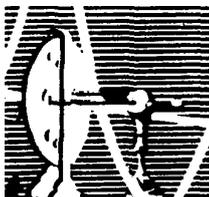


# **Fabio Mendonça Gomes**

ESTOQUE E MOBILIZAÇÃO DE POLIFOSFATO EM OVOS  
DE *RHODNIUS PROLIXUS* E *DROSOPHILA MELANOGASTER*

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO  
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO  
DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
COMO PRÉ-REQUISITO PARA OBTENÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOFÍSICA)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas  
Filho  
2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

ESTOQUE E MOBILIZAÇÃO DE POLIFOSFATO EM OVOS  
DE *RHODNIUS PROLIXUS* E *DROSOPHILA MELANOGASTER*  
**Fabio Mendonça Gomes**

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

Orientadores: Prof. Dr. Ednildo de A. Machado; Prof. Dr. Kildare Rocha de Miranda

Rio de Janeiro  
Julho de 2008

ESTOQUE E MOBILIZAÇÃO DE POLIFOSFATO EM OVOS DE *RHODNIUS PROLIXUS* E *DROSOPHILA MELANOGASTER*  
**FABIO MENDONÇA GOMES**

**Orientador: Prof. Dr. Ednildo de Alcantara Machado; Prof. Dr. Kildare Rocha de Miranda**

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

Aprovada por:

---

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

---

Prof. Dr. Kildare Rocha de Miranda  
Prof. Adjunto, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho / CCS / UFRJ

---

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

---

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

---

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

Revisor:

---

Profa Dra Ana Paula Cabral de Araujo Lima  
Prof. Adjunto, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho / CCS / UFRJ

Rio de Janeiro  
Agosto de 2008

# FICHA CATALOGRÁFICA

Gomes, F.M.

Estoque e Mobilização de Polifosfato em Ovos de *Rhodnius prolixus* e *Drosophila melanogaster* / Fabio Mendonça Gomes - 2008.

100 f: il.

Tese (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Rio de Janeiro, 2008

Orientador: Ednildo de Alcantara Machado, Kildare Rocha de Miranda

1. *Rhodnius prolixus*, 2. *Drosophila melanogaster*, 3. Acidocalcissomo, 4. Embriogênese; 5. Grânulo de Vitelo; 6. Polifosfato; 7. Protease. I. Machado, Ednildo de Alcantara. II. Miranda, Kildare Rocha de. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). IV. Título.

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

## **Agradecimentos**

Os meus pais, Francisco e Dora e irmãos Vitória e Sérgio. Que me apoiaram durante todo este período e souberam sempre compreender todas as variações de humor que houveram.

Aos meus orientadores Ednildo e Kildare, por confiarem e acreditarem no meu potencial. E por estarem sempre dispostos a gastar uma parte importante do seu tempo dedicando-os à minha orientação.

À Dra Suzete Bressan, pela ajuda, paciência e dedicação. Por sua colaboração no campo da Estatística e Taxonomia e Filogenia de Insetos.

Aos meus companheiros e ex-companheiros de laboratório Danielle, Isabela, Lucimar e Marcelo pelo companheirismo e conversas divertidas. E por sempre estarem dispostos a discutir os dados.

À Dra Ana Paula e aos membros do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Proteases. Por toda a prestatividade, colaboração e momentos de divertidas conversas.

Aos professores e alunos do Laboratório de Bioquímica de Insetos, Laboratório e Artrópodos e Hematófagos, e Laboratório de Biologia e Ultraestrutura Celular Hertha Meyer por terem sido sempre extremamente prestativos e terem sempre deixado as portas abertas para utilização de qualquer aparelho ou reagente que fosse preciso.

*Aos meus pais, que por meio de suor, me trouxeram até aqui,*

*Dedico*



## RESUMO:

### ESTOQUE E MOBILIZAÇÃO DE POLIFOSFATO EM OVOS DE *RHODNIUS PROLIXUS* E *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Fabio Mendonça Gomes

Orientador: Prof. Dr. Ednildo de Alcantara Machado, Kildare Rocha de Miranda

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

O Polifosfato Inorgânico (PoliP) é uma molécula descrita em diversos organismos. Apesar da ampla descrição, sua função durante a embriogênese permanece pouco compreendida. O presente trabalho visou estudar o acúmulo e as variações de PoliP durante a embriogênese de *Rhodnius prolixus* e de *Drosophila melanogaster*. Em *R. prolixus*, observou-se por meio de técnicas enzimáticas que PoliP está armazenado principalmente sob a forma de polímeros de cadeia curta. Quando a variação de PoliP, obtida por técnicas espectrofluorimétricas, foi comparada com a variação de fosfato (Pi) e  $Ca^{+2}$ , verificou-se que havia uma alta correlação entre eles sugerindo uma co-regulação. A visualização dos locais de estoque de PoliP com DAPI evidenciou o armazenamento em vesículas de 0,5  $\mu$ m, tamanho bastante reduzido quando comparadas a grânulos de vitelo. Estas pequenas vesículas também possuem cálcio e outros átomos metálicos em sua matriz. Como a redução dos níveis de PoliP durante o período estudado era concomitante ao início de processos de fusão entre vesículas, a ativação de hidrolases e a degradação de proteínas de vitelo, verificamos a relação destes eventos com o metabolismo de PoliP durante a embriogênese. A presença de PoliP em ensaios de espectrofluorimetria foi capaz de inibir a atividade de proteases aspárticas responsáveis pela degradação das proteínas de reserva que estão estocadas dentro do ovo. PoliP também inibiu a degradação de proteínas de vitelo em ovos de dia 3 em ensaios *in vitro*. A indução de processos de fusão resultou na degradação de frações do polímero presente em

Grânulos de Vitelo. A indução de da antecipação da degradação de vitelo a partir de infecção fúngica, também levou a antecipação da degradação de PoliP em ovócitos vitelogênicos. Em *D. melanogaster*, PoliP estava presente em polímeros de cadeia curta. Por microscopia de fluorescência, identificamos o acúmulo de PoliP vesículas acídicas. Quando analisadas por microanálise de elementos, observamos que estas vesículas possuíam grande estoque de fósforo e cálcio. Estas propriedades sugerem que estas vesículas pertençam a família dos acidocalcissomos, organelas descritas inicialmente em tripanosomatídeos e que, hoje, acredita-se estarem presentes em diversos modelos.

Palavras-chave: *Rhodnius prolixus*, *Drosophila melanogaster*; Acidocalcissomo; Embriogênese; Grânulo de Vitelo; Polifosfato; Protease.

## **ABSTRACT:**

### **POLYP STORAGE IN THE EGGS OF *RHODNIUS PROLIXUS* AND *DROSOPHILA MELANOGASTER***

Fabio Mendonça Gomes

Advisor: Prof. Dr. Ednildo de Alcantara Machado, Prof. Dr. Kildare Rocha de Miranda.

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

Inorganic Polyphosphate (PolyP) is a molecule described among different organism. Despite growing attention, its functions during embryogenesis remain unknown. The present work studied the storage and mobilization of PolyP during the embryogenesis of *Rhodnius prolixus* and *Drosophila melanogaster*. By enzymatic assays, it was observed the storage of PolyP mainly in smaller polymers. PolyP variation was obtained by spectrofluorimetric assays and compared against the variation of  $\text{Ca}^{+2}$  and phosphate (Pi). Under these procedures, there was a strong correlation between both PolyP and  $\text{Ca}^{+2}$  and PolyP and Pi. PolyP storage was detected by DAPI in ranging from 0,5  $\mu\text{m}$  and 1,0  $\mu\text{m}$ . Those vesicles had phosphorous, calcium and other metals stored inside its matrix. As PolyP mobilization occurred at the same moment of fusion process, hydrolases activation and yolk mobilization, we tested that hypothesis that PolyP could modulate those factors. Fluorimetric assays evidenced the inhibition of an aspartic protease responsible for yolk mobilization by PolyP. PolyP also inhibited the yolk protein mobilization *in vitro* under acid incubation. A fusion event was related to PolyP degradation. Fungal infection, a phenomenon previously

described to trigger yolk mobilization, also triggered PolyP mobilization. PolyP storage in the eggs of *D. melanogaster* was mainly present in smaller polymers and occurred in acidic vesicles. Microanalyses of those vesicles determined the presence of significant amounts of phosphorus and calcium. These results suggest that, in *D. melanogaster*, PolyP is mainly stored in acidocalcisomes that are organelles described initially in tripanosomatids and now believed to be present in different organisms.

Keywords: *Rhodnius prolixus*, *Periplaneta americana*, Acidocalcisome, Embryogenesis, Yolk Granules, Polyphosphate, Protease.

## **Lista de ilustrações**

**Figura 1** – *Drosophila melanogaster*

**Figura 2** – *Rhodnius prolixus*

**Figura 3** – Captação de Proteínas de Vitelo durante a Fase Vitelogênica

**Figura 4** – Estrutura do Ovócito de *R. prolixus*

**Figura 5** – Bombas de H<sup>+</sup>

**Figura 6** – Inibição de Catepsina D em ovos de *R. prolixus*

**Figura 7** – Polifosfato Inorgânico

**Figura 8** – Acidocalcissomos

**Figura 9** – PoliP se Acumula Principalmente em Frações de Cadeia Curta em Ovos de Dia 0

**Figura 10** – Variação de PoliP Durante a Embriogênese

**Figura 12** – Correlação entre PoliP e Ca<sup>+2</sup>

**Figura 13** – Armazenamento de PoliP em Pequenas Vesículas

**Figura 14** – Microanálise de Vesículas Armazenadoras de PoliP

**Figura 15** – Inibição da Degradação de Peptídeo Fluorescente em Extrato Ácido de Ovo por Pepstatina A.

**Figura 16** – Inibição de Protease Aspártica por PoliP

**Figura 17** – Modulação por Cargas Negativas e Cátions Divalentes

**Figura 18** – Modulação Mediada por PoliP na Degradação de Proteínas de Vitelo

**Figura 19** – Modulação de PoliP por Fusão Mediada por Ca<sup>+2</sup>

**Figura 20** – PoliP em Folículos Ovarianos após Infecção Fúngica

**Figura 21** – Acidificação de Vesículas Visualizadas por Laranja de Acridina em *Drosophila melanogaster*.

**Figura 22** – Microanálise de Vesículas Acídicas

**Figura 23** – Acúmulo de PoliP em GVs de *D. Melanogaster*.

## Lista de Abreviaturas

ATP – Trifosfato de Adenosina

DAPI – 6-diamidino-2-fenilindol

EDTA - Acido Etilenodiamino Tetra-acético

EGTA - Acido Etilenoglicol Tetra-acético

EH – Extrato Ácido de Ovo

GV – Grânulo de Vitelo

LC – PoliP de Cadeia Longa

Pi - Ortofosfato

PoliP – Polifosfato Inorgânico

PoliP<sub>75</sub> – Polifosfato de Sódio de 75 Resíduos

PoliP<sub>15</sub> – Polifosfato de Sódio de 15 Resíduos

PPi - Pirofosfato

PPK – Polifosfato Kinase

PPN - Endopolifosfatase

PPX - Exopolifosfatase

SC – Polifosfato de Cadeia Curta

scPPX – Exopolifosfatase Recombinante de *Saccharomyces cerevisiae*

SG – Suspensão de Grânulos

VG - Vitelogenina

VT - Vitelina

WSF – Fração Solúvel em Água

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1 Radiação evolutiva dos Insetos e Desafio a Vida Moderna</b> .....	<b>2</b>
1.1.1 <i>Drosophila melanogaster</i> .....	3
1.1.2 <i>Rhodnius prolixus</i> .....	6
1.1.4 Mobilização de Proteínas de Vitelo .....	12
1.1.5 Populações de grânulo de vitelo e mobilização de macromoléculas.....	15
<b>1.3 Polifosfato</b> .....	<b>18</b>
1.3.1 Síntese e Degradação de PoliP em Procariotos.....	21
1.3.2 Síntese e Degradação de PoliP em Eucariotos.....	22
1.3.3 Funções de PoliP .....	23
1.3.4 Armazenamento de PoliP e Acidocalcissomos.....	26
1.3.5 PoliP em Artrópodes.....	29
<b>Objetivos</b> .....	<b>30</b>
<b>2.1 Objetivos Gerais</b> .....	<b>30</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>30</b>
<b>3. Material e Métodos</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1 Reagentes</b> .....	<b>31</b>
<b>3.2 <i>Rhodnius prolixus</i></b> .....	<b>31</b>
<b>3.4 Suspensão de Grânulos (SG)</b> .....	<b>32</b>
<b>3.5 Extração de PoliP de Cadeia Curta e Cadeia Longa e Cadeia</b> .....	<b>33</b>
<b>3.6 Dosagem de PoliP com PPX ou Azul de Toluidina</b> .....	<b>34</b>
<b>3.7 Extração de Fração Solúvel em Água</b> .....	<b>34</b>
<b>3.8 Variação de PoliP e Pi Durante a Embriogênese</b> .....	<b>35</b>
<b>3.9 Observação de Armazenamento de PoliP com Microscopia de Fluorescência</b>	<b>36</b>
<b>3.10 Microanálise de Suspensões de Grânulos</b> .....	<b>36</b>
<b>3.11 Atividade Peptidásica sobre Substrato Sintético Fluorescente</b> .....	<b>37</b>
<b>3.12 Degradação de Proteínas de Vitelo <i>in vitro</i></b> .....	<b>37</b>
<b>3.13 Determinação dos Níveis de PoliP após Ensaio de Fusão de Grânulos de Vitelo</b> .....	<b>38</b>
<b>3.14 Desafio Fúngico</b> .....	<b>38</b>
<b>3.15 Observação de Eventos de Acidificação de Grânulos de Vitelo</b> .....	<b>39</b>
<b>4. Resultados</b> .....	<b>40</b>
<b>4.1 Detecção e Análise dos Níveis de PoliP</b> .....	<b>40</b>
<b>4.2 Localização de PoliP</b> .....	<b>46</b>
<b>4.3 Atividade Peptidásica e Modulação por PoliP</b> .....	<b>49</b>
<b>4.4 Polifosfato e Acidocalcissomos em <i>D. melanogaster</i></b> .....	<b>60</b>
<b>5. Discussão</b> .....	<b>64</b>
<b>5.1 <i>Rhodnius prolixus</i></b> .....	<b>64</b>
<b>5.2 <i>Drosophila melanogaster</i></b> .....	<b>72</b>
<b>6. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>74</b>

## **1. Introdução**

### **1.1 Radiação evolutiva dos Insetos e Desafio a Vida Moderna**

A classe Insecta, constituinte do filo Arthropoda, é o grupo animal mais abundante e diverso que se conhece possuindo aproximadamente um milhão de representantes. Durante a evolução, este grupo passou por uma grande radiação evolutiva e atualmente habita quase todos os ambiente terrestres ou dulcícolas (BRUSCA *et al.*, 2003). Esta grande capacidade de ocupação está, em grande parte associada ao potencial reprodutivo deste grupo que é capaz de gerar um grande número de indivíduos em um intervalo de tempo bastante curto.

Sendo um grupo tão diverso, os insetos interagem com diversos outros grupos, incluindo a espécie humana e organismos de interesse econômico. Em diversos casos, como a produção de produtos tais como o mel e a seda, esta interação é benéfica. No entanto, em um outro número de eventos, estas interações podem ser bastante prejudiciais ao homem. Os insetos são vetores de diversas doenças e pragas agrícolas, provocando um grande número de doenças ao homem e outros animais de importância agropecuária, principalmente em países tropicais, e consumindo significativa parte da produção mundial de alimentos. Desta forma, em diversas situações o controle da proliferação de insetos é essencial e seu sucesso pode significar grandes ganhos sociais e econômicos. Diferentes estratégias de controle estão estabelecidas e a modulação do potencial reprodutivo durante o processo de formação do ovo (ovogênese) ou durante a formação do embrião (embriogênese) é uma das mais interessantes.

### 1.1.1 *Drosophila melanogaster*

Pertencente a ordem Diptera, a mosca *Drosophila melanogaster* (Fig 1 A) é um dos principais modelos animais utilizados em estudos de Genética, Evolução, Fisiologia e Desenvolvimento. Diversas vantagens explicam sua utilização – tamanho reduzido, facilidade de manutenção em cultura de laboratório, curto ciclo de vida, presença de cromossomos politênicos, ausência de recombinação meiótica em machos e um genoma pequeno e seqüenciado (ALBERTS, 2002).

Seu aparelho reprodutivo feminino, assim como em outros insetos, é basicamente composto por um ovário organizado em ovariolos, estruturas em filamento onde os ovócitos, células que se transformarão em ovos após a fecundação e ovoposição, estão dispostas (Fig 1 B). Os ovariolos são divididos em duas regiões principais – o trofário, onde estão presentes as células germinativas (oogonias) e o vitelário, onde ocorre o crescimento e amadurecimento do ovócito (Fig 1 B) (BÜNING, 1994). Cada oogonia se divide 4 vezes produzindo 16 clones que permanecem em contato através de canais citoplasmáticos. Um complexo sistema de sinalização irá determinar a diferenciação de apenas um destes 16 clones em ovócito. As 15 células restantes irão se diferenciar em células nutridoras (“nurse cells”) especializadas no fornecimento das moléculas necessárias ao ovócitos em crescimento (KERKUT *et al.*, 1985). Em *D. melanogaster*, as “nurse cells” estão envolvidas, juntas ao ovócito em desenvolvimento, por uma monocamada de células conhecida como epitélio folicular (Fig 1 C). O epitélio folicular, por sua vez, é responsável pela síntese das proteínas do córion (precursor da casca do ovo) que irá se depositar sobre os ovos durante a fase de coriogênese, no final da ovogênese. Esta arquitetura descrita é

conhecida como meroística politrófica e se diferencia pelo fato das “nurse cells” permanecerem próximas ao ovócito durante o seu desenvolvimento (BÜNING, 1994). Após a coriogênese, o ovócito é fertilizado e o ovo é posto no ambiente, iniciando o período de embriogênese que, em *D. melanogaster*, dura entre 12 e 15 horas. Ao final do período, o embrião eclode e se inicia o período de desenvolvimento larval.

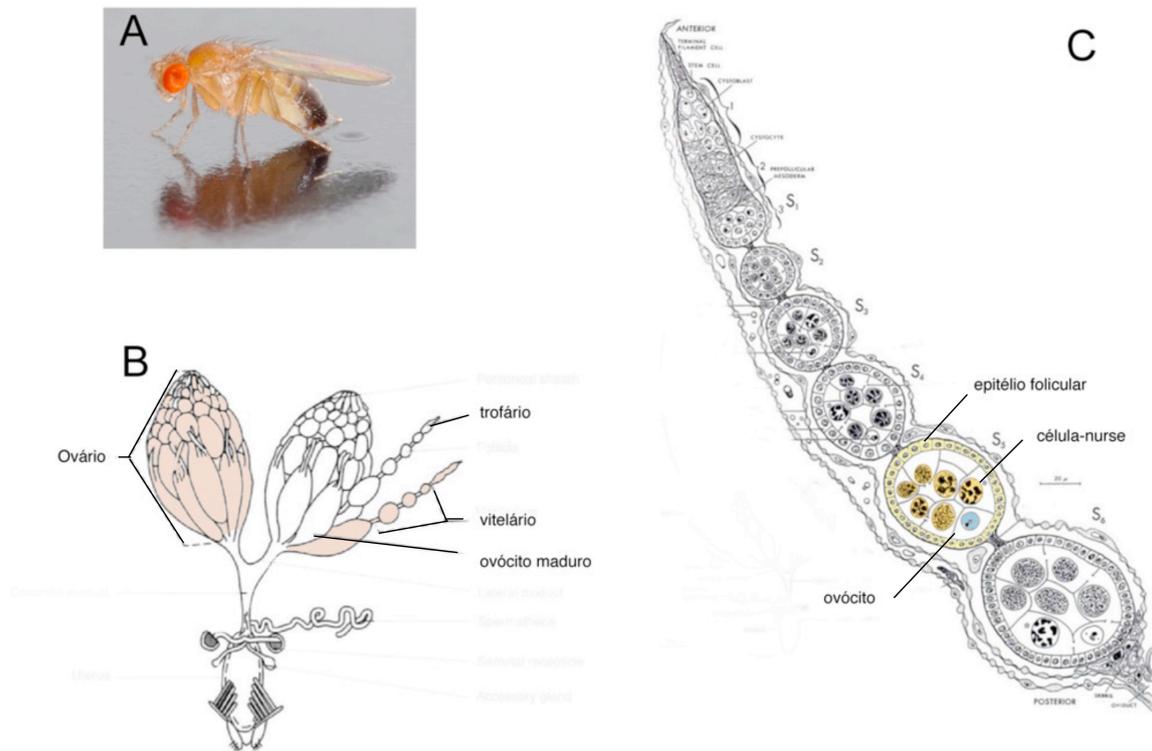


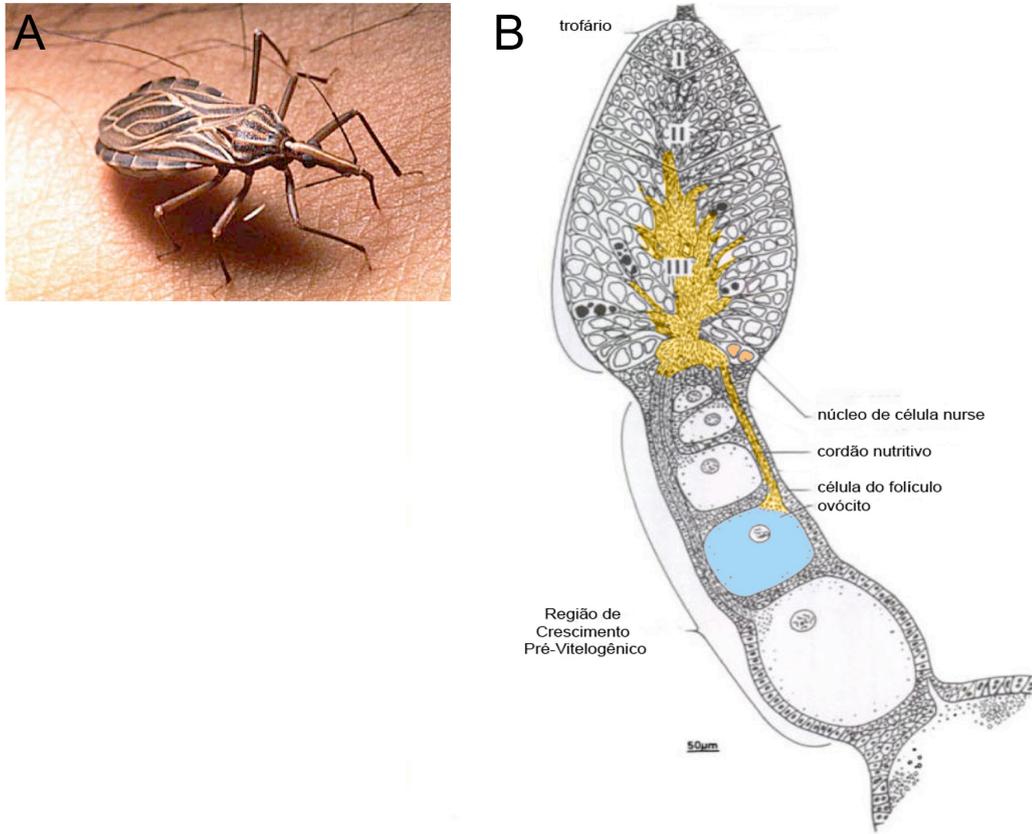
Figura 1: *Drosophila melanogaster*

(A) Exemplar da mosca *Drosophila melanogaster*; (B) Modelo esquemático do aparelho reprodutivo feminino típico de insetos. Os ovários se organizam em ovaríolos, contendo duas regiões principais, o vitelário e o trofário. Os ovócitos passam por diferentes estágios de crescimento ao longo do ovaríolo e na região terminal do ovaríolo estão presentes os ovócitos maduros (C) Modelo esquemático de um ovário típico de um sistema meroístico politrófico. O epitélio folicular envolve as células nurse e os ovócitos (modificado de Jürgen Büning, 1994 - *The Insect Ovary*).

### 1.1.2 *Rhodnius prolixus*

Pertencente a ordem Hemiptera, o inseto hematófago *Rhodnius prolixus* (Fig 2 A) é um importante vetor da Doença de Chagas nas Américas do Sul e Central. Devido à possibilidade de sincronização do ciclo reprodutivo a partir do disparo pelo repasto sanguíneo, ele é também um modelo de fisiologia reprodutiva.

O ovário de *R. prolixus* é do tipo meroístico telotrófico e algumas características o diferencia da organização ovariana encontrada em *D. melanogaster*. Em *R. prolixus*, as “nurse cells” não co-migram com o ovócito, permanecendo na região do trofário em contato com os ovócitos em crescimento a partir de um cordão nutritivo por onde moléculas geradas pelas “nurse cells” migram até o ovócito em crescimento. Assim, somente o ovócito se encontra envolvido pelo epitélio folicular (Fig 2 B) (BÜNING, 1994). A duração do período de embriogênese de *R. prolixus* é de 14 dias, aproximadamente.



**Figura 2: *Rhodnius prolixus***

(A) Exemplar do barbeiro *Rhodnius prolixus*; (B) Estrutura típica da região de crescimento pré-vitelogênico de um ovário meroístico telotrófico. As células-nurse permanecem no trofário e mantém o contato com o ovócito por um cordão nutritivo. O epitélio folicular isola somente o ovócito. (modificado de Jürgen Büning, 1994 - The Insect Ovary)

### **1.1.3 Captação de Moléculas da Hemolinfa e Formação de Grânulos de Vitelo Durante a Ovogênese**

Os ovócitos se dividem em 3 estados principais de desenvolvimento ao longo do ovariolo: a pré-vitelogênese, a vitelogênese e a coriogênese.

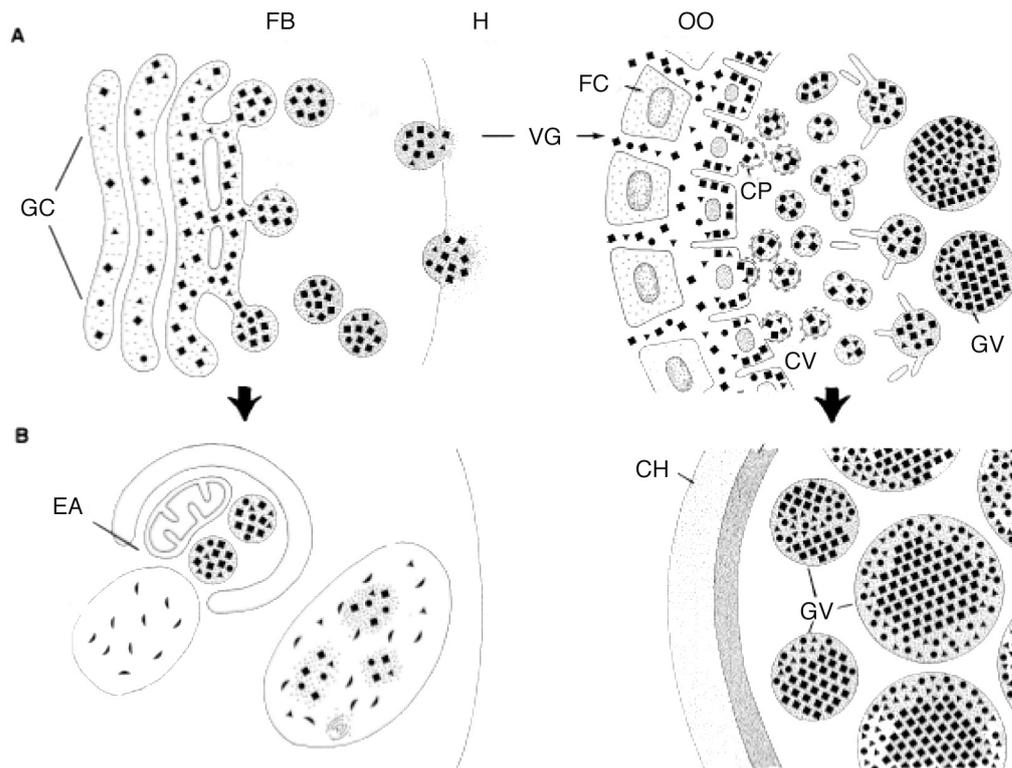
Na porção mais próxima ao trofário, estão presente ovócitos que passam por um primeiro momento de crescimento. Este lento crescimento ocorre principalmente a partir da incorporação de macromoléculas sintetizadas pelas “nurse cells” que se comunicam com o ovócito através de canais citoplasmáticos e células foliculares (HUEBNER *et al.*, 1972; HUEBNER, 1981; BÜNING, 1994).

