

**Metabolismo de Glicose Durante a Embriogênese do  
Mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**

**WAGNER DE OLIVEIRA VITAL**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

MARÇO – 2006

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Metabolismo de Glicose Durante a Embriogênese do Mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

**WAGNER DE OLIVEIRA VITAL**

“Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia”.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Logullo

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

MARÇO - 2006

Metabolismo de Glicose Durante a Embriogênese do Mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

**WAGNER DE OLIVEIRA VITAL**

Comissão examinadora:

---

Dr. Pedro Lagerblad de Oliveira (Laboratório de Bioquímica de Artrópodes Hematófagos – IBM – UFRJ)  
Membro Externo da Banca

---

Dr. Arnoldo Rocha Façanha (Laboratório de Biologia Celular e Tecidual – CBB – UENF)  
Membro da Banca

---

Dr. Francisco José Alves Lemos (Laboratório de Biotecnologia – CBB – UENF)  
Membro da Banca

---

Dra. Marília Dansa de Alencar Petretski (Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos – CBB – UENF)  
Membro Revisor e Suplente Interno

---

Dr. Marcos Henrique Ferreira Sorgine (Laboratório de Bioquímica de Artrópodes Hematófagos – IBM – UFRJ)  
Membro Suplente Externo

---

Dr. Carlos Logullo (Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos - CBB – UENF)  
Orientador

“Deus não joga dados”

Albert Einstein.

## **DEDICATÓRIA**

---

A minha Família.

Pelo amor e cultura transmitidos que me permitem viver em paz.

## **AGRADECIMENTOS:**

Aos meus pais pelo amor e a fé na vida.

A Tatiana, pelo carinho, dedicação e o incentivo constantes.

Ao Logullo, não só pela orientação sempre presente e acessível, como também pelo apoio e consideração pessoal oferecidos desde minha chegada ao grupo, conquistando mais do que meu respeito, minha amizade.

Ao Boca (Jorge Boca do Surf), pela amizade de sempre desde a época da Federal de Química. Valeu também por ter me apresentado ao Logullo.

Ao Dr. Francisco José do Laboratório de Biotecnologia da UENF, assim como ao Gustavo Rezende (Tatu), ao Dr. Bento, à Dr<sup>a</sup> Denise Vale e a todos do IBEX pela ajuda e incentivo no trabalho com os mosquitos.

Ao Dr. Alexandre Peixoto, coordenador do Laboratório de Biologia Molecular localizado na Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, por toda a ajuda na obtenção dos resultados de Biologia Molecular deste trabalho.

A todos os integrantes do LQFPP, por toda ajuda desde a minha chegada ao grupo, que passei a integrar com prazer.

Aos bons amigos, pela amizade e muitas histórias pra contar.

Ao Dr. Luis Carlos Reis, professor do Dept<sup>o</sup> de Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pelo grande incentivo ao caminho científico durante minha vida acadêmica e pelo exemplo de dedicação à ciência.

E a Deus, pelo mundo onde vivemos e a natureza que nos sustenta e nos fascina enquanto objeto de nossos estudos.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1. O mosquito <i>Aedes aegypti</i>	2
1.2. Ovogênese	3
1.3. Embriogênese	4
1.4. Metabolismo energético em insetos	6
1.5. A enzima GSK3 e suas funções	9
<b>2. OBJETIVOS</b>	14
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	16
3.1. Animais	17
3.2. Postura e manutenção dos ovos	17
3.3. Obtenção de homogeneizados de ovos	18
3.4. Quantificação de glicose	18
3.5. Quantificação de glicogênio	18
3.6. Atividade de Hexoquinase	19
3.7. Atividade de Piruvato Quinase	19
3.8. Atividade de Glicose 6-Fosfato Desidrogenase	20
3.9. Atividade de Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase	20
3.10. Atividade de GSK3	21
3.11. RT-PCR do gene da GSK3	21
3.12. Subclonagem e sequenciamento do gene da GSK3	22
<b>4. RESULTADOS</b>	23
4.1. Glicólise	24
4.2. Via das Pentoses	25
4.3. Gliconeogênese	26
4.4. Conteúdo de Glicogênio	27
4.5. RT-PCR do gene da GSK3	28
4.6. Subclonagem e sequenciamento do gene da GSK3	29
<b>5. DISCUSSÃO</b>	32
<b>6. CONCLUSÕES</b>	39
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	41

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Classificação taxonômica e diferentes fases do ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	2
2. Microscopia eletrônica de varredura demonstrando estruturas e processos na embriogênese de <i>Drosophila melanogaster</i>	5
3. Insulina estimula síntese de glicogênio e síntese protéica via inibição de GSK3	9
4. Componentes da via de sinalização Wnt são altamente conservados entre diversos organismos	11
5. Análise de expressão de PEPCK e GSK3 e níveis de glicose em ovos do carrapato bovino <i>B. microplus</i> , durante a embriogênese	12
6. Atividade específica de hexoquinase e de piruvato quinase na embriogênese de <i>Aedes aegypti</i>	24
7. Atividade específica de glicose 6-fosfato desidrogenase na embriogênese de <i>Aedes aegypti</i>	25
8. Níveis de glicose e atividade específica de fosfoenolpiruvato carboxiquinase na embriogênese de <i>Aedes aegypti</i>	26
9. Conteúdo glicogênio e atividade específica de GSK3 na embriogênese de <i>Aedes aegypti</i>	27
10. Resultado do RT-PCR do gene da GSK3 por eletroforese de DNA em gel de agarose na embriogênese de <i>Aedes aegypti</i>	28
11. Eletroforese de DNA plasmidial de <i>E. coli</i> para a seleção dos clones positivos	29
12. Alinhamento da seqüência submetida com a isoforma de GSK3 do mosquito <i>Anopheles gambiae</i>	31

## ÍNDICE DE TABELAS

1. Percentual de homologia da seqüência submetida com a enzima GSK3 de alguns organismos	30
--	----

## Resumo

No presente estudo, investigamos o metabolismo de glicose durante a embriogênese do mosquito *Aedes aegypti*. Foi detectado um aumento nos níveis de glicose e glicogênio durante o desenvolvimento embrionário de *A. aegypti*, que demonstrou poder ser devido à alta atividade da via gliconeogênica e concomitantemente baixa atividade da via glicolítica. Glicose-6-fosfato (G-6P), formada pela reação catalisada pela hexoquinase, na fase inicial da embriogênese, parece ser dirigida principalmente para via das pentoses, usada possivelmente na biossíntese de nucleotídeos. Entretanto, após a celularização (10h) a G-6P pode ser dirigida preferencialmente para a via glicolítica como substrato energético para o desenvolvimento embrionário. Este fato foi confirmado pela detecção de um aumento nas atividades das enzimas hexoquinase e piruvato quinase, após a celularização do embrião. O acúmulo de metabólitos-chave como o glicogênio e a glicose foram monitorados sendo detectado um aumento em suas concentrações de 0h até às 15h após a oviposição. Detectamos a atividade da enzima glicogênio sintase quinase-3 (GSK3) nos tempos iniciais até 3 hr, e de 48h até o fim da embriogênese, estando inversamente relacionada ao conteúdo de glicogênio nos ovos. Adicionalmente, clonamos e sequenciamos um fragmento de DNA de 600 pb relativo a uma região conservada do gene da enzima GSK3 a partir de RT-PCR de ovos de 0h. O conjunto dos dados obtidos sugere um alto controle do metabolismo de glicose durante a embriogênese do mosquito *Aedes aegypti*.

## Abstract

In the present study we investigated glucose metabolism during the embryogenesis of the mosquito *Aedes aegypti*. An increase in glucose and glycogen content during the *A. aegypti* embryonic development was detected and showed may be due to the high enzyme activity of gluconeogenesis and concomitantly low glycolysis activity. Glucose-6-phosphate (G-6P), formed by hexokinase, enzyme that catalyze the first step of glycolysis, at the initial part of embryogenesis may be driven mainly to pentose phosphate pathway, in order to produce for biosynthesis nucleotides. However, after cellularization (10h) it may be driven mainly to glycolytic pathways as energetic substrate to embryo development. This fact was confirmed by the detection of an increase in hexoquinase and pyruvate kinase activities after the embryo cellularization. Accumulation of key metabolites such as glycogen and glucose was monitored and revealed that their concentration increases from hour 0 up to hour 15 after oviposition. We detected the glycogen synthase kinase 3 (GSK3) activity that was inversely related of the glycogen content in the eggs in initial times, until to 3h, and from 48h until to the end of embryogenesis. Additionally, we cloned and sequenced a DNA fragment of 600 bp related to the conserved region of GSK3 enzyme using RT-PCR from the 0h old eggs. Taken together these data suggest there is a high metabolism control during the *Aedes aegypti* embryogenesis.

**Abreviaturas utilizadas**

DNA – ácido desoxirribonucléico

G6PDH – glicose 6-fosfato desidrogenase

GSK3 – glicogênio sintase quinase 3

HK – hexoquinase

IDP – inositol difosfato

pb – pares de base

PBS – tampão fosfato de sódio 10 mM, NaCl 0,15 M

PEPCK – fosforenolpiruvato carboxiquinase

PFK-1 – fosfofrutoquinase

PIP<sub>3</sub> – fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato

PI3K – fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato quinase

PK – piruvato Kinase

PKB/Akt – proteína quinase B

PMSF – phenyl metyl sulphonyl fluoride

TRIS – tris-hidroximetil aminometano

# 1. INTRODUÇÃO

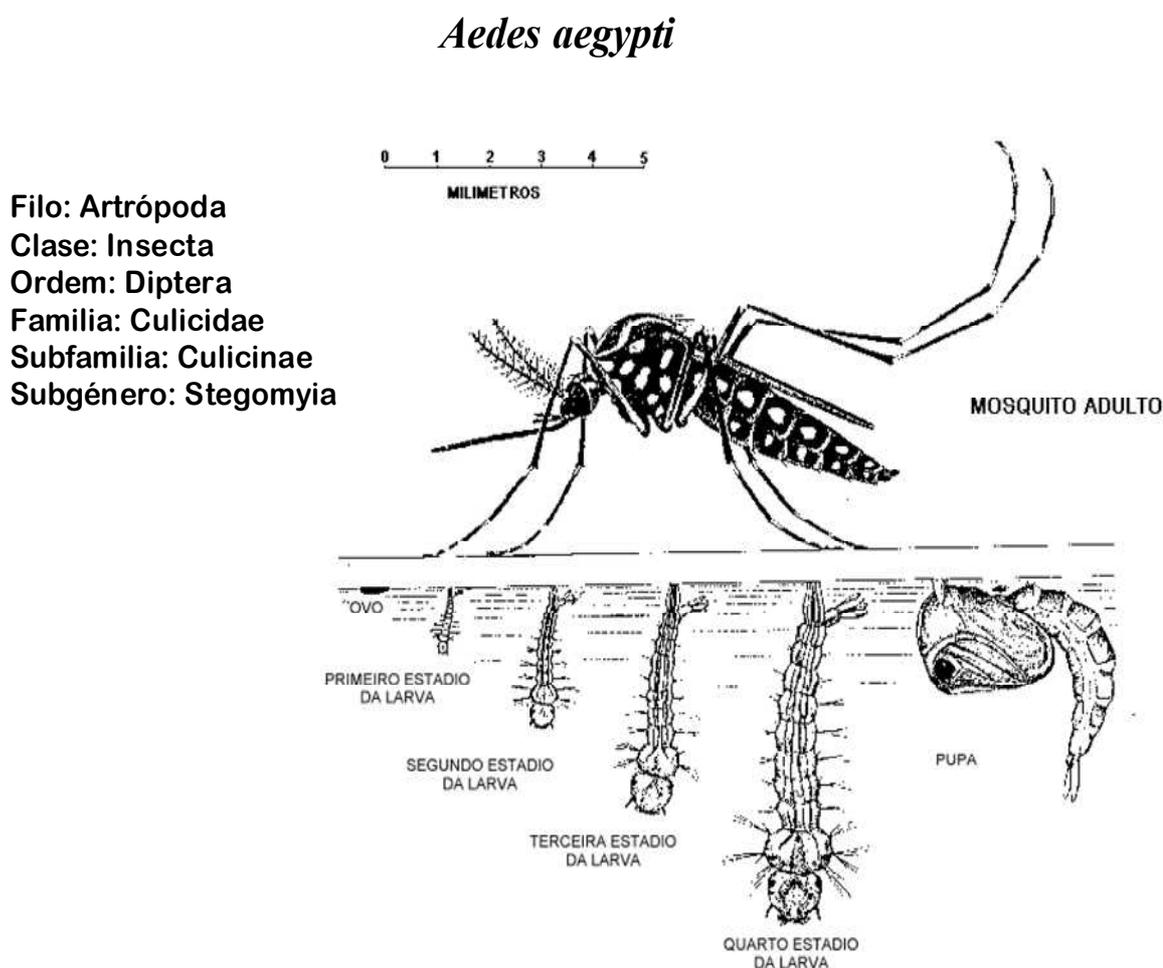
---

---

## 1.1 O mosquito *Aedes aegypti*

Por sua estreita associação com o homem, o *Aedes aegypti* é essencialmente um mosquito urbano, encontrado em maior abundância em cidades, vilas e povoados. Entretanto, no Brasil, México e Colômbia, já foi localizado em zonas rurais tendo sido provavelmente transportado de áreas urbanas em vasos domésticos, contendo ovos e/ou larvas (OPAS/OMS, 1991).

