



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA Ca^{2+} -ATPASE DE
LARVA DE *PACHYMERUS NUCLEORUM* (FABRICIUS)
(COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE: BRUCHINAE)**

Aluno: Hugo Christiano Soares Melo

Orientador: Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

UBERLÂNDIA - MG
2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA Ca^{2+} -ATPASE DE
LARVA DE *PACHYMERUS NUCLEORUM* (FABRICIUS)
(COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE: BRUCHINAE)**

Aluno: Hugo Christiano Soares Melo

Orientador: Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Genética e Bioquímica (Área Bioquímica)

UBERLÂNDIA - MG
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M528p Melo, Hugo Christiano Soares, 1979-
Purificação e caracterização de uma CA^{2+} -ATPase de larva de
Pachymerus nucleorum (Fabricius) (Coleoptera: Chrysomelidae:
Bruchinae) / Hugo Christiano Soares Melo. - 2008.

99 f. : il.

Orientador: Milton Vieira Coelho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Proteínas - Teses. I. Coelho, Milton Vieira. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.112



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA Ca^{2+} -ATPASE DE
LARVA DE *PACHYMERUS NUCLEORUM* (FABRICIUS)
(COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE: BRUCHINAE)**

Aluno: Hugo Christiano Soares Melo

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Milton Vieira Coelho (Orientador)

Examinadores:

L. C. Cameron (Titular)

Ana Graci Brito Madurro (Titular)

Foued S. Espindola (Titular)

Amélia Hamaguchi (Titular)

Data da Defesa: 09 / 07 / 2008

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Tese foram contempladas

Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

Uberlândia, _____ / _____ / _____

“Quanto mais me elevo, menor fico aos olhos de quem não sabe voar.”

(Friedrich Nietzsche)

Dedico aos meus pais, meu
amor e agradecimento eterno,
tudo que sou, sou por eles.

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento especial ao mestre e amigo, Milton V. Coelho, pela imensa paciência e auxílio durante todos os anos de formação na bioquímica, e pelos recentes anos de auxílio na docência.

Agradecimentos especiais ao Professor Marcelo Valle e ao aluno de doutorado Gabriel Costa Nunes, do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas – LBQP da Universidade de Brasília – UnB, por toda ajuda na identificação dos polipeptídeos desse trabalho.

Ao Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, seus funcionários e docentes que se dedicam heroicamente para manutenção do instituto, em especial aos que se dedicaram a fornecer seus conhecimentos aos alunos em forma de disciplinas: Amélia Hamaguchi, Maria Inês H. Brandeburgo, Veridiana de M. Rodrigues Ávila, Foued S. Espindola, Nilson Penha Silva, Ana Maria Bonetti, Malcon Brandeburgo, Sandra Moreli.

À secretária do Instituto de Genética e Bioquímica, Marlene, pelo apoio e esforço para resolução dos problemas que surgiram ao longo desde doutorado.

Ao professor Cameron e professor Foued, que sempre me atenderam nas dificuldades do curso e que me apoiaram a escrever, ensino imprescindível para o que alcancei até aqui.

À dona Maura pela assistência, amizade e conselhos durante todo mestrado. Ao Cleuber, Tianinha, Vilmar e tantos outros, por toda ajuda.

Aos amigos de todos esses anos, pela ajuda ou mesmo pelas conversas nos momentos de distração: Decivaldo (Vicentin), Vinícius, Rogério, Gabriel, Leonardo, Aníbal, Flávia, e tantos outros que não caberiam aqui.

A todos meus alunos, que tanto me ensinaram durante esses anos recentes de docência.

HUMOR?!

DILBERT

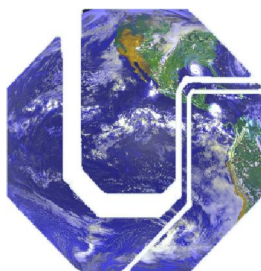


ESTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO COM O SUPORTE DAS SEGUINTE INSTITUIÇÕES:



FAPEMIG

Fundação de Amparo à Pesquisa do
Estado de Minas Gerais



**UNIVERSIDADE FEDERAL
DE UBERLÂNDIA**

Sumário

Apresentação e Objetivo	1
Capítulo 1: Fundamentação teórica - ATPases	4
1. ATPases.....	5
1.1 ATPases de membrana	5
1.1.1 ATPases do tipo P	5
1.1.2 ATPases do tipo V	12
1.1.3 ATPases do tipo F	13
1.1.4 ATPases do tipo ABC	15
1.2 ATPases solúveis	17
1.2.1 Apirases ou ATPases do tipo E	17
1.2.2 Motores Moleculares.....	19
1.2.2.1 Cinesinas.....	19
1.2.2.2 Dineínas	22
1.2.2.3 Miosinas	24
1.3 ATPases em insetos.....	27
2. Referências Bibliográficas.....	29
Capítulo 2: Fundamentação teórica – <i>Orbignyia</i> sp e <i>Pachymerus nucleorum</i> 53	
1. Palmeira babaçu	54
2. <i>Pachymerus nucleorum</i> (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae).....	58
3. Referencias bibliográficas	61
Capítulo 3: Purificação e caracterização de uma Ca ²⁺ ATPase de larva de <i>Pachymerus nucleorum</i> (Fabricius) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) . 66	
1. Resumo.....	67
2. Abstract.....	68
3. Introdução	69
4. Material e Métodos.....	70
4.1 Preparação de ATPase solúvel de larva de <i>Pachymerus nucleorum</i> (Fabricius).....	70
4.2 Determinação de Atividade ATPase	71
4.3 Dosagem de Proteínas	71
4.4 Análise do perfil de polipeptídeos (SDS-PAGE)	72
4.5 Identificação de P205 e P43 por “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF) ..	72
5. Resultados e Discussão.....	73
6. Referências Bibliográficas.....	85
Anexos	90
Anexo 1 – Preparação das larvas de <i>P. nucleorum</i>	91
Anexo 2 – Determinação da atividade ATPase	92
Anexo 3 - Dosagem de proteínas	94
Anexo 4 - SDS-PAGE.....	95
Anexo 5 - Determinação da massa molecular de polipeptídeos	95

Índice de figuras

Capítulo 1: Fundamentação teórica - ATPases

Figura 1: Árvore filogenética da família de ATPases do tipo P.....	6
Figura 2: Representação esquemática da Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	8
Figura 3: Esquema da PMCA.....	10
Figura 4: Estrutura das ATPases do tipo V (V ₁ V ₀ -ATPases).....	12
Figura 5: Estrutura e função de uma ATP-Sintase bacterial (F ₁ -F ₀ -ATPase) ...	15
Figura 6: A estrutura mínima dos transportadores ABC.....	17
Figura 7: Principais membros da superfamília das cinesinas.....	21
Figura 8: A cinesina convencional.....	21
Figura 9: A dineína citoplasmática	23
Figura 10: A dineína citoplasmática e a dinactina	23
Figura 11: Família das miosinas.....	25
Figura 12: A miosina de classe V	26

Capítulo 2: Fundamentação teórica – *Orbignya* sp e *Pachymerus nucleorum*

Figura 1: Foto da palmeira babaçu.....	56
Figura 2: Áreas de babaçuais no Brasil.....	57
Figura 3: Esquema do fruto de babaçu.	58
Figura 4: Fotos da espécie <i>Pachymerus nucleorum</i> , fase larvar e adulta.	60
Figura 5: Ciclo de vida de <i>Pachymerus nucleorum</i> em sementes de A.	61

Capítulo 3: Purificação e caracterização de uma Ca²⁺-ATPase de larva de *Pachymerus nucleorum* (Fabricius) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)

Figura 1: Atividade Ca ²⁺ e Mg ²⁺ -ATPase das frações homogeneizada, solúvel e particulada de larva de <i>P. nucleorum</i>	75
Figura 2: Separação da atividade Ca ²⁺ e Mg ²⁺ -ATPase de S1 de larva de <i>P. nucleorum</i> por congelamento/descongelamento.....	75
Figura 3: SDS-PAGE da purificação da Ca ²⁺ -ATPase de fração solúvel de larva de <i>P. nucleorum</i>	76
Figura 4: Peptídeos de p205 pareados em sua identificação.....	77
Figura 5: Solubilização da atividade Ca ²⁺ -ATPase de P4 de larva de <i>P. nucleorum</i>	79
Figura 6: Atividades Ca ²⁺ , Mg ²⁺ e K ⁺ -EDTA-ATPase de S5	80
Figura 7: Efeito de actina na atividade Mg ²⁺ -ATPase de S5	80
Figura 8: Efeito de inibidores de ATPases na atividade Ca ²⁺ -ATPase de S5... ..	82
Figura 9: Efeito de Mg ²⁺ na atividade Ca ²⁺ -ATPase de S5.....	83
Figura 10: Efeito de cobre e zinco na atividade Ca ²⁺ -ATPase de S5	84
Figura 11: Especificidade de substrate da fração S5	85

Anexos

Figura 1: Fotos da dissecação da larva de <i>P. nucleorum</i>	91
---	----

Figura 2: Curva padrão de fosfato (Pi), com coeficiente de linearidade (R^2)	93
Figura 3: Atividade ATPase de S5 de acordo com o tempo.	93
Figura 4: Curva padrão de proteína (BSA), com coeficiente de linearidade (R^2)	94
Figura 5: Curva padrão de determinação de massa molecular	96

Lista de abreviaturas

AAM – Solução de dosagem de Pi preparada com acetona, ácido sulfúrico e molibdato de amônio na proporção de 2:1:1;

ADP – Adenosina 5'-difosfato;

AMP – Adenosina 5'-monofosfato;

ATP – Adenosina 5'-trifosfato;

ATPase – Adenosina trifosfatase;

BSA – Soro Albumina Bovino;

CAPS - Ácido 3-(Ciclohexilamino)⁻¹-propanosulfônico;

CTP – Citidina 5'-trifosfato;

DTT – Ditioneitol;

EDTA – Ácido etileno diamino tetra acético;

EGTA – Etileno glicol-bis(β-aminoetil éter);

EM – Microscopia eletrônica;

GTP – Guanosina 5'-trifosfato;

HCCA – ácido -ciano-4-hidroxicinnâmico

kDa – unidade de massa molecular correspondente a 1000 Da (dalton);

KHC – *Kinesin Heavy Chain* (Cadeia pesada de cinesina);

KLC – *Kinesin Light Chain* (Cadeia leve de cinesina);

MAP – *Microtubule Associated Protein* (Proteína associada a microtúbulos);

Mr – massa molecular relativa;

Pi – Ortofosfato Inorgânico;

PMCA – Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática;

PPi – Pirofosfato;

PMCA – Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática;

Proteínas PDZ – Proteínas que possuem o domínio PDZ de 80 a 90 aminoácidos típico de proteínas de sinalização; PDZ: acrônimo para o domínio comum de três proteínas sinalizadoras, proteína de densidade pós-sináptica (PSD-95), proteínas supressora de grandes tumores do disco de Drosophila (DlgA) e proteínas zonula occludens⁻¹ (zo⁻¹);

R^2 – coeficiente de linearidade de uma reta ou função matemática;

Rf – mobilidade relativa de um polipeptídeo em eletroforese, utilizado para cálculo da massa molecular relativa;

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS;

SERCA - Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático e endoplasmático;

TMD – Domínio transmembrana das ATPases do tipo ABC, onde se liga o substrato;

NBD - Domínio ligante de nucleotídeos das ATPases do tipo ABC, onde liga e hidrolisa o ATP;

SDS – Dodecil sulfato de sódio;

SERCA – Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático;

TTP – Timidina 5'-trifosfato.

Apresentação e Objetivo

Nosso laboratório tem se dedicado desde 2004 a estudar ATPases de larvas de insetos, e recentemente obteve uma fração rica em atividade ATPase a partir da fração particulada da larva de *Pachymerus nucleorum*, a qual deu origem, neste intervalo, a duas dissertações de mestrado e dois projetos de doutorado. Neste trabalho utilizamos o método previamente descrito para precipitação de miosina para precipitar ATPases a partir da fração solúvel de larva de *P. nucleorum*, e estudá-las bioquimicamente.

No capítulo 1 trouxemos a fundamentação teórica deste trabalho com um apanhado geral sobre ATPases. Para meios de organização, as ATPases foram subdivididas em ATPases de membrana e ATPases solúveis. As ATPases de membrana foram ainda subdivididas de acordo com a sua divisão clássica: ATPases do tipo P, V e F. Incluímos ainda a recente categoria das ATPases do tipo ABC. Dentre as ATPases solúveis encontram-se aqui categorizadas as ecto-ATPases e os chamados motores moleculares, ou seja, as cinesinas, as dineínas e as miosinas.

No capítulo 2 temos uma visão econômica da palmeira babaçu e aspectos da biologia de seu predador *P. nucleorum*. A palmeira babaçu (*Orbignya sp.*) está presente em diversas regiões do Brasil e de outros países da América do sul e seu fruto constitui importante matéria prima para produção de biodiesel e geração de energia elétrica através de sua biomassa, podendo criar milhares de empregos e atuar ativamente na economia brasileira. Seu principal predador é o besouro *P. nucleorum*, cujas larvas infestam os cocos e alimentam de suas amêndoas. Este inseto pertence à subfamília Bruchinae, onde estão vários outros predadores de frutos de leguminosas, tratando-se de grandes pragas de grãos no Brasil e de todo o mundo. O estudo da bioquímica de insetos é de extrema importância para contribuir para o desenvolvimento de técnicas de controle de sua proliferação.

No capítulo 3 descrevemos a precipitação de um polipeptídeo com alta atividade Ca^{2+} -ATPase a partir da fração solúvel de larva de *P. nucleorum*. Este polipeptídeo possui Mr de cerca de 205 kDa (p205) e co-purifica com um polipeptídeo cuja Mr é similar a da actina (p43). Além da massa molecular similar de p205, a estimulação da atividade Mg^{2+} -ATPásica dessa fração por F-actina e identificação por “Peptide Mass Fingerprinting” indica a presença de cadeia pesada de miosina. Além disso, este processo de precipitação do polipeptídeo de

205 kDa foi anteriormente descrito para a precipitação de miosina V e II de outros tecidos como cérebro, testículo e músculo esquelético.

O objetivo deste trabalho foi utilizar o método de congelamento e descongelamento da fração solúvel para precipitar ATPases de larva de *P. nucleorum*.

Capítulo 1: Fundamentação teórica - ATPases

1. ATPases

ATPases correspondem a um grupo de enzimas que utilizam ATP como fonte de energia para realização de algum tipo de trabalho celular, representado muitas vezes pelo transporte de íons (Stahl e Baskin, 1990). Estas ATPases são geralmente dependentes do complexo formado pelo ATP com Mg^{2+} e Ca^{2+} e estimuladas por outros cátions como Na^+ , K^+ , H^+ e alguns ânions como Cl^- .

O estudo das ATPases levou ao conhecimento de muitas de suas propriedades funcionais, físicas e enzimáticas, que hoje são utilizadas para auxiliar a identificação de outras ATPases, como por exemplo a divisão em ATPases de membrana e ATPases solúveis.

1.1 ATPases de membrana

As ATPases de membrana constituem ATPases que estão inseridas em estruturas membranosas da célula, caracterizadas como proteínas integrais de membrana, e que geralmente utilizam a energia livre da hidrólise do ATP para transportar íons através da membrana gerando gradientes eletroquímicos que tornam possíveis processos como absorção, secreção, sinalização transmembrana, transmissão de impulso nervoso, acoplamento da excitação e contração muscular, crescimento e diferenciação (Scarborough, 1999). Em 1987, as ATPases de membrana foram classificadas com base em suas características mecânicas e estruturais, e designadas em quatro categorias: P, V, F e ABC (Pedersen e Carafoli, 1987a; Pedersen e Carafoli, 1987b; Higgins, 1992).

1.1.1 ATPases do tipo P

As ATPases do tipo P (E_1E_2 -ATPases) constituem uma grande família de ATPases translocadoras de íons com cerca de 80 membros de todas partes da

árvore evolucionária (Scarborough, 1999) dividida em 5 subfamílias baseado em homologia de seqüência (tipos I a V) e 10 diferentes subtipos ou classes baseado na especificidade da ATPase pelo íon substrato (Figura 1).

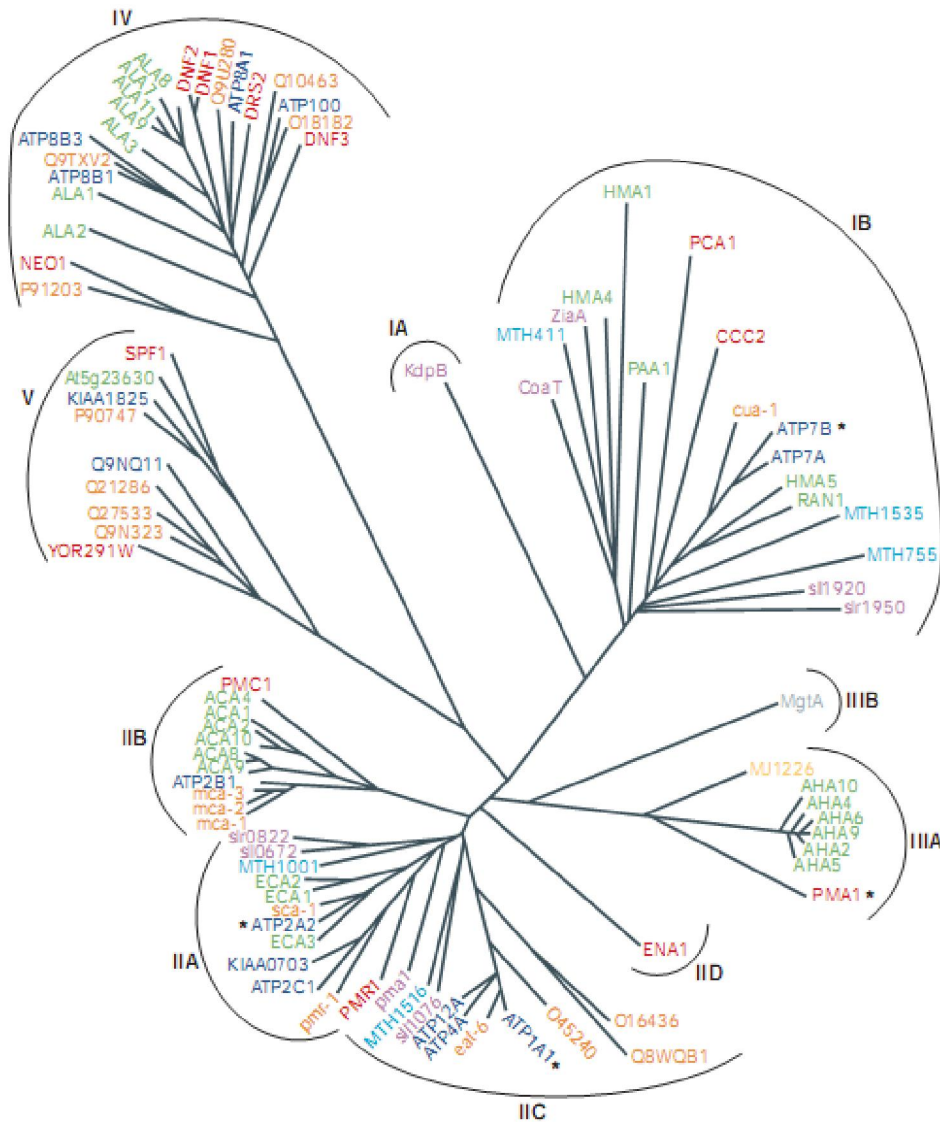


Figura 1: Árvore filogenética da família de ATPases do tipo P

Subfamílias divididas de acordo com sua especificidade de íons. Os produtos dos genes possuem cores de acordo com as espécies: verde para *Arabidopsis thaliana*; laranja para *Caenorhabditis elegans*; cinza para *Escherichia coli*; azul escuro para *Homo sapiens*; azul claro para *Methanobacterium thermoautotrophicum*; amarelo para *Methanococcus jannaschii*; púrpura para *Synechocystis*; e vermelho para *Saccharomyces cerevisiae*. Asteriscos marcam seqüências de genes mais próximas da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático de mamíferos (ATP2A2; tipo IIA), Na^+/K^+ -ATPase de mamíferos (ATP1A1; tipo IIC), H^+ -ATPase de fungos (PMA1; tipo IIIA), e Cu^+ -ATPase de mamíferos

(ATP7B; tipo IB). Classificação de acordo com Axelsen e Palmgren (1998). (Kühlbrandt, 2004)

Essas ATPases são fosforiladas na sua seqüência de reação ou transporte e têm como característica a formação de um estado intermediário fosforilado (aspartil-fosfato) durante seu ciclo catalítico (Pedersen e Carafoli, 1987a). Esta fosforilação acontece em uma seqüência altamente conservada (DKTG) na metade amino-terminal de sua subunidade catalítica (Scarborough, 1999).

Além do mecanismo de reação em comum, as ATPases do tipo P também possuem estruturas terciárias comparáveis, organização topológica de membrana equivalente e diversos domínios altamente conservados (Lutsenko e Kaplan, 1995). Dentre os membros desta família estão a Na^+/K^+ -, Na^+ -, K^+ -, Ca^{2+} - e H^+ -ATPase de membrana plasmática e de retículo sarcoplasmático e endoplasmático (Stahl e Baskin, 1990). As ATPases desta família são inibidas por vanadato e contêm uma subunidade catalítica de Mr de ~100 kDa (Pedersen e Carafoli, 1987a).

A Na^+/K^+ -ATPase foi provavelmente a primeira ATPase transportadora descoberta, encontrada por Jens Skou em 1957 durante seus estudos sobre os efeitos de anestésicos (Skou, 1957; Skou, 1998). Trata-se de uma proteína integral de membrana encontrada em todos eucariotos superiores e responsável por manter gradientes iônicos no sarcolema bombeando 3 Na^+ para fora e 2 K^+ para dentro da célula utilizando o ATP como fonte de energia (Lingrel e Kuntzweiler, 1994). A Na^+/K^+ -ATPase possui três subunidades diferentes (Figura 2), sendo uma α com cerca de 110 kDa, uma β altamente glicosilada de cerca de 50 kDa e uma γ de aproximadamente 15 kDa (Skou e Esmann, 1992; Pressley, 1996). Os sítios de ligação para ATP, K^+ , Na^+ e glicosídeos cardíacos residem na subunidade α , mas é provado que a subunidade β é essencial para a atividade da Na^+/K^+ -ATPase e para a inibição por ouabaína (Emery *et al.*, 1998). A atividade ATPase da Na^+/K^+ -ATPase geralmente é detectada na presença de Na^+ 10 vezes mais concentrado que K^+ (geralmente 140 mM de NaCl contra 14 mmol.L⁻¹ de KCl) e concentrações menores de Mg^{2+} (geralmente 5 mmol.L⁻¹ – Hori *et al.*, 1982), e é inibida especificamente por glicosídeos cardíacos como a ouabaina e a digitonina (Wheeler e Whittam, 1962; Hansen, 1984; Lingrel e Kuntzweiler, 1994).

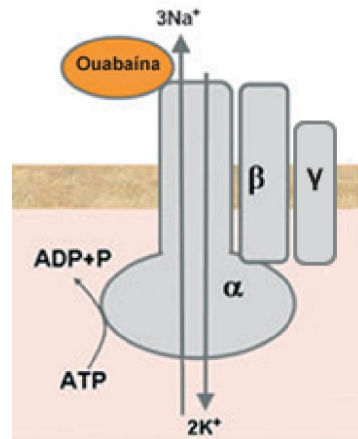


Figura 2: Representação esquemática da Na⁺-K⁺-ATPase

A Na⁺-K⁺-ATPase consiste em uma subunidade catalítica e uma subunidade que é requerida para a inserção da ATPase na membrana plasmática. A Na⁺-K⁺-ATPase usa a energia da hidrólise de ATP para transportar Na⁺ para fora da célula e K⁺ para dentro da célula. A figura esquematiza também o local de ligação do inibidor específico da Na⁺-K⁺-ATPase, ouabaina (em laranja). Adaptado de Aperia (2007).

A Ca²⁺-ATPase é uma ATPase de membrana cuja função é transportar íons Ca²⁺ através da membrana plasmática (Empson *et al.*, 2007) ou da membrana de retículo endoplasmático e sarcoplasmático (Periasamy *et al.*, 2008), estando relacionadas com processos regulatórios que vão desde a fertilização até a morte programada da célula (Strehler *et al.*, 2007). A Ca²⁺-ATPase de retículo sarcoplasmático (SERCA) tem o papel de recaptar o Ca²⁺ liberado durante algum tipo de estimulação, como a estimulação da contração muscular por exemplo, de volta ao retículo sarcoplasmático. Além disso, são conhecidas três isoformas: SERCA1, 2 e 3 (Wu *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1997). As isoformas diferem principalmente pela sua localização, sendo que a SERCA1 está presente exclusivamente em músculo esquelético de contração rápida, enquanto a isoforma SERCA2 é encontrada em todos tecidos e é mais abundante em tecidos musculares de contração lenta (Wuytack *et al.*, 1992). A SERCA3 está presente em plaquetas, células linfóides, células endoteliais, timo, intestino e cerebelo, onde também tem um papel importante na regulação de processos fisiológicos onde o Ca²⁺ possui papel fundamental (Liu *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 2002). Sabe-se que as isoformas 1 e 2 têm Mr de cerca de 110 kDa e a isoforma 3, cerca de

97 kDa (Bobe *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1995; Tupling *et al.*, 2001; Lawson *et al.*, 2007). A atividade ATPase da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático e endoplasmático é inibida especificamente por tapsigargina, um sesquiterpeno natural pertencente à família das lactonas promotoras de tumores (Hakii *et al.*, 1986; Thastrup *et al.*, 1990). A atividade da Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático de músculo cardíaco e esquelético, por exemplo, é inibida em mais de 80% com 100 nmol.L^{-1} de tapsigargina (Kijima *et al.*, 1991; Lytton *et al.*, 1991).

A Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática (PMCA) expulsa Ca^{2+} do citosol contra seu gradiente de concentração (mantendo a concentração de Ca^{2+} bem menor no citosol, cerca de $10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$) usando a energia derivada da hidrólise de ATP (Carafoli, 1992). A Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática (bomba de Ca^{2+}) possui por volta de 1200 resíduos de aminoácidos e Mr calculado de aproximadamente 125-140 kDa com extremidades N- e C-terminais intracelulares (Figura 3), dez segmentos transmembrana e dois grandes *loops* citosólicos (Verma *et al.*, 1988; Greb e Shull, 1989; Strehler *et al.*, 2007). Em humanos e outros mamíferos estudados são conhecidos quatro isoformas (PMCA1, 2, 3 e 4) que são codificadas por genes separados (Strehler *et al.*, 2007). A bomba de Ca^{2+} possui sua atividade dependente de Ca^{2+} e estimulada por calmodulina, e *in vitro*, na ausência de calmodulina, é estimulada por tratamentos como a exposição à fosfolípidos (incluindo os derivados fosforilados do fosfatidil-inositol), por tratamento controlado com proteases (tripsina ou calpaína) e por fosforilação por proteína kinase A ou C (Carafoli, 1997).