Ao entrar na vitelogênese, o crescimento do ovócito ocorre principalmente devido ao acúmulo de nutrientes que serão mobilizados pelo embrião durante a embriogênese para a formação de sua próprias moléculas (RAIKHEL *et al.*, 1992; VALLE, 1993). Assim, os ovócitos em crescimento captam uma grande quantidade de lipídeos e de proteínas da hemolinfa, o líquido circulante dos insetos (SNIGIREVSKAYA *et al.*, 1997) que atravessam espaços intercelulares conhecidos como patência presentes em células foliculares de ovócitos vitelogênicos. (OLIVEIRA *et al.*, 1986; RAIKHEL e DHADIALLA, 1992; WANG *et al.*, 1998). A vitelogenina (VG) é a principal proteína acumulada durante este período. Sintetizada pelo corpo gorduroso, um órgão biossintético com características análogas ao fígado de vertebrados, ela será a principal proteína de reserva utilizada pelo embrião (RAIKHEL e DHADIALLA, 1992). Na superfície dos ovários, a VG, assim como outras proteínas, é captada por um processo de endocitose mediada por receptores e internalizada por meio da formação de “coated-pits” e “coated-vesicles” (SNIGIREVSKAYA, HAYS *et al.*, 1997;

MACHADO *et al.*, 1998; RAIKHEL *et al.*, 2002) (Fig 3). Uma vez dentro do ovócito, a VG passa a ser chamada de Vitelina (VT). Existe ainda uma outra via de síntese mediadas por células do epitélio folicular de onde são exportadas para dentro dos ovócitos (MELO *et al.*, 2000).

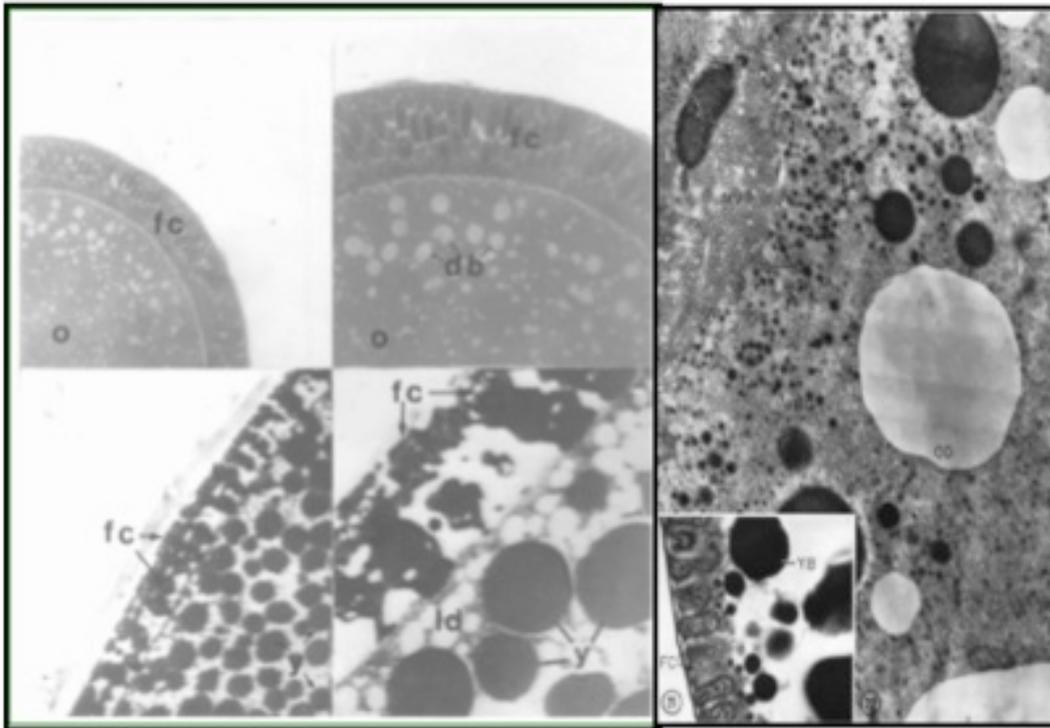
Durante a vitelogênese, são formadas organelas conhecidas como Grânulos de Vitelo (GV) (Fig 4), responsáveis por armazenar VT em sua matriz. Além do estoque de VT, os GVS armazenam hidrolases (NUSSENZVEIG *et al.*, 1992; LIU *et al.*, 1998; YAMAHAMA *et al.*, 2003) com similares às hidrolases lisossomais (FAGOTTO, 1995) e possuem bombas de prótons ( $H^+$ ) em sua membrana, tais como  $H^+$ -ATPases (BOHRMANN *et al.*, 1999; FAUSTO *et al.*, 2001) e  $H^+$ -PPases (MOTTA *et al.*, 2004).

A coriogênese é a última etapa pela qual os ovócitos passam antes de serem fertilizados. Neste momento, as patências se fecham e vários precursores do córion são sintetizados, conferindo proteção mecânica e contra perda de água ao ovócito já desenvolvido (WARING *et al.*, 1979; MELO, VALLE *et al.*, 2000; FAKHOURI *et al.*, 2006). Em seguida, ocorre a degeneração do epitélio folicular através de morte celular programada (BAUM *et al.*, 2005).



**Figura 3: Captação de Proteínas de Vitelo durante a Fase Vitelogênica**

(A) Produção e captação de proteínas de vitelo. As proteínas de vitelo são produzidas pelo corpo gorduroso e transportadas pela hemolinfa até o ovário onde são reconhecidas por receptores específicos na membrana do ovócito vitelogênico e endocitadas (B) Final da captação de proteínas de vitelo. Ao entrar na fase coriogênica, o corpo gorduroso cessa a produção de proteínas de vitelo e os ovócitos interrompem o processo de endocitose. Neste momento os GV já estão bem estruturados. FB – Corpo Gorduroso, H – Hemolinfa, OO – Oócito, GC – Complexo de Golgi, VG – Vitelogenina, FC – Célula Folicular, OO – Ovócito, CP – Coated Pits, CV – Coated Vesicles, GV – Grânulo de Vitelo, EA – Autofagossomo, CH – Corion (Modificado de Snigirevskaya et al, 1997).



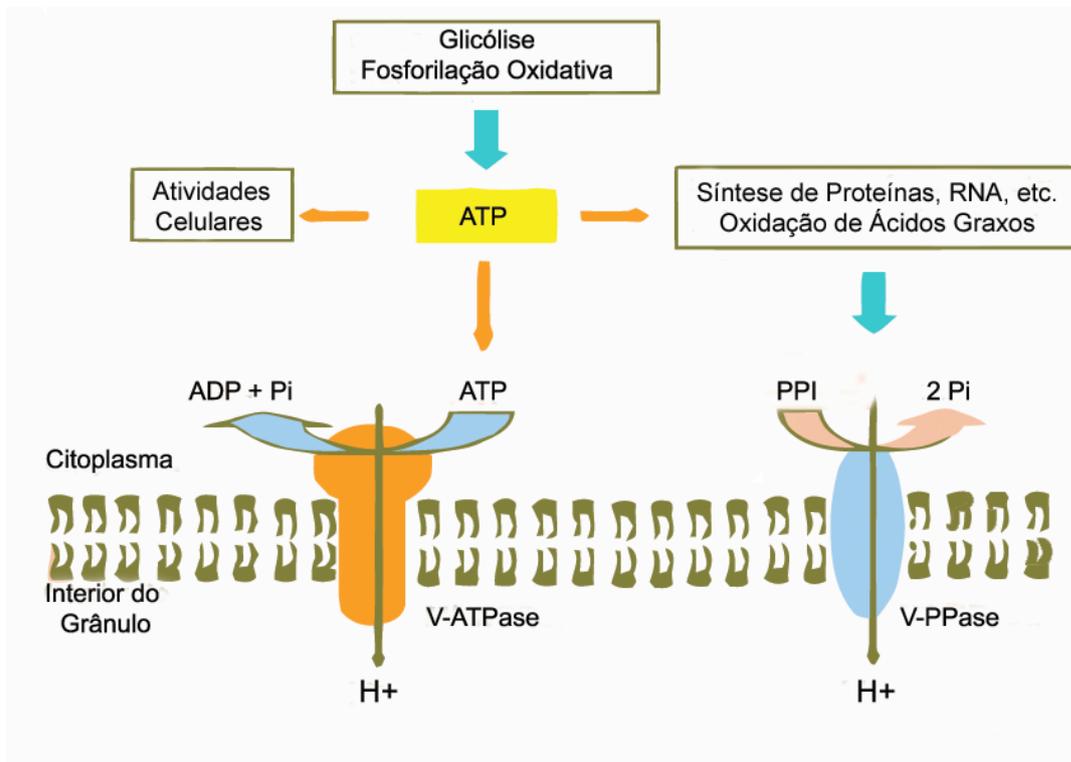
**Figura 4: Estrutura do Ovócito de *R. prolixus***

Durante o crescimento e amadurecimento dos ovócitos, uma grande quantidade de estruturas conhecidas como Grânulos de Vitelo são produzidas e são responsáveis pelo estoque das proteínas de vitelo e suas respectivas hidrolases. FC – Célula Folicular, O – Ovócito, LD – Gotículas de Lipídeo, Y – Grânulos de Vitelo.

#### 1.1.4 Mobilização de Proteínas de Vitelo

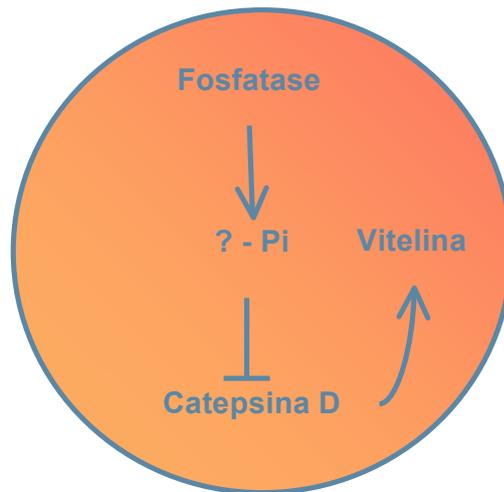
Após a fertilização, o embrião irá gradualmente iniciar um processo de mobilização dos nutrientes armazenados durante a ovogênese (FIALHO *et al.*, 2005). Esses nutrientes são degradados em moléculas tais como aminoácidos e monossacarídeos que serão, por sua vez, utilizados como precursores pelo embrião durante a síntese de suas próprias moléculas. Neste momento se inicia o processo de acidificação mediado por  $H^+$ -ATPases (FAGOTTO, 1995) e  $H^+$ -PPases (MOTTA, DA SILVA *et al.*, 2004) (Fig 5). A acidificação resulta, por sua vez, na ativação das pró-enzimas proteolíticas armazenadas nos GVs que iniciam o processo de mobilização da VT.

A mobilização de VT é um processo bem regulado durante a embriogênese. Em *R. prolixus*, a mobilização da VT se inicia a partir do dia 3 de embriogênese. Neste caso, a mobilização da VT depende da atividade de uma protease aspártica do tipo Catepsina D (NUSSENZVEIG, OLIVEIRA *et al.*, 1992). No entanto, a inibição de fosfatases ácidas pela adição de NaF acarreta na inibição da degradação de vitelo *in vitro* de forma similar à que ocorre a partir da inibição da Catepsina D por pepstatina A. Assim, a degradação das proteínas de vitelo parece ser dependente da cooperação entre fosfatases ácidas e proteases aspárticas presentes no ovo (FIALHO, NAKAMURA *et al.*, 2005). Apesar de ainda não terem sido identificados, sabe-se que os substratos destas fosfatases ácidas não são nem a VT, nem a Catepsina D (FIALHO, NAKAMURA *et al.*, 2005) (Fig 6).



**Figura 5: Bombas de Próton ( $H^+$ ) presentes nas membranas dos GVs.**

Bombas de  $H^+$  tais como  $H^+$ -ATPases e  $H^+$ -PPases utilizam a energia obtida a partir da degradação de seu substrato para transportar  $H^+$  contra o seu gradiente de concentração. Estas bombas são responsáveis pela acidificação de GV de insetos (adaptado de Maeshima, 2000).



**Figura 6: Inibição da Catepsina D nos GV de *R. prolixus* durante o início da embriogênese**

Dentro dos GV, um composto fosfato não-identificado é responsável pela inibição da Catepsina D presente em ovos de *R. prolixus*. No início da embriogênese, a ativação da Fosfatase Ácida degrada este componente. Desta forma, a Catepsina D, não mais inibida, inicia o processo de mobilização das proteínas de vitelo.

### **1.1.5 Populações de grânulo de vitelo e mobilização de macromoléculas**

A formação de GVs passa por diferentes rotas de acúmulo de proteínas, provavelmente envolvendo diferentes endereçamentos pós-endocíticos. Assim, gera-se um ovócito maduro com uma população de grânulos de vitelo de tamanho e densidade variáveis. Já foram descritas algumas diferenças de composição de moléculas em populações de vesículas de algumas espécies de inseto. Em *Bombyx mori*, as hidrolases estão presentes nos GVs pequenos, isoladas das proteínas de vitelo, presentes em grânulos relativamente maiores (YAMAHAMA, UTO et al., 2003). Em *Carausius morosus*, os GVs pequenos foram mais frequentemente encontrados acidificados e se acumulam ao redor de GVs grandes (FAUSTO, GAMBELLINI et al., 2001). Um processo de fusão mediado por  $Ca^{+2}$  parece ser um evento conservado e já foram demonstrados em *R. prolixus* e *P. americana*. (RAMOS et al., 2006; RAMOS et al., 2007b). Estes processos, poderiam promover a fusão entre diferentes compartimentos especializados. Especificamente em *R. prolixus*, a fusão de vesículas é um processo essencial para o início da degradação do vitelo e envolve a transferência para dentro dos GVs das fosfatases ácidas e bombas de  $H^+$  originalmente presentes nos grânulos pequenos (RAMOS et al., 2007a).

## 1.2 Metabolismo de Fosfato e Homeostase de Fósforo

A disponibilidade de fósforo é um fator limitante para o crescimento de diversos organismos, principalmente durante períodos de desenvolvimento acelerado (ELSER *et al.*, 1996; WOODS *et al.*, 2003). Essa limitação está relacionada com a montagem de uma grande quantidade de ribossomos, necessários para manutenção dos níveis transcricionais durante este período, uma vez que sua massa total possui 10% de fósforo (WOODS *et al.*, 2002; WOODS *et al.*, 2004; GILLOOLY *et al.*, 2005). O fósforo participa também da estrutura de moléculas essenciais no metabolismo energético. Por exemplo, a síntese de nucleotídeos trifosfatados (ATP, GTP, CTP, UTP) depende da ligação de grupamentos fosfato a uma pentose. Ele é também um componente estrutural de fosfolípidos, elementos majoritários da membrana plasmática, e de ácidos nucléicos, a base para formação do DNA e do RNA.

Mecanismos de regulação das taxas de absorção de fósforo estão presentes em insetos. Em *Manduca sexta*, o fósforo é absorvido no intestino posterior e é armazenado como  $\alpha$ -glicerol fosfato na hemolinfa. O aumento dos níveis na hemolinfa regulam uma resposta de feedback, diminuindo a absorção deste componente, sugerindo um mecanismo de detecção dos níveis de fosfato neste inseto (WOODS, PERKINS *et al.*, 2002).

Os níveis de fósforo são bastante aumentados nos ovos de fêmeas adultas o que pode estar relacionado com a alta demanda de Pi para produção de DNA e RNA pela fêmea durante o período de embriogênese. Assim, durante a cópula os machos cedem parte do seu conteúdo de fósforo que é utilizado pela fêmea para síntese de ácidos nucléicos (T.A. MARKOW, 1999; THERESE ANN MARKOW, 2001).

No vertebrado anfíbio *Xenopus laevis*, a VT é rica em resíduos de serina fosforilados e sua hidrólise representa uma importante fonte de Pi para o desenvolvimento embrionário (COLMAN *et al.*, 1976). Em insetos, a fonte majoritária de Pi durante a embriogênese não é conhecida. Assim, a forma como o fósforo é armazenado no ovo de insetos e utilizado pelo embrião durante o seu desenvolvimento não é clara. Apesar de ser uma fosfolipoglicoproteína, sabe-se que a VT não é a principal fonte de lipídeos e glicídeos, acumulados em gotículas de lipídeos e glicogênio, respectivamente. Assim, também é possível que a VT não seja a principal fonte de Pi.

### 1.3 Polifosfato

O polifosfato inorgânico (PoliP) é um polímero de resíduos de moléculas de Pi condensadas por ligações fosfoanidro altamente energéticas (KORNBERG, 1999; KULAEV *et al.*, 1999) (Fig 7). Atualmente descrito em uma grande variedade de procariotos e eucariotos, ele atua em papéis essenciais e conservados ao longo da evolução. Neste sentido, PoliP já foi observado e estudado em bactérias (RAO *et al.*, 1988; RASHID *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2002; PALLERLA *et al.*, 2005), protozoários (MORENO *et al.*, 2000; RODRIGUES, RUIZ, ROHLOFF *et al.*, 2002; RODRIGUES, RUIZ, VIEIRA *et al.*, 2002), fungos (SCHUDDEMAT *et al.*, 1989; LICHKO *et al.*, 2006), plantas (JEFFREY, 1968; RUIZ, MARCHESINI *et al.*, 2001) e mamíferos (KUMBLE *et al.*, 1996; LORENZ *et al.*, 1997; HERNANDEZ-RUIZ *et al.*, 2006). O conhecimento dos papéis fisiológicos desempenhados por esta molécula se concentram basicamente na bactérias *Escherichia coli* e na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo o seu papel em animais, principalmente invertebrados, pouco compreendido.

Sabe-se que sua função varia de acordo com o modelo em estudo. Assim, PoliP têm sido descrito em diversos compartimentos celulares tais como o citoplasma, núcleo, mitocôndrias, vesículas variadas além de associado com a estrutura de parede celular, membrana plasmática e complexos protéicos (KULAEV, VAGABOV *et al.*, 1999; KULAEV *et al.*, 2000). Da mesma forma, as funções desempenhadas por moléculas de PoliP são extremamente diversas e compatíveis com o respectivo local de acúmulo – substituto energético ao ATP, reservatório de Pi, quelante de cátions,

regulador de atividades enzimática, remediação ambiental, e regulador de diversas respostas fisiológicas associadas a stress ambiental (KORNBERG, 1999).



### 1.3.1 Síntese e Degradação de PoliP em Procariotos

Em procariotos, PoliP está presente no citoplasma em grânulos (KULAEV, I. S. *et al.*, 1983; KULAEV e KULAKOVSKAYA, 2000) ou associados a diferentes enzimas (BLUM *et al.*, 1997; KUSANO *et al.*, 1997), na membrana plasmática (BODE *et al.*, 1993) e no periplasma (RAO e TORRIANI, 1988). Em *E. coli*, a síntese de PoliP está majoritariamente associada à ação da enzima Polifosfato Kinase (PPK), um homotetrâmero de 270 kDa codificado pelo gene *ppk*. A PPK atua transferindo o fosfato terminal do ATP para um polímero crescente gerando um produto com tamanho final de aproximadamente 750 resíduos de Pi (AHN *et al.*, 1990; AKIYAMA *et al.*, 1992). Por sua vez, a degradação de PoliP está associada principalmente à Exopolifosfatase (PPX), um homodímero de aproximadamente 115 kDa codificado pelo gene *ppx*. A PPX é capaz de hidrolisar grupamentos de Pi terminais de PoliP de forma específica, não possuindo afinidade por PPi ou por outras moléculas fosforiladas (AKIYAMA *et al.*, 1993).

Outras enzimas podem estar envolvidas com a síntese e degradação de PoliP em *E. coli*. Mutantes que não produzem PPK apresentam níveis residuais de PoliP, sugerindo rotas alternativas de síntese (CASTUMA *et al.*, 1995). Alternativamente à PPX, a guanosina penta-fosfato fosfohidrolase, codificada pelo gene *gppA*, também possui atividade exopolifosfatásica (KEASLING *et al.*, 1993) e outras fosfatases já se mostraram capazes de hidrolisar PoliP (LORENZ *et al.*, 2001; SMITH *et al.*, 2006).

Existem ainda fosfotransferases capazes de retirar resíduos de Pi a partir de PoliP como AMP-fosfotransferases (BONTING *et al.*, 1991) e Glicoquinases (HSIEH *et al.*, 1993).

### 1.3.2 Síntese e Degradação de PoliP em Eucariotos

Os conhecimentos sobre o metabolismo de PoliP em eucariotos são bem mais limitados. Em *S. cerevisiae*, PoliP é encontrado armazenado em diversas organelas e estruturas e as funções dos diferentes estoques de PoliP estão associadas com as funções desempenhadas pelas organelas que o armazenam. PoliP já foi descrito em mitocôndrias (BERTRAND BEAUVOIT, 1989; LICHKO *et al.*, 1998), núcleo (LICHKO *et al.*, 2003) e em membranas plasmáticas (HUANG *et al.*, 1995).

À exceção de *Dictyostelium discoideum*, não existe nenhuma descrição de um gene ou proteína similar a PPK em eucariotos (KORNBERG, 1999). Em *S. cerevisiae*, a maior parte de PoliP encontra-se em estruturas acídicas conhecidas como vacúolos. A regulação do pH vacuolar parece ser essencial para a regulação dos níveis intracelulares do polímero e o silenciamento das H<sup>+</sup>-ATPases presentes nos vacúolos leva à inibição da síntese de PoliP (BEAUVOIT *et al.*, 1991; WURST *et al.*, 1995). Neste sentido, foi identificado que o silenciamento de um complexo protéico formado pelas proteínas PHM1, PHM2, PHM3 e PHM4 presentes na membrana de vacúolos de *S. cerevisiae*, inibe a síntese de PoliP apesar da acidificação desta organela permanecer inalterada. Estes resultados sugerem que a acidificação possa ser uma etapa anterior associada a ação deste complexo protéico na síntese de PoliP em *S. cerevisiae* (WYKOFF *et al.*, 2001).

A degradação de PoliP ocorre, em parte, de forma análoga à observada em bactérias e a PPX é a principal enzima envolvida no processo. Em leveduras, existe pelo menos uma PPX para cada compartimento celular onde há PoliP armazenado (LICHKO, KULAKOVSKAYA *et al.*, 2006). Elas são similares na seletividade por

PoliP, na ativação por cátions divalentes e pelo pH ótimo em torno da neutralidade. A dependência de um pH neutro pode estar relacionada ao mecanismo de síntese de PoliP, uma vez que a acidificação dos compartimentos que armazenam PoliP, processo do qual depende a síntese de PoliP em eucariotos, causa a inibição de PPX. No entanto, as diferentes PPXs de levedura variam em diversos aspectos tais como níveis de atividade, ativação induzida por diferentes co-fatores ou inibidores, afinidades por resíduos de PoliP de maior ou menor tamanho, e natureza do produto final do processamento: PPI ou PoliP<sub>3</sub>. Apesar da ação análoga, não existe homologia de sequência entre PPXs eucarióticas e PPXs procarióticas. As primeiras fazem parte de um grupo de fosfoesterases com domínio catalítico DHH – a superfamília DHH (ARAVIND *et al.*, 1998), e a segunda faz parte da superfamília quinase/actina/hsp-70 (REIZER *et al.*, 1993).

Em eucariotos, além da ação de PPX, uma endopolifosfatase (PPN) é capaz de processar polímeros de PoliP de forma seletiva. A PPN é uma enzima capaz de hidrolisar resíduos internos de PoliP, atuando na regulação do tamanho dos polímeros de PoliP acumulados (KUMBLE e KORNBERG, 1996; SETHURAMAN *et al.*, 2001). Além da PPN, outras moléculas parecem ser importantes para o processamento de PoliP (KULAEV e KULAKOVSKAYA, 2000). Por exemplo, já foi sugerido que durante a digestão de bovinos, fosfatases alcalinas intestinais sejam a principal fonte de degradação enzimática de PoliP (LORENZ e SCHRÖDER, 2001). Em *Leishmania major*, uma pirofosfatase inorgânica tem afinidade por PoliP de pequenos tamanhos a partir da modulação de co-fatores e pH (ESPIAU *et al.*, 2006).

### **1.3.3 Funções de PoliP**

As funções desempenhadas por moléculas de PoliP são bastante variadas e algumas delas são consideradas vitais para a homeostasia celular. PoliP é uma importante molécula de estoque de Pi e o conteúdo de PoliP em procariotos depende fortemente do conteúdo de Pi do meio (KULAEV e VAGABOV, 1983). Níveis elevados de PoliP são encontrados em bactérias presentes em esgotos e em lodo ativado (MINO, 2000), locais com grande concentração de Pi. Quando os níveis de Pi presentes no meio são reduzidos, os níveis de PoliP armazenados em *E. coli* são drasticamente reduzidos, e somente voltam ao normal após a normalização dos níveis de Pi no meio (KULAEV e VAGABOV, 1983). Em leveduras, o fenômeno de “Phosphate overplus” é caracterizado pelo acúmulo acentuado de PoliP após a transferência da cultura de um meio pobre em Pi para um meio rico do mesmo (OKOROKOV *et al.*, 1980). No entanto, diferente da função de reserva atribuída ao estoque de Pi celular em bactérias, o estoque de Pi em eucariotos parece ocorrer principalmente em vacúolos ácidos que desaparecem após a diminuição da concentração de Pi no meio (KULAEV, B. S. *et al.*, 1983). Assim, mutantes de levedura que não são capazes de sintetizar vacúolos, não são capazes de crescer em meios pobres em Pi (SHIRAHAMA *et al.*, 1996).

PoliP também é um importante quelante de metais. Em procariotos, PoliP é importante para a detoxificação de metais pesados em diferentes sistemas e para a tolerância a estes componentes em diversas espécies de bactérias (KEASLING *et al.*, 1996; GONZALEZ *et al.*, 1998). Aparentemente, esta tolerância está relacionada não somente à capacidade da célula em quelar estes metais mas também a uma etapa posterior, quando uma PPX é capaz de liberar moléculas de Pi complexadas com estes

metais e transportá-las para fora da célula (KEASLING, 1997). Em eucariotos, os vacúolos ricos em Pi são importantes locais para a reserva de diversos cátions como  $K^+$ ,  $Mg^{+2}$  e  $Ca^{+2}$  (OKOROKOV *et al.*, 1983). Este acúmulo se relaciona bem com as variações do conteúdo de PoliP e sinais que modulam a regulação intracelular destes cátions também parecem influenciar os níveis de PoliP (OKOROKOV, LICHKO *et al.*, 1983; RUIZ, RODRIGUES *et al.*, 2001).