Os mosquitos são insetos holometabólicos, ou seja, desenvolvem-se através de metamorfose completa, e o ciclo de vida do *Aedes aegypti* compreende quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1).



**Figura 1: Classificação taxonômica e o ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*.**

Os ovos são postos fixados milímetros acima da superfície água. Os quatro estágios larvares assim como a pupa consistem na fase de vida aquática do inseto (Retirado de FUNASA, 2001).

A fecundação se dá durante a postura. Os ovos são postos pela fêmea, individualmente, aderidos a um substrato úmido próximos à superfície da água. No momento da postura os ovos são brancos, mas, rapidamente, adquirem a cor negra brilhante (FUNASA, 2001).

A larva do *Aedes aegypti* é dividida em cabeça, tórax e abdômen. O segmento posterior e anal do abdômen tem quatro brânquias lobuladas para regulação osmótica e um sifão ou tubo de ar para a respiração na superfície da água. A larva passa por quatro mudas (ecdises) anteriores as quais correspondem quatro estágios larvares. A pupa é dividida em cefalotórax e abdômen (FUNASA, 2001).

O adulto de *Aedes aegypti* é escuro, possui faixas brancas nas bases dos segmentos tarsais e um desenho em forma de lira no mesonoto. O macho pode ser identificado macroscopicamente da fêmea por possuir antenas plumosas, entre outras características (FUNASA, 2001).

Fêmeas adultas de *Aedes aegypti* podem ingerir néctar ou de sangue como fonte nutritiva. A alimentação sanguínea é essencial para as fêmeas de *A. aegypti* de fato completarem a ovogênese e conseqüentemente o processo reprodutivo (Burke, 1976; Grimes, 1980). O papel dos mosquitos, como vetores de doenças devastadoras como malária, febre amarela e dengue está ligada a sua estratégia reprodutiva (Raikhel & Dhadialla, 1992), sendo o mosquito *Aedes aegypti* o mais importante vetor dos vírus da dengue e da febre amarela (Jasinskiene *et al.*, 1998).

## 1.2 Ovogênese

A fêmea provê o ovo com ingredientes orgânicos e inorgânicos necessários para a construção do embrião (Stewart & Thompson, 1993). No momento da ovoposição tudo que é requerido para o desenvolvimento do embrião já foi adicionado no ovo, com exceção de oxigênio para o metabolismo aeróbio (Rahn *et al.*, 1974) e, em algumas espécies, água (Vleck, 1991).

Grandes quantidades de proteínas, lipídios e açúcares são incorporados nos ovócitos em crescimento durante a ovogênese. A principal proteína de reserva dos ovos de artrópodes é a vitelina, a qual é derivada de um precursor hemolinfático, a vitelogenina. A vitelogenina é adquirida pelos ovócitos através de endocitose mediada por receptor e é acumulada em estruturas chamadas grânulos de vitelo

(Sappington & Raikhel, 1998). Em insetos aminoácidos derivados da alimentação sanguínea são utilizados por células do corpo gorduroso para a síntese de proteínas do vitelo. Tais proteínas sintetizadas pelo corpo gorduroso são então secretadas na hemolinfa e subseqüentemente absorvidas pelos ovários onde são depositadas nos ovócitos. Este processo é denominado vitelogenese (Raikhel & Dhadialla, 1992). A função da vitelina é suprir o desenvolvimento do embrião com aminoácidos, e sua utilização está relacionada à ação de proteases específicas (Fagotto, 1990; Yamamoto & Takahashi, 1993; Logullo *et al.*, 1998).

A deposição seqüencial de componentes do vitelo durante a ovogênese em *Aedes aegypti*, foi observada paralelamente a dois processos de crescimento do comprimento tanto dos folículos ovarianos como dos ovócitos. A primeira fase de crescimento linear foi associada com a incorporação equicalórica (em quantidades equivalentes em calorias) e sincrônica (simultânea) de lipídeos e proteínas aos ovócitos. A segunda fase linear de crescimento foi caracterizada pela incorporação rápida e tardia de glicogênio aos ovócitos (Brigel *et al.*, 2003).

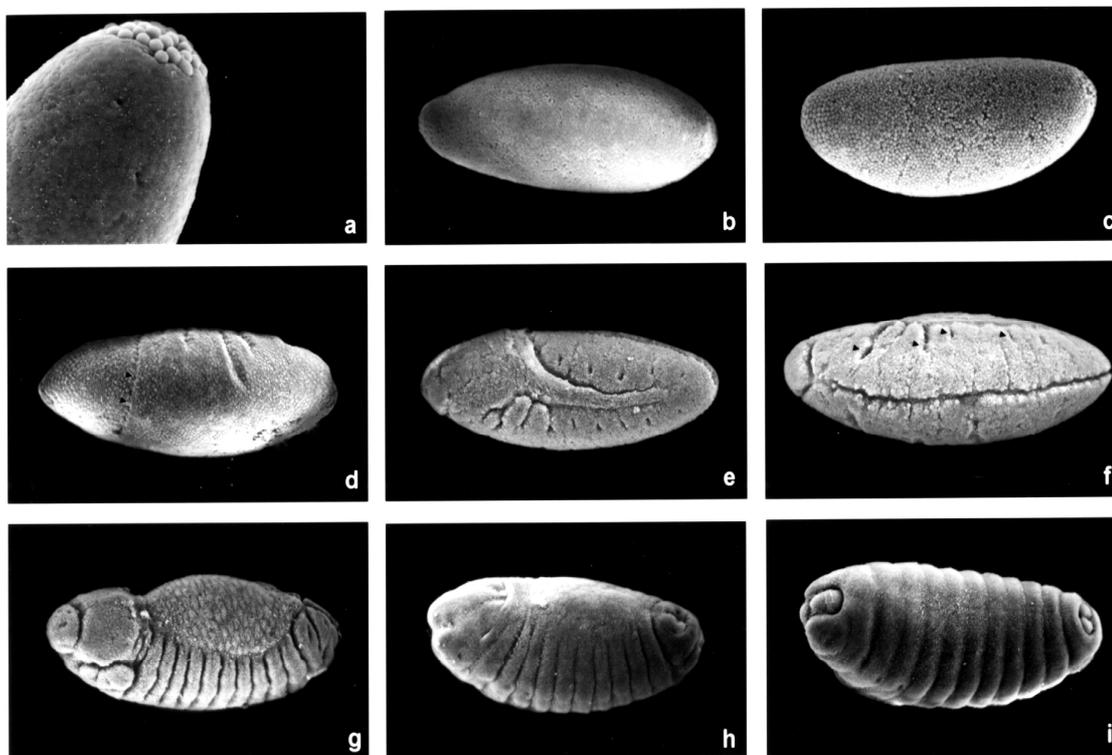
### 1.3 Embriogênese

Os embriões desenvolvem-se basicamente de duas formas: os que têm a embriogênese ocorrendo desde o início por divisões mitóticas formando estruturas semelhantes à mórula (16 células), como é o caso de mamíferos, rãs, ouriços e galinhas; e os que formam um sincício com abrupta celularização, como é observado na mosca *Drosophila melanogaster* (Bate & Arias, 1993).

Por ser amplamente estudada e devido à sua alta proximidade evolutiva com o *Aedes aegypti*, utilizamos como referência a embriogênese da mosca *Drosophila melanogaster*.

A embriogênese da *D. melanogaster* é rápida, com duração de 24 horas a 26°C (Figura 2). Após a fecundação, o zigoto passa por rápidas divisões mitóticas, uma a cada nove minutos. Em seguida, o processo é realizado sem clivagem do citoplasma, resultando em uma estrutura denominada sincício, na qual muitos núcleos estão presentes em um citoplasma comum. Até esse momento, o embrião é considerado unicelular. Após nove divisões, os núcleos migram para a periferia formando o blastoderma sincicial. Posteriormente, membranas crescem a partir da

superfície envolvendo os núcleos e formando células, que dão origem ao blastoderma celular. No entanto, não são todos os núcleos que dão origem a esta estrutura. Em torno de 15 núcleos posicionam-se na extremidade posterior do embrião, desenvolvendo-se em células polares, que futuramente darão origem às células germinativas, ou seja, espermatozóide ou óvulo (Bate & Arias, 1993).



**Figura 2: Microscopia eletrônica de varredura demonstrando estruturas e processos na embriogênese de *Drosophila melanogaster*.**

a) Região posterior da célula-ovo b) Blastoderma sincicial c) Blastoderma celular d) Gástrula e) Extensão da banda germinal, f) Retração da banda germinal g) Início da segmentação h) Fechamento dorsal i) Involução da cabeça (Retirado de Bate & Arias, 1993).

A descrição sobre morfologia de embriões de mosquitos é muito precária o que tem sido atribuído a problemas relacionados à permeabilização dos ovos, que dificultam a entrada dos agentes fixadores utilizados em microscopia óptica ou eletrônica. Entretanto, publicações anteriores descreveram morfologicamente o desenvolvimento embrionário do mosquito *Aedes aegypti* (Raminani & Cupp, 1975 e 1978). O ovo de *Aedes aegypti*, na oviposição, consiste em uma típica matriz citoplasmática de vitelo. A fusão dos núcleos do macho e da fêmea ocorre ao fim de 1h. O blastoderma sincicial é formado com 6h de desenvolvimento. A celularização do blastoderma está completa com 10h. A segmentação do embrião termina em 20h

(Raminani & Cupp, 1975). A retração da banda germinal inicia-se com 30h e com 40h está completa. A formação dos rudimentos gonadais ocorre com 35h. As células polares em cada rudimento iniciam mitose em 70h; em torno de 90h o número total de células em cada rudimento é atingido. Nenhuma outra parte do sistema reprodutivo é formada durante a embriogênese (Raminani & Cupp, 1978).

#### 1.4 Metabolismo energético em insetos

Os processos anabólicos, de modo geral, visam suprir os organismos de energia para manutenção de suas funções vitais. Em seres autotróficos a energia da luz é utilizada para converter água e dióxido de carbono em glicose. Já em seres heterotróficos, a energia é retirada dos alimentos que fornecem os carboidratos, os lipídeos, as proteínas, as vitaminas, os nucleotídeos e os sais minerais. A utilização destas moléculas tem como objetivo principal a obtenção de energia na forma de ATP (adenosina trifosfato) para as células. Quando o ATP é hidrolisado, ele é capaz de liberar uma grande quantidade de energia livre, contida nas suas ligações de fosfato, permitindo que reações importantes, que “*in vitro*” são termodinamicamente desfavoráveis aconteçam com muita facilidade dentro dos seres vivos (de Meis, 2001). 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 em conjunto de vias metabólicas.

Ao longo da evolução, os seres vivos desenvolveram a capacidade de converter certas moléculas em energia, através de processos bioquímicos. Sugere-se que a primeira via metabólica de obtenção de energia que surgiu na natureza, tenha sido a glicólise, já que nas primeiras fases de adaptação ao nosso planeta não existia oxigênio, ou seu nível era muito baixo (Fothergill – Gilmore & Michels, 1993).

No que diz respeito ao estudo do metabolismo em insetos, recentes trabalhos têm como foco a participação de aminoácidos no metabolismo energético. Em fêmeas de mosquitos após realizarem sua alimentação sanguínea os aminoácidos derivados da digestão de proteínas podem ser usados para síntese de proteínas e de lipídeos dos ovos ou ainda, em situações de equilíbrio energético desfavorável, serem oxidados pelos tecidos da fêmea para produção de energia. Entretanto a oxidação destes aminoácidos gera a liberação de nitrogênio sob forma de amônia

tóxica. Em recente estudo, fêmeas de *Aedes aegypti* foram alimentadas exclusivamente com uma proteína deficiente em aminoácidos essenciais, a parvalbumina. Tal deficiência na composição de aminoácidos desta dieta impossibilita a realização de síntese protéica para a vitelogênese e a ovogênese, porém continua oferecendo aminoácidos susceptíveis de oxidação pela fêmea. Os resultados mostraram que nível de prolina na hemolinfa aumentou duas vezes quando comparado ao grupo controle positivo de fêmeas alimentadas com albumina. A degradação dos aminoácidos da dieta produz uma quantidade de amônia adicional que é estocada sob forma de prolina. Os autores sugerem ainda a existência de um ciclo da prolina em mosquitos, que permitiria a estocagem temporária de amônia derivada da desaminação de aminoácidos em uma forma não tóxica (Pennington *et al.*, 2003).

