

DANIELLE MARIA P. DE OLIVEIRA SANTOS

ESTUDO DE HIDROLASES ENVOLVIDAS COM A
MOBILIZAÇÃO DE VITELO EM DOIS MODELOS DE
INSETO

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



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
2 0 0 8

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

DANIELLE MARIA P. DE OLIVEIRA SANTOS

ESTUDO DE HIDROLASES ENVOLVIDAS COM A
MOBILIZAÇÃO DE VITELO EM DOIS MODELOS DE
INSETO

RIO DE JANEIRO

2008

Danielle Maria P. de Oliveira Santos

ESTUDO DE HIDROLASES ENVOLVIDAS
COM A MOBILIZAÇÃO DE VITELO EM
DOIS MODELOS DE INSETO

Tese de Doutorado apresentada ao
programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica
Carlos Chagas Filho, Universidade Federal
do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do título de
Doutor em Ciências

Orientador: Ednildo de Alcantara Machado

Rio de Janeiro
2008

Oliveira Santos, Danielle Maria P.

Estudo de hidrolases envolvidas com a mobilização de vitelo em dois modelos de inseto/Danielle Maria P. de Oliveira Santos. – 2008
114 f.: il.

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

Orientador: Ednildo de Alcantara Machado

1. Embriogênese. 2. *Periplaneta americana*. 3. *Anticarsia gemmatilis*. 4. Fosfatase ácida. 5. Proteases. 6. Vitelo. 7. Vitelinas – Teses.
I. Machado, Ednildo de Alcantara (orient.). II Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. III. Título.

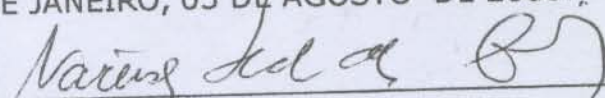
"ESTUDO DE HIDROLASES ENVOLVIDAS COM A MOBILIZAÇÃO DE
VITELO EM DOIS MODELOS DE INSETO".

DANIELLE MARIA PERPÉTUA DE OLIVEIRA SANTOS

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO
GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS

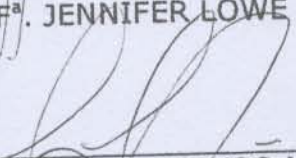
APROVADA POR:

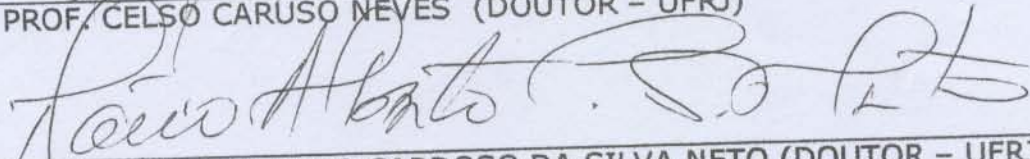
RIO DE JANEIRO, 05 DE AGOSTO DE 2008.

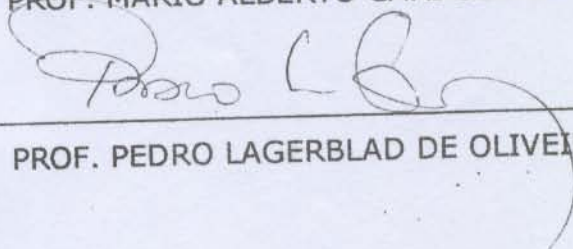

Profª. NARCISA LEAL DA CUNHA E SILVA (DOUTOR - UFRJ)
COORDENADORA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOFÍSICA)


PROF. EDNILDO DE ALCANTARA MACHADO (DOUTOR - UFRJ) - ORIENTADOR


PROFª. JENNIFER LOWE (DOUTOR - UFRJ) - REVISORA


PROF. CELSO CARUSO NEVES (DOUTOR - UFRJ)


PROF. MÁRIO ALBERTO CARDOSO DA SILVA NETO (DOUTOR - UFRJ)


PROF. PEDRO LAGERBLAD DE OLIVEIRA (DOUTOR - UFRJ)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Entomologia Médica, Programa de Biologia Celular e Parasitologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, em colaboração com o Laboratório de Bioquímica de Insetos (IBqM, UFRJ), Laboratório de Bioquímica de Artrópodos Hematófagos (IBqM, UFRJ), Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Proteases (IBCCF, UFRJ), sob a orientação do Dr. Ednildo A. Machado, na vigência de auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de 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).

À minha maravilhosa família, sempre, sempre ao meu lado, meu apoio em todos os momentos de alegrias e tristezas, minha base e meu coração,

Dedico

Agradecimentos

Ao meu orientador Ednildo Machado. Obrigada por ser sempre tão otimista e racional ao mesmo tempo. Por me ensinar, orientar, pelos bombons quando eu merecia. Agradeço muito por sempre ser uma pessoa disponível e aberto a diálogo, isto certamente fez toda a diferença. Obrigada por acreditar em mim, mesmo quando eu mesma não acreditava;

À Dra. Suzete Bressan. Obrigada por sempre ter sido tão solícita, por inúmeras vezes ter sido importunada e ainda assim nos ajudar sempre com dissecções, estatística, colônias e biologia de insetos. Muito obrigada;

À Dra. Ana Paula, por sua colaboração, idéias e por confiar em mim e em meu trabalho;

Ao Dr. Hatisaburo Masuda, por sempre incentivar a pesquisa em cada conversa enriquecedora, pela abertura de seu laboratório ao nosso grupo;

Ao Dr. Pedro Oliveira, por disponibilizar sempre seu laboratório ao nosso grupo;

Ao meu amigo de laboratório Marcelo Medeiros. Não sabe o quanto sou grata por toda a ajuda. Obrigada por ser sempre um grande companheiro, principalmente neste final, que não acaba nunca. Te agradeço de todo o coração;

À minha amiga Lucimar. Obrigada por seu otimismo, pelas diversas conversas em todos estes anos, por sempre nos mostrar que é possível melhorar;

Aos meus amigos Isabela Ramos e Fabio Gomes, pelas conversas de fim de tarde, pelas diversas reflexões acadêmicas ou não, por terem me ajudado sempre, principalmente neste fim de tese;

Aos meus ex-alunos Beatriz e Bruno, obrigada por me aceitarem como orientadora, com certeza foi uma experiência incomparável;

Aos alunos e ex-alunos do laboratório: Rodrigo, Eduardo, Danielle Grimaldi e Maíra, pela convivência tranqüila e amistosa do lab. À Danielle Carvalho, muito obrigada por assumir a colônia neste final de tese e pelos experimentos de protease de Anticarsia. Não poderia deixar de agradecer à Cleide, pelas diversas caronas e pela amizade sincera;

Às Dras. Kátia Gondim e Geórgia Atella, e ao pessoal de bioquímica de insetos: Lize, Denise, Heloísa (pela ajuda no HPLC principalmente), Paula, Lílían, David, Angélica, José Henrique, Petter, Rachel, Giselle, Júnior e Litiane. Obrigada por me ajudarem com muitas coisas, por muitas vezes, pela amizade e pelas conversas;

Ao Dr. Mário e seus alunos ou ex-alunos Allan Barbosa, Raquel Senna e Alan Brito. Agradeço muito por todas as vezes que pedi anticorpos, albumina, pNPP, ajuda no HPLC e tudo mais. Ao Alan Brito principalmente pelo western blotting de *Anticarsia*.

Às alunas ou ex-alunas da Dra. Ana Paula: Maíra, Luciana, Camila, Marília, Tatiana, Giancarla, Flavia. Muito obrigada por sempre me ajudarem quando precisei, e não foram poucas as vezes. Agradeço especialmente à Flavinha, por toda a ajuda no fluorímetro, substratos, cálculos, etc;

Aos meus amigos do Cederj: Benjamin, Lidiane, Marcela, Robson, Érica, Maria Emília, Welington, aos alunos Lidiane, Carolina, Caroline, André, Willian, Laura, Aloísio e todos os outros por toda a amizade, carinho e respeito com que sempre fui tratada por todos;

À todos os meus amigos da faculdade, principalmente Sheila, Cristiane, Karina, Viviane e Igor. Apesar da distância, guardo sempre a amizade por vocês no meu coração;

A todos os meus familiares (seria injusto listar aqui), por todo o apoio, carinho e orgulho, sempre. Em especial ao meu querido avô Ângelo (*in memoriam*), pessoa honrada, de valores e bom coração, sempre nos mostrando a importância da família;

À minha mãe Nídia. Obrigada por tudo, não teria como descrever toda a gratidão, amor e orgulho que sinto, por tudo que já passamos juntas. À minha irmã Gabriella, meu orgulho, tão querida; Ao meu amor Anderson. Agradeço-te por todo este tempo, meu companheiro e anjo. Amo vocês mais que tudo na vida, vocês são pessoas maravilhosas, tenho muita sorte em ter vocês em minha vida. Vocês são tudo para mim. Muito, muito obrigada por tudo.

À todas as pessoas que me ajudaram e que possa ter esquecido o nome por falha;

Agradeço finalmente a Deus. Acredito sim, em algo superior, não conseguiria jamais separar minha vida acadêmica da minha fé. Sempre, em todos os momentos, junto comigo, ao meu lado.

OLIVEIRA SANTOS, Danielle Maria Perpétua de. **Estudo de hidrolases envolvidas com a mobilização de vitelo em dois modelos de inseto**. Rio de Janeiro, 2008. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

Neste trabalho estudou-se hidrolases presentes durante a embriogênese de dois insetos: *Periplaneta americana* e *Anticarsia gemmatilis*. Na primeira parte, uma atividade fosfatásica ácida e duas classes de proteases foram caracterizadas durante a embriogênese inicial de *P. americana*. A atividade fosfatásica ácida foi detectada a partir do dia 6 e atingiu nível máximo no dia 10 após a postura. Ao serem testadas contra fosfoaminoácidos, houve preferência por fosfotirosina no dia 6, e no dia 10 também por fosfoserina. Paralelamente, duas classes de proteases foram identificadas e localizadas em grânulos de vitelo durante esta fase: Uma cisteíno protease ativada por pH ácido a partir do dia 3, pertencente à superfamília C1 (Papaína) insensível ao CA 074; e uma serino protease, inibida por aprotinina com início no dia 6. Ensaio de degradação de vitelina (VT) *in vitro* mostraram a cooperação entre a fosfatase ácida e a cisteíno protease na mobilização de vitelo neste inseto. Na segunda parte, uma fosfatase ácida foi identificada em ovos de *A. gemmatilis*, e atingiu atividade máxima em 21 horas após a postura. A enzima foi parcialmente purificada após cromatografia de filtração em gel em HPLC, e os principais parâmetros de atividade foram determinados. O pH ótimo para o funcionamento da enzima foi 4,0, e peso molecular aproximado de 45 kDa. A enzima foi classificada como tirosina fosfatase ácida através de inibidores seletivos e substratos fosforilados testados. A presença de uma cisteíno protease foi detectada, e a influência da fosfatase na proteólise ácida de vitelo *in vitro* foi demonstrada.

Palavras-chave: Embriogênese. *Periplaneta americana*. *Anticarsia gemmatilis*. Fosfatase ácida. Proteases. Vitelo. Vitelinas.

OLIVEIRA SANTOS, Danielle Maria Perpétua de. **Estudo de hidrolases envolvidas com a mobilização de vitelo em dois modelos de inseto**. Rio de Janeiro, 2008. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biofísica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

In this work hydrolases were characterized during embryogenesis of two insect models: *Periplaneta americana* and *Anticarsia gemmatalis*. At the first part of the work, an acid phosphatase and two classes of proteases were studied during early embryogenesis of *P. americana*. Acid phosphatase activity was first detected at day 6 and reached a maximum activity at day 10 of development. It was directed only against phosphotyrosine at day 6 while at day 10 it was also active against phosphoserine. In parallel, two classes of proteases were detected and located within yolk granules: A clan-CA-cysteine protease, insensitive to CA 074 and activated by acidic pH at day 3, and a neutral serine protease, which was inhibited by aprotinin at day 6. Interplay between acid phosphatase and cysteine protease to assure vitellin (VT) breakdown during early embryogenesis was proposed. At the second part of work, an acid phosphatase was identified during embryogenesis of *A. gemmatalis*. This activity reached a maximum level at 21 hours eggs. The enzyme was partially purified after gel exclusion HPLC and the main activity parameters were determined. It was maximally active at pH 4.0 and approximate molecular mass was 45 kDa. The acid phosphatase was classified as phosphotyrosil acidic phosphatase after specific inhibitors and phosphoaminoacids were used. A cysteine protease was detected at egg preparation. The role of phosphatase at acidic yolk proteolysis *in vitro* was discussed.

Keywords: Embryogenesis. *Periplaneta americana*. *Anticarsia gemmatalis*. Acid phosphatase. Proteases. Yolk. Vitellins.

Lista de ilustrações

	Página
Figura 01: Fases do desenvolvimento de <i>Periplaneta americana</i>	03
Figura 02: Fases do desenvolvimento de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	04
Figura 03: Anatomia básica do trato reprodutivo de inseto	06
Figura 04: Incorporação de proteínas de vitelo no ovo de insetos	08
Figura 05: Eventos de embriogênese inicial em insetos	10
Figura 06: SDS-PAGE de extratos de ootecas durante o desenvolvimento embrionário de <i>P. americana</i>	13
Figura 07: Estruturas de proteínas tirosina fosfatases	22
Figura 08: Atividade fosfatásica ácida durante a embriogênese inicial de <i>P. americana</i>	45
Figura 09: Atividade fosfatásica ácida contra fosfoaminoácidos em ootecas de <i>P. americana</i>	47
Figura 10: Defosforilação <i>in vivo</i> de proteínas de vitelo durante a embriogênese inicial de <i>P. americana</i>	49
Figura 11: Nível de atividade peptidásica durante a embriogênese inicial de <i>P. americana</i>	51
Figura 12: Níveis de atividade peptidásica em ootecas de <i>P. americana</i> – determinação da classe da protease	52
Figura 13: Localização de proteases ativas em grânulos de vitelo de ooteca de <i>P. americana</i>	54
Figura 14: Níveis de atividade tipo cisteíno protease durante a embriogênese inicial de <i>P. americana</i>	56
Figura 15: Ativação ácida da atividade tipo cisteíno protease em ooteca de <i>P. americana</i>	59
Figura 16: Proteólise <i>in vitro</i> em pH ácido	61
Figura 17: Proteólise <i>in vitro</i> em pH ácido – influência da AcP	62
Figura 18: Níveis de atividade tipo serino protease durante a embriogênese inicial de <i>P. americana</i>	64
Figura 19: Proteólise <i>in vitro</i> em pH neutro	65
Figura 20: Atividade fosfatásica ácida durante a embriogênese de <i>A. gemmatalis</i>	68
Figura 21: Atividade fosfatásica em extrato de ovos de <i>A. gemmatalis</i>	69
Figura 22: Purificação parcial da AcP de <i>A. gemmatalis</i>	70
Figura 23: Determinação de pH ótimo para AcP de <i>A. gemmatalis</i>	73

Figura 24: Curva temporal de reação da AcP de <i>A. gemmatalis</i>	74
Figura 25: Curva de inativação térmica da AcP de <i>A. gemmatalis</i>	75
Figura 26: Determinação do peso molecular da AcP de <i>A. gemmatalis</i>	77
Figura 27: Determinação dos parâmetros cinéticos da AcP de <i>A. gemmatalis</i>	81
Figura 28: Atividade da AcP de <i>A. gemmatalis</i> : determinação de preferência de substrato	82
Figura 29: Proteólise de vitelo durante a embriogênese de <i>A. gemmatalis</i>	83
Figura 30: Perfil de proteínas de vitelo fosforiladas em resíduos de tirosina durante a embriogênese de <i>A. gemmatalis</i>	85
Figura 31: Atividade peptidásica em ovos de <i>A. gemmatalis</i>	86
Figura 32: Efeito da AcP na proteólise <i>in vitro</i> das proteínas de vitelo de <i>A. gemmatalis</i>	88

Lista de tabelas

	Página
Tabela 01: Modulação da atividade fosfatásica ácida em ootecas de <i>P. americana</i> por inibidores	48
Tabela 02: Atividade tipo cisteíno protease na presença de inibidor específico de catepsina B em ootecas de <i>P. americana</i>	57
Tabela 03: Etapas de purificação parcial da Fosfatase ácida em ovos de <i>A. gemmatalis</i>	71
Tabela 04: Influência de diferentes inibidores na atividade da AcP de <i>A. gemmatalis</i>	78

Lista de abreviaturas

AcP = fosfatase ácida enriquecida
AgMNPV = mononucleopoliedrovírus de *Anticarsia gemmatilis*
AMC = aminometilcumarina
Arg-Arg-AMC = arginina-arginina-aminometilcumarina
ATP = trifosfato de adenosina
BCIP = 5-bromo 4-cloro 3-indolil fosfato
BCP = cisteíno protease de *Bombyx mori*
BSA = albumina de soro bovino
CA 074 = (L-3-trans-(propilcarbamoil) oxirano-2-carbonil) –L-isoleucil-L-prolina
DTT = ditionitrito
E-64 = L-trans-epoxisuccinil-leucilamido (4-guanidino) butano
EC = sistema internacional de classificação de enzimas
EDTP = tirosina fosfatase derivada de ovo de *Sarcophaga peregrina*
H⁺-ATPases = enzimas bombeadoras de prótons através da hidrólise de trifosfato de adenosina
HBCS = salina de barata tamponada com Hepes
Hepes = ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico
HPLC = cromatografia líquida de alto desempenho
H⁺-PPases = enzimas bombeadoras de prótons através da hidrólise de pirofosfato
Km = constante de Michaelis
LAP = fosfatase ácida lisosomal
MEROPS = banco de dados classificatório de peptidases
MKPs = fosfatases específicas de proteínas cinases ativadas por mitógeno
NaF = fluoreto de sódio
NBT = azul de tetrazólio
PMSF = fluoreto de fenilmetilsulfonila
pNPP = para-nitrofenil fosfato
pNP = para-nitrofenol
Poli P-3 = polímero de fosfato de três resíduos
Poli P-75 = polímero de fosfato de setenta e cinco resíduos
PP = proteína serina/treonina fosfatase
PPi = pirofosfato inorgânico
PTP = proteína tirosina fosfatase
RHBP = proteína ligadora de heme de *Rhodnius prolixus*

RNA = ácido ribonucléico
SBTI = inibidor de tripsina de soja
SDS-PAGE = eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida
TCA = ácido tricloroacético
TLCK = N-alfa-tosil-L-lisina clorometil cetona
TRAP = fosfatase ácida resistente ao tartarato de Na⁺ e K⁺
VG = vitelogenina
V_{max} = velocidade máxima da reação
VT = vitelina
YG = grânulos de vitelo
YP = amostra enriquecida em proteínas de vitelo
Z-Phe-Arg-AMC = fenilalanina-arginina-aminometilcumarina
30 KP = serino protease específica de proteínas de 30 kDa de ovo de *Bombyx mori*

Sumário

	Página
1 Introdução	01
1.1 <i>Periplaneta americana</i> e importância sanitária	01
1.2 <i>Anticarsia gemmatalis</i> e importância agrícola	02
1.3 Ovogênese em insetos	05
1.4 Embriogênese em insetos	07
1.5 Degradação de vitelo durante a embriogênese	11
1.6 Proteases	14
1.6.1 Classificação de Proteases	14
1.6.2 Descrição de proteases durante a embriogênese	16
1.7 Fosforilação e Defosforilação de Proteínas	17
1.7.1 Fosfatases Ácidas	18
1.7.2 Proteína Fosfatases	19
1.8 Tirosina Fosfatases	20
1.9 Tirosina Fosfatases no desenvolvimento embrionário	23
1.10 Correlação entre fosfatase e protease durante o desenvolvimento embrionário de artrópodes	23
2 Objetivos	25
2.1 Objetivos gerais	25
2.1.1 Parte 1	25
2.1.2 Parte 2	25
2.2 Objetivos específicos	25
2.2.1 Parte 1: <i>P. americana</i>	25
2.2.2 Parte 2: <i>A. gemmatalis</i>	26
3 Material e Métodos	27
3.1 Reagentes	27
3.2 Insetos	27
3.2.1 <i>Periplaneta americana</i>	27