Diferentes enzimas são moduladas por PoliP. PoliP é capaz de inibir endonucleases (RODRIGUEZ, 1993) e enzimas de degradação de RNA (BLUM, PY *et al.*, 1997). PoliP inibe a atividade de Poligalactonurase do fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea*, um processo importante para o mecanismo de patogenicidade (YAEL MELLER-HAREL, 1997). O aumento dos níveis de PoliP durante a depleção de aminoácidos do meio de cultura em *E. coli*, está relacionado à capacidade de PoliP de modular a atividade da Protease Lon, induzindo a degradação de proteínas ribossomais (KURODA *et al.*, 2001). Este processo é importante tanto para o fornecimento de aminoácidos quanto para a diminuição dos níveis de tradução de novas proteínas. Já foi também demonstrado que PoliP de pequenos tamanhos são capazes de aumentar a atividade de Catepsina D de baço bovino (WATABE *et al.*, 1979). O PoliP pode regular atividades enzimáticas por processos de fosforilação. Por exemplo, uma proteína quinase que utiliza PoliP de grande tamanho ao invés de ATP foi identificada na bactéria *Sulfolobus acidocaldariusi* (SKORKO, 1989).

PoliP é fundamental para a sobrevivência de bactérias em condições de stress. A resposta primária a diferentes eventos de stress depende da modulação por ppGpp. Estes nucleotídeos inibem a PPX, levando ao acúmulo de PoliP (KURODA *et al.*,

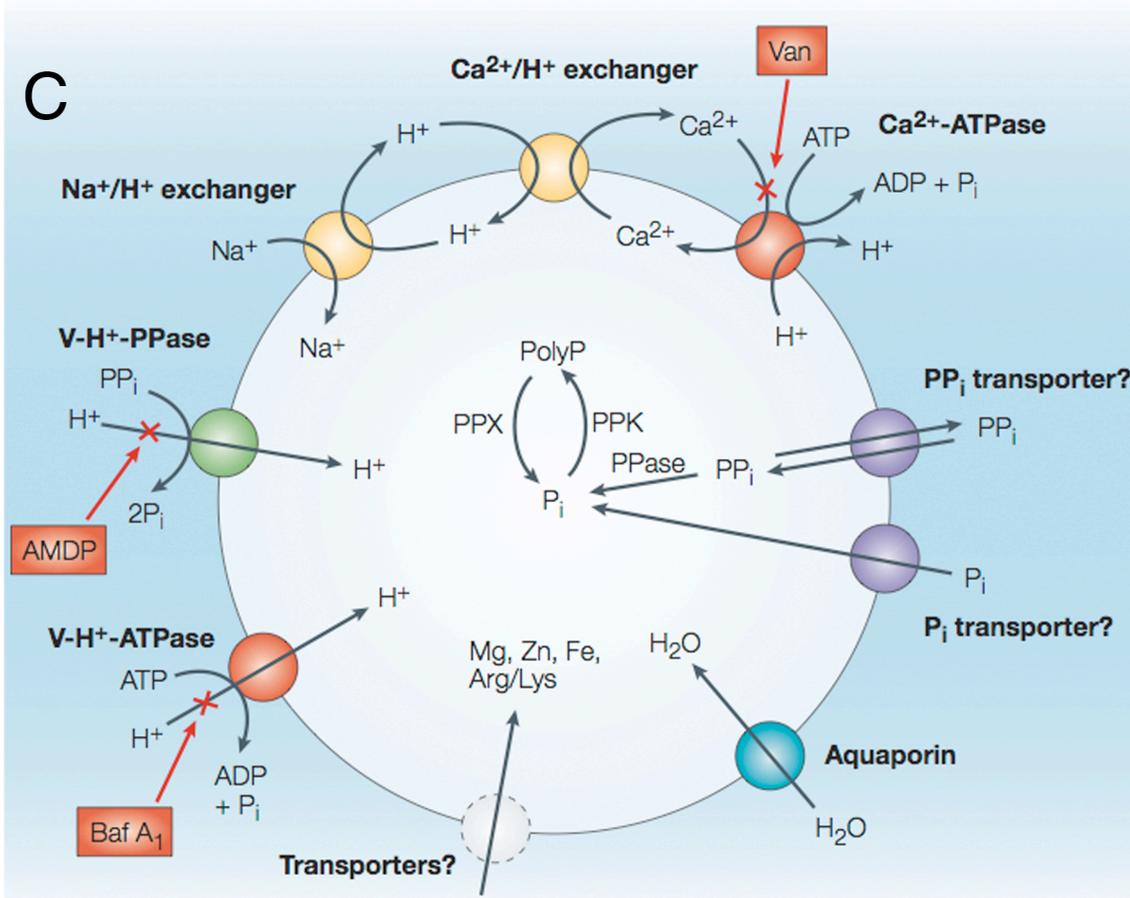
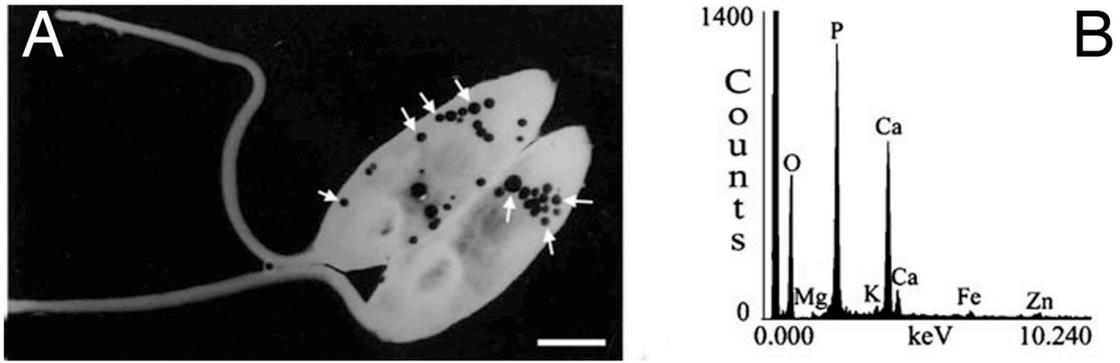
1997). O acúmulo de PoliP, por sua vez, será responsável pela indução do fator  $\sigma^{rpoS}$  (SHIBA *et al.*, 1997), relacionado à expressão de genes envolvidos na modulação da resposta a diferentes processos de stress. Como o ppGpp pode ser sintetizado a partir de GDP por PPK, ela se torna um importante efector da resposta contra stress metabólico (KIM *et al.*, 1998; ISHIGE *et al.*, 2002). Alternativamente, a presença de PPK em degradossomas (BLUM, PY *et al.*, 1997) poderia, de alguma forma, controlar a taxa de degradação de mRNAs. Neste sentido, PPK também parece ser importante na regulação da expressão e na atividade de RNA polimerase (KUSANO e ISHIHAMA, 1997).

O papel de PoliP nas respostas a diferentes eventos de stress é conservado em eucariotos. A hidrólise de PoliP é importante para contrabalancear stress alcalinos como ocorre na alga *Dunaliella salina* (PICK *et al.*, 1990). Em outros modelos, como no *Trypanosoma cruzi*, os níveis de PoliP são também regulados durante a resposta a stress osmóticos (RUIZ, RODRIGUES *et al.*, 2001).

#### **1.3.4 Armazenamento de PoliP e Acidocalcissomos**

O armazenamento de PoliP em eucariotos ocorre principalmente em vesículas cuja acidificação é regulada por bombas de  $H^+$  (BEAUVOIT, RIGOULET *et al.*, 1991; OGAWA *et al.*, 2000). Uma organela denominada acidocalcissomo (Fig 8 A) parece ser o principal local de estoque de PoliP em diversos organismos. Acidocalcissomos se caracterizam pelo ambiente ácido de alta densidade resultante do estoque de moléculas inorgânicas principalmente polifosfato e cátions complexados a este polímero, pelo baixo acúmulo de proteínas (Fig 8 B) e pela existência de  $H^+$ -PPases e

de  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPases em sua membrana (Fig 8 C) (DOCAMPO *et al.*, 2005). A regulação dos níveis de PoliP é importante para a homeostase intracelular de cálcio e magnésio que permanecem complexados com PoliP nos acidocalcissomos. Acidocalcissomos são também importantes na regulação do balanço osmótico. Em *Trypanosoma cruzi*, os níveis de PoliP são modulados a partir de choques osmóticos (RUIZ, MARCHESINI *et al.*, 2001) e os acidocalcissomos estão associados por eventos de fusão de compartimentos aos vacúolos contráteis, estruturas responsáveis por manter os níveis hídricos intracelulares adequados (MARCHESINI *et al.*, 2002; MONTALVETTI *et al.*, 2004; ROHLOFF *et al.*, 2004). Atualmente, acidocalcissomos vêm sendo descritos em um grande número de organismos. Corpos de Polifosfato presentes em *Chlamydomonas reinhardtii* (RUIZ, MARCHESINI *et al.*, 2001), Grânulos de Volutina nas bactérias *Agrobacterium tumefaciens* (SEUFFERHELD *et al.*, 2003) e *Rhodospirillum rubrum* (SEUFFERHELD *et al.*, 2004) e os grânulos densos encontrados em plaquetas humanas (RUIZ *et al.*, 2004) foram agrupadas em um conjunto de organelas similares a acidocalcissomos, sugerindo que estas organelas tenham sido conservadas ao longo do processo evolutivo. (DOCAMPO, DE SOUZA *et al.*, 2005).



**Figura 8: Acidocalcisomos**

(A) Acidocalcisomos são organelas densas acumuladas em grande quantidade em tripanosomatídeos (Miranda, 2004) (B) Composição de elementos de um acidocalcisomo típico, (C) Presença de bombas na superfície de acidocalcisomos e grande acúmulo de PoliP em sua matriz. Modificado de Docampo, 2005

### 1.3.5 PoliP em Artrópodes

Até o momento, a descrição de PoliP em artrópodes é bastante limitada. Recentemente, a partir da análise do armazenamento de PoliP em ovos de *Periplaneta americana* verificamos que este polímero parece estar relacionado a modulação dos níveis de  $\text{Ca}^{+2}$  livre dentro do ovo. Foi observada também uma aparente relação entre a redução dos níveis de Pi e a sinalização para o início da degradação de PoliP (Anexo 1). Este trabalho também mostrou que polímeros de PoliP são armazenados em organelas de natureza ácida, evidenciando a conservação também em insetos da forma de armazenamento dependente da modulação de pH intra-vesicular. Verificamos também que estas organelas são similares a acidocalcissomos confirmando a conservação destas organelas durante a evolução (MOTTA, 2006). Em carrapato, já foi demonstrado o armazenamento de PoliP em ovos e a participação deste polímero no metabolismo energético do embrião (CAMPOS *et al.*, 2007). Estes dois trabalhos são as únicas descrições da presença de PoliP e de sua modulação durante o processo de embriogênese de animais. Tendo em vista a importância deste polímero para a regulação de diversos processos em vários organismos e o seu papel conservado durante a evolução, o maior aprofundamento do estudo do metabolismo de PoliP durante a embriogênese é uma perspectiva inédita e pode levar a uma nova compreensão de como os níveis de PoliP, diferentes íons e processos metabólicos são regulados durante a embriogênese de invertebrados.

## Objetivos

### 2.1 Objetivos Gerais

Este trabalho pretende aprofundar os conhecimentos existentes a respeito do metabolismo de PoliP em insetos durante a embriogênese de *Rhodnius prolixus* e *Drosophila melanogaster*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- A) Verificar a presença de PoliP em ovos de *Rhodnius prolixus*.
- B) Determinar os locais de estoques do polímero e caracterizar o perfil de composição de elementos destes locais de estoque.
- C) Determinar como ocorre a variação dos níveis de PoliP durante a embriogênese e correlacionar esta variação com a variação de  $\text{Ca}^{+2}$  e Pi neste mesmo período.
- D) Determinar o efeito de PoliP sobre a atividade aspártico proteásica de ovos de *R. prolixus*.
- E) Verificar a presença de PoliP em ovos de *Drosophila melanogaster*.
- F) Caracterização preliminar de organelas similares a acidocalcissomos em ovos de *Drosophila melanogaster*.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1 Reagentes**

Guanidina Isotiocianato, 4'-6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI), Laranja de Acridina, PoliP<sub>75</sub><sup>+</sup>, PoliP<sub>15</sub>, ATP e PPi foram adquiridos da Sigma Aldrich. Glassmilk foi adquirido da Bio101. Exopolifosfatase recombinante de levedura (scPPX) foi gentilmente cedida pelo Dr. Roberto Docampo. Peptídeo sintético (ABZ-VVVLANRF-EDDnp) foi gentilmente cedido pelo Dr. Marcos Sorgine.

#### **3.2 *Rhodnius prolixus***

*R. prolixus* foram obtidos da colônia mantida no laboratório do Dr Hatisaburo Masuda no Instituto de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os insetos foram alimentados com sangue de coelho e mantidos a 28° C e 70% de umidade relativa, sob luminosidade natural, seguindo o protocolo de ética de criação de animais da UFRJ. Os ovos foram postos pelas fêmeas em papel de filtro no interior dos frascos de criação e foram coletados em intervalos de 24 horas. O primeiro intervalo correspondendo a coleta de ovos de dia 0. A partir de então, os ovos foram mantidos em estufa a 28° C sob fotoperíodo artificial (12h/12h claro/escuro) até a utilização do material no intervalo de tempo desejado para a realização dos experimentos.

#### **3.3 *Drosophila melanogaster***

As linhagens de *D. melanogaster* foram mantidas em laboratório a 18° C e os repiques dos animais em novos frascos feitos a cada 21 dias no meio de cultura. As

linhagens em uso experimental foram mantidas a 25° C e repicadas a cada 15 dias no mesmo meio. O meio de cultura foi preparado a partir do aquecimento de 700 ml de água destilada acrescida de 50 ml de melado de cana, 50 ml de farinha de milho, 20,7 g de fermento biológico em pó e 7,3 g de ágar, em agitação até a fervura. O meio foi então aquecido por aproximadamente 5 minutos e resfriado até 60° C. Em seguida, adicionou-se 11,2 ml de p-hidroxibenzoato de metila 10% em etanol e 4 ml de ácido propiônico. Os meios foram distribuídos em garrafas vedadas com algodão após solidificação do meio e conservados em geladeira até o momento do uso.

Para a coleta de ovos, animais adultos foram postos em coletores de plástico com meio de ovoposição (suco de uva sem conservantes 39%, ágar 2,7%, Etanol 0,8% e ácido acético 0,7%) sobre o qual adicionava-se uma solução viscosa de levedura. Os meios de ovoposição foram trocados e os ovos presentes foram retirados após intervalos de tempo pré-determinados e imersos em PBS pH 7,2 e deixados a 25° C para decantação. Em seguida os ovos eram lavados mais 4 vezes com PBS e processados.

### **3.4 Suspensão de Grânulos (SG)**

Ovos de *R. prolixus* recolhidos foram rompidos delicadamente em salina isosmótica (NaCl 130mM, KCl 8,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 8,6 mM, NaHCO<sub>3</sub> 10,2 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4mM pH 7,2 e glicose 34 mM). Ovos de *D. Melanogaster* foram rompidos em PBS pH 7,2. Ambas salinas foram acrescidas de 10 mM de EGTA e Coquetel de Inibidor de Proteases (PMSF, Aprotinina, E-64, Pepstatina, EDTA).

### 3.5 Extração de PoliP de Cadeia Curta e Cadeia Longa e Cadeia

Para extração de PoliP de Cadeia Curta (MORENO, URBINA *et al.*, 2000), o conteúdo dos ovos foi homogeneizado em 0,3 ml de ácido perclórico 0,5 M e mantido em gelo por 30 minutos. O homogenato foi então centrifugado a 14.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante foi coletado e neutralizado pela adição de KOH 0,72 M e  $\text{KHCO}_3$  0,6 M. Os sais insolúveis foram precipitados por nova centrifugação a 14.000 rpm por 1 min e o sobrenadante obtido foi rotulado como PoliP de Cadeia Curta (SC).

Para extração de PoliP de Cadeia Longa (AULT-RICHE *et al.*, 1998), o conteúdo dos ovos foi homogeneizado em 0,5 mL de tampão de lise (guanidina isotiocianato 4M, Tris-HCl 50mM pH 7.0) previamente aquecido a 95°C. O material foi agitado e incubado por 5 minutos a 95°C. Em seguida, foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de SDS 10%, 0,5 mL de etanol 95% e 5  $\mu\text{L}$  de suspensão de sílica (Glassmilk). O material foi então homogeneizado e centrifugado a 14.000 rpm por 1 minuto. O precipitado foi ressuspensão em 0,5 mL de Tampão New Wash (Tris-HCl 5mM pH 7,5, NaCl 50mM, EDTA 5mM, etanol 50%) gelado. A amostra foi centrifugada e lavada mais duas vezes nas mesmas condições. Ao final, o precipitado foi ressuspensão em 50  $\mu\text{L}$  de tampão de DNase e RNase (Tris-HCl 50mM pH 7.4,  $\text{MgCl}_2$  10mM, DNase 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$  e RNase 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incubado por 30 min a 37°C. A amostra foi centrifugada e o precipitado foi lavado em 150  $\mu\text{L}$  de tampão de lise e 150  $\mu\text{L}$  de etanol 95% seguido de centrifugação. O material foi lavado duas vezes em 0,5 mL de Tampão New Wash. O precipitado final foi ressuspensão em 50 $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 50mM pH 8,0 e incubado por 2 minutos a 95°C para eluição do PoliP e esta etapa foi repetida

mais duas vezes. O material resultante das 3 centrifugações foi coletado e rotulado como PoliP de Cadeia Longa (LC) em uma única amostra.

### **3.6 Dosagem de PoliP com PPX ou Azul de Toluidina**

Estimativas da quantidade de PoliP presente nas amostras preparadas como descrito anteriormente, foram determinadas indiretamente pela medição dos níveis de Pi liberado a partir do tratamento com excesso de exopolifosfatase recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* (scPPX) (RUIZ, RODRIGUES *et al.*, 2001). Alíquotas de 5 µl de extratos de PoliP de cadeia curta ou longa foram incubadas por 15 minutos a 37°C em Tris-HCl 60 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 6,0 mM na presença de scPPX em um volume final de 75 µL. A liberação do Pi foi monitorada com verde de malaquita (FANG *et al.*, 2007). A reação foi interrompida com a adição de 200 µl de revelador (solução filtrada de 0,84 % de molibdato de amônio e 0,036 % de verde de malaquita). A solução final foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente e a DO a 660 nm foi lida em espectrofotômetro.

Alternativamente, 10 µl das amostras foram incubados em 240 µl de Solução de Azul de Toluidina (Azul de Toluidina 6 mg/l, Ácido acético 40 mM). Após 10 minutos, as amostras tiveram a densidade ótica a 530 e 630 nm lida em espectrofotômetro e as variações de PoliP foram calculadas a partir da razão da OD entre 530 e 630 nm (SMITH, MUTCH *et al.*, 2006).

### **3.7 Extração de Fração Solúvel em Água**

O conteúdo de 150 mg de ovos de diferentes dias foi homogeneizado em água destilada e sonicado por 5 minutos. Após sonicação, o material foi centrifugado a 20.000g por 15 minutos e o sobrenadante foi recolhido. Foi adicionado igual volume de clorofórmio ao sobrenadante, seguido de uma nova etapa de centrifugação ao final da qual a fase aquosa foi recolhida e rotulada como Extrato de Fração Solúvel (WSF) (GOMES, 2006).

### 3.8 Variação de PoliP e Pi Durante a Embriogênese

50 µl de WSF de diferentes dias foram diluídos em água até o volume final de 1 ml e incubado com 3 µg/ml de DAPI. A variação dos níveis de PoliP durante a embriogênese foi analisada, como descrito anteriormente (GOMES, 2006), utilizando excitação de 354 nm e os valores de emissão de fluorescência em 525 nm, o pico de emissão do complexo DAPI-PoliP. Para descontar a contribuição do sinal de fluorescência gerado por moléculas de DNA, a proporção de 7 entre o valor de emissão em 454 nm, o pico de emissão do complexo DAPI-DNA, e em 525 nm foi considerado. Assim a fluorescência emitida pelo complexo DAPI-PoliP era determinada segundo a seguinte fórmula:

$$PoliP_{Teórico} = PoliP_{525nm} - (DNA_{454nm} \div 7,189)$$

Em seguida, os valores da fluorescência do complexo DAPI-PoliP foram normalizados pelo valor de fluorescência que 150 µg/ml de PoliP<sub>75</sub> geraram em 525 nm a partir da equação:

$$PoliP_{Dtax} = PoliP_{Teórico} \div PoliP_{75}$$

As amostras de WSF utilizadas para dosagem de PoliP, tiveram seus níveis de Pi dosados com molibdato de amônio (FISKE *et al.*, 1925).

### **3.9 Observação de Armazenamento de PoliP com Microscopia de Fluorescência**

Suspensões de Grânulos na presença de EGTA 10 mM e Coquetel de Inibidores de proteases (RIE) foram incubado no escuro com DAPI 50 µg/ml por 30 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas a 800g por 10 minutos. O pellet foi ressuspenso em RIE. Após incubação, 5 µl das suspensões foram montadas em lâminas, que foram observadas e registradas em microscópio de fluorescência Zeiss Axioplan utilizando um set de filtros excitação máxima a 350 nm e emissão acima de 500 nm.

### **3.10 Microanálise de Suspensões de Grânulos**

Suspensões de grânulos de *R. prolixus* (200 µl) foram misturadas com 500 µl de Iodixanol 40%. A amostra foi centrifugada por 1 hora a 20.000g e o pellet foi lavado 3 vezes com RIE a 10.000 g por 3 minutos.

O pellet desse fracionamento ou suspensões de grânulos de *D. melanogaster* (PBS pH 7.2, EGTA 10 mM, Coquetel de Inibidor de Protease) tiveram as vesículas aderidas a grades de cobre cobertas com Formvar onde espectros de raios-X por energia dispersiva foram coletados concentrando-se o feixe de elétrons em vesículas encontradas em diferentes regiões das grades. Como controle, espectros foram coletados de regiões adjacentes aos grânulos. As amostras foram analisadas em um microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200 EX operando a 80 kV. Os raios-X

foram contados utilizando-se um detector de Si(Li) com janela Norvar, 0-10 Kev de dispersão de energia e com resolução de 10 eV por canal.

### **3.11 Atividade Peptidásica sobre Substrato Sintético Fluorescente**

Ovos de *R. prolixus* foram homogeneizados em Tampão Acetato (Tampão Acetato 0.1 M pH 4.0, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM). O extrato foi submetido a 3 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a temperatura ambiente e centrifugado a 20.000g por 15 minutos (FIALHO, NAKAMURA *et al.*, 2005). O sobrenadante foi rotulado como extrato de ovo (EH) e sua concentração protéica foi dosada pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951).

A atividade peptidásica de EH foi medida utilizando um substrato sintético fluorescente . Foram adicionados 6  $\mu$ M de substrato fluorescente (ABZ-VVVLANRF-EDDnp), 20  $\mu$ g de proteína de EH e diferentes concentrações de potenciais moduladores em tampão acetato 20 mM pH 4,0, EDTA 10 mM em um volume final de 70  $\mu$ l mantido a 37° C. A atividade foi determinada em espectrofluorímetros e acompanhando a variação de fluorescência sob excitação a 320 nm e emissão a 420 nm (NASCIMENTO-SILVA *et al.*, 2008).

### **3.12 Degradação de Proteínas de Vitelo *in vitro***

Foram incubadas 300  $\mu$ g de EH diluídos em tampão acetato em volume final de 500  $\mu$ l por 2 horas a 37° C na presença de diferentes concentrações de PoliP<sub>75</sub>. Após este período, 30  $\mu$ g de proteínas foram submetidas a SDS-PAGE 10% e coradas com coomassie blue ou nitrato de prata.

### **3.13 Determinação dos Níveis de PoliP após Ensaio de Fusão de Grânulos de Vitelo.**

Ensaio de fusão foram preparados com SGs incubadas na presença 25 mM de  $\text{CaCl}_2$  durante 10 minutos (FIALHO, NAKAMURA *et al.*, 2005). Em seguida, as suspensões foram adicionadas a iodixanol 40% e fracionadas por centrifugação a 20.000g por 60 minutos. As frações de grânulos de vitelo foram identificadas como a região de coloração rosa característica da RHBP, proteína estocada em grânulos de vitelo de *R. prolixus*. As frações de grânulos de vitelo e o pellet do fracionamento foram recolhidos, e o conteúdo de PoliP de Cadeia Longa e Cadeia Curta foi extraído.

### **3.14 Desafio Fúngico**

Fêmeas adultas de *R. prolixus* tiveram seu tórax esterilizado com algodão embebido em etanol 70 % e foram lentamente injetadas entre o segundo e o terceiro esternitos (parte ventral do tórax). Para os ensaios com conídios, foram injetados inóculos de  $10^5$  conídios de *Aspergillus niger*. Animais controle foram injetados somente com veículo (meio Grace's). Todos os grupos injetados (12-15 insetos por grupo, 3-4 grupos por tratamento) foram acomodados em frascos plásticos transparentes contendo um pedaço de papel de filtro grosso e mantidos em fotoperíodo 14:10 L:E, 28 °C e 70 % U.R. Os níveis de PoliP de Cadeia Longa estocados no folículo ovariano foram analisados e quantificados com Azul de Toluidina 48 horas após a injeção .

### **3.15 Observação de Eventos de Acidificação de Grânulos de Vitelo**

SGs de *D. melanogaster* com adição de 10 mM EGTA foram incubadas em lâmina com Laranja de Acridina 5µg/ml por 10 minutos. Após esta incubação, as suspensões foram observadas e registradas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axioplan) utilizando set de filtros adequados para observação de laranja de acridina.

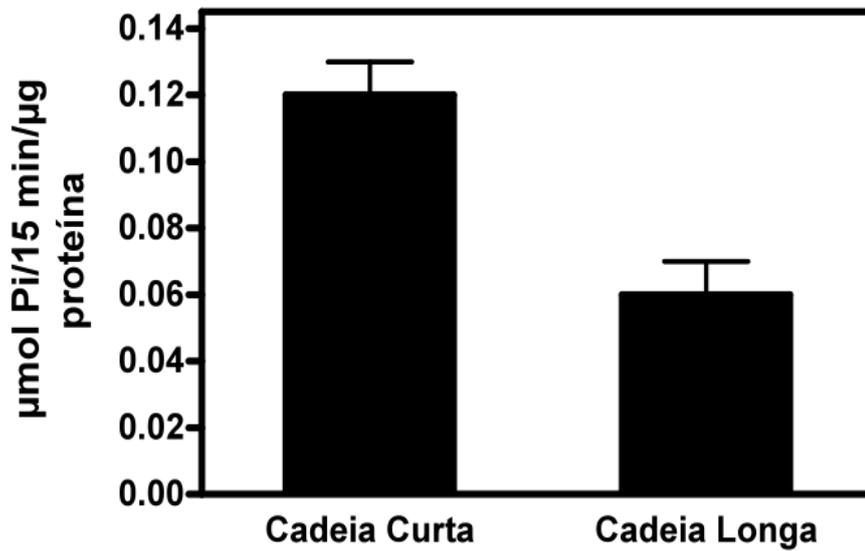
## 4. Resultados

### 4.1 Detecção e Análise dos Níveis de PoliP

A detecção de PoliP em *R. prolixus* foi feita extraíndo polímeros de cadeia curta (SC) e longa (LC) de ovos de dia 0 seguida da utilização de scPPX e dosagem dos níveis de Pi liberados. Os níveis de PoliP SC são, aproximadamente, duas vezes maiores do que de PoliP LC (Fig 9) (MOTTA, 2006).