Em outro estudo sobre o metabolismo energético em *Aede aegypti*, outra importante função foi atribuída à prolina durante a atividade de vôo desta espécie. Os resultados obtidos permitiram atribuir a prolina a função de transferir unidades de acetil-coenzima-A (acetil-CoA) do corpo gorduroso para o músculo de vôo. No corpo gorduroso, moléculas de acetil-CoA são convertidas em alfa-cetoglutarato pelo ciclo do ácido cítrico e posteriormente em glutamato e prolina que pode ser transportada para o músculo de vôo através da hemolinfa. No músculo de vôo a prolina é então convertida de volta a alfa-cetoglutarato que entra no ciclo do ácido cítrico para ser oxidado produzindo ATP (Scaraffia & Wells, 2002).

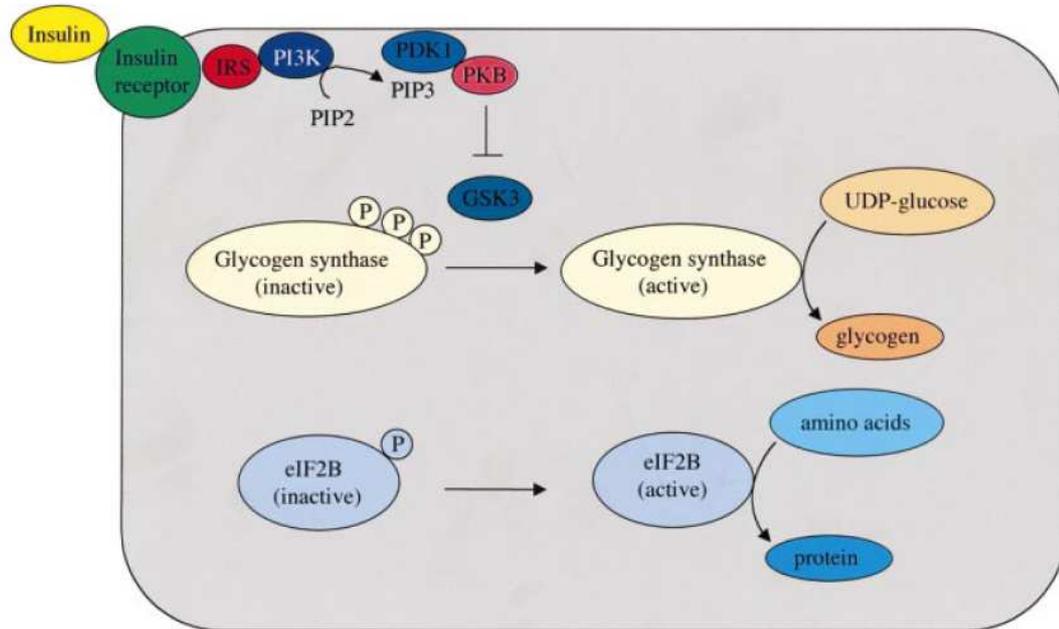
No que diz respeito ao balanço energético durante a embriogênese o custo metabólico do desenvolvimento embrionário pode ser definido como a quantidade total de energia consumida pelo embrião durante o desenvolvimento, incluindo o gasto para o crescimento, biossíntese e manutenção dos tecidos (Thompson & Stewart, 1997). O ovo fertilizado de inseto é um sistema fechado dependente do conteúdo do vitelo para a embriogênese e para nutrição do embrião. O metabolismo energético foi estudado no desenvolvimento embrionário do mosquito *Culex quinquesfasciatus*. Neste trabalho foram determinados os conteúdos totais de proteína lipídeos e glicogênio em ovos recém postos e em larvas recém eclodidas. Os conteúdos de lipídeos e glicogênio decaíram de modo significativo durante a embriogênese desta espécie. Entretanto o conteúdo de proteínas totais não variou significativamente neste mesmo período, fato este atribuído à transformação de

vitelina em proteínas larvais sem gerar queda mensurável na quantidade total de proteínas (Van Handel, 1993).

O estudo do metabolismo de carboidratos durante a embriogênese do peixe de água doce *Coregonus spp.*, identificou as vias centrais do metabolismo e alguns importantes metabólitos foram caracterizados em ovos desta espécie em três estágios distintos do desenvolvimento embrionário. A glicólise foi monitorada pelas atividades das enzimas fosfofrutoquinase (PFK-1), piruvato quinase e pela queda nos níveis de hexoses. A gliconeogênese foi constatada pela atividade da glicose 6-fosfatase, a via da pentose fosfato pela atividade da transaldolase (via não oxidativa) e da glicose-6 fosfato desidrogenase (via oxidativa) e pelo aumento da síntese de ribose. Durante todos os estágios da embriogênese foram investigados os níveis de riboses, heptoses e pentoses os quais apresentaram correlação com a viabilidade dos ovos. Os níveis de hexoses, 6-desoxihexoses e a atividade da glicose-6 fosfatase apresentaram correlação com parâmetros de qualidade dos ovos em alguns dos estágios embrionários investigados, confirmando a importância do metabolismo de carboidratos em ovos (Lahsteiner, 2005).

### **1.5 A enzima GSK3 e suas funções**

A enzima glicogênio sintase quinase-3 (GSK3) foi identificada originalmente como reguladora do metabolismo de glicogênio (Embi *et al.*, 1980). A inibição da atividade de GSK3 por insulina é mediada pela proteína quinase B (PK B; também de chamada Akt) (Cross *et al.*, 1995). Trabalhos subsequentes elucidaram a via dependente de fosfatil inositol (PI) 3-quinase pela qual a PKB é ativada por insulina (Cohen *et al.*, 1997; Cohen, 1999). Desse modo, em resposta a insulina, a inibição de GSK3 promove a desfosforilação e ativação de glicogênio sintase (Figura 3) contribuindo para síntese de glicogênio e de proteínas (Walker *et al.*, 2000).



**Figura 3: Insulina estimula síntese de glicogênio e síntese protéica via inibição de GSK3.**

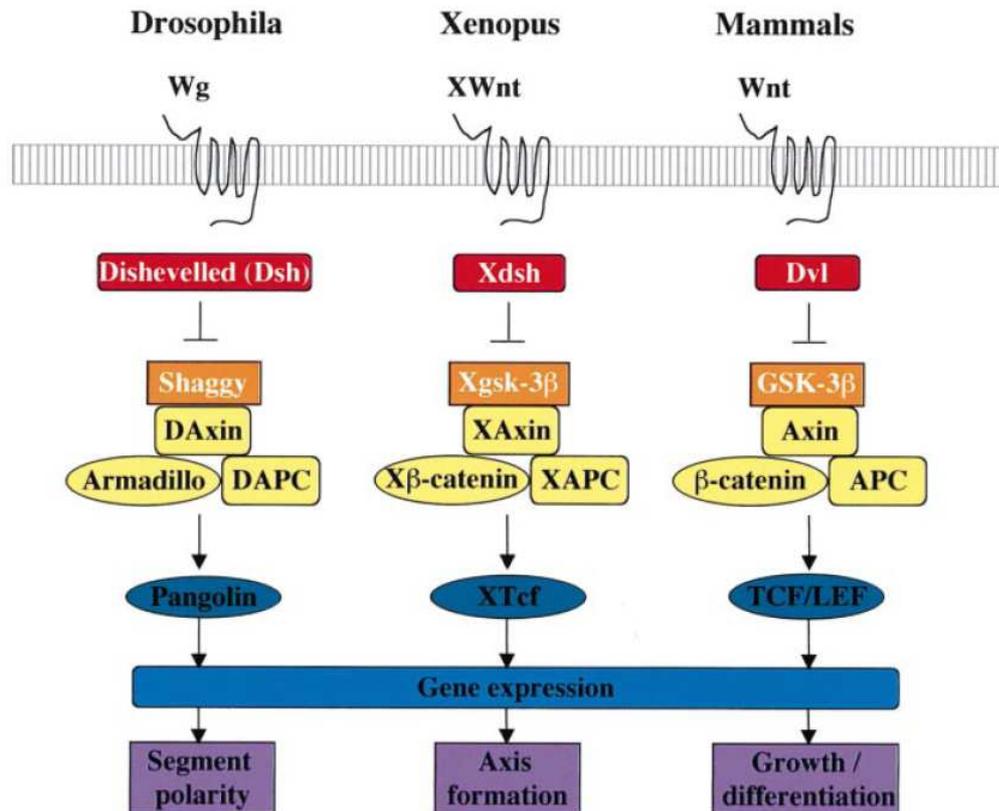
A ligação da insulina ao seu receptor dispara uma cascata de sinalização mediada por proteínas IRS, PI 3-quinase e PKB (Akt) que inibe a GSK3 por fosforilação. Como resultado, resíduos da glicogênio sintase e do fator de iniciação eucariótico (eIF2B) sofrem desfosforilação aumentando suas atividades e assim estimulam respectivamente a síntese de glicogênio e proteínas (Retirado de Frame & Cohen, 2001).

Mais de 40 enzimas são fosforiladas pela GSK3, incluindo 12 fatores de transcrição (Jope & Johnson, 2004). O mau funcionamento da GSK3 está ligado a um número surpreendente de doenças. Trabalhos recentes associam a GSK3 com a hipertrofia muscular (Hardt & Sadoshima, 2002 e Haq et al. 2003), câncer (Manoukian & Woodgett, 2002; Hill & Hemming, 2002), depressão bipolar (Klein & Melton, 1996; Jope, 1999; Phiel & Klein, 2001), esquizofrenia (Kozlovsky *et al.*, 2002), doença de Alzheimer (Grimes & Jope, 2001) e diabetes (Eldar-Finkelman, 2002; Nikoulina *et al.*, 2000).

Alguns anos após sua descoberta, a GSK3 também foi foco de diversos estudos que mostraram que esta é uma quinase essencial para o destino específico de células em embrião precoce de *Drosophila* e *Xenopus* (Dominguez *et al.*, 1995). A inibição de GSK3 por  $\text{Li}^+$  induziu a duplicação do eixo dorsal em *Xenopus* (Kao *et al.*, 1986) o mesmo fenótipo observado quando uma versão negativa dominante de GSK-3 é expressa do lado ventral do embrião (Dominguez *et al.*, 1995; Pierce &

Kimelman, 1995). A razão para isso tornou-se clara quando foi descoberto que o ion  $\text{Li}^1$  inibe a GSK3 (Stambolic *et al.*, 1996; Hedgepeth *et al.*, 1997).

A via de sinalização Wnt atua sobre o crescimento e diferenciação celular em mamíferos, assim como, define a direção dos eixos polares e dos segmentos embrionários em *Drosophila* e *Xenopus*, respectivamente (Figura 4) (Frame & Cohen, 2001). Também exerce funções em tecidos adultos, mantendo células tronco em estado pluripotente (Frame & Cohen, 2001). Na falta do sinal Wnt, a GSK3 ativa está presente em um complexo multiprotéico que se liga a  $\beta$ catenina para degradação mediada por ubiquitina (Aberle *et al.*, 1997).



**Figura 4: Componentes da via de sinalização Wnt são altamente conservados entre diversos organismos.**

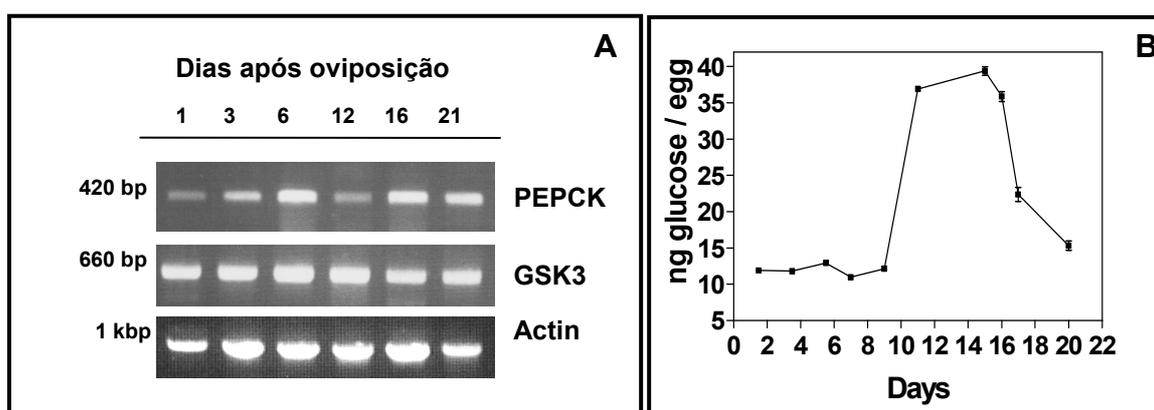
O esquema acima representa particularidades desta via em diferentes organismos demonstrando seus componentes e efeitos específicos sobre a expressão gênica. Abreviaturas: D, *Drosophila*; X, *Xenopus*; Wg, wingless; Dvl/Dsh, Dishevelled (Retirado de Frame & Cohen, 2001).