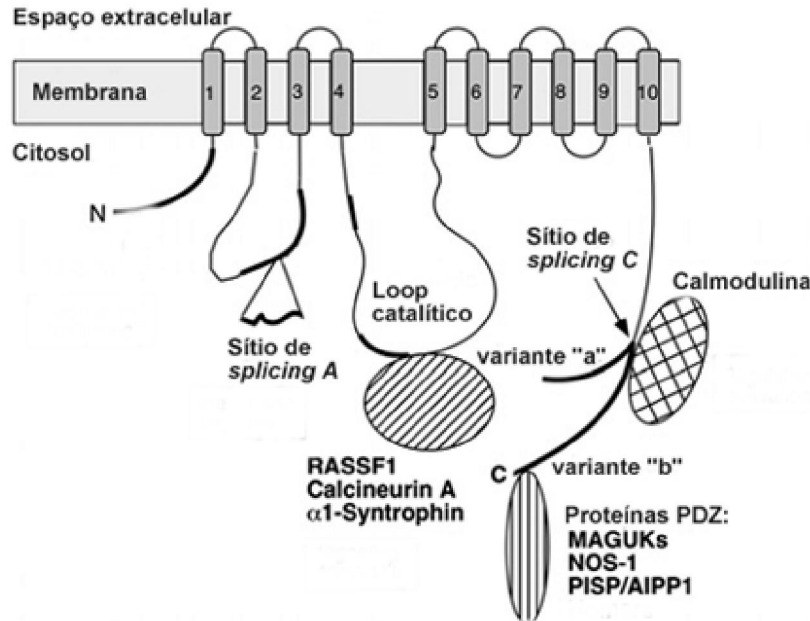


Figura 3: Esquema da PMCA

As regiões transmembrana estão numeradas (1⁻¹⁰) e mostradas como caixas sombreadas. As extremidades N- (amino) e C- (carboxi) terminais estão marcadas, e a posição do *loop* catalítico está indicada. Os sítios de *splicing* "A" e "C" denotam regiões afetadas por *splicing* alternativos. Várias proteínas que interagem com a PMCA são mostradas esquematicamente próximas ao domínio onde se ligam. AIPP, ATPase de interação com proteínas PDZ; MAGUK, Guanilato cinase associada a membrana; NOS⁻¹, óxido nítrico sintase⁻¹; PISP, proteína PDZ de interação com PMCA; RASSF1, domínio de associação a Ras família⁻¹. (Strehler *et al.*, 2007)

Por sua vez, as H⁺-ATPases de membrana pertencem à família das ATPases do tipo P enquanto que as H⁺-ATPases vacuolares ou bombas de prótons são classificadas como ATPases do tipo V, uma vez que estas não formam intermediários fosforilados como as do tipo P. As H⁺-ATPases do tipo P estão presentes apenas em plantas e fungos e executam um papel eletrogênico, bombeando prótons para fora das células e assim formando um potencial negativo do lado de dentro, importante para a formação de floema, movimento de estômatos, captação de nutrientes pelas raízes e crescimento de pêlos e tubos polínicos (Palmgren, 2001). Diversas Na⁺-ATPases (também ATPases do tipo P) têm sido descritas, principalmente em parasitos como *Trypanosoma cruzi* (Caruso-Neves *et al.*, 1998; Iizumi *et al.*, 2006), *Entamoeba histolytica* (De Souza *et al.*, 2007) e *Leishmania amazonensis* (De Almeida-Amaral *et al.*, 2008). Esta ATPase é importante para parasitos pois bombeia Na⁺ para fora da célula como uma

alternativa a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, permitindo a adaptação ao ambiente do hospedeiro que muitas vezes possui concentrações de Na^+ de cerca de 135–146 mmol.L^{-1} (Iizumi *et al.*, 2006; De Almeida-Amaral *et al.*, 2008). Esta ATPase é descrita como insensível a ouabaína, um inibidor específico de $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPases}$, e sensível a furosemida, um inibidor de outras ATPases e princípio ativo de um conhecido diurético sob o nome de Lasix[®] (De Souza *et al.*, 2007; De Almeida-Amaral *et al.*, 2008). A $\text{H}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ é outra ATPase do tipo P que realiza o transporte de captação de K^+ pelas células em troca do efluxo de H^+ (Rhoden *et al.*, 1996). Esta ATPase foi primeiramente descrita em células parietais gástricas (Sachs *et al.*, 1976) e é responsável pela secreção ácida gástrica no lúmen estomacal com considerável habilidade para resistir a tais condições adversas (Rhoden *et al.*, 1996; Thangarajah *et al.*, 2002). Similar a essa ATPase, outras foram descritas em outros epitélios, por exemplo túbulo coletor renal de mamíferos (Wingo, 1989), epitélio de bexiga de anfíbios (Jaisser *et al.*, 1993) e pneumócitos do tipo II (Kemp *et al.*, 1994), com funções que contribuem para a regulação da absorção e reabsorção de K^+ , acidificação urinária e acidificação alveolar. A $\text{H}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ possui atividade $\text{K}^+\text{-ATPase}$ estimulada por 10^{-5} M de valinomicina e inibida por Zn^{2+} e F^- . Esta ATPase é isenta de atividade Mg^{2+} -, Na^+ -, Cs^+ - e $\text{Li}^+\text{-ATPase}$ (Sachs *et al.*, 1976).

Existem mais de 50 outras ATPases do tipo P que possuem pelo menos três características em comum: estão presentes em membranas biológicas, hidrolizam ATP e transportam várias substâncias através da membrana (Pedersen, 2007), principalmente metais pesados (Cu^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}) (Lutsenko e Kaplan, 1995; Williams e Mills, 2005; Arguello *et al.*, 2007). Uma consequência imediata a sua especificidade de metais e às similaridades químicas entre os metais de transição, é que certas bombas transportam também substratos não fisiológicos, como por exemplo, $\text{Cu}^+\text{-ATPases}$ que transportam também Ag^+ e $\text{Zn}^{2+}\text{-ATPases}$ que transportam Cd^{2+} e Pb^{2+} (Arguello *et al.*, 2007).

1.1.2 ATPases do tipo V

As ATPases do tipo V (V_1V_0 -ATPases) são responsáveis pelo transporte de H^+ mas, diferente da H^+ -ATPase do tipo P, não forma intermediário fosforilado (Stahl e Baskin, 1990). As ATPases do tipo V estão associadas à própria membrana plasmática ou com estruturas membranosas intracelulares como vacúolos, grânulos secretórios, lisossomos e vesículas (Stevens e Forgac, 1997). As V-ATPases intracelulares estão envolvidas na endocitose mediada por receptores (Maxfield e McGraw, 2004), tráfego intracelular (Peters *et al.*, 2001; Hiesinger *et al.*, 2005), processamento e degradação de proteínas (Gu e Gruenberg, 2000) e com a entrada de vários patógenos nas células, incluindo vírus como o influenza vírus e toxinas como a toxina do anthrax (Gruenberg e Van Der Goot, 2006; Abrami *et al.*, 2004), enquanto que as V-ATPases de membrana plasmática têm papel importante na secreção de ácido nos rins (Wagner *et al.*, 2004), na reabsorção óssea pelos osteoclastos (Toyomura *et al.*, 2003) e na migração de células tumorais e endoteliais (Sennoune *et al.*, 2004).

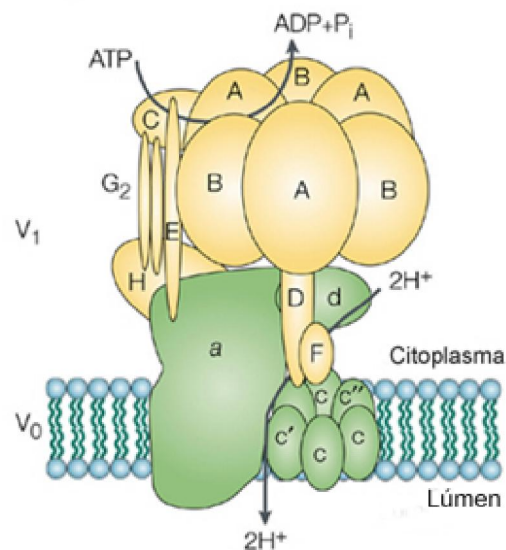


Figura 4: Estrutura das ATPases do tipo V (V_1V_0 -ATPases)

A hidrólise do ATP pelo domínio periférico V_1 (mostrado em amarelo) dirige o transporte de prótons através do domínio integral V_0 (mostrado em verde) do citoplasma para o lúmen, operando por meio de um mecanismo rotacional. (Nishi e Forgac, 2002)

As H⁺-ATPases do tipo V compartilham similaridades estruturais e funcionais com as ATPases do tipo F e acredita-se que estejam presentes em praticamente todas as células eucarióticas em estruturas como vesículas mediadas por clatrina, vesículas sinápticas, endossomos, vesículas de estocagem, vesículas de Golgi, vesículas secretórias, lisossomos e vacúolo central em plantas e fungos, mediando principalmente a acidificação de compartimentos intracelulares e a captação de cátions como Na⁺, Ca²⁺ e Cd²⁺ por antiporte dirigido pelo transporte de H⁺ (Dietz *et al.*, 2001; Beyenbach e Wicczorek, 2006). São proteínas com até 14 diferentes subunidades que formam duas estruturas maiores em forma de anel: um complexo V₁ (400–600 kDa) que interage com ATP, ADP e Pi e contém oito subunidades, e um complexo integral de membrana V₀ (150–350-kDa) que medeia o transporte de H⁺ ou Na⁺ e possui seis subunidades, formando um total de aproximadamente 800 kDa (Beyenbach e Wicczorek, 2006; Qi *et al.*, 2007). V₁ contém oito subunidades (A–H) organizadas em uma cabeça hexamérica de subunidades que se ligam a nucleotídeos (A e B) e que está ancorada ao domínio V₀ por um cabo central e periférico. V₀ contém seis subunidades (a, c, c, c, d, e) no qual as subunidades proteolípídicas (c, c, c) formam um anel que se situa adjacente a subunidade “a” (Figura 4) (Qi *et al.*, 2007).

A atividade ATPase da H⁺-ATPase do tipo V, similar às ATPases do tipo F, é dependente do complexo Mg²⁺-ATP e totalmente inibida por concentrações micromolares de N-etilmaleimida, apresentando ainda inibição por ADP (Graf *et al.*, 1996; Rengel, 2002; Kettner *et al.*, 2003).

1.1.3 ATPases do tipo F

As ATPases do tipo F (F₁F₀-ATPases), assim como as do tipo V, não formam intermediários fosforilados como as do tipo P mas sua atividade envolve ligação com ATP e ADP por meio de um ciclo de mudanças conformacionais que é dirigido pela passagem de prótons através da rotação de um rotor, atuando como uma máquina sintetizadora de ATP ou como um transportador de prótons

movido pela energia da hidrólise de ATP (Weber e Senior, 1997; Boyer, 1997; Kinoshita *et al.*, 2004; Drory e Nelson, 2006).

A F_1F_0 -ATPase (ou ATPase mitocondrial) é responsável pela síntese de ATP em membranas da mitocôndria, cloroplastos ou bactérias e, é provavelmente a proteína mais abundante de qualquer organismo, sendo capaz de sintetizar quantidades que excedem o próprio peso do organismo em ATP por dia (Stahl e Baskin, 1990; Dittrich *et al.*, 2003). Esta ATPase, em bactérias e *in vitro*, utiliza a energia da hidrólise do ATP para induzir o processo reverso, bombeando prótons através da membrana, enquanto que em mitocôndrias e cloroplastos, em condições fisiológicas, atuam essencialmente como uma ATP sintase (Weber e Senior, 1997; Emery *et al.*, 1998). Com oito diferentes subunidades, a F_1F_0 -ATPase de *E. coli* representa o protótipo desta enzima, sendo que a unidade F_1 é solúvel e possui os sítios catalíticos, com cinco diferentes tipos de subunidades sendo 3 α (55,3 kDa), 3 β (50,3 kDa), 1 γ (31,6 kDa), 1 δ (19,3 kDa) e 1 ϵ (14,9 kDa). As subunidades α e β formam um hexâmero onde as subunidades α são não-catalíticas e as β são catalíticas, com o restante das subunidades da porção F_1 formando o bastão central da estrutura (Figura 5). Já a unidade F_0 está ancorada na membrana e está envolvida na translocação de prótons, possuindo três tipos de subunidades sendo 1 *a* (30,3 kDa), 2 *b* (17,2 kDa) e 9 a 12 *c* (8,3 kDa) (Walker *et al.*, 1984; Boyer, 1997; Dittrich *et al.*, 2003). A atividade ATPase da F_1F_0 -ATPase é dependente de Mg^{2+} , fortemente inibida por fluoreto de alumínio e fluoreto de sódio (Lunardi *et al.*, 1988), por ADP (Vasilyeva *et al.*, 1980; Vasilyeva *et al.*, 1982a) e por azida sódica (NaN_3) (Meyerhof e Ohlmeyer, 1952; Myers e Slater, 1957; Vasilyeva *et al.*, 1982b) e ainda é estimulada por vários ânions como $HSeO_3^-$, HSO_3^- , cromato e malonato (Ebel e Lardy, 1975; Vasilyeva *et al.*, 1982b).

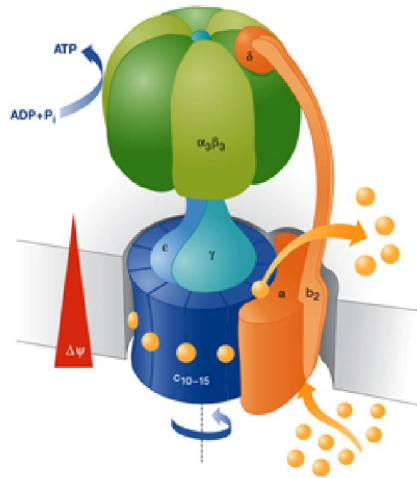


Figura 5: Estrutura e função de uma ATP-Sintase bacteriana (F₁-F₀-ATPase)

F₁ (subunidades $\alpha_3\beta_3$) e F₀ (subunidades ab_2c_{10-15}) são dois motores que trocam energia por rotação acoplada. As subunidades rotacionais (c_{10-15}) estão mostradas em azul, e as subunidades ancoradas na membrana e citoplasmáticas ($\alpha\beta_2\gamma$) estão mostradas em laranja e verde. Durante a síntese de ATP, íons (laranja) passam através do motor F₀ do periplasma para o citoplasma induzindo a rotação e habilitando o motor F₁ a sintetizar ATP (Dimroth *et al.*, 2006).

1.1.4 ATPases do tipo ABC

Cerca de 20% dos genes identificados de *E. coli* estão envolvidos com transporte de membrana (Bachmann, 1990). A maioria dessas ATPases relacionadas com transporte de membrana pertencem a maior e mais diversa família, as ATPases do tipo ABC, que tem recebido atenção recentemente pois estão associadas com muitos processos biológicos importantes, tanto em procarionotos quanto em eucarionotos (Higgins, 1992; Linton, 2007). Estas ATPases estão implicadas também em processos clínicos como fibrose cística (Tabcharani *et al.*, 1991; Mendoza e Thomas, 2007), apresentação de antígenos (Neumann *et al.*, 2002), resistência a drogas anti-câncer (Chang e Roth, 2001), desordens de sangramento (Albrecht *et al.*, 2005), e doenças nos olhos (Martinez-Mir *et al.*, 1998) e fígado (Jacquemin, 2000). Tipicamente, os transportadores do tipo ABC utilizam a energia da hidrólise do ATP para bombear substratos através da membrana contra gradiente de concentração, entretanto a variedade de substratos que são transportados por diferentes transportadores é enorme: transportadores do tipo ABC para aminoácidos (Mathiopoulos *et al.*, 1991),

açúcares (Gilson *et al.*, 1982; Smith *et al.*, 1990), íons inorgânicos (Zumft *et al.*, 1990), peptídeos (Powis *et al.*, 1992) e até mesmo proteínas (Kamijo *et al.*, 1990) tem sido identificados, sempre transportando seu substrato para um lado da membrana (Higgins, 1992). A glicoproteína-P (P-gp), por exemplo, uma proteína com massa total de cerca de 170 kDa, é um membro da família das ATPases do tipo ABC e pode conferir resistência multidrogas a células e tumores bombeando drogas quimioterapêuticas do citoplasma para fora da célula (Loo e Clarke, 1995; Rosenberg *et al.*, 1997). O transportador ABCB10 (ABC-me) é outra ATPase do tipo ABC, com cerca de 65 kDa, localizado na membrana mitocondrial interna e envolvido na translocação de precursores da biossíntese de heme para dentro da mitocôndria (Shirihai *et al.*, 2000; Graf *et al.*, 2004).

Esta grande classe de ATPases de transporte possui o nome de ABC pois possuem uma seqüência característica chamada “**ATP Binding Cassete**” que consiste nos motivos “Walker” A e B e no motivo C que distingue esses transportadores de outras proteínas ligantes de ATP (Higgins, 1992; Dean e Annilo, 2005). Os transportadores ABC requerem o mínimo de quatro domínios (Figura 6), sendo dois transmembrana (TMDs) que formam os sítios ligantes do substrato e provêem especificidade, e dois domínios ligantes de nucleotídeos (NBDs) onde se liga e hidrolisa o ATP para promover o transporte do ligante, sendo os domínios NBDs homólogos e altamente conservados entre os diferentes transportadores e onde estão localizados vários motivos característicos desses transportadores (Dean e Annilo, 2005; Linton, 2007). Os domínios TMDs geralmente não são homólogos entre os diferentes transportadores (Linton, 2007).

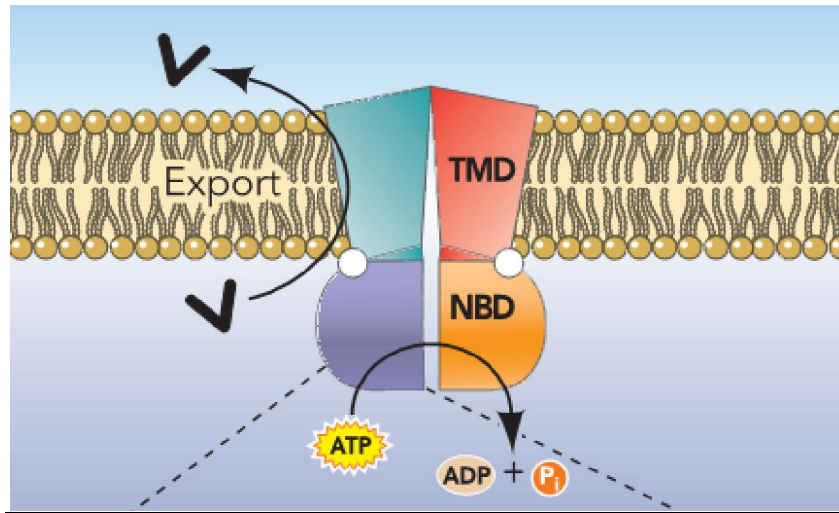


Figura 6: A estrutura mínima dos transportadores ABC

Dois domínios transmembrana (TMD) se ligam ao ligante, enquanto que o transporte é mediado pela ligação e hidrólise de ATP por dois domínios ligantes de nucleotídeos (NBD). O TMD de diferentes subfamílias de transportadores ABC não são necessariamente homólogos. O NBD é homólogo nas diferentes subfamílias. Cada NBD tem sete domínios altamente conservados. (Linton, 2007)

1.2 ATPases solúveis

Existem também, diversas ATPases não dependentes de membrana (apesar de algumas ainda possuírem estruturas associadas a membranas) e não envolvidas com funções de transporte através da membrana, ditas como ATPases solúveis.

1.2.1 Apirases ou ATPases do tipo E

As ecto-ATPases ou apirases, muitas vezes chamadas de ATPases do tipo E, possuem seu sítio catalítico exposto para o exterior da célula (mesmo quando associadas à membrana) e são responsáveis pelo metabolismo extracelular do ATP (Venkstern e Engelgardt, 1955; Grinthal e Guidotti, 2000). Estas ATPases estão presentes em células de eucariotos e procariotos

desempenhando papéis no metabolismo e sinalização da célula, apresentando baixa especificidade por substratos tri- e difosfonucleosídeos (Komoszynski e Wojtczak, 1996; Kukulski e Komoszynski, 2003). Outra característica das apirases é a presença de cinco domínios altamente conservados conhecidos como “regiões conservadas de apirase”, abreviado como ACR1 até ACR5 e que são envolvidas no ciclo catalítico (Robson *et al.*, 2006). Existem mais de 20 membros destas ATPases em mamíferos (Robson *et al.*, 2006) e outros descritos em *Toxoplasma gondii*, *Entamoeba histolytica*, *Tetrahymena thermophila*, *Leishmania tropica*, *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi* e *Tritrichomonas foetus* (Meyer-Fernandes, 2002).

Apesar de também hidrolisarem a molécula de ATP, as ATPases dessa família são divididas em dois grupos de acordo com sua especificidade de substrato, hidrolisando nucleotídeos tri e difosfatos (ectonucleotídeo-difosfohidrolase ou ecto-ATPDase) ou apenas nucleotídeos trifosfato (ectonucleotídeo-trifosfatase ou ecto-ATPase) (Plesner, 1995; Robson *et al.*, 2006). Outro ponto importante é que estas ATPases possuem funções que não envolvem o uso da energia da hidrólise do ATP para execução de algum tipo de trabalho ou transporte de moléculas, estando relacionadas principalmente com a sinalização extracelular gerada pelos metabólitos do ATP (Edwards e Gibb, 1993; Kegel *et al.*, 1997), agregação plaquetária (Marcus e Safier, 1993; Atkinson *et al.*, 2006) e regulação da integridade da membrana (Girolomoni *et al.*, 1993). A maioria das ecto-ATPases possuem apenas uma cadeia polipeptídica e são caracterizadas pela ausência de grupos –SH livres, sendo que as apirases de animais possuem entre 50 e 189 kDa (Komoszynski e Wojtczak, 1996; Dombrowski *et al.*, 1998).

Inicialmente detectou-se que a atividade enzimática das apirases é inibida por agentes quelantes (Moodie *et al.*, 1991), o que foi confirmado pela dependência de sua atividade ATPase de cátions bivalentes, geralmente Mg^{2+} ou Ca^{2+} (Yagi *et al.*, 1991; Picher *et al.*, 1993; Christoforidis *et al.*, 1995; Yi *et al.*, 1999). Esta atividade é também inibida pela presença de diversos análogos do ATP como adenosina 5'-[, -imido]trifosfato (AdoPP[NH]P), adenosina 5'-[, -metileno]trifosfato AdoPP[CH₂]P, adenosina 5'-[, -metileno]difosfato AdoP[CH₂]P e adenosina(5')pentafosfo(5')-adenosina Ap₅A (Moodie *et al.*, 1991).

Detergentes que normalmente solubilizam proteínas ligadas à membrana, como Triton X¹⁰⁰, também agem como inibidores da atividade enzimática das ecto-ATPases (Plesner, 1995). Finalmente, a azida é uma importante ferramenta para distinção entre as ecto-nucleotidasas, uma vez que apenas as ecto-ATPDases são inibidas por azida 10-20 mmol.L⁻¹ (Lebel *et al.*, 1980; Picher *et al.*, 1993; Plesner, 1995).

1.2.2 Motores Moleculares

Outra família de ATPases caracterizadas como solúveis são os chamados motores moleculares que são conhecidos por hidrolisarem nucleotídeos como o ATP e utilizarem a energia liberada para execução de movimento (trabalho) ao longo de filamentos do citoesqueleto (Schliwa e Woehlke, 2003; Vale, 2003; Hirokawa e Takemura, 2005), onde destacam-se as miosinas, as cinesinas e as dineínas. A distinção entre essas famílias de motores moleculares é feita principalmente pelo citoesqueleto ao que estão associados, uma vez que miosinas utilizam apenas filamentos de actina para realizar movimentos e cinesinas e dineínas utilizam microtúbulos. A distinção entre as cinesinas e as dineínas é feita principalmente com base em sua estrutura, muito distintas para estas duas famílias de motores moleculares. Além disso, originalmente, as cinesinas foram identificadas por realizar movimentos direcionados à extremidade + dos microtúbulos ou movimento anterógrado, enquanto que dineínas por movimentos direcionados à extremidade – de microtúbulos ou retrógrado, ainda que existam exceções (Hirokawa e Takemura, 2005; O'Connell *et al.*, 2007). No entanto hoje existem membros destas duas famílias que são responsáveis por movimentos contrários aos identificados originalmente.

1.2.2.1 Cinesinas

As cinesinas são motores moleculares responsáveis principalmente pelo transporte de organelas, proteínas complexas e mRNA até destinos

específicos ao longo de microtúbulos utilizando a energia da hidrólise de ATP (Hirokawa, 1998; Miki *et al.*, 2005). É também conhecida sua participação no movimento de cromossomos e do fuso mitótico durante a divisão celular (Sharp *et al.*, 2000).

A família das cinesinas (Figura 7), com cerca de 14 classes (Dagenbach e Endow, 2004; Miki *et al.*, 2005), possui sua estrutura caracterizada pela presença de um domínio globular bem conservado de cerca de 360 resíduos que contém o sítio catalítico e o sítio de ligação dos microtúbulos (Hirokawa *et al.*, 1989; Miki *et al.*, 2005). A maioria das cinesinas forma uma estrutura filamentosa longa (Figura 8), com o domínio globular em uma extremidade (domínio cabeça) e uma estrutura em forma de “ventilador”, que se associa a cadeias leves e interage com moléculas que servirão de carga, na outra extremidade (domínio cauda) (Hirokawa *et al.*, 1989; Mandelkow e Hoenger, 1999). A cinesina convencional possui um total de cerca de 380 kDa com duas cadeias pesadas (KHC) de ~120 kDa e duas leves (KLC) de ~64 kDa (Vale *et al.*, 1985; Brady, 1985; Schnapp *et al.*, 1985; Bloom *et al.*, 1988). As diferentes famílias são diferenciadas com base na estrutura da região que fica entre o domínio globular e o corpo filamentoso, conhecido como “pescoço”. Além disso, esta região pescoço é também essencial na determinação da direção em que a cinesina se move ao longo do microtúbulo (direção + ou -) e na regulação de sua atividade (Endow e Waligora, 1998).

As cinesinas possuem atividade ATPase na presença de Mg^{2+} ou Ca^{2+} , porém a atividade Ca^{2+} -ATPase é maior na ausência de microtúbulos e a atividade Mg^{2+} -ATPase é dependente da presença de microtúbulos (Kachar *et al.*, 1987). A atividade Mg^{2+} -ATPase das cinesinas é inibida por alta força iônica (Kachar *et al.*, 1987) e concentrações de vanadato maiores que $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e ainda por NaF (Pratt, 1986; Cohn *et al.*, 1987).

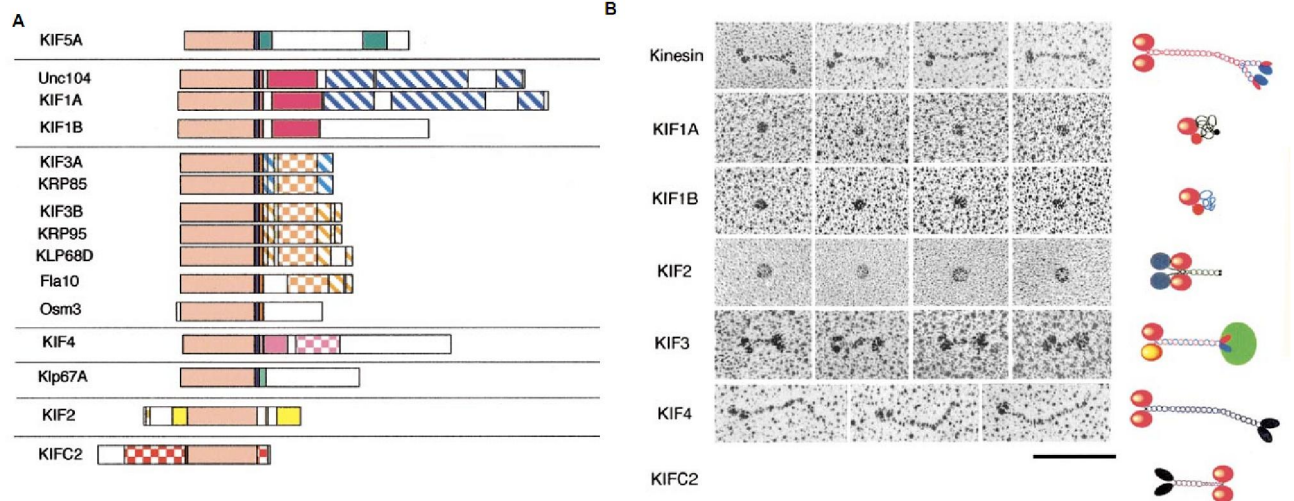


Figura 7: Principais membros da superfamília das cinesinas

(A) Representação esquemática das proteínas da superfamília das cinesinas. Domínios motores conservados estão alinhados e de cor rosa. Em azul escuro e vermelho estão as regiões específicas do pescoço tipo-N e tipo-C, respectivamente. Retângulos amarelos indicam as regiões pescoço e cauda específicas do tipo-M. Outras regiões conservadas estão indicadas por retângulos sólidos, faixas oblíquas, ou xadrez, respectivamente, com diferentes cores. **(B) Esquerda:** Painéis dos principais membros das cinesinas funcionando em transporte de organelas, observado por eletro-microscopia de sombreamento rotacional de baixo ângulo. Barra de escala: 100 nm. **Direita:** Ilustrações esquemáticas das mesmas cinesinas, baseadas nos estudos de eletro-microscopia ou de análise de estruturas primárias (Hirokawa, 1998).