3.2.2 <i>Anticarsia gemmatalis</i>	28
3.3 Metodologia utilizada nos experimentos realizados em ootecas de <i>P. americana</i>	28
3.3.1 Preparação de amostras de ootecas de <i>P. americana</i> para atividade fosfatásica ácida	28
3.3.2 Preparação de amostras de ootecas de <i>P. americana</i> para <i>western blotting</i> anti-fosfotirosina	29
3.3.3 <i>Western blotting</i> anti fosfotirosina durante embriogênese inicial de <i>P. americana</i>	29
3.3.4 Preparação de amostras de ootecas de <i>P. americana</i> para atividade peptidásica	30
3.3.5 Determinação da atividade fosfatásica específica em ootecas de <i>P. americana</i>	31
3.3.6 Determinação da atividade fosfatásica contra fosfoaminoácidos em ootecas de <i>P. americana</i>	31
3.3.7 Determinação da atividade peptidásica específica em ootecas de <i>P. americana</i>	32
3.3.8 Ensaio de ativação ácida da atividade cisteíno proteásica	33
3.3.9 Localização das peptidases ativas em YG de <i>P. americana</i>	33
3.3.10 Preparação da fração enriquecida em VT	33
3.3.11 Ensaios de degradação de VT de <i>P. americana in vitro</i>	34
3.4 Metodologia utilizada nos experimentos realizados em ovos de <i>A. gemmatalis</i>	35
3.4.1 Preparação de ovos para determinação da atividade fosfatásica de <i>A. gemmatalis</i>	35
3.4.2 Determinação de pH e temperatura ótimos de funcionamento da atividade fosfatásica em ovos de <i>A. gemmatalis</i>	35
3.4.3 Preparação de ovos para determinação da atividade fosfatásica ácida durante a embriogênese de <i>A. gemmatalis</i>	36
3.4.4 Atividade fosfatásica ácida durante a embriogênese de <i>A. gemmatalis</i>	36
3.4.5 Purificação parcial da fosfatase ácida em ovos de <i>A. gemmatalis</i>	37
3.4.6 Determinação de pH ótimo para AcP de <i>A. gemmatalis</i>	38
3.4.7 Curva temporal de atividade da AcP de <i>A. gemmatalis</i>	38
3.4.8 Curva de inativação térmica da AcP de <i>A. gemmatalis</i>	39
3.4.9 Determinação do peso molecular da AcP de <i>A. gemmatalis</i>	39
3.4.10 Classificação da AcP através de inibidores específicos	40
3.4.11 Determinação dos parâmetros cinéticos da AcP	40
3.4.12 Preferência da AcP entre substratos fosforilados	41
3.4.13 SDS-PAGE e <i>western blotting</i> anti-fosfotirosina durante a embriogênese de <i>A. gemmatalis</i>	41
3.4.14 Atividade peptidásica em ovos de <i>A. gemmatalis</i>	42

3.4.15 Preparação de ovos de 0 h de <i>A. gemmatalis</i> como substrato da proteólise <i>in vitro</i>	42
3.4.16 Influência da AcP na proteólise <i>in vitro</i> das proteínas de vitelo de <i>A. gemmatalis</i>	42
3.5 Determinação da concentração de proteínas e estatística	43
4 Resultados	44
4.1 Parte 1 – <i>P. americana</i>	44
4.1.1 Caracterização da atividade fosfatásica durante a embriogênese inicial de <i>P. americana</i>	44
4.1.2 Caracterização de proteases durante a embriogênese inicial de <i>P. americana</i>	50
4.1.3 Detecção da atividade peptidásica em YG de <i>P. americana</i>	53
4.1.4 Caracterização da atividade tipo cisteíno protease durante a embriogênese inicial de <i>P. americana</i>	55
4.1.5 Ativação ácida da cisteíno protease em ootecas de <i>P. americana</i>	58
4.1.6 Proteólise <i>in vitro</i> em meio ácido – Correlação entre a fosfatase e a cisteíno protease	60
4.1.7 Caracterização da atividade tipo serino protease durante a embriogênese inicial de <i>P. americana</i> e proteólise <i>in vitro</i> das proteínas de vitelo	63
4.2 Parte 2 – <i>A. gemmatalis</i>	66
4.2.1 Identificação da atividade fosfatásica ácida durante a embriogênese de <i>A. gemmatalis</i>	66
4.2.2 Determinação de parâmetros básicos e purificação parcial da fosfatase ácida de ovos de <i>A. gemmatalis</i>	66
4.2.3 Caracterização da AcP de <i>A. gemmatalis</i> e determinação de peso molecular	72
4.2.4 Classificação da AcP de <i>A. gemmatalis</i>	76
4.2.5 Determinação dos parâmetros cinéticos da AcP de <i>A. gemmatalis</i>	79
4.2.6 Preferência da AcP de <i>A. gemmatalis</i> entre substratos fosforilados	79
4.2.7 Perfil de proteínas durante a embriogênese de <i>A. gemmatalis</i> – Proteólise programada e proteínas fosforiladas em tirosina	80
4.2.8 Evidência de presença de uma cisteíno peptidase em ovos de <i>A. gemmatalis</i>	84
4.2.9 Correlação entre a proteólise ácida <i>in vitro</i> e a AcP	87

5 Discussão	89
6 Conclusões	100
7 Referências bibliográficas	101
8 Anexos	111
8.1 Anexo 01	112
8.2 Anexo 02	113
8.3 Anexo 03	114

1 Introdução

1.1 *Periplaneta americana* e importância sanitária

A classe Insecta compreende aproximadamente 1 milhão de espécies descritas, que colonizam praticamente todos os ambientes terrestres, com exceção dos mares e pólos. Este sucesso evolutivo deve em parte às suas altas taxas reprodutivas, curto tempo de geração e adaptação aos ecossistemas mais distintos, o que implica obrigatoriamente num sistema reprodutivo eficiente e ajustável às variações ambientais e fisiológicas (BÜNING, 1994).

Periplaneta americana (L.) (Dyctioptera: Blattidae), comumente conhecida como barata americana é a principal espécie de barata encontrada no ambiente urbano. Este inseto tem distribuição cosmopolita, bastante freqüente entre a sociedade humana, de hábitos noturnos e alimentação onívora. Podem atuar como vetores mecânicos de diversos organismos patogênicos (RUST *et al.*, 1991; PAGANELLI, 1997). Seu comportamento repulsivo e sua movimentação frequentemente resultam em contaminação de alimentos e água por regurgitação ou defecação. Além disso, atualmente diversos trabalhos mostram a identificação e importância de alérgenos derivados deste grupo de insetos (ARLIAN, 2002). Tais motivos tornam *P. americana* um problema de saúde pública no controle de pragas urbanas. Neste sentido, a compreensão de processos reprodutivos como a ovogênese e a embriogênese pode resultar na construção de novas estratégias de controle de população deste inseto.

O desenvolvimento de *P. americana* é hemimetábolo (com metamorfose incompleta), compreendendo as fases de ovo, ninfas (de 11 a 13 instares) e adulto (**Figura 01**). Os ovos são acondicionados em estruturas denominadas ootecas, as quais são sintetizadas pela fêmea.

Esta estrutura é preenchida de ovos dispostos lateralmente, em duas fileiras, contendo de 13 a 16 ovos. Em média, o desenvolvimento dos embriões em cada ooteca tem duração de 32 dias da postura até a emergência das ninfas. Estas formas imaturas levam aproximadamente 6 meses até a fase adulta (BELL *et al.*, 1981).

1.2 *Anticarsia gemmatalis* e importância agrícola

Anticarsia gemmatalis Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) é uma espécie de mariposa representante da família dos noctuídeos, grupo que inclui a maioria das espécies de importância agrícola (SPECHT *et al.*, 2004). A lagarta de *A. gemmatalis* é considerada a principal praga defoliadora em cultivares de soja (*Glycine max*) no Brasil (TURNIPSEED *et al.*, 1976), causando perdas econômicas no também Sul dos Estados Unidos e na América Latina, devido a aplicação de inseticidas necessária ao seu controle. No Brasil, o programa de gerenciamento integrado de peste, desenvolvido e implantado pela Embrapa Soja tem obtido sucesso no controle biológico desta praga, através da utilização do nucleopoliedrovírus de *A. gemmatalis* (AgMNPV) (HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2000). Para a colheita de soja, a utilização de controle biológico representa uma redução importante nos custos de produção e danos ao meio ambiente devido à diminuição do uso de pesticidas químicos (GAZZONI, 1994).

Este inseto apresenta metamorfose completa (é um holometábolo), seu ciclo de vida compreende as fases de ovo, larva, pupa e adulto. A eclosão da lagarta ocorre entre 3 e 4 dias após a oviposição, e o período larval possui de 5 a 6 ínstar, com duração de 11 a 13 dias. É nesta fase que se detém o foco principal de pesquisas sobre o inseto, devido à defoliação massiva em cultivares de soja. A fase pupal tem duração entre 9 e 13 dias, dependendo do tipo

de alimentação e temperatura ambiente, culminando na emergência de adultos, cuja razão sexual é de 1:1 (FUGI, 2003). As fases do ciclo de vida estão representadas na **Figura 02**.

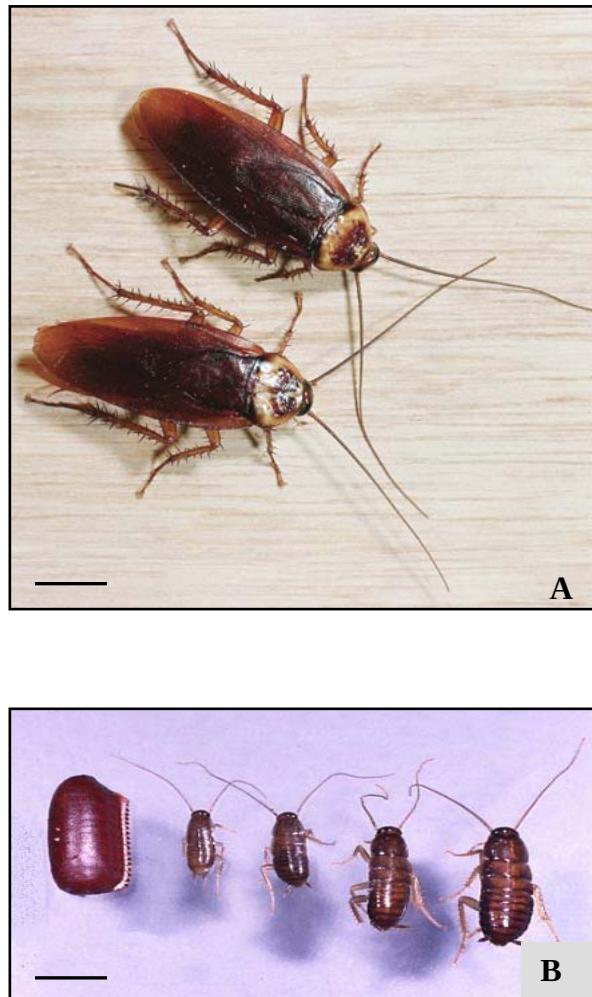


Figura 1: *Periplaneta americana*. A figura **A** representa uma fotografia do inseto no estágio adulto. Em **B**, uma fotografia da ooteca e fases ninfais. Barras: A: 1 cm; B: 0,5 cm. Fonte: <http://cache.eb.com/eb/image?id=82627&rendTypeId=4> (2008).

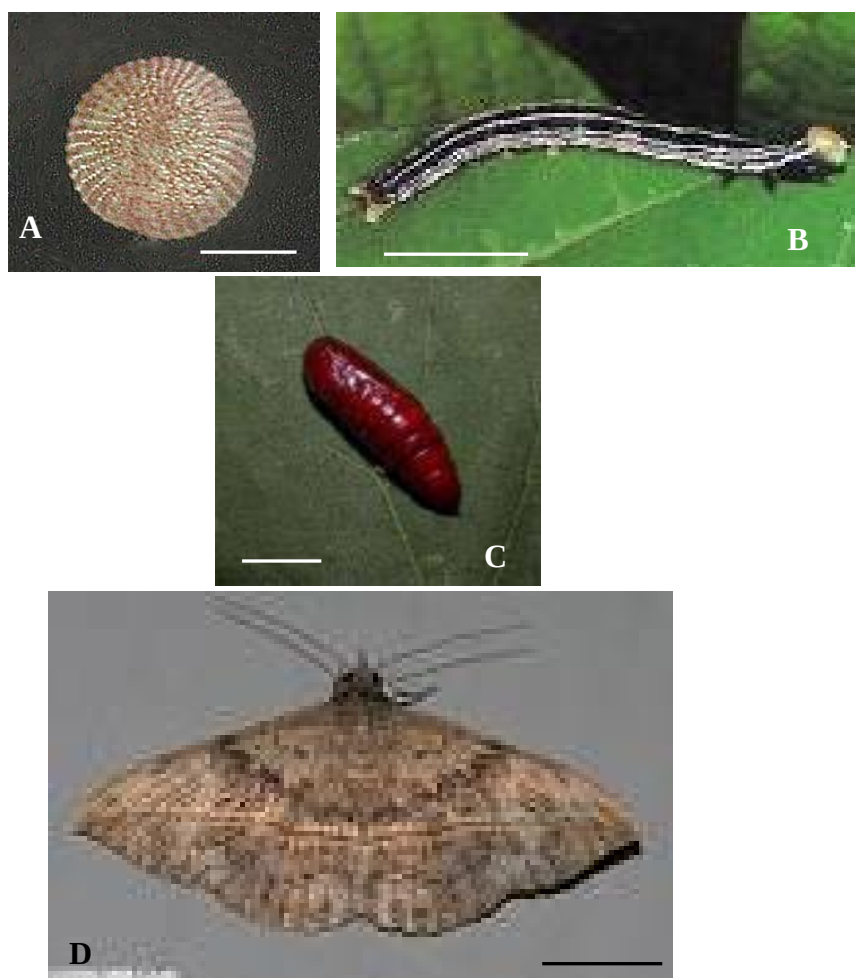


Figura 02: *Anticarsia gemmatalis*. **A:** fotografia de ovo; **B:** fotografia de lagarta de 5º instar; **C:** fotografia de pupa; **D:** fotografia do inseto adulto. Barras: A: 0,5 mm; B e C: 0,5 cm; D: 1 cm. Fonte: www.gaipm.org/top50/images/velvetbean.jpg (2008).

1.3 Ovogênese em insetos

As células germinativas, diferenciadas ainda durante a embriogênese, serão responsáveis pela produção de gametas feminino e masculino em insetos (BÜNING, 1994). A formação dos ovos ocorre nos ovários, que estão organizados em filamentos denominados ovaríolos (**Figura 03 A e B**). Cada ovaríolo é composto de um número variável de ovogônias e ovócitos em diferentes estágios de citomorfogênese, recobertos por uma camada de células epiteliais (epitélio folicular) (ANDERSON, 1964). São divididos em duas porções funcionalmente distintas: germário, região anterior onde as células germinativas são diferenciadas; e vitelário, local de crescimento do folículo ovariano diferenciado (**Figura 03 B**). A formação do ovócito ocorre em três fases: a pré-vitelogênese, onde o crescimento do ovócito é lento; a vitelogênese, fase de crescimento bastante acentuado de intensa atividade endocítica; e a coriogênese, que é marcada pela produção do córion (composto por proteínas e quitina), o qual originará a casca do ovo (FAKHOURI *et al.*, 2006; BOUTS *et al.*, 2007). Após estes processos os ovos serão depositados no meio ambiente, protegidos contra lesões mecânicas e da perda de água (BÜNING, 1994).

A fase rápida de crescimento do ovócito (vitelogênese) ocorre a partir da incorporação massiva de macromoléculas, majoritariamente proteínas, através de endocitose mediada por receptores (RAIKHEL *et al.*, 1992; MACHADO *et al.*, 1998; RAIKHEL *et al.*, 2002). Estas moléculas são captadas a partir da hemolinfa (líquido circulante de função análoga ao sangue de vertebrados), sendo previamente sintetizadas principalmente pelo corpo gorduroso (tecido de função biossintética semelhante o fígado de vertebrados) (VALLE, 1993; SNIGIREVSKAYA, HAYS *et al.*, 1997). Após a entrada no ovócito, estas proteínas são acumuladas em organelas denominadas grânulos de vitelo (YG) em uma conformação altamente empacotada (RAIKHEL e DHADIALLA, 1992) (**Figura 04**). A **Figura 03 C**

mostra um ovócito vitelogênico, repleto de grânulos de vitelo, circundado pelo epitélio folicular.

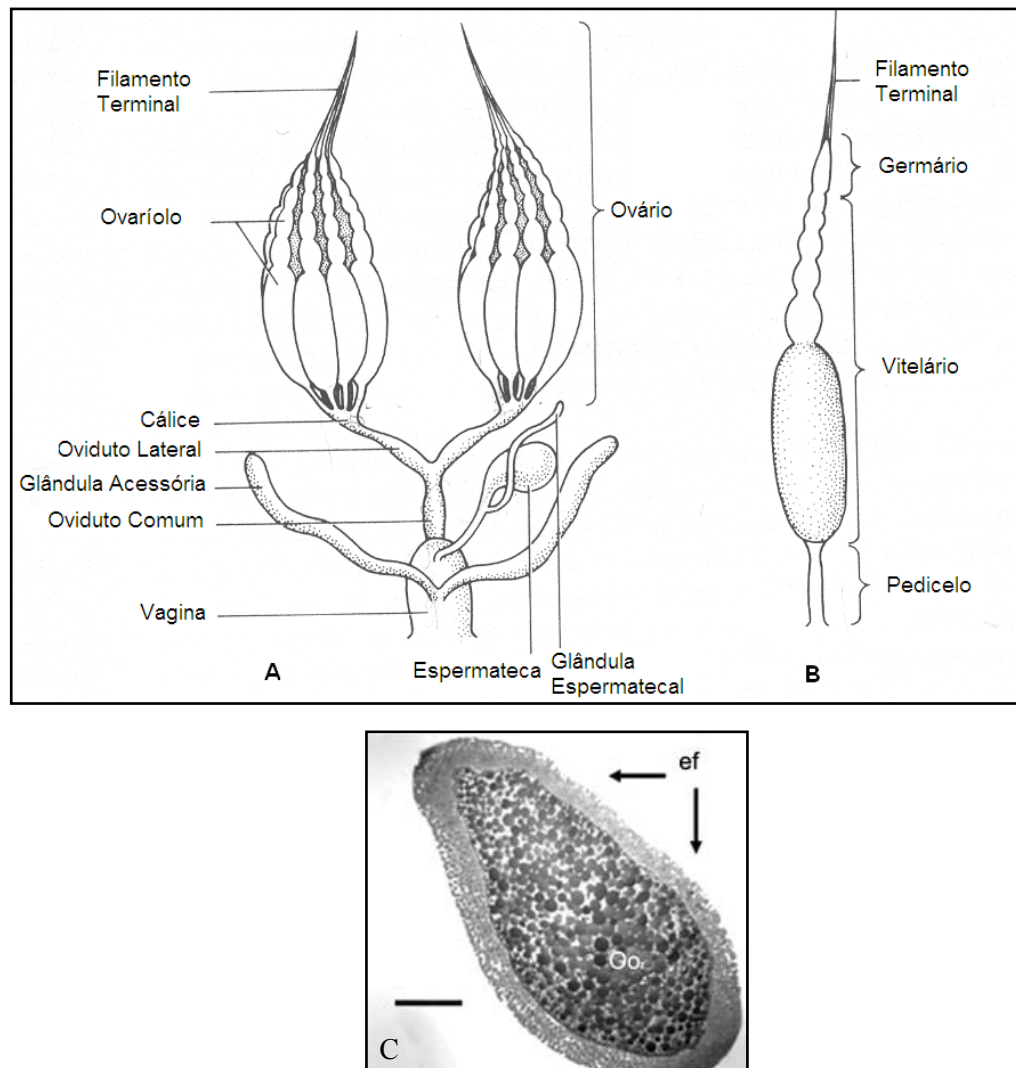


Figura 03: Anatomia básica do trato reprodutivo feminino de insetos. A) Diagrama dos ovários, com os componentes principais. **B)** Detalhe de um ovaríolo. Observam-se as duas regiões do ovaríolo responsáveis pela produção de ovos: o *germário*, com células germinativas que originarão todas as células presentes no ovário; e também o *vitelário*, onde se encontram ovócitos em diferentes estágios de desenvolvimento. **C)** Corte semifino de ovócito vitelogênico de *R. prolixus*, mostrando o ooplasma (Oo) repleto de grânulos de vitelo e as setas mostram a disposição do epitélio folicular (ef). Barra = 250 μ m, dado do laboratório.

A principal proteína estocada nos grânulos de vitelo é vitelina (VT), sintetizada como vitelogenina (VG) no corpo gorduroso. As vitelinas (VT) são lipoglicoproteínas fosforiladas presentes em YG de animais ovíparos, e possuem tamanho molecular variado entre as espécies. Podem apresentar diversas subunidades e tem função principal de reserva nutricional para o embrião. No entanto, outras proteínas também são estocadas nos ovócitos de insetos, como microvitelogenina de *Manduca sexta* (KAWOOYA *et al.*, 1986) e a RHBP de *Rhodnius prolixus* (proteína ligadora de heme em *Rhodnius*) (MACHADO *et al.*, 1998).

Em *P. americana*, duas VTs já foram identificadas e caracterizadas (KIM *et al.*, 1994). Os genes das VGs correspondentes foram clonados e as seqüências analisadas (TUFAIL *et al.*, 2000; TUFAIL *et al.*, 2001), e ambas possuem sítios de clivagem pós-traducional e sítios de fosforilação. Até o momento, não foi encontrada descrição sobre a presença de proteínas de vitelo, ou mesmo sobre mecanismos de degradação de vitelo em *A. gemmatilis*.