A GSK3 é um importante componente da via de sinalização Wnt (Frame & Cohen, 2001), que é essencial para a definição de um padrão corporal único durante o desenvolvimento embrionário de *Drosophila* e *Xenopus*. A clonagem molecular revelou que existem duas isoformas intimamente relacionadas, GSK3 $\alpha$  e GSK3 $\beta$ , que podem ser distinguidas principalmente por um domínio rico em glicina na extremidade amino-terminal, presente apenas na isoforma  $\alpha$  (Woodgett, 1990).

Para testar como a GSK3 está envolvida no padrão de formação de vertebrados, sua função foi investigada durante o desenvolvimento inicial de *Xenopus* (He *et al.*, 1995). Foi visto que o domínio mutante negativo de GSK3 induziu a diferenciação dorsal, enquanto que o tipo selvagem de GSK3 induziu a ventralização. Tais resultados indicam que a GSK3 é essencial para a diferenciação ventral e sugerem ainda que a diferenciação dorsal observada envolva a supressão da atividade de GSK3 pela via de sinalização Wnt.

Em recente estudo foi mostrado o controle de GSK3 sobre a expressão de importantes enzimas relacionadas ao metabolismo de glicose em cultura de células hepáticas, (Lochhead *et al.*, 2001). A inibição de GSK3 controlou a inibição da expressão gênica de PEPCK e glicose-6 fosfatase. Os autores sugerem ainda que inibidores de GSK3 podem gerar profundos efeitos na produção de glicose no fígado bem como a disponibilidade de glicose na periferia. Isso abriu uma nova perspectiva de trabalho em nossos estudos, pois ambas as enzimas, GSK3 e PEPCK são importantes reguladoras de vias metabólicas envolvidas no controle do metabolismo de glicose em vários organismos.

Recentemente, em nosso grupo, clonamos e analisamos a expressão da GSK3 e da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), enzima que catalisa a etapa determinante da gliconeogênese durante a embriogênese do carrapato bovino *Boophilus microplus* (Figura 5A). Ambas as enzimas são classicamente descritas como inibidas pela sinalização por insulina, favorecendo a síntese de glicogênio (GSK3), e interrompendo a gliconeogênese (PEPCK). Observamos um grau de expressão variado para a PEPCK comparada à expressão de GSK3 ao longo da embriogênese do *B. microplus*. O conteúdo de glicose em ovos de diferentes idades variou de modo significativo e inversamente correlacionado com a expressão de PEPCK (Figura 5A, B). Tais resultados sugerem um controle refinado e particularmente diferenciado da expressão da enzima PEPCK durante o desenvolvimento do *B. microplus*.



**Figura 5: Análise de expressão (A) de PEPCK e GSK3 e níveis de glicose (B) em ovos do carrapato bovino *B. microplus*, durante a embriogênese.** (Logullo *et al.* 2006; Moraes *et al.*, 2006).

Neste contexto com a intenção de ampliar os horizontes de nossos estudos, começamos a avaliar aspectos básicos do metabolismo energético em embriões do mosquito *Aedes aegypti*.

No atual estudo analisamos o metabolismo de glicose ao longo da formação dos embriões de *Aedes aegypti*. Adicionalmente clonamos e sequenciamos um fragmento de DNA relativo a uma região interna conservada do gene da enzima GSK3.

## **2. OBJETIVOS**

---

---

## 2. OBJETIVOS:

Objetivo 1: Caracterização de aspectos relacionados ao metabolismo de glicose durante a embriogênese do mosquito *A. aegypti*.

- Quantificação de glicose e glicogênio em ovos de *A. aegypti*.
- Determinação da atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo de glicose:
  - 1° ) hexoquinase;
  - 2° ) glicose-6-fosfato desidrogenase;
  - 3° ) piruvato quinase;
  - 4° ) fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK);
  - 5° ) glicogênio sintase quinase-3 (GSK3).

Objetivo 2: Clonagem do gene da enzima GSK3 de *Aedes aegypti*.

- RT-PCR do gene da GSK3;
- Subclonagem do gene da GSK3;
- Sequenciamento do gene da GSK3;

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

---

### 3.1 Animais

Os animais utilizados para obtenção dos ovos são mosquitos da espécie *Aedes aegypti*, cepa Rockefeller, criados no insetário do Laboratório de Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense. Os mosquitos adultos são mantidos a umidade relativa e temperatura ambiente em gaiolas de plástico teladas, alimentados com solução de sacarose a 10% *ad libitum*. As larvas são criadas em bandejas com água e ração. As fêmeas de *A. aegypti* são alimentadas naturalmente com sangue de camundongo, imobilizado no interior da gaiola, para a obtenção de seus ovos.

### 3.2 Postura e manutenção dos ovos

Fêmeas adultas do mosquito *Aedes aegypti*, naturalmente fecundadas com duas semanas de idade são separadas dos machos e alimentadas com sangue de camundongo, estímulo necessário para o início da ovogênese.

A postura é realizada cinco dias após a alimentação sanguínea, através da transferência das fêmeas para placas de petri recobertas no fundo com papel de filtro. A sincronização da postura é conseguida pelo retardamento da oviposição espontânea através da retirada prévia de substratos úmidos do interior das gaiolas, sem o qual as fêmeas alimentadas não ovipõe (retêm os ovócitos). Após a transferência das fêmeas para placas de petri contendo papel de filtro a postura é disparada pela umidificação do papel. Para a oviposição as fêmeas são mantidas sob temperatura de 28°C e umidade de 80% durante 15 min em uma estufa incubadora. Em seguida as fêmeas são descartadas.

Os ovos aderidos ao papel de filtro úmido são então contados e incubados sob temperatura de 28°C e umidade de 80% durante os respectivos tempos de 0; 5; 15; 24; 48; 72 e 96 horas após a oviposição. Para interromper o desenvolvimento embrionário os ovos sincronizados de diferentes idades são transferidos para criotubos e congelados a -190°C em nitrogênio líquido.

### 3.3 Obtenção de homogeneizados de ovos

Todos os homogeneizados de ovos de *A. aegypti* foram obtidos por ruptura mecânica (com auxílio de um homogeneizador manual) sob baixa temperatura (no gelo) em microtubos de 1,5 mL na presença de um coquetel de inibidores de proteases contendo leupeptina (50  $\mu$ M), pepstatina (2  $\mu$ M) e PMSF (0,5 mM).

A quantidade de ovos e soluções utilizadas, bem como a adição de outros tipos de inibidores está especificada na metodologia respectiva.

### 3.4 Quantificação de glicose

1000 ovos (5mg) sincronizados foram homogeneizados. Nos tempos descritos anteriormente, em 250  $\mu$ L de tampão PBS 100 mM, pH 7,4. Submeteu-se os homogeneizados de ovos a centrifugação a 200 X g por 10 minutos e recolheu-se 5,0  $\mu$ L do sobrenadante. Avolumou-se até 250  $\mu$ L com PBS pH 7,4 e reagiu-se com 250  $\mu$ L de glucox (15 mg/mL de PBS pH 7,4). Incubou-se este meio reacional a 37°C por 10 minutos. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu UV-visível-1240) a 510 nm. Calculou-se o conteúdo de glicose contida nos ovos com base em uma curva padrão de glicose. (Kit enzimático glucox para dosagem de glicose. registro MS 10231810011).

### 3.5 Quantificação glicogênio

1000 de ovos (5mg) sincronizados foram homogeneizados como descrito anteriormente, em 250  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 200 mM, pH 4,8. Os homogeneizados de ovos foram submetidos a centrifugação a 200 X g por 10 minutos e 5,0  $\mu$ L do sobrenadante foram recolhidos. 20  $\mu$ L da enzima  $\alpha$ -amiloglucosidase (1,0 mg/mL) foram adicionados e incubou-se este meio de reação a 40°C por 4 horas. Os tubos foram avolumados com PBS pH 7,4 até 250  $\mu$ L. 250  $\mu$ L de glucox (15 mg/mL de PBS pH 7,4) foram adicionados e incubados a 37°C por 10 minutos. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu

UV-visível-1240) a 510 nm. Calculou-se o conteúdo de glicogênio nos ovos com base em uma curva padrão de glicogênio submetida às mesmas condições do ensaio.

### **3.6 Atividade de Hexoquinase**

10 mg de ovos sincronizados foram homogeneizados em 250  $\mu$ L tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,5. O homogeneizado foi centrifugado a 200 x g por 10 minutos e recolhido 10,0  $\mu$ L do sobrenadante. Foram adicionados 385  $\mu$ L de meio de reação contendo  $MgCl_2$  6 mM, ATP 0,5 mM e  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 0,5 mM e glicose 6-fosfato desidrogenase 3 unidades/mL. A reação foi disparada com 5,0  $\mu$ L de glicose 2 mM. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu UV-visível-1240) a 340nm em intervalos de 1 minuto, durante 10 minutos de reação. A atividade de total HK foi determinada indiretamente pela oxidação de  $\beta$ -NADH, acoplada ao consumo de glicose pela glicose 6-fosfato desidrogenase. O método fundamenta-se na detecção da formação de  $\beta$ -NADH a 340 nm, que é proporcional a velocidade de formação de glicose 6-fosfato no meio (Galina Filho *et al.*, 1999). A atividade específica foi obtida pela razão entre a atividade total, proporcional à formação de  $\beta$ -NADH, pela quantidade de proteínas (em mg) na amostra.

### **3.7 Atividade de Piruvato Quinase**

10 mg de ovos foram homogeneizados em 250  $\mu$ L de tampão TRIS-HCl 20 mM, pH 7,5. O homogeneizado foi centrifugado a 200 x g por 10 minutos e recolhido 10,0  $\mu$ L do sobrenadante. Foram adicionados 380  $\mu$ L de meio de reação contendo ADP 0,8 mM,  $MgCl_2$  5 mM,  $\beta$ -NADH 0,4 mM e lactato desidrogenase 5 unidades/mL. Disparou-se a reação com 10,0  $\mu$ L de fosfoenolpiruvato (PEP) 15 mM. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu UV-visível-1240) a 340nm em intervalos de 1 minuto, durante 10 minutos de reação. A atividade de PK foi medida indiretamente pela oxidação de  $\beta$ -NADH acoplada ao consumo de PEP pela lactato desidrogenase. O método fundamenta-se na detecção do consumo de  $\beta$ -NADH a 340 nm, que é proporcional a velocidade de formação de piruvato no meio (Worthington, 1998). A atividade específica foi obtida pela razão entre a

atividade total, proporcional ao consumo de  $\beta$ -NADH, pela quantidade de proteínas (em mg) na amostra.

### **3.8 Atividade de Glicose 6-Fosfato Desidrogenase**

10 mg de ovos sincronizados foram homogeneizados em 250  $\mu$ L de tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,5. O homogeneizado foi centrifugado a 200 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi separado. Em um tubo foram adicionados 390  $\mu$ L de meio de reação contendo Tris-HCl 55 mM, pH 7,8,  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> 6 mM e glicose 6-fosfato 100 mM. A reação foi disparada com 10  $\mu$ L do sobrenadante. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-visível-1240) a 340 nm em intervalos de 1 minuto, durante 10 minutos de reação. A velocidade foi determinada pela detecção da formação de  $\beta$ -NADH (Moritz *et al.*, 2000). A atividade específica foi obtida pela razão entre a atividade total, proporcional à formação de  $\beta$ -NADH, pela quantidade de proteínas (em mg) na amostra.

### **3.9 Atividade de Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase**

10 mg de ovos sincronizados foram homogeneizados, conforme descrito anteriormente, em 250  $\mu$ L de tampão Hepes 100 mM pH 7,5. O homogeneizado foi centrifugado a 200 x g por 10 minutos e recolhido 10  $\mu$ L de sobrenadante. Foram adicionados 380  $\mu$ L de meio de reação contendo Hepes 100 mM pH 7,0, MnCl<sub>2</sub> 10 mM, KHCO<sub>3</sub> 100 mM, glutatona reduzida 2 mM, PEP 10 mM,  $\beta$ -NADH 0,2 mM e 24 unidades/mL de malato desidrogenase. A reação foi disparada com a adição de 10  $\mu$ L de IDP 2,5 mM. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu UV-visível-1240) a 340nm em intervalos de 1 minuto, durante 10 minutos de reação. A atividade de PEPCK foi medida indiretamente pela oxidação de  $\beta$ -NADH acoplada ao consumo de malato pela malato desidrogenase. A atividade de PEPCK foi determinada na direção da formação de oxaloacetato, pela detecção da formação de  $\beta$ -NADH (Peters-Wendisch, 1996). A atividade específica foi obtida pela razão entre a atividade total, proporcional à formação de  $\beta$ -NADH, pela quantidade de proteínas (em mg) na amostra.

