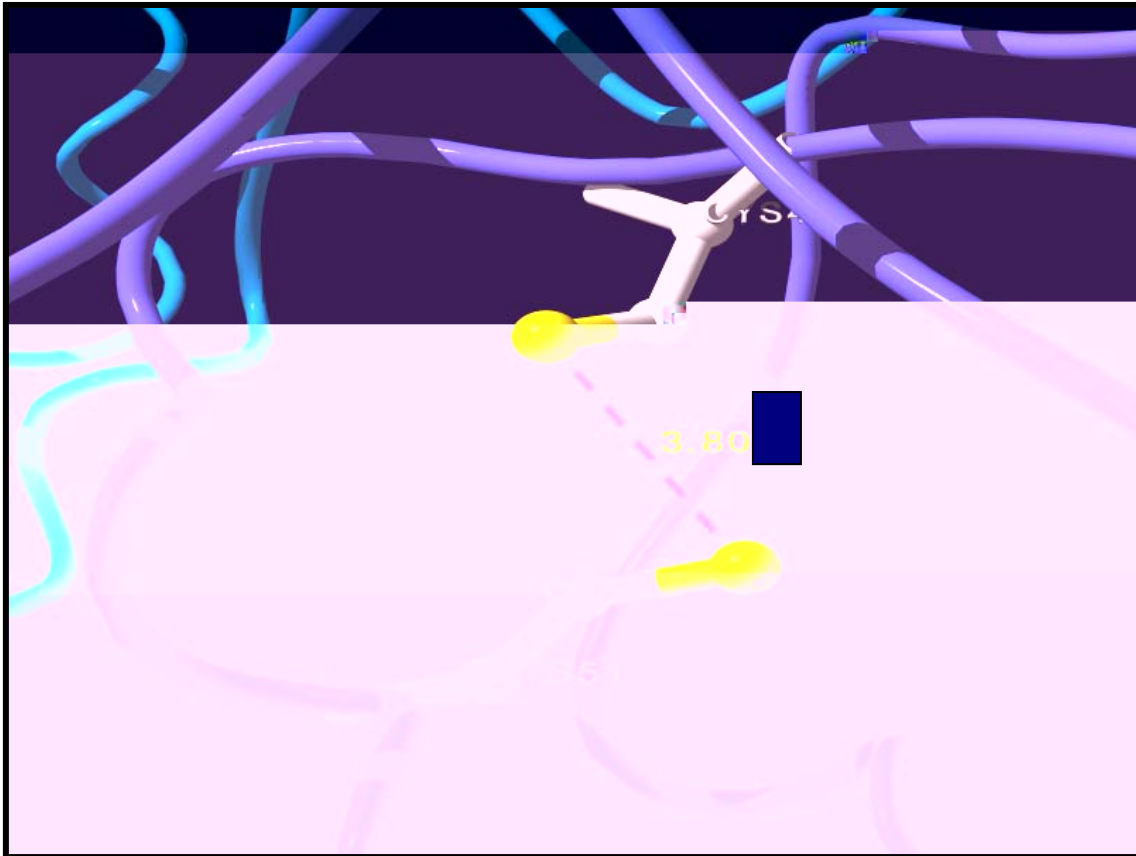


Figura 21: Estrutura tridimensional da TIM de embriões de *R. microplus*.

Detalhe da estrutura modelada mostrando que as cisteínas 43 e 51 estão a 3.8 Å (distancia S-S), sugerindo uma possível ponte dissulfeto intramonômero. A estrutura modelada foi obtida como descrito em materiais e métodos utilizando os programas Deep View Swing PDB Viewer , Swiss Model e GROMACS.

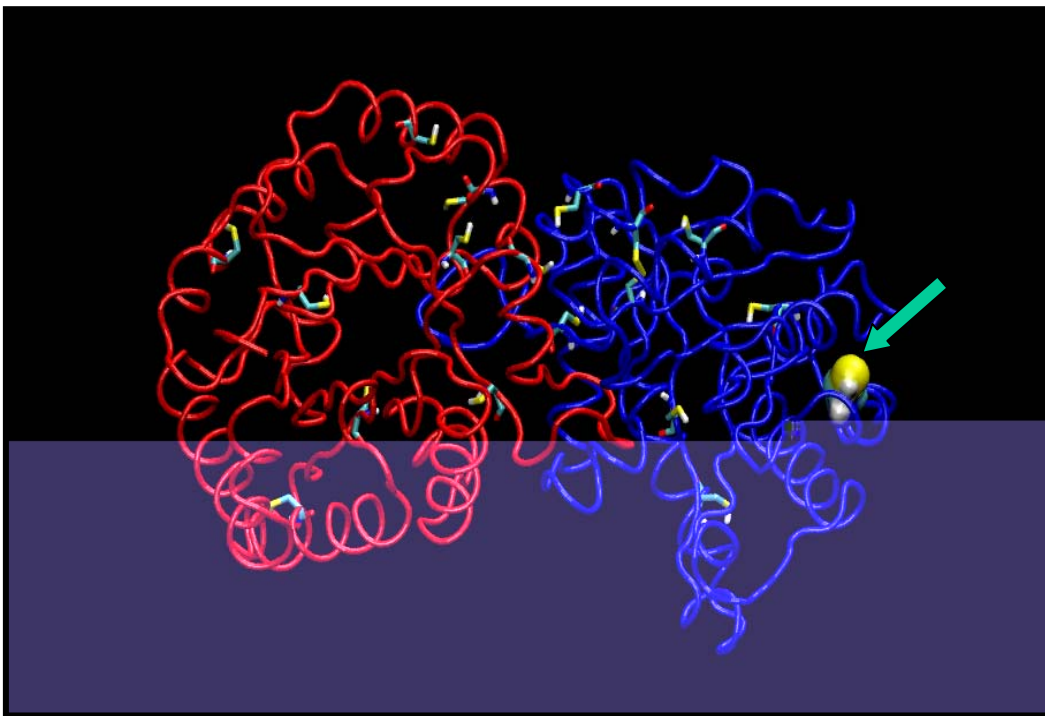


Figura 22: Estrutura tridimensional teórica da TIM de embriões de *R.microplus*.

Estrutura tridimensional da TIM Bm mostrando que a cisteína 217 (seta verde) monômero A está exposta a solventes. A estrutura tridimensional foi obtida como descrito em materiais e métodos utilizando os programas Deep View, Swiss PDB Viewer, Swiss Model e GROMACS.

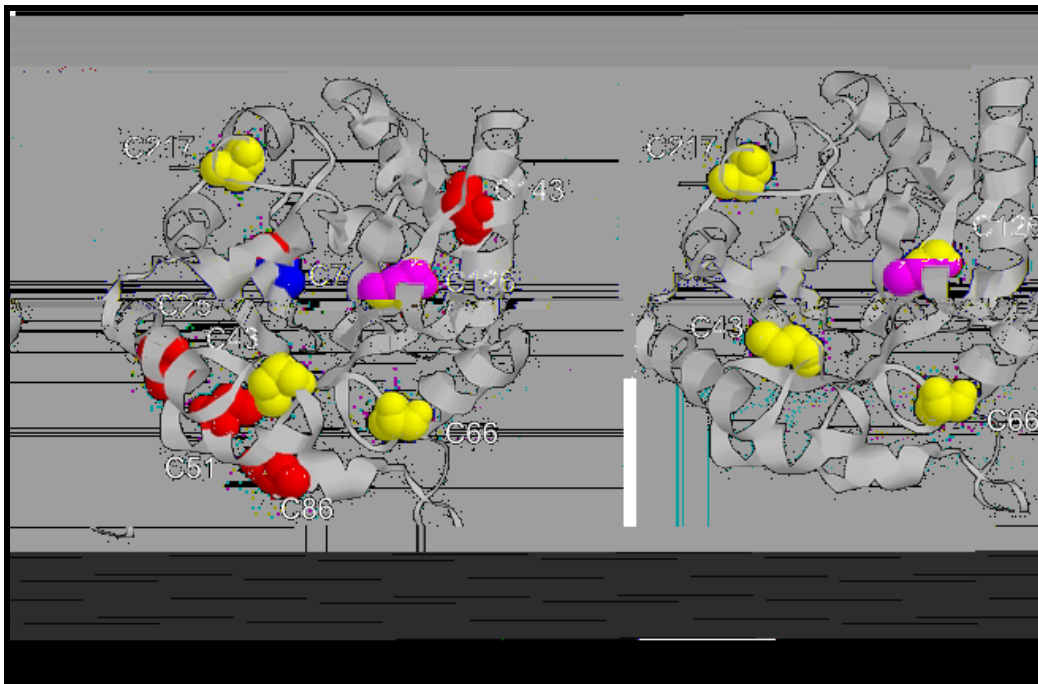


Figura 23: Estrutura tridimensional das subunidades da RBmTIM e da TIM de boi.

Detalhe da estrutura modelada mostrando que os resíduos de cisteínas grifados em amarelo são conservados entre estas espécies e os resíduos de cisteínas grifadas em vermelho são evolutivamente não conservados na RBmTIM. A estrutura modelada foi obtida como descrito em materiais e métodos utilizando os programas Deep View Swing PDB Viewer , Swiss Model e GROMACS.

4.8 – Expressão da RBmTIM.

O plasmídeo pET3a contendo o gene da RBmTIM foi transformado em bactéria *E. coli* da cepa BL21(DE3)pLysS e a RBmTIM foi otimamente expressada pela *E. coli* na forma solúvel após a indução com 1mM de IPTG. O acompanhamento em SDS-PAGE 11 % mostra uma banda majoritária com 27 kDa no sobrenadante proveniente do homogeneizado destas células (dados não mostrados).

4.9– Purificação e atividade da RBmTIM.

A RBmTIM foi purificada como especificado em materiais e métodos. O último passo da purificação foi a utilização de coluna troca iônica aniônica Mono-Q de alta resolução. Os passos da purificação foram acompanhados através de SDS-PAGE 11 % (figura 24). A proteína RBmTIM foi eluída pura com um rendimento de 6 mg / L de cultura bacteriana.

A RBmTIM com alto teor de pureza foi usada em ensaios de atividade específica, onde esta enzima mostrou ter uma atividade em torno de 6622 $\mu\text{mols}/\text{min. proteína (mg)}$, bastante elevada se comparada a outros organismos como *T. cruzi* e *T. brucei* que têm atividades em torno de 3500 $\mu\text{mols}/\text{min. proteína (mg)}$. A atividade total e específica foi acompanhada em todos os passos da purificação mostrando um aumento da atividade específica e uma diminuição da atividade total (tabela 1).

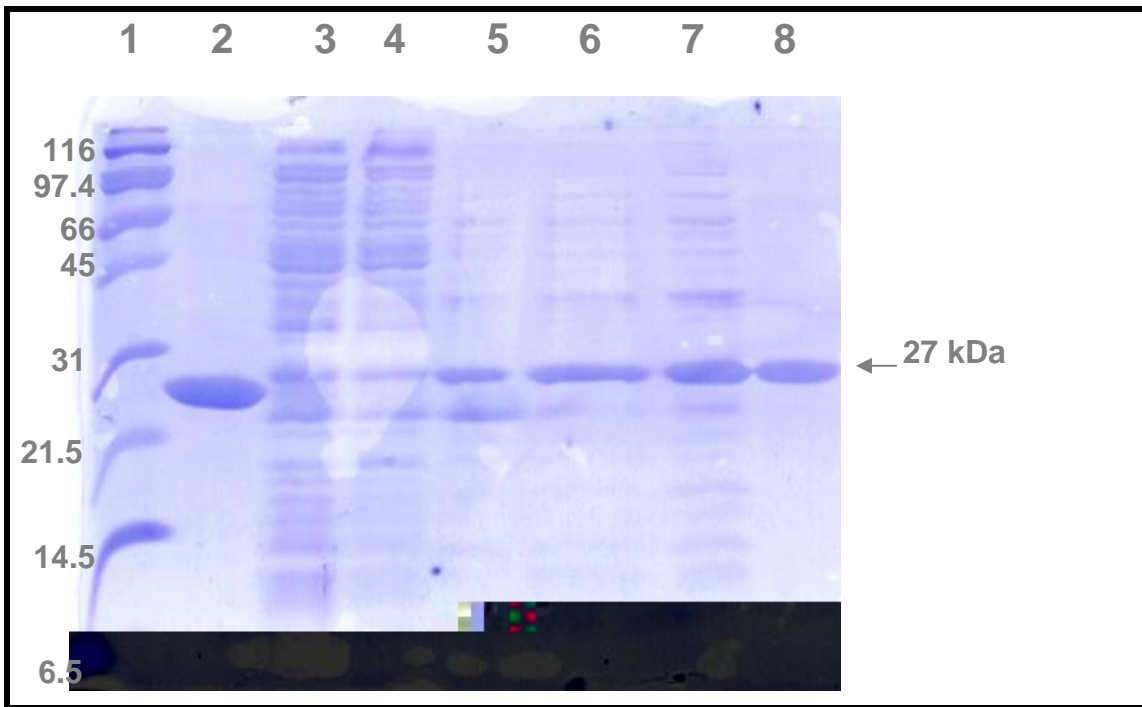


Figura 24: Obtenção da Tim recombinante de *R. microplus*.