1.4 Embriogênese em insetos

O desenvolvimento embrionário de insetos envolve a multiplicação de células por mitose, seguida pelo crescimento e diferenciação em tecidos e órgãos. A formação dos tecidos ocorre à custa da degradação do vitelo, visto que em ovíparos, o desenvolvimento embrionário acontece com o embrião totalmente desconectado do organismo materno (CHAPMAN, 1982). Na fase inicial após a fertilização, o núcleo sofre divisões sucessivas, sem a separação em células (clivagem superficial). Estas divisões nucleares formam um sincício, com os núcleos direcionados para a periferia do ovo. Após esta etapa, a invaginação da membrana plasmática promove a celularização no embrião, formando a blastoderme, e o conteúdo de vitelo é circundado por estas células (GILBERT, 2000) (**Figura 05**). As células

germinativas – que originarão as ovogônias e espermatogônias no inseto – são diferenciadas precocemente, posicionando-se na região terminal do embrião.

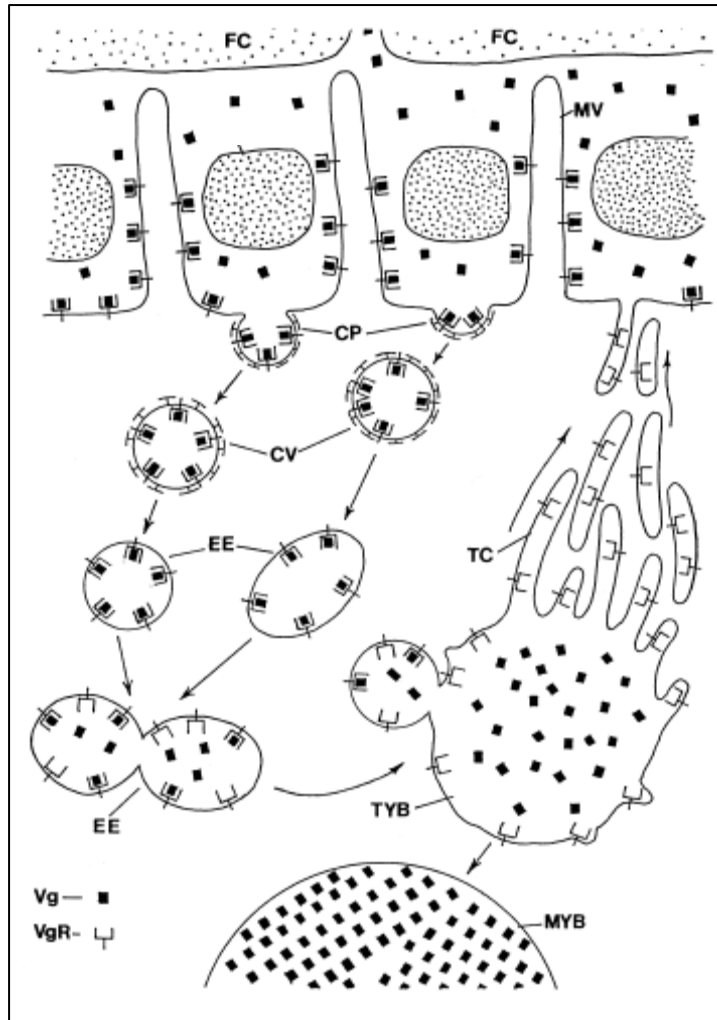


Figura 04: Representação esquemática da incorporação de proteínas de vitelo no ovo de insetos. FC: Células foliculares; MV: microvilosidades, onde os receptores de VG estão localizados; CP: *Coated-Pits* cobertas de clatrina, formadas após interação do complexo VG-Receptor. CV: *Coated vesicles*. Após a perda da clatrina, estas estruturas são transformadas em endossoma inicial (EE), que se funde a outro para formar o endossoma tardio ou grânulos de vitelo transientes (TYB). Nesta fase, ocorre reciclagem do receptor via compartimentos tubulares (TC). Os grânulos de vitelo maduros são formados em estruturas cristalinas (MYB), que são estocados até o início da embriogênese. Adaptado de (SNIGIREVSKAYA, SAPPINGTON *et al.*, 1997).

Durante esta fase inicial embrionária, chamada embriogênese inicial, tem início a degradação do vitelo, através de eventos de ativação de enzimas hidrolíticas presentes em grânulos de vitelo, ou pela presença de células denominadas vitelófagos, que são células semelhantes a macrófagos, oriundas de clivagens nucleares mantidas no citoplasma (vitelófagos primários) ou a partir de células da periferia que migram de volta ao conteúdo de vitelo (vitelófagos secundários) (COUNCE, 1961; GIORGI *et al.*, 1999).

A embriogênese tardia é marcada pela multiplicação dos blastômeros em uma região do ovo, denominada banda germinativa. É nesta região que o corpo do embrião é formado. As outras células formarão a camada serosa, que cresce em torno da banda germinativa e envolve o embrião (CHAPMAN, 1982). Nesta camada são formados os folhetos ectodérmico e mesodérmico. A endoderme é formada posteriormente. A ectoderme dá origem ao cérebro, gânglios, órgãos sensoriais, epiderme, glândulas exócrinas, sistema respiratório, genitália externa e intestinos anterior e posterior. As células mesodérmicas dão origem às células musculares, sanguíneas, glândulas endócrinas, gônadas, corpo gorduroso. O endoderma é responsável pela formação do intestino médio. Após a organogênese, o embrião está pronto para eclosão (CHAPMAN, 1982; GILBERT, 2000).

Os estudos de transcrição e tradução em embriões mostram que o início da transcrição do genoma do embrião ocorre após o fim da fase de clivagem superficial, e a tradução, que tem início antes da fase blastodérmica, depende de RNA e ribossomos de origem materna, depositados durante a ovogênese (BERRY, 1982). Neste sentido, moléculas necessárias inicialmente, antes da transcrição de genes embrionários, sejam proteínas, enzimas ou RNA são adquiridos de origem materna.

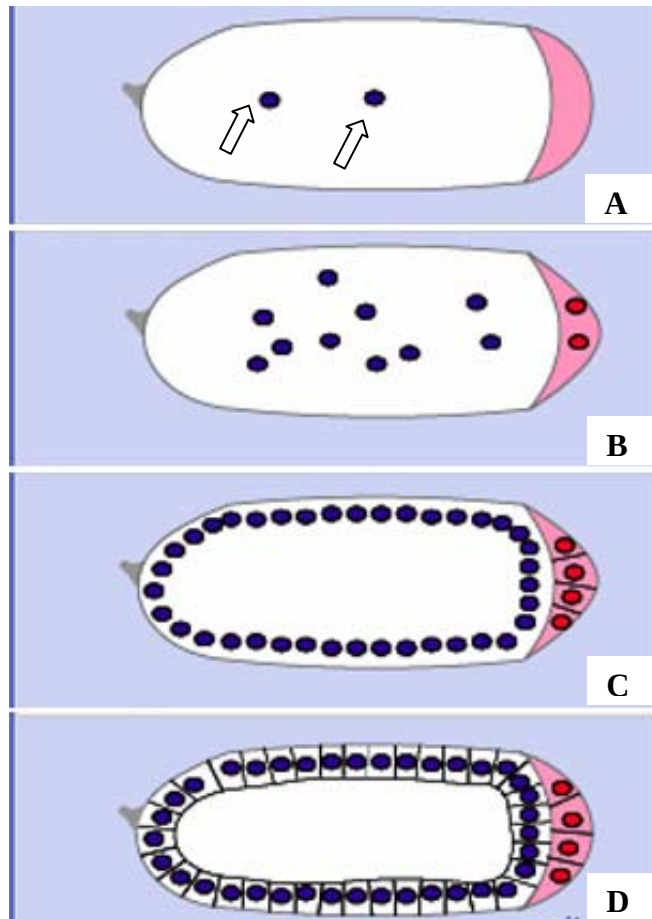


Figura 05: Esquema representativo de eventos de embriogênese inicial em insetos. A: Ovo fertilizado. Os pró-núcleos estão dispostos no interior do ovo (setas). **B:** Clivagem superficial. O núcleo se divide no citoplasma. **C:** Blastoderma sincicial. Os núcleos migram para a periferia do ovo, formando um sincício. **D:** Blastoderma celular. A membrana plasmática invagina os núcleos, formando células na periferia. O interior do ovo (em branco) é preenchido de vitelo. A região em rosa na porção posterior do embrião corresponde às células germinativas. A região à esquerda corresponde à porção anterior do embrião. Adaptado do *site* www.ergito.com (2008).

1.5 Degradação de vitelo durante a embriogênese

Como dito anteriormente, o desenvolvimento embrionário em animais ovíparos acontece com o embrião totalmente desconectado do organismo materno. Por este motivo, o ovo precisa conter todos os nutrientes necessários para a formação dos tecidos do inseto, assim como uma série de enzimas envolvidas na disponibilização destas moléculas para a embriogênese na fase inicial, além de mecanismos regulatórios que ativem estas enzimas no momento exato de mobilização destas reservas.

Os grânulos de vitelo (YG) são as organelas originadas no ovócito em formação que servem de fonte nutricional ao desenvolvimento embrionário. Hidrolases tipicamente lisosomais são estocadas em YG em diversos modelos de invertebrados em uma conformação inativa, ativada em pH ácido, como em dípteros (CHO *et al.*, 1991; CHO *et al.*, 1999; RIBOLLA *et al.*, 2001), lepidóptera (YAMAMOTO *et al.*, 2000; YAMAHAMA *et al.*, 2003) e carrapatos (FAGOTTO, 1990b; LOGULLO *et al.*, 1998). Baseado nestas características, Fagotto (1995) propôs o modelo que os YG são organelas semelhantes à lisosomas dormentes. A acidificação destes YG é um mecanismo chave no controle das enzimas que degradam o vitelo (FAGOTTO, 1995). Esta acidificação ocorre a partir da atividade de H⁺-ATPases (FAGOTTO, 1991; MALLYA *et al.*, 1992; ABREU *et al.*, 2004) e H⁺-PPases (MOTTA *et al.*, 2004).

As populações de YG são heterogêneas em relação ao seu conteúdo, tamanho e densidade, como observado no lepidóptero *Bombyx mori* (YAMAHAMA *et al.*, 2003). As hidrolases são geralmente encontradas em YG pequenos, enquanto que as proteínas de vitelo tipicamente estão em YG grandes, e a acidificação é diferencial, por exemplo, em *Carausius morosus* (FAUSTO *et al.*, 2001) e no carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ABREU *et al.*, 2004). No barbeiro *Rhodnius prolixus* foi mostrado que os eventos de fusão

entre os YG de tamanhos diferentes, mediados por uma mudança nos níveis de cálcio no ovo permite a montagem da maquinaria de degradação do vitelo neste inseto (RAMOS *et al.*, 2007) (**Anexo 03**).

As amplas descrições de hidrolases que atuam na degradação de vitelo são, na maioria dos modelos, baseadas em estudos de proteases ácidas e neutras (GIORGI *et al.*, 1999). Entretanto, a presença de outras hidrolases, como fosfatases ácidas e glicosidases também já foi demonstrada em carrapatos (FAGOTTO, 1990a; SILVEIRA *et al.*, 2006) e em insetos (PURCELL *et al.*, 1988; NUSSENZVEIG *et al.*, 1992; RIBOLLA *et al.*, 1993).

O padrão de degradação de proteínas de vitelo de *P. americana* é mostrado na **Figura 06** (STORELLA *et al.*, 1985). A proteólise do vitelo observada neste modelo e em outras espécies, como em *B. mori* (SUGIMOTO *et al.*, 1990) e *Blattella germanica* (NORDIN *et al.*, 1990) é parcial, ou seja, as proteínas não são totalmente degradadas durante a embriogênese destes insetos.

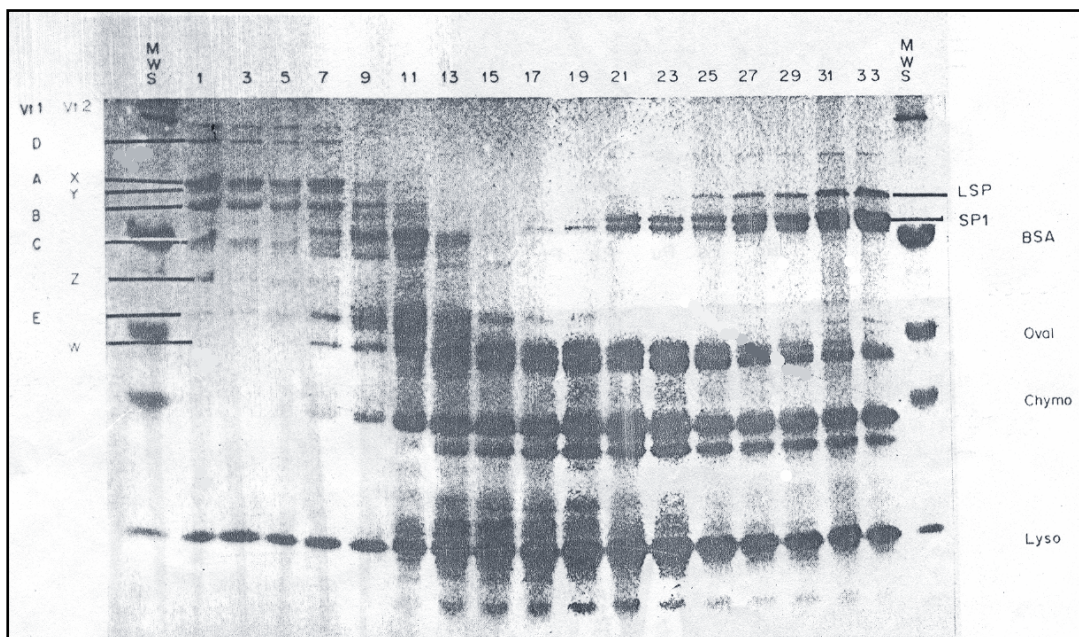


Figura 06. SDS-PAGE de extratos de ootecas durante o desenvolvimento embrionário de *P. americana*, de 1 a 33 dias após a postura. MWS, marcadores de massa molecular [BSA (Albumina sérica bovina) = 66 kDa; Oval (Ovoalbumina) = 43 kDa; Chymo (Quimotripsina) = 25 kDa; Lyso (Lisozima) = 17 kDa]. À esquerda, estão representadas as bandas correspondentes às vitelinas (VT) 1 e 2, e suas respectivas subunidades [D, A, B, C, E; (VT-1); X; Y; Z; W; (VT-2)]. Retirado de Storella e cols., 1985.

1.6 Proteases

1.6.1 Classificação de Proteases

Peptidases (EC 3.4) são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas de proteínas (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/>). Exopeptidases clivam um resíduo de aminoácido terminal de um polipeptídeo, e as endopeptidases (proteases) clivam ligações peptídicas internas. As exopeptidases podem ser classificadas, de forma resumida, em aminopeptidases (atuam no terminal amino da proteína) (EC 3.4.11) e carboxipeptidases (atuam no terminal carboxílico da proteína) (EC 3.4. 16-18).

As endopeptidases podem ser classificadas de acordo com o grupamento químico que funciona na catálise. São divididas em subclasses: Serino endopeptidases (EC 3.4.21), o nucleófilo da reação de hidrólise é o hidroxil da cadeia lateral do resíduo de serina do sítio ativo; Cisteíno endopeptidases (3.4.22), o nucleófilo da reação de hidrólise é a sulfidril da cadeia lateral de um resíduo de cisteína do sítio ativo; Aspartil endopeptidases (EC 3.4.23) e Metallo endopeptidases (EC 3.4.24), uma molécula de água no sítio ativo funciona como nucleófilo que ataca a ligação peptídica, interagindo com o grupamento aspartil da cadeia lateral ou do íon metal, respectivamente, nestas endopeptidases.

O sistema de classificação MEROPS se baseia na estrutura das peptidases (<http://merops.sanger.ac.uk>). Neste caso, cada peptidase é anotada em uma família, a partir das similaridades na sequência de aminoácidos. As famílias que são homólogas são agrupadas juntas em um Clã. Neste caso temos, por exemplo, a cisteíno peptidase papaína é classificada como pertencente ao clã C, à família C1, enquanto que a pepsina (aspartil peptidase) é classificada na família A1 (RAWLINGS *et al.*, 2008).

A protease cliva uma ligação peptídica chamada de ponte sésil entre dois resíduos de aminoácidos identificados por P1 e P1'. Os subsítios no lado amino terminal da ponte sésil são numerados no sentido carboxi → amino (... P3, P2, P1), enquanto que os subsítios no lado carboxi terminal são numerados no sentido amino → carboxi (P1', P2', P3',...). A especificidade do substrato geralmente é dependente da natureza da cadeia lateral do resíduo P1, porém os outros subsítios também podem interferir na ligação ao substrato e afetar a catálise (RAWLINGS, MORTON *et al.*, 2008).

Entre as serino proteases, a família S1 apresenta grande destaque, devido à sua abundante distribuição (como exemplos tripsina, quimiotripsina, calicreína, fator de coagulação X e elastase). Estão envolvidas em diversos eventos fisiológicos, incluindo a digestão, a coagulação sanguínea e a resposta imune. O mecanismo catalítico básico é constituído pela tríade catalítica clássica, formada pelos resíduos Serina–Aspartato–Histidina (POLGÁR, 2005). Os inibidores protéicos da família aprotinina e serpinas, além dos inibidores não protéicos PMSF, leupeptina e TLCK são capazes de inibir esta família de enzimas.

A família C1 abrange as cisteíno peptidases do tipo papaína. Estas enzimas incluem exemplares com atividade exo e endopeptidásica, e são inibidas por E-64, leupeptina e cistatinas (inibidores protéicos). Os resíduos catalíticos clássicos são Cisteína-Histidina, formando uma díade catalítica. Os dois outros resíduos do sítio ativo são de glutamina (precedendo a cisteína) e asparagina (seguinte à histidina), segundo a classificação MEROPS. Estas enzimas estão envolvidas com o sistema lisosomal de degradação de proteínas (TURK *et al.*, 2001). Dentre as mais descritas estão as catepsinas B e L de mamíferos. São geralmente sintetizadas como pró-enzimas, e são ativadas em condições acídicas (MCGRATH, 1999). A acidificação promove a ativação autocatalítica da enzima, e este processo pode ser

bimolecular, no qual uma enzima é capaz de ativar a outra, como uma reação em cadeia (TURK *et al.*, 2001).

As aspartil proteases, pertencentes à família A1, são hidrolases capazes de clivar proteínas em condições acídicas, sendo todos os exemplares endopeptidases como a Pepsina A (protease estomacal) e a catepsina D. A pepstatina A é o principal inibidor seletivo desta família de enzimas. O centro catalítico é formado por dois resíduos de aspartato, que ativam uma molécula de água, e esta atua no ataque nucleofílico (RAWLINGS, MORTON *et al.*, 2008).

1.6.2 Descrição de proteases durante a embriogênese

A participação de proteases na mobilização de vitelo tem sido demonstrada em diversos modelos de ovíparos, como foi comentado anteriormente (seção 1.5). Em *B. mori*, uma cisteíno protease que degrada vitelina (VT) é sintetizada maternalmente e acumulada nos ovócitos durante a ovogênese, sendo ativada após acidificação dos grânulos, e é similar à catepsina-L humana (YAMAMOTO *et al.*, 1994; YAMAMOTO *et al.*, 2000). Entretanto, existe uma serino protease da família S1 que foi purificada e clonada (INDRASITH, SASAKI *et al.*, 1988; IKEDA *et al.*, 1991). Esta enzima degrada proteínas de vitelo, e a atividade tem início na metade da embriogênese, aumentando até a diferenciação larval. Uma segunda serino protease (família S1, denominada 30 KP) é sintetizada no fim da embriogênese, e degrada especificamente as proteínas de 30 kDa (MAKI *et al.*, 2001). Este modelo é interessante, uma vez que as descrições das enzimas indicam que as diferentes proteínas de vitelo são processadas especificamente por proteases, em momentos controlados. Enzimas tipo catepsinas B (cisteíno proteases) foram descritas em ovários e ovos de outros modelos de lepidópteros, como no noctuídeo *Helicoverpa armigera* (ZHAO *et al.*, 2005).

Em *Drosophila*, uma cisteíno protease (tipo catepsina B) atua na degradação do vitelo, e esta enzima aparentemente é ativada por uma serino protease, também associada aos grânulos de vitelo (MEDINA *et al.*, 1988; MEDINA *et al.*, 1989), mostrando uma ação cooperativa entre hidrolases descritas nestas organelas. Na espécie de barata *B. germanica*, foi descrita a participação de uma cisteíno protease (tipo catepsina L) no processamento da vitelina, sendo estocada como pro-enzima e ativada durante a embriogênese por acidificação dos YG (LIU *et al.*, 1996).

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* possui duas proteases envolvidas com a degradação do vitelo: a aspartil protease (LOGULLO *et al.*, 1998) e a cisteíno protease (SEIXAS *et al.*, 2003). A participação de cisteíno proteases na degradação do vitelo foi identificada em outros modelos de ovíparos, como no nematódeo *Caenorhabditis elegans* (BRITTON *et al.*, 2004) e no sapo *Xenopus laevis* (YOSHIZAKI *et al.*, 1998).