### 3.10 Atividade da GSK3

10 mg de ovos sincronizados foram homogeneizados em 250  $\mu$ L de tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,5. O homogeneizado foi centrifugado a 200 x g por 10 minutos e recolhido 10  $\mu$ L do sobrenadante para disparar a reação. Em um tubo foram adicionados 90  $\mu$ L de meio de reação contendo  $MgCl_2$  10 mM, dithiothreitol 5 mM, peptídeo CREB 50  $\mu$ M e  $\delta$ -ATP radioativo 100  $\mu$ M (500-3000 CPM/pmol). Adicionou-se molibdato de amônio 1 mM (inibidor de fosfatase) e heparina 1  $\mu$ g/mL (inibidor de caseína cinase). Após a reação foram aplicadas alíquotas em tiras de papel fosfocelulose Whatman P-81 (1cm x 2cm). As tiras de papel foram lavadas com 5 mL de ácido fosfórico 75 mM. Os papéis foram secos sob lâmpada infravermelha, colocados em tubos especiais e embebidos com 300  $\mu$ L de líquido de cintilação, para contagem em um cintilador líquido. A contagem foi feita em janela de carbono por 30 segundos (Wang *et al.*, 1994). A atividade específica foi obtida pela razão entre a atividade total, proporcional ao número de contagens por minutos (CPMs), pela quantidade de proteínas (em mg) na amostra.

### 3.11 RT-PCR do gene da GSK3

Realizou-se a extração de mRNA de ovos de 0 hora após a oviposição utilizando o “QuickPrep micro mRNA purification kit (Amersham Biosciences)”, e o cDNA correspondente foi sintetizado com o “kit First-strand cDNA Synthesis (Amersham Biosciences)”.

Para a amplificação dos cDNAs por PCR utilizou-se “primers” degenerados sendo o primeiro primer GTIGCIATHAARAARGTIYTICARGAY e o primer reverso YTTRWRYTCIRTRTARTTIGGRTTCAT, para uma região quinase extremamente conservada da GSK3 em *Drosophila*, *Xenopus*, Humano, Zebra Fish e ouriço do mar, depositadas no “genbank”. O programa utilizado para amplificação no PCR foi: 94°C/5min; 40 x ( 94°C/1min.; 45°C/1min.; 72°C/1min.; 72°C/10min.); 4°C ( $\infty$ ).

O produto da reação de PCR foi observado por eletroforese de DNA em gel de agarose 2,5%, corado com brometo de etídio.

### 3.12 Subclonagem e sequenciamento do gene da GSK3.

Realizou-se a subclonagem de um fragmento de DNA de 600 pb, amplificado por RT-PCR, de ovos sincronizados de 0h de *A. aegypti*, em células DH5 $\alpha$  de *E. coli* com o plasmídeo “pGEM-T Easy”.

Após a ligação do fragmento de DNA de 600 pb amplificado (produto do RT-PCR) ao plasmídeo com a enzima DNA ligase, promoveu-se a transformação bacteriana de *E. coli* por choque térmico com o produto da ligação. Em seguida, selecionou-se os clones positivos de *E. coli*, contendo o plasmídeo com o inserto. Para isso, após a extração de DNA plasmidial realizou-se a digestão deste material com a enzima EcoRI “overnight”. Em seguida foi analisada a presença de clones positivos através de uma eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio.

O sequenciamento dos clones selecionados foi realizado em um seqüenciador de nucleotídeos BigDye Terminator v3.0, modelo ABI 377XL (AppliedBiosystems), no Setor de Sequenciamento do Laboratório de Biotecnologia do Instituto Oswaldo Cruz. Após o sequenciamento as seqüências foram submetidas ao “gene bank” para identificação e comparação.

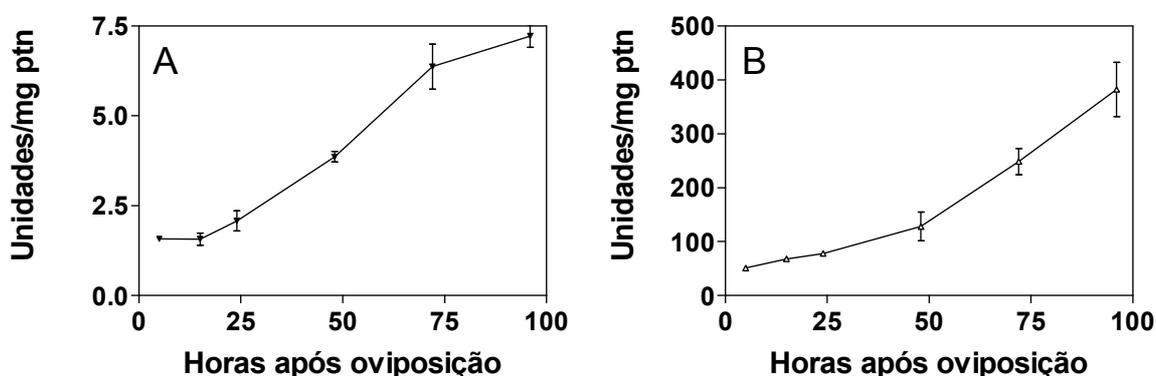
## **4. RESULTADOS**

---

---

## 4.1 A Glicólise

A atividade da via glicolítica foi avaliada durante a embriogênese de *A. aegypti* por medida das atividades das enzimas-chave envolvidas neste processo, a hexoquinase (HK) e a piruvato quinase (PK). O padrão de atividade de PK esteve correlacionado com a atividade de HK ao longo de toda a embriogênese (Figura 6A e B). Os resultados demonstram um acentuado aumento da atividade glicolítica em ovos a partir da 15ª hora do desenvolvimento embrionário. Estes dados sugerem uma crescente utilização da via glicolítica, o que pode estar correlacionado a um aumento da demanda energética ao longo do desenvolvimento embrionário.

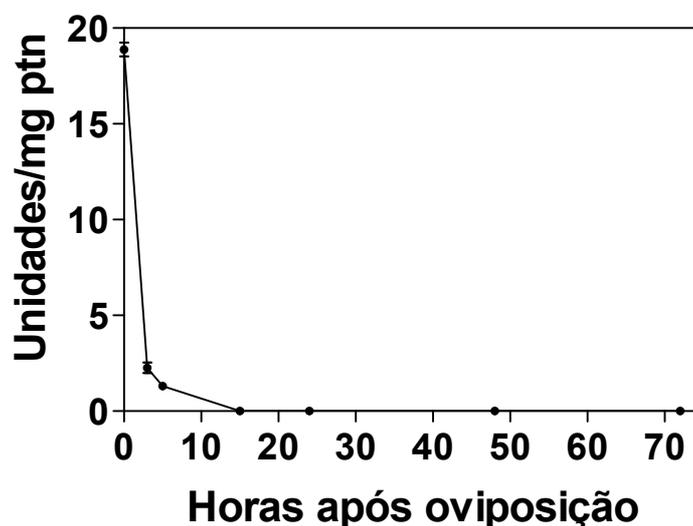


**Figura 6: Atividade específica de hexoquinase (A) e de piruvato quinase (B) na embriogênese de *Aedes aegypti***

As atividades de HK de PK foram monitoradas em ovos sincronizados de diferentes idades, em horas, ao longo do desenvolvimento embrionário. As atividades específicas das enzimas foram determinadas de acordo com o coeficiente de extinção molar do  $\beta$ -NADH que foi monitorado a 340 nm. Os símbolos representam a média das atividades específicas  $\pm$  erro padrão.

## 4.2 Via das Pentoses

A atividade específica da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) foi monitorada durante a embriogênese de *A. aegypti* para avaliar a participação da via das pentoses nesta fase do desenvolvimento. Esta enzima catalisa a reação glicose 6-P  $\rightarrow$  6-P-gliconolactona, uma etapa limitante da via das pentoses. Verifica-se que de 0 a 15 horas a atividade passa de 20 U/mg para níveis abaixo do limite de detecção até os tempos finais da embriogênese (Figura 7).

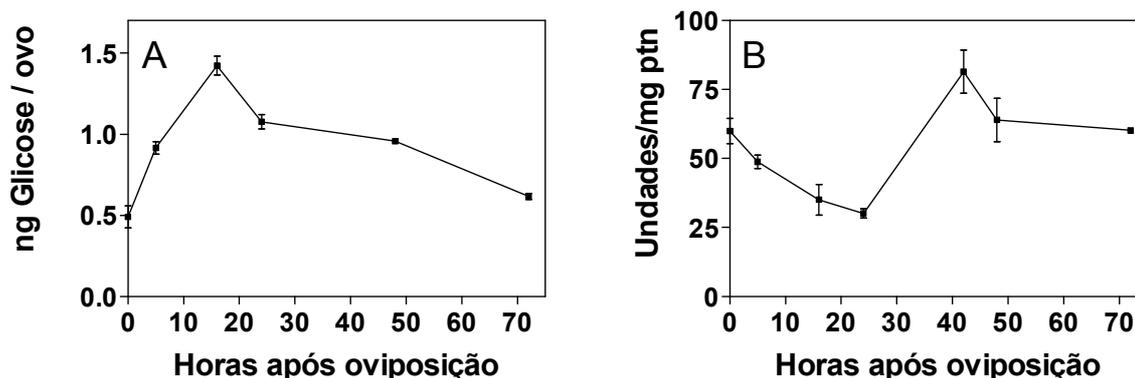


**Figura 7: Atividade específica de glicose 6-fosfato desidrogenase na embriogênese de *Aedes aegypti***

A atividade de G6PDH foi monitorada em ovos sincronizados de diferentes idades. A produção de  $\beta$ -NADH foi monitorada a 340 nm. Os pontos representam a média das atividades específicas  $\pm$  erro padrão.

### 4.3 Gliconeogênese

A gliconeogênese, na embriogênese do *A. aegypti*, foi avaliada pela determinação do conteúdo de glicose nas diferentes fases do desenvolvimento pela atividade da enzima-chave, a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) (Figura 8B). Verifica-se um aumento no nível de glicose de 0 a 15 horas (Figura 8A). Por outro lado, a concentração de glicose é reduzida a baixos níveis até 72 horas. Inversamente a atividade de PEPCK é reduzida até 24 horas, e subseqüentemente sofre um aumento até 42 horas, sugerindo um controle gliconeogênico dependente do balanço de glicose nestes ovos durante a formação dos embriões.

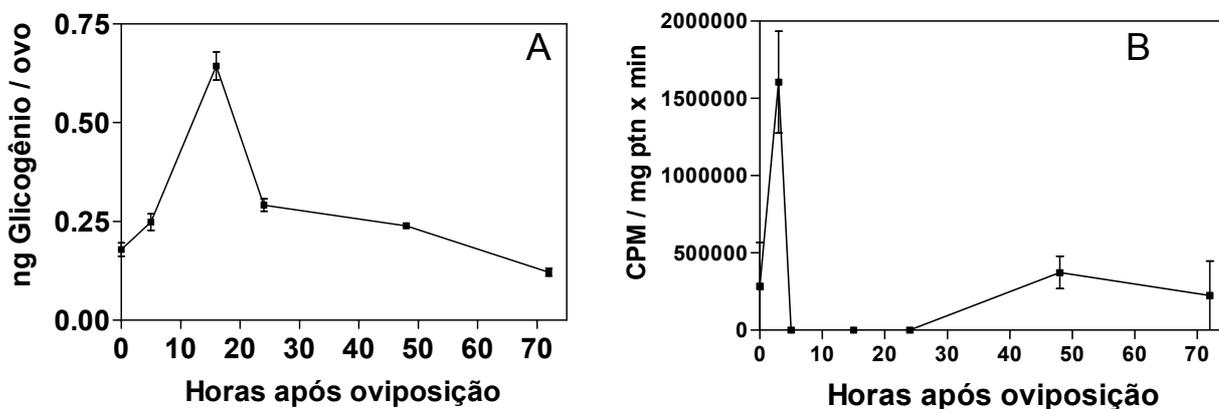


**Figura 8: Níveis de glicose e atividade específica de fosfoenolpiruvato carboxiquinase na embriogênese de *Aedes aegypti***

Conteúdo de glicose (A) e a atividade específica de PEPCK (B) foram monitorados em ovos sincronizados de diferentes idades. Os pontos nas figuras representam a média dos parâmetros avaliados  $\pm$  erro padrão.

#### 4.4 Conteúdo de Glicogênio

A quantidade total de glicogênio nos ovos (Figura 9A) acompanhou o conteúdo de glicose nos ovos (Figura 8) durante a embriogênese de *A. aegypti*. A atividade específica de GSK3 diminui drasticamente nas primeiras 5 horas de embriogênese (Figura 8B). Entre 5 e 24 horas de desenvolvimento a atividade de GSK3 não foi detectada. Entretanto, após 24 horas a atividade GSK3 aumenta até 48 horas, junto a uma drástica diminuição no conteúdo de glicogênio (Figura 8A). Isto mostra uma relação inversa destes parâmetros, sugerindo uma possível regulação no controle de síntese de glicogênio pela GSK3 na embriogênese deste mosquito.