O grau pureza da RBmTIM foi monitorado nas principais etapas da purificação por SDS-PAGE 16 % e posteriormente corados com azul de comassie. Os poços foram orientados na seguinte ordem: 1- padrão de peso molecular; 2- TIM de *Trypanosoma brucei*; 3- extrato celular bruto de *E.coli*; 4- extrato celular de *E.coli* sonificado; 5- sobrenadante da primeira centrifugação a 45000 x g por 1 hora; 6- sobrenadante após precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 7- precipitado em 75 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 8- Cromatografia Mono-Q.

	Homogeneizado	Sonicado	Sobrenadante	S45%	P75%	Mono - Q
Atividade específica ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteina}^{-1}$)	279.98 \pm 57.46	325.72 \pm 37.7	801.25 \pm 26.9	1390.07 \pm 5.62	1585.98 \pm 10.25	6880.56 \pm 48.44
Atividade total ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)	164549.09 \pm 33595.33	195509.37 \pm 13991.57	152699.64 \pm 3646.79	98403.29 \pm 398.31	89619.12 \pm 566.95	16444.53 \pm 115.77

Tabela 1: A atividade específica e total foram monitoradas em diferentes passos da purificação da RBmTIM.

A purificação da RBmTIM foi realizada como descrito em materiais e métodos. Nesta tabela vemos que a atividade específica aumenta e a atividade total diminui durante a purificação. O sinal (\pm) representa o desvio padrão de três medidas independentes.

4.10– Parâmetros cinéticos da RBmTIM.

A estabilidade da RBmTIM a 4°C foi determinada por quarenta e cinco dias e a atividade específica mantém-se praticamente inalterada por todo este período. Este fato é muito importante, pois permite que cada preparação desta enzima possa ser estocada e usada por longos períodos sem comprometimento do trabalho.

As constantes cinéticas K_m e V_{max} também foram medidas, mostrando valores muito similares a outras TIMs conhecidas. O valor de K_m foi 0.48 mM de G-3-P e a V_{max} 6.031 $\mu\text{mol} / \text{mim.mg PTN}$ (Figura 25).

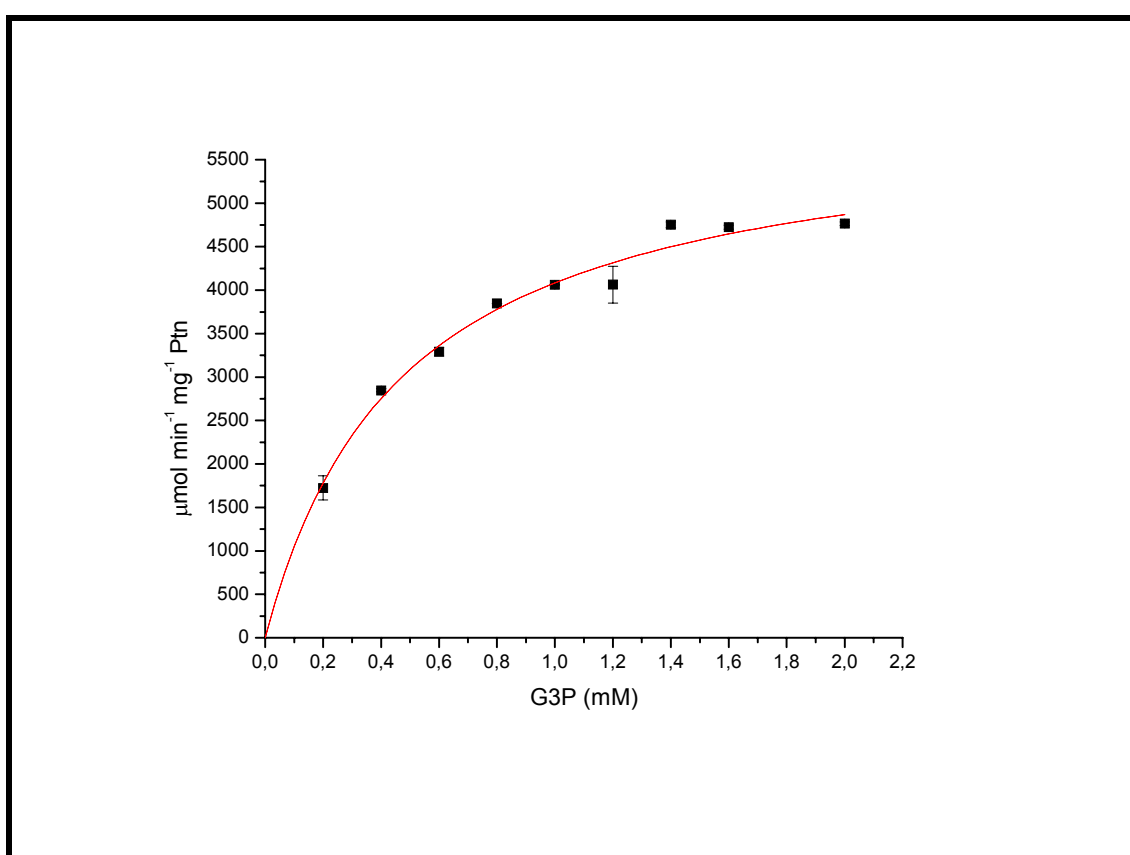


Figura 25: Parâmetros cinéticos da triose fosfato isomerase recombinante de embriões do *R.B. microplus*.

A atividade da RBmTIM foi determinada em diferentes concentrações do substrato G3-P como descrito em materiais e métodos. As constantes cinéticas K_m e V_{max} foram obtidas por regressão não linear de acordo com o modelo de Michaelis-Menten. As barras representam o desvio padrão de três medidas independentes.

4.11 – Parâmetros espectroscópicos da RBmTIM.

As propriedades espectroscópicas de fluorescência intrínseca (Figura 26) e dicroísmo circular (Figura 27) da RBmTIM também foram analisadas e mostraram muita semelhança quando comparada à outras TIMs descrita na literatura. Estes resultados nos faz acreditar que realmente a enzima recombinante RBmTIM se trata de uma proteína com estrutura com mesmo teor de folhas e α -hélices e, em forma de barril (β / α)₈, como são todas as TIMs conhecidas.

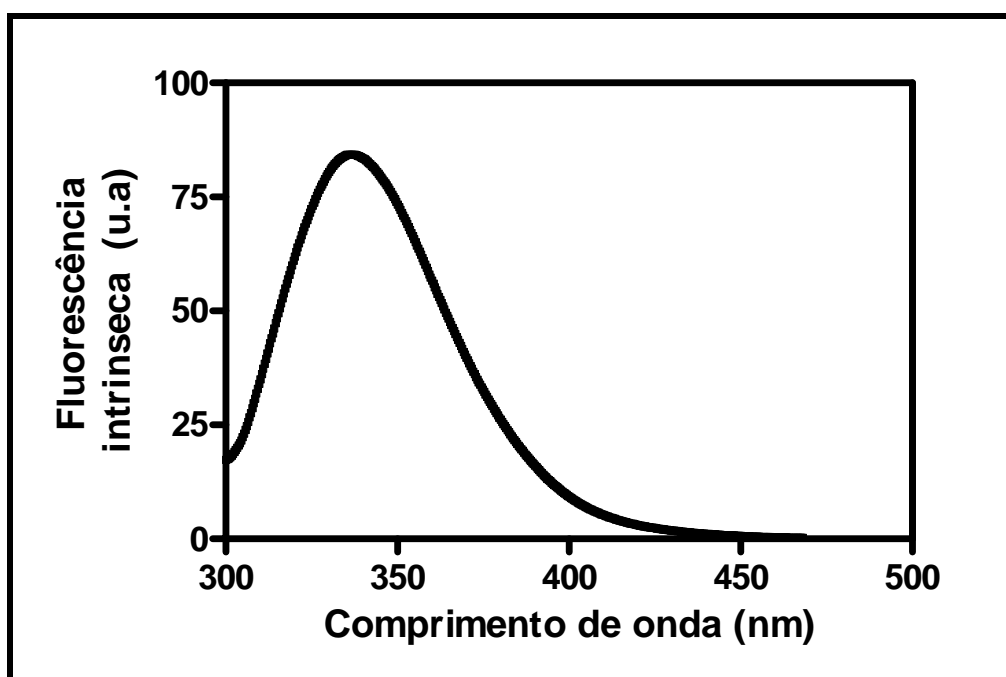


Figura 26: Emissão da fluorescência intrínseca da TIM de embriões de *R. microplus*.

O espectro de fluorescência foi realizado como descrito em materiais e métodos. O espectro de fluorescência é muito semelhante ao de outras TIMs previamente reportadas.

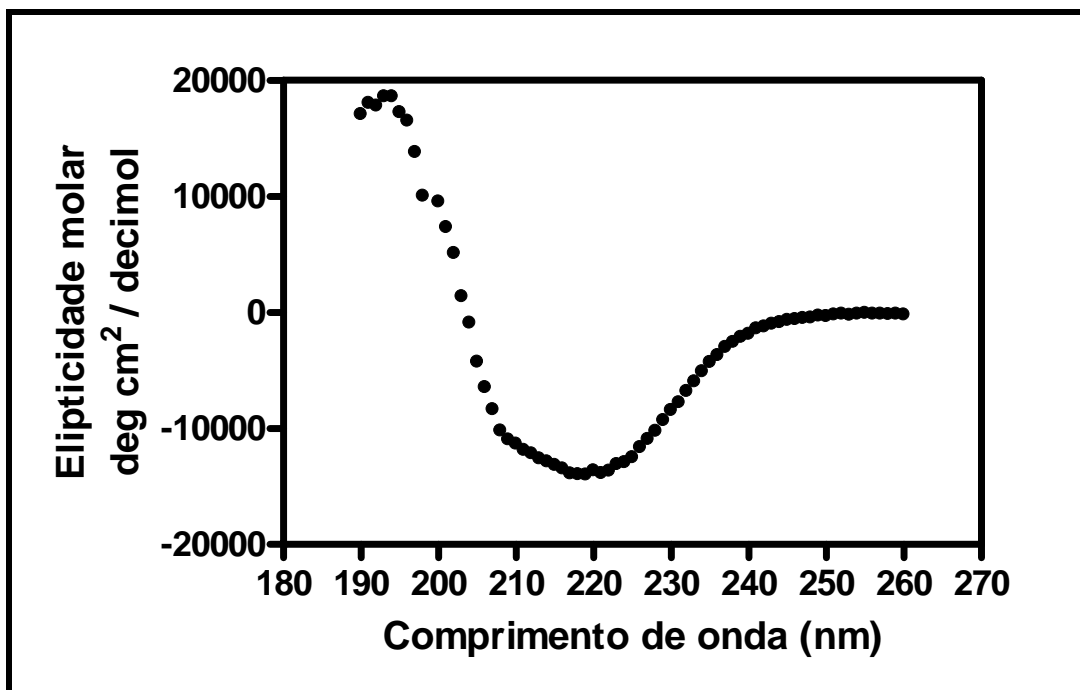


Figura 27: Dicroísmo circular da TIM de embriões de *R. microplus*.
O espectro de dicro

Dataset (programa Denzo)	
grupo espacial	P6522
Mosaiticidade	0.800
Rmerge	0.096 (0.356*)
Completeness	99.8 (99.90*)
I/sigma	7.3 (2.1*)
Multiplicidade	5.2 (5.3*)
N ^o . Total de observações	41353 (5917*)
N ^o . Total de únicas	8018 (1113*)
Unidade Assimétrica:	um dímero
Resolução máxima:	2.4 A
Resolução útil	2.6 A

Tabela 2: Informações obtidas da difração de raios-X do cristal da RBmTIM.