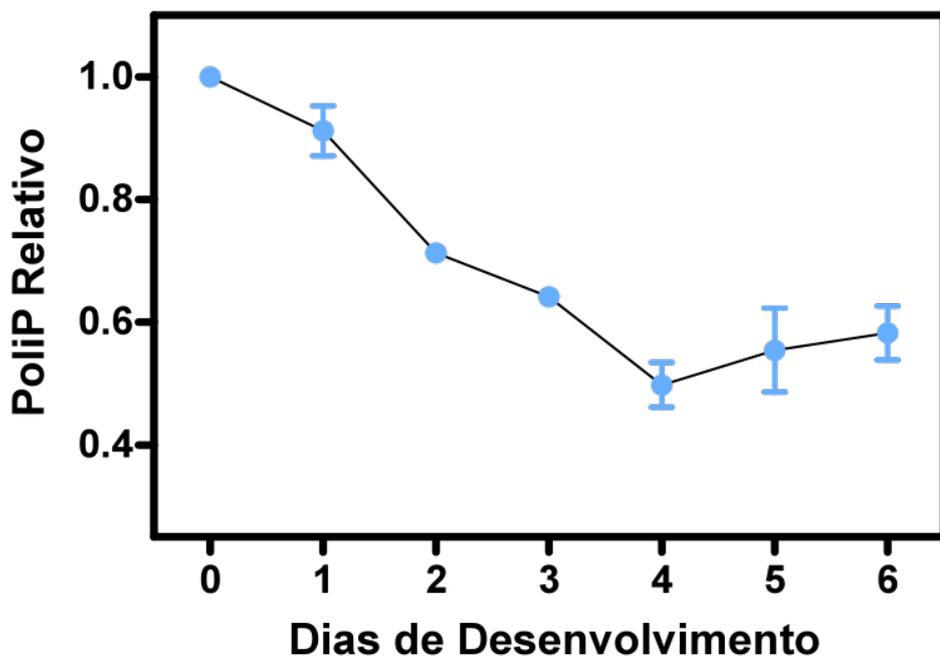
Alternativamente, a presença e a variação de PoliP pode ser investigada utilizando a capacidade de PoliP se complexar com DAPI emitindo valores máximos de fluorescência em 525 nm. Esta propriedade vem sendo utilizada para analisar a variação (GOMES, 2006; ABRAMOV *et al.*, 2007; ASCHAR-SOBBI *et al.*, 2008) ou estoque de PoliP (RUIZ, MARCHESINI *et al.*, 2001; MARCHESINI, RUIZ *et al.*, 2002; GOMES, 2006) e é vantajosa por ser altamente específica, não sendo observada interações com outras moléculas como PPI ou ATP e difere do espectro de emissão gerado pelo complexo do DAPI com DNA (ALLAN *et al.*, 1980; KAPUSCINSKI, 1990; RUIZ, RODRIGUES *et al.*, 2001). A análise da variação dos níveis de PoliP com DAPI foi feita ao longo da primeira semana de embriogênese. Durante este período, os níveis de PoliP foram máximos logo após a postura do ovo sendo progressivamente reduzidos por 5 dias quando atingiram o mínimo observado no período, aproximadamente metade dos valores iniciais. A partir deste instante, não houve nenhuma variação dos níveis de PoliP (Fig 10).

Como PoliP já foi descrito como um modulador dos níveis de Pi e de  $\text{Ca}^{+2}$ , analisamos a variação dos níveis destas duas moléculas durante a primeira semana de embriogênese. Os níveis de Pi aumentaram progressivamente durante o início da embriogênese, quando então se estabilizaram por volta do dia 5 (Fig 11 A). A análise de correlação entre os níveis de PoliP e Pi gerou um coeficiente de correlação bastante alto (Pearson  $r$ : - 0.9182,  $P < 0.05$ ) (Fig 11 B). Neste mesmo período, os níveis de  $\text{Ca}^{+2}$  livre (RAMOS, MIRANDA *et al.*, 2007a) aumentaram progressivamente a partir do segundo dia de embriogênese até o quarto dia quando foram máximos. Após este período, não houve mais uma variação dos níveis de  $\text{Ca}^{+2}$  (Fig 12 A). A análise de correlação entre os níveis de PoliP e os níveis de  $\text{Ca}^{+2}$  livre também apresentou um alto índice de correlação (Pearson  $r$ : - 0.8783,  $P < 0.05$ ) (Fig 12 B).



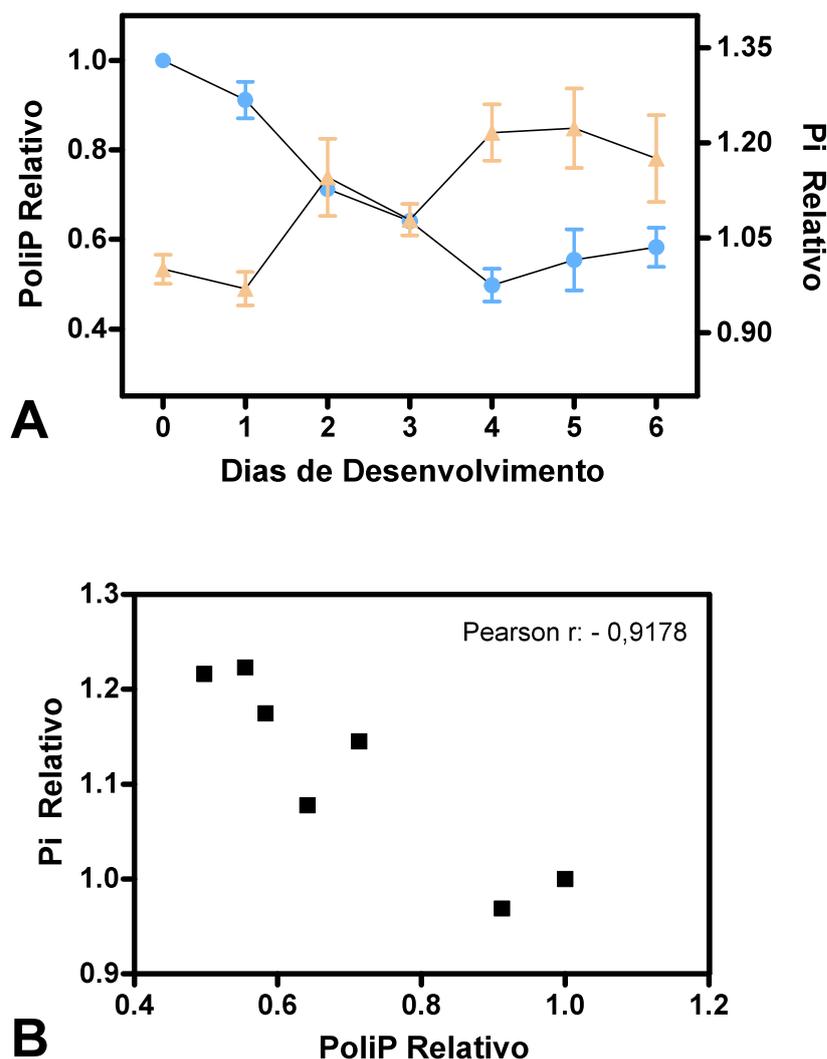
**Figura 9: PoliP se acumula principalmente em frações de Cadeia Curta em ovos de dia 0.**

Ovos de dia 0 tiveram o conteúdo de PoliP de Cadeia Curta e Cadeia Longa extraído e os níveis de PoliP foram determinados a partir da reação colorimétrica com verde de malaquita dos níveis de Pi liberados após reação com scPPX (MOTTA, 2006).



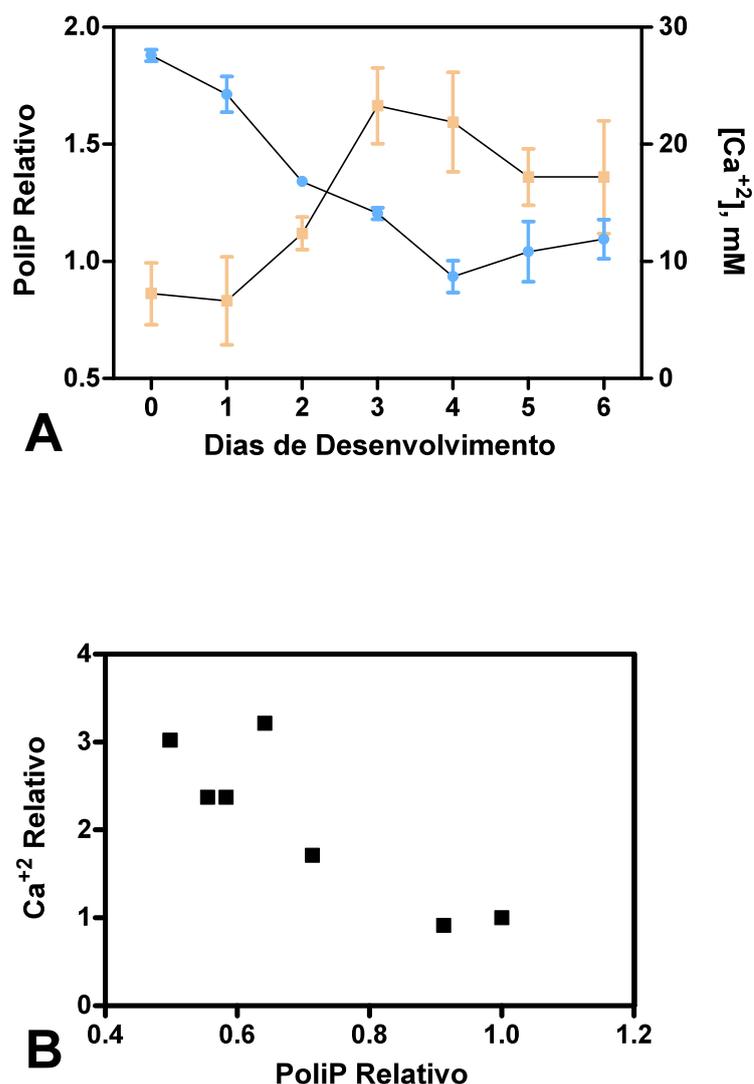
**Figura 10: Variação dos níveis de PoliP durante a Embriogênese por DAPI**

Ovos de diferentes dias de desenvolvimento tiveram o conteúdo de WSF extraído e os níveis de PoliP foram monitorados incubando as amostras com 3  $\mu\text{g/ml}$  de DAPI e analisando as emissões de fluorescência em 525 nm em fluorímetro. Os níveis de PoliP no dia 0 foram utilizados como referência durante o experimento.



**Figura 11: Correlação entre PoliP e Pi**

A variação de Pi durante a embriogênese foi estabelecida dosando os níveis de Pi present nas WSF de diferentes dias com molibdato de amônia. A reação colorimétrica foi monitorada em espectrofotômetro. Os níveis de Pi no dia 0 foram utilizados como referência durante c experimento. (A)Variação dos níveis de PoliP (azul) e Pi (laranja) durante a embriogênese (B) Correlação entre os níveis de PoliP e Pi. A análise estatística foi feita utilizando a Análise de



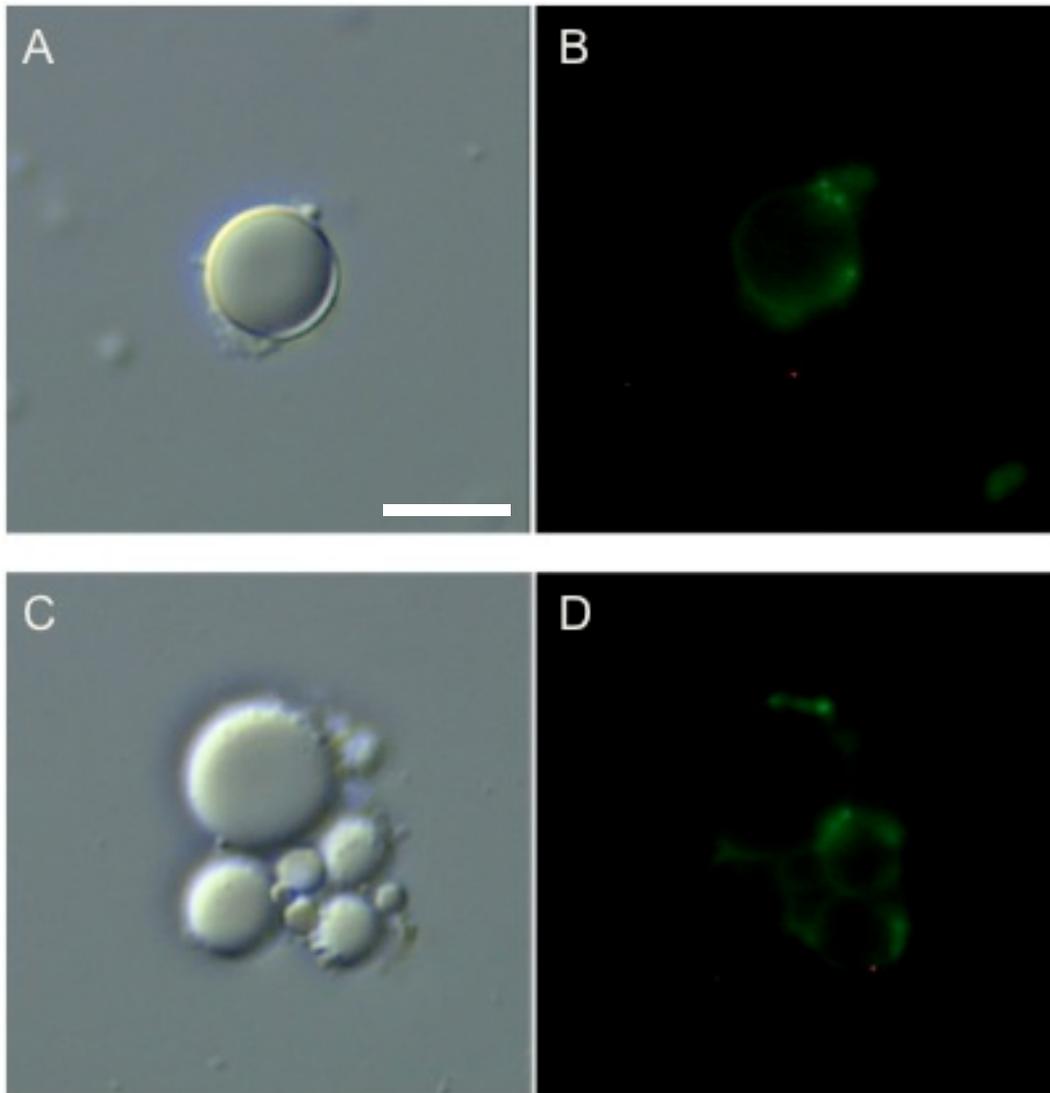
**Figura 12: Correlação entre PoliP e Ca<sup>2+</sup>**

A variação de Ca<sup>2+</sup> durante a embriogênese foi Arsenazo III no sobrenadante da centrifugação das suspensões de grânulos. A reação colorimétrica foi monitorada em espectrofotômetro. Os níveis de Ca<sup>2+</sup> no dia 0 foram utilizados como referência durante o experimento. (A) Variação dos níveis de PoliP (azul) e Ca<sup>2+</sup> (laranja) durante a embriogênese (B) Correlação entre os níveis de PoliP e Ca<sup>2+</sup>. A análise estatística foi feita utilizando a Análise de Correlação de Pearson, P < 0,05.

## 4.2 Localização de PoliP

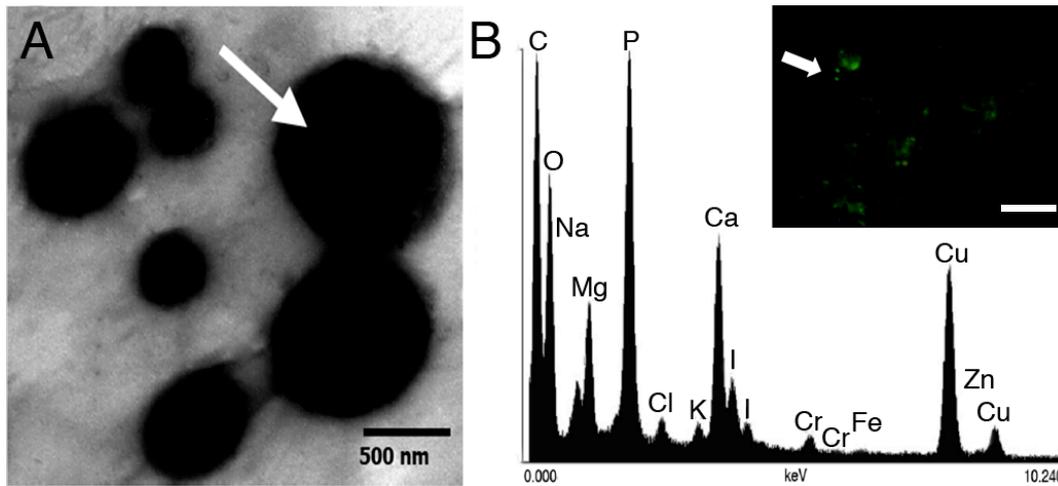
A complexação de DAPI com PoliP pode ser utilizada para identificar estoques deste polímero por microscopia de fluorescência (RUIZ, MARCHESINI *et al.*, 2001; RUIZ, RODRIGUES *et al.*, 2001; MARCHESINI, RUIZ *et al.*, 2002). Em ovos de dia 0, PoliP se mostrou preferencialmente armazenado em vesículas com tamanho variando entre 0,5 e 1  $\mu\text{m}$ . Grânulos de Vitelo foram arbitrados como vesículas com tamanho em torno de 3 a 15  $\mu\text{m}$  baseado em resultados prévios (RAMOS, MIRANDA *et al.*, 2007a) e não apresentaram fluorescência significativa oriunda do complexo DAPI-PoliP (Fig 13).

A recuperação da fração de vesículas mais densas após recuperação do pellet do fracionamento com iodixanol gerou um enriquecimento de vesículas densas de tamanho similar àquela que armazena PoliP (Fig 14 A). A observação dessas vesículas em microscópio eletrônico equipado com sistema de análise de elementos por microanálise de Raio-X demonstrou a presença de átomos de fósforo e cálcio, além da presença de outros átomos metálicos tais como ferro e zinco. As análise destas vesículas revelaram também que os picos referentes a enxofre, um elemento comumente encontrado em vesículas contendo grande estoques protéicos, eram pequenos ou inexistentes (Fig 14 B). Finalmente, a incubação destas vesículas com DAPI evidenciou que estas também armazenam PoliP (Fig 14 B, inset).



**Figura 13: Armazenamento de PoliP em pequenas Vesículas**

Suspensões de grânulos na presença de EGTA e inibidores de proteases foram incubadas com DAPI e observadas em microscópio de fluorescência utilizando um sistema de filtros com excitação em 350 nm e emissão acima de 500 nm. DIC (A e C) fluorescência (B e D). Barra – 10  $\mu$ m.



**Figura 14: Microanálise de Vesículas Armazenadoras de PoliP**

Suspensões de grânulos foram centrifugadas em Iodixanol 40% e o pellet foi montado em grades de cobre e analisados por microscópio eletrônico de transmissão equipado com um sistema de microanálise de Raio-X (A). As setas em (A) indicam o local onde a composição de elementos em (B) foi determinada por microanálise. O inset é representativo da incubação das vesículas enriquecidas no pellet com DAPI e observadas com microscópio de fluorescência. A seta no inset identifica vesículas com tamanhos similares aquelas observadas com microanálise. Barra – 500 nm, Barra do inset – 10  $\mu\text{m}$ .

### 4.3 Atividade Peptidásica e Modulação por PoliP

A fim de verificar se PoliP poderia modular a atividade de Catepsina D em ovos e, conseqüentemente, a degradação de vitelo de *R. prolixus*, uma série de análises foram realizadas utilizando extratos ácidos de ovo (EH) obtidos a partir de ovos de dia 3 e um substrato sintético para protease aspártica (NASCIMENTO-SILVA, LEAL *et al.*, 2008).

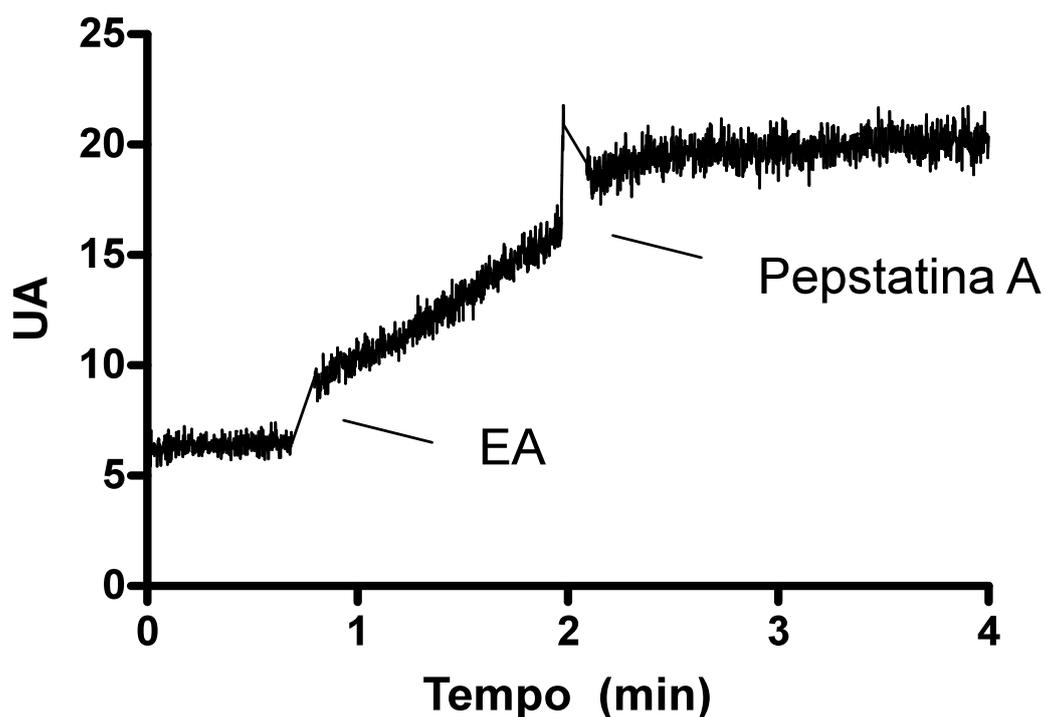
Observamos a hidrólise do substrato sintético por liberação de fluorescência, evidenciando a atividade peptidásica em EH. A atividade de hidrólise do peptídeo sintético por EH foi inibida por pepstatina A (Fig 15), um inibidor específico de proteases aspárticas. Em seguida, testamos se a atividade proteásica era afetada por PoliP. Na presença de polímeros com mais de 15 resíduos de Pi a atividade de degradação de substrato fluorescente foi inibida (Fig 16 A). A inibição foi mais acentuada PoliP<sub>75</sub>, sendo a inibição máxima similar àquela observada pela utilização de 10 mM de pepstatina A. A inibição foi dose-dependente e máxima com 5 µM de PoliP<sub>75</sub> (Fig 16 B).

Para testar a possibilidade de que o efeito observado poderia resultar do aumento de cargas negativas na solução, foram utilizados outros compostos negativos cuja concentração foi calculada de modo a igualar os níveis de resíduos de Pi existentes em 5 µM de PoliP<sub>75</sub>. Nesta situação, 375 µM de Pi, 187 µM de PPI ou 125 µM de ATP não foram capazes de alterar o perfil de atividade verificado nos controles (Fig 17 A).

O possível sequestro de cátions divalentes do meio de reação por PoliP também não foi responsável pelo efeito inibitório do PoliP, uma vez que a adição de EGTA, um forte quelante de Ca<sup>+2</sup>, além da presença de EDTA, um quelante de Mg<sup>+2</sup>, no meio

de reação, não produziu efeitos semelhantes aos observados pela adição de PoliP<sub>75</sub> (Fig 17 B).

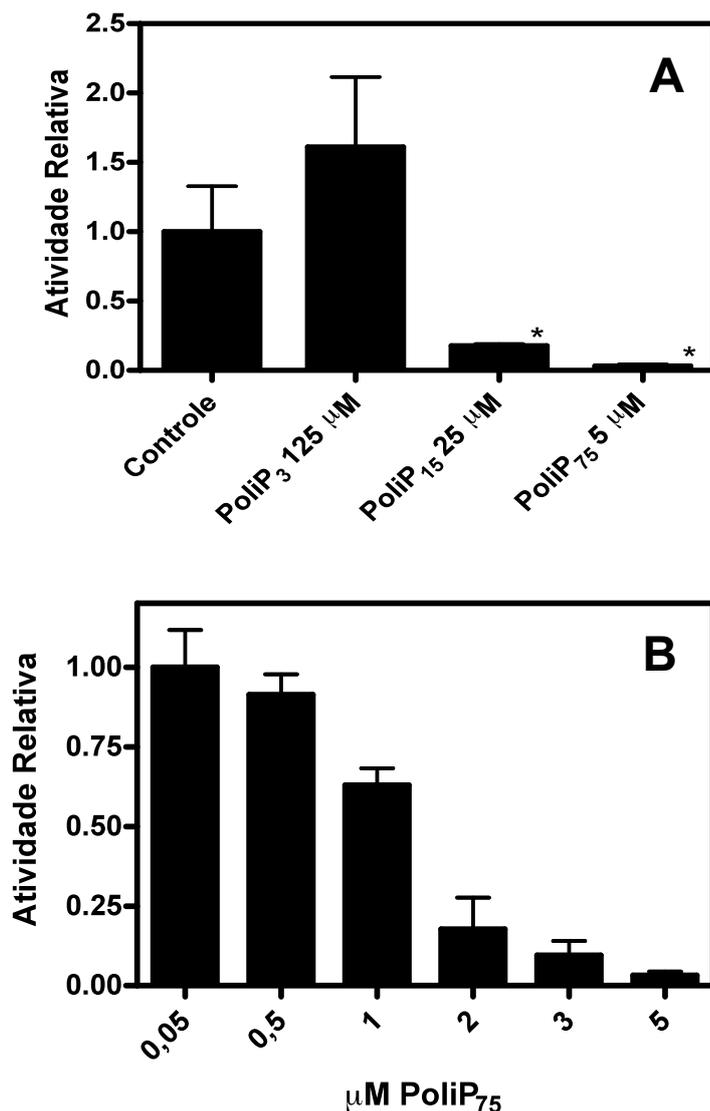
Para avaliar se PoliP poderia interferir também com a modulação de proteínas de vitelo *in vitro*, realizamos a incubação de EA em pH ácido, situação que permite a degradação das proteínas presentes (FIALHO, NAKAMURA *et al.*, 2005). Esta incubação foi feita na presença ou ausência de níveis crescentes de PoliP. Quando o extrato de ovo foi incubado por 5 horas de reação em pH 4,0, verificou-se a degradação de bandas de massa molecular mais elevada e o surgimento de polipeptídeos de menor massa (Fig 18 A). A incubação de EH na presença de 5  $\mu$ M de PoliP<sub>75</sub> inibiu a degradação de bandas de massa elevada (Fig 18 A) e o surgimento de bandas de menor massa molecular (Fig 18 B). Este efeito foi acentuado quando concentrações maiores de PoliP<sub>75</sub> foram utilizadas.



**Figura 15: Inibição de Degradação de Peptídeo Sintético em Extrato Ácido por Pepstatina A.**

20  $\mu\text{g}$  de proteína de Extrato Ácido (EA) foram adicionadas ao meio de reação (Tp Acetato pH 4,0, EDTA 10 mM, DTT 10 mM) contendo 6  $\mu\text{M}$  de peptídeo sintético. A atividade peptidásica foi acompanhada em fluorímetro. Após um breve período de reação, foi adicionada Pepstatina A 10 mM que inibiu completamente a degradação do substrato.