**Figura 9: Conteúdo glicogênio e atividade específica de GSK3 na embriogênese de *Aedes aegypti***

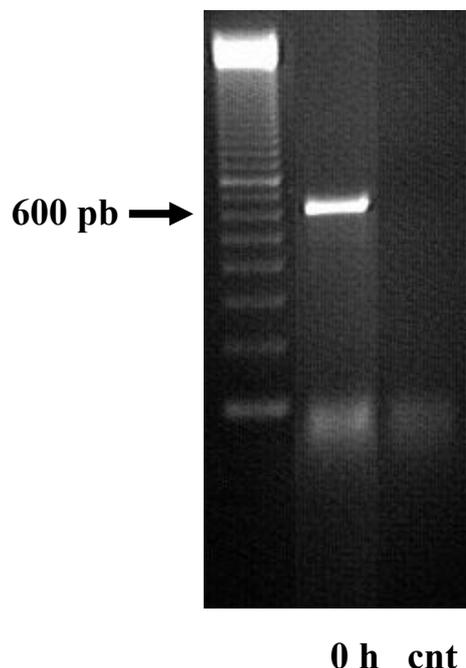
Em ovos sincronizados de diferentes idades, o conteúdo de glicogênio (A) foi determinado pela digestão por  $\alpha$ -amylglucosidase e a subsequente quantificação de glicose liberada. A atividade de GSK3 (B) foi determinada com  $\delta$ -ATP, o peptídeo CREB e tampão de incubação. A reação foi disparada com  $\delta$ -ATP. Após 30 minutos aplicaram-se três alíquotas em um papel de fosfocelulose, lavou-se e determinou-se a radioatividade incorporada. Os pontos representam a média das atividades específicas  $\pm$  erro padrão.

#### 4.5 RT-PCR do gene da GSK3

O conjunto dos dados obtidos sugere um possível controle do metabolismo de glicose e glicogênio durante a embriogênese do mosquito *Aedes aegypti*. Assim voltamos nossos esforços para a subclonagem e o sequenciamento do gene da enzima GSK3 de *A. aegypti*.

O RNA total foi extraído a partir de ovos com 0 h de desenvolvimento, e subsequente submetido à reação com a enzima transcriptase reversa (RT-PCR). Após a síntese da primeira fita de DNA procedeu-se reação em PCR utilizando-se “primers” degenerados desenhados para um sítio quinase conservado de diferentes GSK3 obtidas no “GENE Bank”. O produto da reação de PCR foi monitorado, por eletroforese de DNA em gel de agarose, revelando o aparecimento de uma banda esperada em torno de 600 pb (Figura 10). Este resultado era o esperado, uma vez que os “primers” foram desenhados para amplificar um fragmento deste tamanho.

Neste gel é possível observar uma outra banda fraca abaixo daquela amplificada que pode ser atribuída a uma possível dimerização dos “primers”.

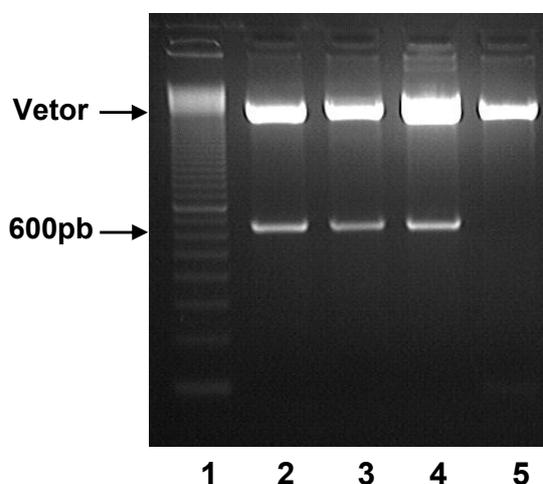


**Figura 10: Resultado do RT-PCR do gene da GSK3 por eletroforese de DNA em gel de agarose na embriogênese de *Aedes aegypti*.**

A amplificação dos cDNAs obtidos de ovos sincronizados de 0h de desenvolvimento gerou uma banda próxima de 600pb. Um controle negativo sem cDNAs (cnt) foi usado. O produto do PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2,5% corado com brometo de etídio.

#### 4.6. Subclonagem e sequenciamento do gene da GSK3

Uma eletroforese de DNA plasmidial de *E. coli* em gel de agarose objetivou a seleção dos clones positivos de *E. coli*, que absorveram o plasmídio com o inserto após a transformação. O resultado da eletroforese (Figura 11), realizada após extração de DNA plasmidial dos clones, revelou o aparecimento da banda esperada em torno de 600 pb, relativa ao inserto clonado, constatando a presença de três clones positivos entre quatro colônias testadas.



**Figura 11: Eletroforese de DNA plasmidial de *E. coli* para a seleção dos clones positivos.**

A seleção dos clones positivos de *E. coli*, após a transformação. Vetor: pGEM-T Easy; 1: padrão de peso molecular; 2, 3 e 4: plasmídio + inserto e 5: plasmídio. O resultado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio após incubação com a enzima EcoRI como descrito em Materiais e Métodos.

O sequenciamento do DNA plasmidial dos clones selecionados foi realizado e a seqüência obtida foi submetida a um alinhamento no “gene bank”.

O fragmento de DNA seqüenciado apresentou, após análise, um grau de homologia altíssimo com inúmeras seqüências de proteínas entre elas enzimas GSK3 de inúmeros organismos. Podemos observar na Tabela 1 algumas espécies que apresentaram um alto grau de homologia com a seqüência de GSK3 de *A. aegypti* obtida.

Entre todas as seqüências homólogas o fragmento submetido apresentou um maior grau de homologia com a enzima ENSAGP00000017061 de *Anopheles gambiae*, isoforma de GSK3 nesta espécie de mosquito (Holt *et al.*, 2002).

	<i>A. gambiae</i>	<i>Xenopus</i>	<i>Galus gallus</i>	<i>Mus musculus</i>	Humana
<b>GSK3 (%)</b>	<b>96%</b>	<b>87%</b>	<b>86%</b>	<b>86%</b>	<b>86%</b>

**Tabela 1: Percentual de homologia da seqüência de *A. aegypti* com a enzima GSK3 de outros organismos**

A seqüência de *A. aegypti* apresentou um alto grau de homologia com enzimas GSK3 de organismos evolutivamente distintos.

O alinhamento entre a seqüência de aminoácidos deduzida a partir do fragmento de DNA clonado e a seqüência de aminoácidos da enzima ENSANGP00000017061 de *Anopheles gambiae* (Figura 12), revelou um grau de homologia de 96%.

```

Query  711  IVAIKKVLQDKRFKNRELQIMRRLEHCNIVKLKYFFYSSGDKKDEVYLNLVLEYIPETVY  532
        +VAIKKVLQDKRFKNRELQIMRRLEHCNIVKLKYFFYSSG+KKDEVYLNLVLEYIPETVY
Sbjct  50    LVAIKKVLQDKRFKNRELQIMRRLEHCNIVKLKYFFYSSGEKKDEVYLNLVLEYIPETVY  109

Query  531  KVARYYAKNKQTIPINFIRLYMYQLFRSLAYIHSLGICHRDIKPQNLLLDPETAVLKLCD  352
        KVAR+YAKNK TIPIN+IR+YMYQLFRSLAYIHSLGICHRDIKPQNLLL+PETAVLKLCD
Sbjct  110   KVARHYAKNKLTIPINYIRIYMYQLFRSLAYIHSLGICHRDIKPQNLLLNPETAVLKLCD  169

Query  351  FGSAKQLLHGEPNVSYICSRYYRAPELIFGAINYTTKIDVWSAGCVLAELLGQPIFPGD  172
        FGSAKQLL GEPNVSYICSRYYRAPELIFGAINYTTKIDVWSAGCVLAELLGQPIFPGD
Sbjct  170   FGSAKQLLDGEPNVSYICSRYYRAPELIFGAINYTTKIDVWSAGCVLAELLGQPIFPGD  229

Query  171  SGVDQIVEI IKVLGTPTREQIKEMNPNYTEFK  76
        SGVDQIVEI IKVLGTPTREQIKEMNPNYTEFK
Sbjct  230   SGVDQIVEI IKVLGTPTREQIKEMNPNYTEFK  261

```

**Figura 12: Alinhamento da seqüência de GSK3 de *A. aegypti* com a isoforma de GSK3 do mosquito *Anopheles gambiae*.**

Os símbolos positivos (+) representam substituições relativas a aminoácidos de mesma função. Os espaços em branco ( ) representam substituições relativas a aminoácidos de funções distintas.

## **5. DISCUSSÃO**

---

---

Em animais ovíparos o desenvolvimento embrionário ocorre fora do organismo materno. Devido a este fato, todos os nutrientes necessários à embriogênese são colocados nos ovócitos pela mãe (Matova & Cooley, 2001). Uma vez fora do organismo materno, é necessário o uso sistemático destas reservas depositadas nos ovos, para não haver comprometimento do embrião em formação (Chinzei & Yano, 1984). O metabolismo de carboidratos é essencial para o desenvolvimento embrionário normal de modo que embriões com o metabolismo de carboidratos insuficiente têm seu desenvolvimento interrompido (Lahnsteiner & Patarnello, 2003). O desenvolvimento embrionário em invertebrados tem sido analisado sob diversos aspectos, tendo a morfogênese e o controle do ciclo celular como exemplos (Nusslein-Volhard & Roth, 1989; Bate & Arias, 1993; Edgar *et al.*, 1994; Patel, 1994). No atual estudo, particularmente, investigamos a dinâmica do metabolismo de glicose durante a embriogênese do mosquito *Aedes aegypti*.

Nossos estudos inicialmente revelaram o destino de um importante intermediário-chave entre o metabolismo energético e a biossíntese de nucleotídeos, a glicose 6-fosfato (G6-P), que faz a ligação entre glicólise e via das pentoses, durante a embriogênese de *A. aegypti*. No início da embriogênese, a G6-P é desviada para suprir de substratos a via das pentoses (Figura 7). Observamos que de 0h até 3h de embriogênese, a via das pentoses é intensamente utilizada. Em contrapartida, nesta mesma etapa, também foi observado um baixo fluxo glicolítico (Figura 6A, B), mostrando um pequeno consumo de G6-P direcionado para a formação de piruvato, ATP e energia. Em *Coregonus spp.* a via das pentoses foi mostrada por aumento nos níveis de ribose e também pela atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (Lahnsteiner, 2005). Em nosso estudo a atividade de G6PDH, a primeira enzima da via das pentoses, não é mais detectada a partir de 5h até o fim da embriogênese (Figura 7). Desse modo, a G6-P nesta fase, é prioritariamente dirigida para via das pentoses, podendo ser convertida em ribose para síntese de nucleotídeos. Assim, nas primeiras horas de embriogênese de *A. aegypti*, relativas à ocorrência de sucessivas divisões nucleares, anteriores a formação do blastoderma sincicial (Raminani & Cupp, 1975), o destino da glicose poderia ser efetivamente a síntese de nucleotídeos fundamentais para a divisão nuclear.

Durante o embriogênese do peixe de água doce *Coregonus spp.* Foram registrados aumentos significativos no metabolismo de carboidratos, principalmente

na taxa de glicólise (Lahnsteiner, 2005). Em nosso estudo durante a embriogênese de *A. aegypti* as atividades de HK e de PK, enzimas-chaves da via glicolítica, aumentaram significativamente e em quantidades diferentes durante a embriogênese (Figura 6A, B), conforme observado no estudo citado anteriormente. Uma taxa muito elevada de glicólise foi observada após 15h do desenvolvimento, como revelado pelas atividades crescentes de HK e de PK (Figura 6A, B), até 96 horas. Este resultado sugere que, após a celularização do embrião (10h), a glicose poderia ser usada prioritariamente como substrato energético até o fim da embriogênese.

A gliconeogênese foi estudada através da determinação da atividade de PEPCK e em conjunto com os níveis de glicose (Figura 8A, B). A PEPCK apresenta atividade decrescente de 0h até 24h de embriogênese. Nas primeiras 15 horas de desenvolvimento os níveis de glicose aumentam simultaneamente a queda da atividade de PEPCK. A detecção da diminuição na atividade desta enzima-chave pelo seu produto final pode representar um mecanismo de regulação comandado pela concentração de glicose no interior destas células. A alta atividade de PEPCK e o aumento do nível de glicose e glicogênio nas primeiras horas de embriogênese sugerem que a gliconeogênese atua como a principal via de reabastecimento de glicose para a célula-ovo nesta etapa, visto tratar-se de um sistema fechado à entrada de substratos energéticos. Fato semelhante foi observado no estudo sobre a embriogênese do peixe *Coregonus spp.*, onde autores mostraram uma alta gliconeogênese. Em ovos não fertilizados os autores mostraram uma importante participação da gliconeogênese como fonte de glicose para a via das pentoses, para a síntese de frutose e de polissacarídeos (Lahnsteiner, 2005).