A coleta de dados da difração de raios-X foi realizada usando programa Denzo e as escalas feitas com programa CCP4 suite versão 5.0.2.

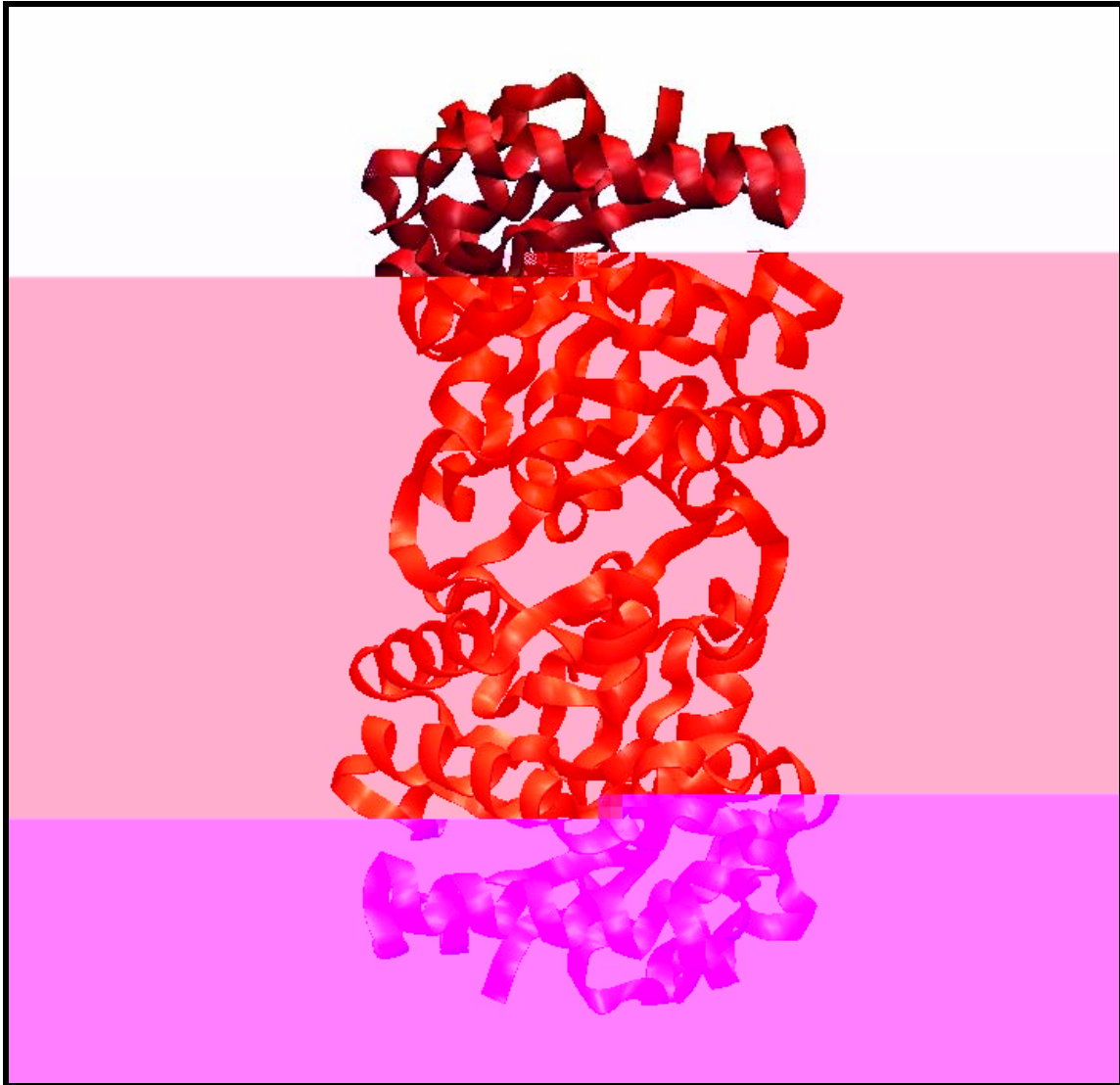


Figura 28: Estrutura tridimensional obtida através da difração do cristal da TIM de embriões de *R. microplus*.

Análise da estrutura 3D da RBmTIM mostrando é um homodímero, onde cada monômero é formado por 8 folhas- β unidas a 8 α -hélices por alças. A estrutura da RBmTIM é muito similar a estrutura de outras TIMs descritas previamente.

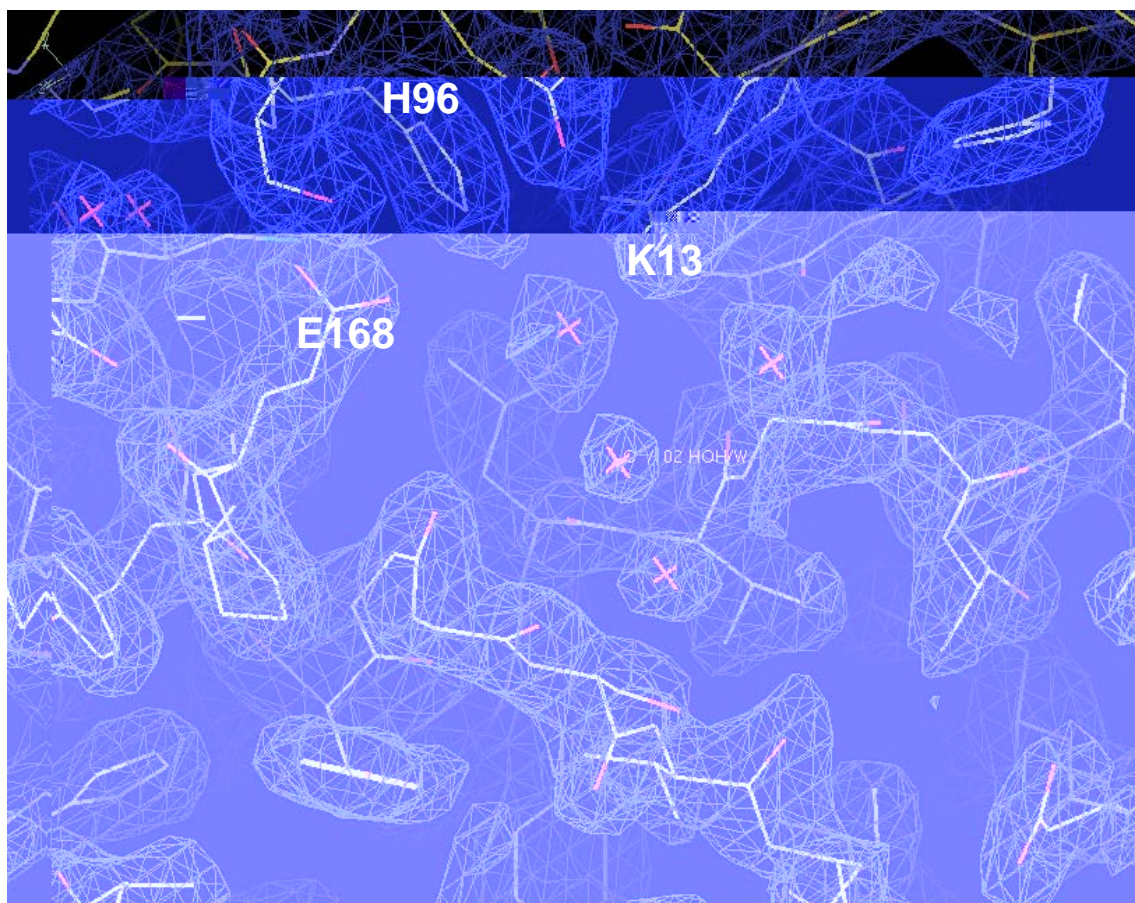


Figura 29: Mapa de densidade eletrônica do sítio ativo do monômero A.

A resolução da estrutura mostra os três resíduos catalíticos que são: Ácido glutâmico 168 (G168), lisina 13 (K13) e histidina 96 (H96) e que não há nenhum ligante no sítio ativo. A difração de R-X, coleta e redução de dados estão descritas em materiais e métodos.

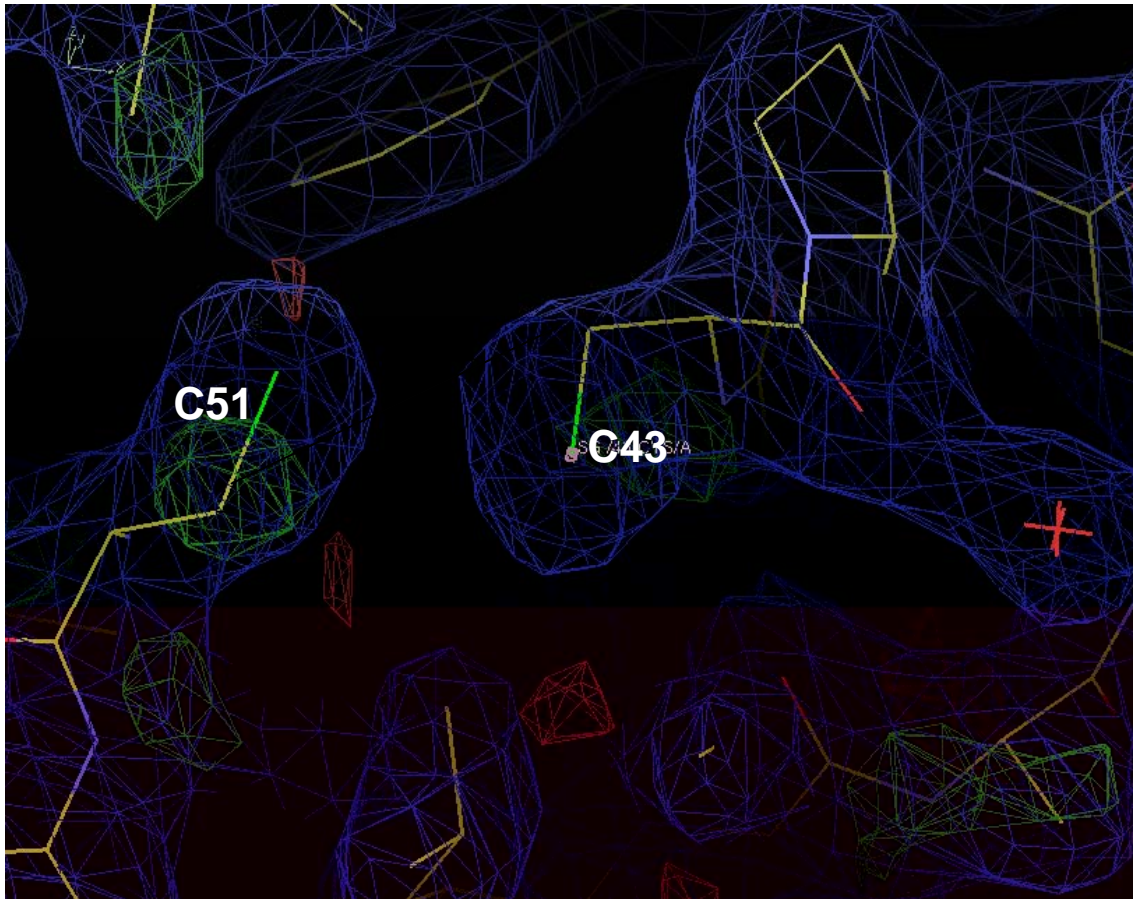


Figura 30: Mapa de densidade eletrônica das cisteínas 43 e 51 do monômero A.

A resolução da estrutura mostra os resíduos de cisteínas 43 (C43) e 51 (C51) que estão mais próximos entre si na estrutura da RBmTIM, estes resíduos se encontram a uma distancia de 3.4 Å e não formam ponte disulfeto. A difração de R-X, coleta e redução de dados estão descritas em materiais e métodos.