Figura 8: A cinesina convencional

Os domínios motores catalíticos são mostrados em azul, amplificadores mecânicos em azul claro, e os domínios cauda implicados na ligação da carga são mostrados em púrpura. As cadeias leves são mostradas em verde. (Vale, 2003)

1.2.2.2 Dineínas

As dineínas são categorizadas em apenas duas grandes famílias chamadas dineínas axonemais e dineínas citoplasmáticas, separadas pela sua localização e função, uma vez que as dineínas axonemais estão envolvidas com o batimento de cílios e flagelos fazendo parte da estrutura do axonema enquanto que as citoplasmáticas realizam o transporte de vesículas e outras partículas no citoplasma, ambas utilizando microtúbulos como trilhos (Gibbons, 1988; Hook e Vallee, 2006). Todas as dineínas já estudadas são proteínas com várias subunidades (Figura 9), sendo geralmente de uma a três cadeias pesadas com mais de 500 kDa e formadas por duas estruturas proeminentes: um domínio N-terminal de cerca de 160 kDa que forma a base da molécula, onde a maioria das subunidades acessórias se ligam, e um domínio motor de cerca de 380 kDa (Oiwa e Sakakibara, 2005). As dineínas citoplasmáticas contêm geralmente duas cadeias pesadas formando homodímeros e diversas subunidades acessórias como cadeias intermediárias, intermediárias leves e leves (Hook e Vallee, 2006).

In vitro, a dineína citoplasmática sozinha é capaz de promover o movimento sobre microtúbulos. Entretanto, dentro da célula, um segundo complexo enzimático chamado dinactina é requerido para a maioria das funções da dineína citoplasmática (Figura 10). A dinactina é um complexo protéico grande (1 MDa) com uma estrutura distinta composta por cerca de 11 subunidades diferentes que variam de 22 a 150 kDa (Holleran *et al.*, 1998; Levy e Holzbaur, 2006), dentre as quais a dinamitina é uma das mais importantes, e é responsável por mediar a interação entre a própria dineína e suas cargas, juntamente com a diversidade de subunidades acessórias (Vallee *et al.*, 2004; Hook e Vallee, 2006).

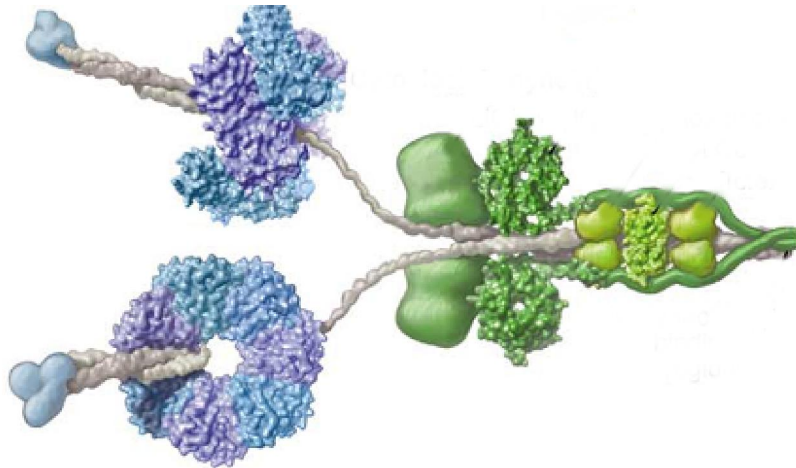


Figura 9: A dineína citoplasmática

Os domínios motores catalíticos e amplificadores mecânicos são mostrados em azul e azul claro, respectivamente. As cadeias leves são mostradas em verde. (Vale, 2003)

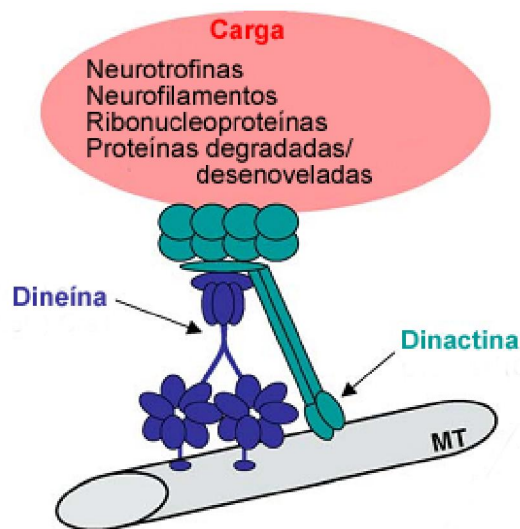


Figura 10: A dineína citoplasmática e a dinactina

A dineína citoplasmática e a dinactina são responsáveis pelo transporte axonal retrógrado de neurotrofinas, neurofilamentos, ribonucleoproteínas e material marcado para degradação das regiões distais dos neurônios, incluindo a sinapse, para o corpo celular. Este transporte ocorre ao longo de microtúbulos (MT) (Levy e Holzbaur, 2006).

A dineína citoplasmática possui atividade Ca^{2+} - e Mg^{2+} -ATPase, sendo sua atividade Mg^{2+} -ATPase inibida por vanadato em baixas concentrações ($5 \cdot 10 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e por N-etilmaleimida (Shpetner *et al.*, 1988). Apesar que somente a hidrólise de ATP ser capaz de estimular a translocação de microtúbulos *in vitro*

(Paschal e Vallee, 1987), a dineína é capaz de hidrolisar GTP, CTP e TTP a uma taxa maior do que a do ATP (Shpetner *et al.*, 1988).

1.2.2.3 Miosinas

Descobertas como uma proteína globular de músculo (Edsall, 1930) sabe-se hoje que as mais de 20 classes de miosina identificadas (Richards e Cavalier-Smith, 2005; Foth *et al.*, 2006) constituem uma enorme família de proteínas expressas em todos tecidos de eucariotos (Yamamoto *et al.*, 1999; Sokac e Bement, 2000; Steinberg, 2000; Richards e Cavalier-Smith, 2005) responsáveis por funções dependentes do citoesqueleto de actina, como por exemplo, citocinese (Uyeda e Nagasaki, 2004; Arden *et al.*, 2007), transporte de vesículas secretórias e melanossomos (Varadi *et al.*, 2005; Hume *et al.*, 2006; Holt *et al.*, 2007), migração celular (Novak e Titus, 1997; Morin *et al.*, 2008), movimento vacuolar (Hill e Weisman, 1996; Mulvihill *et al.*, 2001), adesão celular (Tuxworth *et al.*, 2001; Titus, 2005), função sensorial (Hasson *et al.*, 1997; Brown e Bridgman, 2004; Gillespie, 2004) e sinalização celular (Müller *et al.*, 1997; Cross *et al.*, 2004). As primeiras miosinas musculares identificadas e as por seguinte encontradas em outros tecidos com semelhança estrutural e funcional, pertencentes à classe II e são chamadas de “miosinas convencionais”. As miosinas de todas outras classes são conhecidas como “não-convencionais” e das cerca de 40 miosinas presentes em humanos (12 classes diferentes) 26 são não-convencionais (Redowicz, 2007), havendo diversas doenças ligadas às mutações nos genes de diferentes miosinas, como miopatias, cegueiras e perda de audição (Foth *et al.*, 2006).

A cadeia pesada da maioria das miosinas possui três regiões distintas (Figura 11): um motor N-terminal ou domínio cabeça que é responsável pela ligação e hidrólise do ATP; uma região pescoço que contém uma ou mais cópias da seqüência consenso “IQ-motif”, que tem o padrão IQxxxRGxxxRxxY, e é um sítio potencial para a ligação das cadeias leves específicas de miosina (calmodulina ou outros membros da família de proteínas E-F) que geralmente são pequenas, ácidas e membros da família de proteínas ligantes de Ca²⁺; e uma

cauda C-terminal que é responsável pela ligação da carga e dimerização (Krendel e Mooseker, 2005). Todas as classes identificadas são definidas com base na comparação da seqüência de seus domínios motores (O'Connell *et al.*, 2007).

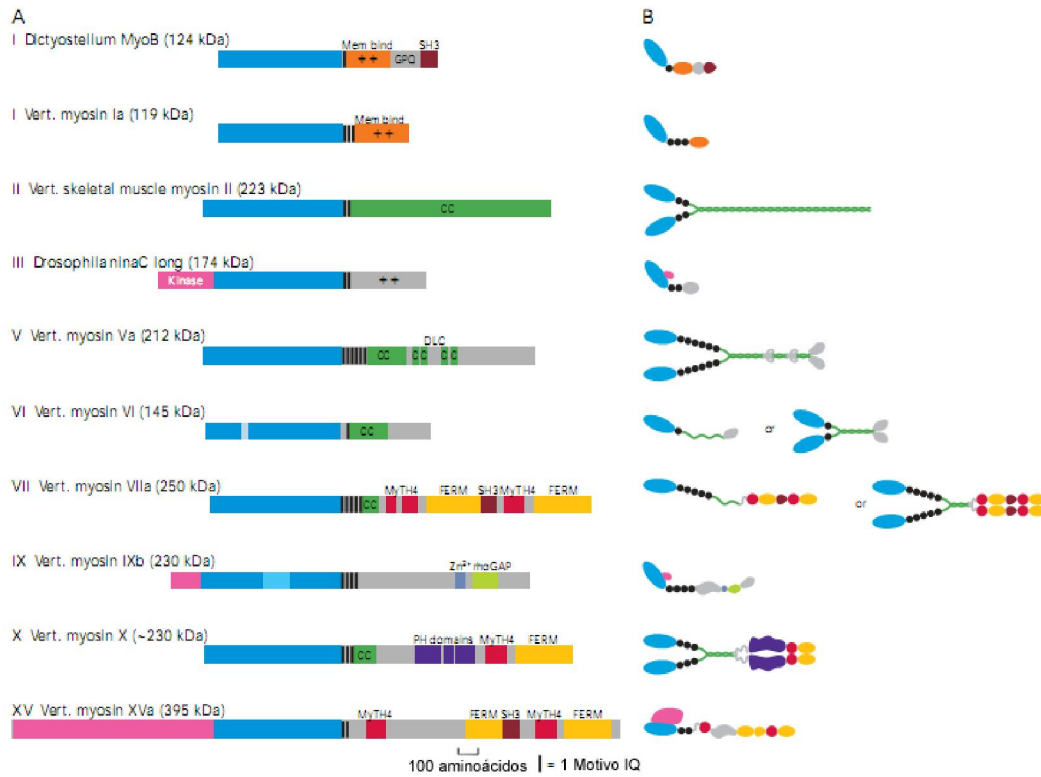


Figura 11: Família das miosinas

A: Estrutura das cadeias pesadas das principais classes de miosinas. B: Representações esquemáticas da estrutura das miosinas. As miosinas de classe VI e VII podem existir em ambas as formas, diméricas e monoméricas. (Krendel e Mooseker, 2005)

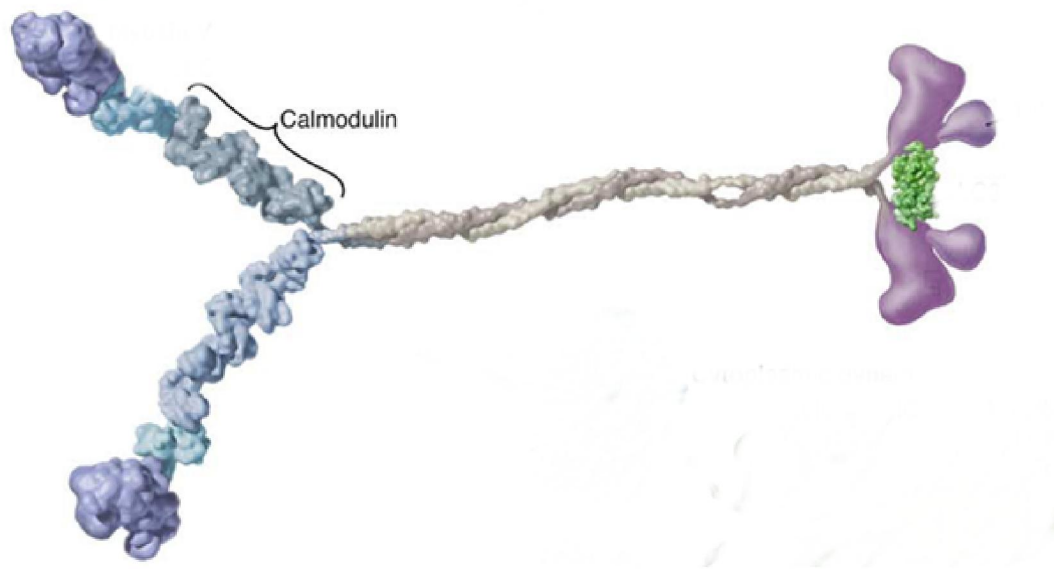


Figura 12: A miosina de classe V

Os domínios motores catalíticos são mostrados em azul, amplificadores mecânicos em azul claro, e os domínios cauda implicados na ligação da carga são mostrados em púrpura. As cadeias leves são mostradas em verde. (Vale, 2003)

Nas miosinas de classe V (Figura 12), o domínio cabeça ou motor contém os sítios ligantes de actina e nucleotídeo, seguido por um braço em α -hélice de 24 nm que é estabilizado pela ligação de seis moléculas de calmodulina (CaM) ou cadeias leves relacionadas (Trybus, 2008). Este braço amplifica pequenas mudanças dependentes do nucleotídeo que se originam no sítio ativo, permitindo que “passos” mais largos ocorram após a hidrólise do ATP e dados bioquímicos têm mostrado que na ausência de Ca^{2+} , calmodulina co-purifica (Larson *et al.*, 1988) e co-imunoprecipita (Brockhoff *et al.*, 1994) com miosina V. A região bastão que se segue (cauda), contém regiões em α -hélice intercaladas com regiões globulares que são responsáveis pela dimerização da molécula (Trybus, 2008). A primeira destas regiões globulares contém uma seqüência PEST (uma seqüência rica em resíduos P, E, S e T) (Espreafico *et al.*, 1992) que é associada a alvos de proteólise por calpaína (Rogers *et al.*, 1986).

A miosina V é um motor processivo, o que significa que é uma proteína que dá múltiplos passos sem se dissociar da actina, e usa um mecanismo de passos alternados (“*hand-over-hand*”) para mover-se 36 nm para frente (Yildiz *et al.*, 2003; Cappello *et al.*, 2007). Todas as miosinas possuem sua atividade

estimulada por actina, porém algumas características as diferem entre si. As miosinas do tipo I, por exemplo, possuem alta atividade Ca^{2+} -ATPase e K^+ /EDTA-ATPase, se comparadas a atividade Mg^{2+} -ATPase, e não possuem especificidade de substrato, quebrando diversos nucleotídeos trifosfato (Barylko *et al.*, 1992). As miosinas do tipo II também possuem atividade K^+ /EDTA-ATPase (Maruta e Korn, 1977) e são inibidas por vanadato (Goodno, 1979). As miosinas do tipo V possuem alta atividade K^+ /EDTA-ATPase apenas na presença de actina (Nascimento *et al.*, 1996), e sua atividade Mg^{2+} -ATPase, na presença de actina, é estimulada por Ca^{2+} e por Ca^{2+} /Calmodulina (Espindola *et al.*, 1992).

1.3 ATPases em insetos

Diversas ATPases foram identificadas em insetos e estão diretamente envolvidas com sua fisiologia. As larvas de *Manduca sexta* (um lepidóptero predador do tabaco) possuem em seu aparelho digestivo uma ATPase cuja imunoprecipitação apresenta pelo menos 9 polipeptídeos e a atividade enzimática é insensível a ouabaína (Wieczorek, 1992). Esta ATPase foi identificada como uma H^+ -ATPase do tipo V responsável pelo transporte de prótons para dentro da célula e pelo antiporte de K^+ para fora da célula (Wieczorek, 1992; Klein, 1992; Wieczorek *et al.*, 2000). Como o sistema digestório da maioria dos insetos não possui uma Na^+ - K^+ -ATPase, esta parece ser a única responsável pela fluxo de solutos neste epitélio (Harvey *et al.*, 1983). Sabe-se, porém da presença de Na^+ - K^+ -ATPases no intestino de mosquitos (como *Anopheles stephensi* – Emery *et al.*, 1995) e em diversos tecidos de outros insetos como *Drosophila melanogaster* (Lebovitz *et al.*, 1989), *Stomoxys calcitrans* (Macvicker *et al.*, 1994), *Ctenocephalides felis* (Reeves e Yamanaka, 1993) e diversos outros, sendo responsáveis principalmente pela manutenção do potencial de repouso de tecidos nervosos (Levenson, 1994) e outros órgãos sensitivos (como fotoreceptores – Baumann *et al.*, 1991; Jansonius, 1990) e também de músculo esquelético (Fitzgerald *et al.*, 1996). Em *D. melanogaster* há apenas a expressão de uma isoforma de Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático (Magyar *et al.*, 1995). A SERCA de *Drosophila* possui atividade Ca^{2+} e Mg^{2+} -ATPase e é também sensível

a tapsigargina (Vazquez-Martinez *et al.*, 2003). Três transportadores do tipo ABC estão também descritos no proteoma de *Drosophila*, e são responsáveis pelo transporte de guanina e triptofano nos olhos deste inseto (precursores para formação dos pigmentos oculares vermelhos e marrons) (Ewart *et al.*, 1994; Ewart e Howells, 1998).

Drosophila possui vários tipos de cinesinas que semelhante a mamíferos, são responsáveis pelo transporte anterógrado de diversos tipos de cargas (Saxton *et al.*, 1988; Endow e Hatsumi, 1991). A cinesina-73 é um exemplo de cinesina expressa em *Drosophila*, amplamente distribuída nos períodos iniciais de desenvolvimento embrionário que passa a estar restrita aos tecidos nervosos durante as outras fases do desenvolvimento (Li *et al.*, 1997). Estudos de Lupetti e colaboradores em 1998, apontaram a presença de dineínas em insetos, utilizando microscopia eletrônica para analisar a estrutura e mudanças conformacionais da dineína axonemal de espermatozóide do díptero *Monarthropalpus flavus*.

As miosinas também fazem parte da fisiologia de insetos e de fato a mosca de frutas (*Drosophila melanogaster*) possui 13 miosinas as quais pertencem a oito classes (a recente Myo29D, GenBank n° de acesso AAF52683, foi sugerida a pertencer a classe XX) (Tzolovsky *et al.*, 2002; Foth *et al.*, 2006) com genes de três miosinas da classe I (IA, IB e IC), duas da classe II (uma muscular e outra não-muscular), uma da classe III (ninaC - o primeiro membro da classe III foi descoberto em *Drosophila* - Montell e Rubin, 1988), uma única miosina da classe V, uma da classe VI (também o primeiro membro das miosinas da classe VI - Kellerman e Miller, 1992), duas da classe VII (VIIA e VIIB), uma da classe XV, uma da XVIII (PDZ) e a recente representante da classe XX, classificada recentemente como uma nova classe de miosinas específicas de insetos (Tzolovsky *et al.*, 2002). Esta classe inclui ainda membros de *D. melanogaster*, *Drosophila pseudoobscura* e do vetor do parasito da malária *Anopheles gambiae*, todos tendo a característica de possuir um único motivo IQ bem conservado no domínio pescoço (Foth *et al.*, 2006). Apesar do fato de que grande parte dessas miosinas ainda não ter sido purificada e caracterizada bioquimicamente, sabe-se que dentre suas funções estão regulação da morfologia celular (miosina VI – Lin *et al.*, 2007), manutenção da estrutura de borda-em-escova dos enterócitos (miosina IB – Hegan *et al.*, 2007), manutenção

do arranjo celular e arquitetura epitelial (miosina II não-muscular – Escudero *et al.*, 2007), desenvolvimento larval e diferenciação celular (miosina V – Mermall *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007), sensorial (miosina VIIA – Todi *et al.*, 2005) e movimentação das asas (miosina II muscular – Kronert *et al.*, 1995).

2. Referências Bibliográficas

Abrami, L.; Lindsay, M.; Parton, R. G.; Leppla, S. H. e Van Der Goot, F. G. Membrane insertion of anthrax protective antigen and cytoplasmic delivery of lethal factor occur at different stages of the endocytic pathway. **J Cell Biol** 166, (5), 645-51. 2004.

Albrecht, C.; Mcvey, J. H.; Elliott, J. I.; Sardini, A.; Kasza, I.; Mumford, A. D.; Naoumova, R. P.; Tuddenham, E. G.; Szabo, K. e Higgins, C. F. A novel missense mutation in ABCA1 results in altered protein trafficking and reduced phosphatidylserine translocation in a patient with Scott syndrome. **Blood** 106, (2), 542-9. 2005.

Aperia, A. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. **J Intern Med** 261, (1), 44-52. 2007.

Arden, S. D.; Puri, C.; Au, J. S.; Kendrick-Jones, J. e Buss, F. Myosin VI is required for targeted membrane transport during cytokinesis. **Mol Biol Cell** 18, (12), 4750-61. 2007.

Arguello, J. M.; Eren, E. e Gonzalez-Guerrero, M. The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. **Biometals** 20, (3-4), 233-48. 2007.

Atkinson, B.; Dwyer, K.; Enyoji, K. e Robson, S. C. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. **Blood Cells Mol Dis** 36, (2), 217-22. 2006.

Bachmann, B. J. Linkage map of Escherichia coli K¹², edition 8. **Microbiol Rev** 54, (2), 130-97. 1990.

Barylko, B.; Wagner, M. C.; Reizes, O. e Albanesi, J. P. Purification and characterization of a mammalian myosin I. **Proc Natl Acad Sci U S A** 89, (2), 490-4. 1992.

Baumann, O.; Walz, B.; Somlyo, A. V. e Somlyo, A. P. Electron probe microanalysis of calcium release and magnesium uptake by endoplasmic reticulum in bee photoreceptors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 88, (3), 741-4. 1991.

Beyenbach, K. W. e Wieczorek, H. The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. **J Exp Biol** 209, (Pt 4), 577-89. 2006.

Bloom, G. S.; Wagner, M. C.; Pfister, K. K. e Brady, S. T. Native structure and physical properties of bovine brain kinesin and identification of the ATP-binding subunit polypeptide. **Biochemistry** 27, (9), 3409¹⁶. 1988.

Bobe, R.; Bredoux, R.; Wuytack, F.; Quarck, R.; Kovacs, T.; Papp, B.; Corvazier, E.; Magnier, C. e Enouf, J. The rat platelet 97-kDa Ca²⁺ATPase isoform is the sarcoendoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase 3 protein. **J Biol Chem** 269, (2), 1417-24. 1994.

Boyer, P. D. The ATP synthase--a splendid molecular machine. **Annu Rev Biochem** 66, 717-49. 1997.

Brady, S. T. A novel brain ATPase with properties expected for the fast axonal transport motor. **Nature** 317, (6032), 73-5. 1985.

Brockhoff, S. E.; Stevens, R. C. e Davis, T. N. The unconventional myosin, Myo2p, is a calmodulin target at sites of cell growth in Saccharomyces cerevisiae. **J Cell Biol** 124, (3), 315-23. 1994.

- Brown, M. E. e Bridgman, P. C. Myosin Function in Nervous and Sensory Systems. **J Neurobiol** 58, 118⁻130. 2004.
- Cappello, G.; Pierobon, P.; Symonds, C.; Busoni, L.; Gebhardt, J. C.; Rief, M. e Prost, J. Myosin V stepping mechanism. **Proc Natl Acad Sci U S A** 104, (39), 15328-33. 2007.
- Carafoli, E. The Ca²⁺ pump of the plasma membrane. **J Biol Chem** 267, (4), 2115-8. 1992.
- Carafoli, E. Plasma membrane calcium pump: structure, function and relationships. **Basic Res Cardiol** 92 Suppl 1, 59-61. 1997.
- Caruso-Neves, C.; Meyer-Fernandes, J. R.; Saad-Nehme, J.; Proverbio, F.; Marin, R. e Lopes, A. G. Ouabain-insensitive Na(+)-ATPase activity of Malpighian tubules from *Rhodnius prolixus*. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol** 119, (4), 807⁻1. 1998.
- Chang, G. e Roth, C. B. Structure of MsbA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. **Science** 293, (5536), 1793-800. 2001.
- Christoforidis, S.; Papamarcaki, T.; Galaris, D.; Kellner, R. e Tsolas, O. Purification and properties of human placental ATP diphosphohydrolase. **Eur J Biochem** 234, (1), 66-74. 1995.
- Cohn, S. A.; Ingold, A. L. e Scholey, J. M. Correlation between the ATPase and microtubule translocating activities of sea urchin egg kinesin. **Nature** 328, (6126), 160-3. 1987.
- Cross, M.; Csar, X. F.; Wilson, N. J.; Manes, G.; Addona, T. A.; Marks, D. C.; Whitty, G. A.; Ashman, K. e Hamilton, J. A. A novel 110 kDa form of myosin XVIII

(MysPDZ) is tyrosine-phosphorylated after colony-stimulating factor¹ receptor signalling. **Biochem J** 380, (Pt 1), 243-53. 2004.

Dagenbach, E. M. e Endow, S. A. A new kinesin tree. **J Cell Sci** 117, (Pt 1), 3-7. 2004.

De Almeida-Amaral, E. E.; Caruso-Neves, C.; Pires, V. M. e Meyer-Fernandes, J. R. Leishmania amazonensis: characterization of an ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity. **Exp Parasitol** 118, (2), 165-71. 2008.

De Souza, A. M.; Batista, E. J.; Pinheiro, A. A.; Carvalhaes, M.; Lopes, A. G.; De Souza, W. e Caruso-Neves, C. Entamoeba histolytica: ouabain-insensitive Na(+)-ATPase activity. **Exp Parasitol** 117, (2), 195-200. 2007.

Dean, M. e Annilo, T. Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. **Annu Rev Genomics Hum Genet** 6, 123-42. 2005.

Dietz, K. J.; Tavakoli, N.; Kluge, C.; Mimura, T.; Sharma, S. S.; Harris, G. C.; Chardonens, A. N. e Golldack, D. Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. **J Exp Bot** 52, (363), 1969-80. 2001.

Dimroth, P.; Von Ballmoos, C. e Meier, T. Catalytic and mechanical cycles in F₁-ATP synthases. Fourth in the Cycles Review Series. **EMBO Rep** 7, (3), 276-82. 2006.

Dittrich, M.; Hayashi, S. e Schulten, K. On the mechanism of ATP hydrolysis in F₁-ATPase. **Biophys J** 85, (4), 2253-66. 2003.

Dombrowski, K. E.; Ke, Y.; Brewer, K. A. e Kapp, J. A. Ecto-ATPase: an activation marker necessary for effector cell function. **Immunol Rev** 161, 111-8. 1998.

Drory, O. e Nelson, N. The emerging structure of vacuolar ATPases. **Physiology (Bethesda)** 21, 317-25. 2006.

Ebel, R. E. e Lardy, H. A. Stimulation of rat liver mitochondrial adenosine triphosphatase by anions. **J Biol Chem** 250, (1), 191-6. 1975.

Edsall, J. T. Studies in the physical chemistry of muscle globulin. II. on some physicochemical properties of muscle globulin (myosin). **J Biol Chem** 89, (1), 289-313. 1930.

Edwards, F. A. e Gibb, A. J. ATP-a fast neurotransmitter. **FEBS Lett** 325, (1-2), 86-9. 1993.

Emery, A. M.; Billingsley, P. F.; Ready, P. D. e Djamgoz, M. B. Insect Na(+)/K(+)-ATPase. **J Insect Physiol** 44, (3-4), 197-210. 1998.

Emery, A. M.; Ready, P. D.; Billingsley, P. F. e Djamgoz, M. B. A single isoform of the Na⁺/K⁺-ATPase alpha-subunit in Diptera: evidence from characterization of the first extracellular domain. **Insect Mol Biol** 4, (3), 179-92. 1995.

Empson, R. M.; Garside, M. L. e Knopfel, T. Plasma membrane Ca²⁺ ATPase 2 contributes to short-term synapse plasticity at the parallel fiber to Purkinje neuron synapse. **J Neurosci** 27, (14), 3753-8. 2007.

Endow, S. A. e Hatsumi, M. A multimember kinesin gene family in Drosophila. **Proc Natl Acad Sci U S A** 88, (10), 4424-7. 1991.

Endow, S. A. e Waligora, K. W. Determinants of kinesin motor polarity. **Science** 281, (5380), 1200-2. 1998.

Escudero, L. M.; Bischoff, M. e Freeman, M. Myosin II regulates complex cellular arrangement and epithelial architecture in Drosophila. **Dev Cell** 13, (5), 717-29. 2007.

Espindola, F. S.; Espreafico, E. M.; Coelho, M. V.; Martins, A. R.; Costa, F. R. C.; Mooseker, M. S. e Larson, R. E. Biochemical and Immunological Characterization of p190-Calmodulin Complex from Vertebrate Brain: A Novel Calmodulin-binding Myosin. **J Cell Biol** 118, (2), 359-368. 1992.