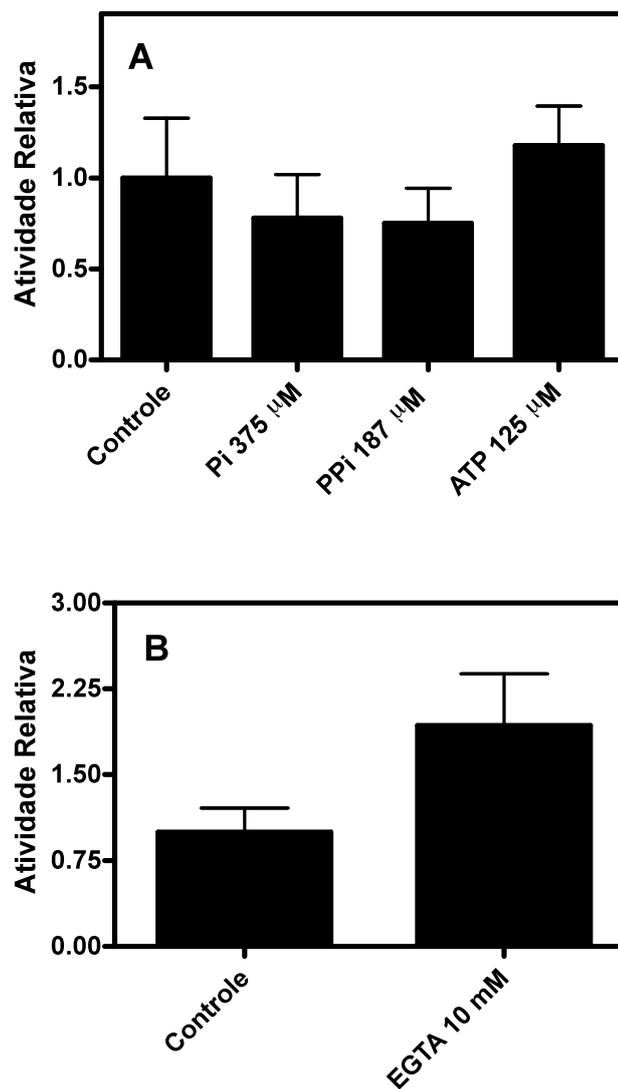
Error!



**Figura 16: Inibição de Protease Aspártica por PoliP**

20 µg de proteína de Extrato Ácido (EA) foram adicionadas ao meio de reação (Tp Acetato pH 4,0, EDTA 10 mM, DTT 10 mM) contendo 6 µM de peptídeo sintético e PoliP. (A) Efeito de Diferentes Tamanhos de PoliP. Os valores foram normalizados de modo a possuir os mesmos níveis de resíduos de Pi. (B) Efeito de diferentes concentrações de PoliP<sub>75</sub>. As barras representam a média e o erro-padrão está representado. As análises estatísticas foram feitas utilizando One Way ANOVA e Teste de Tukey,  $P < 0,05$ .

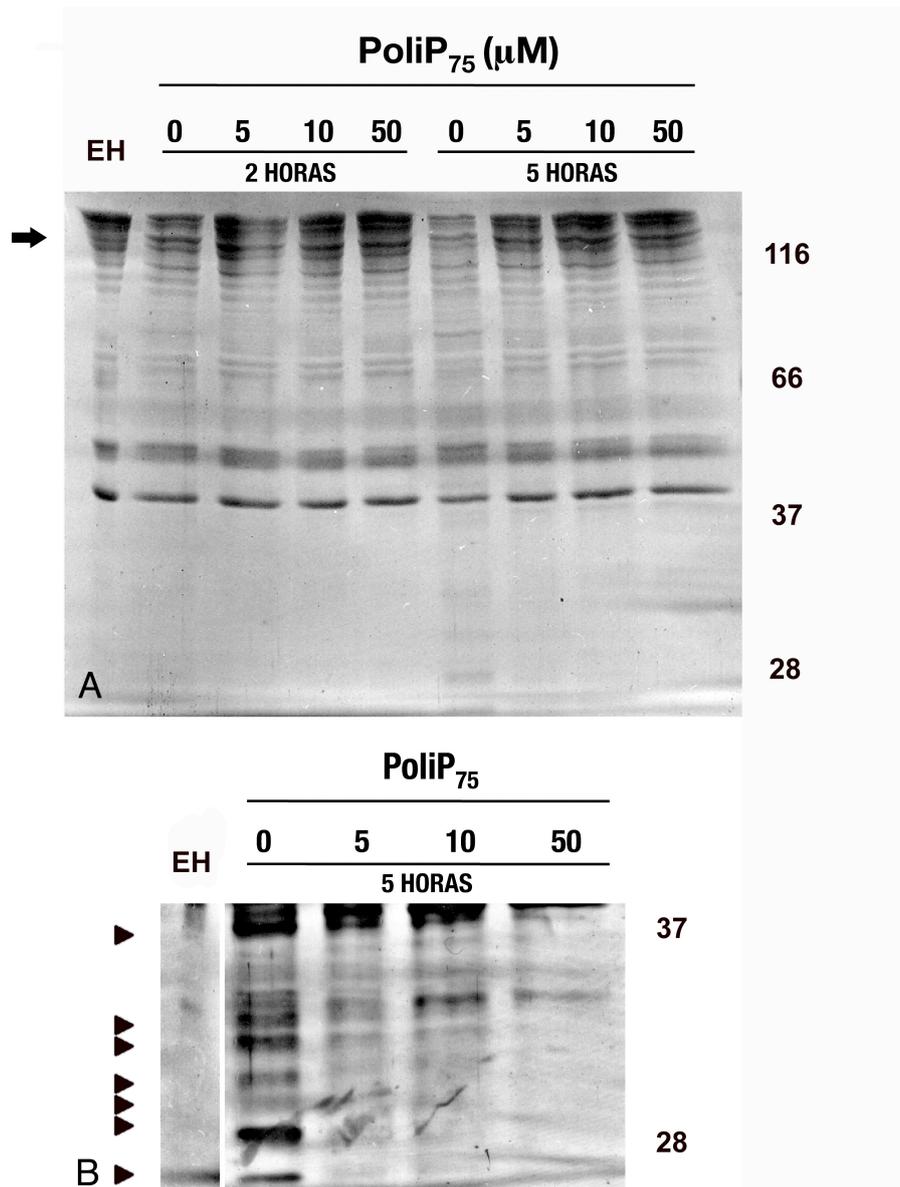




**Figura 17: Modulação por Carga Negativa e Cátion Divalentes**

20  $\mu$ g de proteína de Extrato Ácido (EA) foram adicionadas ao meio de reação (Tp Acetato pH 4,0, EDTA 10 mM, DTT 10 mM) contendo 6  $\mu$ M de peptídeo sintético e potenciais moduladores. (A) Efeito de diferentes moléculas fosforiladas. Os valores foram normalizados de modo a possuir os mesmos níveis de resíduos de Pi.. (B) Efeito de 10 mM EGTA. As barras representam a média e o erro-padrão está representado. As análises estatísticas foram feitas utilizando One Way ANOVA e Teste de Tukey,  $P < 0,05$ .



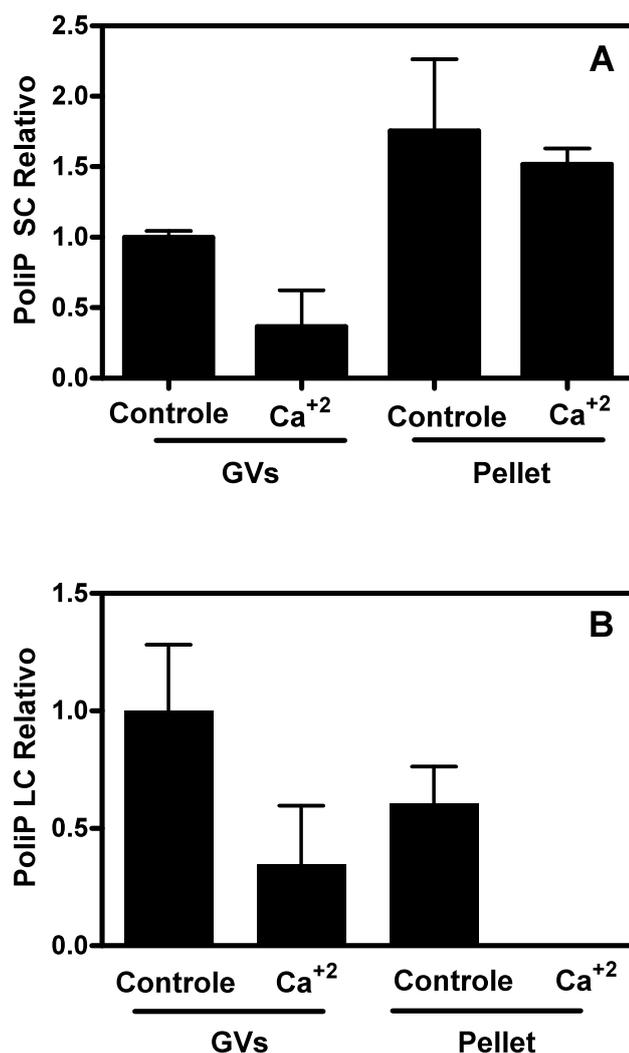


**Figura 18: Modulação mediada por PolIP na degradação de proteínas de vitelo**

Extrato Ácido foi incubado na presença de PolIP em Tp Acetato pH 4.0, EDTA 10 mM e 30 μg foram submetidas a SDS-PAGE. (A) Gel corado com Coomassie Blue. A seta indica a região de alta massa que foi protegida após 5 horas de reação pela adição de PolIP. (B) Detalhe da região de baixa massa em gel corado com Nitrato de Prata. As cabeças de seta indicam a região de baixa massa que surgem em incubações na ausência de PolIP. Os números à direita representam a posição de corrida dos padrões de massa molecular.

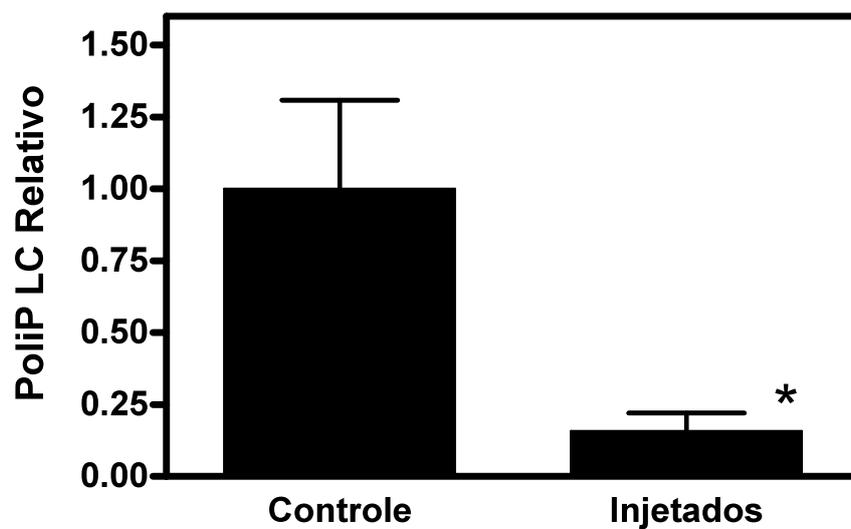
Para avaliar se os níveis de PoliP poderiam ser modulados durante os processos de fusão *in vitro* induzidos pela adição de  $\text{Ca}^{+2}$  (RAMOS, MIRANDA *et al.*, 2007a), os níveis de PoliP foram dosados pós-fusão na fração de grânulos de vitelo e no pellet contendo vesículas densas após o fracionamento com iodixanol. Enquanto os níveis de PoliP SC não se mostraram fortemente modificados (Fig 19 A), os níveis de PoliP LC foram bastante reduzidos tanto nos grânulos de vitelo quanto no pellet após o fracionamento (Fig 19 B).

Durante a resposta contra patógenos, os insetos reduzem seu potencial reprodutivo direcionando energia e nutrientes para a resposta contra o processo infeccioso. Especificamente, parte do processo desencadeado pela infecção artificial com o fungo *Aspergillus niger* caracteriza-se pela acidificação de grânulos de vitelo, ativação de hidrolases e degradação de proteínas de vitelo nos ovócitos vitelogênicos (MEDEIROS, 2008). Como esse processo acontece em ovócitos em amadurecimento no ovário, verifica-se um adiantamento da sinalização para ativação de hidrolases. Quando analisamos a modulação dos níveis de PoliP LC após infecção artificial com o fungo *A. niger*, verificamos que 48 horas após o início do processo infeccioso, havia uma forte redução dos níveis de PoliP (Fig 20).



**Figura 19: Modulação de PoliP por Fusão Mediada por  $Ca^{+2}$**

Para um ensaio de fusão, 25 mM de  $CaCl_2$  foram adicionados a SG. Após 10 minutos, as amostras foram centrifugados em Iodixanol 40%. A fração enriquecida em grânulos de vitelo e o pellet foram recolhidos. O conteúdo de PoliP foi extraído em cadeia curta (A) e cadeia longa (B). Os níveis de PoliP presentes em ambas amostras foram dosados com Azul de Toluidina. Os níveis de PoliP são relativos aos níveis de PoliP na fração do controle dos grânulos de vitelo. As barras representam a média e o erro-padrão está representado.



**Figura 20: PolIP em folículos ovarianos após infecção fúngica**

Conídeos de *A. niger* foram injetados em fêmeas de *R. prolixus*. Os níveis de PolIP LC foram dosados com azul de toluidina 48 horas após a injeção. As barras representam a média e o erro-padrão está representado. A análise estatística foi realizada utilizando Teste T unicaudal,  $P < 0,05$ .

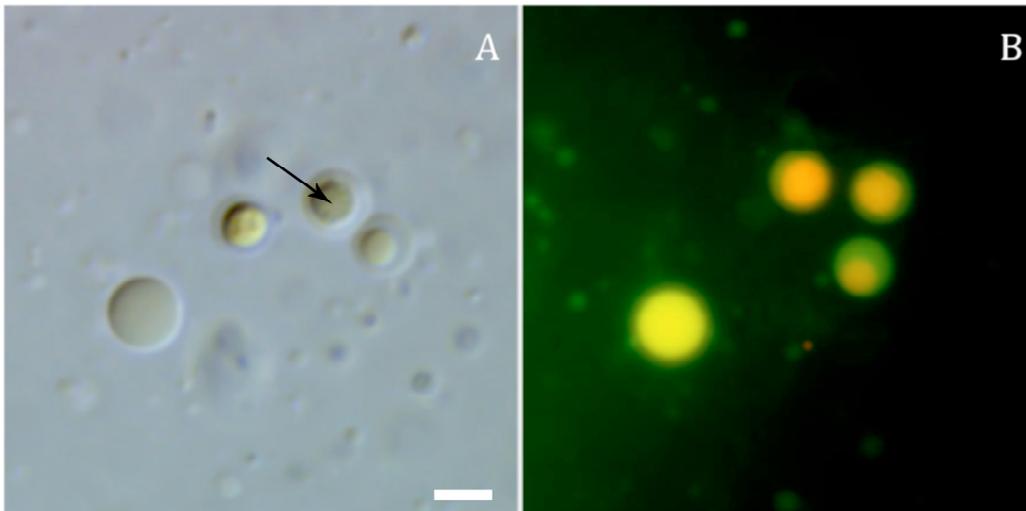
#### 4.4 Polifosfato e Acidocalcissomos em *D. melanogaster*

Os acidocalcissomos vem sendo descritos em diversos organismos incluindo ovos de insetos (MOTTA, 2006). Para verificar se a mosca *D. melanogaster* poderia ser utilizada como um modelo para o estudo dos aspectos genéticos da regulação dos níveis de PoliP, buscamos identificar diferentes aspectos relacionados ao acúmulo de acidocalcissomos nos ovos de *D. melanogaster*.

Laranja de acridina foi utilizado para identificar a existência de compartimentos acídicos nos ovos de 3 horas de desenvolvimento (DOCAMPO *et al.*, 1995; YAMAHAMA, UTO *et al.*, 2003; MOTTA, DA SILVA *et al.*, 2004). Foi reconhecido um grupo de vesículas que apresentam um sub-compartimento interno (core) (Fig 21 A). Enquanto a região periférica desta vesículas apresentou um pH alcalino ou neutro, o core se caracterizou por ser um compartimento ácido (Fig 21 B).

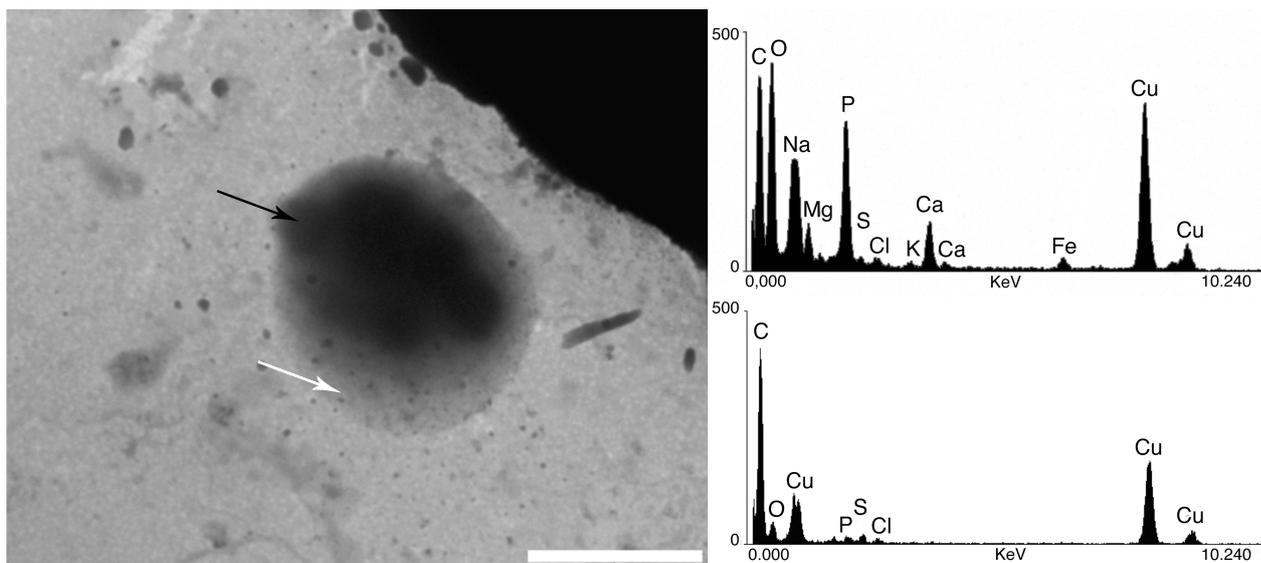
A análise do perfil de composição de elementos de vesículas similares (Fig 22 A), observadas por microscopia ótica, revelou que o core destas vesículas apresenta acúmulo de cálcio, magnésio e fósforo (Fig 22 B). A análise da região periférica, não acidificada, revelou um perfil de elementos diferente do observado no core das vesículas (Fig 22 C).

O core destas vesículas também armazena PoliP em níveis significativos, como pode ser observado a partir da utilização de DAPI em suspensões de grânulos (Fig 23 A e B). Em seguida, coletamos ovos de 3 horas para confirmar o estoque de PoliP e analisar o perfil de armazenamento do polímero em diferentes tamanhos utilizando scPPX. Observamos a presença de 2 vezes mais SC PoliP em relação a LC PoliP armazenado dentro do ovo (Fig 23 C).



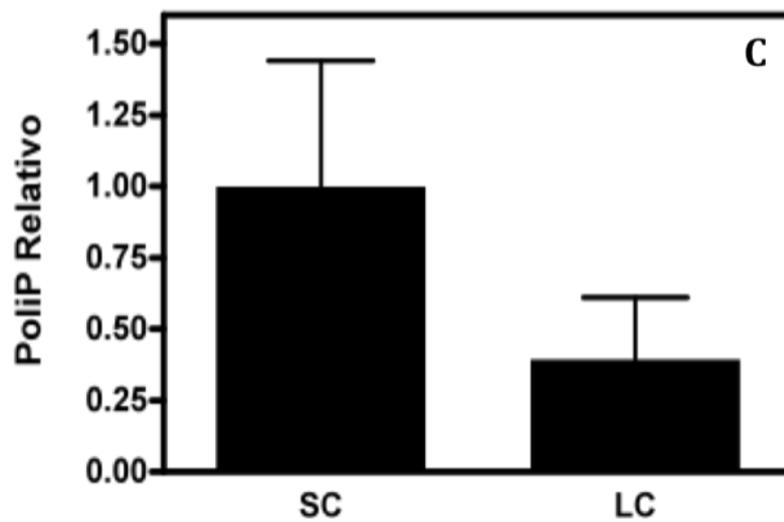
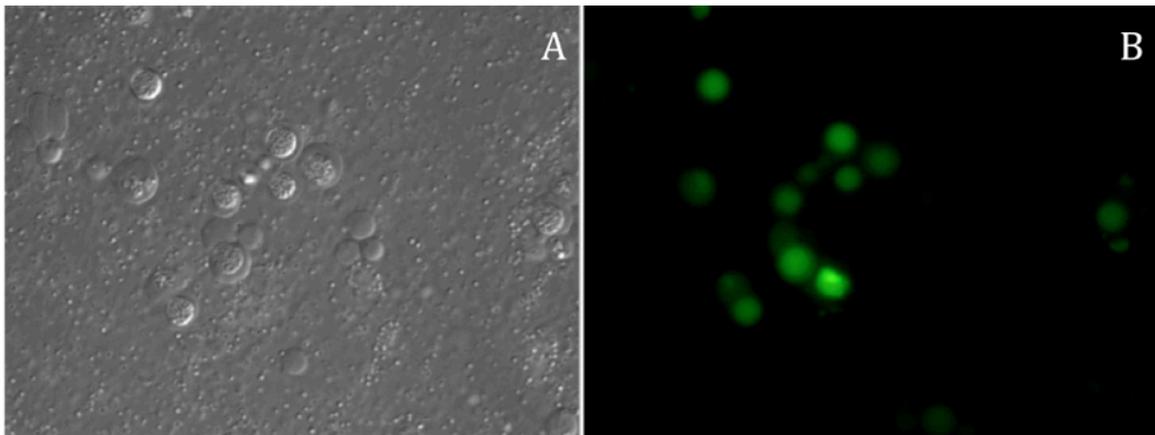
**Figura 21: Acidificação de vesículas visualizada por Laranja de Acridina em *Drosophila melanogaster***

5  $\mu\text{g/ml}$  de Laranja de Acridina foi incubada em suspensões de grânulos de ovos de 3 horas de desenvolvimento. Após 10 minutos de incubação, as lâminas foram observadas por microscopia de fluorescência utilizando filtro para fluoresceína. Barra – 5  $\mu\text{m}$ . A seta indica o core das vesículas.



**Figura 22: Microanálise de Vesículas Acídicas**

Suspensões de Grânulos foram montadas em grades de cobre e observadas como microscópio eletrônico de transmissão equipado com microanálise (A) A composição de elementos do core (B) e da região periférica (C) foram analisadas. As setas preta e branca indicam a região do core onde foram feitas as microanálises do core e região periférica, respectivamente. Os gráficos são representativos. - Barra 5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 23: Acúmulo de PoliP em Ovos de *D. melanogaster***

50  $\mu\text{g/ml}$  de DAPI foi incubado em suspensões de grânulos de ovos de 3 horas de desenvolvimento. As lâminas foram montadas e observadas em microscópio de fluorescência utilizando set de filtros com excitação máxima em 350 nm a emissão acima de 500 nm. Microscopia por DIC (A) e fluorescência (B). O conteúdo de PoliP foi extraído em cadeia curta e cadeia longa. O conteúdo de PoliP foi analisado utilizando scPPX e dosando o conteúdo total de Pi liberado com verde de malaquita (C). As barras representam a média e o erro-padrão está representado.

## 5. Discussão

### 5.1 *Rhodnius prolixus*

O desenvolvimento embrionário de insetos é desacoplado do organismo materno. Assim, todo o material nutritivo que será utilizado pelo embrião durante o seu desenvolvimento deverá ser armazenado durante a ovogênese. A VT é a principal proteína de reserva estocada dentro do ovo. Sendo uma fosfolipoglicoproteína, ela pode fornecer, além de aminoácidos, lipídeos, glicídeos e fosfatos para o embrião em desenvolvimento. No entanto, ela não é a principal fonte nutricional para síntese de lipídeos ou de carboidratos. Corpos lipídicos estocados dentro dos ovos são a principal fonte de lipídios e também a principal reserva energética (ZIEGLER *et al.*, 2006) e o estoque de carboidratos se dá principalmente a partir do acúmulo de moléculas de glicogênio dentro do ovo (SANTOS *et al.*, 2007). Assim, é plausível que reservas de Pi diferentes da VT estejam presentes em ovos de insetos.

O Pi é um nutriente essencial para a formação de ovos. Durante este período, rápidas taxas biossintéticas devem ser acompanhadas de grandes acúmulos de ribossomos, tRNA e mRNA, componentes que acumulam elevados níveis de Pi. Além disso, a grande taxa de duplicação celular durante a embriogênese demanda grande quantidade de Pi para a formação de ácidos nucléicos. (WOODS, PERKINS *et al.*, 2002; WOODS, FAGAN *et al.*, 2004; GILLOOLY, ALLEN *et al.*, 2005). Assim, é essencial que o embrião possua reservas de Pi capazes de suprir a demanda de Pi neste período de seu ciclo de vida.

Em diversos outros organismos, o principal estoque de Pi ocorre na forma de resíduos condensados em um polímero conhecido como PoliP (KORNBERG, 1999;

KULAEV e KULAKOVSKAYA, 2000). No entanto, ainda não foi bem estudado o papel do PoliP durante a embriogênese. Nosso grupo detectou a presença de PoliP estocado em ovos de *P. americana* (Anexo 1) e o presente trabalho estendeu esta descrição para *R. prolixus* e *D. melanogaster*. Diversos papéis poderiam ser postulados para moléculas de PoliP em ovos de insetos. O principal, ou talvez mais óbvio, seria a atuação de PoliP como um reservatório de Pi. No entanto, ao levar em conta a diversidade de estoques de PoliP em uma variedade de compartimentos celulares em modelos eucarióticos, outras funções podem ser postuladas. O presente trabalho analisou, além da relação entre os níveis de Pi e de PoliP, a possibilidade de PoliP atuar como um regulador da homeostase de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular ou da mobilização das proteínas de vitelo.

A regulação dos tamanhos de PoliP ou sua importância em sistemas biológicos ainda não é bem compreendida (KORNBERG, 1999). No entanto, sabe-se que o estoque de PoliP de cadeia curta é um fenômeno verificado em diferentes sistemas, especialmente nos modelos eucarióticos onde acidocalcissomos estão presentes (MORENO, URBINA *et al.*, 2000; RUIZ, RODRIGUES *et al.*, 2001) e foi verificado em *P. americana* (Anexo 1). A regulação do tamanhos dos polímero deve ser um fator importante para a modulação de diversas enzimas por PoliP. Por exemplo, em *E. coli*, uma protease envolvida nas respostas à falta de aminoácidos em meio de cultura é modulada pelo aumento dos níveis de PoliP intracelular, ativando a degradação de proteínas envolvidas na organização de ribossomos (KURODA, NOMURA *et al.*, 2001; KURODA, 2006). Esta modulação dependia da existência de PoliP de cadeia longa e PoliP de cadeia curta não produzia efeitos similares (KURODA, NOMURA *et*

*al.*, 2001; KURODA, 2006). Da mesma forma, os níveis de atividade de PPN e PPX dependem do tamanho dos polímeros sobre o qual elas atuam (LICHKO, KULAKOVSKAYA *et al.*, 2006). Assim, também é possível que o acúmulo de PoliP em estoques de determinado tamanho seja uma forma de modular a taxa de mobilização do polímero.