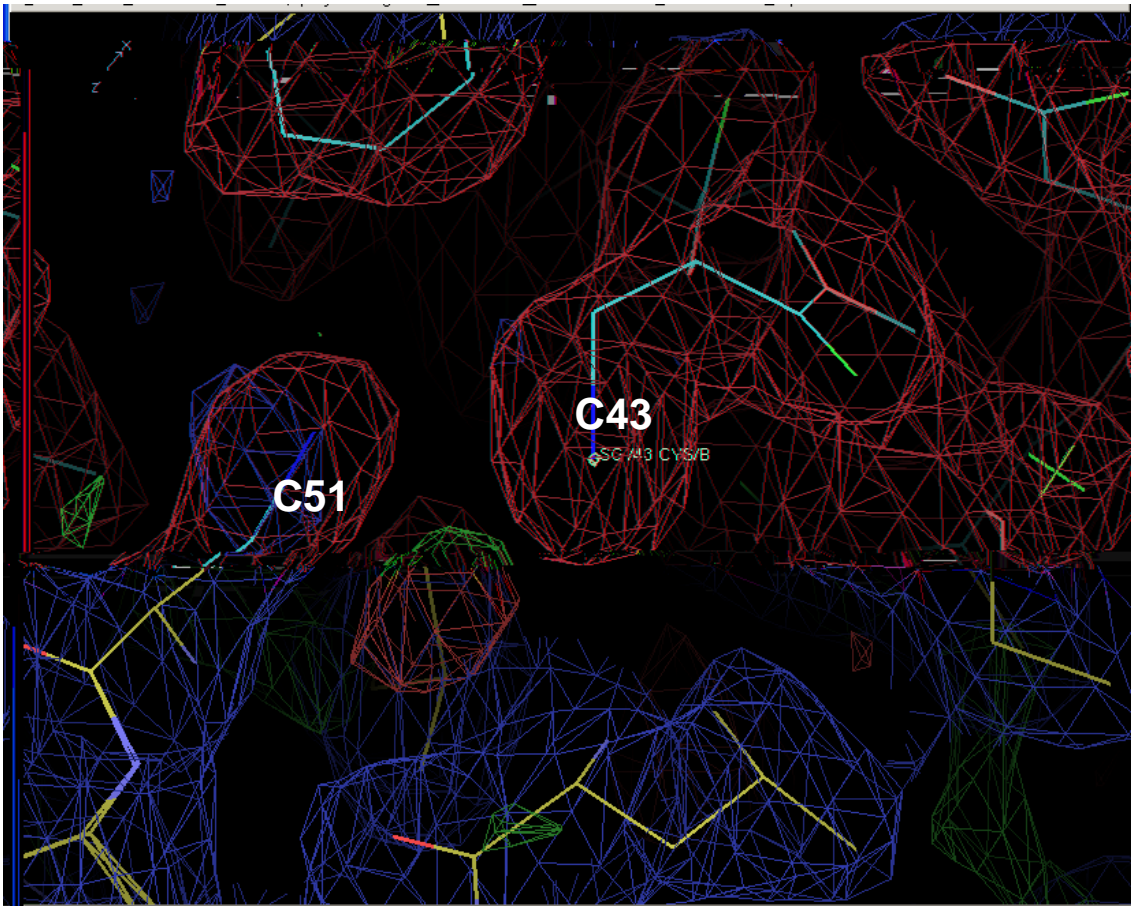


Figura 31: Mapa de densidade eletrônica das cisteínas 43 e 51 do monômero B.

A resolução da estrutura mostra os resíduos de cisteínas 43 (C43) e 51 (C51) que estão mais próximos entre si na estrutura da RBmTIM, estes resíduos se encontram a uma distancia de 3.55 Å e não formam ponte disulfeto. A difração de R-X, coleta e redução de dados estão descritas em materiais e métodos.

5 - DISCUSSÃO

A proposta de trabalho aqui apresentada iniciou-se a partir da quantificação de VT durante a embriogênese do *R. microplus* (Logullo *et al.*, 2002) & anexo II, figura 5. O intrigante naquele momento era o fato de, apesar de ter-se significativas reduções no conteúdo de VT durante a embriogênese, não eram observadas modificações no conteúdo total de proteínas. Este resultado sugeriu que se poderia ter um sistema de degradação de proteínas muito bem controlado e que isso estaria, de alguma forma, relacionado com a mobilização e síntese de outros metabólitos nestes embriões. Dentro deste contexto, procurou-se estudar a cinética de mobilização de importantes reservas energéticas como carboidratos totais, lipídeos totais e proteínas durante a embriogênese do *R. microplus*. Observam-se claramente importantes correlações entre eventos morfológicos e mobilização destas reservas (anexo I e II). No entanto, alguns pontos centrais do metabolismo energético como metabolismo de aminoácidos e metabolismo de lipídeos ainda não foram abordados nos anexos I e II.

Inicialmente concentrou-se esforços para o estudo do metabolismo de aminoácidos. Isso se deve a sugestão que os acúmulos de glicose, glicogênio e guanina, na segunda fase da embriogênese, seriam provocados por intensa atividade gliconeogênica. Esta hipótese está baseada no fato de ter-se gliconeogênese, determinada pela atividade e concomitante aumento de expressão de PEPCK, com correlação direta com o acúmulo de guanina.

A necessidade de se entender melhor o metabolismo de aminoácidos fez com que estudos mais aprofundados fossem desenvolvidos. Sabe-se que apesar de cada grupo de aminoácidos possuírem um caminho metabólico próprio de degradação, há um mecanismo comum de remoção do nitrogênio da molécula, através da ação das aminotransferases onde os aminoácido são divididos em duas partes: um esqueleto carbônico que é dirigido para a oxidação, geralmente como intermediário do Ciclo de Krebs, e a amônia, por ser muito tóxica, é inicialmente convertida em glutamato e posteriormente eliminada do organismo. Dentro deste contexto, a AAT tem função central, pois é capaz de converter aspartato mais -cetoglutarato em oxaloacetato mais glutamato. O destino do oxaloacetato, dependendo da situação metabólica, é

na maior parte das vezes a gliconeogênese e o glutamato é então submetido à ação da glutamato desidrogenase, que é responsável pela deaminação oxidativa desta molécula, onde o glutamato é convertido em α -cetoglutarato. O α -cetoglutarato pode ainda seguir o ciclo de Krebs ou participar de outras transaminações, e o amônio tóxico é eliminado na forma de uréia em mamíferos, amônia em peixes, ácido úrico em insetos (Scaraffia *et al.*, 2005) e guanina neste carrapato (Anexo I).

Apesar de não detectar-se atividade da enzima AAT na primeira fase do desenvolvimento embrionário, após a formação das células embrionárias (figura 8) torna-se progressivamente elevada até o final da embriogênese. Já a glutamato desidrogenase (GDH) (figura 9), responsável pela deaminação oxidativa dos aminoácidos, apresenta-se com um padrão de atividade semelhante à AAT, reforçando nossa hipótese de que realmente após a celularização, inicia-se uma intensa degradação de aminoácidos. É importante ressaltar que as atividades destas enzimas acompanham a atividade de PEPCK (anexo I, figura 3B).

O metabolismo de aminoácido é amplamente estudado em mosquitos, que se alimentam de sangue de vertebrados que é pobre em lipídeos e carboidratos e rico em proteínas (Pennington *et al.*, 2003). No momento da digestão da porção protéica do sangue pelo inseto são formados expressivos níveis do aminoácido prolina na hemolinfa. A explicação para este fato é que este aminoácido pode estar servindo de estoque temporário de amônia derivada da deaminação de aminoácidos e transformada em uma espécie nitrogenada não tóxica (Pennington *et al.*, 2003).

Uma outra situação em que o metabolismo de aminoácido está bastante envolvido nos insetos é o vôo, que requer demanda energética elevada e para melhor mobilização de moléculas energéticas há a necessidade de cooperação e coordenação de vários tecidos. Scaraffia & Wells (2003), mostraram em *Aedes aegypti* que o músculo de vôo pode utilizar o aminoácido prolina produzido pelo corpo gorduroso como uma importante fonte de energia. Neste trabalho os autores propõem que a função da prolina seja levar unidades de acetil-Coa do corpo gorduroso para o músculo de vôo (Scaraffia & Wells, 2003). Este acetil-Coa é derivado principalmente de ácidos graxos, glicose ou catabolismo de aminoácidos que são inicialmente convertidos a α -cetoglutarato

através do ciclo do ácido cítrico. O α -cetoglutarato é posteriormente convertido em prolina ainda no corpo gorduroso. A prolina é secretada para a hemolinfa e transportada até o músculo de vôo, onde é re-convertida em α -cetoglutarato que entra no ciclo de Krebs para ser oxidado e produzir ATP (Scaraffia & Wells, 2003) (figura32).

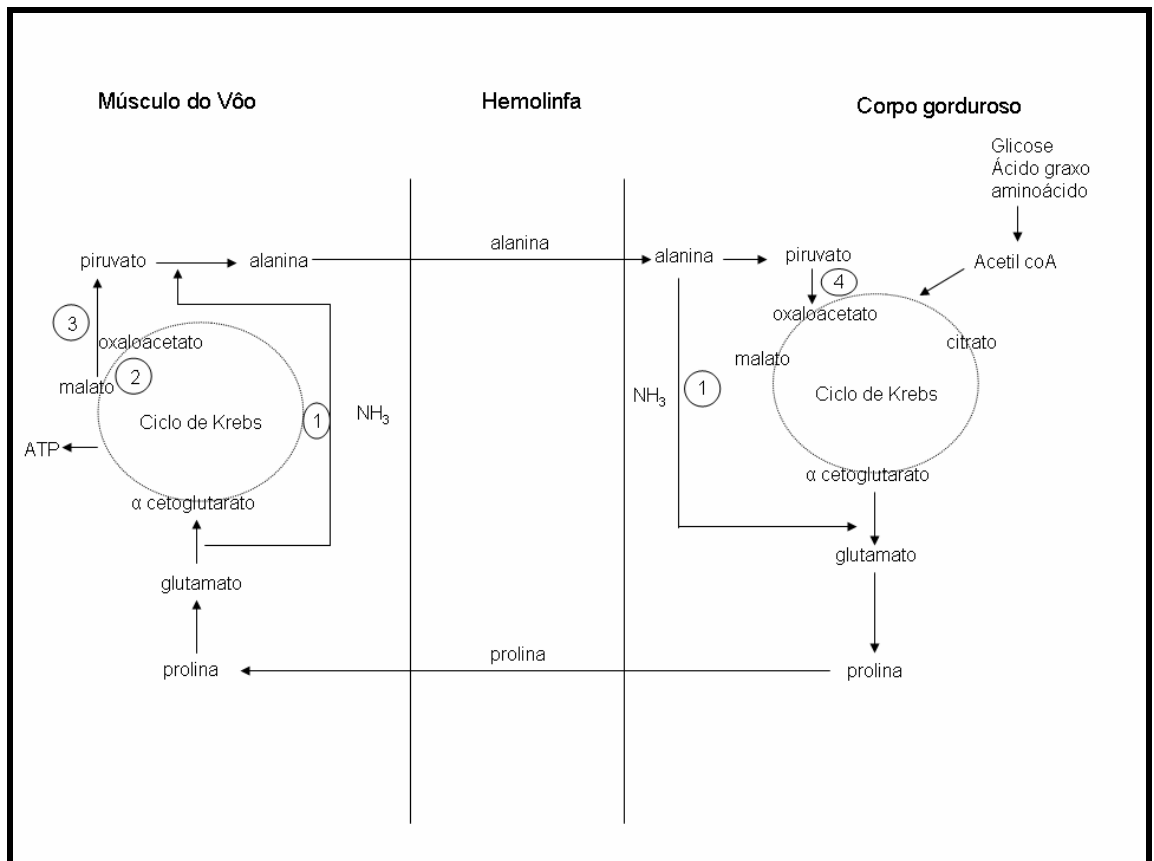


Figura 32: Prolina pode ser usado como substrato energético durante o vôo em mosquito. Adaptado de Scaraffia & Wells (2003). Os números 1, 2, 3 e 4 representam as enzimas alanina aminotransferase, malato desidrogenase, enzima malica NAD^+ dependente e piruvato carboxilase, respectivamente.