Como dito anteriormente, a participação de hidrolases na degradação do vitelo tem sido descrita em diversos modelos. Além de proteases, outra classe de hidrolases estudada são as fosfatases e, tendo em vista que as proteínas de vitelo são fosforiladas, existe a necessidade da participação de mecanismos de fosforilação e defosforilação destas proteínas durante a mobilização do vitelo como fonte nutritiva para o embrião.

1.7 Fosforilação e defosforilação de proteínas

A modulação do estado de fosforilação de proteínas intracelulares atualmente tem sido reconhecida como o mais importante mecanismo de transdução de sinal, no controle da atividade de enzimas e outras proteínas, e está envolvido na regulação de diversos processos celulares (INGEBRITSEN *et al.*, 1983; VILLAFRANCA *et al.*, 1996). A fosforilação de proteínas pode criar novos sítios de reconhecimento para interação proteína-proteína, regular

a atividade enzimática, entre outras funções. Esta via de modificação pós-traducional é utilizada pelas células no controle dos mais diversos eventos celulares como ciclo e diferenciação celulares, bem como de processos como ativação de células T e atividade de receptor de neurotransmissores (ZHANG, 2001). Os níveis de fosforilação das proteínas celulares são controlados pelas atividades de proteínas cinases e proteínas fosfatases (fosforilação e defosforilação de proteínas, respectivamente), o que torna essas duas classes de enzimas com funções antagônicas importantes alvos de regulação celular.

A fosforilação de proteínas é mediada pelas proteínas cinases, as quais têm sido estudadas por muitas décadas, de forma que muito do conhecimento adquirido em processos de transdução de sinal intracelular derivam de cascatas de reações de proteínas cinases.

A defosforilação de proteínas é exercida por proteínas fosfatases. Estas enzimas constituem uma grande família, podendo exercer efeitos positivos ou negativos em vias de sinalização, com funções fisiológicas cruciais em células de mamíferos (INGEBRITSEN e COHEN, 1983). Podem ser classificadas entre fosfatases ácidas ou alcalinas (defosforilam resíduos de fosfato de substratos diferentes, em condições de alta ou baixa concentração de prótons, respectivamente). Trabalhos anteriores indicam que as fosfatases ácidas são o grupo comumente encontrado participando da degradação de vitelo em animais ovíparos (LEMANSKI *et al.*, 1977; FIALHO *et al.*, 2002).

1.7.1 Fosfatases Ácidas

As fosfatases ácidas [fosfohidrolase monoéster ortofosfórica (pH ótimo ácido), EC 3.1.3.2] são um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de monoésteres de fosfato em condições acídicas, e têm sido estudadas nos mais diversos organismos, como em diferentes tecidos de mamíferos, invertebrados, plantas e protozoários parasitos (ARAÚJO *et al.*, 1976;

ULLAH *et al.*, 1988; SCHELL *et al.*, 1990; VIHKO *et al.*, 1993; STUBBERUD *et al.*, 2000; JING *et al.*, 2006). Estas enzimas são agrupadas em duas classes: **fosfatases ácidas de alto-peso molecular** (que possuem origem lisosomal) e **fosfatases ácidas de baixo-peso molecular** (de origem citoplasmática, normalmente secretada) (ARAÚJO *et al.*, 1976). Além disso, estas enzimas também são classificadas quanto à sensibilidade ao tartarato de Na⁺ e K⁺, sendo classificadas como sensíveis ao tartarato (**LAP**) e as fosfatases ácidas resistentes ao tartarato (**TRAP**), que foram descritas relacionadas à reabsorção do osso (em osteoclastos) (ODDIE *et al.*, 2000). O fluoreto de sódio é descrito como um potente inibidor, de largo espectro, de fosfotransferases (GURANOWSKI, 1990). A sensibilidade ou resistência à temperatura também é estudada na atividade de fosfatases ácidas em alguns modelos (FERREIRA *et al.*, 1998; WYSOCKI *et al.*, 2003). Fosfatases ácidas lisossomais são glicoproteínas marcadores de lisosomas. Sofrem processamento proteolítico para se tornarem ativas em ambiente ácido e a participação na digestão intracelular de macromoléculas as tornam pouco seletivas em relação ao substrato (DE DUVE *et al.*, 1966).

1.7.2 Proteínas Fosfatases

As proteínas fosfatases são separadas em três classes principais: Serina/ Treonina Fosfatases, Tirosina Fosfatases e Fosfatases de especificidade dupla (VILLAFRANCA *et al.*, 1996). As Serina/ Treonina Fosfatases são enzimas que catalisam a hidrólise de fosfato em resíduos de serina ou treonina em substratos protéicos, e se subdividem em quatro subclasses: PP1, PP2A, PP2B, PP2C. Estas classes se distinguem pelos mecanismos de regulação e ativação. Algumas destas enzimas já foram descritas na embriogênese de ouriço-do-mar, atuando nas fases iniciais da embriogênese, principalmente durante a fase de mórula (KAWAMOTO *et al.*, 2000). As fosfatases de especificidade dupla têm capacidade de

defosforilar resíduos de serina, treonina e tirosina, sendo as MKPs (fosfatases específicas de MAPK - proteínas cinases ativadas por mitógeno) o grupo mais bem descrito desta família (THEODOSIOU *et al.*, 2002).

1.8 Tirosinas Fosfatases

Diversos processos celulares como a diferenciação, a proliferação e o crescimento celular são regulados por fosforilação em resíduos de tirosina. Erros no funcionamento de Proteína Tirosina Fosfatases (PTPs) podem levar a situações aberrantes de fosforilação de proteínas, contribuindo para o desenvolvimento de diversas doenças humanas, como o câncer e o diabetes (ZHANG, 2001; 2002). As PTPs não são dependentes de metais, e formam um intermediário fosfocisteína durante a defosforilação (ZHANG, 1998). A característica marcante desta classe de enzimas é a sequência de aminoácidos no sítio ativo (H/V)C(X)₅R(S/T), com a cisteína central desta região desenvolvendo o papel principal da catálise. Esta classe de enzimas se caracteriza pela inibição pelos íons vanadato e molibdato (GORDON, 1991), e insensibilidade ao ácido ocláico. A cisteína funcional do sítio ativo é determinante para o funcionamento da enzima. Por esta razão, íons metais oxidantes, como o cobre e o zinco são inibidores destas enzimas (KIM *et al.*, 2000).

PTPs são subdivididas em três famílias principais: Tirosinas Fosfatases Específicas, Tirosinas Fosfatases de Especificidade Dupla e Fosfatases de Baixo Peso Molecular (**Figura 07**). Tirosinas fosfatases específicas são subdivididas em dois grupos, as do tipo **receptores**, como a CD45 e PTP α que possuem um domínio extracelular para reconhecimento do ligante, um domínio transmembrana e um ou dois domínios citoplasmáticos; **intracelulares**, como a PTP1B e a PTP2 (que contém o domínio SH2), também chamadas de SHP-2, que possuem

um único domínio catalítico e variadas regiões amino-ou carboxi-terminal (WALTON *et al.*, 1993).

As tirosinas fosfatases de especificidade dupla podem hidrolisar tanto resíduos fosforilados em tirosina, quanto em serina ou treonina. As tirosinas fosfatases de baixo peso molecular possuem peso menor que 50 kDa, e já foram encontradas em mamíferos, leveduras e bactérias, parecendo ser compostas apenas do domínio catalítico (WYSOCKI E STRZEZEK, 2003). Recentemente, estudos de fosfoproteoma (proteínas fosforiladas) têm sido realizados objetivando a determinação de alvos de tirosinas cinases e tirosinas fosfatases em larga escala. Estes estudos visam analisar as proteínas-alvo de uma determinada rede de sinalização, comparando os níveis de fosforilação em diversas situações como progresso temporal de uma via metabólica (BLAGOEV *et al.*, 2004).

Embora estas fosfatases atuem preferencialmente em ambientes de pH neutro, a atividade de tirosina fosfatase purificadas ou clonadas em pH ácido foi demonstrada em tecidos de mamífero, protozoário e bactéria (LAU *et al.*, 1987; WO *et al.*, 1992; CHEN *et al.*, 1999; BAKALARA *et al.*, 2000; WYSOCKI e STRZEZEK, 2003).

Família de Proteína Tirosina Fosfatase

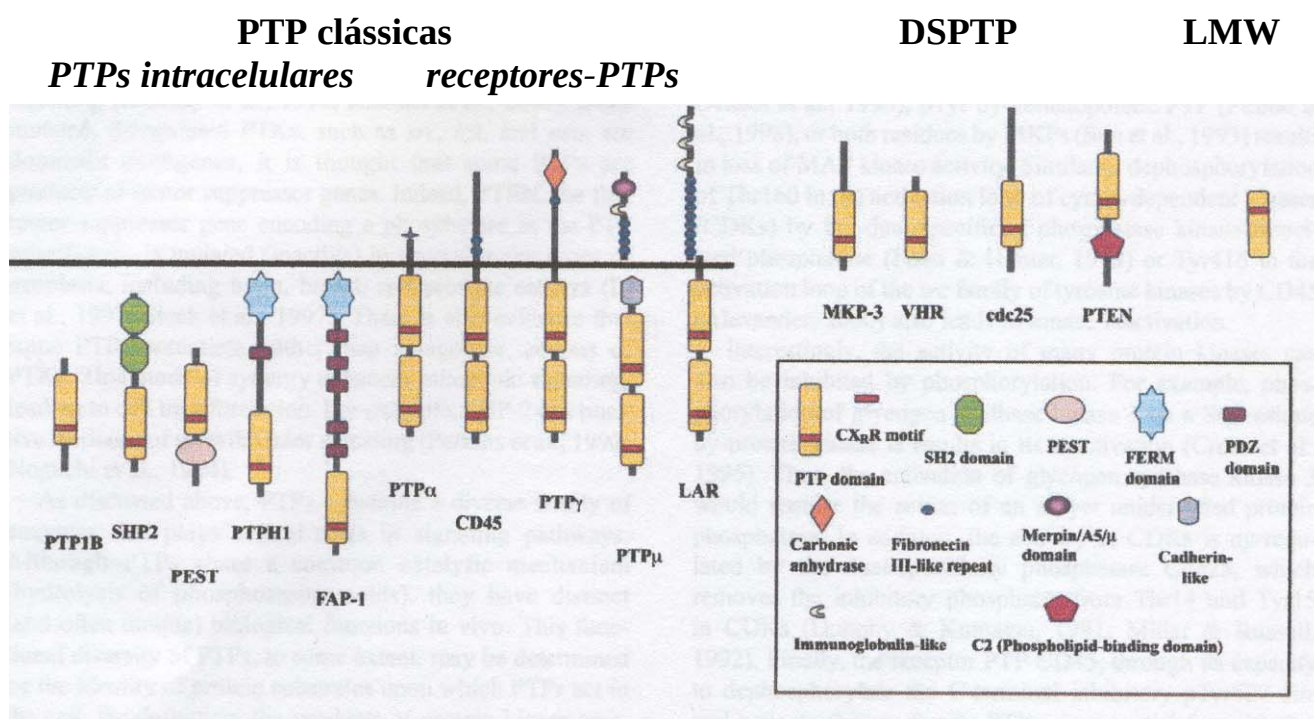


Figura 07: Estruturas das proteínas tirosinas fosfatases. O esquema mostra as classes, os domínios e exemplos de cada uma delas. No detalhe são mostradas as siglas correspondentes aos domínios descritos nas enzimas. PTP: proteína tirosina fosfatase; DSPTP: proteína tirosina fosfatase de especificidade dupla; LMW: PTP de baixo peso molecular. Retirado de (ZHANG *et al.*, 2002).

1.9 Tirosinas Fosfatases no desenvolvimento embrionário

A fosforilação em resíduos de tirosina, catalisada pela tirosina cinase, é um importante regulador de processos de desenvolvimento. Atualmente, têm-se estudado a função de tirosinas fosfatases que atuam nestes fenômenos, mostrando-se serem estas enzimas cruciais para o desenvolvimento embrionário de invertebrados e vertebrados (DEN HERTOOG, 1999). Em 2006, nosso grupo caracterizou uma tirosina fosfatase ácida em ovócitos de *P. americana*, sendo incorporada a partir da hemolinfa em YG (OLIVEIRA *et al.*, 2006) (**Anexo 01**). Durante a ovogênese de *Drosophila* foram identificados genes que expressam proteínas tirosinas fosfatases (FITZPATRICK *et al.*, 1995). Três genes descritos representam tirosinas fosfatases solúveis (intracelulares), sendo o gene *corkscrew* um dos primeiros a ser estudado, o qual possui função importante na sinalização do receptor Torso durante a ovogênese e a embriogênese, envolvido na padronização de eixos (PERKINS *et al.*, 1992). O funcionamento de tirosinas fosfatases durante a ovogênese e embriogênese de *Drosophila* tem sido estudado, com enfoque dado ao funcionamento no crescimento e orientação dos axônios (STOKER, 2001). Em vertebrados, diversos grupos de tirosinas fosfatases já foram estudados, como as citoplasmáticas SHP1 e 2 que são expressas preferencialmente nas células hematopoiéticas. Os defeitos em mutantes para estes genes inviabilizam o embrião.

1.10 Correlação entre Fosfatase e Protease durante o Desenvolvimento Embrionário de Artrópodes

A correlação temporal da atividade das hidrolases durante o desenvolvimento embrionário de artrópodes foi recentemente observada nos insetos *Musca domestica* e *B. germanica*, porém não foi identificada uma cooperação direta entre a fosfatase ácida e a

protease (PURCELL *et al.*, 1988; RIBOLLA *et al.*, 1993). Entretanto, no barbeiro *R. prolixus*, a fertilização foi o evento que ativou a fosfatase ácida, e se esta enzima for inibida a proteólise mediada pela catepsina D é bloqueada, mostrando que a proteólise depende da atividade da fosfatase ácida (FIALHO *et al.*, 2002; FIALHO *et al.*, 2005). Em carrapato, observou-se que a VT é fosforilada em resíduos de tirosina, e a defosforilação destes resíduos está envolvida na regulação da proteólise durante a embriogênese (SILVEIRA *et al.*, 2006).

Na mosca *Sarcophaga peregrina*, foi identificada uma proteína tirosina fosfatase presente em ovos (EDTP) e foi demonstrado que esta enzima é um alvo da protease do tipo catepsina L ativa no embrião, e esta degrada a EDTP logo no início da embriogênese (YAMAGUCHI *et al.*, 1999). A sequência do domínio do sítio ativo, comparada a outras PTPs classificou a enzima como uma tirosina fosfatase. Portanto, a compreensão da relação entre as diferentes hidrolases (como fosfatases e proteases, por exemplo) associadas à degradação do vitelo pode fornecer base científica importante a respeito dos aspectos nutricionais da embriogênese de insetos. Estudar a atividade fosfatásica durante o desenvolvimento embrionário, bem como a proteólise e os alvos destas enzimas podem ajudar no entendimento do processo embrionário, com relação aos mecanismos metabólicos envolvidos e a sua regulação.

2 Objetivos

Partes dos resultados desta tese são componentes de artigo publicado em revista internacional indexada. Didaticamente os objetivos serão divididos em duas partes, separados a partir do modelo biológico estudado.

2.1 Objetivos gerais

2.1.1 Parte 1

Estudo de fosfatases ácidas e proteases ácidas e neutras durante a embriogênese inicial de *P. americana*, investigação de possíveis alvos e correlação entre as hidrolases nesta fase do desenvolvimento embrionário.

2.1.2 Parte 2

Purificação parcial de tirosina fosfatase ácida em ovos de *A. gemmatalis*, caracterização do funcionamento da enzima e investigação de correlação entre a proteólise e a atividade da fosfatase durante a embriogênese deste inseto.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Parte 1: *P. americana*

- a) Caracterizar a atividade fosfatásica ácida durante a embriogênese inicial de *P. americana*;
- b) Determinar a preferência da fosfatase ácida entre os fosfoaminoácidos fosfoserina e fosfotirosina e a modulação da enzima por inibidores;
- c) Identificar os resíduos de tirosina fosforilada em proteínas de vitelo durante a embriogênese inicial;
- d) Caracterizar e localizar a atividade peptidásica durante a embriogênese inicial de *P. americana*;
- e) Caracterizar as atividades tipo cisteíno protease e serino protease, bem como a degradação do vitelo mediado por estas enzimas;
- f) Determinar a influência da fosfatase ácida na proteólise ácida de vitelo de *P. americana in vitro*.

2.2.2 Parte 2: *A. gemmatalis*

- a) Caracterizar a atividade fosfatásica ácida durante a embriogênese de *A. gemmatalis*;
- b) Purificar parcialmente a fosfatase ácida presente em ovos de 0 a 24 horas;
- c) Caracterizar detalhadamente a fosfatase ácida de *A. gemmatalis*, determinando os parâmetros cinéticos de funcionamento da enzima;
- d) Determinar a classe da fosfatase ácida de *A. gemmatalis* através de inibidores específicos;
- e) Identificar a preferência entre substratos fosforilados pela enzima, incluindo fosfoaminoácidos e polímeros de fosfato;
- f) Demonstrar a proteólise *in vivo* e identificar as proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina durante a embriogênese de *A. gemmatalis*;
- g) Determinar a influência da fosfatase ácida na proteólise ácida de vitelo de *A. gemmatalis in vitro*.

3 Material e Métodos

3.1 Reagentes

Z-Phe-Arg-AMC, Sephadex G-50, E-64, pNPP, SBTI, Pepstatina A, fosfotirosina, fosfoserina, fosfotreonina, BCIP, cafeína, α -naftil fosfato, ATP, PPi, β -glicero fosfato, Poli P 3 e Poli P 75 foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). PMSF, CA 074, DTT e Aprotinina foram adquiridos da Calbiochem-Novabiochem (La Jolla, CA, USA). Filtros Centricon Ultrafree-MC 30 (poro de 30 kDa) foram obtidos da Millipore Co. (Billerica, MA, USA). Anti-fosfotirosina PY20 ou PY99 (monoclonal); Anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina e anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (ambos produzidos em cabra) foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Todos os outros reagentes usados foram de grau analítico ou superior.

3.2 Insetos

3.2.1 *Periplaneta americana*

As ootecas de *P. americana* foram provenientes de uma colônia mantida em laboratório, à temperatura e umidade ambientes. Os animais são alimentados com ração para cães e água *ad libitum* em aquários de vidro. As ootecas foram coletadas a partir de placas de isopor colocadas dentro dos aquários no intervalo de tempo de 24 horas após a postura (dia 0 após a postura). Foram incubadas nas mesmas condições da colônia durante o

desenvolvimento embrionário (duração de 30 a 33 dias após a postura, até a eclosão das ninfas) (LENOIR-ROUSSEAUX *et al.*, 1970).

3.2.2 *Anticarsia gemmatalis*

Os ovos de *A. gemmatalis* foram provenientes de uma colônia mantida em laboratório. As lagartas e os animais adultos são alimentados utilizando dieta artificial (HOFFMAN-CAMPO *et al.*, 1985). A colônia é mantida a 25 ± 3 °C, 70 ± 10 % de umidade relativa e fotoperíodo de 14:10 horas (luz/escuro). As fêmeas adultas são mantidas em caixas de plástico, recobertas internamente por folhas de papel branco, onde as fêmeas fazem a postura de ovos durante o período escuro. As folhas de papel foram retiradas a cada hora (ovos de 0 h) ou no dia seguinte (ovos de 0 a 24 horas). O desenvolvimento embrionário ocorreu no papel, nas mesmas condições ambientais da colônia, sendo retirados por filtração após umedecer os papéis e desprender os ovos suavemente. O desenvolvimento embrionário tem duração média de 65 a 72 horas após a postura, até a eclosão da larva (observação de laboratório).

3.3 Metodologia utilizada nos experimentos realizados em ootecas de *P. americana*

3.3.1 Preparação de amostras de ootecas de *P. americana* para atividade fosfatásica ácida

Duas ootecas coletadas de cada dia da embriogênese inicial testado (de 0 a 12 dias após a postura) foram lavadas em água destilada e homogeneizadas utilizando um homogeneizador de plástico em tubos *ependorf* em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,0, contendo DTT 10 mM e EDTA 10 mM, na proporção de 300 µL de tampão/ ooteca. As amostras foram centrifugadas a 20.000 *g* a 4 °C por 5 minutos, e este procedimento foi

repetido por duas vezes. Os sobrenadantes foram utilizados como amostras de fosfatase ácida, e mantidos a -20 °C até a realização das análises. Para os experimentos de proteólise *in vitro*, ootecas do dia 6 após a postura foram preparadas conforme descrito acima, e o sobrenadante foi concentrado em filtro Centricon Ultrafree-MC-30 (poro de 30 kDa) a 4300 *g* por 2 horas a 4 °C. A amostra retida foi utilizada e denominada AcP.