A análise de PoliP por PPX é bastante seletiva mas possui algumas desvantagens. PoliP frequentemente possui as regiões terminais bloqueadas, impedindo a ação de PPX sobre estas moléculas (KORNBERG, 1999) e são necessárias frações de PoliP purificadas, uma vez que parece ser comum a presença de diversos moduladores de PPX em extratos. Além disso, PPX não está disponível comercialmente e seus parâmetros cinéticos variam de acordo com o tamanho do polímero. Estes fatores tornam, em diversos momentos, a dosagem de PoliP com PPX um método inadequado ou impraticável.

Alternativamente, recentes trabalhos vêm utilizando a propriedade de ligação de PoliP ao DAPI (GOMES, 2006; KLAUTH *et al.*, 2006; CAMPOS, FACANHA *et al.*, 2007; ASCHAR-SOBBI, ABRAMOV *et al.*, 2008). Sabe-se que PoliP é capaz de se ligar a DAPI de forma específica, deslocando o pico de emissão de fluorescência para 525 nm (ALLAN e MILLER, 1980; ASCHAR-SOBBI, ABRAMOV *et al.*, 2008). Desta forma, o DAPI foi utilizado para a observação dos níveis de PoliP em ovos de diferentes dias. Sua concentração foi máxima logo após a postura, sugerindo que PoliP é produzido e estocado durante a ovogênese. Os níveis de PoliP foram gradualmente reduzidos sendo compatível com a utilização de uma molécula-estoque e similar à variação de PoliP observada durante a embriogênese de *Boophilus microplus*

(CAMPOS, FACANHA *et al.*, 2007) e *P. Americana* (Anexo 01), sugerindo a conservação do armazenamento e mobilização de PoliP durante a embriogênese de artrópodes.

Quando correlacionamos a variação de PoliP com a variação de Pi, detectamos que estes se correlacionam de forma inversa. Assim, o aumento dos níveis de Pi parece ocorrer quando se inicia a degradação de PoliP. Um fenômeno similar foi obtido quando comparamos a variação de PoliP com dados previamente estabelecidos por nosso grupo para a variação de  $Ca^{+2}$  livre neste mesmo período (RAMOS, MIRANDA *et al.*, 2007a). Estas observações estão de acordo com a hipótese de que PoliP seja um importante modulador da homeostase de Pi e de  $Ca^{+2}$  nos ovos de *R. prolixus* como já foi observado em diversos organismos (KORNBERG, 1999; KULAEV e KULAKOVSKAYA, 2000; RUIZ, RODRIGUES *et al.*, 2001).

Nosso grupo vem mostrando que diferentes organelas, previamente indentificadas como pertencentes ao grupo dos GVs, são vesículas especializadas e não possuem relação direta com o estoque de VT (MOTTA, 2006; RAMOS, MIRANDA *et al.*, 2007b). Em *P. americana*, estas vesículas parecem estar relacionadas com o estoque de PoliP (GOMES, 2006). Quando analisamos o estoque de PoliP em suspensões de ovos de dia 0, verificamos que este ocorre principalmente em vesículas cujo tamanho se restringe a 0,5 e 1  $\mu m$ . A análise da composição de elementos dessas vesículas revelou o acúmulo de grandes níveis de fósforo e de cálcio. A presença de cálcio em vesículas que armazenam PoliP reforça a hipótese de que o PoliP presente nos ovos seja um regulador da homeostase de  $Ca^{+2}$ . Este fenômeno é similar ao que ocorre em acidocalcissomos presentes em *T. cruzi*, onde a maior parte do  $Ca^{+2}$  e PoliP celular

estão presentes em acidocalcissomos (RUIZ, RODRIGUES *et al.*, 2001; MORENO *et al.*, 2003).

A diminuição dos níveis de PoliP armazenados se inicia no mesmo instante em que se inicia a degradação da VT em *R. prolixus*, um processo mediado pela ativação da Catepsina D armazenada em grânulos de vitelo. Especificamente, já havia sido descrito que PoliP acentua a atividade da Catepsina D de baço bovino (WATABE, TERADA *et al.*, 1979) e que PoliP modula a afinidade de uma protease ATP-dependente de *E. coli* durante a resposta a stress gerada por déficit de aminácidos (KURODA, NOMURA *et al.*, 2001; KURODA, 2006). Nossas análises revelaram que a degradação do substrato fluorescente mediada provavelmente pela Catepsina D de ovo de *R. prolixus* foi regulada pela adição de PoliP de forma tamanho e dose-dependente. Esta regulação foi máxima quando utilizados polímeros de 75 resíduos de Pi e não foi devido ao acúmulo de cargas negativas, uma vez que a utilização de PoliP<sub>3</sub>, Pi, PPI ou ATP, normalizados pelos níveis de resíduos de Pi, não produziram o mesmo efeito. A captura de cátions como Mg<sup>+2</sup> ou Ca<sup>+2</sup>, um efeito da presença de PoliP em diversos sistemas, também não está relacionada à inibição por PoliP uma vez que a adição de quelantes como EDTA ou EGTA não geram efeitos similares. A inibição da degradação de proteínas em ensaios *in vitro* nos permitiu questionar se a degradação de PoliP poderia representar uma etapa da ativação da proteólise do vitelo por Catepsina D durante o desenvolvimento embrionário de *R. prolixus*.

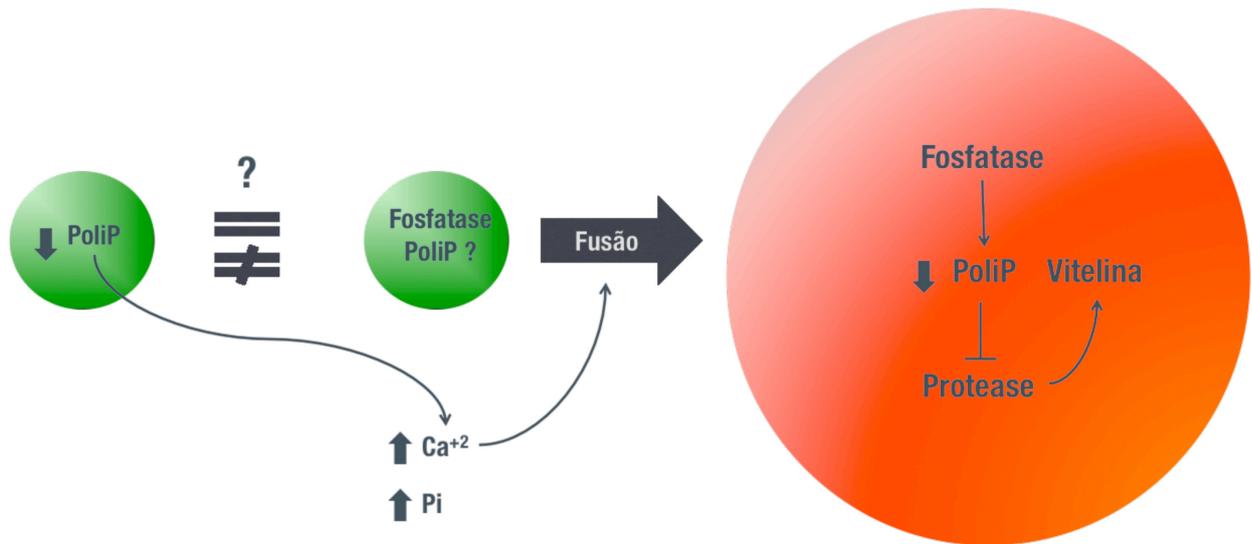
Trabalhos anteriores já haviam sugerido que o início da degradação das VTs depende da fusão de vesículas e do endereçamento de fosfatases ácidas estocadas em vesículas pequenas para os GVs (RAMOS, MIRANDA *et al.*, 2007a). A presença de

fosfatase ácida em grânulos de vitelo após os eventos de fusão, permitiria a degradação de um composto fosfatado, que sugerimos ser PoliP, gerando então a intensa mobilização das VTs (FIALHO, NAKAMURA *et al.*, 2005). Corroborando nossa hipótese de que o composto fosfatado em questão seja PoliP, a indução de eventos de fusão em ovos de dia 3, gerou a degradação dos níveis de PoliP armazenados, principalmente de PoliP LC, o tamanho de polímero que inibe a atividade de Catepsina D de ovos de *R. prolixus*.

Assim, parece plausível que PoliP de cadeia longa estocado dentro dos grânulos de vitelo seja o componente fosfatado previamente descrito. Sua presença deve estar em níveis abaixo daqueles detectados com DAPI por microscopia de fluorescência. A compartimentalização de fosfatases ácidas a partir de processos de fusão que ocorrem intensamente no dia 3 (RAMOS, MIRANDA *et al.*, 2007a), poderia ativar a degradação destes componentes fosforilados, permitindo a ação da Catepsina D neste mesmo período. O processo de fusão depende do aumento dos níveis de  $Ca^{+2}$  livre o que, como demonstrado, poderia ser, pelo menos em parte, associado à hidrólise de PoliP durante o período (Fig 24).

A degradação de PoliP em ensaios de desafio por infecção fúngica fortalece a hipótese da regulação da degradação de proteínas de vitelo por PoliP. Neste sistema, a injeção de fungos em fêmeas após o repasto sanguíneo é capaz de induzir uma intensa degradação de proteínas de vitelo ainda em ovócitos vitelogênicos. Assim, a observação de que PoliP também é degradado neste sistema sugere que, de fato, este evento está acoplado à mobilização das proteínas de vitelo. Assim, a degradação de PoliP, a ativação de Catepsina D e a consequente degradação de proteínas de vitelo

seriam, possivelmente, eventos que ocorreriam a partir de um mesmo sinal e fariam parte da mesma via metabólica.



**Figura 24: Modelo Esquemático para Modulação por PoliP dos níveis de Pi e  $\text{Ca}^{+2}$  e da degradação de vitelo**

Ao se iniciar a hidrólise de de PoliP em vesículas especializadas, ocorre o aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular. O aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{+2}$  ativam o processo de fusão que leva à compartimentaliza da fosfatase ácida nos grânulos de vitelo. A ativação de fosfatase ácida, por sua vez, leva à degradação de PoliP presente dentro dos Grânulos de Vitelo, permitindo a ativação da Catepsina D, reponsável pela degradação do vitelo.

## 5.2 *Drosophila melanogaster*

Após a descrição inicial de acidocalcissomos em tripanosomatídeos, eles vêm sendo descritos em diversos organismos e hoje se sabe que diversas organelas ou vesículas se organizam em um grupo maior de organelas similares a acidocalcissomos (DOCAMPO, DE SOUZA *et al.*, 2005). Esta existência ubíqua sugere funções conservadas e essenciais ao funcionamento de sistema biológicos. Especificamente, o nosso grupo vem desenvolvendo diversas análises no sentido de descrever a existência destas organelas em ovos de *Rhodnius prolixus* e de *Periplaneta americana*. No entanto, a descrição de acidocalcissomos em um animal superior que pudesse servir de modelo, permitiria o aprofundamento das análises e a melhor compreensão da importância e do funcionamento destas organelas.

Acidocalcissomos possuem bombas de  $H^+$  responsáveis por regular o pH interno ácido. A regulação de pH parece ser importante para diversos processos, entre eles a mobilização de PoliP. PoliP está presente em grandes níveis em acidocalcissomos que, nos modelos onde foi descrito, responde pelo principal local de acúmulo de PoliP que se encontra associado com a outros íons como  $Ca^{+2}$  e  $Mg^{+2}$  (DOCAMPO, DE SOUZA *et al.*, 2005). Em *Drosophila melanogaster*, um grupo de vesículas presente em ovos de 3 horas possui diversas características de acidocalcissomos. Estas vesículas possuem um perfil ácido e grandes níveis de fósforo e cálcio em sua composição atômica. Além disso, elas estocam grandes níveis de PoliP, principalmente PoliP de cadeia curta. Todas estas características sugerem a existência de organelas similares a acidocalcissomos nos ovos de *D. melanogaster*.

Em outros modelos, acidocalcissomos representam os sítios principais de acúmulo PoliP e estão relacionados com a homeostase de cálcio em *P. americana* e *R. prolixus*. Em tripanosomatídeos, eles são importantes para a resposta ao stress osmótico do protozoário (RUIZ, RODRIGUES *et al.*, 2001) e se fundem com vacúolos contráteis (MONTALVETTI, ROHLOFF *et al.*, 2004; ROHLOFF, MONTALVETTI *et al.*, 2004). Neste sentido, seu papel na regulação dos níveis osmóticos intracelulares nos ovos e em outras células de insetos ainda é algo a ser investigado.

Assim, estas características sugerem que a presença de acidocalcissomos se estende para um importante modelo de Biologia Molecular e Desenvolvimento, abrindo perspectivas para os estudos dos diferentes processos metabólicos destas organelas.

## 6. Referências Bibliográficas

Abramov, A. Y., *et al.* Targeted polyphosphatase expression alters mitochondrial metabolism and inhibits calcium-dependent cell death. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.104, n.46, Nov 13, p.18091-6. 2007.

Ahn, K. e A. Kornberg. Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. Journal of Biological Chemistry, v.265, n.20, Jul 15, p.11734-9. 1990.

Akiyama, M., E. Crooke e A. Kornberg. The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*. Isolation and sequence of the *ppk* gene and membrane location of the protein. Journal of Biological Chemistry, v.267, n.31, Nov 5, p.22556-61. 1992.

\_\_\_\_\_. An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon. Journal of Biological Chemistry, v.268, n.1, Jan 5, p.633-9. 1993.

Alberts, B. Molecular biology of the cell. New York: Garland Science. 2002. xxxiv, 1464 p. p.

Allan, R. A. e J. J. Miller. Influence of S-adenosylmethionine on DAPI-induced fluorescence of polyphosphate in the yeast vacuole. Canadian Journal of Microbiology, v.26, n.8, Aug, p.912-20. 1980.

Aravind, L. e E. V. Koonin. A novel family of predicted phosphoesterases includes *Drosophila* prune protein and bacterial RecJ exonuclease. Trends in Biochemical Sciences, v.23, n.1, Jan, p.17-9. 1998.

Aschar-Sobbi, R., *et al.* High Sensitivity, Quantitative Measurements of Polyphosphate Using a New DAPI-Based Approach. Journal of Fluorescence. 2008.

Ault-Riche, D., *et al.* Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology, v.180, n.7, Apr, p.1841-7. 1998.

Baum, J. S., J. P. St George e K. McCall. Programmed cell death in the germline. Seminars in Cell and Developmental Biology, v.16, n.2, Apr, p.245-59. 2005.

Beauvoit, B., *et al.* Differential sensitivity of the cellular compartments of *Saccharomyces cerevisiae* to protonophoric uncoupler under fermentative and respiratory energy supply. Biochemistry, v.30, n.47, Nov 26, p.11212-20. 1991.

Bertrand Beauvoit, M. R., Bernard Guerin and Paul Canioni. Polyphosphates as a source of high energy phosphates in yeast mitochondria: A  $^{31}\text{P}$  NMR study. FEBS Letters, v.252, n.1-2, p.17-21. 1989.

Blum, E., *et al.* Polyphosphate kinase is a component of the Escherichia coli RNA degradosome. Molecular Microbiology, v.26, n.2, Oct, p.387-98. 1997.

Bode, G., *et al.* Identification of structures containing polyphosphate in Helicobacter pylori. Journal of General Microbiology, v.139, n.12, Dec, p.3029-33. 1993.

Bohrmann, J. e B. Braun. Na,K-ATPase and V-ATPase in ovarian follicles of Drosophila melanogaster. Biologie Cellulaire, v.91, n.2, Mar, p.85-98. 1999.

Bonting, C. F., G. J. Kortstee e A. J. Zehnder. Properties of polyphosphate: AMP phosphotransferase of Acinetobacter strain 210A. Journal of Bacteriology, v.173, n.20, Oct, p.6484-8. 1991.

Brusca, R. C. e G. J. Brusca. Invertebrates. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. 2003. xviii, 936 p. p.

Büning, J. Insect Ovary: Ultrastructure, previtellogenic growth and evolution London: Chapman & Hall, v.1. 1994. 424 p.

Campos, E., *et al.* A mitochondrial exopolyphosphatase activity modulated by phosphate demand in Rhipicephalus (Boophilus) microplus embryo. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v.37, n.10, Oct, p.1103-7. 2007.

Castuma, C. E., *et al.* Inorganic Polyphosphates in the Acquisition of Competence in Escherichia coli. Journal of Biological Chemistry, v.270, n.22, June 2, 1995, p.12980-12983. 1995.

Chen, W., R. J. Palmer e H. K. Kuramitsu. Role of polyphosphate kinase in biofilm formation by Porphyromonas gingivalis. Infection and Immunity, v.70, n.8, Aug, p.4708-15. 2002.

Colman, A. e D. G. Gadian.  $^{31}\text{P}$  nuclear-magnetic-resonance studies on the developing embryos of Xenopus laevis. European Journal of Biochemistry, v.61, n.2, Jan 15, p.387-96. 1976.

Docampo, R., *et al.* Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. Nature Reviews. Microbiology, v.3, n.3, Mar, p.251-61. 2005.

\_\_\_\_\_. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  storage in acidocalcisomes of Trypanosoma cruzi. Biochemical Journal, v.310 ( Pt 3), Sep 15, p.1005-12. 1995.

Elser, J. J., *et al.* Organism Size, Life History, and N:P Stoichiometry. Bioscience, v.46, n.9, p.674-684. 1996.

Espiau, B., *et al.* A soluble pyrophosphatase, a key enzyme for polyphosphate metabolism in *Leishmania*. Journal of Biological Chemistry, v.281, n.3, Jan 20, p.1516-23. 2006.

Fagotto, F. Regulation of yolk degradation, or how to make sleepy lysosomes. Journal of Cell Science, v.108 ( Pt 12), Dec, p.3645-7. 1995.

Fakhouri, M., *et al.* Minor proteins and enzymes of the *Drosophila* eggshell matrix. Developmental Biology, v.293, n.1, May 1, p.127-41. 2006.

Fang, J., *et al.* Overexpression of a Zn<sup>2+</sup>-sensitive soluble exopolyphosphatase from *Trypanosoma cruzi* depletes polyphosphate and affects osmoregulation. Journal of Biological Chemistry, v.282, n.44, Nov 2, p.32501-10. 2007.

Fausto, A. M., *et al.* Yolk granules are differentially acidified during embryo development in the stick insect *Carausius morosus*. Cell and Tissue Research, v.305, n.3, Sep, p.433-43. 2001.

Fialho, E., *et al.* Cathepsin D-mediated yolk protein degradation is blocked by acid phosphatase inhibitors. Archives of Biochemistry and Biophysics, v.436, n.2, Apr 15, p.246-53. 2005.

Fiske, C. F. e Y. Subbarow. The Colorimetric Determination of Phosphorus. Journal of Biological Chemistry, n.66, p.375-400. 1925.

Gillooly, J. F., *et al.* The metabolic basis of whole-organism RNA and phosphorus content. Proceedings of the National Academy of Sciences, v.102, n.33, August 16, 2005, p.11923-11927. 2005.

Gomes, F. M. Caracterização de Polifosfato em Ovos de *Periplaneta americana*. Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

Gonzalez, H. e T. E. Jensen. Nickel sequestering by polyphosphate bodies in *Staphylococcus aureus*. Microbios, v.93, n.376, p.179-85. 1998.

Hernandez-Ruiz, L., *et al.* Inorganic polyphosphate and specific induction of apoptosis in human plasma cells. Haematologica, v.91, n.9, Sep, p.1180-6. 2006.

Hsieh, P. C., *et al.* Purification of polyphosphate and ATP glucose phosphotransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra: evidence that poly(P) and ATP glucokinase activities are catalyzed by the same enzyme. Protein Expression and Purification, v.4, n.1, Feb, p.76-84. 1993.

Huang, R. e R. N. Reusch. Genetic competence in *Escherichia coli* requires poly-beta-hydroxybutyrate/calcium polyphosphate membrane complexes and certain divalent cations. Journal of Bacteriology, v.177, n.2, Jan, p.486-90. 1995.

Huebner, E. Oocyte-follicle cell interaction during normal oogenesis and atresia in an insect. Journal of Ultrastructure Research, v.74, n.1, Jan, p.95-104. 1981.

Huebner, E. e E. Anderson. A cytological study of the ovary of *Rhodnius prolixus*. II. Oocyte differentiation. Journal of Morphology, v.137, n.4, Aug, p.385-415. 1972.

Ishige, K., H. Zhang e A. Kornberg. Polyphosphate kinase (PPK2), a potent, polyphosphate-driven generator of GTP. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.99, n.26, Dec 24, p.16684-8. 2002.

Jeffrey, D. Phosphate nutrition of Australian heath plants. II. The formation of polyphosphate by five heath species. Australian Journal of Botany, v.16, n.3, p.603-613. 1968.

Kapuscinski, J. Interactions of nucleic acids with fluorescent dyes: spectral properties of condensed complexes. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, v.38, n.9, Sep, p.1323-9. 1990.

Keasling, J. D. Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. Annals of the New York Academy of Sciences, v.829, Nov 21, p.242-9. 1997.

Keasling, J. D., L. Bertsch e A. Kornberg. Guanosine pentaphosphate phosphohydrolase of *Escherichia coli* is a long-chain exopolyphosphatase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.90, n.15, Aug 1, p.7029-33. 1993.

Keasling, J. D. e G. A. Hupf. Genetic manipulation of polyphosphate metabolism affects cadmium tolerance in *Escherichia coli*. Applied and Environmental Microbiology, v.62, n.2, Feb, p.743-6. 1996.

Kerkut, G. A. e L. I. Gilbert. Comprehensive insect physiology, biochemistry, and pharmacology. Oxford ; New York: Pergamon Press. 1985

Kim, H. Y., *et al.* Alginate, inorganic polyphosphate, GTP and ppGpp synthesis co-regulated in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for stationary phase survival and synthesis of RNA/DNA precursors. Molecular Microbiology, v.27, n.4, Feb, p.717-25. 1998.

Klauth, P., *et al.* Determination of soluble and granular inorganic polyphosphate in *Corynebacterium glutamicum*. Applied Microbiology and Biotechnology, v.72, n.5, Oct, p.1099-106. 2006.

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

Kulaev, B. S., A. E. Enes e A. G. Popov. [Blood flow redistribution in the stimulation of the structures of the ventral surface of the medulla oblongata]. Doklady Akademii Nauk SSSR, v.272, n.6, p.1510-2. 1983.

Kulaev, I. e T. Kulakovskaya. Polyphosphate and phosphate pump. Annual Review of Microbiology, v.54, p.709-34. 2000.

Kulaev, I., V. Vagabov e T. Kulakovskaya. New aspects of inorganic polyphosphate metabolism and function. Journal of Bioscience and Bioengineering, v.88, n.2, p.111-29. 1999.

Kulaev, I. S. e V. M. Vagabov. Polyphosphate metabolism in micro-organisms. Advances in Microbial Physiology, v.24, p.83-171. 1983.

Kumble, K. D. e A. Kornberg. Endopolyphosphatases for long chain inorganic polyphosphate in yeast and mammals. Journal of Biological Chemistry, v.271, n.43, Oct 25, p.27146-51. 1996.

Kuroda, A. A polyphosphate-lon protease complex in the adaptation of Escherichia coli to amino acid starvation. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, v.70, n.2, Feb, p.325-31. 2006.

Kuroda, A., *et al.* Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in Escherichia coli. Journal of Biological Chemistry, v.272, n.34, Aug 22, p.21240-3. 1997.

\_\_\_\_\_. Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in E. coli. Science, v.293, n.5530, Jul 27, p.705-8. 2001.

Kusano, S. e A. Ishihama. Functional interaction of Escherichia coli RNA polymerase with inorganic polyphosphate. Genes to Cells, v.2, n.7, Jul, p.433-41. 1997.

Lichko, L., T. Kulakovskaya e I. Kulaev. Membrane-bound and soluble polyphosphatases of mitochondria of Saccharomyces cerevisiae: identification and comparative characterization. Biochimica et Biophysica Acta, v.1372, n.2, Jul 17, p.153-62. 1998.

Lichko, L. P., T. V. Kulakovskaya e I. S. Kulaev. Nuclear exopolyphosphatase of Saccharomyces cerevisiae is not encoded by the PPX1 gene encoding the major yeast exopolyphosphatase. FEMS Yeast Research, v.3, n.1, Mar, p.113-7. 2003.

\_\_\_\_\_. Inorganic polyphosphates and exopolyphosphatases in different cell compartments of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemistry, v.71, n.11, Nov, p.1171-5. 2006.

Liu, X. e J. H. Nordin. Localization of the proenzyme form of the vitellin-processing protease in *Blattella germanica* by affinity-purified antibodies. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v.38, n.3, p.109-18. 1998.

Lorenz, B., *et al.* Changes in metabolism of inorganic polyphosphate in rat tissues and human cells during development and apoptosis. Biochimica et Biophysica Acta, v.1335, n.1-2, Apr 17, p.51-60. 1997.

Lorenz, B. e H. C. Schröder. Mammalian intestinal alkaline phosphatase acts as highly active exopolyphosphatase. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, v.1547, n.2, p.254-261. 2001.

Lowry, O. H., *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, v.193, n.1, Nov, p.265-75. 1951.

Machado, E. A., *et al.* Uptake of *Rhodnius* heme-binding protein (RHBP) by the ovary of *Rhodnius prolixus*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v.39, n.4, p.133-43. 1998.

Marchesini, N., *et al.* Acidocalcisomes are functionally linked to the contractile vacuole of *Dictyostelium discoideum*. Journal of Biological Chemistry, v.277, n.10, Mar 8, p.8146-53. 2002.

Medeiros, M. Ovogênese e Degeneração de Folículos Ovarianos induzida pela Resposta Imune em *Rhodnius prolixus*. Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Melo, A. C., *et al.* Synthesis of vitellogenin by the follicle cells of *Rhodnius prolixus*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v.30, n.7, Jul, p.549-57. 2000.

Mino, T. Microbial selection of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge wastewater treatment processes for enhanced biological phosphate removal. Biochemistry, v.65, n.3, Mar, p.341-8. 2000.

Montalvetti, A., P. Rohloff e R. Docampo. A functional aquaporin co-localizes with the vacuolar proton pyrophosphatase to acidocalcisomes and the contractile vacuole complex of *Trypanosoma cruzi*. Journal of Biological Chemistry, v.279, n.37, Sep 10, p.38673-82. 2004.

Moreno, B., *et al.* <sup>31</sup>P NMR spectroscopy of *Trypanosoma brucei*, *trypanosoma cruzi*, and *leishmania major*. Evidence for high levels of condensed inorganic phosphates. Journal of Biological Chemistry, v.275, n.37, Sep 15, p.28356-62. 2000.

Moreno, S. N. e R. Docampo. Calcium regulation in protozoan parasites. Current Opinion in Microbiology, v.6, n.4, Aug, p.359-64. 2003.

Motta, L. S. Próton-Pirofosfatase em *Rhodnius prolixus* e *Periplaneta americana*: Caracterização Bioquímica e Participação na Acidificação de Compartimentos Subcelulares. Instituto de Biofísica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

Motta, L. S., *et al.* A new model for proton pumping in animal cells: the role of pyrophosphate. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v.34, n.1, Jan, p.19-27. 2004.

Nascimento-Silva, M. C., *et al.* BYC, an atypical aspartic endopeptidase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology, v.149, n.4, Apr, p.599-607. 2008.

Nussenzveig, R. H., P. L. Oliveira e H. Masuda. Identification of yolk platelet-associated hydrolases in the oocytes of *Rhodnius prolixus*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v.21, n.4, p.253-62. 1992.

Ogawa, N., J. Derisi e P. O. Brown. New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. Molecular Biology of the Cell, v.11, n.12, Dec, p.4309-21. 2000.