Espreafico, E. M.; Cheney, R. E.; Matteoli, M.; Nascimento, P. V. C.; Larson, R. E. e Mooseker, M. S. Primary structure and cellular localisation of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional Myosin with calmodulin light chains. **J Cell Biol** 119, (6), 1541-1557. 1992.

Ewart, G. D.; Cannell, D.; Cox, G. B. e Howells, A. J. Mutational analysis of the traffic ATPase (ABC) transporters involved in uptake of eye pigment precursors in *Drosophila melanogaster*. Implications for structure-function relationships. **J Biol Chem** 269, (14), 10370-7. 1994.

Ewart, G. D. e Howells, A. J. ABC transporters involved in transport of eye pigment precursors in *Drosophila melanogaster*. **Methods Enzymol** 292, 213-24. 1998.

Fitzgerald, E.; Djamgoz, M. e Dunbar, S. Maintenance of the K⁺ activity gradient in insect muscle compared in diptera and lepidoptera: contributions of metabolic and exchanger mechanisms. **J Exp Biol** 199, (8), 1857-1872. 1996.

Foth, B. J.; Goedecke, M. C. e Soldati, D. New insights into myosin evolution and classification. **Proc Natl Acad Sci U S A** 103, (10), 3681-6. 2006.

Gibbons, I. R. Dynein ATPases as microtubule motors. **J Biol Chem** 263, (31), 15837-40. 1988.

Gillespie, P. G. Myosin I and adaptation of mechanical transduction by the inner ear. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 359, (1452), 1945-51. 2004.

Gilson, E.; Nikaido, H. e Hofnung, M. Sequence of the malK gene in E.coli K12. **Nucleic Acids Res** 10, (22), 7449-58. 1982.

Girolomoni, G.; Santantonio, M. L.; Pastore, S.; Bergstresser, P. R.; Giannetti, A. e Cruz, P. D., Jr. Epidermal Langerhans cells are resistant to the permeabilizing effects of extracellular ATP: in vitro evidence supporting a protective role of membrane ATPase. **J Invest Dermatol** 100, (3), 282-7. 1993.

Goodno, C. C. Inhibition of myosin ATPase by vanadate ion. **Proc Natl Acad Sci U S A** 76, (6), 2620-4. 1979.

Graf, R.; Harvey, W. R. e Wieczorek, H. Purification and properties of a cytosolic V1-ATPase. **J Biol Chem** 271, (34), 20908-13. 1996.

Graf, S. A.; Haigh, S. E.; Corson, E. D. e Shirihai, O. S. Targeting, import, and dimerization of a mammalian mitochondrial ATP binding cassette (ABC) transporter, ABCB10 (ABC-me). **J Biol Chem** 279, (41), 42954-63. 2004.

Greeb, J. e Shull, G. E. Molecular cloning of a third isoform of the calmodulin-sensitive plasma membrane Ca²⁺-transporting ATPase that is expressed predominantly in brain and skeletal muscle. **J Biol Chem** 264, (31), 18569-76. 1989.

Grinthal, A. e Guidotti, G. Substitution of His59 converts CD39 apyrase into an ADPase in a quaternary structure dependent manner. **Biochemistry** 39, (1), 9-16. 2000.

Gruenberg, J. e Van Der Goot, F. G. Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. **Nat Rev Mol Cell Biol** 7, (7), 495-504. 2006.

Gu, F. e Gruenberg, J. ARF1 regulates pH-dependent COP functions in the early endocytic pathway. **J Biol Chem** 275, (11), 8154-60. 2000.

Hakii, H.; Fujiki, H.; Suganuma, M.; Nakayasu, M.; Tahira, T.; Sugimura, T.; Scheuer, P. J. e Christensen, S. B. Thapsigargin, a histamine secretagogue, is a non-¹2-O-tetradecanoylphorbol-¹3-acetate (TPA) type tumor promoter in two-stage mouse skin carcinogenesis. **J Cancer Res Clin Oncol** 111, (3), 177-81. 1986.

Hansen, O. Interaction of cardiac glycosides with (Na⁺ + K⁺)-activated ATPase. A biochemical link to digitalis-induced inotropy. **Pharmacol Rev** 36, (3), 143-63. 1984.

Harvey, W. R.; Cioffi, M.; Dow, J. A. e Wolfersberger, M. G. Potassium ion transport ATPase in insect epithelia. **J Exp Biol** 106, 91-117. 1983.

Hasson, T.; Gillespie, P. G.; Garcia, J. A.; Macdonald, R. B.; Zhao, Y.; Yee, A. G.; Mooseker, M. S. e Corey, D. P. Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia. **J Cell Biol** 137, (6), 1287-307. 1997.

Hegan, P. S.; Mermall, V.; Tilney, L. G. e Mooseker, M. S. Roles for *Drosophila melanogaster* myosin IB in maintenance of enterocyte brush-border structure and resistance to the bacterial pathogen *Pseudomonas entomophila*. **Mol Biol Cell** 18, (11), 4625-36. 2007.

Hiesinger, P. R.; Fayyazuddin, A.; Mehta, S. Q.; Rosenmund, T.; Schulze, K. L.; Zhai, R. G.; Verstreken, P.; Cao, Y.; Zhou, Y.; Kunz, J. e Bellen, H. J. The v-ATPase V0 subunit a1 is required for a late step in synaptic vesicle exocytosis in *Drosophila*. **Cell** 121, (4), 607-20. 2005.

Higgins, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. **Annu Rev Cell Biol** 8, 67-113. 1992.

Hill, K. L. C. N. L. e Weisman, L. S. Actin and Myosin Function in Directed Vacuole Movement during Cell Division in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Cell Biol** 135, 1535-1549. 1996.

- Hirokawa, N. Kinesin and Dynein Superfamily Proteins and the Mechanism of Organelle Transport. **Science** 279, 519-526. 1998.
- Hirokawa, N.; Pfister, K. K.; Yorifuji, H.; Wagner, M. C.; Brady, S. T. e Bloom, G. S. Submolecular domains of bovine brain kinesin identified by electron microscopy and monoclonal antibody decoration. **Cell** 56, (5), 867-78. 1989.
- Hirokawa, N. e Takemura, R. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. **Nat Rev Neurosci** 6, (3), 201-14. 2005.
- Holleran, E. A.; Karki, S. e Holzbaur, E. L. The role of the dynactin complex in intracellular motility. **Int Rev Cytol** 182, 69-109. 1998.
- Holt, J. P.; Bottomly, K. e Mooseker, M. S. Assessment of myosin II, Va, VI and VIIa loss of function on endocytosis and endocytic vesicle motility in bone marrow-derived dendritic cells. **Cell Motil Cytoskeleton** 64, (10), 756-66. 2007.
- Hook, P. e Vallee, R. B. The dynein family at a glance. **J Cell Sci** 119, (Pt 21), 4369-71. 2006.
- Hori, M.; Eguchi, H.; Tsuchiya, M.; Hara, T.; Naganawa, H.; Tamamura, T. e Umezawa, H. An inhibitor of (Na⁺, K⁺)-ATPase produced by *Streptomyces pseudovenezuelae* MF722-02; purification and properties. **J Antibiot (Tokyo)** 35, (11), 1448-53. 1982.
- Hume, A. N.; Tarafder, A. K.; Ramalho, J. S.; Sviderskaya, E. V. e Seabra, M. C. A coiled-coil domain of melanophilin is essential for Myosin Va recruitment and melanosome transport in melanocytes. **Mol Biol Cell** 17, (11), 4720-35. 2006.
- Iizumi, K.; Mikami, Y.; Hashimoto, M.; Nara, T.; Hara, Y. e Aoki, T. Molecular cloning and characterization of ouabain-insensitive Na⁽⁺⁾-ATPase in the parasitic protist, *Trypanosoma cruzi*. **Biochim Biophys Acta** 1758, (6), 738-46. 2006.

Jacquemin, E. Progressive familial intrahepatic cholestasis. Genetic basis and treatment. **Clin Liver Dis** 4, (4), 753-63. 2000.

Jaisser, F.; Horisberger, J. D.; Geering, K. e Rossier, B. C. Mechanisms of urinary K⁺ and H⁺ excretion: primary structure and functional expression of a novel H,K-ATPase. **J Cell Biol** 123, (6 Pt 1), 1421-9. 1993.

Jansonius, N. M. Properties of the sodium pump in the blowfly photoreceptor cell. **J Comp Physiol [A]** 167, (4), 461-467. 1990.

Kachar, B.; Albanesi, J. P.; Fujisaki, H. e Korn, E. D. Extensive purification from *Acanthamoeba castellanii* of a microtubule-dependent translocator with microtubule-activated Mg²⁺-ATPase activity. **J Biol Chem** 262, (33), 16180-5. 1987.

Kamijo, K.; Taketani, S.; Yokota, S.; Osumi, T. e Hashimoto, T. The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily. **J Biol Chem** 265, (8), 4534-40. 1990.

Kegel, B.; Braun, N.; Heine, P.; Maliszewski, C. R. e Zimmermann, H. An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. **Neuropharmacol** 36, (9), 1189-200. 1997.

Kellerman, K. A. e Miller, K. G. An unconventional myosin heavy chain gene from *Drosophila melanogaster*. **J Cell Biol** 119, (4), 823-34. 1992.

Kemp, P. J.; Roberts, G. C. e Boyd, C. A. Identification and properties of pathways for K⁺ transport in guinea-pig and rat alveolar epithelial type II cells. **J Physiol** 476, (1), 79-88. 1994.

Kettner, C.; Obermeyer, G. e Bertl, A. Inhibition of the yeast V-type ATPase by cytosolic ADP. **FEBS Lett** 535, (1-3), 119-24. 2003.

Kijima, Y.; Ogunbunmi, E. e Fleischer, S. Drug action of thapsigargin on the Ca²⁺ pump protein of sarcoplasmic reticulum. **J Biol Chem** 266, (34), 22912-8. 1991.

Kinosita, K., Jr.; Adachi, K. e Itoh, H. Rotation of F1-ATPase: how an ATP-driven molecular machine may work. **Annu Rev Biophys Biomol Struct** 33, 245-68. 2004.

Klein, U. The insect V-ATPase, a plasma membrane proton pump energizing secondary active transport: immunological evidence for the occurrence of a V-ATPase in insect ion-transporting epithelia. **J Exp Biol** 172, (Pt 1), 345-54. 1992.

Komoszynski, M. e Wojtczak, A. Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. **Biochim Biophys Acta** 1310, (2), 233-41. 1996.

Krendel, M. e Mooseker, M. S. Myosins: Tails (and Heads) of Functional Diversity. **Physiology** 20, 239-51. 2005.

Kronert, W. A.; O'donnell, P. T.; Fieck, A.; Lawn, A.; Vigoreaux, J. O.; Sparrow, J. C. e Bernstein, S. I. Defects in the Drosophila myosin rod permit sarcomere assembly but cause flight muscle degeneration. **J Mol Biol** 249, (1), 111-25. 1995.

Kuhlbrandt, W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. **Nat Rev Mol Cell Biol** 5, (4), 282-95. 2004.

Kukulski, F. e Komoszynski, M. Purification and characterization of NTPDase1 (ecto-apyrase) and NTPDase2 (ecto-ATPase) from porcine brain cortex synaptosomes. **Eur J Biochem** 270, (16), 3447-54. 2003.

Larson, R. E.; Pitta, D. E. e Ferro, J. A. A novel 190 kDa calmodulin-binding protein associated with brain actomyosin. **Braz J Med Biol Res** 21, (2), 213-7. 1988.

Lawson, C.; Dorval, V.; Goupil, S. e Leclerc, P. Identification and localisation of SERCA 2 isoforms in mammalian sperm. **Mol Hum Reprod** 13, (5), 307-16. 2007.

Lebel, D.; Poirier, G. G.; Phaneuf, S.; St-Jean, P.; Laliberte, J. F. e Beaudoin, A. R. Characterization and purification of a calcium-sensitive ATP diphosphohydrolase from pig pancreas. **J Biol Chem** 255, (3), 1227-33. 1980.

Lebovitz, R. M.; Takeyasu, K. e Fambrough, D. M. Molecular characterization and expression of the (Na⁺ + K⁺)-ATPase alpha-subunit in *Drosophila melanogaster*. **EMBO J** 8, (1), 193-202. 1989.

Levenson, R. Isoforms of the Na,K-ATPase: family members in search of function. **Rev Physiol Biochem Pharmacol** 123, 1-45. 1994.

Levy, J. R. e Holzbaur, E. L. Cytoplasmic dynein/dynactin function and dysfunction in motor neurons. **Int J Dev Neurosci** 24, (2-3), 103-11. 2006.

Li, B. X.; Satoh, A. K. e Ready, D. F. Myosin V, Rab11, and dRip11 direct apical secretion and cellular morphogenesis in developing *Drosophila* photoreceptors. **J Cell Biol** 177, (4), 659-69. 2007.

Li, H. P.; Liu, Z. M. e Nirenberg, M. Kinesin-73 in the nervous system of *Drosophila* embryos. **Proc Natl Acad Sci U S A** 94, (4), 1086-91. 1997.

Lin, H. P.; Chen, H. M.; Wei, S. Y.; Chen, L. Y.; Chang, L. H.; Sun, Y. J.; Huang, S. Y. e Hsu, J. C. Cell adhesion molecule Echinoid associates with unconventional myosin VI/Jaguar motor to regulate cell morphology during dorsal closure in *Drosophila*. **Dev Biol** 311, (2), 423-33. 2007.

Lingrel, J. B. e Kuntzweiler, T. Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. **J Biol Chem** 269, (31), 19659-62. 1994.

Linton, K. J. Structure and function of ABC transporters. **Physiology (Bethesda)** 22, 122-30. 2007.

Liu, L. H.; Paul, R. J.; Sutliff, R. L.; Miller, M. L.; Lorenz, J. N.; Pun, R. Y.; Duffy, J. J.; Doetschman, T.; Kimura, Y.; MacLennan, D. H.; Hoying, J. B. e Shull, G. E. Defective endothelium-dependent relaxation of vascular smooth muscle and endothelial cell Ca²⁺ signaling in mice lacking sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 3. **J Biol Chem** 272, (48), 30538-45. 1997.

Loo, T. W. e Clarke, D. M. P-glycoprotein. Associations between domains and between domains and molecular chaperones. **J Biol Chem** 270, (37), 21839-44. 1995.

Lunardi, J.; Dupuis, A.; Garin, J.; Issartel, J. P.; Michel, L.; Chabre, M. e Vignais, P. V. Inhibition of H⁺-transporting ATPase by formation of a tight nucleoside diphosphate-fluoroaluminate complex at the catalytic site. **Proc Natl Acad Sci U S A** 85, (23), 8958-62. 1988.

Lupetti, P.; Mencarelli, C.; Rosetto, M.; Heuser, J. E. e Dallai, R. Structural and molecular characterization of dynein in a gall-midge insect having motile sperm with only the outer arm. **Cell Motil Cytoskeleton** 39, (4), 303⁻¹⁷. 1998.

Lutsenko, S. e Kaplan, J. H. Organization of P-type ATPases: significance of structural diversity. **Biochemistry** 34, (48), 15607⁻¹³. 1995.

Lytton, J.; Westlin, M. e Hanley, M. R. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. **J Biol Chem** 266, (26), 17067-71. 1991.

Macvicker, J. A. K.; Billingsley, P. F.; Djamgoz, M. B. A. e Harrow, I. D. Ouabain-sensitive Na⁺/K⁺-ATPase activity in the reservoir zone of the midgut of *Stomoxys calcitrans* (diptera: muscidae). **Insect Biochem Mol Biol** 24, (2), 151-59. 1994.

Magyar, A.; Bakos, E. e Varadi, A. Structure and tissue-specific expression of the *Drosophila melanogaster* organellar-type Ca²⁺-ATPase gene. **Biochem J** 310 (Pt 3), 757-63. 1995.

Mandelkow, E. e Hoenger, A. Structures of kinesin and kinesin-microtubule interactions. **Curr Opin Cell Biol** 11, (1), 34-44. 1999.

Marcus, A. J. e Safier, L. B. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. **FASEB J** 7, (6), 516-22. 1993.

Martin, V.; Bredoux, R.; Corvazier, E.; Van Gorp, R.; Kovacs, T.; Gelebart, P. e Enouf, J. Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 3 isoforms. Expression, regulation, and function of the membranes of the SERCA3 family. **J Biol Chem** 277, (27), 24442-52. 2002.

Martinez-Mir, A.; Paloma, E.; Allikmets, R.; Ayuso, C.; Del Rio, T.; Dean, M.; Vilageliu, L.; Gonzalez-Duarte, R. e Balcells, S. Retinitis pigmentosa caused by a homozygous mutation in the Stargardt disease gene ABCR. **Nat Genet** 18, (1), 11-2. 1998.

Maruta, H. e Korn, E. D. Acanthamoeba myosin II. **J Biol Chem** 252, 6501-09. 1977.

Mathiopoulos, C.; Mueller, J. P.; Slack, F. J.; Murphy, C. G.; Patankar, S.; Bukusoglu, G. e Sonenshein, A. L. A *Bacillus subtilis* dipeptide transport system expressed early during sporulation. **Mol Microbiol** 5, (8), 1903-13. 1991.

Maxfield, F. R. e McGraw, T. E. Endocytic recycling. **Nat Rev Mol Cell Biol** 5, (2), 121-32. 2004.

Mendoza, J. L. e Thomas, P. J. Building an understanding of cystic fibrosis on the foundation of ABC transporter structures. **J Bioenerg Biomembr** 39, (5-6), 499-505. 2007.

Mermall, V.; Bonafe, N.; Jones, L.; Sellers, J. R.; Cooley, L. e Mooseker, M. S. Drosophila myosin V is required for larval development and spermatid individualization. **Dev Biol** 286, (1), 238-55. 2005.

Meyer-Fernandes, J. R. Ecto-ATPases in protozoa parasites: looking for a function. **Parasitol Int** 51, (3), 299-303. 2002.

Meyerhof, O. e Ohlmeyer, P. Purification of adenosinetriphosphatase of yeast. **J Biol Chem** 195, (1), 11-7. 1952.

Miki, H.; Okada, Y. e Hirokawa, N. Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. **Trends Cell Biol** 15, (9), 467-76. 2005.

Montell, C. e Rubin, G. M. The Drosophila ninaC locus encodes two photoreceptor cell specific proteins with domains homologous to protein kinases and the myosin heavy chain head. **Cell** 52, (5), 757-72. 1988.

Moodie, F. D.; Baum, H.; Butterworth, P. J. e Peters, T. J. Purification and characterisation of bovine spleen ADPase. **Eur J Biochem** 202, (3), 1209¹⁵. 1991.

Morin, N. A.; Oakes, P. W.; Hyun, Y. M.; Lee, D.; Chin, E. Y.; King, M. R.; Springer, T. A.; Shimaoka, M.; Tang, J. X.; Reichner, J. S. e Kim, M. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mediates integrin LFA⁻¹ de-adhesion during T lymphocyte migration. **J Exp Med** 205, (1), 195-205. 2008.

Müller, R. T. H. U. R. J. e Bähler, M. The Rat Myosin myr 5 Is a GTPase-activating Protein for Rho In Vivo: Essential Role of Arginine 1695. **Mol Biol Cell** 8, 2039-53. 1997.

Mulvihill, D. P.; Pollard, P. J.; Win, T. Z. e Hyams, J. S. Myosin V-mediated vacuole distribution and fusion in fission yeast. **Curr Biol** 11, (14), 1124-7. 2001.

Myers, D. K. e Slater, E. C. The enzymic hydrolysis of adenosine triphosphate by liver mitochondria. 2. Effect of inhibitors and added cofactors. **Biochem J** 67, (4), 572-8. 1957.

Nascimento, A. A. C.; Cheney, R. E.; Tauhata, S. B. F.; Larson, R. E. e Mooseker, M. S. Enzymatic Characterization and Functional Domain Mapping of Brain Myosin-V. **J Biol Chem** 271, (29), 17561-9. 1996.

Neumann, L.; Abele, R. e Tampe, R. Thermodynamics of peptide binding to the transporter associated with antigen processing (TAP). **J Mol Biol** 324, (5), 965-73. 2002.

Nishi, T. e Forgac, M. The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. **Nat Rev Mol Cell Biol** 3, (2), 94⁻¹03. 2002.

Novak, K. D. e Titus, M. A. Myosin I Overexpression Impairs Cell Migration. **J. Cell Biol.** 136, (3), 633-47. 1997.

O'connell, C. B.; Tyska, M. J. e Mooseker, M. S. Myosin at work: motor adaptations for a variety of cellular functions. **Biochim Biophys Acta** 1773, (5), 615-30. 2007.

Oiwa, K. e Sakakibara, H. Recent progress in dynein structure and mechanism. **Curr Opin Cell Biol** 17, (1), 98⁻¹03. 2005.

Palmgren, M. G. PLANT PLASMA MEMBRANE H⁺-ATPases: Powerhouses for Nutrient Uptake. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 52, 817-45. 2001.

Paschal, B. M. e Vallee, R. B. Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C. **Nature** 330, (6144), 181-3. 1987.

Pedersen, P. L. Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. **J Bioenerg Biomembr** 39, (5-6), 349-55. 2007.

Pedersen, P. L. e Carafoli, E. Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. **TIBS** 12, 146-50. 1987a.

Pedersen, P. L. e Carafoli, E. Ion motive ATPases. II. Energy coupling and work output. **TIBS** 12, 186-9. 1987b.

Periasamy, M.; Bhupathy, P. e Babu, G. J. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. **Cardiovasc Res** 77, (2), 265-73. 2008.

Peters, C.; Bayer, M. J.; Buhler, S.; Andersen, J. S.; Mann, M. e Mayer, A. Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. **Nature** 409, (6820), 581-8. 2001.

Picher, M.; Cote, Y. P.; Beliveau, R.; Potier, M. e Beaudoin, A. R. Demonstration of a novel type of ATP-diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in the bovine lung. **J Biol Chem** 268, (7), 4699-703. 1993.

Plesner, L. Ecto-ATPases: identities and functions. **Int Rev Cytol** 158, 141-214. 1995.

Powis, S. H.; Mockridge, I.; Kelly, A.; Kerr, L. A.; Glynne, R.; Gileadi, U.; Beck, S. e Trowsdale, J. Polymorphism in a second ABC transporter gene located within the class II region of the human major histocompatibility complex. **Proc Natl Acad Sci U S A** 89, (4), 1463-7. 1992.

Pratt, M. M. Stable complexes of axoplasmic vesicles and microtubules: protein composition and ATPase activity. **J Cell Biol** 103, (3), 957-68. 1986.

Pressley, T. A. Structure and function of the Na,K pump: ten years of molecular biology. **Miner Electrolyte Metab** 22, (5-6), 264-71. 1996.

Qi, J.; Wang, Y. e Forgac, M. The vacuolar (H⁺)-ATPase: subunit arrangement and in vivo regulation. **J Bioenerg Biomembr** 39, (5-6), 423-6. 2007.

Redowicz, M. J. Unconventional myosins in muscle. **Eur J Cell Biol** 86, (9), 549-58. 2007.

Reeves, S. A. e Yamanaka, M. K. Cloning and sequence analysis of the alpha subunit of the cat flea sodium pump. **Insect Biochem Mol Biol** 23, (7), 809-14. 1993.

Rengel, Z. Handbook of Plant Growth: PH as the Master Variable: **CRC Press**, v.86. 2002. 472 p. (Books in Soils, Plants, and the Environment)

Rhoden, K. J.; Tallini, G. e Douglas, J. S. H⁺-K⁺ ATPase inhibitors cause relaxation of guinea pig and human airway smooth muscle in vitro. **J Pharmacol Exp Ther** 276, (3), 897-903. 1996.

Richards, T. A. e Cavalier-Smith, T. Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. **Nature** 436, (7054), 1113-8. 2005.

Robson, S. C.; Sevigny, J. e Zimmermann, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signal** 2, (2), 409-30. 2006.

Rogers, S.; Wells, R. e Rechsteiner, M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. **Science** 234, (4774), 364-8. 1986.

Rosenberg, M. F.; Callaghan, R.; Ford, R. C. e Higgins, C. F. Structure of the multidrug resistance P-glycoprotein to 2.5 nm resolution determined by electron microscopy and image analysis. **J Biol Chem** 272, (16), 10685-94. 1997.

Sachs, G.; Chang, H. H.; Rabon, E.; Schackman, R.; Lewin, M. e Saccomani, G. A nonelectrogenic H⁺ pump in plasma membranes of hog stomach. **J Biol Chem** 251, (23), 7690-8. 1976.

Saxton, W. M.; Porter, M. E.; Cohn, S. A.; Scholey, J. M.; Raff, E. C. e McIntosh, J. R. Drosophila kinesin: characterization of microtubule motility and ATPase. **Proc Natl Acad Sci U S A** 85, (4), 1109-13. 1988.

Scarborough, G. A. Structure and function of the P-type ATPases. **Curr Opin Cell Biol** 11, (4), 517-22. 1999.

Schliwa, M. e Woehlke, G. Molecular motors. **Nature** 422, 759-765. 2003.

Schnapp, B. J.; Vale, R. D.; Sheetz, M. P. e Reese, T. S. Single microtubules from squid axoplasm support bidirectional movement of organelles. **Cell** 40, (2), 455-62. 1985.

Senoune, S. R.; Bakunts, K.; Martinez, G. M.; Chua-Tuan, J. L.; Kebir, Y.; Attaya, M. N. e Martinez-Zaguilan, R. Vacuolar H⁺-ATPase in human breast cancer cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. **Am J Physiol Cell Physiol** 286, (6), C1443-52. 2004.

Sharp, D. J.; Rogers, G. C. e Scholey, J. M. Microtubule motors in mitosis. **Nature** 407, (6800), 41-7. 2000.

Shirihai, O. S.; Gregory, T.; Yu, C.; Orkin, S. H. e Weiss, M. J. ABC-me: a novel mitochondrial transporter induced by GATA¹ during erythroid differentiation. **EMBO J** 19, (11), 2492-502. 2000.

Shpetner, H. S.; Paschal, B. M. e Vallee, R. B. Characterization of the microtubule-activated ATPase of brain cytoplasmic dynein (MAP 1C). **J Cell Biol** 107, (3), 1001-9. 1988.

Skou, J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. **Biochim Biophys Acta** 23, (2), 394-401. 1957.

Skou, J. C. Nobel Lecture. The identification of the sodium pump. **Biosci Rep** 18, (4), 155-69. 1998.

Skou, J. C. e Esmann, M. The Na,K-ATPase. **J Bioenerg Biomembr** 24, (3), 249-61. 1992.

Smith, A. N.; Boulnois, G. J. e Roberts, I. S. Molecular analysis of the Escherichia coli K5 kps locus: identification and characterization of an inner-membrane capsular polysaccharide transport system. **Mol Microbiol** 4, (11), 1863-9. 1990.

Sokac, A. M. e Bement, W. M. Regulation and expression of metazoan unconventional myosins. **Int Rev Cytol** 200, 197-304. 2000.

Stahl, W. L. e Baskin, D. G. Histochemistry of ATPases. **J Histochem Cytochem** 38, (8), 1099-122. 1990.

Steinberg, G. The cellular roles of molecular motors in fungi. **Trends Microbiol** 8, (4), 162-8. 2000.

Stevens, T. H. e Forgac, M. Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase. **Annu Rev Cell Dev Biol** 13, 779-808. 1997.

Strehler, E. E.; Filoteo, A. G.; Penniston, J. T. e Caride, A. J. Plasma-membrane Ca²⁺ pumps: structural diversity as the basis for functional versatility. **Biochem Soc Trans** 35, (Pt 5), 919-22. 2007.

Tabcharani, J. A.; Chang, X. B.; Riordan, J. R. e Hanrahan, J. W. Phosphorylation-regulated Cl⁻ channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. **Nature** 352, (6336), 628-31. 1991.

Thangarajah, H.; Wong, A.; Chow, D. C.; Crothers, J. M., Jr. e Forte, J. G. Gastric H-K-ATPase and acid-resistant surface proteins. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 282, (6), G953-61. 2002.

Thastrup, O.; Cullen, P. J.; Drobak, B. K.; Hanley, M. R. e Dawson, A. P. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca²⁺ stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase. **Proc Natl Acad Sci U S A** 87, (7), 2466-70. 1990.

Titus, M. A. A conserved role for myosin VII in adhesion. **Novartis Found Symp** 269, 16-24; discussion 24-34, 223-30. 2005.