3.3.2 Preparação de amostras de ootecas de *P. americana* para *western blotting* anti-fosfotirosina

Ootecas coletadas de cada dia da embriogênese inicial testado (0, 1, 3, 6, 10 e 15 dias após a postura) foram lavadas em água destilada e homogeneizadas em tampão Hepes 30 mM, pH 7,5, contendo inibidores de proteases (SBTI 0,5 µg /µL, PMSF 2 mM, Pepstatina A 7 µM, E-64 30 µM) (concentrações finais), na proporção de 300 µL tampão/ ooteca. As amostras foram centrifugadas a 20.000 *g* a 4 °C por 5 minutos, e este procedimento foi repetido por duas vezes. Os sobrenadantes foram preparados com tampão de amostra desnaturante (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10 %, β-mercaptoetanol 5 %, azul de bromofenol 0,012 %) e utilizados como amostras para *western blotting*.

3.3.3 *Western blotting* anti-fosfotirosina durante embriogênese inicial de *P. americana*

As amostras preparadas anteriormente foram separadas por eletroforese SDS-PAGE (12,5 %), na quantidade de 50 µg de proteína/poço, sob corrente constante a 25 mA, 2 horas. As amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose a 200 mA por 2 horas a 4°C em tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3. A membrana foi bloqueada *overnight* utilizando BSA 2 % em TBS-Tween 20 (0,1 %). O tampão foi utilizado nas lavagens da

membrana e diluições dos anticorpos. Em seguida, foi incubada com o anticorpo monoclonal PY-99 ou PY-20 (anti-fosfotirosina) (1:1000) por 4 horas, a temperatura ambiente. Após, a membrana foi lavada por 5 vezes e incubada por 2 horas com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (1:5000). Após, as proteínas marcadas foram reveladas utilizando a solução BCIP (0,016 %) – NBT (0,033 %). Todas as incubações foram realizadas sob agitação.

3.3.4 Preparação de amostras de ootecas de *P. americana* para atividade peptidásica

Ootecas coletadas de cada dia da embriogênese inicial testado (de 0 a 10 dias após a postura) foram lavadas em água destilada e homogeneizadas suavemente, em salina tamponada com Hepes (sem adição de CaCl_2) contendo Hepes 5 mM, sacarose 5 mM, KCl 3,1 mM, NaCl 214 mM, pH 7,2 (HBCS modificada) (BLAGBURN *et al.*, 1987), na proporção de 200 μL / ooteca. Estas amostras foram centrifugadas a 400 g por 2 minutos a 4 °C, e os *pellets* enriquecidos em grânulos de vitelo foram suspensos na mesma solução. Estas amostras foram centrifugadas novamente nas mesmas condições e os *pellets* foram ressuspensos no tampão apropriado, de acordo com o experimento em questão. Para determinação da atividade peptidásica durante a embriogênese inicial, foi utilizado tampão fosfato 50 mM, NaCl 0,2 M, e EDTA 5 mM, pH 6,5. Para preparações em pH ácido, foi utilizado tampão acetato de sódio 50 mM, NaCl 0,2 M, e EDTA 5 mM, pH 5,0. Para preparações em pH neutro, foi utilizado tampão Hepes 50 mM, NaCl 0,2 M, e EDTA 5 mM, pH 7,0. Todas as amostras foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento em N_2 líquido, seguido de centrifugação a 20.000 g por 30 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados e utilizados como amostras de protease. Para os experimentos de proteólise *in vitro*, as preparações de protease a partir de ootecas de dia 6

foram concentradas em filtro Centricon Ultrafree-MC-30 a 4300 *g* por 2 horas a 4 °C, e as amostras retidas no filtro foram utilizadas nos ensaios de incubação para observação da proteólise *in vitro*.

3.3.5 Determinação da atividade fosfatásica específica em ootecas de *P. americana*

A hidrólise do substrato sintético *p*-nitrofenil fosfato (*p*NPP) foi medida a 44 °C em meio de reação contendo *p*NPP 4 mM, tampão acetato de sódio 20 mM, pH 5,0 DTT 1 mM e EDTA 1 mM. As amostras testadas foram adicionadas ao meio de reação na concentração final de proteínas 0,1 mg/mL. O volume de reação foi 150 µL, e os controles não tiveram adição de amostra. As reações foram paralisadas após 60 minutos com a adição de NaOH 1 N (concentração final). A quantidade de *p*-nitrofenol (*p*NP) liberado foi calculado através da leitura da absorbância a 405 nm em leitor de microplacas (Thermomax, Molecular Devices, Orleans Sunnyvale, CA, USA). O coeficiente de extinção molar para o íon *p*-nitrofenolato ($1,75 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) (SHENG *et al.*, 1993) foi empregado para a quantificação do *p*NP em todos os experimentos de dosagem de *p*NP formado. Amostras dos dias 6 e 10 foram testadas na presença dos inibidores NaF (inibidor de fosfohidrolases) 10 mM; Tartarato de Na⁺ e K⁺ (inibidor de fosfatases ácidas) 1 e 10 mM; Molibdato de amônio (inibidor de tirosinas fosfatases) 0,1 e 1 mM.

3.3.6 Determinação da atividade fosfatásica contra fosfoaminoácidos em ootecas de *P. americana*

As preparações de ootecas dos dias 6 e 10 para fosfatase ácida foram testadas contra os fosfoaminoácidos fosfoserina e fosfotirosina. As atividades foram ensaiadas em meio de

reação contendo 4 mM de cada fosfoaminoácido, acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, DTT 1 mM e EDTA 1 mM. As amostras foram adicionadas na concentração final de proteínas de 0,1 mg/mL. As reações foram medidas em intervalos de tempo diferentes (0, 30, 60 e 75 minutos). O volume de reação foi 160 µL, os controles não tiveram adição das amostras ou do substrato. A reação foi interrompida com a adição de 40 µL de TCA 50 % gelado. A dosagem de fosfato livre (Pi) foi realizada colorimetricamente, adicionando 80 µL da solução de molibdato (molibdato de amônio 27 mM, ácido sulfúrico 11 %) e 40 µL de solução redutora (1-amino 2-naftol 4-sulfônico 0,2 %, sulfito de sódio 0,4 %, bissulfito de sódio 13 %). Após 15 minutos, a reação de revelação foi lida a 660 nm em leitor de microplacas. A concentração de Pi liberado de cada fosfoaminoácido testado foi determinada através da curva padrão de fosfato (FISKE *et al.*, 1925).

3.3.7 Determinação da atividade peptidásica específica em ootecas de *P. americana*

Todos os ensaios de protease foram realizados utilizando o substrato fluorogênico Z-Phe-Arg-AMC. Os testes com as diferentes amostras de ootecas foram feitos incubando as amostras de ootecas de diferentes dias, a temperatura ambiente, em meio de reação contendo NaCl 0,2 M, EDTA 5 mM, DTT 2,5 mM e Z-Phe-Arg-AMC 5 µM. Os tampões utilizados (todos a 50 mM), dependendo do experimento foram: fosfato, pH 6,5 (atividade peptidásica durante a embriogênese inicial); acetato de sódio, pH 5,0 (atividade tipo-cisteína protease); Hepes pH 7,0 (atividade tipo-serina protease). O volume de reação foi 1 mL, tendo de 10 a 20 µg de proteína da amostra, dependendo do experimento. A hidrólise do substrato foi monitorada em fluorímetro (Hitachi F 4500) nos comprimentos de onda 380 nm (excitação) e 440 nm (emissão). As velocidades antes e após a adição dos inibidores foram obtidas por regressão linear da curva temporal de hidrólise do substrato (LIMA *et al.*, 2001). Os

inibidores utilizados foram E-64 (inibidor de cisteíno proteases) 30 μ M, CA 074 (inibidor de catepsina B) 5 μ M ou aprotinina (inibidor de serino proteases da família S1) 10 μ g/mL, adicionados após determinado intervalo de tempo de reação.

3.3.8 Ensaio de ativação ácida da atividade cisteíno proteásica

A amostra de ooteca de dia 3 após a postura, preparada em pH 7,0 conforme descrito anteriormente foi pré-incubada em intervalos de tempo (0 a 120 minutos), em tampão acetato de sódio 0,1 M, NaCl 0,2 M, EDTA 5 mM, pH 5,0 (2 μ g de proteína/ μ L de tampão). Imediatamente após a pré-incubação, a atividade peptidásica é determinada nestas amostras seguindo os procedimentos descritos na seção 3.3.7, em pH 5.0.

3.3.9 Localização das peptidases ativas em grânulos de vitelo (YG) de *P. americana*

Ootecas do dia 6 após a postura foram homogeneizadas suavemente em HBCS modificada, em temperatura ambiente. O conteúdo decantou por 5 minutos, e os *pellets* contendo YG (aproximadamente 10 μ L) foram incubados no seguinte meio de reação: DTT 2,5 mM, PPi 2,5 mM, ATP 0,5 mM, MgCl₂ 3 mM, Z-Phe-Arg-AMC 0,2 mM (UCHIDA *et al.*, 2001). Após, as amostras foram aderidas em lâminas de vidro cobertas com Poli-L lisina e observadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axioplan) equipado com set de filtro para DAPI. Os grupos controle foram observados sem o substrato ou na presença de inibidores de protease E-64 30 μ M e aprotinina 10 μ g/ mL.

3.3.10 Preparação da fração enriquecida em vitelina (VT)

Ootecas de dia 0 foram homogeneizadas em tampão Hepes 20 mM, pH 7,5. A preparação foi centrifugada a 20.000 g por 5 minutos a 4 °C, este procedimento foi repetido por duas vezes. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de Penefsky, preparada a partir de uma seringa de insulina preenchida e empacotada com a resina de filtração em gel Sephadex G-50 (PENEFSKY, 1977). A coluna contendo a preparação foi centrifugada por 2 minutos a 1.400 g. O volume coletado após a centrifugação foi concentrado sob vácuo (Savant Instruments, Inc.) por 2 horas em baixa temperatura. Esta fração enriquecida em proteínas de alto peso molecular, incluindo as vitelinas, foi utilizada como substrato para ensaios de proteólise *in vitro*.

3.3.11 Ensaios de degradação de VT de *P. americana* *in vitro*

Os ensaios para observar a degradação de vitelinas foram realizados a partir da incubação da fração enriquecida em VT (1,6 mg de proteína) a temperatura ambiente com a preparação ácida ou neutra de ootecas de dia 6 (0,8 mg de proteína), descritas anteriormente (acetato de sódio pH 5,0 ou Hepes, pH 7,0, ambos a 50 mM, contendo NaCl 0,2 M e EDTA 5 mM). Alíquotas foram coletadas em intervalos de tempo de incubação. As reações nas alíquotas foram interrompidas pela adição de tampão de amostra (mesmo descrito na seção 3.3.2) e fervidas por 5 minutos. 80 µg de proteína foram aplicadas em eletroforese em SDS-PAGE (12,5 %), coradas por Azul de Coomassie R. Para observar a correlação entre a fosfatase ácida e a enzima tipo-cisteíno protease, a fração enriquecida em VT (0,2 mg) foi pré-incubada com a amostra AcP (0,07 mg) por 1 h a temperatura ambiente, seguida pela adição da preparação ácida (0,18 mg) ao meio de reação. Alíquotas de intervalos de tempo de incubação foram obtidas e processadas para SDS-PAGE como descrito acima. Os controles foram realizados da seguinte forma: Para inibição da proteólise ácida, foi incluído E-64 30

μM no meio de reação; para inibir a proteólise neutra aprotinina $10\ \mu\text{g/mL}$ foi adicionada no meio de reação; para inibir a AcP durante a pré-incubação, foram adicionados molibdato $1\ \text{mM}$, tartarato $10\ \text{mM}$ e NaF $10\ \text{mM}$ ao meio de reação, e adicionalmente a amostra AcP foi fervida por 5 minutos antes da pré-incubação.

3.4 Metodologia utilizada nos experimentos realizados em ovos de *A. gemmatalis*

3.4.1 Preparação de ovos para determinação da atividade fosfatásica de *A. gemmatalis*

Aproximadamente $50\ \mu\text{L}$ de ovos de 0 a 24 horas congelados foram homogeneizados em tubos *ependorf* em tampão Hepes $0,1\ \text{M}$, pH 7,0 contendo inibidores de protease (aprotinina $10\ \mu\text{g/mL}$, PMSF $2\ \text{mM}$, Pepstatina A $7\ \mu\text{M}$, E-64 $30\ \mu\text{M}$) (concentrações finais), na proporção de $400\ \mu\text{L}$ de tampão/ tubo/ amostra, utilizando um homogeneizador de plástico. As amostras foram centrifugadas a $20.000\ \text{g}$ a 4°C por 10 minutos, e este procedimento foi repetido por duas vezes. Os sobrenadantes foram utilizados como amostras no ensaio de determinação de pH ótimo de funcionamento para a atividade fosfatásica. Para verificar a melhor temperatura de atividade, os ovos foram preparados seguindo os mesmos procedimentos adotados anteriormente, sendo o tampão de homogeneização acetato de sódio $0,1\ \text{M}$, pH 5,5, DTT $10\ \text{mM}$, EDTA $10\ \text{mM}$, e inibidores de protease já descritos acima, na proporção de $200\ \mu\text{L}$ de tampão/ tubo/ amostra. A amostra utilizada para a purificação parcial foi preparada seguindo este mesmo procedimento.

3.4.2 Determinação de pH e temperatura ótimos de funcionamento da atividade fosfatásica em ovos de *A. gemmatalis*

Para determinar o pH ótimo para a fosfatase, a hidrólise do *p*NPP foi medida a 37°C em meio de reação contendo *p*NPP 4 mM, e os tampões utilizados foram os seguintes: acetato de sódio nos pHs 3,5 a 5,5; citrato de sódio em pH 6,0; Hepes nos pHs 6,5 a 7,5; Tris-HCl nos pHs 8,0 a 9,0. Todos estavam na concentração final de 0,1 M, contendo DTT 10 mM e EDTA 10 mM. Para a curva de temperatura, o tampão de reação utilizado foi o acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5 contendo DTT 10 mM e EDTA 10 mM, e as temperaturas de reação utilizadas no ensaio foram: 4 °C, 28 °C, 37 °C, 45 °C, 56 °C e 70 °C. As amostras testadas foram adicionadas ao meio de reação na concentração final de proteínas 0,2 mg/mL. O volume de reação foi 150 µL, e os controles não tiveram adição de amostra. As reações foram paralisadas após 60 minutos com a adição de NaOH 1 N (concentração final). A quantificação do *p*NP liberado seguiu os mesmos procedimentos descritos para atividade fosfatásica em ootecas de *P. americana* (seção 3.3.5).

3.4.3 Preparação de ovos para determinação da atividade fosfatásica ácida durante a embriogênese de *A. gemmatalis*

Ovos coletados (aproximadamente 50 µL de ovos por grupo) em intervalos de tempo durante a embriogênese (0, 12, 16, 21, 35, 40, 46, 62 horas após a postura) foram preparados seguindo o procedimento descrito anteriormente na seção 3.4.1 utilizando acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5, DTT 10 mM, EDTA 10 mM e inibidores de protease, na proporção de 100 µL de tampão/ tubo/ amostra.

3.4.4 Atividade fosfatásica ácida durante a embriogênese de *A. gemmatalis*

As amostras de ovos coletados durante a embriogênese, preparadas anteriormente foram testadas para atividade fosfatásica ácida. O meio de reação foi constituído de acetato de sódio 0,1 M pH 5,5, DTT 10 mM, EDTA 10 mM, pNPP 4 mM e 0,05 mg/mL de proteína de cada amostra. O volume de reação foi 150 μ L, e os controles não tiveram adição de amostra. As reações foram paralisadas após 60 minutos com a adição de NaOH 1 N (concentração final). A quantificação do pNP formado seguiu os mesmos procedimentos descritos para atividade fosfatásica em ootecas de *P. americana* (seção 3.3.5).

3.4.5 Purificação parcial da fosfatase ácida em ovos de *A. gemmatilis*

Aproximadamente 5 mL de ovos de 0 a 24 horas congelados foram lavados em água destilada e homogeneizados em grau de porcelana utilizando pistilo de vidro, em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5, DTT 10 mM, EDTA 10 mM (5 mL de tampão). O homogenato total foi centrifugado a 20.000 *g* por 10 minutos, a 4 °C, e este procedimento foi repetido por duas vezes. O sobrenadante foi utilizado como amostra para a concentração em filtro Centricon Ultrafree-MC-30 a 1400 *g* por 4 horas a 4 °C. Alíquotas de todas as etapas foram testadas para atividade fosfatásica, e a fração retida no filtro concentrou a atividade fosfatásica. Esta amostra foi aplicada na coluna cromatográfica de filtração em gel Superose 6HR acoplada ao sistema de HPLC Shimadzu. A coluna foi equilibrada em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5 contendo NaCl 0,15 M, e este tampão foi utilizado na corrida. O fluxo utilizado foi 0,5 mL/minuto, em 60 minutos de corrida. As frações (0,5 mL) foram coletadas e avaliadas para o conteúdo de proteínas medindo-se a absorbância a 280 nm, e testadas para atividade fosfatásica contra o pNPP 4 mM (30 μ L da fração), usando o tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5, DTT 10 mM, EDTA 10 mM, e os procedimentos descritos na seção 3.4.4. As frações com maior atividade (30 a 32) foram reunidas e concentradas sob vácuo

(Savant Instruments, Inc.) por 2 horas em baixa temperatura, e a amostra final denominada AcP. Alíquotas de cada etapa foram separadas por eletroforese de SDS-PAGE (10 %) a 25 mA, por 2 horas, aplicando 7 µg de proteína no gel. Para visualizar as proteínas da fração 31 (pico de atividade), 30 µL foram precipitados em acetona gelada: 4:1 acetona gelada:amostra, mantidos a -20 °C por 20 minutos, centrifugados em seguida a 20.000 g por 15 minutos a 4 °C, descartando-se o sobrenadante e suspendendo o *pellet* em 10 µL de água destilada + 10 µL de tampão de amostra. As proteínas foram visualizadas pelo método de prata (DUNN *et al.*, 1994).

3.4.6 Determinação de pH ótimo para AcP de *A. gemmatalis*

A fração AcP obtida após a purificação parcial foi testada para determinação de pH ótimo de funcionamento. Os mesmos tampões para a varredura de pH no extrato de ovos foram utilizados. O meio de reação foi formado por tampão de reação 0,1 M, DTT 10 mM, EDTA 10 mM, pNPP 4 mM, 4 µL de AcP (0,24 a 0,32 µg de proteína). A reação ocorreu a 37 °C, por 60 minutos. A dosagem de pNP formado foi determinada conforme descrito anteriormente (seção 3.3.5).

3.4.7 Curva temporal de atividade da AcP de *A. gemmatalis*

A amostra AcP foi testada para atividade fosfatásica variando-se os intervalos de tempo de reação, entre 0 e 4 horas. O meio de reação foi formado por tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,0, DTT 10 mM, EDTA 10 mM, pNPP 4 mM, e 4 µL de AcP. Os controles não tiveram a adição da enzima. A reação foi realizada a 37 °C, e foi interrompida com a adição

de NaOH 1 N (concentração final). A quantificação de *p*NP formado foi realizada conforme descrito anteriormente (seção 3.3.5).

3.4.8 Curva de inativação térmica da AcP de *A. gemmatalis*

Para determinar a susceptibilidade térmica da AcP, a amostra foi pré-incubada em três temperaturas diferentes (37 °C, 55 °C e 70 °C) em intervalos de tempo (de 0 a 45 minutos), no volume de 10 µL de amostra/ tempo/ temperatura. Após a pré-incubação, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 4 °C, a 20.000 *g*. 4 µL de cada sobrenadante foram ensaiados em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,0 DTT 10 mM, EDTA 10 mM e *p*NPP 4 mM a 37°C por 60 minutos. A reação foi interrompida após a adição de NaOH 1 N (concentração final). A quantificação de *p*NP formado foi realizada conforme descrito previamente (seção 3.3.5).

3.4.9 Determinação do peso molecular da AcP de *A. gemmatalis*

Aplicaram-se 5 proteínas-padrão de peso molecular (quimotripsinogênio 25 kDa; ovoalbumina 40 kDa; BSA 66 kDa; aldolase 158 kDa; tiroglobulina 669 kDa) separadamente na coluna cromatográfica de filtração em gel Superose 6HR acoplada ao sistema de HPLC Shimadzu. O fluxo e tampão de equilíbrio e corrida foram os mesmos utilizados para a purificação parcial da AcP. Os tempos de retenção dos padrões foram obtidos após absorbância a 280 nm. O logaritmo do peso molecular de cada padrão foi correlacionado ao respectivo tempo de retenção. A regressão linear dos pontos foi determinada, e a equação obtida após a regressão foi $y = -0,1287x + 5,643$. Através da equação, o tempo de retenção equivalente ao pico de atividade da AcP foi utilizado para a determinação do peso molecular da enzima.