Durante a embriogênese do carrapato de camelo *Hyalomma dromedari* no 12º dia de desenvolvimento deste carrapato, a prolina livre nos embriões apresenta níveis extremamente baixos coincidentemente com os níveis extremamente altos de α -cetoglutarato. Os autores sugerem que a prolina livre pode ser uma fonte de acúmulo de α -cetoglutarato que estaria sendo utilizado no ciclo de Krebs, para posterior produção de energia na respiração,

mostrando que a prolina pode ser uma importante fonte energética neste carrapato e também um transportador temporário de amônio proveniente da deaminação de outros aminoácidos (Fahmy *et al.*, 2004).

Alguns grupos de aminoácidos chamam atenção, na embriogênese do *R. microplus*, pelas suas quantidades. O íon amônio (NH_4^+) (figura 10) aumenta seus níveis na primeira fase da embriogênese e se mantém constante durante toda a segunda fase. Fica evidente que é necessário um mecanismo de eliminação desta molécula, uma vez que a mesma é tóxica em altos níveis. Sabe-se que guanina é o produto de excreção de nitrogênio em aracnídeos (Linton *et al.*, 2005), porém é possível que o excesso tóxico desta molécula (NH_4^+) seja convertido em guanina.

O grupo 4 (figura 11) contendo prolina, alanina, triptofano e tirosina, apresentou um aumento em sua concentração. No entanto, não podemos afirmar qual aminoácido é responsável por esta variação neste grupo que contém dois importantes aminoácidos de interesse bioenergético em artrópode, a alanina e a prolina (Scaraffia *et al.*, 2006; Scaraffia *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2004; Scaraffia & Wells, 2003; Pennington *et al.*, 2003).

O grupo 7 (figura 13), representado pelos aminoácidos cetogênicos leucina e isoleucina, mostra variação de concentração semelhante ao de acetoacetato nos ovos, o que nos faz pensar na possibilidade de uma interligação metabólica entre estas moléculas, ou seja, especulamos que estes aminoácidos podem ser convertidos em corpos cetônicos.

Os resultados mostram que há variação da quantidade de todos os grupos de aminoácidos durante a embriogênese, nos fazendo acreditar que há uma mobilização seletiva desta reserva nas diferentes fases da formação do embrião de *R. microplus*.

Em uma outra etapa deste trabalho, a atenção esteve voltada para o estudo do metabolismo de lipídeos nestes embriões. Abordagens parecidas foram desenvolvidas em outras espécies, como em camarões tropicais (Wehrtmann & Albornoz, 1998), peixes (Verreth *et al.*, 1994), aves (Speake *et al.*, 1998) e insetos (Briegel *et al.*, 2002), mostrando que os lipídeos representam uma das principais fontes de energia nos embriões. Estas moléculas são geralmente estocadas em tecidos especializados como o tecido

adiposo em humano ou corpo gorduroso em insetos, e devem ser disponibilizadas quando necessárias ao embrião (Gronke *et al.*, 2005).

Em insetos os lipídeos estocados no corpo gorduro são liberados na forma de diacilglicerol (DAG) pela lipase e transportados para o músculo de vôo por lipoproteínas denominadas lipoforinas. No músculo de vôo os DAG são hidrolisados e então os ácidos graxos (AG) são oxidados para fornecimento de energia (Ogoyi *et al.*, 1998; Ryan & Van der Horst, 2000).

Em insetos, a degradação de lipídeos é estimulada pelo hormônio adipocinético (AKH) em varias espécies incluindo *Locusta migratória* (Gade & Beenackers, 1977), *Manduca sexta* (Gade & Beenackers, 1977; Ziegler *et al.*, 1990) e *Drosophila melanogaster* (Gronke *et al.*, 2005; Lee & Park, 2004), sugerindo uma importante função deste hormônio no controle do balanço de energia do inseto (Gronke *et al.*, 2005). A lipólise estimulada por AKH no corpo gorduroso do inseto é mediada via proteína G (Gronke *et al.*, 2005; Staubli *et al.*, 2002), aumento da concentração intracelular de AMPc e ativação da proteína quinase A (PkA) (Gade & Beenackers, 1977; Staubli *et al.*, 2002).

A enzima lipase foi caracterizada em embriões de carrapato de camelo *Hyalomma dromedari* onde mostra que atividade aumenta do décimo segundo dia do desenvolvimento deste carrapato até o final da embriogênese (Fahmy *et al.*, 2004). Nos embriões de *R. microplus*, observamos que a enzima lipase tem perfil de atividade semelhante ao encontrado em carrapato de camelo, no entanto, o aumento da atividade é observado do quarto dia até o final da embriogênese (figura 15). Este perfil enzimático se correlaciona diretamente com o conteúdo de lipídeos totais (anexo II, figura 4A). Isto sugere que nesta etapa do desenvolvimento este embrião está utilizando a energia contida nas reservas lipídicas, já que nesta etapa o glicogênio está quase extinto (anexo I, figura 4).

Posteriormente verificou-se a formação de corpos cetônicos (figura 14), que mostra um aumento na sua concentração do quinto para o sétimo dia. Isto pode se relacionar com a alta degradação de lipídeos neste mesmo período. Do nono dia em diante percebemos um constante aumento na concentração de corpos cetônicos. Isso pode ser resultado da constante queda no conteúdo total de lipídeos, observada do nono ao décimo oitavo dia. Percebemos também uma queda no conteúdo de corpos cetônicos no início da

embriogênese (do primeiro ao quinto dia). Acreditamos que os embriões são postos com uma concentração inicial de corpos cetônicos. Estes, por sua vez, são consumidos até o quinto dia. A partir desse momento ocorre uma efetiva degradação de lipídeos e, conseqüente síntese de corpos cetônicos. Esses resultados confirmam as dosagens da atividade lipásica, a qual aumenta significativamente a partir do quarto dia (figura 15).

Na segunda fase da embriogênese do *R. microplus*, a partir do sétimo dia, observamos o aparecimento de 1,2-DAG (figuras 16 e 17) e também um notável aumento da concentração de 1,3 – DAG (figuras 16 e 17), possivelmente resultante da mobilização de TAG. Estudos descrevendo o processo de transporte de lipídeos entre os tecidos de estoque e os tecidos de utilização (Arrese *et al.*, 2001; Chino & Gilbert, 1964), mostraram que o corpo gorduroso mobiliza lipídeos na forma de 1,2 – DAG que são transportados por lipoproteínas denominadas lipoforinas. Nossa hipótese para explicar o aumento da concentração de 1,2-DAG e 1,3-DAG é que estes lipídeos estão sendo formados na hidrólise de TAG que pode estar estocado em um órgão recém formado como, por exemplo, o corpo gorduroso e então transportados por lipoforinas para outros tecidos.

O principal sítio de produção de energia na forma de ATP dentro das células eucarióticas é a mitocôndria onde estão localizadas as enzimas da - oxidação, ciclo de Krebs, cadeia transportadora de elétrons e o complexo ATP sintase. Esta organela tem sido alvo de intensos estudos nos últimos 50 anos, onde se estabeleceu que a mitocôndria fosse considerada a “pilha” energética da célula, estes estudos combinados com os da origem evolutiva desta organela, que tem sua maquinaria genética própria, levaram a introdução de um conceito que a mitocôndria é uma organela independente de outros eventos celulares (McBride *et al.*, 2006). No entanto, recentemente este conceito tem perdido força com a descoberta que esta organela funciona de forma integrada com o reticulo endoplasmático, onde principalmente o fluxo de cálcio do reticulo para a mitocôndria pode ativar enzimas do ciclo de Krebs, da cadeia transportadora de elétrons e a ATP sintase em diversas situações, como por exemplo, na fertilização (Dumollard *et al.*, 2006).

A regulação do metabolismo mitocondrial pela sinalização mediada por cálcio incluem a fosforilação / defosforilação de proteínas metabólicas, como

por exemplo, os complexos respiratórios I e V (McBride *et al.*, 2006). Na matriz mitocondrial, a fosforilação / desfosforilação da piruvato desidrogenase (PDH) são reguladas através da ação das enzimas PDH quinases e PDH fosfatases. A atividade da PDH também é regulada por estímulos citosólicos como a cascata de sinalização por insulina, que ativa uma Akt mitocondrial (Bijur & Jope, 2003) que tem como um de seus alvos a enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3), que apesar de predominantemente citossólica, também foi encontrada na matriz mitocondrial (Cross *et al.*, 2000). A GSK-3 é ativa na forma não fosforilada. Esta quinase tem diversos substratos entre eles a PDH, que quando fosforilada inibe a conversão de piruvato em acetil-Coa, conseqüentemente inibindo a síntese de ATP. Por outro lado, quando a GSK é fosforilada pela AKT, a PDH está ativa e a síntese de ATP é ativada (McBride *et al.*, 2006).

Apesar da enorme importância da mitocôndria para o metabolismo energético, a literatura sobre esta organela em artrópodes, como carrapatos e mosquitos é muito precária. Em abelhas *Pachnoda sinuata* foi mostrado que mitocôndrias isoladas do músculo de vôo são capazes de oxidar os substratos prolina, piruvato e α -glicerofosfato, no entanto não foram capazes de oxidar os substratos palmitoil-carnitina (Auerswald & Gade, 1999). No mesmo trabalho foi mostrado que a co-oxidação de piruvato e prolina tem efeito aditivo na taxa respiratória. Os autores acreditam que durante o vôo, o músculo utiliza uma mistura destes substratos. Os autores também atribuem o fato da mitocôndria utilizar como substrato energético o α -glicerofosfato à presença de um sistema de lançadeira de α -glicerofosfato que, juntamente, como o NADH, participam de um sistema de transporte de elétrons para mitocôndria e que, na presença de Ca^{+2} , este sistema é estimulado, aumentando a taxa respiratória para oxidação do α -glicerofosfato em 100 % (Auerswald & Gade, 1999).

Neste trabalho estabeleceu-se uma metodologia para obtenção de mitocôndrias acopladas de embriões de *R. microplus*. Embriões ovíparos de uma forma geral têm grande quantidade de ácidos graxos que são potentes desacopladores mitocondriais, por este motivo torna-se fundamental o uso de albumina essencialmente livre de ácidos graxos durante o isolamento. As mitocôndrias de embriões de *R. microplus* foram capazes de oxidar os substratos prolina, piruvato e succinato e que respondem aos inibidores da

respiração como rotenona e oligomicina. A taxa do coeficiente respiratório (RCR) foi medida indicando um elevado acoplamento destas preparações mitocondriais (figura 6). A medida do potencial de membrana mitocondrial foi realizada usando safranina O mostrando que os substratos piruvato, prolina e succinato aumentam o potencial de membrana e que o ADP provoca decréscimo do potencial de membrana, FCCP foi utilizado como controle, pois provoca colapso do potencial de membrana (figura 7). O estabelecimento da metodologia de isolamento de mitocôndrias acopladas nos permite estudar os diferentes substratos oxidativos que podem ser usados pelas mitocôndrias destes embriões como, por exemplo, glicerol-fosfato que ainda não foi testado. Recentemente nosso grupo vem demonstrando que estas mitocôndrias são capazes de utilizar na respiração um polímero de fosfato denominado polifosfato (dados não mostrados).

Diante deste panorama metabólico iniciou-se estudo mais aprofundado de uma enzima envolvida diretamente em uma das etapas fundamentais do metabolismo energético, a Triose Fosfato Isomerase. O interesse em estudar a enzima triose fosfato isomerase em embriões de *R. microplus* surgiu com a possibilidade de esta proteína estar env9398 398

metilglioxal, pois o intermediário enediol da reação catalisada pela TIM pode ser transformado em metilglioxal, no entanto, dentro do contexto catalítico da TIM, a formação desta molécula é considerada um fator negativo sendo considerada tóxica e sem função biológica definida (Richard, 1991). Entretanto, dentro do contexto metabólico de obtenção de energia consideramos esta hipótese viável e levantamos a hipótese do metilglioxal ser convertido no intermediário enediol da TIM, que poderá ser convertido em gliceraldeído-3-fosfato e/ou DHAP.

A atividade da TIM durante a embriogênese do *R. B. microplus* apresenta uma diminuição de 50 % na primeira fase e aumenta progressivamente na segunda fase, após a formação das células embrionárias. Acredita-se que na segunda fase da embriogênese a TIM está acompanhando o fluxo preferencial da gliconeogênese (figura 19) e/ou sendo estimulada pela metabolização do glicerol proveniente da degradação de TAG.