Em recente estudo sobre a ovogênese de *Aedes aegypti* observou-se que a deposição de glicogênio, está associada a uma segunda fase de crescimento dos ovócitos. Por outro lado, a incorporação sincrônica (simultânea) de lipídeos e de proteínas se dá durante a uma primeira fase de alongação destes ovócitos (Brigel *et al.*, 2003). Esta deposição tardia de glicogênio, na ovogênese, foi também observada no mosquito *Culex quinquefasciatus*. O autor sugere ainda que os ovócitos maduros devam reter muitas enzimas capazes de sintetizar glicogênio (Van Handel, 1992). Ambos os autores propõem que ovócitos em desenvolvimento inicial de ambas as espécies, sofrem uma supressão parcial da síntese de glicogênio. Esta hipótese poderia explicar então a baixa glicogênese durante a primeira fase de

incorporação de nutrientes nos ovócitos (Brigel *et al.*, 2003). Adicionalmente monossacarídeos foram mensurados, em ovócitos maduros, em tempos posteriores aos fenômenos de alongação e incorporação de componentes aos ovócitos, o que reforça a hipótese de acúmulo tardio de glicogênio. A deposição de glicogênio nestes ovos é considerada como uma reserva estratégica nutricional para estes embriões desde a década de setenta (Hagedorn e Kunkel, 1979). No atual estudo observamos que os conteúdos de glicogênio (Figura 9A) e glicose (Figura 8A) aumentam em ovos de *A. aegypti*, nas primeiras 15 horas de embriogênese. Depois sofrem uma queda gradual até o fim da desta etapa do desenvolvimento. O aumento desta reserva, nos tempos iniciais da embriogênese, vem reforçar a hipótese da participação de enzimas capazes de realizar glicogenogênese nos ovócitos maduros (Brigel *et al.*, 2003). Tais considerações nos permitem ainda supor que estas enzimas podem ser ativadas imediatamente após a oviposição, visto o significativo acúmulo de glicogênio observado nas primeiras horas de embriogênese em nossos resultados (Figura 9A). O conjunto destes dados sugere um mecanismo coordenado de controle do metabolismo glicídico durante a embriogênese deste mosquito.

A enzima glicogênio sintase quinase-3 (GSK3) foi originalmente descoberta como uma proteína quinase que inativava a glicogênio sintase em diferentes espécies (Embi *et al.* 1980). Esta enzima reguladora da etapa final na biossíntese de glicogênio é também controladora de diversas estratégias celulares de regulação, expressão e diferenciação (Frame & Cohen, 2001). Durante a embriogênese de *A. aegypti* observa-se que a atividade específica da enzima GSK3 foi detectada somente nas primeiras horas, de 0h a 3h, e em tempos relativos ao final desse processo, de 48h a 72h, (Figura 9B). Em ambos os momentos, o nível de glicogênio está baixo nos ovos de *A. aegypti*. A atividade de GSK3 não foi detectada entre 5h e 48h, quando existe um aumento significativo no nível de glicogênio nos ovos. Sendo a função clássica da GSK3 o controle da homeostase de glicogênio seria metabolicamente coerente observar que esta enzima esteja inativa em momentos em que ocorre um aumento da síntese de glicogênio em um sistema fechado como o ovo.

Em embriões de *Drosophila melanogaster* os carboidratos são a principal fonte de energia para a rápida segmentação do embrião assim como em diferentes modelos de artrópodes (Nusslein-Volhard & Roth, 1989). Durante a embriogênese de *A. aegypti*, registramos altos níveis de glicose em momentos relativos à

segmentação, entre 15h e 20h, sugerindo ser uma importante fonte energética também nesta etapa da embriogênese deste mosquito.

Em espécies marinhas como *Sparus aurata* e *Diplodus puntazzo* o metabolismo de carboidratos, avaliados pelo estudo da glicólise, da gliconeogênese e da via da pentose-fosfato, mostrou-se essencial para o desenvolvimento embrionário destas espécies. Nestas espécies os carboidratos representam uma importante fonte de nutrientes que é decisiva para a formação destes embriões (Lahnsteiner & Patarnello, 2004a, b). Em nosso estudo, o nível de glicose em tempos intermediários da embriogênese é aparentemente mantido pela degradação do glicogênio inicialmente acumulado como também pela gliconeogênese inicial. Observa-se que ocorre ainda uma diminuição progressiva do conteúdo de glicogênio após as 15h do desenvolvimento (Figura 9A). Concomitantemente detecta-se um drástico aumento da atividade de PEPCK entre 24h e 42h (Figura 8B). Estes dados sugerem que a degradação de glicogênio e/ou gliconeogênese poderiam ser as duas principais fontes de reabastecimento de unidades de glicose, nesta etapa do desenvolvimento.

Entre os tempos de 15 e 42h do desenvolvimento de *A. aegypti* a via glicolítica e a gliconeogênese sofrem aumento (Figura 6A, B). Esta aparente contradição pode ser explicada por uma possível micro-compartimentalização destas vias metabólicas como o que já foi observado durante a embriogênese de *Drosophila melanogaster* (Yamazaki & Nusse, 2002). Neste trabalho também foi mostrado que o conteúdo de glicogênio aumenta durante o desenvolvimento embrionário. O mesmo foi observado durante a embriogênese do carrapato bovino *Boophilus microplus*, onde se atribui o acúmulo de glicose e glicogênio nos ovos a uma intensa atividade gliconeogênica (Moraes *et al.* 2006). É interessante notar que em *A. aegypti*, apesar das progressivas taxas de glicólise observadas, entre 24h e 48h (Figura 6A e 6B), o conteúdo de glicose nos ovos nesta fase (Figura 8A) permanece estável, sem que ocorra um consumo total da glicose dos ovos. Estes dados sugerem que o glicogênio está localizado em compartimentos próprios nestes ovos, de modo semelhante ao observado em *Drosophila melanogaster* (Yamazaki e Nusse, 2002).

A enzima glicogênio sintase quinase-3 (GSK3) é atualmente reconhecida como um componente-chave no controle de um grande número de processos celulares e doenças (Jope & Johnson, 2004). Muitos anos após a sua descoberta, a

GSK3 ressurgiu como uma quinase essencial para o destino específico de células no desenvolvimento embrionário inicial de *Drosophila* e *Xenopus*. (Siegfried *et al.*, 1992) Recentemente a GSK3 foi também incluída como um importante componente da via de sinalização Wnt (Frame & Cohen, 2001), com papel fundamental na definição do sentido e localização dos eixos embrionários em diferentes modelos. Em estudos anteriores do nosso grupo clonamos e analisamos a expressão da GSK3 durante a embriogênese do carrapato bovino *Boophilus microplus* (Figura 5) (Logullo *et al.* 2006; Moraes *et al.*, 2006). Nosso atual estudo em *A. aegypti* revelou semelhanças no metabolismo de glicose quando os dois modelos são comparados. O aumento do nível de glicose por gliconeogênese nos ovos já havia sido anteriormente observado durante a embriogênese de *B. microplus* (Moraes *et al.*; 2006). Considerando-se o alto grau de importância das enzimas GSK3 e da PEPCK no controle da síntese glicogênio e no reabastecimento de unidades de glicose respectivamente, o conjunto dos dados observados na embriogênese de *A. aegypti* e de *B. microplus*, reforça a hipótese da existência de mecanismo de regulação gênica entre estas enzimas também em *A. aegypti*.

A clonagem molecular da enzima GSK3 revelou que existem duas isoformas intimamente relacionadas, GSK3 $\alpha$  e GSK3 $\beta$  que podem ser diferenciadas por clonagem molecular principalmente pela presença de um domínio rico em glicina na extremidade amino-terminal presente apenas na isoforma  $\alpha$  (Woodgett, 1990). Diferentes isoformas de GSK3 vem sendo identificadas em diversos organismos como em *Xenopus* e em *Drosophila melanogaster* (Frame & Cohen, 2001). No presente trabalho, realizamos a clonagem de um fragmento de DNA de aproximadamente 600 pb obtido por RT-PCR de embriões de *A. aegypti* (ovos de com de 0h de desenvolvimento) em *E. coli* (Figura 10, 11). O sequenciamento do fragmento de DNA clonado revelou, após análise, um altíssimo grau de homologia com inúmeras seqüências de proteínas entre elas enzimas GSK3 de inúmeros organismos. Entre estas, a proteína ENSANGP00000017061, isoforma de GSK3 no mosquito *Anopheles gambiae* (Holt *et al.*, 2002), apresentou a maior similaridade com a seqüência submetida entre todas as seqüências homólogas (Figura 12). O gênero *Anopheles* pertence à mesma família do gênero *Aedes* (Culicidae), o que justifica a alta homologia observada entre estas seqüências. Este resultado permite-nos afirmar que o fragmento clonado a partir de ovos de *Aedes aegypti* é, de fato, relativo a uma região interna do gene da enzima GSK3 de mosquito *Aedes aegypti*.

Neste estudo, determinamos a dinâmica do metabolismo de glicose, de modo a detectar estágios estratégicos durante a embriogênese do mosquito *Aedes aegypti* e adicionalmente clonamos uma isoforma de GSK3 de *A. aegypti*. Resultados semelhantes aos deste trabalho foram observados na embriogênese do carrapato bovino *Boophilus microplus* (Logullo *et al.* 2006, Moraes *et al.*, 2006), mostrando o metabolismo de glicose e sua relação com a embriogênese de ambos artrópodes hematófagos. Por outro lado, os tempos e sincronismos em *A. aegypti* são bem diferentes dos observados em *B. microplus*. Tais achados durante a embriogênese de *Aedes aegypti* demonstraram a existência de uma sincronia e de uma auto-regulação no metabolismo de glicose, dentro do ovo, um sistema fechado para entrada e saída de nutrientes.

Acreditamos que as informações obtidas por este trabalho possam contribuir relevantemente no aumento do conhecimento dos processos bioquímicos e fisiológicos envolvidos no desenvolvimento embrionário do mosquito *Aedes aegypti*, revelando alvos adicionais e possivelmente suscetíveis ao desenvolvimento de metodologias de controle deste vetor que atualmente causa enormes perdas em nosso país e no mundo.

## **6. CONCLUSÕES**

---

---

Os resultados apresentados nesta dissertação nos permitem concluir:

- 1) Durante a embriogênese do mosquito *Aedes aegypti*, foi observado um acúmulo de glicogênio nos ovos até 15h de embriogênese, seguido de diminuição do conteúdo deste metabólito nos ovos até o fim deste estágio.
- 2) Durante as sucessivas divisões nucleares anteriores a formação do blastoderma sincicial, nas primeiras horas de embriogênese de *Aedes aegypti*, a glicose pode estar sendo direcionada preferencialmente para síntese de nucleotídeos.
- 3) Após a celularização (15h), a glicose parece ser usada preferencialmente como substrato energético pela via glicolítica, até o fim da embriogênese.
- 4) A gliconeogênese parece atuar como uma possível via metabólica de reabastecimento de glicose para a célula-ovo, servindo como substrato para a síntese de glicogênio e nucleotídeos.
- 6) O fragmento de DNA clonado a partir de ovos de *Aedes aegypti* com 0h de desenvolvimento é relativo a uma região conservada do gene de uma isoforma da enzima GSK3 de mosquito *Aedes aegypti*.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. and Kemler, R. (1997), [b-Catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway](#). *EMBO J.* 16: 3797-3804.
- Bate, M., Arias, M. (1993), [The development of Drosophila melanogaster](#). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Briegleb, H., Gut, T., Lea, A. O. (2003), [Sequential deposition of yolk components during oogenesis in an insect, Aedes aegypti \(Diptera: Culicidae\)](#). *Journal of Insect Physiology* 49: 249-260.
- Burke, S.R. (1976), [The Composition and Function of Body Fluids](#). The C.V. Mosby Company, St. Louis, MO.
- Chinzei, Y., Yano, I. (1984), [Vitellin is the nutrient reserve during starvation in the nymphal stage of a tick](#). *Exp.*, 41: 948-950.
- Cohen, P., Alessi, D. R., Cross, D. A. (1997), [PDK1, one of the missing links in insulin signal transduction ?](#) *FEBS Lett.*, 410: 3-10.
- Cohen, P. (1999), [The development and therapeutic potential of protein kinase inhibitors](#). *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 3: 459-465.
- Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M. and Hemmings, B. A. (1995), [Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B](#). *Nature*: 378: 785-789.
- de Meis, L. (2001), [Uncoupled ATPase activity and heat production by the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. Regulation by ADP](#). *J. Biol. Chem.*, 276(27): 25078-25087.
- Dominguez, I., Itoh, K. and Sokol, S. Y. (1995), [Role of glycogen synthase kinase 3 as a negative regulator of dorsoventral axis formation in Xenopus embryos](#). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 92: 8498-8502.
- Edgar B. A., Lehman D. A., O'Farrell P. H. (1994), [Transcriptional regulation of string \(cdc25\): a link between developmental programming and the cell cycle](#). *Development*, 120: 3131-3143.
- Eldar-Finkelman, H. (2002), [Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target](#). *Trends Mol. Med.*, 8:126-132.
- Embi, N., Rylatt, D. B., Cohea. (1980). [P -Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase](#). *Eur. J. Biochem.*, 107: 519-527.
- Fagotto, F. (1990), [Yolk degradation in tick eggs: In Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres](#). *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 14: 217-235.