Todi, S. V.; Franke, J. D.; Kiehart, D. P. e Eberl, D. F. Myosin VIIA defects, which underlie the Usher 1B syndrome in humans, lead to deafness in *Drosophila*. **Curr Biol** 15, (9), 862-8. 2005.

Toyomura, T.; Murata, Y.; Yamamoto, A.; Oka, T.; Sun-Wada, G. H.; Wada, Y. e Futai, M. From lysosomes to the plasma membrane: localization of vacuolar-type H⁺-ATPase with the $\alpha 3$ isoform during osteoclast differentiation. **J Biol Chem** 278, (24), 22023-30. 2003.

Trybus, K. M. Myosin V from head to tail. **Cell Mol Life Sci** 65, (9), 1378-89. 2008.

Tupling, R.; Green, H.; Senisterra, G.; Lepock, J. e Mckee, N. Ischemia-induced structural change in SR Ca²⁺-ATPase is associated with reduced enzyme activity in rat muscle. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 281, (5), R1681-8. 2001.

Tuxworth, R. I.; Wessels, D.; Addicks, G. C.; Soll, D. R.; Gerisch, G. e Titus, M. A. A role for myosin VII in dynamic cell adhesion. **Current Biology** 11, 318-329. 2001.

Tzolovsky, G.; Millo, H.; Pathirana, S.; Wood, T. e Bownes, M. Identification and phylogenetic analysis of *Drosophila melanogaster* myosins. **Mol Biol Evol** 19, (7), 1041-52. 2002.

Uyeda, T. Q. e Nagasaki, A. Variations on a theme: the many modes of cytokinesis. **Curr. Opin. Cell Biol.** 16, 1-6. 2004.

Vale, R. D. The Molecular Motor Toolbox for Intracellular Transport. **Cell** 112, 467-80. 2003.

Vale, R. D.; Reese, T. S. e Sheetz, M. P. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. **Cell** 42, (1), 39-50. 1985.

Vallee, R. B.; Williams, J. C.; Varma, D. e Barnhart, L. E. Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. **J Neurobiol** 58, (2), 189-200. 2004.

Varadi; Tsuboi, T. e Utter, G. A. Myosin Va Transports Dense Core Secretory Vesicles in Pancreatic MIN6-Cells. **Mol Biol Cell** 16, 2670-80. 2005.

Vasilyeva, E. A.; Fitin, A. F.; Minkov, I. B. e Vinogradov, A. D. Kinetics of interaction of adenosine diphosphate and adenosine triphosphate with adenosine triphosphatase of bovine heart submitochondrial particles. **Biochem J** 188, (3), 807-15. 1980.

Vasilyeva, E. A.; Minkov, I. B.; Fitin, A. F. e Vinogradov, A. D. Kinetic mechanism of mitochondrial adenosine triphosphatase. ADP-specific inhibition as revealed by the steady-state kinetics. **Biochem J** 202, (1), 9-14. 1982a.

Vasilyeva, E. A.; Minkov, I. B.; Fitin, A. F. e Vinogradov, A. D. Kinetic mechanism of mitochondrial adenosine triphosphatase. Inhibition by azide and activation by sulphite. **Biochem J** 202, (1), 15-23. 1982b.

Vazquez-Martinez, O.; Canedo-Merino, R.; Diaz-Munoz, M. e Riesgo-Escovar, J. R. Biochemical characterization, distribution and phylogenetic analysis of *Drosophila melanogaster* ryanodine and IP3 receptors, and thapsigargin-sensitive Ca²⁺ ATPase. **J Cell Sci** 116, (Pt 12), 2483-94. 2003.

Venkstern, T. V. e Engel'gardt, V. A. Adenosine-polyphosphatase of surfaces of nuclear erythrocytes. **Dokl Akad Nauk SSSR** 102, (1), 133-6. 1955.

Verma, A. K.; Filoteo, A. G.; Stanford, D. R.; Wieben, E. D.; Penniston, J. T.; Strehler, E. E.; Fischer, R.; Heim, R.; Vogel, G.; Mathews, S. e Et al. Complete primary structure of a human plasma membrane Ca²⁺ pump. **J Biol Chem** 263, (28), 14152-9. 1988.

Wagner, C. A.; Finberg, K. E.; Breton, S.; Marshansky, V.; Brown, D. e Geibel, J. P. Renal vacuolar H⁺-ATPase. **Physiol Rev** 84, (4), 1263-314. 2004.

Walker, J. E.; Saraste, M. e Gay, N. J. The unc operon. Nucleotide sequence, regulation and structure of ATP-synthase. **Biochim Biophys Acta** 768, (2), 164-200. 1984.

Weber, J. e Senior, A. E. Catalytic mechanism of F1-ATPase. **Biochim Biophys Acta** 1319, (1), 19-58. 1997.

Wheeler, K. P. e Whittam, R. Some properties of a kidney adenosine triphosphatase relevant to active cation transport. **Biochem J** 85, 495-507. 1962.

Wieczorek, H. The insect V-ATPase, a plasma membrane proton pump energizing secondary active transport: molecular analysis of electrogenic potassium transport in the tobacco hornworm midgut. **J Exp Biol** 172, 335-43. 1992.

Wieczorek, H.; Grber, G.; Harvey, W. R.; Huss, M.; Merzendorfer, H. e Zeiske, W. Structure and regulation of insect plasma membrane H⁽⁺⁾V-ATPase. **J Exp Biol** 203, (Pt 1), 127-35. 2000.

Williams, L. E. e Mills, R. F. P(1B)-ATPases--an ancient family of transition metal pumps with diverse functions in plants. **Trends Plant Sci** 10, (10), 491-502. 2005.

Wingo, C. S. Active proton secretion and potassium absorption in the rabbit outer medullary collecting duct. Functional evidence for proton-potassium-activated adenosine triphosphatase. **J Clin Invest** 84, (1), 361-5. 1989.

Wu, K. D.; Lee, W. S.; Wey, J.; Bungard, D. e Lytton, J. Localization and quantification of endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoform transcripts. **Am J Physiol Cell Physiol** 269, (3), C775-784. 1995.

Wuytack, F.; Raeymaekers, L.; De Smedt, H.; Eggermont, J. A.; Missiaen, L.; Van Den Bosch, L.; De Jaegere, S.; Verboomen, H.; Plessers, L. e Casteels, R. Ca(2+)-transport ATPases and their regulation in muscle and brain. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 671, (1), 82-91. 1992.

Yagi, K.; Shinbo, M.; Hashizume, M.; Shimba, L. S.; Kurimura, S. e Miura, Y. ATP diphosphohydrolase is responsible for ecto-ATPase and ecto-ADPase activities in bovine aorta endothelial and smooth muscle cells. **Biochem Biophys Res Commun** 180, (3), 1200-6. 1991.

Yamamoto, K.; Hamada, S. e Kashiyama, T. Myosins from plants. **Cell Mol Life Sci** 56, (3-4), 227-32. 1999.

Yi, F. X.; Sun, P.; Huang, S. L.; Liu, W. L. e Guo, Z. G. Characteristics of apyrase (EC 3.6.1.5) on cultured bovine endocardial endothelial cells. **Sheng Li Xue Bao** 51, (4), 425-9. 1999.

Yildiz, A.; Forkey, J. N.; Mckinney, S. A.; Ha, T.; Goldman, Y. E. e Selvin, P. R. Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. **Science** 300, (5628), 2061-5. 2003.

Zumft, W. G.; Viebrock-Sambale, A. e Braun, C. Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. Genes for copper-processing and properties of the deduced products, including a new member of the family of ATP/GTP-binding proteins. **Eur J Biochem** 192, (3), 591-9. 1990.

**Capítulo 2: Fundamentação teórica – *Orbignya* sp e
*Pachymerus nucleorum***

1. Palmeira babaçu

A palmeira babaçu (*Orbignya phalerata* Martius, *O. martiana* Barbosa Rodrigues, *O. barbosiana* Burret e *O. oleifera* Burret) é um dos principais recursos oleíferos nativos do mundo e tem papel essencial na vida econômica de milhares de pessoas, principalmente, nas regiões norte, nordeste e central do país (Figura 1) (May *et al.*, 1985). Atualmente, no Brasil, encontram-se vastos babaçuais espalhados ao sul da bacia amazônica, onde a floresta úmida cede lugar à vegetação típica dos cerrados (Figura 2). São os Estados do Maranhão, Piauí e Tocantins que concentram as maiores extensões de matas onde predominam os babaçus, formando, muitas vezes e espontaneamente, agrupamentos homogêneos, bastante densos e escuros, tal a proximidade entre os grandes coqueiros (Biodieselbr, 2008). Minas Gerais, na região Sudeste, merece citação por ser o único estado fora das regiões citadas que possui área expressiva coberta com babaçu (EMBRAPA, 1984). O gênero *Orbignya* ocorre em outros países das Américas, do México para o sul onde se destacam os babaçuais Bolivianos presentes de Santa Cruz de La Sierra às fronteiras com os estados brasileiros do Acre e Rondônia (EMBRAPA, 1984).

O fruto inteiro da palmeira pesa de 40 a 450 gramas (Figura 3) e tem de 12 a 15% de seu peso total constituído pelo epicarpo (fibroso), cerca de 20% do peso composto pelo mesocarpo, a maior parte (aproximadamente 60%) é constituída pelo endocarpo e 6 a 8% composto pelas amêndoas (May *et al.*, 1985; Pinheiro e Frazão, 1995; Baruque Filho *et al.*, 2000). O principal produto extraído do babaçu, e que possui valor mercantil e industrial, são as amêndoas contidas em seus frutos. Estas amêndoas estão presentes em quantidade de 3 a 5 em cada fruto e concentram altos teores de óleos e gorduras de aplicação alimentícia ou industrial, principalmente para a produção de óleo cru e potencial produção de biodiesel (Lima *et al.*, 2007). O coco babaçu é coletado e quebrado de forma manual em um sistema caseiro tradicional e de subsistência, e então segregado e transportado por uma rede total que envolve quase 2 milhões de pessoas, cobre 9,57 milhões de hectares e tem um potencial de cerca de 10,6 bilhões de toneladas de frutos por ano (Teixeira e Carvalho, 2007).

O óleo retirado das amêndoas do babaçu perfaz cerca de 60-70% de toda amêndoa (Salunkhe *et al.*, 1992). Este óleo retirado das amêndoas é composto de

não menos que oito diferentes ácidos graxos, dos quais se destacam o ácido láurico (C12:0) com 44% do total de ácidos graxos, o ácido mirístico (C14:0) com 17% e o ácido oléico (C18:1) com 14% (Lima *et al.*, 2007). As amêndoas possuem também por volta de 23% de proteínas, com composição balanceada de aminoácidos essenciais. Após a retirada do óleo, a massa protéica resultante dessas amêndoas é adequada para alimentação ou suplementação animal (Salunkhe *et al.*, 1992).

O babaçu tem sido muito utilizado também em estudos que buscam atribuir utilidade medicinal a esta planta, baseados na cultura da medicina popular, muito utilizada nas regiões norte e nordeste do Brasil. O babaçu apresenta algumas propriedades antiinflamatórias e analgésicas já comprovadas (Silva e Parente, 2001), e tem seu uso popular indicado nos tratamentos de dores menstruais, úlceras, tumores, reumatismo, leucemia, constipação intestinal, colite e obesidade (Batista *et al.*, 2006). Em um trabalho pioneiro, Moraes e colaboradores (1997) estudaram o efeito do extrato hidroalcolico de 72 plantas nativas do nordeste brasileiro, encontrando 10 plantas com potencial para inibição tumoral, dentre elas o babaçu com 59% de inibição de carcinoma de Ehrlich. Outros estudos recentes buscam comprovar a ação do babaçu no auxílio da cicatrização do estômago (Batista *et al.*, 2006), da bexiga (Ferreira *et al.*, 2006), de cólon (Baldez *et al.*, 2006), da pele (Amorin *et al.*, 2006), da linha Alba (Brito Filho *et al.*, 2006) e na ativação de macrófagos (Nascimento *et al.*, 2006).

Mesmo com baixa importância econômica, todos os outros componentes do babaçu têm utilidade para a economia de subsistência de regiões pobres do Brasil. Suas folhas servem de matéria-prima para a fabricação de cestos, peneiras, cercas, janelas, portas, armadilhas, gaiolas e como matéria-prima fundamental na armação e cobertura de casas e abrigos. Das palmeiras jovens, quando derrubadas, extrai-se o palmito e coleta-se uma seiva que, fermentada, produz um vinho bastante apreciado nas regiões norte e nordeste do Brasil (Simmons, 1943; Biodieselbr, 2008). A casca do coco (endocarpo) possui densidade de 1,27 g/cm³, muito alta comparada a outras espécies de madeira, e baixo conteúdo de enxofre, fazendo com que seja um substituto satisfatório na produção do carvão usado na metalurgia (coque) que muitas vezes é produzido de florestas nativas (Emmerich e Luengo, 1996).

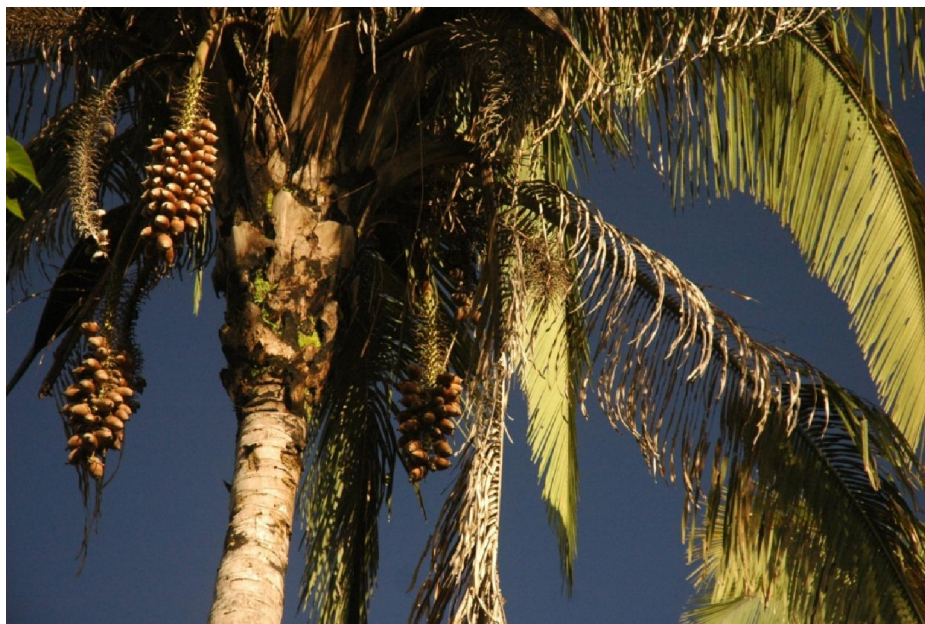


Figura 1: Foto da palmeira babaçu

Palmeira imponente que pode atingir até 20 m de altura. Estipe característico por apresentar em seu ápice restos das folhas velhas que já caíram. Possui folhas arqueadas de até 8 m de comprimento. Cada palmeira pode apresentar até seis cachos, surgindo de janeiro a abril. Fonte: Site Biodieselbr (Biodieselbr, 2008)

Apesar da vasta extensão de produtos da palmeira de babaçu, nenhuma atividade econômica ligada ao babaçu parece ser tão prospectiva quanto a produção de biodiesel. O processo de transformação de óleos vegetais no chamado biodiesel (uma alternativa natural ao combustível fóssil diesel) envolve a conversão de triacilgliceróis em ésteres de metil ou etil através da transesterificação que reduz a massa molecular, reduz a viscosidade e aumenta a volatilidade, produzindo óleos com cerca de $10^{-11}\%$ de oxigênio (w/w) ótimos para combustão em motores (Barnwal e Sharma, 2005). O óleo de babaçu, devido a sua composição predominantemente láurica, possui características excelentes para produção de biodiesel. O conteúdo de ácido láurico facilita a reação de transesterificação, pois os ésteres láuricos são compostos de cadeias relativamente curtas frente a outras matérias primas do biodiesel, tornando a interação mais eficaz e efetiva com o agente transesterificante e com o catalisador, de modo a se obter um produto, biodiesel, de excelentes características físico-químicas para combustão em motores (Lima *et al.*, 2007). O biodiesel de babaçu possui uma das viscosidades cinemáticas mais próximas do diesel fóssil dentre os diversos biodieseis disponíveis, com um custo baixo em relação a outros óleos vegetais (Barnwal e Sharma, 2005). Em outubro de 2002, o

Ministério da Ciência e Tecnologia do Brasil lançou o Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico do Biodiesel (PROBIODIESEL) (Portaria no. 702 do MCT, de 30 de outubro de 2002) que tem como objetivo fomentar a produção e utilização do biodiesel no País, de modo a se atingir sua viabilidade técnica, sócio-ambiental e econômica, prevendo o uso comercial de misturas com 5% de biodiesel e 95% de óleo diesel (mistura B5), esperando-se para 2010 o aumento da participação do biodiesel para 10% (B10) e até 2020 para 20% (B20) (Ramos *et al.*, 2003).

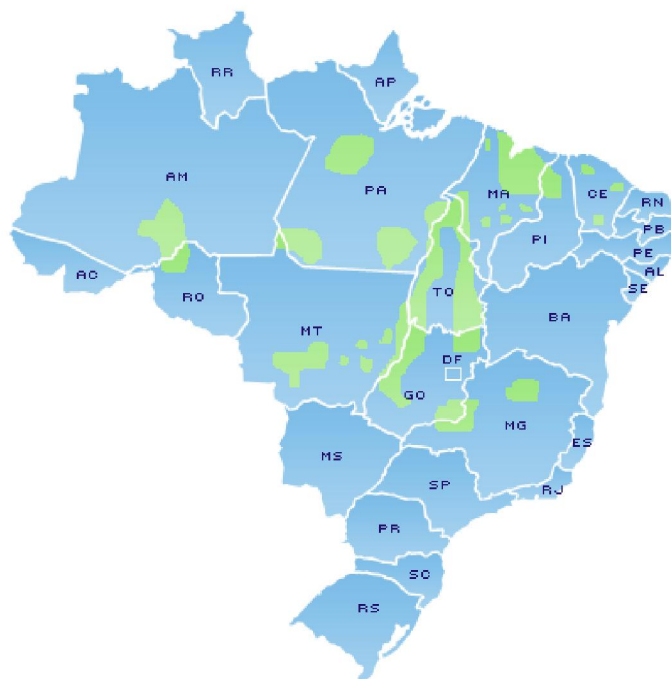


Figura 2: Áreas de babaçuais no Brasil

Os babaçuais brasileiros (marcados em verde) concentram-se na região Nordeste, Norte e Centro Oeste, merecendo maior destaque a região Nordeste que detém, atualmente, a maior produção de amêndoas. Adaptado de Anderson e May, 1985.

O babaçu se mostra bastante próspero também na geração de energia elétrica, uma vez que o governo federal brasileiro lançou recentemente o PROINFA, programa brasileiro de incentivo às fontes alternativas de energia elétrica, que visa o estímulo da produção de energia elétrica através de meios renováveis em diversas regiões do país (Eletrobrás, 2008). Esta produção de energia seria baseada na geração de vapor pela utilização da biomassa do babaçu e poderá gerar mais de 150 mil empregos diretos e indiretos. Somente na região Nordeste, a expectativa é de geração de mais de 40 mil empregos. O

maior programa brasileiro de apoio ao desenvolvimento de fontes renováveis, PROINFA, deverá ter investimentos da ordem de R\$ 9 bilhões, com financiamentos de cerca de R\$ 7 bilhões e receita anual em torno de R\$ 2 bilhões (Eletrobrás, 2008 #382).

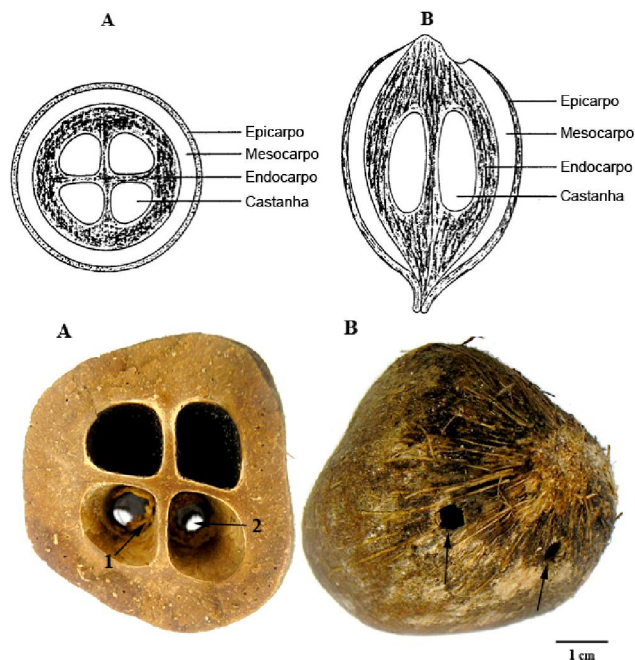


Figura 3: Esquema do fruto de babaçu.

Imagem superior: estão representados o epicarpo, mesocarpo, endocarpo e castanhas, conforme indicado. (A) Secção transversal do fruto. (B) Secção longitudinal do fruto. Figura modificada de Emmerich e Luengo (1996). Imagem inferior: exemplar de fruto de babaçu (*Orbignya* sp.). O fruto foi seccionado e as castanhas não estão presentes. (A) Secção transversal do fruto. 1. Parte do casulo que a larva tece após se alimentar da castanha. 2. Orifício feito pelo besouro adulto para sair do fruto. (B) Vista da parte anterior do fruto, que se liga ao cacho. As setas indicam os orifícios feitos pelos besouros. Adaptado de Cruz (2006).

2. *Pachymerus nucleorum* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)

A família Bruchidae foi incluída na família Chrysomelidae, como a subfamília Bruchinae, da ordem dos insetos que compreende os besouros (Coleoptera). Os bruchíneos são chamados “besouros de sementes”, pois são

conhecidos por seus hábitos de atacarem sementes de legumes, sejam cultivados ou selvagens e é considerada a maior praga de grãos estocados no mundo, estando presentes em todos continentes com exceção da Antártica (Southgate, 1979). Dos 64 gêneros de bruchíneos (cerca de 1700 espécies), 12 são encontrados predando sementes de palmeiras e constituem a tribo Pachymerini, que segundo compilações recentes possui pelo menos 20 espécies de besouros os quais predam as sementes de cerca de 100 espécies de palmeiras (Johnson *et al.*, 1995; Delobel *et al.*, 1995; Ramos *et al.*, 2001; Tuda, 2007). Além da óbvia importância econômica da predação do coco babaçu e de outros grãos, há também uma preocupação crescente com a ecologia e manejo de áreas áridas e devastadas com a introdução de espécies alternativas de árvores, uma vez que são claros os efeitos deletérios desses predadores nas sementes dessas árvores (Southgate, 1979).

Pachymerus nucleorum (Fabricius 1792) é um besouro (família Chrysomelidae, subfamília Bruchinae) conhecido popularmente como “bicho-do-coco” ou “coró”. O indivíduo adulto mede de 12 a 18 mm de comprimento, por 5 a 7 mm de largura, tem coloração cinzenta, élitros estriados, coxas posteriores ovóides e denteadas (Figura 4). Este besouro é predador do fruto de diversas espécies de palmeiras, como o babaçu (*Orbygnia* spp.), a macaúba (*Acrocomia*), o coco da baía (*Cocos*), o dendê (*Elaeis*), a piaçava (*Attalea*) e a gueiroba (*Syagrus*) (Anderson e May, 1985; Gallo, 1988).

O ciclo de vida de *P. nucleorum* em sementes de *A. arenaria* (Figura 5), muito semelhante ao encontrado para esse bruquíneo em sementes de dendê, licuri, piassava e babaçu (Bondar, 1936; Bondar, 1953; Grenha *et al.*, 2008), começa com as fêmeas colocando os ovos na superfície dos frutos, e depois de cerca de 10 dias, há a eclosão da larva e penetração na semente através dos canais de seiva ou do hilo (poro funcional), onde esta se alimenta e desenvolve (Grenha *et al.*, 2008). A larva se alimenta fazendo movimentos circulares e ao final do desenvolvimento ocupa praticamente todo o interior do endocarpo, onde empupa fazendo uma espécie de casulo com restos de fezes e material oriundo da alimentação, permanecendo neste estágio de pupa por aproximadamente um mês, emergindo em seguida (Grenha *et al.*, 2008). Ainda existem informações limitadas sobre o seu ciclo de vida e taxas de predação e acredita-se que na

maioria dos casos, os ovos de *P. nucleorum* são colocados na superfície externa do coco quando estes já estão no solo (Grenha *et al.*, 2008).

P. nucleorum tem enorme importância na ecologia do babaçu, que possui um número médio de 3,1 amêndoas por fruto. Estatísticas nas décadas de 80 e 90 apontaram que apesar deste inseto raramente comer todas as amêndoas do fruto, cerca de 70% dos frutos continha pelo menos uma castanha destruída por esta larva, causando grande prejuízo na economia desta palmeira (May *et al.*, 1985; Fairman, 1992).

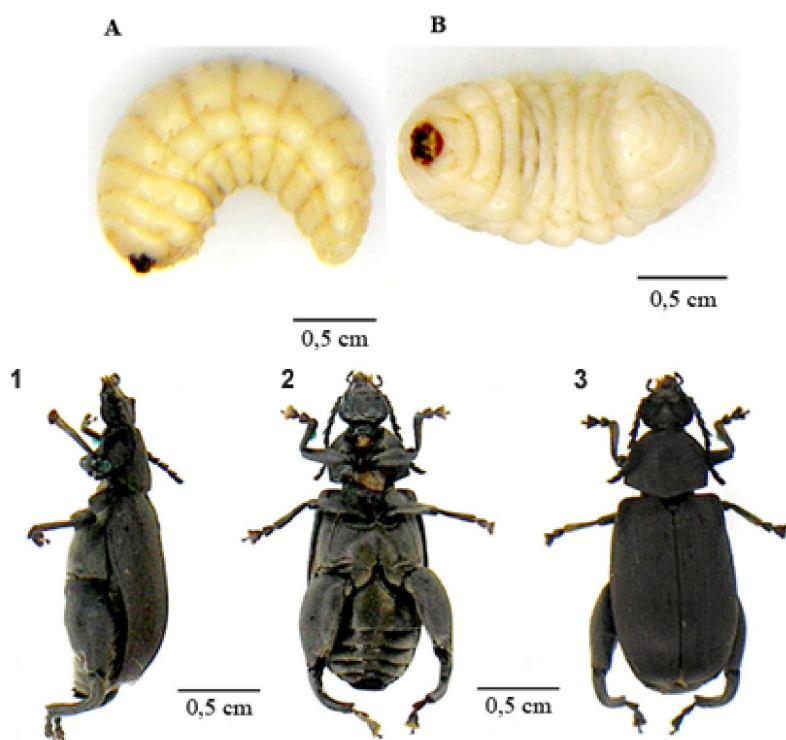


Figura 4: Fotos da espécie *Pachymerus nucleorum*, fase larvar e adulta.

Imagem superior: exemplar de larva em estágio final de desenvolvimento, material biológico utilizado neste trabalho. (A) Vista lateral da larva. (B) Vista ventral da larva. Imagem inferior: exemplar adulto da espécie *Pachymerus nucleorum*. Um bruquíneo de 18 mm de comprimento e 7 mm de largura. (1) Vista lateral do besouro. Verifica-se a cabeça achatada e coxas posteriores ovóides. (2) Vista ventral do besouro. Evidencia-se a cabeça livre. (3) Vista dorsal do besouro. Percebe-se o corpo ovalado, élitro estriado curto, deixando desprotegida a extremidade do abdômen (pigídio). Rostro curto e antenas com 11 segmentos. Adaptado de Cruz (2006).



Figura 5: Ciclo de vida de *Pachymerus nucleorum* em sementes de *A. arenaria*
 Ovos (A); Larva madura (B); Pupa (C) e Adulto e orifício de saída do besouro no coco maduro (D). (Grenha *et al.*, 2008)

3. Referencias bibliográficas

Amorim, E.; Matias, J. E.; Coelho, J. C.; Campos, A. C.; Stahlke, H. J., Jr.; Timi, J. R.; Rocha, L. C.; Moreira, A. T.; Rispoli, D. Z. e Ferreira, L. M. Topic use of aqueous extract of *Orbignya phalerata* (babassu) in rats: analysis of its healing effect. **Acta Cir Bras** 21 Suppl 2, 67-76. 2006.

Anderson, A. e May, P. A palmeira de muitas vidas. **Ciência Hoje** 4, 58-64. 1985.