3.4.10 Classificação da AcP através de inibidores específicos

A atividade da AcP foi realizada na presença de inibidores específicos de fosfatases em diferentes concentrações: Levamisol e tetramisol (inibidores de fosfatases alcalinas) 1 e 10 mM; NaF e tartarato de Na^+ e K^+ (inibidores de fosfatases ácidas) 1 e 10 mM; fosfato de potássio (Pi) (inibidor competitivo de fosfatases) 1 e 10 mM; cafeína (inibidor de fosfodiesterase) 0,5 e 5 mM; molibdato de amônio 0,05, 0,1 e 1 mM, ortovanadato de sódio 0,05 e 0,1 mM, sulfato de cobre 0,1 e 1 mM (inibidores de tirosina fosfatase). O meio de reação continha tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,0, DTT 10 mM e EDTA 10 mM, exceto nos ensaios com os inibidores vanadato e sulfato de cobre (sem DTT e EDTA), pNPP 4 mM e 5 μL de AcP (0,3 a 0,4 μg de proteína). Os controles não tiveram a adição da enzima. As reações foram realizadas a 37 °C por 60 minutos e interrompidas após a adição de NaOH 1 N (concentração final). A quantificação de pNP formado foi realizada conforme descrito previamente (seção 3.3.5).

3.4.11 Determinação dos parâmetros cinéticos da AcP

A amostra AcP (4 μL) foi ensaiada em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,0, DTT 10 mM, EDTA 10 mM e pNPP em concentrações diferentes, a 37 °C por 60 minutos, seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente. Os dados de concentração de substrato e as atividades correspondentes foram utilizados para a construção do gráfico duplo-recíproco (geração da equação de Lineweaver-Burk), com o propósito de determinar os parâmetros K_m aparente e V_{max} , a partir dos interceptos. O intercepto em Y correspondeu ao valor de $1/V_{\text{max}}$, e o intercepto em X ao $-1/K_m$.

3.4.12 Preferência da AcP entre substratos fosforilados

A amostra AcP (7 μ L) foi testada a 37 °C em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,0, NaCl 0,2 M, EDTA 5 mM e contra diferentes substratos fosforilados nas concentrações finais: fosfotirosina, fosfoserina, fosfotreonina, α -naftil fosfato, β -glicero fosfato, ATP (4 mM); PPI (2 mM), Poli P-3 (1,3 mM) e Poli P-75 (52 μ M). O volume de reação foi 160 μ L. A reação foi realizada em 60 minutos ou, no experimento temporal, em intervalos de tempo de 0 a 120 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 40 μ L de TCA 50 %. A dosagem do Pi liberado foi realizada seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente (seção 3.3.6).

3.4.13 SDS-PAGE e *western blotting* anti-fosfotirosina durante a embriogênese de *A. gemmatalis*

As amostras de ovos coletados durante a embriogênese, preparados em pH 5,5 (seção 3.4.3) foram misturadas ao tampão de amostra descrito previamente (seção 3.3.2), e utilizadas para observação da proteólise *in vivo*. 4 μ g de proteína de cada amostra foram separadas por eletroforese em SDS-PAGE (10 %) a 25 mA, e as proteínas foram coradas pelo método de prata. Para observação de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina, as amostras de embriogênese (15 μ g de proteína) foram aplicadas em eletroforese em SDS-PAGE (10 %) e transferidas para membrana de nitrocelulose seguindo as mesmas etapas descritas anteriormente na seção 3.3.3. As etapas de bloqueio e incubações da membrana com os anticorpos foram idênticas às utilizadas para ootecas de *P. americana*, exceto o anticorpo secundário; neste caso utilizou-se anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (1:5000),

e a revelação foi feita a partir de um kit de quimioluminescência (sistema ECL Thermo Fisher Scientific Inc. – Rockford, IL, USA), seguindo as instruções do fabricante.

3.4.14 Atividade peptidásica em ovos de *A. gemmatalis*

Ovos de 0 a 24 horas congelados foram homogeneizados em tampão Hepes 0,1 M pH 7,0 ou em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0, ambos contendo NaCl 0,2 M e EDTA 5 mM, na proporção de 50 µL de ovos/ amostra. Os extratos foram centrifugados a 20.000g a 4°C por 10 minutos, e este procedimento foi repetido duas vezes. Os sobrenadantes foram utilizados como amostras no ensaio de hidrólise de Phe-Arg-AMC, a 25°C, seguindo os mesmos procedimentos descritos para a atividade peptidásica em ootecas de *P. americana* (seção 3.3.7). As atividades foram expressas como produção de unidades arbitrárias de fluorescência (a.u.) em função do curso temporal da reação em segundos. As velocidades apontadas no gráfico foram determinadas seguindo o procedimento descrito anteriormente (seção 3.3.7).

3.4.15 Preparação de ovos de 0 h de *A. gemmatalis* como substrato da proteólise *in vitro*

Ovos de 0 h coletados (aproximadamente 100 µL de ovos) foram homogeneizados em tampão Hepes 0,1 M, pH 7,0, centrifugados 20.000 g a 4 °C por 10 minutos, sendo este procedimento repetido por duas vezes. O sobrenadante foi utilizado como amostra para a observação da proteólise *in vitro* (YP).

3.4.16 Influência da AcP na proteólise *in vitro* das proteínas de vitelo de *A. gemmatalis*

A amostra YP (30 µg de proteína) foi incubada em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5, DTT 10 mM, EDTA 10 mM durante intervalos de tempo (0, 4 e 24 horas) com a amostra AcP (1 µg de proteína), a 37 °C. Os controles foram feitos na presença de inibidores de fosfatase (NaF 10 mM, tartarato 10 mM, molibdato 1 mM) e/ ou inibidores de protease (E-64 30 µM, aprotinina 10 µg/ mL, pepstatina A 7 µM). Após os períodos de incubação, as amostras foram aplicadas em eletroforese em SDS-PAGE (10 %), a 25 mA por 2 horas. Após a corrida, as proteínas foram visualizadas por Azul de Coomassie R.

3.5 Determinação da concentração de proteínas e estatística

A concentração de proteína em todas as amostras utilizadas nesta tese foi obtida de acordo com o método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), utilizando BSA 0,1 % como padrão. Todos os gráficos e testes estatísticos (One-Way ANOVA testes de Tukey e Dunnet) apresentados nesta tese foram gerados utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.00 para Windows.

4 Resultados

4.1 Parte 1 – *P. americana*

4.1.1 Caracterização da atividade fosfatásica durante a embriogênese inicial de *P. americana*

Estudos prévios mostram a presença de uma fosfatase ácida em ovócitos de *P. americana*, localizada em grânulos de vitelo após a incorporação nestas organelas durante a ovogênese, e que apresentou preferência por resíduos de tirosina fosforilada (OLIVEIRA e MACHADO, 2006) (**Anexo 01**). Esta enzima teve atividade máxima nas condições de pH entre 3,5 e 4,0 e 44 °C de temperatura. A presença desta enzima em YG motivou a caracterização da atividade fosfatásica também durante a embriogênese deste inseto, utilizando as mesmas condições de funcionamento (pH e temperatura).

O desenvolvimento embrionário de *P. americana* tem duração média de 32 dias da postura da ooteca até a emergência das ninfas (Lenoir-Rousseaux e Lender, 1970). Inicialmente a atividade fosfatásica ácida foi detectada utilizando o substrato *p*-nitrofenil fosfato (*p*NPP) durante o período inicial da embriogênese de *P. americana*, a partir de extratos de ootecas coletadas de 0 a 12 dias após a postura. Não foi detectada atividade fosfatásica significativa nos primeiros dias após a postura. A partir do dia 5, foi detectado um aumento na atividade, com um pico no dia 6 que se manteve até o dia 10 após a postura (**Figura 08**). A atividade diminuiu a níveis basais após o dia 12 até a emergência das ninfas (dias 30 a 33 após a postura).

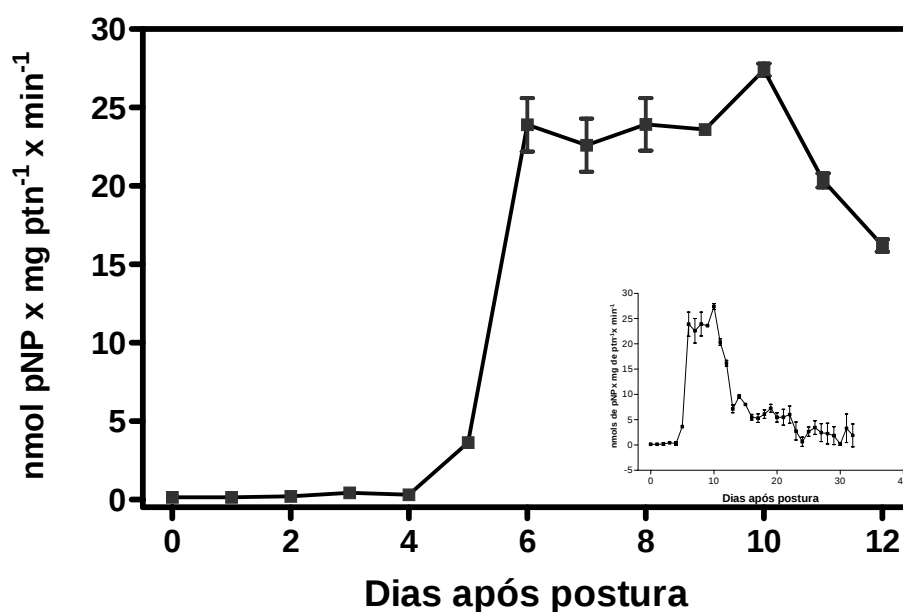


Figura 08: Atividade fosfatásica ácida durante a embriogênese inicial de *P. americana*. Duas ootecas por cada dia de embriogênese (de 0 a 12 dias) foram preparadas em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,0, DTT 10 mM e EDTA 10 mM, conforme descrito em Material e Métodos. As amostras foram ensaiadas contra *pNPP* a 44 °C por 60 minutos, (0,1 mg/mL de proteína). Os resultados foram expressos em nmol de *pNP* liberado x mg ptn⁻¹ x min⁻¹. Cada ponto representa a atividade média ± desvio padrão de 02 experimentos independentes, feitos em triplicata. O gráfico inserido (*inset*) representa o perfil da atividade fosfatásica durante a embriogênese total do inseto.

Devido à diminuição dos níveis da atividade fosfatásica ácida, resolveu-se estudar a embriogênese inicial (de 0 a 10 dias após a postura) para a caracterização de enzimas envolvidas com a mobilização do vitelo deste inseto.

Inicialmente foi determinada a preferência entre os fosfoaminoácidos fosfotirosina e fosfoserina como substratos, separadamente entre os dias 6 e 10 (**Figura 09**). No extrato ácido do dia 6, houve liberação de fosfato apenas a partir de fosfotirosina (**Figura 09 A**), semelhante ao observado extrato ácido de ovário deste inseto (durante a ovogênese) (OLIVEIRA E MACHADO, 2006). No extrato do dia 10, tanto fosfotirosina quanto fosfoserina foram defosforilados, indicando o aparecimento de uma nova classe de fosfatase embrionária (**Figura 09 B**).

As amostras dos dias 6 e 10 foram testadas contra inibidores clássicos de fosfatase (**Tabela 01**), usando o pNPP como substrato. O NaF (10 mM), inibidor clássico de fosfatase ácida (ARAÚJO *et al.*, 1976), inibiu igualmente entre os dois dias, diminuindo a atividade específica para cerca de 15 % em relação aos controles (sem o inibidor). O inibidor de fosfatase lisosomal tartarato de Na^+ e K^+ (1 e 10 mM), diminuiu eficientemente a atividade no dia 6 (atividade residual de 3,9 %), entretanto no dia 10, esta inibição foi menos efetiva, a atividade residual foi de 12,5 % (usando a concentração de 10 mM). O molibdato de amônio (0,1 e 1 mM) foi capaz de inibir a atividade de forma similar ao tartarato, diminuindo as atividades aos mesmos percentuais nas amostras dos dias 6 e 10 após a postura. Estes resultados reforçam a hipótese da presença de uma tirosina fosfatase ácida no dia 6 e de mais de uma classe de fosfatase ácida no dia 10 após a postura.

A **Figura 10** mostra o perfil das proteínas de vitelo durante a embriogênese inicial de *P. americana*, bem como as proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina nestas amostras. Foram observadas subunidades de VT-1 e VT-2 sofrendo proteólise parcial (**Figura 10, painel à esquerda**); algumas das proteínas de vitelo apresentaram fosforilação em resíduos de

tirosina no início da embriogênese, como observado no *western blotting* anti-fosfotirosina mostrado nesta figura (**painel à direita**). As amostras de 10 e 15 dias aparentemente não tinham mais resíduos de tirosina fosforilada (painel à direita, poços 10 e 15). Este resultado sugere a existência de defosforilação *in vivo* destes resíduos nestas proteínas, ou ainda a proteólise diminuindo os níveis de tirosina fosforilada.

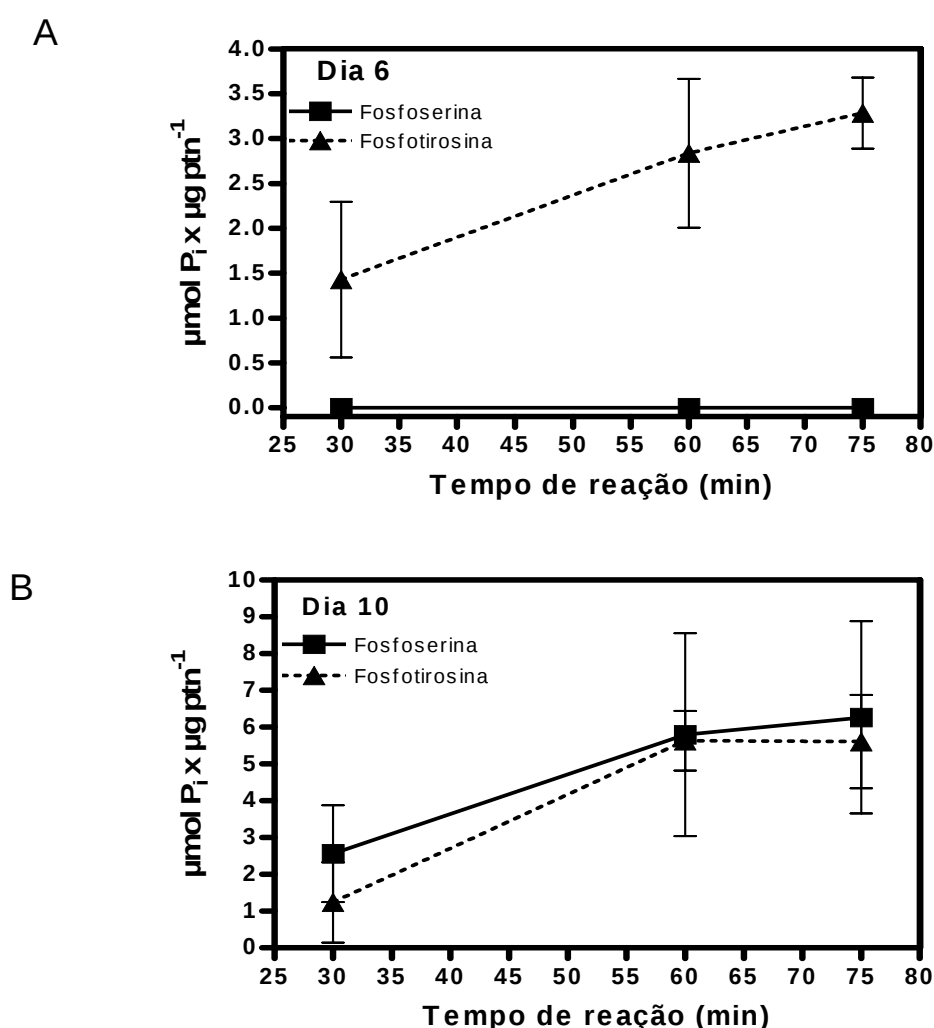


Figura 09: Atividade fosfatásica ácida contra fosfoaminoácidos em ootecas de *P. americana*. As amostras de ootecas dos dias 6 (**A**) e 10 (**B**) após a postura foram testadas contra fosfoserina e fosfotirosina como substrato (4 mM). As reações foram realizadas em intervalos de tempo a 44 °C, conforme descrito em Material e Métodos. Os resultados foram expressos em μmol de P_i liberado $\times \mu\text{g ptn}^{-1}$. Cada ponto representa a atividade média $\pm$ desvio padrão de 02 experimentos independentes, feitos em triplicata.

Tabela 01. Modulação da atividade fosfatásica ácida em ootecas de *P. americana* por inibidores

Grupos	Dia 6	Dia 10
Controle (% de atividade)	2,84 ± 0,53 (100)	13,3 ± 0,75 (100)
Molibdato 0,1 mM	1,78 ± 0,21 (62,7)	5,39 ± 0,44 (40,5)
Molibdato 1 mM	0,11 ± 0,21 (3,9)	1,66 ± 0,50 (12,5)
NaF 10 mM	0,43 ± 0,20 (15,1)	1,88 ± 0,39 (14,1)
Tartarato de Na+ K+1 mM	1,54 ± 0,35 (54,2)	4,97 ± 0,66 (37,4)
Tartarato de Na+K+ 10 mM	0,11 ± 0,22 (3,9)	1,49 ± 0,20 (11,2)

Amostras de ootecas dos dias 6 e 10 de embriogênese foram testados contra o pNPP na presença de diferentes inibidores de fosfatase ácida. O controle representa a atividade sem inibidor. Os resultados foram expressos em nmol de pNP liberado x mg ptn⁻¹ x min⁻¹. Cada ponto representa a atividade média ± desvio padrão de 02 experimentos independentes, feitos em triplicata. Os valores entre parênteses indicam o percentual de atividade após o inibidor em relação ao controle.

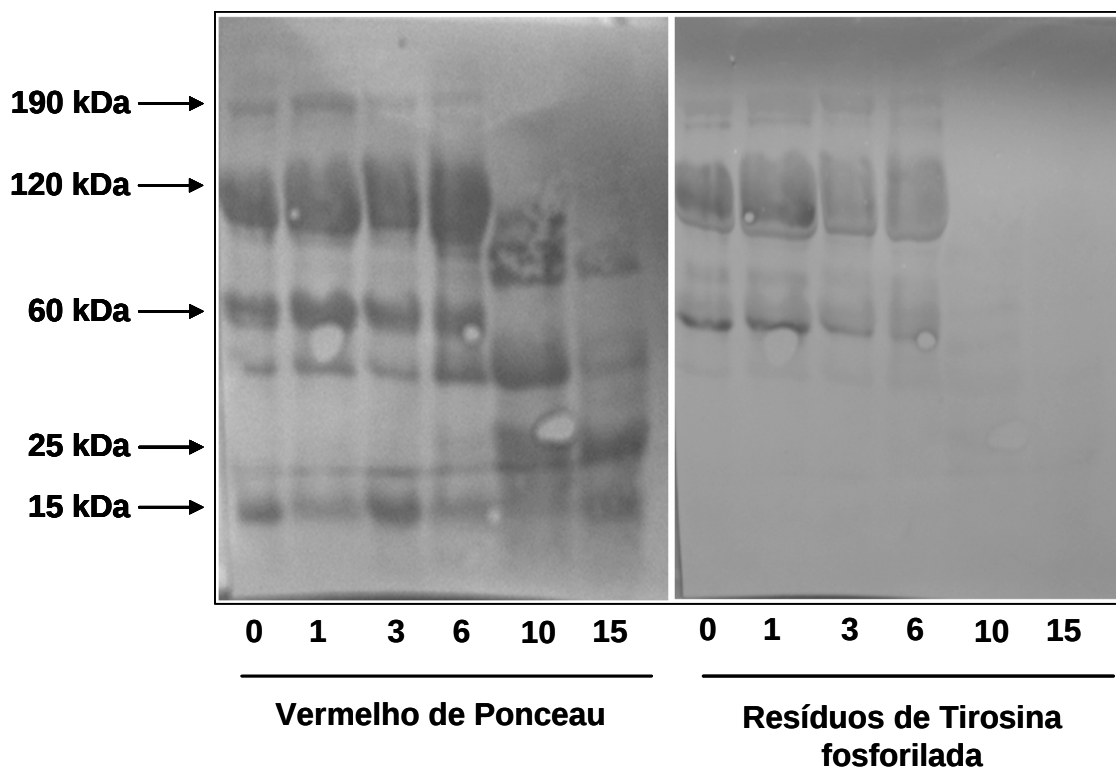


Figura 10: Defosforilação *in vivo* de proteínas de vitelo durante a embriogênese inicial de *P. americana*. Ootecas de cada dia de embriogênese inicial foram preparadas em tampão Hepes 30 mM, pH 7,5 contendo inibidores de protease, conforme descrito em Material e Métodos. As proteínas (50 µg) foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose, e coradas por Vermelho de Ponceau (painel à esquerda). Em seguida, a membrana foi submetida à *western blotting* para anti-fosfotirosina (painel à direita). As setas à esquerda representam os padrões de peso molecular, e a numeração abaixo dos painéis indica o dia de embriogênese inicial (0 a 15 dias após a postura).