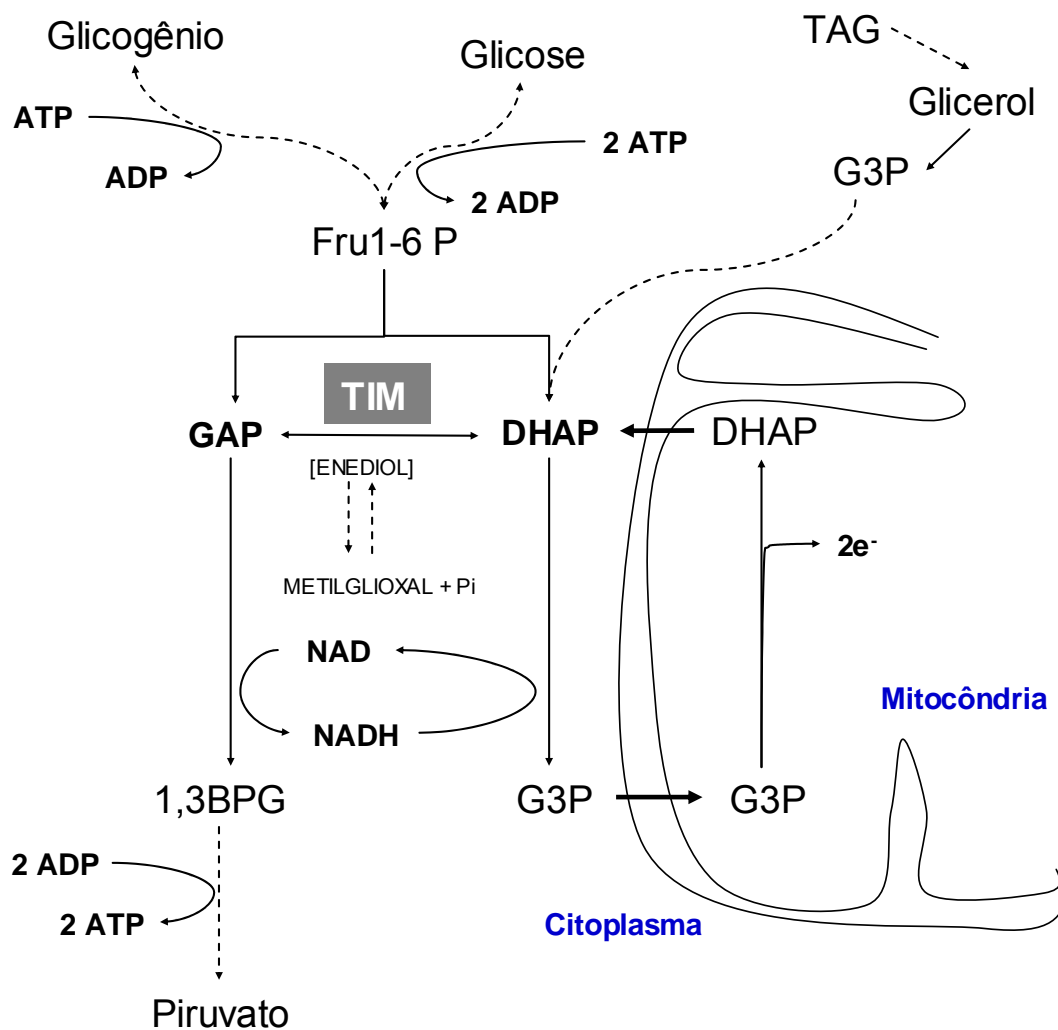


Figura 33: Possíveis destinos da molécula de DHAP. O esquema não reflete rotas completamente elucidadas tratando-se de uma possibilidade a ser testada.

A TIM é uma das enzimas mais estudadas em todo mundo, desde suas características cinéticas e físico-químicas à elucidação de sua estrutura em diversos organismos. No entanto, não há trabalhos na literatura que descreva estas características em artrópodes, como o carrapato bovino *R. microplus* ou mosquitos, como o *Aedes Aegypti* e o *Anopheles gambiae*. Estas espécies estão envolvidas na transmissão de doenças como babesiose e ehrlichiose, no caso do carrapato e dengue e malária, no caso dos mosquitos.

TIMs são alvos em potencial para desenho de drogas contra diversos parasitas (Olivares-Illana *et al.*, 2006; Tellez-Valencia *et al.*, 2004). Estes

estudos mostram que os resíduos do sítio ativo, o mecanismo catalítico e a estrutura tridimensional foram muito bem conservados durante a evolução (Maldonado *et al.*, 1998). Neste trabalho foi mostrado que a TIM de embriões do carrapato *R. microplus* não é uma exceção, ela tem seqüência de aminoácidos, estrutura secundária e propriedades cinéticas muito semelhante a outras TIMs descritas anteriormente.

A seqüência da RBmTIM apresenta alta homologia com TIMs de diversos organismos (figura 20), este fato é esperado, visto que, este enzima faz parte da fisiologia básica de obtenção de energia de todos os organismos. No entanto, Este estudo mostra pela primeira vez a caracterização da TIM em artrópode com informações importantes como o alto teor de cisteínas da RBmTIM, o maior já descrito em todas as espécies estudadas até o momento.

A RBmTIM tem 9 resíduos de cisteínas por monômero. Este fato é de grande relevância, pois um dos mecanismos de inibição espécie específica desta enzima é o desenho de drogas que reagem com resíduos de cisteínas que são exclusivos de cada espécie. Estes estudos estão baseados principalmente em reações com um resíduo de cisteína não conservado, a cisteína 14, da TIM de alguns parasitas como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Plasmodium falciparum*. Estas reações na cisteína 14 provocam uma alta inibição seletiva por alteração estrutural (Maldonado *et al.*, 1998; Olivares-Illana *et al.*, 2006; Tellez-Valencia *et al.*, 2004; Garza-Ramos *et al.*, 1997; Garza-Ramos *et al.*, 1998).

A cisteína 14 faz parte da interface do dímero, e uma das importantes características das TIMs é que somente o dímero é cataliticamente ativo (Maldonado *et al.*, 1998; Olivares-Illana *et al.*, 2006; Tellez-Valencia *et al.*, 2004; Garza-Ramos *et al.*, 1997; Garza-Ramos *et al.*, 1998), alguns agentes químicos podem ligar-se a esta região provocando específica inibição da catálise. A TIM de *Homo sapiens* tem um resíduo de metionina na mesma posição 14 e por isto não é inibida pelos mesmos agentes (Olivares-Illana *et al.*, 2006; Tellez-Valencia *et al.*, 2004).

A RBmTIM não possui cisteína 14, entretanto apresenta outros nove resíduos de cisteína por monômero a serem explorados. Estes resíduos são cisteína 7, 25, 43, 51, 66, 86, 126, 143 e 217. A estrutura tridimensional obtida por modelagem molecular apresenta importantes informações a respeito das

cisteínas: Dos 18 resíduos existentes no dímero, apenas o par de cisteínas 43 e 51, estão numa distância que permitiria a estes aminoácidos fazerem pontes de sulfeto intramoleculares (figura 21). No entanto, a resolução da estrutura cristalina da RBmTIM descarta esta hipótese pois prova que estes resíduos não fazem pontes dissulfetos e as distâncias entre eles é de 3.4 Å e 3.55 Å nos monômeros A e B, respectivamente. O resíduo conservado cisteína 217 é o mais acessível a solventes e dependendo do posicionamento estrutural do mesmo resíduo na TIM do hospedeiro bovino, poderia ser alvo para desenho drogas visando a sua inibição específica (Figura 22).

A comparação entre a estrutura tridimensional do monômero da RBmTIM e do monômero da TIM de *Bos taurus* (seqüência depositada no genbank N^o AAI02904), indica que os resíduos de cisteína 43, 66, 126 e 217 têm um resíduo correspondente (figura 23) e que os resíduos 7, 25, 51, 86 e 143 são não conservados na RBmTIM (figura 23). Este fato possibilita que estes resíduos sejam utilizados como alvo para desenho de drogas que inibam especificamente a TIM do parasito *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* sem inibir a TIM do seu hospedeiro específico, o bovino.

Dados da literatura mostram que todas as TIMs precipitam em sulfato de amônio 75 % (Gao *et al.*, 1998). De posse desta informação, a estratégia de purificação foi utilizar basicamente uma combinação de precipitação em sulfato de amônio 45 % para eliminar uma parte das impurezas, precipitação da TIM em sulfato de amônio 75 %, diálise para eliminar o sulfato de amônio e cromatografia de troca iônica em HPLC utilizando a coluna mono-Q. Os passos da purificação da RBmTIM foram analisados em SDS-PAGE 11 %. O gel foi corado com Coomassie blue (figura 24) ou por prata (dados não mostrados), mostrando uma única banda de 27 kDa, o tamanho esperado para o monômero TIM (figura 24). A atividade total e específica também foi verificada em distintos passos da purificação, mostrando que a atividade total diminui e a atividade específica aumenta durante a purificação desta enzima (tabela 1). O rendimento aproximado de 6 mg de RBmTIM pura, possibilita o uso desta enzima em ensaios que necessitam grandes quantidades de proteína, como por exemplo, a cristalização.

O Km da RBmTIM de 0,47 mM (figura 25) para o substrato G3P é muito similar aos relatados para outras TIMs de outros organismos como o *T. cruzi*,

T. brucei e *L. mexicana* que têm Km para G3P 0,9, 0,6 e 0,9 mM, respectivamente (Gomez-Puyou *et al.*, 1995). A Vmax de 6,031 $\mu\text{mols} / \text{min. proteína(mg)}$ (figura 25) da RBmTIM também apresenta grande similaridade com outras TIMs como de *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. mexicana*, que apresentam 5915 $\mu\text{mols} / \text{min. proteína (mg)}$, 7498 $\mu\text{mols} / \text{min. proteína (mg)}$ e 11678 $\mu\text{mols} / \text{min. proteína (mg)}$, respectivamente (Garza-Ramos *et al.*, 1997).

As propriedades espectroscópicas da RBmTIM foram analisadas. O espectro de fluorescência intrínseca (figura 26) apresenta grande similaridade com o espectro de outras TIMs descritas na literatura, provavelmente, devido aos cinco resíduos de triptofano da RBmTIM, sabe-se que as TIMs apresentam múltiplos triptofanos que são responsáveis pela fluorescência intrínseca. O espectro de dicroísmo circular (figura 27) também apresenta grande semelhança com outras TIMs previamente reportadas. Estudos sobre mudanças que possam ter ocorrido em proteínas oligoméricas durante a evolução indicam que suas estruturas secundárias, terciárias e quaternárias foram largamente conservadas, apesar de que muitas mudanças pode ocorrer em sua estrutura primária. (Olivares-Illana *et al.*, 2006; Garza-Ramos *et al.*, 1998; GarzaRamos *et al.*, 1996). Análises estatísticas das mudanças em diferentes porções de enzimas oligoméricas mostraram que a grau de conservação de aminoácidos é significativamente baixa na interface e que a porção mais conservada é o sitio ativo.(Hu *et al.*, 2000; Grishin & Phillips, 1994).

Cristais da RBMTIM foram obtidos na condição 38 do kit Crystal Screen I e os cristais de proteínas foram difratados a uma resolução máxima de 2.4 Å. Os dados da difração de R-X estão reunidos na tabela 2 e a resolução da estrutura 3-D mostra que esta proteína é um homodímero, onde cada subunidade é formada por oito α -hélices unidas à 8 folhas- por alças (figura 28) e que não forma ponte dissulfeto entre os resíduos 43 e 51, em nenhum dos dois monômeros como indica os dados de modelagem molecular (figuras 21).

No presente estudo nós propomos que a RBmTIM pode ser alvo para controle do carrapato *R. microplus* baseado na análise de sua estrutura. Importantes trabalhos mostram o uso de resíduos não conservados para inibição espécie-específica de enzimas homólogas (Hernandez-Alcantara *et al.*,

2002; Maldonado *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 1998; Garza-Ramos *et al.*, 1997; Garza-Ramos *et al.*, 1998). Neste sentido, a TIM é uma das enzimas mais estudadas, onde resíduos não conservados de cisteínas em TIMs de várias espécies podem ser utilizados para inibição espécie-específica (Olivares-Illana *et al.*, 2006; Perez-Montfort *et al.*, 1999; Gómez-Puyou *et al.*, 1995). A RBmTIM tem cinco resíduos de cisteínas evolutivamente não conservados quando comparado a TIM de *Bos taurus* (hospedeiro específico do *R. microplus*), os resíduos são 7, 25, 51, 86 e 143. Estes aminoácidos podem ser excelentes alvos para o desenvolvimento de fármacos contra infestação por carrapatos.