Okorokov, L. A., L. P. Lichko e N. A. Andreeva. Changes of ATP, polyphosphate and K<sup>+</sup> contents in *Saccharomyces carlsbergensis* during uptake of Mn<sup>2+</sup> and glucose. Biochemistry International, v.6, n.4, Apr, p.481-8. 1983.

Okorokov, L. A., L. P. Lichko e I. S. Kulaev. Vacuoles: main compartments of potassium, magnesium, and phosphate ions in *Saccharomyces carlsbergensis* cells. Journal of Bacteriology, v.144, n.2, Nov, p.661-5. 1980.

Oliveira, P. L., *et al.* Uptake of yolk proteins in *Rhodnius prolixus*. Journal of Insect Physiology, v.32, n.10, p.859-866. 1986.

Pallerla, S. R., *et al.* Formation of volutin granules in *Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiology Letters, v.243, n.1, Feb 1, p.133-40. 2005.

Pick, U., *et al.* Polyphosphate-hydrolysis--a protective mechanism against alkaline stress? FEBS Letters, v.274, n.1-2, Nov 12, p.15-8. 1990.

Raikhel, A. S. e T. S. Dhadialla. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. Annual Review of Entomology, v.37, p.217-51. 1992.

Raikhel, A. S., *et al.* Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v.32, n.10, Oct, p.1275-86. 2002.

Ramos, I. B., *et al.* Calcium-regulated fusion of yolk granules during early embryogenesis of *Periplaneta americana*. Molecular Reproduction and Development, v.73, n.10, Oct, p.1247-54. 2006.

\_\_\_\_\_. Calcium-regulated fusion of yolk granules is important for yolk degradation during early embryogenesis of *Rhodnius prolixus* Stahl. Journal of Experimental Biology, v.210, n.Pt 1, Jan, p.138-48. 2007a.

\_\_\_\_\_. Calcium-regulated fusion of yolk granules is important for yolk degradation during early embryogenesis of *Rhodnius prolixus* Stahl. Journal of Experimental Biology, v.210, n.1, January 1, 2007, p.138-148. 2007b.

Rao, N. N. e A. Torriani. Utilization by *Escherichia coli* of a high-molecular-weight, linear polyphosphate: roles of phosphatases and pore proteins. Journal of Bacteriology, v.170, n.11, Nov, p.5216-23. 1988.

Rashid, M. H. e A. Kornberg. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.97, n.9, Apr 25, p.4885-90. 2000.

Reizer, J., *et al.* Exopolyphosphate phosphatase and guanosine pentaphosphate phosphatase belong to the sugar kinase/actin/hsp70 superfamily. Trends in Biochemical Sciences, v.18, n.7, p.247-248. 1993.

Rodrigues, C. O., *et al.* Characterization of isolated acidocalcisomes from *Toxoplasma gondii* tachyzoites reveals a novel pool of hydrolyzable polyphosphate. Journal of Biological Chemistry, v.277, n.50, Dec 13, p.48650-6. 2002.

\_\_\_\_\_. An acidocalcisomal exopolyphosphatase from *Leishmania major* with high affinity for short chain polyphosphate. Journal of Biological Chemistry, v.277, n.52, Dec 27, p.50899-906. 2002.

Rodriguez, R. J. Polyphosphate Present in DNA Preparations from Filamentous Fungal Species of *Colletotrichum* Inhibits Restriction Endonucleases and Other Enzymes. Analytical Biochemistry, v.209, n.2, p.291-297. 1993.

Rohloff, P., A. Montalvetti e R. Docampo. Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. Journal of Biological Chemistry, v.279, n.50, Dec 10, p.52270-81. 2004.

Ruiz, F. A., *et al.* Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. Journal of Biological Chemistry, v.279, n.43, Oct 22, p.44250-7. 2004.

\_\_\_\_\_. The polyphosphate bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* possess a proton-pumping pyrophosphatase and are similar to acidocalcisomes. Journal of Biological Chemistry, v.276, n.49, Dec 7, p.46196-203. 2001.

Ruiz, F. A., C. O. Rodrigues e R. Docampo. Rapid changes in polyphosphate content within acidocalcisomes in response to cell growth, differentiation, and environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. Journal of Biological Chemistry, v.276, n.28, Jul 13, p.26114-21. 2001.

Santos, R., *et al.* Carbohydrate accumulation and utilization by oocytes of *Rhodnius prolixus*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v.67, n.2, Dec 6, p.55-62. 2007.

Schuddemat, J., *et al.* Polyphosphate synthesis in yeast. Biochimica et Biophysica Acta, v.1010, n.2, Feb 9, p.191-8. 1989.

Sethuraman, A., N. N. Rao e A. Kornberg. The endopolyphosphatase gene: essential in *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.98, n.15, Jul 17, p.8542-7. 2001.

Seufferheld, M., *et al.* The H(+)-pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum* is predominantly located in polyphosphate-rich acidocalcisomes. Journal of Biological Chemistry, v.279, n.49, Dec 3, p.51193-202. 2004.

\_\_\_\_\_. Identification of organelles in bacteria similar to acidocalcisomes of unicellular eukaryotes. Journal of Biological Chemistry, v.278, n.32, Aug 8, p.29971-8. 2003.

Shiba, T., *et al.* Inorganic polyphosphate and the induction of *rpoS* expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.94, n.21, Oct 14, p.11210-5. 1997.

Shirahama, K., *et al.* Vacuolar function in the phosphate homeostasis of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Plant and Cell Physiology, v.37, n.8, Dec, p.1090-3. 1996.

Skorko, R. Polyphosphate as a source of phosphoryl group in protein modification in the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. Biochimie, v.71, n.9-10, p.1089-1093. 1989.

Smith, S. A., *et al.* Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.103, n.4, Jan 24, p.903-8. 2006.

Snigirevskaya, E. S., A. R. Hays e A. S. Raikhel. Secretory and internalization pathways of mosquito yolk protein precursors. Cell and Tissue Research, v.290, n.1, Oct, p.129-42. 1997.

T.A. Markow, B. R., D. Dobberful, C.M. Breitmeyer, J.J. Elser, E. Pfeiler. Elemental Stoichiometry of *Drosophila* and their hosts. Functional Ecology, n.13, p.78-84. 1999.

Therese Ann Markow, A. C., Thomas Watts. How *Drosophila* males make eggs: it is elemental. Proc R Soc Lond n.268, p.1527-1532. 2001.

Valle, D. Vitellogenesis in insects and other groups--a review. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, v.88, n.1, Jan-Mar, p.1-26. 1993.

Wang, Y. e W. H. Telfer. Pertussis toxin-sensitive G protein that supports vitellogenin uptake by promoting patency. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v.39, n.1, p.36-45. 1998.

Waring, G. L. e A. P. Mahowald. Identification and time of synthesis of chorion proteins in *Drosophila melanogaster*. Cell, v.16, n.3, Mar, p.599-607. 1979.

Watabe, S., *et al.* Polyphosphate anions increase the activity of bovine spleen cathepsin D. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.89, n.4, Aug 28, p.1161-7. 1979.

Woods, H. A., *et al.* Allometric and phylogenetic variation in insect phosphorus content. Functional Ecology, v.18, n.1, p.103-109. 2004.

\_\_\_\_\_. Temperature and the chemical composition of poikilothermic organisms. Functional Ecology, v.17, p.237-245. 2003.

\_\_\_\_\_. Absorption and storage of phosphorus by larval *Manduca sexta*. Journal of Insect Physiology, v.48, n.5, May, p.555-564. 2002.

Wurst, H., T. Shiba e A. Kornberg. The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology, v.177, n.4, Feb, p.898-906. 1995.

Wykoff, D. D. e E. K. O'shea. Phosphate transport and sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, v.159, n.4, Dec, p.1491-9. 2001.

Yael Meller-Harel, A. A., Yair Aharonowitz, David Gutnick, Dafna Ben-Bashat, Gil Navon. Inhibition by polyphosphate of phytopathogenic polygalacturonases from *Botrytis cinerea*. Canadian Journal of Microbiology, v.43, n.9, p.6. 1997.

Yamahama, Y., *et al.* In vivo activation of pro-form Bombyx cysteine protease (BCP) in silkworm eggs: localization of yolk proteins and BCP, and acidification of yolk granules. Journal of Insect Physiology, v.49, n.2, Feb, p.131-40. 2003.

Ziegler, R. e R. Van Antwerpen. Lipid uptake by insect oocytes. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v.36, n.4, Apr, p.264-72. 2006.

## **Anexo 01**

Artigo aceito para publicação pela revista Journal of Insect Physiology.

Polyphosphate Polymers During Early Embryogenesis of *Periplaneta americana*,  
Gomes, F.M., Ramos, I.B., Miranda, K., Santiago, M.F., de Souza, W., Machado,  
E.A.,

Journal of Insect Physiology (2007), doi:10.1016/j.jinsphys.2008.07.018



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Insect Physiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jinsphys](http://www.elsevier.com/locate/jinsphys)



# Polyphosphate polymers during early embryogenesis of *Periplaneta americana*

F.M. Gomes<sup>a</sup>, I.B. Ramos<sup>a</sup>, L.M. Motta<sup>a</sup>, K. Miranda<sup>b</sup>, M.F. Santiago<sup>c</sup>, W. de Souza<sup>b</sup>, E.A. Machado<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Entomologia Médica, Programa de Parasitologia e Biologia Celular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária. Rio de Janeiro, 21941-590, RJ, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Programa de Parasitologia e Biologia Celular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária. Rio de Janeiro, 21941-590, RJ, Brazil

<sup>c</sup>Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular, Programa de Bioengenharia e Biotecnologia Animal, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária. Rio de Janeiro, 21941-590, RJ, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 February 2008

Received in revised form 25 July 2008

Accepted 30 July 2008

#### Keywords:

Calcium  
Development  
Insect  
Phosphate  
Polyphosphate

### ABSTRACT

Inorganic polyphosphates (PolyP) are linear polymers of phosphate (Pi) residues linked by high-energy phosphoanhydride bonds. Despite a wide distribution, their role during insect embryogenesis has not been examined so far. In this study, we show the mobilization of PolyP polymers during the embryogenesis of the cockroach *Periplaneta americana*. PolyP was detected by enzymatic and fluorimetric assays and found to accumulate in two main sizes by agarose gel electrophoresis. Confocal microscopy showed their presence in small vesicles. In addition, X-ray microanalysis of small vesicles showed considerable amounts of calcium, sodium and magnesium, suggesting an association of PolyP with these elements. Variations of the free Ca<sup>+2</sup>, Pi and PolyP levels were observed during the first days of embryogenesis. Our results are consistent with the hypothesis that phosphate ions modulate PolyP variation and that PolyP hydrolysis result in increasing free Ca<sup>+2</sup> levels. This is the first investigation of PolyP metabolism during embryogenesis of an insect and might shed light on the mechanisms involving Pi storage and homeostasis during this period. We suggest that PolyP, mainly stored in small vesicles, might be involved in the functional control of Ca<sup>+2</sup> and Pi homeostasis during early embryogenesis of *P. americana*.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Inorganic polyphosphates (PolyP) are linear polymers of phosphate (Pi) residues linked by high-energy phosphoanhydride bonds. This molecule is widespread in biological systems and was found in different organisms such as prokaryotes, unicellular eukaryotes, plants and mammals (Kornberg, 1995). These polymers play important roles in different processes such as Pi storage, Ca<sup>+2</sup> binding, energy source and regulation of enzyme activities (Kornberg, 1999; Kulaev et al., 1999; Kulaev and Kulakovskaya, 2000). They have been found in different subcellular compartments such as nucleus (Kumble and Kornberg, 1995), mitochondria (Lichko et al., 2006) and lysosomes (Pisoni and Lindley, 1992). In some eukaryotic microorganisms, an acidic organelle named acidocalcisome has been described as the main PolyP storage

compartment where it remains associated with different cations, such as Ca<sup>+2</sup> and Mg<sup>+2</sup> (Moreno and Docampo, 2003; Docampo et al., 2005), being important to the regulation of Pi storage. Acidocalcisome-like organelles have been found in different organisms, being currently seen as organelles that have been conserved during evolution from bacteria to men (Docampo et al., 2005).

As in all oviparous animals, oogenesis in insects involves massive incorporation of yolk protein through receptor-mediated endocytosis (Engelman, 1979). In this system, endocytic activities during oogenesis occur mainly by the incorporation of the lipophosphoglycoprotein vitellin (VT) (Sappington and Raikhel, 1998; Raikhel et al., 2002) which is stored in organelles known as yolk granules (YG), the main nutrient reservoir in the developing embryo (Raikhel and Dhadialla, 1992; Valle, 1993). In non-mammalian vertebrates, VT is rich in phosphorylated serines, making it a suitable binding substrate for different cations (Byrne et al., 1984). It has been postulated that VT might play an important role in providing embryos with the Ca<sup>+2</sup> and Pi required for bone and tooth formation during vertebrate embryogenesis (Nardelli et al., 1987; Wahli, 1988). Specifically, the rapid growth of the embryo demands a large investment in synthetic cellular

\* Corresponding author at: Laboratório de Entomologia Médica do Programa de Parasitologia e Biologia Celular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Prédio do CCS, Bloco D, sala 13, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, 21941-590 - Rio de Janeiro, RJ, Brazil.  
Tel.: +55 21 2562 6589.

E-mail address: [ednildo@biof.ufrj.br](mailto:ednildo@biof.ufrj.br) (E.A. Machado).

components, especially ribosomes that often contain a large fraction of total cellular RNA. As nucleic acids are particularly phosphorous-rich (P), rapidly growing organisms must exhibit a distinct high-phosphorous signature (Woods et al., 2004). In this regard, some type of P storage is also likely to exist inside insect eggs, mainly due to the increased amount of biosynthetic phosphorous-demanding reactions such as protein, phospholipid, DNA and RNA synthesis. Nevertheless, VT of insects contains fewer serine residues than vertebrate VT (Byrne et al., 1989) and it is still unclear whether or not VT can be referred to as the major source of Pi and P during the embryonic development period.

During embryogenesis, a process of acidification leads to activation of acidic hydrolases stored within YGs (Purcell et al., 1988; Fialho et al., 2005). This process is widely conserved within oviparous animals, being essential for yolk mobilization during embryo development. It is generally believed that YG populations are not homogeneous because the macromolecular content vary within the vesicles and they can be fractionated according to their difference in size and density (Chestkov et al., 1998; Yamahama et al., 2003). This suggests some specialization in the subsets of the YG population as it refers to biochemical composition and function.

However, despite all the studies concerning insect embryogenesis and nutrient storage, no previous description of PolyP has been carried out during the development of any insect. In the present work, PolyP polymers stored inside the eggs of the American cockroach *Periplaneta americana* were characterized using biochemical and microscopical methods. PolyP was found to accumulate inside small vesicles, which also have significant levels of calcium. The variation of PolyP during early embryogenesis and the correlation of PolyP degradation with the variation of Pi and Ca<sup>+2</sup> levels during the same period were analyzed. Together, our results suggest that PolyP is stored with Ca<sup>+2</sup> in a subset of vesicles and that PolyP mobilization during embryogenesis is an important mechanism for the regulation of Ca<sup>+2</sup> and Pi homeostasis during *P. americana* embryogenesis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Arsenazo III, leupeptin, aprotinin, pepstatin, PMSF, 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI), sodium phosphate glass: type 75+ (75-chain-length PolyP or PolyP<sub>75</sub>) and type 15 (15-chain-length PolyP or PolyP<sub>15</sub>), sodium phosphate, sodium pyrophosphate, acid phosphatase, DNase and RNase were purchased from Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA). Plasmidium DNA Max-PREP was kindly provided by Dr Marcelo Medeiros. All others reagents were of analytical grade.

### 2.2. Insects

The insects were maintained at 25–28 °C and 60–70% relative humidity. Animals were fed with dog chow and water ad libitum. Oothecae were collected daily from a piece of Isopore placed inside the animal's aquarium and were used immediately (day 0 oothecae) or allowed to develop to the required embryogenesis stage.

### 2.3. PolyP detection by recombinant exopolyphosphatase

Long and short chain PolyP were extracted from the content of fresh oothecae. Samples were extracted in Lysis Buffer and long chain PolyP samples were extracted under binding of PolyP with

powdered glass and elution at 95 °C after DNase and RNase treatment as described (Ault-Riche et al., 1998). Short chain PolyP extractions were performed using acid treatment with 0.5N HClO<sub>4</sub> followed by neutralization using KOH and KHCO<sub>3</sub> as described (Ruiz et al., 2001a,b). Relative PolyP levels were determined as a function of the amount of Pi released upon treatment with an excess of recombinant exopolyphosphatase purified from *Sacharomyces cerevisiae* (scPPX). Aliquots of long or short chain PolyP extracts (always less than 1.5 nmol) were incubated for 15 min at 37 °C with 60 mM Tris-HCl, pH 7.5, 6.0 mM MgCl<sub>2</sub>, and 3000–5000 units of purified scPPX1 in a final volume of 75 ml.

### 2.4. Extraction of PolyP-containing water soluble fractions from eggs from different days of embryogenesis

PolyP-containing water soluble fractions (WSF) were prepared using modifications from Lima (Lima et al., 2003). Oothecae contents from different days after oviposition were extracted in distilled water (300 µl water/ootheca). The homogenates were sonicated on ice for 4 min and then centrifuged at 20,000 × g for 10 min at 4 °C. An equal volume of chloroform was added to the supernatant and the material was centrifuged under the same conditions. The supernatant (water soluble) was kept on ice for immediate use or stored at –20 °C.

### 2.5. PolyP detection by fluorescence spectrometry

PolyP<sub>75</sub> (50 µg) or WSF (5 µl) were incubated in Citrate Buffer (Sodium Citrate 90 mM pH 4.8) in the presence of 100 units of acid phosphatase for 1 h. Control experiments were made in the absence of acid phosphatase and used as standard for PolyP-DAPI spectra. The solution was incubated for 30 min with 20 µg/ml DAPI at room temperature and its fluorescence emission spectrum was analyzed in a F-Max fluorometer (Molecular Devices) using excitation wavelength of 354 nm. Plasmidial DNA was incubated with DAPI under the same conditions and was used as a standard reference for DNA-DAPI spectra.

### 2.6. Determination of PolyP levels during early embryogenesis

Variation of PolyP levels during early embryogenesis of *P. americana* using a modification of a described method was analyzed from WSF of different days (Abramov et al., 2007). Initially, 100 µl of WSF was diluted in a final volume of 1 ml and incubated with 20 µg/ml DAPI for 30 min at room temperature. The fluorescence level at 580 nm obtained in an F-Max fluorometer (Molecular Devices) using 354 nm as the excitation wavelength was used to estimate the variation of PolyP. PolyP<sub>75</sub> was used to normalize the values obtained, 150 µg. The values of PolyP were expressed as a function of the relative fluorescence signal obtained from WSF and PolyP<sub>75</sub>.

PolyP levels were statistically analyzed with One-Way ANOVA ( $P < 0.05$ ) using at least 3 repeated experiments. Tukey Test was used as a post-test. Statistical analyses were performed using InStat GraphPad 4.0.

### 2.7. Determination of Ca<sup>+2</sup> and Pi levels during early embryogenesis

Pi from WSF was estimated using the colorimetric analysis described by Fiske and Subbarow (1925). For free Ca<sup>+2</sup> determinations, Arsenazo III was used as before (Ramos et al., 2006). InStat GraphPad 4.0 was used to calculate the Pearson correlation  $r$  between PolyP and Ca<sup>+2</sup> levels, and between PolyP and Pi levels.

## 2.8. PolyP detection by electrophoresis in agarose gel

WSFs prepared from 3 oothecae were dried using SpeedVac, resuspended in 10  $\mu$ l of gel loading buffer and loaded in a 0.8% agarose gel prepared using TBE (90 mM Tris, 90 mM Boric Acid and 10 mM EDTA pH 8.3) as electrophoresis buffer. PolyP<sub>75</sub> and PolyP<sub>15</sub> were used as size standards. Electrophoresis was carried out at 200 V and 0.1% toluidine blue was used as staining agent. Bands were visualized after destaining using distilled water.

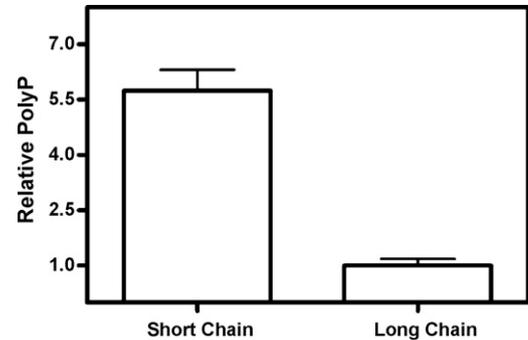
DNase and RNase treatment was performed by incubating WSF prepared from 3 oothecae and dried in SpeedVac in proper buffer (50 mM Tris HCl pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20  $\mu$ g/ml DNase, 20  $\mu$ g/ml RNase,) at 37 °C for 30 and 60 min.

## 2.9. PolyP detection by confocal microscopy

Suspensions of yolk granules suspension were extracted from day-1 eggs by gently disrupting the oothecae, using a plastic pestle, in a modified HEPES-buffered cockroach saline containing 5 mM HEPES, 5 mM sucrose, 3.1 mM KCl, and 214 mM NaCl pH 7.2 (HBCS) as described before (Ramos et al., 2006). The suspension was incubated with 50  $\mu$ g/ml DAPI for 20 min at room temperature. Samples were mounted on glass slides and observed with a Zeiss Confocal Microscope LSM510 META at an excitation wavelength of 458 nm and emission over 475 nm. Fluorescence images were digitally colorized using Adobe Photoshop CS2.

## 2.10. Elemental analysis of small vesicles

For imaging, fresh oothecae were squeezed in a microtube, washed and resuspended in HEPES-buffered cockroach saline. Droplets were applied to Formvar-coated 100-mesh copper grid and carefully blotted dry with a filter paper. Samples were examined in a JEOL 1200 EX Transmission Electron Microscope operating at 80 kV. X-rays were collected for 300 s using a Si (Li) detector with Norvar window on a 0–10 keV energy range with a



**Fig. 1.** PolyP detection by scPPX. Long and short chain PolyP were extracted from the content of fresh oothecae. Relative PolyP levels were determined as a function of the amount of Pi released upon treatment with an excess of scPPX. The average  $\pm$  S.E.M. are shown.

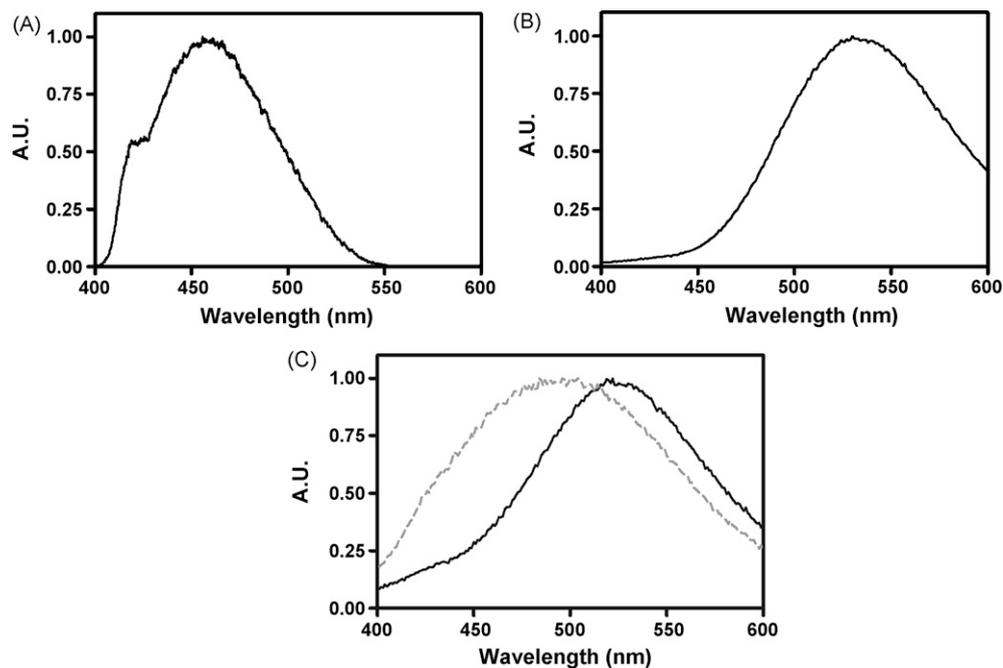
resolution of 10 eV/channel. Analyses were performed using a Noran/Voyager III analyzer.

## 3. Results

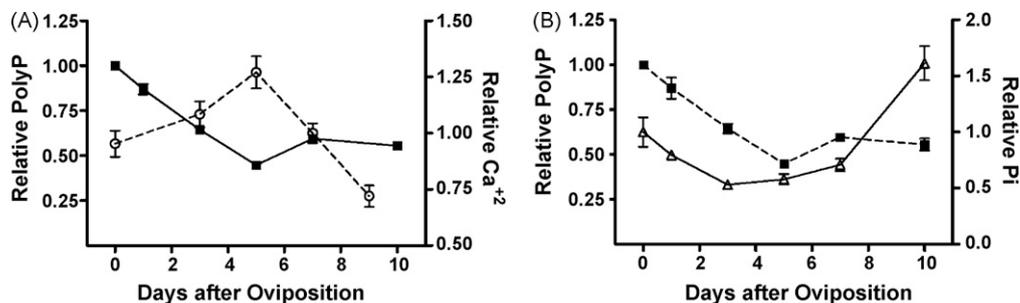
### 3.1. PolyP detection in WSF from day 0 eggs

In order to first identify the presence of PolyP in the eggs of *P. americana*, a treatment with an excess of recombinant exopolyphosphatase (scPPX) was performed. Short and long chain PolyP content of the eggs were extracted and analyzed by scPPX. At day 0, short chain PolyP was 5 times more concentrated than long chain PolyP (Fig. 1).

It has been reported that PolyP has the ability to shift the fluorescence spectra of DAPI to a higher wavelength different from the usual DNA-DAPI maximum fluorescence around 450 nm (Allan and Miller, 1980) as observed in Fig. 2A. This change has been shown to be specific for PolyP and it is not produced by other anions (Allan and Miller, 1980; Ruiz et al., 2001a,b). Accordingly,



**Fig. 2.** Detection of DAPI-PolyP by fluorimetric assay. Samples were incubated with 20  $\mu$ g/ml DAPI for 30 min and the fluorescence emission spectra were detected under excitation of 354 nm in a fluorometer. (A) DAPI-DNA (purified plasmid) samples, (B) DAPI-PolyP<sub>75</sub> samples, and (C) DAPI-WSF of day 1 ootheca (black line) and DAPI-WSF previously treated with an excess of acid phosphatase (gray line). AU is the relative fluorescence and results shown are representative from at least 3 independent experiments.



**Fig. 3.** PolyP, Ca<sup>2+</sup> and Pi variation during early embryogenesis. WSF samples from different days of embryogenesis were measured for levels of PolyP ((A and B) closed squares), Ca<sup>2+</sup> ((A) open circles) and Pi ((B) open triangles) using DAPI, Arsenazo III and ammonium molybdate, respectively. At least 3 sets of independent experiments were performed. Results are expressed as relative to day 0 levels and the average  $\pm$ S.E.M. are presented.

PolyP<sub>75</sub>-DAPI fluorescence spectrum showed a maximum fluorescence value around 525 nm (Fig. 2B). Other phosphorylated compounds such as RNA, ATP, AMP, PPI and Pi did not produce a similar shift in DAPI fluorescence spectrum (data not shown). Incubation of water soluble fraction from fresh oothecae with DAPI showed a similar spectrum (Fig. 2C), with maximum fluorescence value around 525 nm, confirming the presence of PolyP in WSF. When WSF was incubated in the presence of acid phosphatase, followed by incubation of the reaction product with DAPI, the 525 peak moved to 480 nm, the known value of free maximum fluorescence of DAPI (Fig. 2C).