Baldez, R. N.; Malafaia, O.; Czecko, N. G.; Martins, N. L.; Ferreira, L. M.; Ribas, C. A.; Salles Junior, G.; Del Claro, R. P.; Santos, O.; Graca Neto, L. e Araujo, L. R. Healing of colonic anastomosis with the use of extract aqueous of *Orbignya phalerata* (Babassu) in rats. **Acta Cir Bras** 21 Suppl 2, 31-8. 2006.

Barnwal, B. K. e Sharma, M. P. Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. **Renew Sust Energy Rev** 9, 363–78. 2005.

Baruque Filho, E. A.; Baruque, M. G. A. e Sant'anna Jr., G. L. Babassu coconut starch liquefaction: an industrial scale to improve conversion yield. **Bioresour Technol** 75, 49-55. 2000.

Batista, C. P.; Torres, O. J.; Matias, J. E.; Moreira, A. T.; Colman, D.; Lima, J. H.; Macri, M. M.; Rauen, R. J., Jr.; Ferreira, L. M. e De Freitas, A. C. Effect of watery extract of *Orbignya phalerata* (babassu) in the gastric healing in rats: morphological and tensiometric study. **Acta Cir Bras** 21 Suppl 3, 26-32. 2006.

Biodieselbr. <http://www.biodieselbr.com/plantas/babacu/babacu.htm>. Curitiba - Paraná: Biodieselbr Online Ltda 2008. Acessado em Novembro/2008.

Bondar, G. Notas biológicas sobre bruquídeos observados no Brasil. **Arquivos do Instituto de Biologia Vegetal** 3, 7-44. 1936.

Bondar, G. Palmeiras oleíferas nativas do Brasil. **Chácaras e Quintais** 88, 698-700. 1953.

Brito Filho, S. B.; Matias, J. E.; Stahlke Junior, H. J.; Torres, O. J.; Timi, J. R.; Tenorio, S. B.; Tambara, E. M.; Carstens, A. G.; Campos, R. V. e Myamoto, M. Analysis of healing in the Alba Linea with the use of *Orbignya phalerata* (babassu) water extract. Controlled study in rats. **Acta Cir Bras** 21 Suppl 3, 76-88. 2006.

Cruz, G. C. N. Caracterização parcial de uma Ca-ATPase de larva de *Pachymerus nucleorum* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). Dissertação de mestrado. **Pós-Graduação em Genética e Bioquímica**, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006. 65 p.

Delobel, A.; Couturier, G.; Kahn, F. e Nilsoon, J. A. Trophic relationships between palms and bruchids (Coleoptera: Bruchidae: Pachymerini) in Peruvian Amazonia. **Amazoniana** 13, (3/4), 209-19. 1995.

Eletrobrás.

<http://www.eletrobras.com.br/elb/portal/data/Pages/LUMISABB61D26ITEMID4CD80A9D8141489CAE9A9A81D0E177E0PTBRNN.htm>: Ministério de Minas e Energia - Governo do Brasil 2008. Acessado em julho/2008.

Embrapa. Babaçu: programa nacional de pesquisa. Brasília: **Departamento de Orientação e Apoio à Programação de Pesquisa**. 1984

Emmerich, F. G. e Luengo, C. A. Babassu charcoal: a sulfurless renewable thermo-reducing feedstock for steelmaking. **Biomass Bioenerg** 10, 41-4. 1996.

Fairman, R. M. Minor oil crops: Part I - Edible oils. Rome: **Food and agriculture organization of the united nations - FAO**, v.1. 1992 (Minor oil crops)

Ferreira, E. C.; Matias, J. E. F.; Campos, A. C. L.; Filho, R. T.; Rocha, L. C. A.; Timi, J. R. R.; Sado, H. N.; Sakamoto, D. G.; Tolazzi, A. R. D. e Filho, M. P. S. Surgical bladder wounds treated with *Orbignya phalerata* aqueous extract: controlled study in rats. **Acta Cir Bras** Vol 21 (Suplemento 3), 33-39. 2006.

Gallo, D. Manual de entomologia agrícola. São Paulo: **Agronômica Ceres**. 1988

Grenha, V.; Macedo, M. V. e Monteiro, R. F. Predação de sementes de *Allagoptera arenaria* (Gomes) O'Kuntze (Arecaceae) por *Pachymerus*

nucleorum Fabricius (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae). **Rev Bras entomol** 52, (1), 50-6. 2008.

Johnson, C. D.; Zona, S. e Nilsson, J. A. Bruchid beetles and palm seeds: recorded relationships. **Principes** 39, 25-35. 1995.

Lima, J. R. O.; Silva, R. B.; Silva, C. C. M.; Santos, L. S. S.; Santos Jr, J. R.; Moura, E. M. e Moura, C. V. R. Biodiesel de babaçu (*Orbignya* sp.) obtido por via etanólica. **Quimica Nova** 30, (3), 600-3. 2007.

May, P. H.; Anderson, A. B.; Balick, M. J. e Frazão, J. M. Subsistence benefits from the Babassu palm (*Orbignya martiana*). **Econ. Bot.** 39, 113¹29. 1985.

Moraes, M. O.; Fonteles, M. C. e Moraes, M. E. A. Screening for anticancer activity of plants from northeast of Brazil. **Fitoterapia** LXVIII, (3), 235-239. 1997.

Nascimento, F. R.; Barroqueiro, E. S.; Azevedo, A. P.; Lopes, A. S.; Ferreira, S. C.; Silva, L. A.; Maciel, M. C.; Rodriguez, D. e Guerra, R. N. Macrophage activation induced by *Orbignya phalerata* Mart. **J Ethnopharmacol** 103, (1), 53-8. 2006.

Pinheiro, C. U. B. e Frazão, J. M. F. Integral processing of babassu palm (*Orbignya phalerata*, Arecaceae) fruits: Village level production in Maranhão. **Econ Bot** 49, 31-9. 1995.

Ramos, F. A.; Martins, I.; Farias, J. M.; Silva, I. C. S.; Costa, D. C. e Miranda, A. P. Oviposition and predation by *Speciomerus revoili* (coleoptera, bruchidae) on seeds of *Acrocomia aculeata* (arecaceae) in Brasília, DF, Brazil. **Braz J Biol** 61, (3), 449-54. 2001.

Ramos, L. P.; Kucek, K. T.; Domingos, A. K. e Wilhelm, H. M. Biodiesel. **Rev. Biotecnol. Ciênc. Desenv.** 31, 28-37. 2003.

Salunkhe, D. K.; Adsule, R. N.; Chavan, J. K. e Kadam, S. S. World Oilseeds: Chemistry, Technology, and Utilization: **Springer**. 1992. 554 p.

Silva, B. P. e Parente, J. P. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignyia phalerata*. **Fitoterapia** 72, (8), 887-93. 2001.

Simmons, A. G. E. Babassu Nut. **Economic Geography** 19, (3), 279-82. 1943.

Southgate, B. J. Biology of the Bruchidae. **Ann. Rev. Entomol.** 24, 449- 73. 1979.

Teixeira, M. A. e Carvalho, M. G. Regulatory mechanism for biomass renewable energy in Brazil, a case study of the Brazilian Babassu oil extraction industry. **Energy** 32, (6), 999-1005. 2007.

Tuda, M. Applied evolutionary ecology of insects of the subfamily Bruchinae (Coleoptera: Chrysomelidae). **Appl. Entomol. Zool.** 42, (3), 337-46. 2007.

**Capítulo 3: Purificação e caracterização de uma Ca^{2+}
ATPase de larva de *Pachymerus nucleorum* (Fabricius)
(Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)**

1. RESUMO

Miosina pode ser precipitada pelo congelamento e descongelamento de fração solúvel de diferentes tecidos de mamíferos. Nesse trabalho, o objetivo foi precipitar ATPase similar à miosina a partir de fração solúvel de larva de *P. nucleorum*. A fração solúvel foi congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e descongelada após 48 horas. O precipitado foi recuperado por centrifugação a $45.000\text{ g} \times 40$ minutos e foi lavado sucessivamente com solução tampão em pH 7,5 e 9,0. Posteriormente, ATPase foi solubilizada pelo tratamento do precipitado com solução tampão pH 9,0 contendo $0,5\text{ mol.L}^{-1}$ de NaCl. Os principais polipeptídeos da fração ATPase apresentaram Mr de 205 e 45 kDa. Essa fração expressou alta atividade Ca-ATPase, mas não apresentou atividade Mg^{2+} -ATPase e nem K^+ /EDTA-ATPase. A atividade Ca^{2+} -ATPase não foi inibida por tapsigargina $140\text{ }\mu\text{ mol.L}^{-1}$, ouabaína $1,7\text{ mmol.L}^{-1}$ ou azida 1 mmol.L^{-1} . A atividade foi sensivelmente inibida por magnésio, mas praticamente não foi inibida por cobre ou zinco. A enzima não hidrolisou AMP e nem PPi e hidrolisou muito pouco ADP e GTP. Nesse trabalho, foi isolado um polipeptídeo de 205 kDa de larva de *P. nucleorum*, que co-purificou com atividade Ca^{2+} -ATPase.

Palavras Chave: Purificação, ATPase, Larva, *Pachymerus*

2. ABSTRACT

Myosin can be precipitated by freezing and thawing the soluble fraction of different mammal tissues. In this work, the objective was to precipitate ATPase similar to myosin starting from the soluble fraction of *P. nucleorum* larva. The soluble fraction was frozen at -20 °C and thawed after 48 h and centrifuged at 45.000 g x 40 min. The precipitated was recovered and successively washed with buffer solution at pH 7.5 and 9.0. Later, ATPase was solubilized through the treatment of the precipitate with buffer solution pH 9.0 containing 0.5 mmol.L⁻¹ NaCl. The main peptides of the ATPase fraction presented Mr of 205 and 45 kDa. That fraction expressed high Ca²⁺-ATPase activity, but it did not present or K⁺/EDTA-ATPase activity. However, Mg²⁺-ATPase activity appears in the presence of F-actin, and identification by PMF shows similarity of p205 with myosin heavy chain of *Tribolium castaneum*. The Ca²⁺-ATPase activity was not inhibited by 140 µmol.L⁻¹ thapsigargin, 1.7 mmol.L⁻¹ ouabain or 1 mmol.L⁻¹ azide, but was greatly inhibited by magnesium. The enzyme did not hydrolyze AMP or PPi and only slightly hydrolyze ADP and GTP. In this work, we isolated a polypeptide from 205 kDa of *P. nucleorum* larvae that was co-purified with Ca²⁺-ATPase activity.

Keywords: Purification, ATPase, Larvae, Pachymerus

3. INTRODUÇÃO

A palmeira babaçu, *Orbygnia spp.*, é um dos principais recursos oleíferos nativos do mundo e tem um grande potencial na geração de energia. A propriedade do óleo extraído de suas amêndoas é ótima para a geração de biodiesel (Lima *et al.*, 2007). Esta palmeira é encontrada em abundância no Brasil, em zonas de babaçu do sudeste amazônico, uma área que cobre 9,57 milhões de hectares e tem um potencial estimado de 10,6 bilhões de toneladas de frutos por ano (Teixeira e Carvalho, 2007). Além da castanha, outras partes da palmeira são usadas pela população local e muitas famílias dependem desses produtos nas regiões mais pobres do Brasil, onde a palmeira babaçu tem um papel muito importante na vida econômica de milhares de pessoas (May *et al.* 1985).

Pachymerus nucleorum (Fabricius) é um besouro (família *Chrysomelidae*, subfamília *Bruchinae*) predador do fruto de diversas espécies de palmeiras, dentre as quais se destaca a palmeira babaçu (Southgate, 1979). Na zona do babaçu cerca de 70% dos frutos da palmeira tem pelo menos uma castanha destruída pela larva desse inseto (Fairman, 1992). A compreensão da bioquímica e da biologia molecular de insetos pode ser de grande importância para controlar a população desses organismos.

ATPases são enzimas que hidrolisam o ATP e utilizam a energia liberada nesse processo para realizar algum tipo de trabalho celular (Kaplan, 2002; Stokes e Green, 2003; Krendel e Mooseker, 2005; Hirokawa e Takemura, 2005). Algumas ATPases são alvos de inseticidas (Soderlund e Bloomquist, 1989; Blasiak, 1996; Kakko e al., 2003; Ping e al., 2004). O difenil-2-penten-1one, um inseticida natural extraído de *Stellera chamaejasme*, por exemplo, inibe de maneira relativamente específica $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase de membrana plasmática de inseto (Ping *et al.*, 2004). Outras ATPases como Na^+/K^+ -ATPase, Mg^{2+} -ATPase e Ca^{2+} -ATPase, embora menos sensíveis, também são inibidas pelo difenil-2-penten-1one. Portanto, a caracterização de ATPases de insetos pode auxiliar no controle de sua proliferação.

Atividade ATPase foi obtida tanto a partir de fração solúvel como de

fração particulada de larva de *P. nucleorum* (Cruz e Coelho 2006, manuscrito submetido; Dias e Coelho, 2007a; Lacerda e Coelho, 2008). A ATPase isolada a partir de fração particulada expressou alta atividade Ca^{2+} -ATPase e foi sensivelmente inibida por magnésio, cobre e zinco (Cruz e Coelho, 2006, manuscrito submetido; Dias e Coelho, 2007a). Por outro lado, a enzima obtida a partir de fração solúvel de larva de *P. nucleorum* apresentou alta atividade Mg^{2+} -ATPase e um dos principais polipeptídeos dessa fração apresentou Mr similar à cadeia pesada de miosina II e V (Lacerda e Coelho, 2006). Miosina é uma ATPase que participa do processo de contração muscular e diversos outros processos de motilidade celular (Trybus, 2008). A miosina do tipo II está envolvida no processo de celularização e das primeiras citocineses após a celularização de embriões de *Drosophila* (Royou *et al.*, 2004), enquanto que a miosina do tipo V é fundamental para o desenvolvimento larval e individualização de espermátides (Mermall *et al.*, 2005). Miosinas podem ser precipitadas pelo congelamento de fração solúvel de cérebro (Soares Melo e Coelho, 2007), testículo e músculo esquelético (Dias e Coelho, 2007b) e as frações precipitadas exibem alta atividade ATPase indicando que o procedimento de congelamento e descongelamento não destrói tal atividade. O objetivo desse trabalho foi usar o método de congelamento para precipitar ATPase a partir de fração solúvel de larva de *P. nucleorum*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparação de ATPase solúvel de larva de *Pachymerus nucleorum* (Fabricius)

Cerca de 8 a 10 larvas (total de 6-7 g) foram removidas dos frutos da palmeira babaçu, lavadas com água Milli-Q e imediatamente dissecadas para a extração do sistema digestório. Os tecidos restantes foram então homogeneizados (0,1 g/mL) em tampão de extração (imidazol 50 mmol.L⁻¹ pH 7,5, sacarose 250 mmol.L⁻¹, EDTA 10 mmol.L⁻¹, EGTA 10 mmol.L⁻¹, -mercaptoetanol

2 mmol.L⁻¹, aprotinina 2 µg/mL e benzamidina 1 mmol.L⁻¹) com homogeneizador elétrico e em seguida com homogeneizador tipo potter. Este homogeneizado foi, então, centrifugado a 45.000g por 30 minutos e a fração sobrenadante (S1) foi recuperada vertendo o tubo em uma proveta graduada para medir o volume. A fração S1 foi congelada em freezer a -20 °C e a fração P1 descartada. Após pelo menos 48 horas, a fração S1 foi descongelada em banho a 27 °C e centrifugada a 45.000g x 40 minutos. A fração P2 foi homogeneizada em 10 mL de tampão Imidazol-HCl 20 mmol.L⁻¹ pH 8,0 contendo EDTA 1 mmol.L⁻¹ e DTT 0,1 mmol.L⁻¹ e centrifugada a 45.000 g x 40 minutos. A fração P3 foi homogeneizada em 5 mL de tampão CAPS 10 mmol.L⁻¹ pH 9,0 contendo EDTA 1 mmol.L⁻¹ e DTT 0,1 mmol.L⁻¹ e centrifugada a 45.000 g x 40 minutos. A fração P4 foi homogeneizada com o mesmo tampão de P3, porém contendo 500 mmol.L⁻¹ de NaCl, sendo novamente centrifugada a 45.000 g x 40 minutos. A fração P5 foi homogeneizada com o mesmo tampão de P3 para fins de análise. As centrifugações foram realizadas a 4 °C e as homogeneizações foram feitas em banho de gelo.

4.2 Determinação de Atividade ATPase

A atividade ATPase foi determinada pela quantificação do fosfato inorgânico (Pi) liberado pela hidrólise de ATP usando o método colorimétrico de Heinonen e Lahti (1981). Os ensaios foram feitos a 37 °C em duplicatas, o volume final do meio de reação foi de 200 µL e a leitura da absorbância foi feita em 355 nm. Meios de reação usados: Ca²⁺ ou Mg²⁺-ATPase (Imidazol-HCl 25 mmol.L⁻¹ pH 7,5, DTT 1 mmol.L⁻¹, EDTA 1 mmol.L⁻¹, KCl 60 mmol.L⁻¹ e CaCl ou MgCl 4 mmol.L⁻¹) e K⁺/EDTA-ATPase (Imidazol-HCl 25 mmol.L⁻¹ pH 7,5, EDTA 2 mmol.L⁻¹, DTT 1 mmol.L⁻¹ e KCl 60 ou 600 mmol.L⁻¹).

4.3 Dosagem de Proteínas

A concentração de proteínas nas frações foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) usando como padrão BSA (albumina de soro

bovino). Alíquotas das respectivas frações foram previamente diluídas para 100 µL com água deionizada e, posteriormente, foram adicionados 3 mL de Reagente de Bradford. As dosagens foram feitas em duplicatas.

4.4 Análise do perfil de polipeptídeos (SDS-PAGE)

O perfil de polipeptídeos das frações foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) usando géis em gradiente linear de 5 a 24%, empregando o método descrito por Laemmli e Favre (1973) e o sistema de placas descrito por Studier (1973).

4.5 Identificação de P205 e P43 por “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF)

As bandas ou “spots” correspondentes a P205 e P43 foram cortados de diversos géis e descorados por 15 minutos com solução recém-preparada de ferricianeto de potássio 15 mM e tiosulfato de sódio 50 mM (Gharahdaghi et al. 1999). Os pedaços de gel foram enxaguados várias vezes com água para parar a reação, lavados alternadamente por 10 minutos com água e acetonitrila e depois secos usando sublimador Speed Vac (Savant). Os géis foram hidratados novamente em NH_4HCO_3 50 mM, CaCl_2 5 mM contendo 12,5 ng/µL de tripsina modificada (Promega, Madison, WI, EUA) e incubados a 37 °C até o dia seguinte. Os peptídeos trípticos foram extraídos duas vezes com 40 µL de solução acetonitrila/água/TFA (66:33:0,1) em sonicador por 10 minutos. Os produtos de proteólise foram dessalinizados e concentrados usando ZipTips® C₁₈ (Millipore, Billerica, MA, EUA).

Peptídeos trípticos eluídos do gel foram misturados com solução de matriz recém-preparada (HCCA 20 µg/µL), dissolvida em acetonitrila 50% contendo TFA 0,1%. A mistura foi colocada sobre uma placa de aço polido MTP 384 (Bruker Daltonics) e deixada secar ao ar. As massas das amostras foram analisadas usando um espectrômetro de massa Autoflex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics). A calibração externa foi realizada usando um “kit” de peptídeos padrão fornecido por Bruker Daltonics.

Espectros de massa de peptídeos foram gerados usando o programa FlexControl v. 2.4 (Bruker Daltonics) e os programas FlexAnalysis v. 2.4 e BioTools v. 3.0 (Bruker Daltonics) foram usados para criar e editar a lista de picos a partir dos espectros obtidos. As massas monoisotópicas dos peptídeos trípticos foram usadas para identificar as proteínas por “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF), utilizando o programa “on-line” Mascot, www.matrixscience.com, (Perkins, Pappin *et al.*, 1999). Foram feitas buscas contra o banco de dados NCBI nr 20080924 de proteínas não-redundante do “National Center for Biotechnology Information”, NCBI (Bethesda, EUA).

A tolerância de massa estabelecida para os peptídeos foi entre 0,1 e 0,25 Da e nenhuma restrição foi imposta para a massa molecular da proteína ou para linhagem filogenética. Estabeleceu-se como modificação variável a oxidação de metionina, e propionamidação de cisteína (alquilação com acrilamida) como modificação fixa. Os sítios de clivagem perdidos foram estabelecidos como zero ou, no máximo, um. Identidades foram consideradas significativas se o escore da proteína ultrapassasse o limiar calculado pelo programa Mascot, assumindo valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maior parte tanto da atividade Mg^{2+} -ATPase como da Ca^{2+} -ATPase presente no homogeneizado apareceu na fração particulada (fração P1), enquanto que apenas uma pequena parte dessas atividades apareceu na fração solúvel (fração S1) sendo que a atividade Mg^{2+} -ATPase dessa fração foi superior à atividade Ca^{2+} -ATPase (Fig. 1). As atividades Ca^{2+} - e Mg^{2+} -ATPase da fração S1 corresponderam à, respectivamente, 6,6 e 34,7% dessas atividades na fração P1 (Fig. 1). O congelamento/descongelamento da fração S1 gerou um precipitado (fração P2), que contém menos de 5% das proteínas da fração S1, mas apresentou atividade Ca^{2+} -ATPase até 100 vezes superior à da fração S1 (Fig. 2). Observa-se também na figura 2, que a atividade Mg^{2+} -ATPase da fração S1 foi totalmente recuperada na fração S2. Portanto, o congelamento e descongelamento da fração S1 separaram as atividades Mg^{2+} - e Ca^{2+} -ATPase e

enriqueceu a atividade Ca^{2+} -ATPase na fração P2. Enquanto as atividades específicas Ca^{2+} - e Mg^{2+} -ATPase da fração S1 foram, respectivamente, 1,2 e 18,2 nmols Pi/mg prot./min, as atividades Ca^{2+} - e Mg^{2+} -ATPase da fração P2 foram, respectivamente, de 96 e 0 nmols Pi/mg prot./min (Fig. 2). Após lavar a fração P2, menos de 40% das proteínas foram recuperadas na fração precipitada, mas a maioria da atividade Ca^{2+} -ATPase total de P2 foi recuperada nesta fração e apenas uma pequena parte da atividade Ca^{2+} -ATPase total foi solubilizada nesse passo (dados não mostrados). Os principais polipeptídeos da fração P3 apresentaram M_r de aproximadamente 205 (P205), 57 (P57) e 45 (P45) kDa (Fig. 3). O tratamento da fração P3 com tampão CAPS pH 9,0 solubilizou a maioria dos polipeptídeos de 57 e 45 kDa, que provavelmente não estão relacionados com a atividade ATPase, pois essa atividade foi recuperada totalmente na fração P4 (dados não mostrados). P205 é o principal polipeptídeo da fração P4, mas os polipeptídeos de 57 e 45 kDa também aparecem nesta fração. A atividade Ca^{2+} -ATPase foi solubilizada com o tratamento da fração P4 com tampão CAPS pH 9,0 contendo $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaCl e o polipeptídeo de alto peso molecular (205 kDa) co-purificou com a atividade Ca^{2+} -ATPase (Figura 3 e Figura 5). Esse polipeptídeo tem M_r similar à cadeia pesada de miosina II e V e estas miosinas podem ser precipitadas pelo congelamento da fração solúvel de diferentes tecidos (Soares Melo e Coelho, 2007; Dias e Coelho, 2007b). Além do polipeptídeo de 205 kDa, a fração S5 também possui um polipeptídeo com M_r similar à da actina, 45 kDa, e outro de 145 kDa (Figura 3). A actina constitui os microfilamentos e é conhecida para purificar junto com miosina (Warrick e Spudich, 1987; Korn e Hammer, 1988).

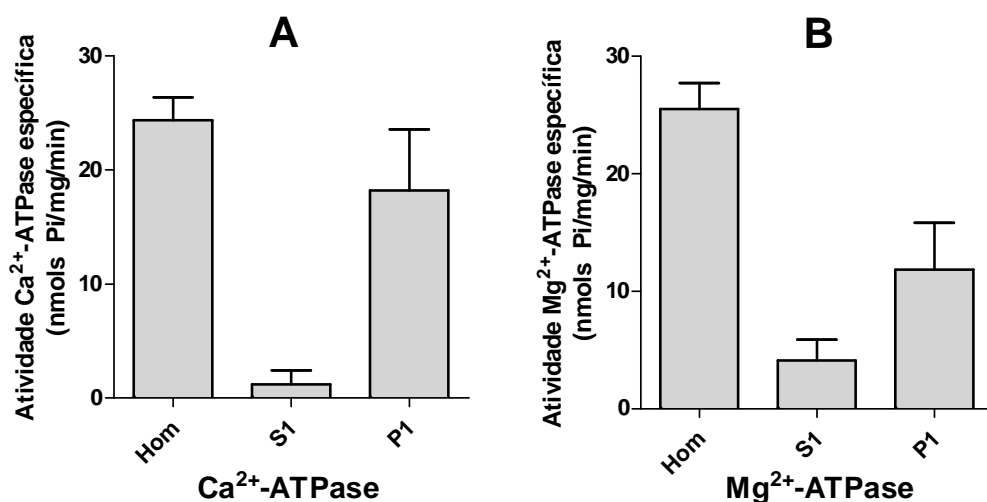


Figura 1: Atividade Ca²⁺ e Mg²⁺-ATPase das frações homogeneizada, solúvel e particulada de larva de *P. nucleorum*

Cerca de 82 µg de homogeneizado, 25 µg de S1 e 54 µg de P1 foram incubados a 37°C por 20 min em meio de reação I (imidazol-HCl 25 mmol.L⁻¹ pH 8.0, DTT 1 mmol.L⁻¹, EDTA 1 mmol.L⁻¹, KCl 60 mmol.L⁻¹) contendo CaCl₂ 4 mmol.L⁻¹ (A) ou MgCl₂ 4 mmol.L⁻¹ (B). A reação foi iniciada pela adição de ATP 1 mmol.L⁻¹ e interrompida com 2 mL de solução de dosagem de fosfato. As barras indicam erro padrão calculado para 3 preparações distintas.

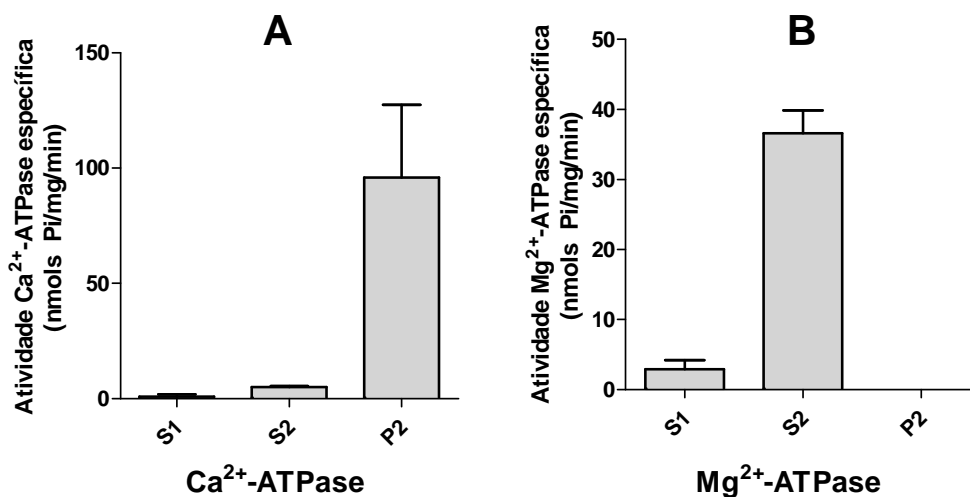


Figura 2: Separação da atividade Ca²⁺ e Mg²⁺-ATPase de S1 de larva de *P. nucleorum* por congelamento/descongelamento

Cerca de 25 µg de S1, 23 µg de S2 e 11 µg de P2 foram incubados a 37°C por 20 min em meio de reação I (imidazol-HCl 25 mmol.L⁻¹ pH 8.0, DTT 1 mmol.L⁻¹, EDTA 1 mmol.L⁻¹, KCl 60 mmol.L⁻¹) contendo CaCl₂ 4 mmol.L⁻¹ (A) ou MgCl₂ 4 mmol.L⁻¹ (B). A reação foi iniciada pela adição de ATP 1 mmol.L⁻¹ e interrompida com 2 mL de solução de dosagem de fosfato. As barras indicam erro padrão calculado para 3 preparações distintas.