A TIM também tem sido usada para o desenvolvimento de vacinas contra schistosomiose onde se mostra que a TIM recombinante e plasmídeos contendo o gene da TIM de *S. japonicum* são capaz de reduzir a infestação em porcos e principalmente a transmissão por reduzir o número de ovos (Zhu *et al.*, 2006). Em *Giardia lamblia* (Reyes-Vivas *et al.*, 2007) e em *Taenia solium* (Jimenez *et al.*, 2000) especula-se a possibilidade do desenvolvimento de vacina utilizando a TIM ou seu gene como antígeno. Nestes trabalhos observa-se que o grau de identidade das TIMs do parasita e do hospedeiro é aproximadamente 60 % (Zhu *et al.*, 2006; Reyes-Vivas *et al.*, 2007; Jimenez *et al.*, 2000). Neste trabalho mostramos que a RBmTIM é 66,3 % idêntica a seqüência da TIM de bovino da espécie *Bos taurus* depositada no GenBank o que nos encoraja a realizar experimentos de vacinação usando a RBmTIM para imunizar bovinos.

6-CONCLUSÕES

- 1- A embriogênese deste artrópode é dividida metabolicamente em duas fases, baseando-se no balanço de glicose dentro do embrião: a primeira da oviposição até a formação do blastoderma celular caracterizada pelo consumo acentuado de glicogênio e a segunda fase, deste momento até a eclosão das larvas, caracterizada por intensa gliconeogênese (anexo I).
- 2- A formação das células embrionárias (blastoderma celular) entre o quinto e sexto dia impõe as principais modificações metabólicas observadas durante a embriogênese deste carrapato marcada principalmente pelo início do intenso consumo de oxigênio pelo embrião em formação (anexo II).
- 3- Neste estudo foi possível estabelecer metodologia para isolamento de mitocôndrias acopladas deste carrapato e que estas mitocôndrias respondem aos principais substratos oxidativos e agentes inibidores da respiração celular.
- 4- As atividades das enzimas do catabolismo de aminoácidos aspartato aminotransferase (AAT) e glutamato desidrogenase (GDH) aumentam progressivamente após a formação do blastoderma celular reforçando a nossa hipótese de que após a formação desta estrutura celular inicia-se intensa gliconeogênese nestes embriões.
- 5- Em relação à composição de aminoácidos podemos concluir que os níveis de amônio não sofrem variações consideráveis após a formação do blastoderma celular e que há uma consistente correlação entre os níveis de aminoácidos cetogênicos (leucina e isoleucina) e os níveis de acetoacetato. No entanto, o método usado não permite discriminar quais aminoácidos são responsáveis pelas mudanças observadas nos grupos, tornado imprescindível a análise individual dos aminoácidos;

- 6- Podemos concluir neste trabalho que existe uma sistemática de utilização de reservas lipídicas, podemos destacar alguns aspectos mais específicos: O conteúdo total de lipídeos que sofre abrupta diminuição do conteúdo coincidindo com as modificações morfológicas que ocorrem do blastoderma celular até a segmentação do embrião (anexo II, figura 4 A). A atividade específica da lipase, a concentração de 1,2 – DAG e 1,3-DAG aumentam após a formação do blastoderma celular.
- 7- O conjunto dos nossos resultados nos permite concluir que a RBmTIM é muito similar a outras TIMs previamente descritas desde de sua estrutura primaria (seqüência de aminoácidos) até a estrutura quaternária que é um homodímero onde cada monômero é formada por oito folhas- β unidas a oito α - hélices por alças.
- 8- Este estudo mostra pela primeira vez a caracterização da TIM em um artrópode, desde a clonagem a resolução da estrutura molecular, com destaque para informações importantes como o alto teor de cisteínas da *R. microplus*, o maior já descrito em todas as espécies estudadas até o momento. Este fato é de grande relevância, pois um dos mecanismos de inibição espécie específica desta enzima é o desenho de drogas que reagem com resíduos de cisteínas que são exclusivos de cada espécie. O alto teor de resíduos de cisteínas não conservados na RBmTIM torna esta enzima um grande alvo de controle da infestação por *B.microplus* utilizando esta estratégia. Os resíduos de cisteína não conservados são 7, 25, 51, 86 e 143.

7-BIBLIOGRAFIA:

1. Arrese,E.L., Gazard,J.L., Flowers,M.T., Soulages,J.L., & Wells,M.A. (2001) Diacylglycerol transport in the insect fat body: evidence of involvement of lipid droplets and the cytosolic fraction. *Journal of Lipid Research* **42**, 225-234.
2. Auerswald,L. & Gade,G. (1999) Effects of metabolic neuropeptides from insect corpora cardiaca on proline metabolism of the African fruit beetle, *Pachnoda sinuata*. *Journal of Insect Physiology* **45**, 535-543.
3. Bell,G.S., Russell,R.J.M., Kohlhoff,M., Hensel,R., Danson,M.J., Hough,D.W., & Taylor,G.L. (1998) Preliminary crystallographic studies of triosephosphate isomerase (TIM) from the hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus woesei*. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **54**, 1419-1421.
4. Bergquist,N.R. (1995) Schistosomiasis Vaccine Development - Approaches and Prospects. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **90**, 221-227.
5. Bijur,G.N. & Jope,R.S. (2003) Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Journal of Neurochemistry* **87**, 1427-1435.
6. Büning, J. (1994) The insect ovary: Ultrastructure, previtelogenic growth and evolution Chapman and Hall, London.
7. Bligh,E.G. & Dyer,W.J. (1959) A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **37**, 911-917.

8. Briegel,H., Hefti,A., & DiMarco,E. (2002) Lipid metabolism during sequential gonotrophic cycles in large and small female *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology* **48**, 547-554.
9. Canal,C.W., Maia,H.M., Vaz,I.S., Chies,J.M., Farias,N.A.R., Masuda,A., Gonzales,J.C., Ozaki,L.S., & Dewes,H. (1995) Changing Patterns of Vitellin-Related Peptides During Development of the Cattle Tick *Boophilus-Microplus*. *Experimental & Applied Acarology* **19**, 325-336.
10. Candy,D.J., Becker,A., & Wegener,G. (1997) Coordination and integration of metabolism in insect flight. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **117**, 497-512.
11. Chino,H. & Gilbert,L.I. (1964) Diglyceride Release from Insect Fat Body - Possible Means of Lipid Transport. *Science* **143**, 359-&.
12. Cross,D.A., Culbert,A., Chalmers,K., Rausch,O.L., Facci,L., Gray,J., Smith,D.G., Haigh,D., Ward,R.W., Skaper,S.D., & Reith,A.D. (2000) Inhibition of GSK-3 activity is sufficient to protect primary cerebellar granule neurons from apoptotic cell death. *European Journal of Neuroscience* **12**, 231.
13. Dudley,R. & Winter,Y. (2002) Hovering flight mechanics of neotropical flower bats (Phyllostomidae: Glossophaginae) in normodense and hypodense gas mixtures. *J.Exp.Biol.* **205**, 3669-3677.
14. Dumollard,R., Duchen,M., & Sardet,C. (2006) Calcium signals and mitochondria at fertilisation. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **17**, 314-323.
15. Fahmy,A.S., bdel-Gany,S.S., Mohamed,T.M., & Mohamed,S.A. (2004) Esterase and lipase in camel tick *Hyalomma dromedarii* (Acari : Ixodidae) during embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **137**, 159-168.

16. Field, M.J., Bash, P.A., & Karplus, M. (1990) A Combined Quantum-Mechanical and Molecular Mechanical Potential for Molecular-Dynamics Simulations. *Journal of Computational Chemistry* **11**, 700-733.

17. Gade, G. & Auerswald, L. (2000) Flight substrates and their regulation by a member of the AKH/RPCH family of neuropeptides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**, 1248-1259. doi:10.1016/S0965-1746(00)00128-1

1770) dipokbintic Borl a d e , G .

23. GarzaRamos,G., PerezMontfort,R., RojoDominguez,A., deGomezPuyou,M.T., & GomezPuyou,A. (1996) Species-specific inhibition of homologous enzymes by modification of nonconserved amino acids residues - The cysteine residues of triosephosphate isomerase. *European Journal of Biochemistry* **241**, 114-120.
24. Gomez-Puyou,A., Saavedra-Lira,E., Becker,I., Zubillaga,R.A., Rojo-Dominguez,A., & Perez-Montfort,R. (1995) Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action--studies with triosephosphate isomerase. *Chem.Biol.* **2**, 847-855.
25. Gonzales, J. C.; Silva, N. R.; Wagner, E. M. (1974) O ciclo do *Boophilus microplus* em bovinos estabulados. *Arq. Fac. Vet. Univ. Fed. RG.* **2**: 25-34.
26. Grishin,N.V. & Phillips,M.A. (1994) The Subunit Interfaces of Oligomeric Enzymes Are Conserved to A Similar Extent to the Overall Protein Sequences. *Protein Science* **3**, 2455-2458.
27. Gronke,S., Mildner,A., Fellert,S., Tennagels,N., Petry,S., Muller,G., Jackle,H., & Kuhnlein,R.P. (2005) Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in Drosophila. *Cell Metabolism* **1**, 323-330.
28. Harn,D.A., Mitsuyama,M., HugueneI,E.D., & David,J.R. (1985a) Schistosoma-Mansoni - Detection by Monoclonal-Antibody of A 22,000-Dalton Surface-Membrane Antigen Which May be Blocked by Host Molecules on Lung Stage Parasites. *Journal of Immunology* **135**, 2115-2120.
29. Harn,D.A., Mitsuyama,M., HugueneI,E.D., Oligino,L., & David,J.R. (1985b) Identification by Monoclonal-Antibody of A Major (28 Kda) Surface-Membrane Antigen of Schistosoma-Mansoni. *Molecular and Biochemical Parasitology* **16**, 345-354.

30. Hernandez-Alcantara,G., Garza-Ramos,G., Hernandez,G.M., Gomez-Puyou,A., & Perez-Montfort,R. (2002) Catalysis and stability of triosephosphate isomerase from Trypanosoma brucei with different residues at position 14 of the dimer interface. Characterization of a catalytically competent monomeric enzyme. *Biochemistry* **41**, 4230-4238.
31. Hu,Z.J., Ma,B.Y., Wolfson,H., & Nussinov,R. (2000) Conservation of polar residues as hot spots at protein interfaces. *Proteins-Structure Function and Genetics* **39**, 331-342.
32. Jimenez,L., Vibanco-Perez,N., Navarro,L., & Landa,A. (2000) Cloning, expression and characterisation of a recombinant triosephosphate isomerase from Taenia solium. *International Journal for Parasitology* **30**, 1007-1012.
33. Johnston,L.A.Y. (1985) Control of Ectoparasites of Economic Importance by Immunization of Their Hosts with Particular Reference to Boophilus-Microplus and Cattle. *New Zealand Journal of Zoology* **12**, 439-440.
34. Jonsson,N.N., Mayer,D.G., & Green,P.E. (2000) Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricide resistance in cattle tick (Boophilus microplus). *Veterinary Parasitology* **88**, 79-92.
35. Katagiri,N., Ando,O., & Yamashita,O. (1998) Reduction of glycogen in eggs of the silkworm, Bombyx mori, by use of a trehalase inhibitor, trehazolin, and diapause induction in glycogen-reduced eggs. *Journal of Insect Physiology* **44**, 1205-1212.
36. Knowles,J.R. & Albery,W.J. (1977) Perfection in Enzyme Catalysis - Energetics of Triosephosphate Isomerase. *Accounts of Chemical Research* **10**, 105-111.
37. Kolsch,G. (2001) Anoxia tolerance and anaerobic metabolism in two tropical weevil species (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* **171**, 595-602.