### 3.2. PolyP, Pi and Ca<sup>2+</sup> variations during embryogenesis

In order to investigate how PolyP levels vary during the first days of embryogenesis, DAPI-PolyP exclusive binding properties were used. WSFs were prepared using eggs from different days of embryogenesis and the samples were incubated with DAPI for 30 min. After incubation, the difference in PolyP levels during the first week of embryogenesis was determined as a direct product of the fluorescence levels at 580 nm (Abramov et al., 2007). The use of a higher wavelength was preferred in order to minimize any possible interference from DNA or RNA present in the samples.

Maximum PolyP levels were detected on day 0. A decrease of PolyP levels was observed until day 5 followed by an increase at day 7. This variation correlated with variations in Pi and Ca<sup>2+</sup> levels. Ca<sup>2+</sup> and PolyP had a Pearson correlation  $r$  of  $-0.9452$  whereas Pi, PolyP had a Pearson correlation  $r$  of  $0.8197$ . There was an increase in free Ca<sup>2+</sup> levels during the first 5 days of embryogenesis – the period of PolyP degradation – followed by a decrease until day 7 (Fig. 3A). Similar to PolyP, decreasing Pi levels were observed during the first 5 days followed by an increase at day 7 (Fig. 3B).

### 3.3. PolyP banding pattern in agarose gel electrophoresis

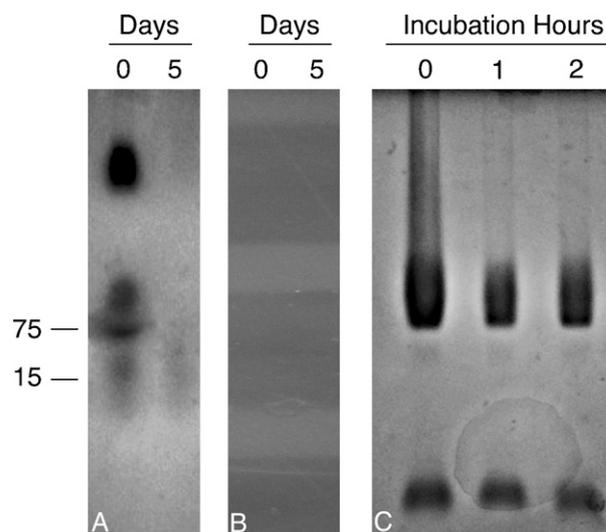
In order to measure the length pattern of PolyP chain and visualize PolyP degradation during early embryogenesis, electrophoresis in agarose gel followed by staining with toluidine blue was performed using samples from days 0 and 5 after oviposition. The results revealed the presence of two bands (Fig. 4A). Toluidine blue is capable of performing a metachromatic reaction with PolyP as well with nucleic acids. To confirm if the banding could be attributed to PolyP staining, ethidium bromide (a nucleic acid marker) was used and did not have a positive reaction to either bands (Fig. 4B). Also, the banding pattern was not affected by DNase or RNase treatment prior to electrophoresis (Fig. 4C). Additionally, after electrophoresis, the bands were extracted from the agarose gel, DAPI was added to the resulting solution and the fluorescence spectra confirmed the presence of PolyP in the samples (data not shown). Together these data suggest that the

bands observed by toluidine blue staining correspond to PolyP that accumulates inside the eggs in two major sizes. The difference in staining along the first 5 days of embryogenesis is consistent with what was observed in the fluorescence experiments (Figs. 3 and 4)—the toluidine blue staining was much stronger on days 0 and 1 after oviposition than on day 5, confirming PolyP degradation during the period.

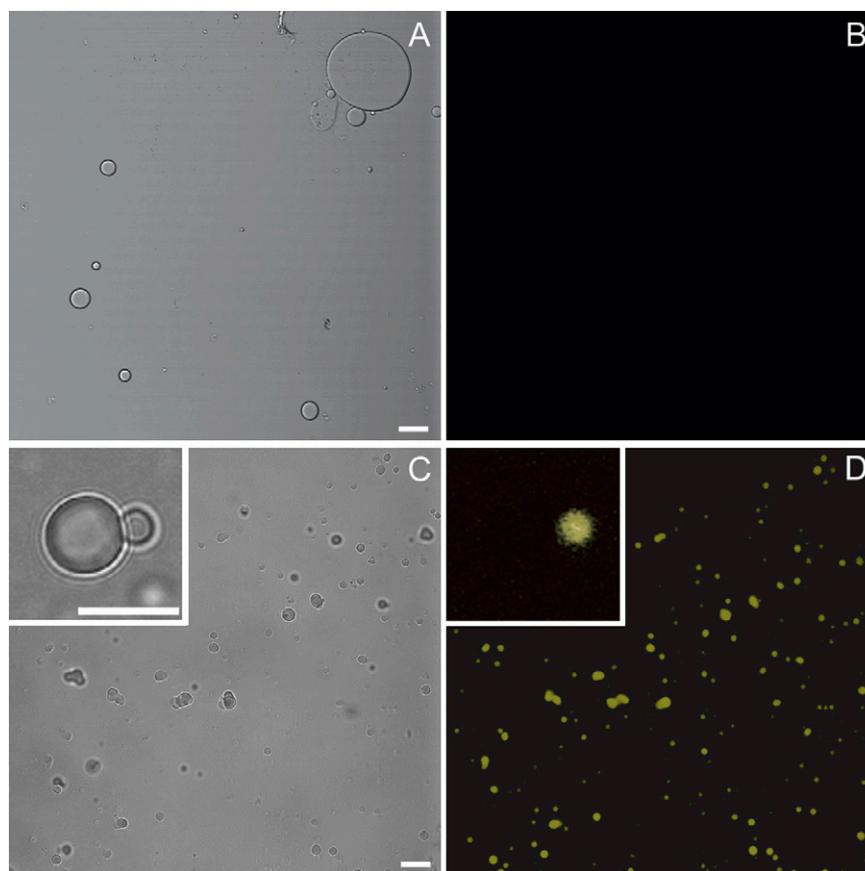
### 3.4. Localization of PolyP and elemental composition by X-ray microanalysis

To investigate the localization of PolyP stores, YG suspensions were obtained from day 0 oothecae, incubated with DAPI and observed in a confocal microscope. PolyP signals were detected in small vesicles ranging from 0.5 to 5  $\mu$ m (Fig. 5C and D). Larger vesicles did not present DAPI-PolyP staining (Fig. 5C and D inset). Controls YG suspensions not incubated with DAPI did not present endogenous fluorescence (Fig. 5A and B).

Electron probe by X-ray microanalysis of the small vesicles showed significant levels of oxygen, potassium, sodium, magnesium, phosphorus, iron and calcium (Fig. 6B). The Copper signal is due to the supporting grid. Interestingly, a small sulfur peak,



**Fig. 4.** PolyP banding as detected by agarose gel electrophoresis. WSF from different days were extracted and the equivalent of 3 oothecae was loaded in an agarose gel electrophoresis stained with toluidine blue (A). The numbers on the left are the running position of standard PolyP of 75 and 15 chain length. To eliminate the hypothesis that banding was due to nucleic acid metachromatic staining, samples were incubated with ethidium bromide (B) or previously treated with 20  $\mu$ g/ml DNase and 20  $\mu$ g/ml RNase (C). The numbers on the top designate the day of embryogenesis of the samples (A and B) or DNase and RNase incubation hours (C).



**Fig. 5.** Differential interference contrast (DIC) field and confocal fluorescence microscopy of DAPI-incubated YG suspension from day 0 ootheca. Yolk granules were incubated with 50  $\mu\text{g/ml}$  DAPI in saline supplemented with protease inhibitor cocktail and observed on confocal microscope under excitation of 458 nm. (A) DIC and (B) correspondent confocal fluorescence image of yolk granules without DAPI. (C) DIC and (D) correspondent confocal fluorescence image of DAPI-stained vesicles. Note that only small vesicles are stained (inset). Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ .

usually large in protein-rich samples, was found within the small vesicles. In typical yolk granules and magnesium were not detected and much smaller phosphorus peaks were observed. Large sulfur peak was present in spectra collected from this region (Fig. 6C). Interestingly, in seldom events, calcium was found within large granules (Fig. 6C inset).

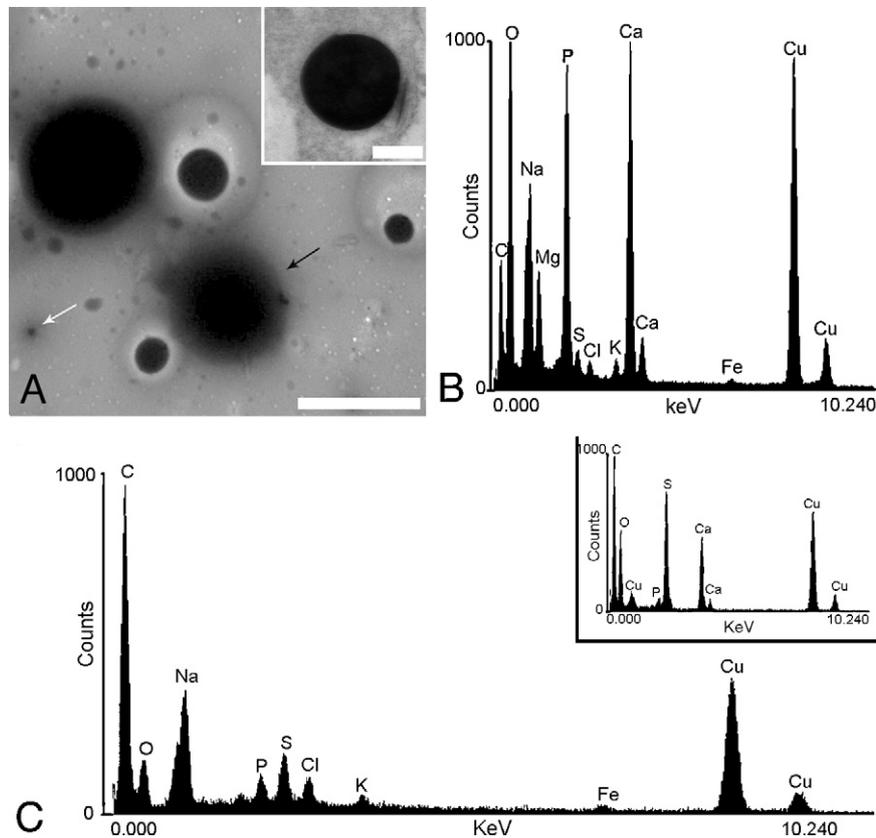
#### 4. Discussion

Embryogenesis in insects generally occurs totally dissociated from the maternal body. In such cases, all nutrients necessary for embryo development are stored before oviposition. In different models, PolyP is a major Pi storage source, but its functional role as Pi source during embryogenesis has never been investigated in insects. Also, only a few papers have reported that insects accumulate PolyP. Wax moth was shown to excrete significant amounts of PolyP which were not present in their diet (Pierpoint, 1957). It has been reported stores of PolyP in vesicles present in hemoglobin cells in the back swimmer *Buena margaritacea* (Vossbrinck et al., 1994). This paper presents the first evidence for the presence of PolyP in embryonic system of any insect. The presence of PolyP molecules in eggs was detected by both enzymatic and fluorimetric assays and also electrophoresis.

Detection and quantification of PolyP in different models has been performed using different assays. The use of PPX has been suggested as a specific analytic assay because of its specific reaction against PolyP. However, the lack of commercially available enzyme and the absence of activity when the PolyP ends are blocked (Kornberg, 1999) make this assay unsuitable in

certain cases. Alternatively, DAPI has been used to localize PolyP pools in a number of organisms (Allan and Miller, 1980; Ruiz et al., 2001a,b, 2004) and has recently been also used to analyze the difference between PolyP levels in different samples (Abramov et al., 2007). The reliability of DAPI-PolyP measurements is based on the fact that it produces a specific shift of DAPI spectrum to a higher wavelength that does not occur with other compounds. This change has been shown to be specific for PolyP and it is not produced by other anions (Allan and Miller, 1980; Ruiz et al., 2001a,b). In addition, DAPI is commercially available, inexpensive and its binding properties to PolyP are very sensitive. When PolyP<sub>75</sub> was used as a standard, it was possible to obtain a rough estimate of the stored PolyP levels. In our assay conditions, PolyP levels could generate as much as 1 M of Pi residues if completely hydrolyzed. These values would be in agreement with the hypothesis that PolyP might have a role in Pi storage during the embryo development.

Recombinant PPX from *S. cerevisiae* was used to report PolyP storage. PolyP accumulates at shorter polymers; similar to what has been shown in previous reports in other organisms (Moreno et al., 2000; Ruiz et al., 2004). To date, it is not clear how PolyP size is regulated neither is well understood its importance (Kornberg, 1999). A major function may be attributed to eukaryotic endopolyphosphatase, an enzyme that cleaves internal Pi residues, generating smaller PolyP molecules as a product. However, it is possible that other mechanisms might regulate PolyP size and the molecular mechanism and biochemical pathways involved in such reactions is not defined yet. Endopolyphosphatases have been reported in yeast and mammals (Kumble and Kornberg, 1996), but



**Fig. 6.** Elemental analysis of small vesicles from day 1 oothecae. YG suspension was mounted on Formvar-coated copper grids and submitted to X-ray microanalysis. (A) Transmission electron micrograph of vesicles adhered to Formvar-coated grids. Black arrow—typical yolk granule, white arrow—typical small vesicles (B) X-ray microanalysis of the typical small vesicle. Inset is detailed image of a small vesicle. (C) X-ray microanalysis of typical yolk granules. Inset is an X-ray microanalysis of a less frequent yolk granule containing sulfur (S) and calcium (Ca). Bar—5  $\mu\text{m}$ , inset bar, 250 nm.

the existence of such enzyme in arthropods is still unknown. Nevertheless, the presence of PolyP of different sizes might be important for the different roles they participate. PolyP is important for the regulation of different enzymatic activities and the magnitude of this regulation depends on PolyP chain length size. For instance, PolyP of 700 Pi residues regulate Lon protease activity in *E. coli*, whereas PolyP of 15 residues has no effect on this protease activity (Kuroda et al., 2001). In addition, enzymes of PolyP metabolism have different kinetic properties depending on PolyP size and the storage of PolyP in specific sizes might be a mechanism to regulate these enzymatic activities.

It is possible that PolyP mobilization might be triggered by the concurrent decrease of Pi levels. This hypothesis is supported by a high Pearson correlation  $r$  between PolyP and Pi. These data are in accordance with the well-known function of PolyP as a Pi store in different models (Kornberg, 1999; Kulaev et al., 1999; Kulaev and Kulakovskaya, 2000). Interestingly, the variation profile of PolyP is similar to what has been observed in the eggs of the cattle tick *Boophilus microplus* (Campos et al., 2007) and might suggest some pattern along arthropod embryogenesis. The presence of PolyP at maximum levels just after oviposition, therefore, is in agreement with its conserved role in Pi storage and suggests a moment of PolyP accumulation during oogenesis. The use of PolyP as a Pi source during embryogenesis may be a new insight into Pi origin—mainly in invertebrates which do not store vitellins massively phosphorylated like vertebrates do.

In *B. germanica* (Purcell et al., 1988), as well as in *P. americana* (Oliveira et al., 2008), the activity of yolk phosphatases is concurrent with the hydrolysis of VT, starting at day 4 (Storella

et al., 1985). Yolk phosphatases may use the VT, a phosphoprotein, as substrate, explaining the significant observed increase of Pi levels at this moment. A mechanism of Pi sensing inside the egg could account for the degradation of PolyP during the 5 first days of embryogenesis and the increase in PolyP levels after day 5. The correlation between Pi and PolyP levels might present similarities with the Pi sensing mechanism of *S. cerevisiae*. In this model, the PHO regulatory pathway is involved in Pi homeostasis (Oshima, 1997; Ogawa et al., 2000; Wykoff and O'Shea, 2001) and PolyP mobilization (Ogawa et al., 2000), and coordinates PolyP synthesis and degradation in the presence or absence of excess Pi, respectively. Another possibility is that high levels of Pi, the product of exopolyphosphatase (PPX) reaction, could inhibit polyphosphatase activity impairing PolyP degradation. A similar PPX inhibition has been described for the tick *B. microplus* (Campos et al., 2007).

$\text{Ca}^{+2}$  plays different essential roles during embryonic development (Webb and Miller, 2003). In insects, we demonstrated that an event of YG fusion during early embryogenesis of *P. americana* (Ramos et al., 2006) and *Rhodnius prolixus* (Ramos et al., 2007) is coincident with the peak of free  $\text{Ca}^{+2}$ . These fusion events are important to regulate the acidification of yolk granules and yolk mobilization (Ramos et al., 2007). In vertebrate eggs, calcium is mainly bound to VT. As insect VT is not as rich in phosphorylated serines, an additional source of  $\text{Ca}^{+2}$  might be required. Our results revealed a strong correlation between free  $\text{Ca}^{+2}$  levels and PolyP, suggesting that PolyP degradation may account, at least in part, for the increasing values of free  $\text{Ca}^{+2}$ . Together, confocal fluorescence microscopy

and elemental analyses suggest that small vesicles might store calcium associated with PolyP. Interestingly, in seldom events, calcium was found within large vesicles what might be a consequence of a recent fusion event. Recent studies have demonstrated that in a number of organisms PolyP stored in acidic vesicles named acidocalcisomes has an essential role in  $\text{Ca}^{+2}$  storage and homeostasis (Docampo and Moreno, 1999, 2001; Moreno and Docampo, 2003; Docampo et al., 2005). Interestingly, the profile observed in elemental analysis is very similar to acidocalcisomes. Also, the small Sulfur peak suggests that those vesicles are not involved in protein storage, a classic YG function.

## Acknowledgments

We express our gratitude to Ana Paula C.A. Lima, Pedro L. de Oliveira and Hatisaburo Masuda, for generously providing laboratory materials and facilities. Roberto Docampo for providing recombinant exopolyphosphatase. To Marcelo Medeiros and Danielle de Oliveira, for critical opinion during the experimental period of this manuscript. This work was supported by grants from the following Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa Pensa Rio da Fundação de Amparo a Pesquisa Carlos Chagas Filho (FAPERJ), Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT) and Programa de Núcleos de Excelência (PRONEX). Santiago, M. F. is supported by FAPERJ and FUJB. Miranda, K. is supported by Programa de Nanociência e Nanotecnologia (CNPq/MCT) and FAPERJ. de Souza, W. is supported by CNPq, FAPERJ and PRONEX.

## References

- Abramov, A.Y., Fraley, C., Diao, C.T., Winkfein, R., Colicos, M.A., Duchon, M.R., French, R.J., Pavlov, E., 2007. Targeted polyphosphatase expression alters mitochondrial metabolism and inhibits calcium-dependent cell death. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 104 (46) pp. 18091–18096.
- Allan, R.A., Miller, J.J., 1980. Influence of S-adenosylmethionine on DAPI-induced fluorescence of polyphosphate in the yeast vacuole. Canadian Journal of Microbiology 26 (8), 912–920.
- Ault-Riche, D., Fraley, C.D., Tzeng, C.M., Kornberg, A., 1998. Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 180 (7), 1841–1847.
- Byrne, B.M., Gruber, M., Ab, G., 1989. The evolution of egg yolk proteins. Progress in Biophysics and Molecular Biology 53 (1), 33–69.
- Byrne, B.M., van het Schip, A.D., van de Klundert, J.A., Arnberg, A.C., Gruber, M., Ab, G., 1984. Amino acid sequence of phosvitin derived from the nucleotide sequence of part of the chicken vitellogenin gene. Biochemistry 23 (19), 4275–4279.
- Campos, E., Facanha, A., Moraes, J., da Silva Vaz Jr., I., Masuda, A., Logullo, C., 2007. A mitochondrial exopolyphosphatase activity modulated by phosphate demand in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo. Insect Biochemistry and Molecular Biology 37 (10), 1103–1107.
- Chestkov, V.V., Radko, S.P., Cho, M.S., Chrambach, A., Vogel, S.S., 1998. Reconstitution of calcium-triggered membrane fusion using “reserve” granules. Journal of Biological Chemistry 273 (4), 2445–2451.
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., Moreno, S.N., 2005. Acidocalcisomes—conserved from bacteria to man. Nature Reviews. Microbiology 3 (3), 251–261.
- Docampo, R., Moreno, S.N., 1999. Acidocalcisome: a novel  $\text{Ca}^{2+}$  storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. Parasitology Today 15 (11), 443–448.
- Docampo, R., Moreno, S.N., 2001. The acidocalcisome. Molecular and Biochemical Parasitology 114 (2), 151–159.
- Engelman, F., 1979. Insect vitellogenin: identification, biosynthesis and role in vitellogenesis. Advances in Insect Physiology (14), 49–108.
- Fialho, E., Nakamura, A., Juliano, L., Masuda, H., Silva-Neto, M.A., 2005. Cathepsin D-mediated yolk protein degradation is blocked by acid phosphatase inhibitors. Archives of Biochemistry and Biophysics 436 (2), 246–253.
- Fiske, C.F., Subbarow, Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. Journal of Biological Chemistry (66), 375–400.
- Kornberg, A., 1995. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. Journal of Bacteriology 177 (3), 491–496.
- Kornberg, A., 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. Progress in Molecular and Subcellular Biology 23, 1–18.
- Kulaev, I., Kulakovskaya, T., 2000. Polyphosphate and phosphate pump. Annual Review of Microbiology 54, 709–734.
- Kulaev, I., Vagabov, V., Kulakovskaya, T., 1999. New aspects of inorganic polyphosphate metabolism and function. Journal of Bioscience and Bioengineering 88 (2), 111–129.
- Kumble, K.D., Kornberg, A., 1995. Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues. Journal of Biological Chemistry 270 (11), 5818–5822.
- Kumble, K.D., Kornberg, A., 1996. Endopolyphosphatases for long chain inorganic polyphosphate in yeast and mammals. Journal of Biological Chemistry 271 (43), 27146–27151.
- Kuroda, A., Nomura, K., Ohtomo, R., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H., Kornberg, A., 2001. Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. Science 293 (5530), 705–708.
- Lichko, L.P., Kulakovskaya, T.V., Kulaev, I.S., 2006. Inorganic polyphosphates and exopolyphosphatases in different cell compartments of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemistry 71 (11), 1171–1175.
- Lima, M.A.B.D., Nascimento, A.E.D., Souza, W.D., 2003. Effects of phosphorus on polyphosphate accumulation by *Cunninghamella elegans*. Brazilian Journal of Microbiology 34 (4), 363–372.
- Moreno, B., Urbina, J.A., Oldfield, E., Bailey, B.N., Rodrigues, C.O., Docampo, R., 2000.  $^{31}\text{P}$  NMR spectroscopy of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, and *Leishmania major*. Evidence for high levels of condensed inorganic phosphates. Journal of Biological Chemistry 275 (37), 28356–28362.
- Moreno, S.N., Docampo, R., 2003. Calcium regulation in protozoan parasites. Current Opinion in Microbiology 6 (4), 359–364.
- Nardelli, D., Gerber-Huber, S., van het Schip, F.D., Gruber, M., Ab, G., Wahli, W., 1987. Vertebrate and nematode genes coding for yolk proteins are derived from a common ancestor. Biochemistry 26 (20), 6397–6402.
- Ogawa, N., DeRisi, J., Brown, P.O., 2000. New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. Molecular Biology of the Cell 11 (12), 4309–4321.
- Oliveira, D.M.P., Ramos, I.B., Reis, F.C.G., Lima, A.P.C.A., Machado, E.A., 2008. Interplay between acid phosphatase and cysteine proteases in mediating vitellin degradation during early embryogenesis of *Periplaneta americana*. Journal of Insect Physiology 54 (5), 883–891.
- Oshima, Y., 1997. The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. Genes and Genetic Systems 72 (6), 323–334.
- Pierpoint, W.S., 1957. Polyphosphates excreted by wax-moth larvae (*Galleria mellonella* L. and *Achroia grisella* Fabr). Biochemical Journal 67 (4), 624–627.
- Pisoni, R.L., Lindley, E.R., 1992. Incorporation of  $^{32}\text{P}$  orthophosphate into long chains of inorganic polyphosphate within lysosomes of human fibroblasts. Journal of Biological Chemistry 267 (6), 3626–3631.
- Purcell, J.P., Quinn, T.M., Kunkel, J.G., Nordin, J.H., 1988. Correlation of yolk phosphatase expression with the programmed proteolysis of vitellin in *Blattella germanica* during embryonic development. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 9 (3), 237–250.
- Raikhel, A.S., Dhadialla, T.S., 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. Annual Review of Entomology 37, 217–251.
- Raikhel, A.S., Kokoza, V.A., Zhu, J., Martin, D., Wang, S.F., Li, C., Sun, G., Ahmed, A., Dittmer, N., Attardo, G., 2002. Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. Insect Biochemistry and Molecular Biology 32 (10), 1275–1286.
- Ramos, I.B., Miranda, K., De Souza, W., Machado, E.A., 2006. Calcium-regulated fusion of yolk granules during early embryogenesis of *Periplaneta americana*. Molecular Reproduction and Development 73 (10), 1247–1254.
- Ramos, I.B., Miranda, K., de Souza, W., Oliveira, D.M., Lima, A.P., Sorgine, M.H., Machado, E.A., 2007. Calcium-regulated fusion of yolk granules is important for yolk degradation during early embryogenesis of *Rhodnius prolixus* Stahl. Journal of Experimental Biology 210 (Pt 1), 138–148.
- Ruiz, F.A., Lea, C.R., Oldfield, E., Docampo, R., 2004. Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. Journal of Biological Chemistry 279 (43), 44250–44257.
- Ruiz, F.A., Marchesini, N., Seufferheld, M., Govindjee, Docampo, R., 2001a. The polyphosphate bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* possess a proton-pumping pyrophosphatase and are similar to acidocalcisomes. Journal of Biological Chemistry 276 (49), 46196–46203.
- Ruiz, F.A., Rodrigues, C.O., Docampo, R., 2001b. Rapid changes in polyphosphate content within acidocalcisomes in response to cell growth, differentiation, and environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. Journal of Biological Chemistry 276 (28), 26114–26121.
- Sappington, T.W., Raikhel, A.S., 1998. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. Insect Biochemistry and Molecular Biology 28 (5–6), 277–300.
- Storella, J.R.W., Woichowski, D.M., Kunkel, J.G., 1985. Structure and embryonic degradation of two native vitellins in the cockroach, *Periplaneta americana*. Insect Biochemistry 15 (2), 259–275.
- Valle, D., 1993. Vitellogenesis in insects and other groups—a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 88 (1), 1–26.
- Vossbrinck, C.R., Debrunner-Vossbrinck, B.A., Crang, R.F.E., Kuras, M., 1994. Insect hemoglobin production: a unique system utilizing ribosome clusters and iron/polyphosphate bodies. Naturwissenschaften 81 (6), 262–266.

- Woods, H.A., Fagan, W.F., Elser, J.J., Harrison, J.F., 2004. Allometric and phylogenetic variation in insect phosphorus content. *Functional Ecology* 18 (1), 103–109.
- Wahli, W., 1988. Evolution and expression of vitellogenin genes. *Trends in Genetics* 4 (8), 227–232.
- Webb, S.E., Miller, A.L., 2003. Calcium signalling during embryonic development. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (7), 539–551.
- Wykoff, D.D., O'Shea, E.K., 2001. Phosphate transport and sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 159 (4), 1491–1499.
- Yamahama, Y., Uto, N., Tamotsu, S., Miyata, T., Yamamoto, Y., Watabe, S., Takahashi, S.Y., 2003. In vivo activation of pro-form Bombyx cysteine protease (BCP) in silkmoth eggs: localization of yolk proteins and BCP, and acidification of yolk granules. *Journal of Insect Physiology* 49 (2), 131–140.

# 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](#)