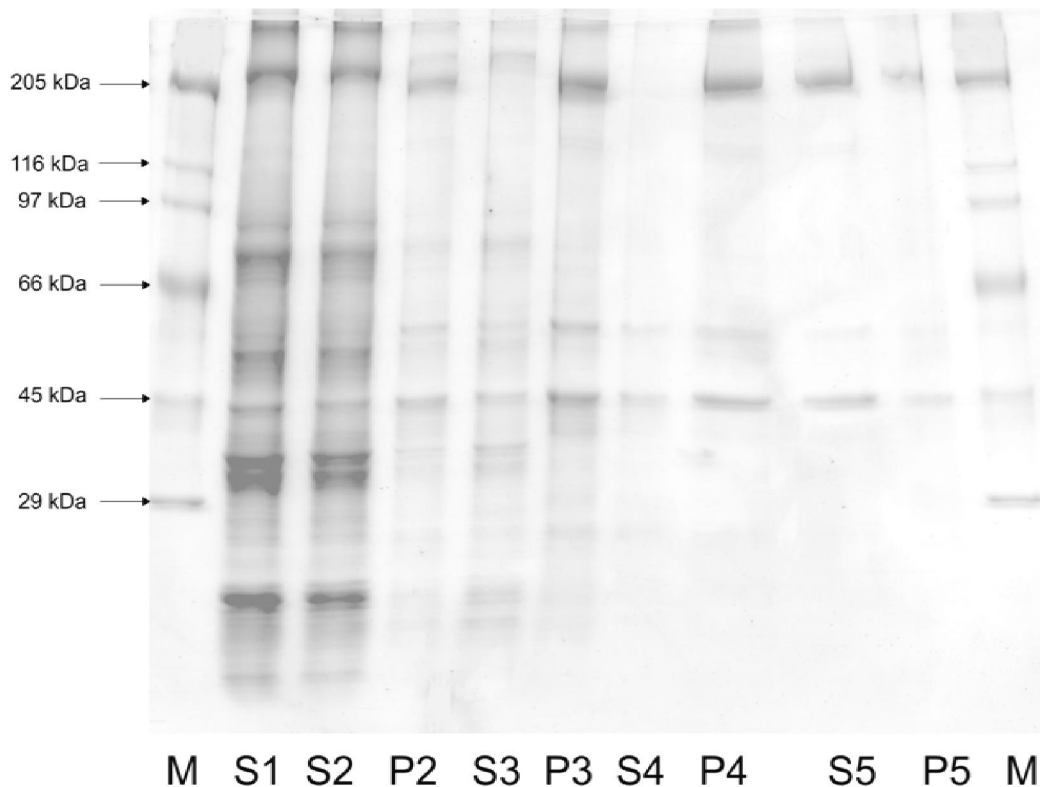


Figura 3: SDS-PAGE da purificação da Ca^{2+} -ATPase de fração solúvel de larva de *P. nucleorum*

Aproximadamente 10 μg de S1 e S2, 5 μg de P2, S3 e P3, 2 μg de S4 e 5 μg de P4, S5 e P5 foram aplicados em gel de poliacrilamida 5-24%. (M) Padrão de massa molecular: miosina, β -galactosidase, fosforilase b, albumina bovina, ovalbumina e anidrase carbônica. O gel foi corado com coomassie blue R-250.

P205 analisado por *Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF-MS), apontou 31 peptídios (16% da seqüência total) correspondentes a cadeia pesada de miosina CG17927-PF isoform 2, 3 ou 5 (GenBank accession GI 189239935) de *Tribolium castaneum*, de um total de 59 peptídeos gerados pela digestão com tripsina (Figura 4). P205 apresentou valores preditos de massa molecular e P_i de 224.781 kDa and 5.72 respectivamente (Tabela 1). A análise de P43 por sua vez apontou que de um total de 55 peptídeos gerados pela digestão com tripsina identificados, 19 corresponderam a actina-87E isoform 1 (GenBank accession GI 91078486) de *Tribolium castaneum*,

representando cerca de 44% da seqüência total. P43 apresentou valores preditos de massa molecular e Pi de 42.256 kDa and 5.29 respectivamente (Tabela 1).

```

1  MPKFEKTEED PDPTFYLFVS LEQKRIDQTK PYDAKKSCWV FDEKEGFVLG
51  EIKGTKGDLV TVGLPGGEEK NFKKEQVGQV NPPKYEKCED MSNLTYLNDL
101 SVLHNLKQRY YAKLIYTYSG LFCVAINFYK RFPVYTNRCA KLYRGKRRNE
151 VPPHIFATSD GAYVNMLTNH ENQSMITIGE SGAGKTENTK KVIAYFATVG
201 ASTKKSEEQA KKGNDLDQVV QTNPVLEAFG NAKTVRNDNS SRFGKPIR IH
251 FGPTGKLAGA DIETYLLEKA RVI SQQSLEK SYHIFYQMMS GAVKGLKENC
301 LLSDNVVDYN FVSQGKVITP GVDDBEELEL TDQAFDVLGF TQEEKDNI YK
351 ITAAVMHMGK MKFKQGRREE QAE PDGTEEG ERVAKLLGIE APGLYNALCK
401 PRIKVGAEFV TQGRNVNQVN YSVGAMSKAM FDRLEK FLVK KCNETLDTKQ
451 KRQHF IGVL D IAGFEI FDFN GFEQLCINFT NEKLQQFFNH HMFVLEQEY
501 QREGI ENAFI DFGMDLLACI ELIEKPMGIL SILEEE SMFP KATDKTFEEK
551 LNTNHLGKSP NFLKPKPKPKP GQQAAHFAIG HYAGNV PYNI TGWLEKNKDP
601 LNDTVVDLYK KGTNKLLEVEI FADHPGQSGA PDAGGGKGRG KKGGGFATVS
651 SAYKEQLNNL MTTLRSTQPH FVRCI IPNEL KQPGVIDSHL VMHQLTONGV
701 LEGIRICRKG FPNRMVYPDF KLR YKILAAS AIRDDMAPEK ASQVILETIN
751 LDAEQYRLGK TKVFFRAGVL GQMEELRDER LGKIVTWMQS WRGYLSRKE
801 FKRLQEQRLA LQVCQRNLK YLKLRTWPWY KLNQKVKPLL NVTRIEDEIA
851 KLEEKAAKAQ EAYEREAKAK KELEGLYSKL LAEKTE LLSS LEQEKGSLSLSE
901 VQERANKLQA QKSDLESQLS ETQDRLSQEE DARNQLMQQK KKLEQ EISGY
951 KKDIE DLELN LQKSEQDKAT KDHQIRNLND EIAHQDELIN KLNKEKKLSG
1001 ENSQRVSEEL QAEDKVNHL NKVKAKLEQT LDELED SLER EKKLRGDVEK
1051 SKRKVEGDLK LTQEA VADLE RNKK KELEQTI QRKDKE ISSL TAKLEDEQSV
1101 VGKLLQKQIKE LQARIEELEEE EVEAERQARA KAEKQRADLA RELEELGERL
1151 EEAGGATSAQ IELNKKREAE LAKLRDLEE SNIQHESTLA NLRKKHNDVAV
1201 SEMGEQIDQL NKLKAKAEKE KAA YFGELND LRASVDHLAN EKAAVEKVS
1251 QLQQQLNDVQ GKLDETNRTL NDFDAAKKKL SIENSD LLRQ LEEAE SQV SQ
1301 LSKIKVSLTT QLED TKRLAD EEGRERATLL GKFRNLEHDL DNI REQVEE
1351 AEAKA DIQRQ LSKANAEAQL WRQKYSEGV AKSELEEEAK RKLQARLAEA
1401 EETIESLNQK VVALEKTKQR LATE VEDLQI EVDRANA IAN AAEKKQKAFD
1451 KIIGEWKLV DDLAAELDAS QKECRNYSTE LFRL KGAYEE QEQLE AVRR
1501 ENKNLADEVK DLLD QIGEGG RNI HEIEKAR KRLEAEKDEL QAALEEAFAA
1551 LEQEENKVLK SQLELSQVRQ EIDRRIQEKE EEFENT RKNH QRALDS MQAS
1601 LEAEAAGKAE ALRMKKKLEA DINELE IALD HANKANA AEAQ KTIKRY QQQL
1651 KDTQTALEEE QRARDEAREQ LGI SERRANA LQNE LEESRT LLEQADR ARR
1701 QAEQELGDAH EQNLDSLQSN SSLSAKRRKL ETELQTLHSD LDELLNEAKN
1751 SEEKAKKAMV DAARLADLR AEQDHAQTQE KLRKALETQI KDLQVRLDEA
1801 EANALKGGKK LIQKLEQRVR ELENE LDGEQ RRHADA QKNL RKSERRI KEL
1851 SFQAE EDRKN HERMQ DLVDK LQQKIKTYKR QIEEAE EIAA INLAK FRKAQ
1901 QELEEAEBERA DLAEQAIAKF RAKGRGGSVA RGGSPAPFRQ RFQMD GLT FP
1951 PR FDLAP EI

```

Figura 4: Peptídeos de p205 pareados em sua identificação

A sequencia coberta pela identificação de P205 similar a cadeia pesada de miosina CG17927-PF isoforma 2 de *Tribolium castaneum* (GenBank GI189239935). Os peptídeos pareados estão marcados em negrito (vermelho).

A fração S5 obtida a partir de larva de *P. nucleorum* não expressou atividade Mg^{2+} -ATPase e nem atividade na ausência de cátions bivalentes e presença de alta concentração de sal, conhecida como atividade K^+ /EDTA-ATPase (Figura 6). Esta é uma atividade não fisiológica, mas importante para identificar membros da família das miosinas, pois outras ATPases não apresentam esse tipo de atividade. A falta de atividade K^+ /EDTA-ATPase não

permite afirmar que P205 não pertence à família das miosinas. É sabido que vários tecidos, apesar de possuírem membros da família das miosinas, apresentam nível baixo ou ausente de atividade K^+ /EDTA-ATPase (Ostlund *et al.*, 1978). Apesar da atividade ATPase de miosinas ser considerada sensível ao congelamento, a baixa atividade K^+ /EDTA-ATPase observada aqui parece ser uma característica de miosina de larva de *Pachymerus nucleorum*, pois miosina II de músculo esquelético obtida pelo método de congelamento apresentou alta atividade K^+ /EDTA-ATPase (Dias e Coelho, 2007b). Miosina II de testículo também não apresenta atividade K^+ /EDTA-ATPase (Dias e Coelho, 2007b) e é importante mencionar que algumas preparações de miosina V também não apresentam atividade K^+ /EDTA-ATPase (Larson *et al.*, 1990; Espíndola *et al.*, 1992). Com a adição de F-actina a fração S5 apresentou atividade Mg^{2+} -ATPase referente a uma estimulação de cerca de 300 %, fato consistente com a presença de miosina nessa fração (Figura 7). Esta atividade também é importante para indentificação de miosinas, uma vez que é característica das miosinas apresentarem sua atividade Mg^{2+} -ATPase estimulada por F-actina (Espíndola *et al.*, 1992; Cheney *et al.*, 1993).

Tabela 1: Bandas de proteínas analisadas por MALDI-TOF MS e identificadas por buscas no banco de dados de proteínas não-redundantes NCBI usando Mascot.

Banda	Mr (SDS-PAGE) kDa	Proteína identificada	Organismo / ID da proteína	Escore Mascot	Peptídeos pareados	Cobertura (%)	Mr (MALDI-TOF-MS) kDa
P205	211.882	cadeia pesada de miosina CG17927-PF isoform 2	Tribolium castaneum / gij189239935	133	31	16	224.781
P43	42.603	actina-87E isoform 1	Tribolium castaneum / gij91078486	200	19	44	42.256

As bandas do SDS-PAGE (p205 e p43) foram cortadas, e em seguida digeridas e dessalinizadas usando tripsina e cromatografia líquida respectivamente. Os fragmentos proteolizados foram analisados por Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) na Universidade de Brasília – UnB. O servidor Mascot v2.2 foi aplicado para identificação dos peptídeos e as buscas feitas no banco de dados NCBI nr 20080924.

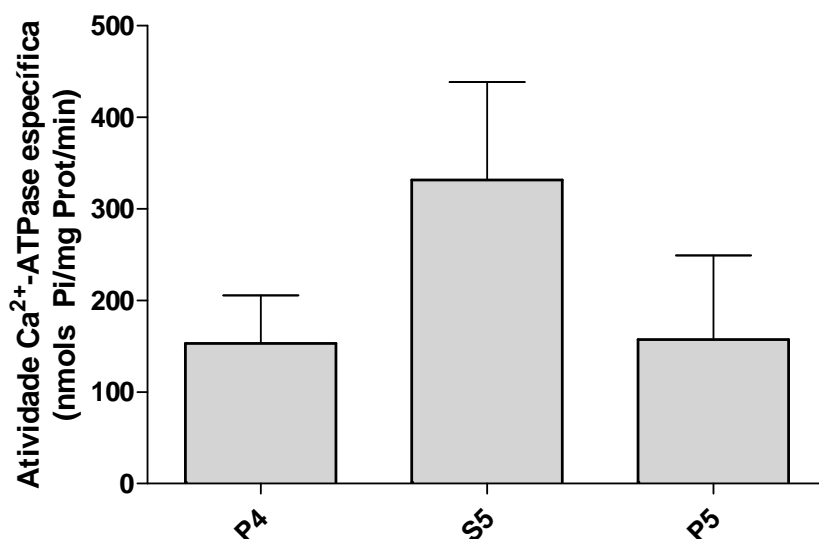


Figura 5: Solubilização da atividade Ca²⁺-ATPase de P4 de larva de *P. nucleorum*

Cerca de 7,5 µg de P4, 5,2 µg de S5 e 6,3 µg de P5 foram incubados a 37°C por 20 min em meio de reação I (imidazol-HCl 25 mmol.L⁻¹ pH 8,0, DTT 1 mmol.L⁻¹, EDTA 1 mmol.L⁻¹, KCl 60 mmol.L⁻¹) contendo CaCl₂ 4 mmol.L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de ATP 1 mmol.L⁻¹ e interrompida com 2 mL de solução de dosagem de fosfato. As barras indicam erro padrão calculado para 3 preparações distintas.

O polipeptídeo de 205 kDa da fração S5, também, não foi reconhecido por anticorpos policlonais gerados contra, respectivamente, miosina II e V de cérebro de rato (dados não mostrados). A falta de reatividade a esses anticorpos também não descarta que P205 seja um membro da família das miosinas, pois esses anticorpos foram gerados contra miosinas de mamíferos e podem não reconhecer miosinas de insetos, pois são organismos filogeneticamente distantes. Vale ressaltar, também, que existem cerca de 20 classes de miosinas sendo que cada classe possui vários membros (Richards e Cavalier-Smith, 2005; Foth *et al.*, 2006) e, que um determinado membro dessa família pode não ser reconhecido por anticorpos gerados contra outras miosinas.

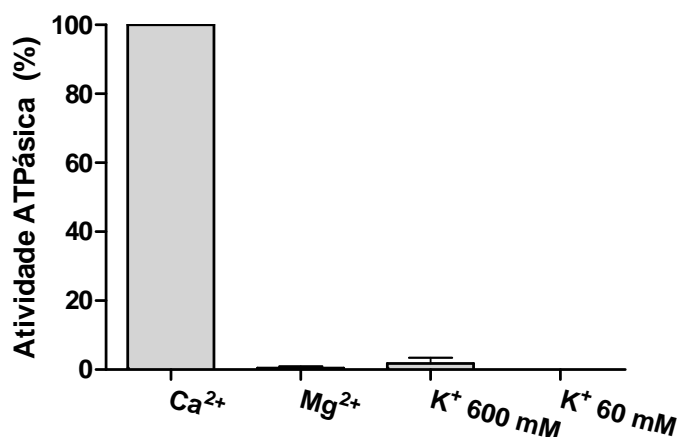


Figura 6: Atividades Ca²⁺, Mg²⁺ e K⁺-EDTA-ATPase de S5

Cerca de 2 µg de S5 foram incubados a 37°C por 20 min em meio de reação I (imidazol-HCl 25 mmol.L⁻¹ pH 8.0, DTT 1 mmol.L⁻¹, EDTA 1 mmol.L⁻¹, KCl 60 mmol.L⁻¹) contendo CaCl₂ ou MgCl₂ 4 mmol.L⁻¹ ou meio de reação II (imidazol-HCl 25 mmol.L⁻¹ pH 8.0, DTT 1 mmol.L⁻¹, EDTA 2 mmol.L⁻¹) com KCl 60 ou 600 mmol.L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de ATP 1 mmol.L⁻¹ e interrompida com 2 mL de solução de dosagem de fosfato. A atividade Ca²⁺-ATPase basal específica foi ± 1500 nmols Pi/ mg Prot./ min. As barras indicam erro padrão calculado para 3 preparações distintas.

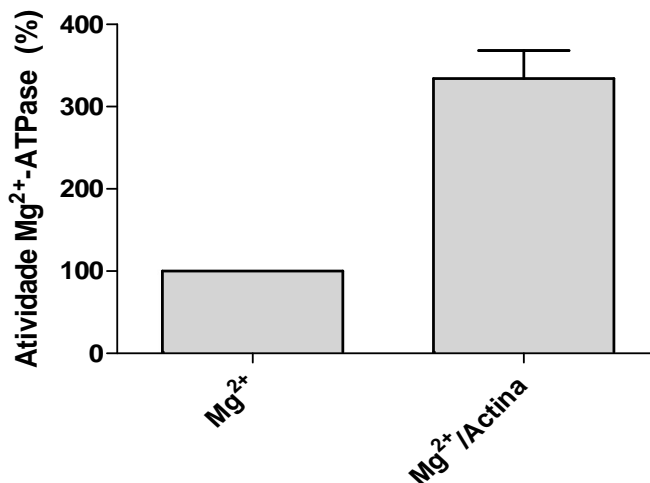


Figura 7: Efeito de actina na atividade Mg²⁺-ATPase de S5

Cerca de 5 µg de S5 foram incubados a 37°C por 20 min em meio de reação I (imidazol-HCl 25 mmol.L⁻¹ pH 8.0, DTT 1 mmol.L⁻¹, EDTA 1 mmol.L⁻¹, KCl 60 mmol.L⁻¹) contendo MgCl₂ 4 mmol.L⁻¹ e cerca de 500 µg de actina de músculo esquelético de coelho onde indicado. A reação foi iniciada pela adição de ATP 1 mmol.L⁻¹ e interrompida com 2 mL de solução de dosagem de fosfato. A atividade Mg²⁺-ATPase basal específica foi ± 23,5 nmols Pi/ mg Prot./ min. As barras indicam erro padrão calculado para 3 preparações distintas. Actina de músculo esquelético foi preparado como descrito por Spudich e Watt (1971).

A fração particulada de larva de *P. nucleorum* possui uma ATPase que expressa alta atividade ATPase na presença de cálcio e esta foi sensivelmente inibida por tapsigargina (Duarte e Coelho, manuscrito em preparação), um inibidor específico de Ca^{2+} -ATPase de retículo endoplasmático (Kijima *et al.*, 1991; Lytton *et al.*, 1991). Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático de músculo cardíaco e esquelético, por exemplo, foi inibida em mais de 80% por 100 nmol.L^{-1} de tapsigargina (Kijima *et al.*, 1991; Lytton *et al.*, 1991). Para verificar se a Ca^{2+} -ATPase isolada de fração solúvel de larva de *P. nucleorum*, também, possui propriedades similares às de Ca^{2+} -ATPase de retículo endoplasmático, a fração S5 foi incubada com tapsigargina. Não foi detectada inibição da atividade Ca^{2+} -ATPase da fração S5 em meio de reação contendo tapsigargina $140 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figura 8) indicando que uma Ca^{2+} -ATPase de retículo endoplasmático não é a enzima responsável pela atividade dessa fração. A atividade Ca^{2+} -ATPase também não foi sensível à calmodulina (dados não mostrados), uma proteína ligante de cálcio, que se liga a região C-terminal de algumas Ca^{2+} -ATPases e estimula sua atividade (Carafoli, 1991). Não foi observado na fração S5 nenhum polipeptídeo com Mr em torno de 100 e nem de 130 kDa (Fig. 3), que corresponde, respectivamente, ao Mr de Ca^{2+} -ATPase de retículo endoplasmático (Yao *et al.*, 1998) e de membrana plasmática (Verma *et al.*, 1988; Greeb e Shull, 1989). Azida, um inibidor de F_1 -ATPase (Vasilyeva *et al.*, 1982; Harris, 1989), e ouabaína, um inibidor de Na^+/K^+ -ATPase (Wheeler e Whittam, 1962), também, não inibiram a atividade da enzima isolada de larva de *P. nucleorum* (Figura 8) sugerindo que essas ATPases não estão presentes na fração ATPase obtida de fração solúvel de larva de *Pachymerus nucleorum*.

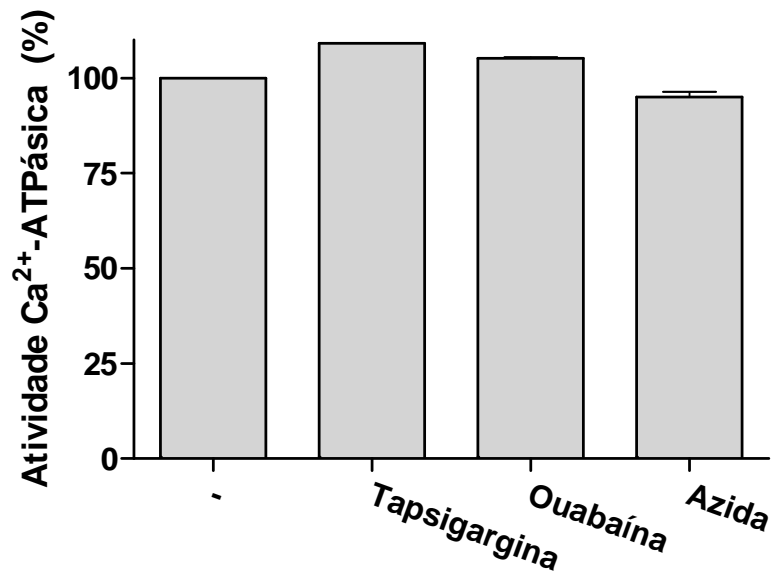


Figura 8: Efeito de inibidores de ATPases na atividade Ca²⁺-ATPase de S5

Cerca de 2 µg de S5 foram incubados a 37°C por 20 min em meio de reação I (imidazol-HCl 25 mmol.L⁻¹ pH 8.0, DTT 1 mmol.L⁻¹, EDTA 1 mmol.L⁻¹, KCl 60 mmol.L⁻¹) contendo CaCl₂ 4 mmol.L⁻¹ e tapsigargina 140 µmol.L⁻¹, ouabaína 1,7 mmol.L⁻¹ ou azida 1 mmol.L⁻¹ onde indicado. A reação foi iniciada pela adição de ATP 1 mmol.L⁻¹ e interrompida com 2 mL de solução de dosagem de fosfato. A atividade Ca²⁺-ATPase basal específica foi ± 1500 nmols Pi/ mg Prot./ min. As barras indicam erro padrão calculado para 3 preparações distintas.

Diferente de Ca²⁺-ATPase isolada de vários tecidos e caracterizada, a atividade Ca²⁺-ATPase isolada de fração particulada de larva de *P. nucleorum* não expressa atividade Mg²⁺-ATPase e esse cátion inibe sensivelmente a sua atividade Ca²⁺-ATPase (Cruz e Coelho, 2006, manuscrito submetido). Similar ao observado para a ATPase isolada da fração particulada de larva de *P. nucleorum*, a ATPase isolada a partir da fração solúvel da larva desse bruchineo, também, não expressou atividade Mg²⁺-ATPase (Figura 6) e sua atividade Ca²⁺-ATPase foi inibida por magnésio (Figura 9). Enquanto aproximadamente 0,25 mmol.L⁻¹ magnésio inibiu 50% da atividade Ca²⁺-ATPase da enzima isolada da fração particulada (Cruz e Coelho, 2006, manuscrito submetido), a enzima isolada da fração solúvel requer aproximadamente 0,8 mmol.L⁻¹ de magnésio para a mesma inibição (Figura 9). Esse é um dado interessante, pois, em geral, as ATPases requerem magnésio para expressar sua atividade e inclusive o verdadeiro substrato de várias ATPases é o complexo Mg²⁺/ATP. Uma caracterização mais

aprofundada da ATPase de larva de *Pachymerus nucleorum* pode esclarecer essa questão. Além de magnésio, a ATPase isolada de fração particulada de *P. nucleorum* foi sensivelmente inibida por cobre e zinco (Dias e Coelho, 2007a). A Figura 10 mostra que zinco 1 mmol.L⁻¹ praticamente não inibiu a atividade Ca²⁺-ATPase da fração S5, enquanto que cobre 1 mmol.L⁻¹ inibiu apenas 25 % da atividade Ca²⁺-ATPase.

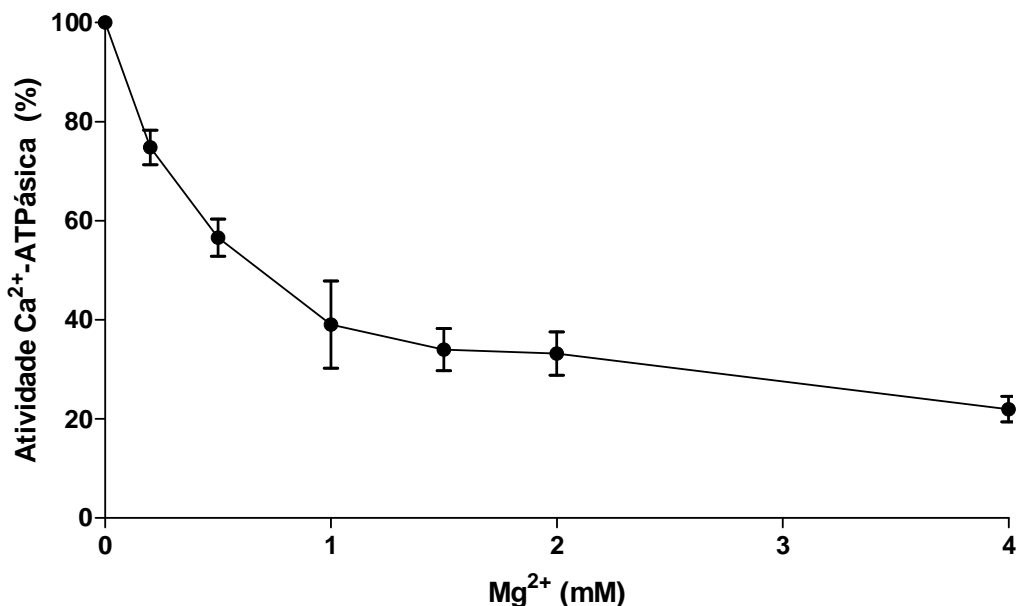


Figura 9: Efeito de Mg²⁺ na atividade Ca²⁺-ATPase de S5

Cerca de 2 µg de S5 foram incubados a 37°C por 20 min em meio de reação I (imidazol-HCl 25 mmol.L⁻¹ pH 8.0, DTT 1 mmol.L⁻¹, EDTA 1 mmol.L⁻¹, KCl 60 mmol.L⁻¹) contendo CaCl₂ 4 mmol.L⁻¹ e MgCl₂ na concentração indicada. A reação foi iniciada pela adição de ATP 1 mmol.L⁻¹ e interrompida com 2 mL de solução de dosagem de fosfato. A atividade Ca²⁺-ATPase basal específica (sem Mg²⁺) foi ± 1500 nmols Pi/ mg Prot./ min. As barras indicam erro padrão calculado para 3 preparações distintas.

No intuito de verificar a especificidade de substrato da enzima isolada de fração solúvel de larva de *P. nucleorum*, a fração S5 foi incubada em meio de reação contendo AMP, ADP ou GTP no lugar de ATP. Foi testada também a hidrólise de pirofosfato. O ADP e o GTP foram muito pouco hidrolisados pela enzima da fração S5, enquanto AMP e P₂i não foram hidrolisados (Figura 11). A ausência de atividade pirofosfatase sugere a ausência desta enzima na fração S5.

Apirases (ecto-ATPases) hidrolisam o fosfato terminal de ambos, ATP e ADP (Plesner, 1995) e também parece não estarem presentes na fração S5 de larva de *P. nucleorum*.