4.1.2 Caracterização de proteases durante a embriogênese inicial de *P. americana*

A proteólise parcial das VTs 1 e 2 de *P. americana* é iniciada entre os dias 5 e 7 após a postura (STORELLA *et al.*, 1985) indicando a existência de endoproteases ativas nesta fase inicial de embriogênese. Este dado motivou o estudo destas hidrolases no início da embriogênese de *P. americana*. Extratos de ooteca dos dias 0 a 10 dias após a postura, preparados em tampão fosfato 50 mM, pH 6,5 foram testados para a atividade peptidásica utilizando o substrato sintético Phe-Arg-AMC (substrato fluorogênico para serino e cisteíno proteases) (**Figura 11**). A atividade teve início no dia 3, aumentando continuamente até dia 10 após a postura (período embrionário de interesse nesta análise), tendo sido significativamente diferente entre os dias 0 e 10 ($P < 0,05$). Tendo como parâmetros a atividade fosfatásica demonstrada anteriormente, houve o interesse em comparar as atividades peptidásicas entre dias 6 e 10 após a postura (**Figura 12**). Na tentativa de classificar as possíveis proteases presentes, os ensaios nos dois dias foram realizados na presença de dois inibidores: E-64 (30 μM), inibidor específico de cisteíno proteases; e aprotinina (0,1 $\mu\text{g/mL}$), inibidor específico de serino proteases. Na amostra do dia 6, a atividade peptidásica em pH 6,5 produziu em média 2,78 pM AMC x $\mu\text{g ptn}^{-1} \times \text{s}^{-1}$, sendo inibida em cerca de 60 % por E-64. Ao adicionar os dois inibidores juntos, a atividade foi totalmente inibida. Na amostra do dia 10, a atividade média detectada foi 37,1 pM AMC x $\mu\text{g ptn}^{-1} \times \text{s}^{-1}$, aumentando aproximadamente 13 vezes em relação a amostra do dia 6. O E-64 inibiu pouco mais que 40 % da atividade, e a aprotinina adicionada junto ao E-64 praticamente anularam a atividade. Apesar de não serem significativamente diferentes ($P > 0,05$), observou-se uma tendência de inibição da atividade após a adição do E-64, e houve diferença significativa entre os controles (sem inibidor) entre os dias 6 e 10 (**Figura 12**).

Este resultado demonstra que a atividade peptidásica foi realizada por dois tipos de proteases: Uma cisteíno protease, inibida por E-64 e uma serino protease, inibida por aprotinina.

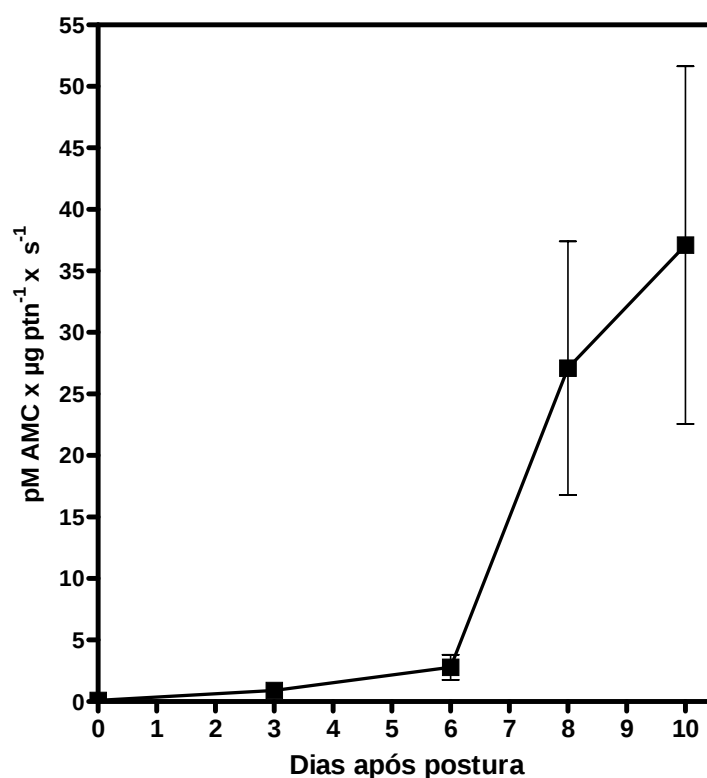


Figura 11: Nível de atividade peptidásica durante embriogênese inicial de *P. americana*. Ootecas de cada dia de embriogênese inicial foram preparadas conforme descrito em Material e Métodos e ensaiadas com Phe-Arg-AMC a 25 °C. A hidrólise do substrato foi monitorada continuamente por 5 minutos. Os resultados foram expressos como concentração de AMC x µg ptn⁻¹ x segundo⁻¹. Cada ponto representa a atividade média ± desvio padrão de 04 grupos independentes. Houve diferença significativa entre as atividades dos dias 0 e 10 por One Way ANOVA (P<0,05).

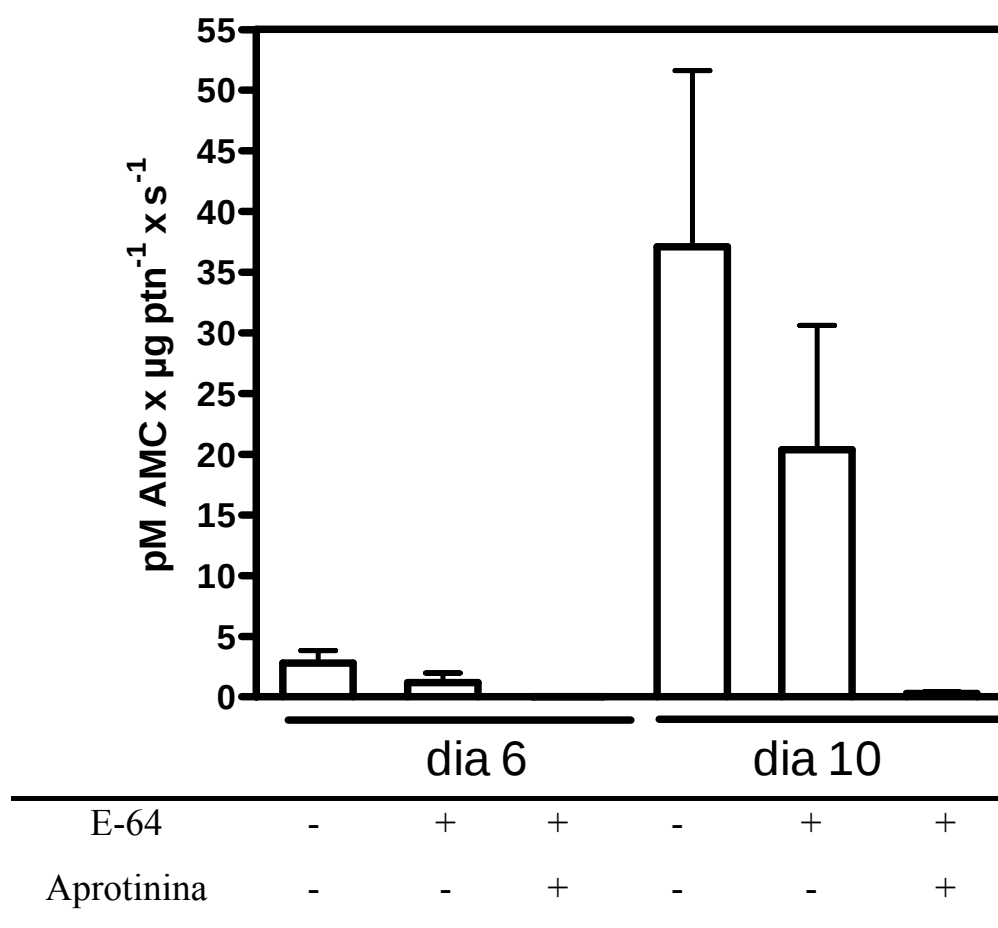


Figura 12: Níveis de atividade peptidásica em ootecas de *P. americana* – determinação da classe da protease. Amostras de ooteca dos dias 6 e 10 de embriogênese foram testadas para atividade peptidásica com Phe-Arg-AMC, a 25 °C. Após 100 s de reação o inibidor E-64 (30 µM) foi adicionado; Após 300 s de reação o inibidor aprotinina (10 µg/mL) foi adicionado. Os resultados foram expressos como concentração de AMC x µg ptn⁻¹ x segundo⁻¹. Cada ponto representa a atividade média ± desvio padrão de 04 grupos independentes. No ensaio com a amostra do dia 6 após a postura, a atividade peptidásica foi nula após a adição dos dois inibidores juntos. As atividades controle (sem inibidor) dos dias 6 e 10 foram significativamente diferentes (P<0,05), por One Way ANOVA.

4.1.3 Detecção da atividade peptidásica em YG de *P. americana*

Os grânulos de vitelo são as organelas que comumente estocam as hidrolases envolvidas com a mobilização das reservas do ovo, e estas enzimas são estocadas geralmente como proenzimas e ativadas posteriormente, após a ativação do ovo (YAMAHAMA *et al.*, 2003). Para investigar a localização das proteases no ovo, uma suspensão de grânulos de vitelo do dia 6 foi obtida e incubada com o substrato fluorogênico Phe-Arg-AMC, e observada num microscópio de fluorescência, conforme descrito por Uchida e cols. (Uchida, Ohmori *et al.*, 2001) (**Figura 13**). Houve uma marcação intensa em grânulos de vitelo pequenos ($< 10\ \mu\text{m}$ de diâmetro), e ocasionalmente grânulos de vitelo grandes estavam marcados ($> 20\ \mu\text{m}$ de diâmetro) (**Figura 13 B**). Os controles sem o substrato (**Figura 13 C e D**) ou grânulos incubados na presença dos inibidores E-64 e aprotinina (**Figura 13 E e F**) não mostraram marcação. Não foi possível detectar e localizar as proteases ativas em suspensões de YG de ootecas de dias anteriores devido à atividade ter sido muito baixa nestas amostras (dados não mostrados). Estes resultados indicam que as proteases se localizam tanto em grânulos de vitelo pequenos e grandes no dia 6 após a postura. Não foram realizados ensaios de localização das proteases em dias posteriores ao dia 6.

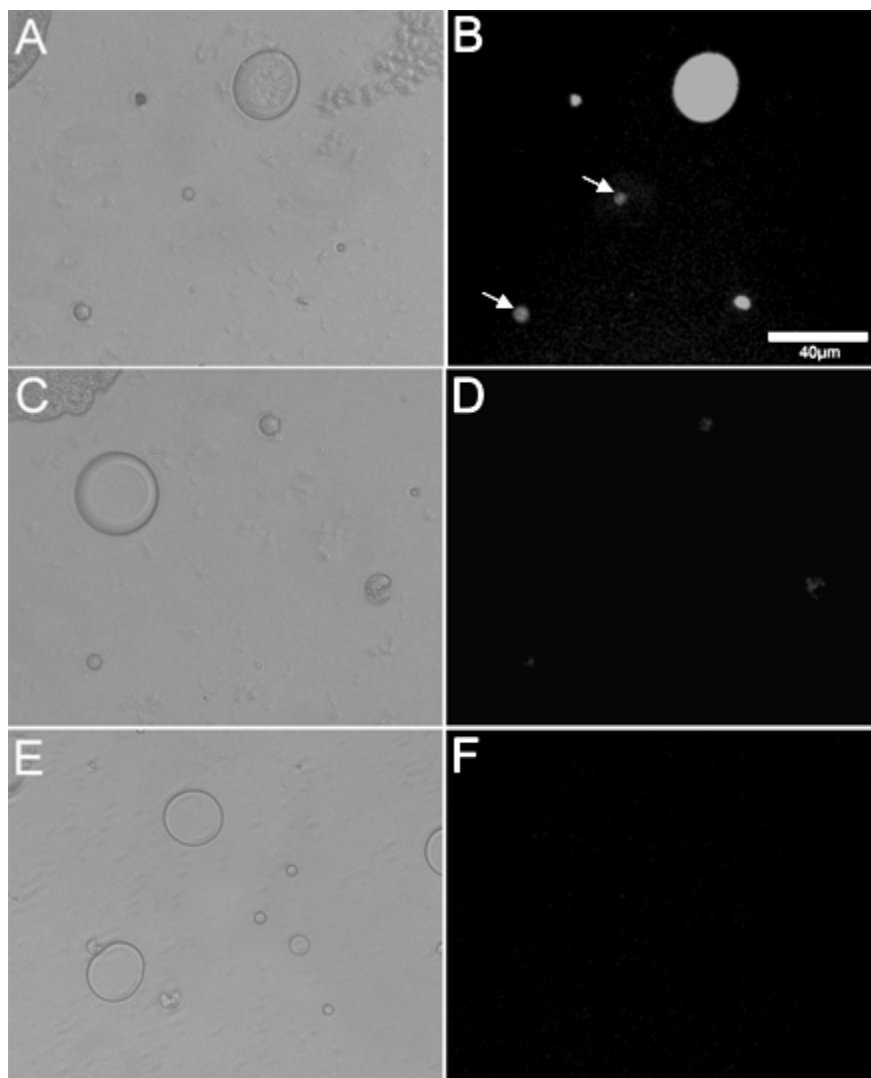


Figura 13: Localização de proteases ativas em grânulos de vitelo de ooteca de *P. americana*. Ootecas de dia 6 foram homogeneizadas suavemente em HCBS e a suspensão de grânulos foi incubada com Phe-Arg-AMC, e observada em microscópio de fluorescência. Os painéis da esquerda são micrografias de contraste de fase e os painéis da direita são as imagens de fluorescência correspondentes. **A e B:** Grânulos de vitelo incubados na presença de Phe-Arg-AMC. **C e D:** Grânulos de vitelo incubados sem Phe-Arg-AMC. E e F: Grânulos de vitelo incubados na presença de Phe-Arg-AMC e os inibidores de protease aprotinina (10µg/mL) e E-64 (30µM). Os resultados são representativos de 3 experimentos, e ao menos 5 campos por experimento foram observados. As setas indicam grânulos de vitelo pequenos marcados.

4.1.4 Caracterização da atividade tipo cisteíno protease durante a embriogênese inicial de *P. americana*

Os níveis da atividade cisteíno proteásica foram determinados ao longo da embriogênese inicial. Extratos ácidos obtidos de suspensões de grânulos de ootecas de 0 a 10 dias foram utilizados como amostras. A atividade peptidásica foi medida temporalmente utilizando o substrato Phe-Arg AMC e após 200 s o inibidor E-64 (30 μ M) foi adicionado. A diferença entre a atividade inicial e a atividade residual após a adição do inibidor resultou na atividade cisteíno proteásica. É importante ressaltar que a atividade caracterizada neste trabalho foi inibida por E-64, indicando que a enzima faz parte do clã CA (cisteíno proteases); A atividade foi detectada utilizando um substrato específico, na presença de EDTA e em pH ácido, o que confirma que a atividade pertence à superfamília da papaína (C1), e não pertence à superfamília da calpaína (C2) (cisteíno proteases neutras dependentes de cálcio). A **Figura 14** mostra a atividade cisteíno proteásica durante a embriogênese inicial de *P. americana*. A atividade média específica teve início no dia 3 (1,6 pM AMC x μ g ptn⁻¹ x s⁻¹) aumentando continuamente até o dia 10 (7,2 pM AMC x μ g ptn⁻¹ x s⁻¹).

As cisteíno proteases pertencentes à superfamília papaína (C1) são divididas em dois grupos: enzimas tipo - catepsinas B e tipo - catepsinas L. Para determinar qual o tipo de enzima estava presente nas amostras de ooteca de *P. americana*, a atividade cisteíno proteásica foi determinada na presença de CA 074 (inibidor específico para catepsina B) nas amostras de extrato ácido dos dias 6 e 10 (**Tabela 02**). A presença do inibidor não alterou significativamente as atividades peptidásicas no dia 6 (1,44 $\pm$ 0,50 no controle e 1,60 $\pm$ 0,53 pM AMC x μ g ptn⁻¹ x s⁻¹ com o inibidor) ou no dia 10 (5,15 $\pm$ 0,27 no controle e 6,1 $\pm$ 0,98 pM AMC x μ g ptn⁻¹ x s⁻¹ com o inibidor). As preparações ácidas dos dias 6 e 10 após a postura não foram capazes de hidrolisar o Arg-Arg-AMC, que é um substrato específico de

enzimas tipo-catepsinas B. Este conjunto de resultados indica que a cisteíno protease presente nestas amostras foi similar às catepsinas L.

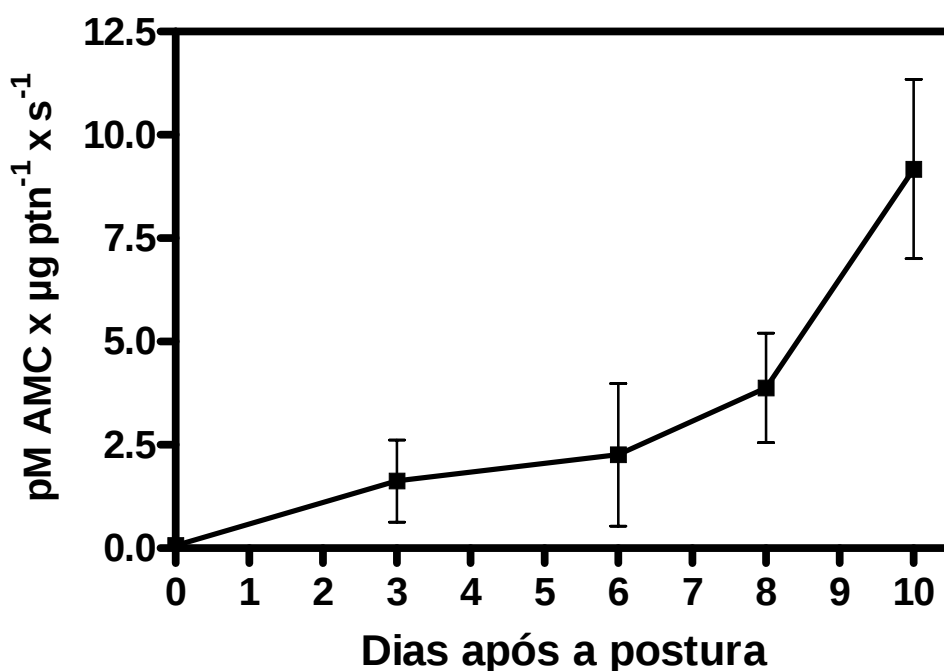


Figura 14: Níveis de atividade tipo cisteíno protease durante a embriogênese inicial de *P. americana*. Ootecas dos dias 0, 3, 6, 8 e 10 foram preparadas e ensaiadas em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 utilizando como substrato Phe-Arg-AMC a 25 °C. A hidrólise do substrato foi monitorada continuamente por 200 s. O inibidor E-64 (30 μM) foi adicionado e a atividade indicada representa a diferença entre a atividade total e a atividade residual após a adição do inibidor. Os resultados foram expressos como concentração de AMC x $\mu\text{g ptn}^{-1} \times \text{s}^{-1}$. Cada ponto representa a atividade média $\pm$ desvio padrão de 03 grupos independentes. Houve diferença significativa entre as atividades dos dias 0 e 10 por One Way ANOVA ($P < 0,05$).

Tabela 02: Atividade tipo cisteíno protease na presença de inibidor específico de catepsina B em ootecas de *P. americana*

Grupos	Dia 6	Dia 10
controle	1,44 ± 0,50	5,15 ± 0,27
CA 074 5 µM	1,60 ± 0,53	6,10 ± 0,98

Ootecas dos dias 6 e 10 de embriogênese foram preparadas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 e as amostras foram testadas contra o substrato sintético Phe-Arg-AMC. Após 200 s, o inibidor CA 074 foi adicionado ao meio de reação (5 µM). Os resultados foram expressos como concentração de AMC x µg ptn⁻¹ x s⁻¹. Cada ponto representa a atividade média ± desvio padrão de 03 grupos independentes.

4.1.5 Ativação ácida da cisteíno protease em ootecas de *P. americana*

Diversas proteases descritas em ovos de insetos são estocadas como proenzima, a partir da síntese materna destas enzimas, incorporação nos ovócitos e ativação em pH ácido (CHO *et al.*, 1999; RIBOLLA *et al.*, 2001; YAMAHAMA *et al.*, 2003). A **Figura 15** mostrou a atividade cisteíno proteásica de amostras de dia 3 preparadas em condições neutras (para impedir a ativação em pH ácido) e pré-incubadas por diferentes intervalos de tempo (de 0 a 120 minutos) em tampão em pH ácido (para promover a ativação das proenzimas). Observou-se que houve a ativação da cisteíno protease na amostra do dia 3 a partir da acidificação do meio, aumentando em cerca de 4 vezes a atividade após 20 minutos de incubação, continuando a aumentar até 120 minutos. Este aumento foi significativo estatisticamente ($P < 0,01$ entre 0 e 120 minutos). Este resultado sugere que a atividade cisteíno proteásica em ootecas de *P. americana* requer a acidificação do meio para seu funcionamento, provavelmente a partir de auto-ativação conforme observado para a BCP (cisteíno protease de *Bombyx*) de ovos de *B. mori* (YAMAHAMA *et al.*, 2003). Controles utilizando o E-64 inibiram totalmente a atividade.