- Frame, S. e Cohen P. (2001), GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* 359: 1-16.
- Fothergill-Gilmore, L. A., Michels, P. A. (1993), Evolution of glycolysis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 59: 105-135.
- Fundação Nacional de Saúde, (2001), Dengue Instruções de Combate ao Vetor- Manual de Normas Técnicas. Ministério da Saúde, Brasília, Brasil.
- Galina Filho, A., Logullo, C., Souza, E. F., Rezende, G. L., Silva, W. S. (1999), Sugar phosphorylation modulates ADP inhibition of maize mitochondrial hexokinase, *Physiologia Plantarum*, 105: 17-23.
- Grimes, A.J. (1980), Humand Red Cell Metabolism. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Grimes, C. A. and Jope, R. S. (2001), The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 in cellular signaling. *Prog. Neurobiol.*, 65: 391-426.
- Hagedorn, H. H., Kunkel, J. G. (1979), Vitellogenin and vitellin in insects. *Annual Review of Entomology*, 24: 475-505.
- Haq, S., Michael, A., Andreucci, M., Bhattacharya, K., Dotto, P., Walters, B., Woodgett, J., Kilter, H., Force, T. (2003), Stabilization of b-catenin by a Wnt-independent mechanism regulates cardiomyocyte growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100: 4610-4615.
- Hardt, S. E., Sadoshima, J. (2002), Glycogen synthase kinase-3b: a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. *Circ. Res.* 90: 1055-1063.
- He, X., Saint-Jeannet, J. P., Woodgett, J. R., Varmus, H. E., Dawid, i. G. (1995), Glycogen syntase kinase-3 e padrão dorsoventral em embriões de *Xenopus*. *Nature*, 374: 617-622.
- Hedgepeth, C. M., Conrad, L. J., Zhang, J., Huang, H. C., Lee, V. M. and Klein, P. S (1997), Activation of the Wnt signaling pathway : a molecular mechanism for lithiumaction. *Dev. Biol.*, 185: 82-91.
- Hill, M. M. and Hemmings, B. A. (2002), Inhibition of protein kinase B/Akt. Implications for cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* 93: 243-251.
- Holt R. A., Subramanian G. M., Halpern A., Sutton G. G., Charlab R, Nusskern D. R., Wincker P., Clark A. G., Ribeiro J. M., Wides R., Salzberg S. L., Loftus B., Yandell M., Majoros W. H., Rusch D. B., Lai Z., Kraft C. L., Abril J. F., Anthouard V., Arensburger P., Atkinson P. W., Baden H., de Berardinis V., Baldwin D., Benes V., Biedler J., Blass C., Bolanos R., Boscus D., Barnstead M., Cai S., Center A.,

- Chaturverdi K., Christophides G. K., Chrystal M. A., Clamp M., Cravchik A., Curwen V., Dana A., Delcher A., Dew I., Evans C. A., Flanigan M., Grundschober-Freimoser A., Friedli L., Gu Z., Guan P., Guigo R., Hillenmeyer M. E., Hladun S. L., Hogan J. R., Hong Y. S., Hoover J., Jaillon O., Ke Z., Kodira C., Kokoza E., Koutsos A., Letunic I., Levitsky A., Liang Y., Lin J. J., Lobo N. F., Lopez J. R., Malek J. A., McIntosh T. C., Meister S., Miller J., Mobarry C., Mongin E., Murphy S. D., O'Brochta D. A., Pfannkoch C., Q. R., Regier M. A., Remington K., Shao H., Sharakhova M. V., Sitter C. D., Shetty J., Smith T. J., Strong R., Sun J., Thomasova D., Ton L. Q., Topalis P., Tu Z., Unger M. F., Walenz B., Wang A., Wang J., Wang M., Wang X., Woodford K. J., Wortman J. R., Wu M., Yao A., Zdobnov E. M., Zhang H., Zhao Q., Zhao S., Zhu S. C., Zhimulev I., Coluzzi M., della Torre A., Roth C. W., Louis C., Kalush F., Mural R. J., Myers E. W., Adams M. D., Smith H. O., Broder S., Gardner M. J., Fraser C. M., Birney E., Bork P., Brey P. T., Venter J. C., Weissenbach J., Kafatos F. C., Collins F. H., Hoffman S. L. (2002), The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*, Oct. 4; 298(5591): 129-49.
- Jasinskiene, N., Coates, C. J., Benedict, M. Q., Cornel, A. J., Rafferety, C. S., James, A. A., Collins and F. H. (1998), Stable transformation of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*, with the *Hermes* element from the housefly *Stable*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 3743-3747.
- Joep, R.S. (1999), Anti-bipolar therapy: mechanism of action of lithium. *Mol. Psychiatry*, 4:117-128.
- Joep, R. S., Johnson, G. V. W. (2004), The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3, *Trends in Biochemical Sciences*, 29: 95-102.
- Kao, K. R., Masui, Y. and Elinson, R. P. (1986), Lithium-induced respecification of pattern in *Xenopus laevis* embryos. *Nature* 322, 371-373.
- Klein, P. S. and Melton, D. A. (1996), A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 8455-8459.
- Kozlovsky, N., Belmaker, R. H., Agam, G. (2002), GSK-3 and the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Eur. Neuropsychophar.*, 12: 13-25.
- Lahnsteiner, F., Patarnello, P. (2003), Investigations on the metabolism of viable and nonviable gilthead sea bream (*Sparus aurata*) eggs. *Aquaculture*, 223: 159-174.

- Lahnsteiner, F., Patarnello, P. (2004a), Egg quality determination in the gilthead seabream, *Sparus aurata*, with biochemical parameters. *Aquaculture*, 237: 443-459.
- Lahnsteiner, F., Patarnello, P. (2004b), Biochemical egg quality determination in the gilthead seabream, *Sparus aurata*: Reproducibility of the method and its application for sharpsnout seabream, *Puntazzo puntazzo*. *Aquaculture*, 237: 433-442.
- Lahnsteiner, F. (2005), Carbohydrate metabolism of eggs of the whitefish, *Cerogonus* spp. during embryogenesis and its relationship with egg quality. *Comp. Bioch. Physiol.*, B142: 46-55.
- Lochhead, P. A., Coghlan, M., Rice, S. Q. J., Sutherland, C. (2001), Inhibition of GSK3 Selectively Reduces Glucose-6-Phosphatase and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Gene Expression. *Diabetes*, 50: 937-946.
- Logullo, C.J., Vaz jr., I. S., Sorgine, M. H. F.; Paiva-Silva, G.O. Faria, F.S., Zingali, R., Lima, M. F. R., Abreu, L.; Oliveira, E.F.; Alves, E.W.; Masuda, H.; Gonzales, J. C., Masuda, A., Oliveira, P.L. (1998), Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitol.* 116: 525-532.
- Logullo, C., Witola, W. H., Vaz Jr, I., Imamura, S., Konnai, S., Nakajima, C., Onuma, M. (2006). GSK3 $\beta$  activity is involved in the PEPCCK gene expression regulation during tick embryo development. Manuscrito em preparação.
- Manoukian, A.S., Woodgett, J.R.(2002). Role of glycogen synthase kinase-3 in cancer: regulation by Wnts and other signaling pathways.*Adv. Cancer Res.*, 84: 203-229.
- Matova, N., Cooley, L. (2001), Comparative aspects of animal oogenesis. *Develop. Biol.*, 231: 291-320.
- Moraes, J., Galina, G., Alvarenga, P. H., Rezende, G. L., Masuda, A., Vaz Jr, I, S., Logullo, C. (2006), Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *Boophilus microplus*. Artigo submetido para *Comp. Biochem. and Physiol.*
- Moritz, B.; Striegel, K.; Graaf, A. A.; Sahm, H. (2000), Kinect proprieties of the glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases from *Corynebacterium glutamacium* and application for predicting pentose phosphate pathway flux in vivo, *Eur. J. Biochem.* 267: 3442-3452.

- Nikoulina, S. E., Ciaraldi, T. P., Mudaliar, S. (2000), Mohideen, P., Carter, L., Henry, R.R., - Potential role of glycogen synthase kinase-3 in skeletal muscle insulin resistance of type 2 diabetes. *Diabetes*, 49: 263-271.
- Nusslein-Volhard C; Roth S. (1989), Axis determination in insect embryos. *Ciba Foundation Symposium*, 144: 37-55.
- Organização Panamericana da Saúde. Diretrizes relativas à prevenção e ao controle da dengue e da dengue hemorrágica nas Américas. Relatório da Reunião sobre Diretrizes para Dengue. Washington, 16-20 de dezembro 1991. Washington: 1991.
- Patel N. H., (1994), Developmental evolution: insights from studies of insect segmentation. *Science*, 266: 581-590.
- Peters-Wendisch, P. G. (1996), Anaplerotische Reaktionen in *Corynebacterium glutamicum*: Untersuchungen zur Bedeutung der PEP-Carboxilase und der Pyruvate Carboxilase in Zentralstoffwechsel und bei der Aminosäure-Produktion. *PhD. Thesis, Univ. Düsseldorf. Reports of the Research Center Jülich* 3259.
- 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.
- Phiel, C. J. & Klein, P. S. (2001), Molecular targets of lithium action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 41: 789-813.
- Pierce, S. B. and Kimelman, D. (1995), Regulation of Spemann organizer formation by the intracellular kinase Xgsk-3. *Development*, 121: 755-765.
- Raikhel, A. S., Dhadialla, T. S. (1992), Accumulation of yolk proteins in insect oocytes, *Annu. Rev. Entomol.*, 37: 217-251.
- Raminani, L. N., Cupp E. W. (1975), Early embryology of *Aedes aegypti* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE). *Int. J. Morphol. & Embriol.*, 4(6): 517-528.
- Raminani, L. N., Cupp E. W. (1978), Embryology of *Aedes aegypti* (L.) (DIPTERA: CULICIDAE): Organogenesis. *Int. J. Morphol. & Embriol.*, 7(3): 273-296.
- Scaraffia, P. Y., Wells, M. A. (2002), Proline can be utilized as an energy substrate during flight of *Aedes aegypti* females. *Journal of Insect Physiology*, 49: 591-601.
- Siegfried, E., Chou, T. B. and Perrimon, N. (1992), Wingless signaling acts through zeste-white 3, the *Drosophila* homolog of glycogen synthase kinase-3, to regulate engrailed and establish cell fate. *Cell*, 71: 1167-1179.

- Stambolic, V., Ruel, L., Woodgett, J. R. (1996), Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signalling in intact cells. *Curr. Biol.*, 6: 1664-1668.
- Stewart, J.R., Thompson, M.B. (1993), A novel pattern of embryonic nutrition in a viviparous reptile. *J.Exp. Biol.*, 174: 97-108.
- Thompson, B.M., Stewart, R.J. (1997), Embryonic Metabolism and Growth in Lizards of the Genus Eumeces. *Comp. Biochem. and Physiol.*, A118:(3) 647-654.
- Van Handel, E. (1992), Postvitellogenic metabolism of the mosquito (*Culex quinquefasciatus*) ovary. *Journal of Insect Physiology*, 38: 75-79.
- Van Handel, E.(1993), Fuel Metabolism of the mosquito (*Culex quinquefasciatus*) Embyo. *Journal of Insect Physiology*, 39 (10): 831-833.
- Vleck, D. (1991), Water economy and solute regulation of reptilian and avian embryos. In: Deeming, D.C., Ferguson, M.W.J. (Eds.), Egg incubation: Its effects on embryonic development in birds and reptiles. Cambridge University Press, Cambridge, 245-259.
- Worthington, C. C, (1998), Worthing Enzyme Manual, 294-297.
- Walker, K. S., Watt, P. W. and Cohen, P. (2000), Phosphorylation of the skeletal muscle glycogen-targetting subunit of protein phosphatase 1 in response to adrenaline *in vivo*. *FEBS Lett.*, 466: 121-124.
- Wang, Q. M.; Roach, P. J.; Fiol, C. J. (1994), Use of a synthetic peptide as a selective substrate for Glycogen synthase kinase 3, *Analytical Biochemistry.* 220: 397-402.
- Woodgett, J. R. (1990), Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor. A. *EMBO J.*, 9: 2431-2438.
- Yamamoto, Y., Takahashi, S.Y. (1993), Cysteine proteinase from *Bombyx* eggs: role in programmed degradation of yolk proteins during embryogenesis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106: 35-45.
- Yamazaki H., Nusse R. (2002), Identification of DCAP, a *Drosophila* homolog of a glucose transport regulatory complex. *Mech. Dev.*, 119: 115-119.

# 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](#)