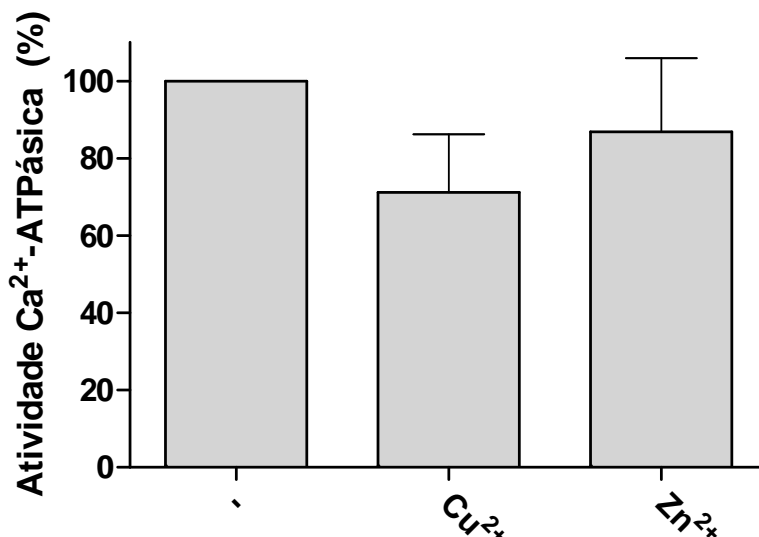


Figura 10: Efeito de cobre e zinco na atividade Ca²⁺-ATPase de S5

Cerca de 2 µg de S5 foram incubados a 37°C por 20 min em meio de reação I (imidazol-HCl 25 mmol.L⁻¹ pH 8.0, DTT 1 mmol.L⁻¹, EDTA 1 mmol.L⁻¹, KCl 60 mmol.L⁻¹) contendo CaCl₂ 4 mmol.L⁻¹ e CuCl₂ ou ZnCl₂ 1 mmol.L⁻¹ onde indicado. A reação foi iniciada pela adição de ATP 1 mmol.L⁻¹ e interrompida com 2 mL de solução de dosagem de fosfato. A atividade Ca²⁺-ATPase basal específica foi ± 1500 nmols Pi/ mg Prot./ min. As barras indicam erro padrão calculado para 3 preparações distintas.

Nesse trabalho, foi isolado, a partir de fração solúvel de larva de *P. nucleorum*, um polipeptídeo de 205 kDa que, similar à miosina II e V, foi precipitado pelo congelamento e descongelamento de fração solúvel. P205 copurificou com um polipeptídeo, que apresentou Mr em SDS-PAGE similar à actina e esta fração expressou alta atividade Ca²⁺-ATPase, mas não foi detectada atividade Mg²⁺-ATPase e nem K⁺/EDTA-ATPase.

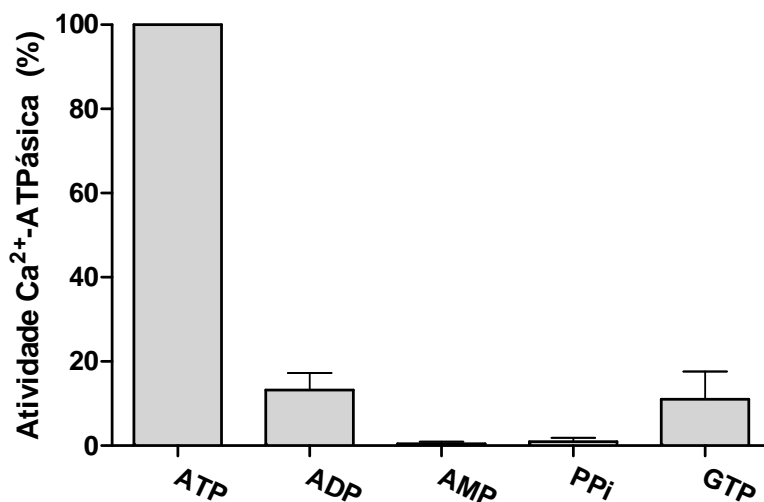


Figura 11: Especificidade de substrate da fração S5

Cerca de 2 µg de S5 foram incubados a 37°C por 20 min em meio de reação I (imidazol-HCl 25 mmol.L⁻¹ pH 8.0, DTT 1 mmol.L⁻¹, EDTA 1 mmol.L⁻¹, KCl 60 mmol.L⁻¹) contendo CaCl₂ 4 mmol.L⁻¹ e o respectivo substrato a 1 mmol.L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de S5 e interrompida com 2 mL de solução de dosagem de fosfato. A atividade Ca²⁺-ATPase basal específica foi ± 1500 nmols Pi/ mg Prot./ min. As barras indicam erro padrão calculado para 3 preparações distintas.

6. Referências Bibliográficas

- Blasiak J. 1996. Comparison of the action of an organophosphorus insecticide and its metabolite on chloride and sulfate transport in erythrocyte membrane. *Z Naturforsch [C]* 51(3-4):226-32.
- Bradford MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Bio* 72:248-54.
- Carafoli E. 1991. The calcium pumping ATPase of the plasma membrane. *Annu Rev Physiol* 53:531-47.

- Cheney RE, O'Shea MK, Heuser JE, Coelho MV, Wolenski JS, Espreafico EM, Forscher J. F, Larson RE, Mooseker MS. 1993. Brain Myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell* 75:13-23.
- Dias DS, Coelho MV. 2007a. Effect of Cu^{2+} and Zn^{2+} ions in Ca-ATPase activity isolated from *Pachymerus nucleorum* (Fabricius) (Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae) larvae. *Neotrop Entomol* 36(1):65-9.
- Dias DS, Coelho MV. 2007b. Purification and partial characterization of myosin II from rat testis. *Int J Biol Macromol* 41:475-480.
- Espindola FS, Espreafico EM, Coelho MV, Martins AR, Costa FRC, Mooseker MS, Larson RE. 1992. Biochemical and Immunological Characterization of p190-Calmodulin Complex from Vertebrate Brain: A Novel Calmodulin-binding Myosin. *J Cell Biol* 118(2):359-68.
- Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D. 2006. New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(10):3681-6.
- Gharahdaghi F, Weinberg CR, Meagher DA, Imai BS, Mische SM. 1999. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis* 20(3):601-5.
- Greeb J, Shull GE. 1989. Molecular cloning of a third isoform of the calmodulin-sensitive plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPase that is expressed predominantly in brain and skeletal muscle. *J Biol Chem* 264(31):18569-76.
- Harris DA. 1989. Azide as a probe of co-operative interactions in the mitochondrial F1-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 974(2):156-62.
- Heinonen JK, Lahti RJ. 1981. A New and Convenient Colorimetric Determination of Inorganic Orthophosphate and Its Application to the Assay of Inorganic Pyrophosphatase. *Anal Bio* 113:313-7.
- Hirokawa N, Takemura R. 2005. Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci* 6(3):201-14.
- Kakko I, Toimela T, Tahti H. 2003. The synaptosomal membrane bound ATPase as a target for the neurotoxic effects of pyrethroids, permethrin and cypermethrin. *Chemosphere* 51(6):475-80.
- Kaplan JH. 2002. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem* 71:511-35.

- Kijima Y, Ogunbunmi E, Fleischer S. 1991. Drug action of thapsigargin on the Ca²⁺ pump protein of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 266(34):22912-8.
- Korn ED, Hammer JA, 3rd. 1988. Myosins of nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 17:23-45.
- Krendel M, Mooseker MS. 2005. Myosins: Tails (and Heads) of Functional Diversity. *Physiology* 20:239-251.
- Lacerda RF, Coelho MV. 2008. Partial characterization of ATPase from *Pachymerus nucleorum* (Fabricius) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) Larvae. *Neotrop. Entomol.* in press.
- Laemmli UK, Favre M. 1973. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events. *J Mol Biol* 80(4):575-99.
- Larson RE, Espindola FS, Espreafico EM. 1990. Calmodulin-regulated enzyme activities associated with brain actomyosin. *Journal of Neurochemistry* 54:1288-94.
- Lima JRO, Silva RB, Silva CCM, Santos LSS, Santos Jr JR, Moura EM, Moura CVR. 2007. Biodiesel de babaçu (*Orbignya* sp.) obtido por via etanólica. *Quimica Nova* 30(3):600-3.
- Lytton J, Westlin M, Hanley MR. 1991. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *J Biol Chem* 266(26):17067-71.
- May PH, Anderson AB, Balick MJ, Frazão JM. 1985. Subsistence benefits from the Babassu palm (*Orbignya martiana*). *Econ Bot* 39:113-29.
- Mermall V, Bonafe N, Jones L, Sellers JR, Cooley L, Mooseker MS. 2005. *Drosophila* myosin V is required for larval development and spermatid individualization. *Dev Biol* 286(1):238-55.
- Ostlund RE, Leung JT, Kipnis DM. 1978. Myosins of secretory tissues. *J Cell Biol* 77:827-36.
- Ping G, Yanping L, Shigui L. 2004. Effect of dp-B on ATPase activity of insect plasma membrane. *Pestic. Biochem. Physiol* 80:157-62.
- Plesner L. 1995. Ecto-ATPases: identities and functions. *Int Rev Cytol* 158:141-214.

- Richards TA, Cavalier-Smith T. 2005. Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature* 436(7054):1113-8.
- Royou A, Field C, Sisson JC, Sullivan W, Karess R. 2004. Reassessing the role and dynamics of nonmuscle myosin II during furrow formation in early *Drosophila* embryos. *Mol Biol Cell* 15(2):838-50.
- Spudich JA, Watt S. 1971. The Regulation of Rabbit Skeletal Muscle Contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J Biol Chem* 246:4866-71.
- Soares Melo HC, Coelho MV. 2007. A new method to precipitate myosin v from rat brain soluble fraction. *Acta Biochim Pol* 54(3):575-81.
- Soderlund DM, Bloomquist JR. 1989. Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annu Rev Entomol* 34:77-96.
- Southgate BJ. 1979. Biology of the Bruchidae. *Ann. Rev. Entomol.* 24:449- 473.
- Stokes DL, Wagenknecht T. 2000. Calcium transport across the sarcoplasmic reticulum: Structure and function of Ca²⁺-ATPase and the ryanodine receptor. *Eur J Biochem* 267(17):5274-9.
- Studier FW. 1973. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slabgels. *J Mol Biol* 79:237-48.
- Teixeira MA, Carvalho MG. 2007. Regulatory mechanism for biomass renewable energy in Brazil, a case study of the Brazilian Babassu oil extraction industry. *Energy* 32(6):999-1005.
- Trybus KM. 2008. Myosin V from head to tail. *Cell Mol Life Sci*:1-12.
- Vasilyeva EA, Minkov IB, Fitin AF, Vinogradov AD. 1982. Kinetic mechanism of mitochondrial adenosine triphosphatase. ADP-specific inhibition as revealed by the steady-state kinetics. *Biochem J* 202(1):9-14.
- Verma AK, Filoteo AG, Stanford DR, Wieben ED, Penniston JT, Strehler EE, Fischer R, Heim R, Vogel G, Mathews S and others. 1988. Complete primary structure of a human plasma membrane Ca²⁺ pump. *J Biol Chem* 263(28):14152-9.
- Warrick HM, Spudich JA. 1987. Myosin Structure and Function in Cell Motility. *Annu Rev Cell Biol* 3:379-421.

- Wheeler KP, Whittam R. 1962. Some properties of a kidney adenosine triphosphatase relevant to active cation transport. *Biochem J* 85:495-507.
- Yao Q, Chen LT, Bigelow DJ. 1998. Affinity purification of the Ca-ATPase from cardiac sarcoplasmic reticulum membranes. *Protein Expr Purif* 13(2):191-7.

Anexos

Anexo 1 – Preparação das larvas de *P. nucleorum*

O coco babaçu foi fixado em uma superfície rígida e então aberto com o auxílio de uma machadinha aplicada perpendicularmente ao maior comprimento do coco, de onde as larvas frescas foram extraídas. As larvas foram mobilizadas em placas de petri onde eram lavadas em água normal e água Mili-Q, em seguida cada larva era afixada em uma placa de isopor limpa com o uso de dois alfinetes, um na cabeça e um na região terminal da larva (figura 1). Com o auxílio constante de uma lupa, a larva foi cortada longitudinalmente por uma lâmina de bisturi com um corte leve e superficial. Outros dois alfinetes foram então afixados, separando os dois lados da larva. Neste momento é possível distinguir o sistema digestivo da larva e retirá-lo com segurança (figura 1). As larvas foram então imersas em tampão de extração e homogêneas em seguida.

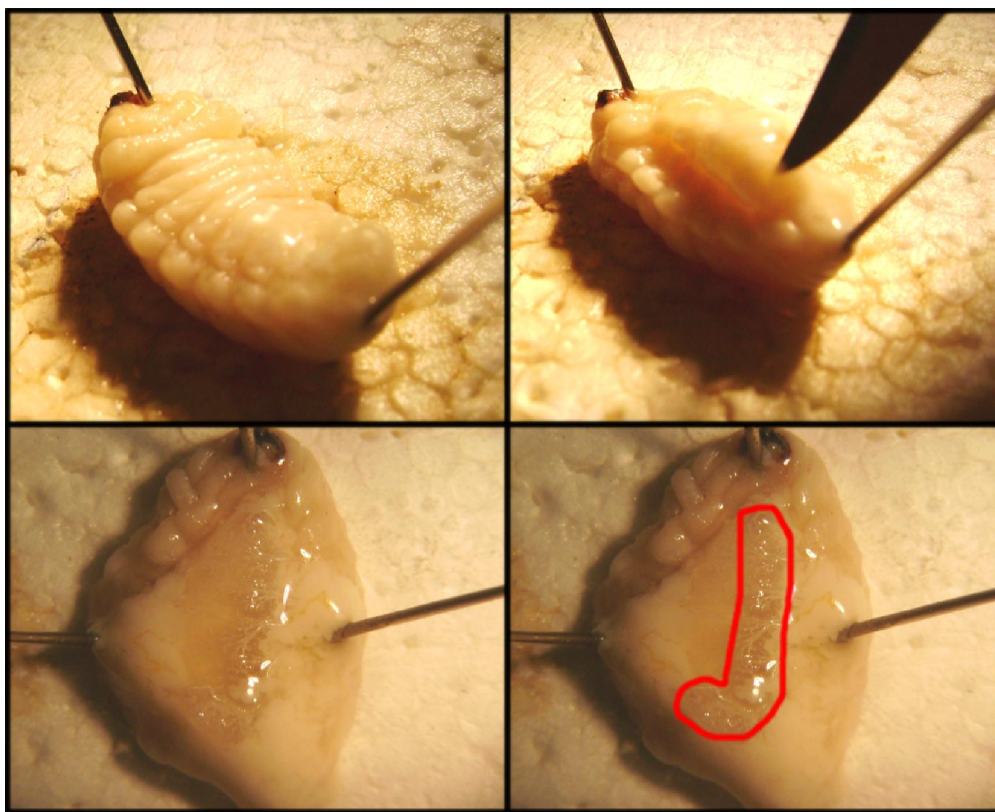


Figura 1: Fotos da dissecação da larva de *P. nucleorum*

O procedimento ilustrado foi realizado com todas as larvas antes da homogeneização, no intuito da retirada do sistema digestório, conforme material e métodos.

Anexo 2 – Determinação da atividade ATPase

Para os ensaios de atividade Ca^{2+} -ATPase, as amostras foram incubadas em meio de reação específico (meio de reação I) contendo: Imidazol-HCl 25 mmol.L^{-1} pH 7,5, EDTA 1 mmol.L^{-1} , DTT 1 mmol.L^{-1} , CaCl_2 5 mmol.L^{-1} e KCl 60 mmol.L^{-1} . A reação foi iniciada pela adição de $20 \mu\text{L}$ de ATP 10 mmol.L^{-1} com o volume final fixo em $200 \mu\text{L}$, sendo imediatamente incubada a uma temperatura de 37°C por um período de tempo pré-determinado de 20-25 minutos. Ao encerrar o tempo de incubação, foram acrescentados 2 mL de solução de dosagem AAM:

- 2 volumes de acetona
- 1 volume de molibdato de amônio 10 mmol.L^{-1}
- 1 volume de ácido sulfúrico 5 N

Ao se acrescentar a solução AAM, o mesmo foi agitado vigorosamente por cerca de 15 segundos em vórtex e recebeu $200 \mu\text{L}$ de ácido cítrico 1 mol.L^{-1} para interromper a reação, seguido por nova agitação de cerca de 10 segundos. Todos ensaios foram realizados em duplicatas, e foram analisados a uma absorvância de 355 nm em espectrofotômetro (HITACHI U-2000) usando cubetas de quartzo.

Para a confecção da curva padrão, uma curva de fosfato diácido de potássio (KH_2PO_4) foi feita onde diversas concentrações, geralmente de 0 a 250 nmoles, foram analisadas ao espectrofotômetro. Observa-se claramente que nesta faixa, a absorvância aumenta linearmente com o aumento de P_i (Figura 2). Os resultados das leituras, em nmoles de P_i , foram utilizados para o cálculo da atividade específica em nmoles de P_i por mg de proteína por minutos de incubação.

Para determinação do tempo ótimo de incubação da nossa amostra a atividade ATPase de S5 de *P. nucleorum* foi avaliada em diferentes tempos

(Figura 3). A atividade Ca^{2+} -ATPase de S5 parece ser constante ao longo de pelo menos 20 minutos de incubação, não apresentando inibição, desnaturação ou outros tipos que levam a diminuição da atividade enzimática.

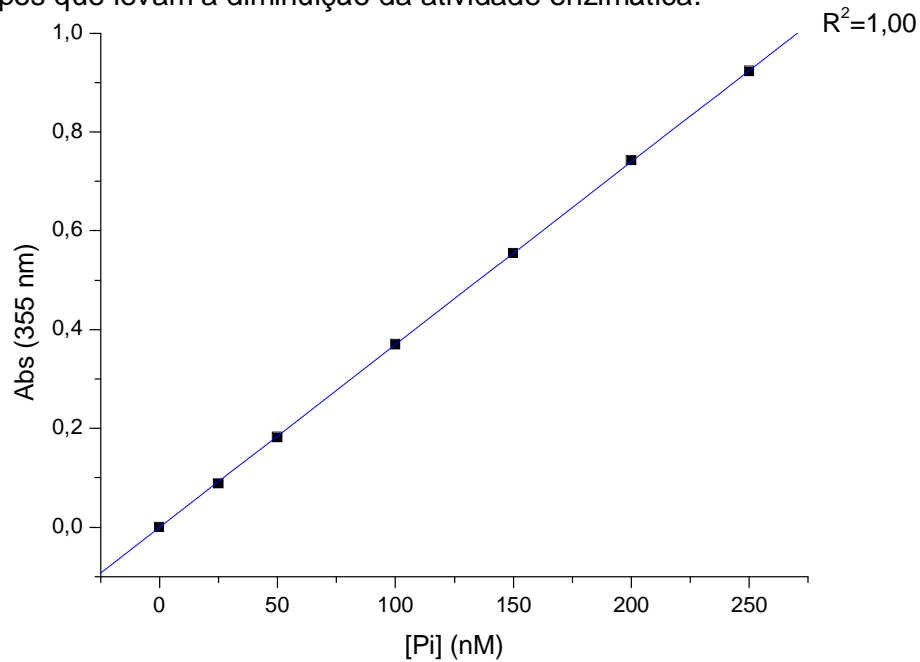


Figura 2: Curva padrão de fosfato (Pi), com coeficiente de linearidade (R^2)

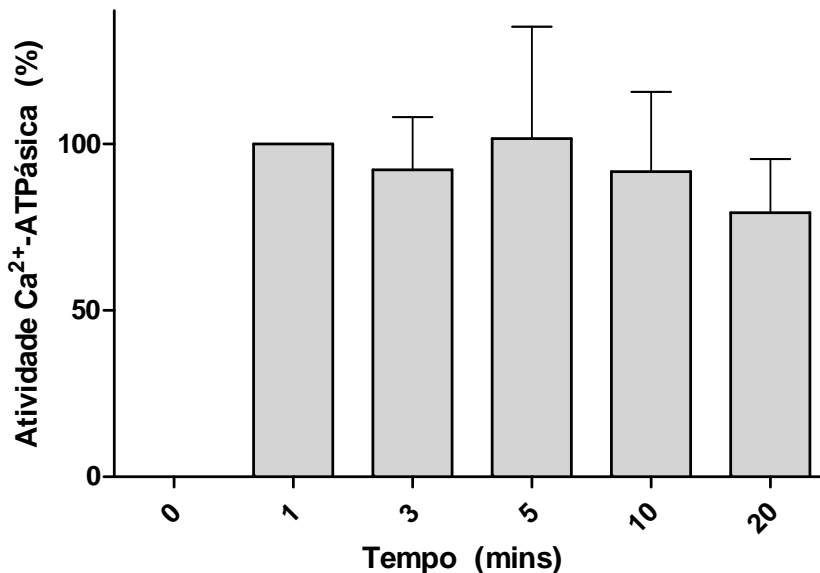


Figura 3: Atividade ATPase de S5 de acordo com o tempo.

Cerca de 2 μg de S5 foram incubados a 37°C por tempos variados (de 0 a 20 minutos) em meio de reação I (imidazol-HCl 25 mmol.L^{-1} pH 8,0, DTT 1 mmol.L^{-1} , EDTA 1 mmol.L^{-1} , CaCl_2 4 mmol.L^{-1} e KCl 60 mmol.L^{-1}). A reação foi iniciado com

a adição de ATP 1 mmol.L^{-1} e interrompida com a adição de 2 mL de solução de dosagem de fosfato (conforme material e métodos). As barras indicam erro padrão calculado para $n = 3$.

Anexo 3 - Dosagem de proteínas

A concentração de proteína das frações de interesse foi determinada segundo o método descrito por BRADFORD (1976). Alíquotas das respectivas frações foram previamente diluídas em 100 μL de água Mili-Q e posteriormente, completadas com a adição de 3 mL do Reagente de Bradford (coomassie Blue G 0,1 mg/mL, álcool etílico 4,75% e ácido fosfórico 8,5%). As determinações foram realizadas em duplicatas, lendo-se em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

Os valores encontrados para as amostras foram comparados a uma curva padrão (Figura 4) construída utilizando-se diferentes concentrações de albumina de soro bovino (BSA) para a determinação matemática da concentração de proteínas.

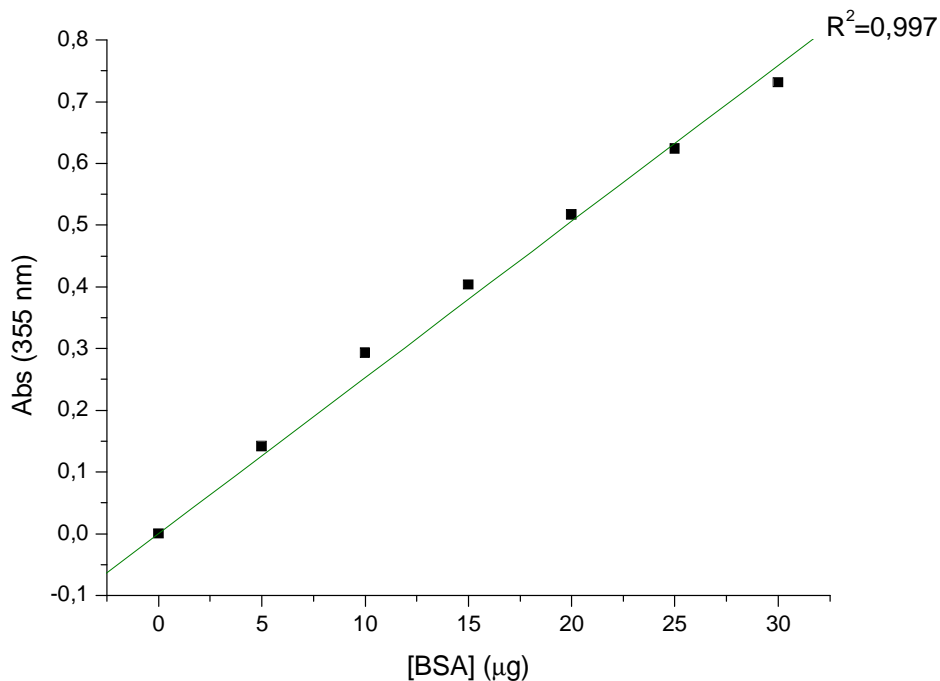


Figura 4: Curva padrão de proteína (BSA), com coeficiente de linearidade (R^2)

Anexo 4 - SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizada em placas de vidro e cerâmica de 10 x 10 x 0,06 cm de dimensões (Hofer®). As amostras a serem analisadas foram preparadas na proporção de 10:1 da fração em questão para o *tampão da amostra* (SDS 8,75%, Sacarose 600 mmol.L⁻¹, Tris HCl 50 mmol.L⁻¹ pH 6,8, β-mercaptoetanol 1,43 mol.L⁻¹, EGTA-K 10 mmol.L⁻¹ e azul de bromofenol). As amostras foram então aquecidas em banho maria a aproximadamente 100°C por no mínimo 2 minutos.

As amostras, após preparadas, foram aplicadas no gel utilizando microseringas (Hamilton®) de volume variável. Os géis foram preparados em uma concentração gradiente de 5 a 24% e para execução foram montados em uma cuba Hofer® Mighty Small II com tampão eletrodo (Tris-HCl 25 mmol.L⁻¹ pH 8,3, EDTA 2 mmol.L⁻¹, Glicina 200 mmol.L⁻¹ e SDS 2,5 mmol.L⁻¹). O gel foi então conectado à fonte (BIO-RAD Power Pac 1000), onde a eletroforese foi realizada sob uma corrente constante de 25 miliamperes.

Junto das amostras foi aplicado também um padrão de massa molecular (SDS-6H, Sigma®) que contém: cadeia pesada de miosina (205 kDa), β-galactosidase (116 kDa), fosforilase-b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa). Após a corrida o gel foi então corado com solução corante (Comassie Brilliant Blue – R-250 1,25 mg/mL, metanol 50% e ácido acético 40%) e posteriormente descorado com metanol 30% e ácido acético 10%.

Anexo 5 - Determinação da massa molecular de polipeptídeos

SDS-PAGE é freqüentemente utilizado para determinar a massa molecular relativa (Mr) de um polipeptídeo uma vez que sua migração em sistemas de gel desnaturantes é geralmente proporcional a massa do polipeptídeo. A estimativa do Mr dos polipeptídeos de interesse foi feita utilizando

uma curva plotada com a migração relativa (Rf) dos polipeptídeos presentes no padrão de massa molecular, e o logaritmo (log) de cada massa molecular correspondente (Figura 5). O valor de cada Rf foi obtido pela divisão da distância de migração dos padrões a partir da origem do gel pela distância de migração da origem do gel até a frente de corrida do gel. A massa molecular do polipeptídeo de interesse foi calculada pela leitura do Rf do mesmo no gráfico plotado com os polipeptídeos do padrão de massa molecular.

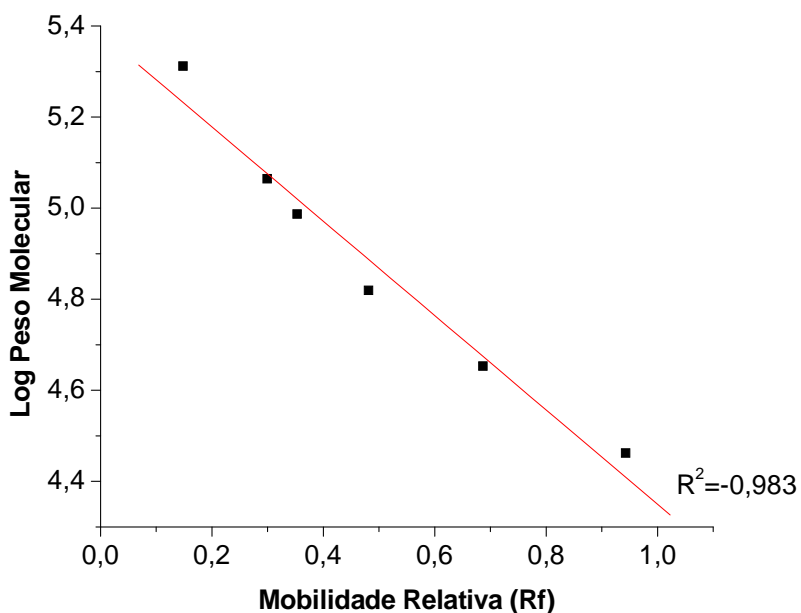


Figura 5: Curva padrão de determinação de massa molecular

Curva padrão de determinação de massa molecular com coeficiente de linearidade (R2). Padrões de massa molecular: cadeia pesada de miosina (205 kDa), β -galactosidase (116 kDa), fosforilase-b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa).

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](#)