38. Kresge,N., Simoni,R.D., & Hill,R.L. (2005) JBC Centennial - 1905-2005 - 100 years of biochemistry and molecular biology - Otto Fritz Meyerhof and the elucidation of the glycolytic pathway. *Journal of Biological Chemistry* **280**.
39. Labruna,M.B., Kerber,C.E., Ferreira,F., Faccini,J.L.H., De Waal,D.T., & Gennari,S.M. (2001) Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*

- early divergent eukaryote *Giardia lamblia*. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **55**, 824-834.
46. Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L., & Randall,R.J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275.
 47. Maldonado,E., Soriano-Garcia,M., Moreno,A., Cabrera,N., Garza-Ramos,G., de Gomez-Puyou,M.T., Gomez-Puyou,A., & Perez-Montfort,R. (1998) Differences in the intersubunit contacts in triosephosphate isomerase from two closely related pathogenic trypanosomes. *Journal of Molecular Biology* **283**, 193-203.
 48. Marchler-Bauer,A., Anderson,J.B., Cherukuri,P.F., Wweese-Scott,C., Geer,L.Y., Gwadz,M., He,S.Q., Hurwitz,D.I., Jackson,J.D., Ke,Z.X., Lanczycki,C.J., Liebert,C.A., Liu,C.L., Lu,F., Marchler,G.H., Mullokandov,M., Shoemaker,B.A., Simonyan,V., Song,J.S., Thiessen,P.A., Yamashita,R.A., Yin,J.J., Zhang,D.C., & Bryant,S.H. (2005) CDD: a conserved domain database for protein classification. *Nucleic Acids Research* **33**, D192-D196.
 49. McBride,H.M., Neuspiel,M., & Wasiak,S. (2006) Mitochondria: More than just a powerhouse. *Current Biology* **16**, R551-R560.
 50. Mohamed,S.A. (2000) alpha-Amylase from developing embryos of the camel tick *Hyalomma dromedarii*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **126**, 99-108.
 51. Nari,A. (1995) Strategies for the Control of One-Host Ticks and Relationship with Tick-Borne Diseases in South-America. *Veterinary Parasitology* **57**, 153-165.
 52. Norval,R.A.I., Peter,T., Yunker,C.E., Sonenshine,D.E., & Burridge,M.J. (1991) Responses of the Ticks *Amblyomma-Hebraeum* and *A-Variegatum* to Known Or Potential Components of the Aggregation-Attachment Pheromone .1. Long-Range Attraction. *Experimental & Applied Acarology* **13**, 11-18.

53. Ogoyi,D.O., Osir,E.O., & Olembo,N.K. (1998) Fat body triacylglycerol lipase in solitary and gregarious phases of *Schistocerca gregaria* (Forsk.) (Orthoptera : Acrididae). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **119**, 163-167.
54. Oliveira, P. L.; Gondin, K. C.; Guedes, D. M.; Masuda, H. (1986) Uptake of yolk proteins in *Rhodnius prolixus*, *J. Insect. Physiol.* 32: 859-866.
55. Olivares-Illana,V., Perez-Montfort,R., Lopez-Calahorra,F., Costas,M., Rodriguez-Romero,A., de Gomez-Puyou,M.T., & Puyou,A.G. (2006) Structural differences in triosephosphate isomerase from different species and discovery of a multitypanosomatid inhibitor. *Biochemistry* **45**, 2556-2560.
56. Oliveira,P.L., Gondim,K.C., Guedes,D.S., & Masuda,H. (1985) Regulation of Vitellogenin Uptake in *Rhodnius-Prolixus* (Hemiptera). *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* **57**, 530.
57. Patarroyo,J.H., Portela,R.W., De Castro,R.O., Pimentel,J.C., Guzman,F., Patarroyo,M.E., Vargas,M.I., Prates,A.A., & Mendes,M.A.D. (2002) Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Veterinary Immunology and Immunopathology* **88**, 163-172.
58. Pennington,J.E., Goldstrohm,D.A., & Wells,M.A. (2003) The role of hemolymph proline as a nitrogen sink during blood meal digestion by the Mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology* **49**, 115-121.
59. Perez-Montfort,R., Garza-Ramos,G., Alcantara,G.H., Reyes-Vivas,H., Gao,X.G., Maldonado,E., de Gomez-Puyou,M.T., & Gomez-Puyou,A. (1999) Derivatization of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* as probe of the interrelationship between the catalytic sites and the dimer interface. *Biochemistry* **38**, 4114-4120.

60. Reyes-Vivas,H., Diaz,A., Peon,J., Mendoza-Hernandez,G., Hernandez-Alcantara,G., De la Mora-De la Mora, Enriquez-Flores,S., Dominguez-Ramirez,L., & Lopez-Velazquez,G. (2007) Disulfide bridges in the mesophilic triosephosphate isomerase from *Giardia lamblia* are related to oligomerization and activity. *Journal of Molecular Biology* **365**, 752-763.
61. Reyes-Vivas,H., Hernandez-Alcantara,G., Lopez-Velazquez,G., Cabrera,N., Perez-Montfort,R., de Gomez-Puyou,M.T., & Gomez-Puyou,A. (2001) Factors that control the reactivity of the interface cysteine of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *Biochemistry* **40**, 3134-3140.
62. Reyes-Vivas,H., Martinez-Martinez,E., Mendoza-Hernandez,G., Lopez-Velazquez,G., Perez-Montfort,R., de Gomez-Puyou,M.T., & Gomez-Puyou,A. (2002) Susceptibility to proteolysis of triosephosphate isomerase from two pathogenic parasites: Characterization of an enzyme with an intact and a nicked monomer. *Proteins-Structure Function and Genetics* **48**, 580-590.
63. Ribolla,P.E.M. & Debianchi,A.G. (1995) Cathepsin in *Musca-Domestica* Embryogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry* **230**.
64. Richard,J.P. (1991) Kinetic-Parameters for the Elimination-Reaction Catalyzed by Triosephosphate Isomerase and An Estimation of the Reactions Physiological Significance. *Biochemistry* **30**, 4581-4585.
65. Ringe,D., Bash,P., Karplus,M., Davenport,R.C., Giamonna,D.A., Sugio,S., Zhang,Z., Petsko,G.A., Raines,R.T., Liu,K.D., Komives,E.A., Lodi,P.J., & Knowles,J.R. (1991) Triose Phosphate Isomerase Mutants and Mechanism - Computation Vs Experiment. *Faseb Journal* **5**, A1148.
66. Ryan,R.O. & Van der Horst,D.J. (2000) Lipid transport biochemistry and its role in energy production. *Annual Review of Entomology* **45**, 233-260.
67. Scaraffia,P.Y., Isoe,J., Murillo,A., & Wells,M.A. (2005) Ammonia metabolism in *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **35**, 491-503.

68. Scaraffia,P.Y., Remedi,M.S., Maldonado,C., Aoki,A., & deBurgos,N.M.G. (1997) Enzymatic and ultrastructural changes in thoracic muscles of triatomine insects during the last stages of metamorphosis. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* **116**, 173-179.
69. Scaraffia,P.Y. & Wells,M.A. (2003) Proline can be utilized as an energy substrate during flight of *Aedes aegypti* females. *Journal of Insect Physiology* **49**, 591-601.
70. Scaraffia,P.Y., Zhang,Q.F., Wysocki,V.H., Isoe,J., & Wells,M.A. (2006) Analysis of whole body ammonia metabolism in *Aedes aegypti* using [N-15]-labeled compounds and mass spectrometry. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **36**, 614-622.
71. Seifert,G.W., SPRINGEL.PH, & Tatchell,R.J. (1968) Radioactive Studies on Feeding of Larvae Nymphs and Adults of Cattle Tick *Boophilus Microplus* (Canestrini). *Parasitology* **58**, 415-&.
72. Speake,B.K., Noble,R.C., & Murray,A.M.B. (1998) The utilization of yolk lipids by the chick embryo. *Worlds Poultry Science Journal* **54**, 319-334.
73. Staubli,F., Jorgensen,T.J.D., Cazzamali,G., Williamson,M., Lenz,C., Sondergaard,L., Roepstorff,P., & Grimmelikhuijzen,C.J.P. (2002) Molecular identification of the insect adipokinetic hormone receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 3446-3451.
74. Sutherst,R.W., Maywald,G.F., Kerr,J.D., & Stegeman,D.A. (1983) The Effect of Cattle Tick (*Boophilus-Microplus*) on the Growth of *Bos-Indicus* X *Bos-Taurus* Steers. *Australian Journal of Agricultural Research* **34**, 317-327.
75. Tellez-Valencia,A., Olivares-Illana,V., Hernandez-Santoyo,A., Perez-Montfort,R., Costas,M., Rodriguez-Romero,A., Lopez-Calahorra,F., de Gomez-Puyou,M.T., & Gomez-Puyou,A. (2004) Inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an agent that

- perturbs its dimer interface. *Journal of Molecular Biology* **341**, 1355-1365.
76. Tellez-Valencia,A., vila-Rios,S., Perez-Montfort,R., Rodriguez-Romero,A., de Gomez-Puyou,M.T., Lopez-Calahorra,F., & Gomez-Puyou,A. (2002) Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **295**, 958-963.
77. Telfer, W. H. (1975) Development and physiology of the nurse cell syncytium. *Adv. Insect Physiol.* 11: 223–319.
78. Thanki,N., Zeelen,J.P., Mathieu,M., Jaenicke,R., Abagyan,R.A., Wierenga,R.K., & Schliebs,W. (1997) Protein engineering with monomeric triosephosphate isomerase (monoTIM): The modelling and structure verification of a seven-residue alça. *Protein Engineering* **10**, 159-167.
79. Verreth,J., Coppoolse,J., & Segner,H. (1994) The Effect of Low Hufa-Enriched and High Hufa-Enriched Artemia, Fed at Different Feeding Levels, on Growth, Survival, Tissue Fatty-Acids and Liver Histology of Clarias-Gariepinus Larvae. *Aquaculture* **126**, 137-150.
80. Wehrtmann,I.S. & Albornoz,L. (1998) Larval development of *Nauticaris magellanica* (A. Milne Edwards, 1891) (Decapoda : Caridea : Hippolytidae), reared under laboratory conditions. *Bulletin of Marine Science* **62**, 45-72.
81. Whyard,S., Russell,R.J., & Walker,V.K. (1994a) Insecticide Resistance and Malathion Carboxylesterase in the Sheep Blowfly, *Lucilia-Cuprina*. *Biochemical Genetics* **32**, 9-24.
82. Whyard,S., Tittiger,C., & Walker,V.K. (1994b) Purification of Triosephosphate Isomerase and Isolation of Its Gene from the Mosquito *Culex Tarsalis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **24**, 1017-1024.

83. Willadsen,P., Cobon,G., & McKenna,R.V. (1996) Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunology* **18**, 241-246.
84. Zdobnov,E.M. & Apweiler,R. (2001) InterProScan - an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. *Bioinformatics* **17**, 847-848.
85. Zhou,G.L., Flowers,M., Friedrich,K., Horton,J., Pennington,J., & Wells,M.A. (2004) Metabolic fate of [C-14]-labeled meal protein amino acids in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Journal of Insect Physiology* **50**, 337-349.
86. Zhu,Y., Si,J., Harn,D.A., Xu,M., Ren,J., Yu,C., Liang,Y., Yin,X., He,W., & Cao,G. (2006) *Schistosoma japonicum* triose-phosphate isomerase plasmid DNA vaccine protects pigs against challenge infection. *Parasitology* **132**, 67-71.
87. Ziegler,R., Eckart,K., & Law,J.H. (1990) Adipokinetic Hormone Controls Lipid-Metabolism in Adults and Carbohydrate-Metabolism in Larvae of *Manduca-Sexta*. *Peptides* **11**, 1037-1040.
88. Zomosa-Signoret,V., Hernandez-Alcantara,G., Reyes-Vivas,H., Martinez-Martinez,E., Garza-Ramos,G., Perez-Montfort,R., de Gomez-Puyou,M.T., & Gomez-Puyou,A. (2003a) Control of the reactivation kinetics of homodimeric triosephosphate isomerase from unfolded monomers. *Biochemistry* **42**, 3311-3318.
89. Zomosa-Signoret,V., Hernandez-Alcantara,G., Reyes-Vivas,H., Martinez-Martinez,E., Garza-Ramos,G., Perez-Montfort,R., de Gomez-Puyou,M.T., & Gomez-Puyou,A. (2003b) Control of the reactivation kinetics of homodimeric triosephosphate isomerase from unfolded monomers. *Biochemistry* **42**, 3311-3318.

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](#)