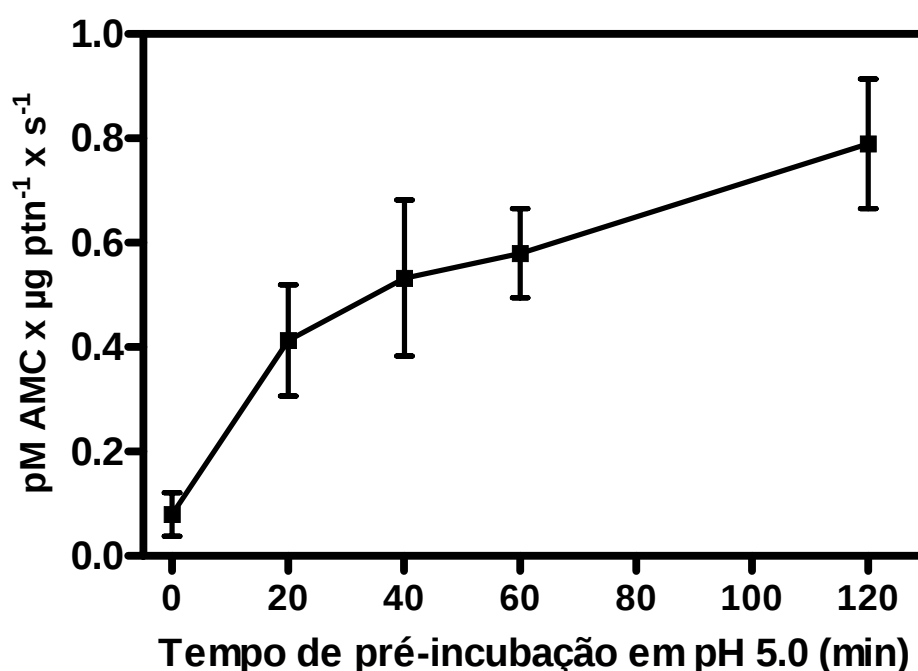


Figura 15: Ativação ácida da atividade tipo cisteíno protease em ooteca de *P. americana*. Ootecas do dia 3 após a postura foram preparadas em tampão Hepes 50 mM pH 7,0 e alíquotas desta amostra foram pré-incubadas em intervalos de tempo diferentes, a 25 °C, em tampão acetato de sódio pH 5,0. Imediatamente após a pré-incubação, as amostras foram testadas para atividade peptidásica com Phe-Arg-AMC. Os resultados foram expressos como concentração de AMC x µg ptn⁻¹ x s⁻¹. Cada ponto representa a atividade média ± desvio padrão de 03 grupos independentes. Houve diferença significativa entre 0 e 40 minutos ($P < 0,05$) e bastante significativa entre 60 e 120 minutos ($P < 0,01$) por One Way ANOVA.

4.1.6 Proteólise *in vitro* em meio ácido – Correlação entre a fosfatase e a cisteíno protease

A degradação das proteínas estocadas em ovos ocorre mediada por proteases encontradas nos grânulos de vitelo (GIORGI *et al.*, 1999). A participação da cisteíno protease no processamento das proteínas de vitelo *in vitro* foi determinada. A fração de ootecas de dia 0 enriquecida em VT de alto peso molecular a partir de uma coluna de Penefsky foi utilizada como substrato para a ação da cisteíno protease (preparada a partir de ootecas de dia 6). A fração enriquecida em VT e a fração ácida de dia 6 contendo a cisteíno protease (protease ácida) foram incubadas em intervalos de tempo (0, 3 e 24 horas) a temperatura ambiente, na presença ou ausência de E-64 (inibidor da cisteíno protease), e foi realizado o perfil protéico através de SDS-PAGE (**Figura 16**). Não houve indício de proteólise ácida mesmo após 24 horas de incubação, seja por diminuição de intensidade ou surgimento de novas bandas decorrentes da proteólise de outras.

A cooperação entre a fosfatase ácida e a cisteíno protease foi investigada através da pré-incubação da fração enriquecida em VT com a preparação enriquecida em fosfatase ácida de ootecas de dia 6 (AcP) por 1 hora. Em seguida, esta amostra (pré-incubação) foi incubada com a protease ácida nos mesmos intervalos de tempo do experimento anterior, e as amostras observadas por SDS-PAGE (**Figura 17**). Este resultado mostrou que a pré-incubação com a AcP favoreceu a degradação de proteínas após 24 horas de incubação (**painel A, à esquerda**). Esse perfil foi parcialmente inibido quando as amostras foram incubadas com inibidores de fosfatase (**painel A, à direita**), ou com E-64 ou ambos (**painel B**). Este dado sugere que a degradação das proteínas de vitelo pela cisteíno protease requer a participação da fosfatase ácida.

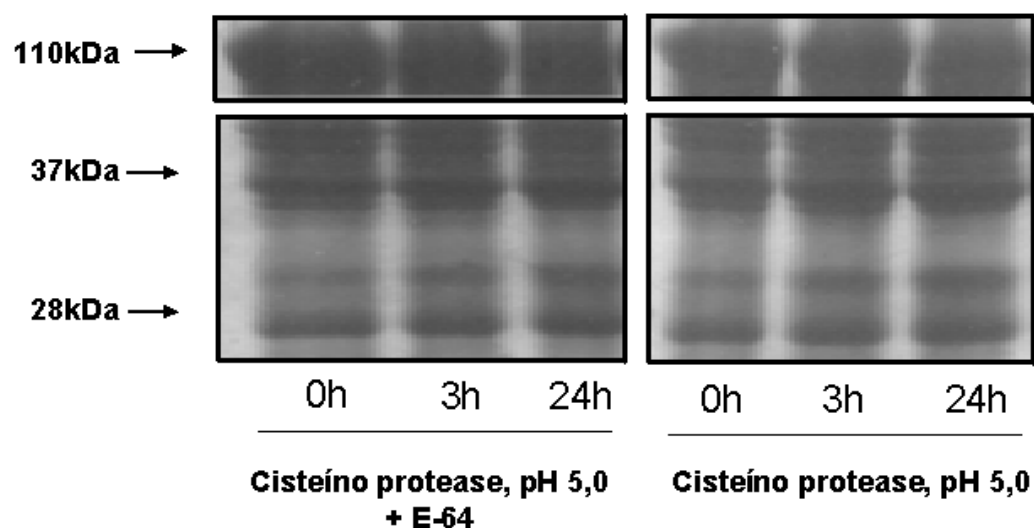


Figura 16: Proteólise *in vitro* em pH ácido. A fração enriquecida em VT foi incubada com a protease ácida durante os intervalos de tempo indicados em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 (painel à direita). Os controles foram incubados nas mesmas condições, incluindo E-64 (30 μ M) (painel à esquerda). As amostras de cada grupo foram separadas por SDS-PAGE e as proteínas foram coradas por Azul de Coomassie R. As setas à esquerda representam os padrões de peso molecular.

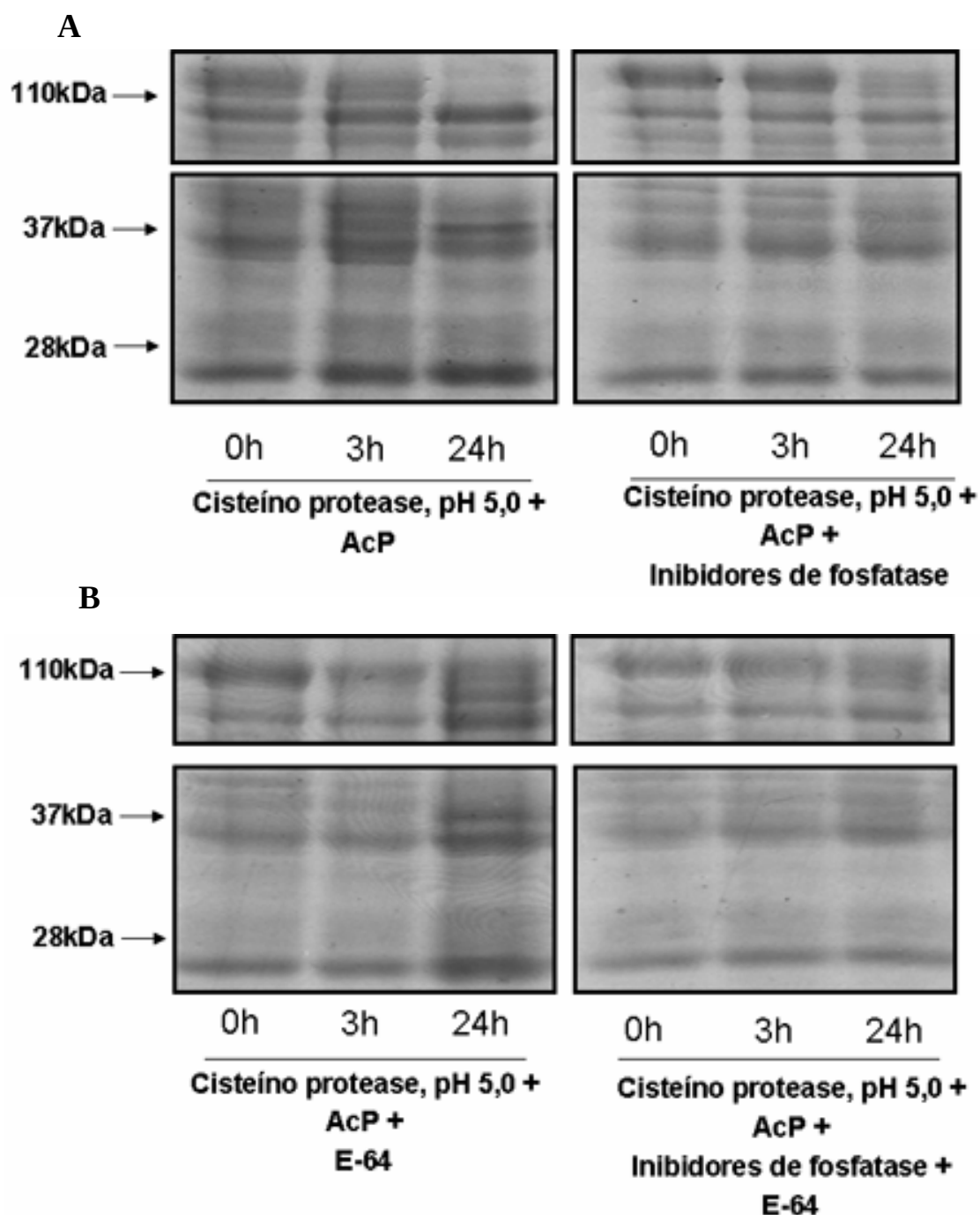


Figura 17: Proteólise *in vitro* em pH ácido – influência da AcP. A fração enriquecida em VT foi pré-incubada com a AcP por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionada ao meio de reação a protease ácida e as amostras foram incubadas durante os intervalos de tempo indicados em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 (**A**, painel à esquerda). Inibidores de fosfatase ácida (molibdato 1 mM, NaF 10 mM e tartarato 10 mM) foram incluídos à pré-incubação (**A**, painel à direita). As amostras de cada grupo foram separadas por SDS-PAGE, e as proteínas foram coradas por Azul de Coomassie R. **Figura B:** O mesmo experimento descrito na figura A, incluindo o E-64 (30 µM) no meio de incubação. As setas à esquerda representam os padrões de peso molecular.

4.1.7 Caracterização da atividade tipo serino protease durante a embriogênese inicial de *P. americana* e proteólise *in vitro* das proteínas de vitelo

Para analisar a atividade serino proteásica durante o início da embriogênese de *P. americana*, extratos em pH neutro obtidos de suspensões de grânulos de ootecas de 0 a 10 dias foram utilizados como amostras. A atividade peptidásica foi medida temporalmente utilizando o substrato Phe-Arg AMC e após 200 s o inibidor aprotinina foi adicionado. A diferença entre a atividade inicial e a atividade residual após a adição do inibidor resultou na atividade serino proteásica (**Figura 18**). Esta atividade teve início apenas no dia 6 (diferentemente da atividade cisteíno proteásica, que começou no dia 3 após a postura), e aumentou continuamente do dia 8 ao 10. Houve uma diferença significativa entre as atividades dos dias 0 e 10 ($P < 0,01$).

A participação da serino protease na degradação das proteínas de vitelo em ootecas de *P. americana* foi investigada. A fração enriquecida em VT foi incubada a temperatura ambiente com uma preparação de ootecas de dia 6 em pH 7,0 (protease neutra), conforme realizado para a cisteíno protease, nos mesmos intervalos de tempo. O meio de reação estava em pH neutro, na presença ou ausência de aprotinina 10 $\mu\text{g/mL}$. As amostras da incubação foram observadas após SDS-PAGE (**Figura 19**). Neste resultado observou-se a degradação de uma proteína de aproximadamente 130 kDa após 24 horas de incubação, e esta proteólise foi inibida pela aprotinina. Duas bandas de baixo peso molecular (aproximadamente 28,8 e 19,3 kDa) surgiram após a incubação, indicando que poderiam ser produtos da proteólise parcial em pH neutro (painel à direita). A pré-incubação com a AcP não interferiu no perfil das proteínas das amostras após a incubação em pH neutro (dados não mostrados). Este resultado indica que a degradação das proteínas pela serino protease independe da ação prévia da

fosfatase ácida e que a contribuição da serino protease na proteólise é mínima durante a embriogênese inicial de *P. americana*.

Parte deste grupo de resultados foi publicada no artigo intitulado “Interplay between acid phosphatase and cysteine proteases in mediating vitellin degradation during early embryogenesis of *Periplaneta americana*”, na revista “Journal of Insect Physiology”, em maio de 2008 (Anexo 02).

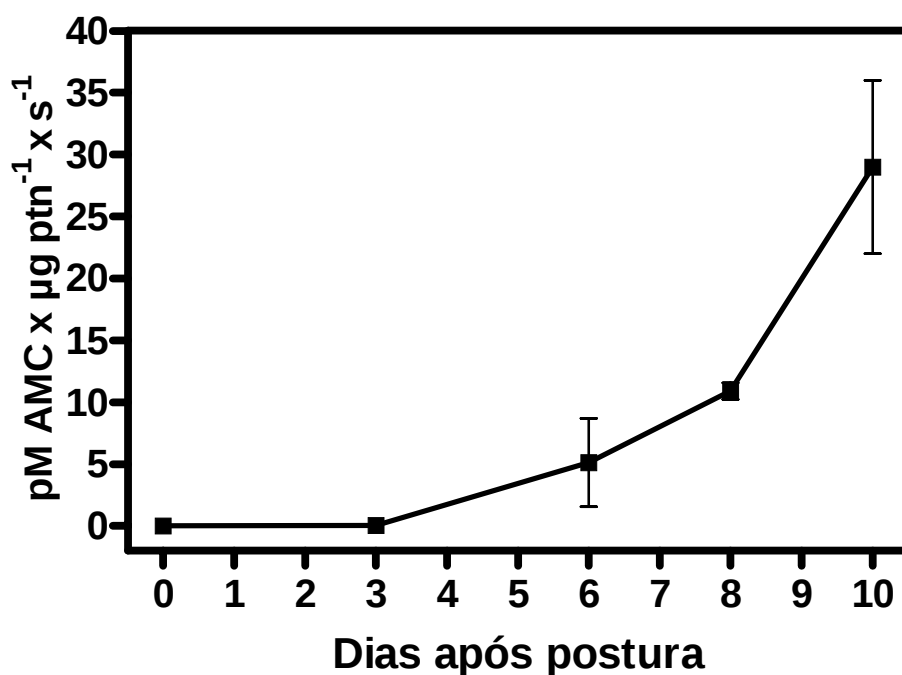


Figura 18: Níveis de atividade tipo serino protease durante a embriogênese inicial de *P. americana*. Ootecas dos dias 0, 3, 6, 8 e 10 de embriogênese foram preparadas e ensaiadas em tampão Hepes 50 mM pH 7,0 com Phe-Arg-AMC a 25 °C. A hidrólise do substrato foi monitorada continuamente por 200 s. O inibidor aprotinina (10 µg/mL) foi adicionado e a atividade indicada representa a diferença entre a atividade total e a atividade residual após a adição do inibidor. Os resultados foram expressos como concentração de AMC x µg ptn⁻¹ x s⁻¹. Cada ponto representa a atividade média ± desvio padrão de 03 grupos independentes. Houve diferença estatisticamente significativa entre as atividades dos dias 0 e 10 (P<0,01) por One Way ANOVA.

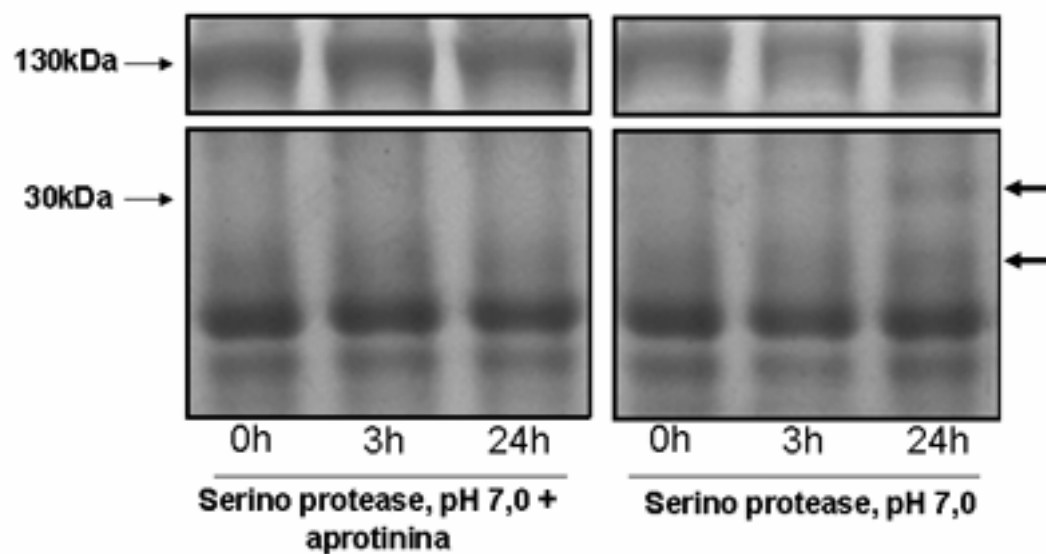


Figura 19: Proteólise *in vitro* em pH neutro. A fração enriquecida em VT foi incubada com a protease neutra durante os intervalos de tempo indicados em tampão Hepes 50 mM, pH 7,0 (painel à direita). Os controles foram incubados nas mesmas condições, incluindo aprotinina (10 µg/ml) (painel à esquerda). As amostras de cada grupo foram separadas por SDS-PAGE e as proteínas foram coradas por Azul de Coomassie R. As setas no painel à direita indicam o surgimento de duas novas bandas após a proteólise *in vitro*. As setas à esquerda representam os padrões de peso molecular.

4.2 Parte 2 – *A. gemmatalis*

4.2.1 Identificação da atividade fosfatásica ácida durante a embriogênese de *A. gemmatalis*

O tempo de desenvolvimento embrionário de ovo até a eclosão de larva de *A. gemmatalis* tem duração em média de 3 a 4 dias em campo (MAGRINI *et al.*, 1999), período semelhante ao observado em laboratório. Para estudar a presença de fosfatases ácidas durante a embriogênese deste inseto, foram realizadas coletas de ovos em intervalos de tempo durante o período de 0 h (de 1 h após a postura) até 62 horas (fase pré-larva). Estes ovos foram preparados em tampão acetato pH 5,5 conforme descrito anteriormente, e as amostras foram testadas contra o pNPP no mesmo tampão para a detecção da atividade fosfatásica (**Figura 20**). A atividade foi observada desde o início da embriogênese, aumentando temporalmente até o intervalo de tempo de 21 horas. Após, houve uma diminuição gradativa desta atividade, até o retorno aos níveis basais determinados inicialmente. Este perfil de atividade indicou que o máximo ocorre em torno de 21 horas após a postura.

4.2.2 Determinação de parâmetros básicos e purificação parcial da fosfatase ácida de ovos de *A. gemmatalis*

Conforme observado na seção anterior, a atividade fosfatásica ácida atinge seu nível máximo em ovos de 21 horas após a postura (**Figura 20**). Para caracterizar essa enzima, ovos de 0 a 24 horas foram utilizados como material de estudo na determinação de parâmetros básicos de atividade. A preparação obtida em pH 7,0 foi testada contra o pNPP variando o pH do meio de reação (**Figura 21**). A atividade aumentou significativamente de pH 5,0 para pH 5,5 ($P < 0,01$), e houve diferença significativa entre as atividades nos pHs 5,5 e 7,5, mostrando

uma tendência de haver um segundo pico na faixa neutra de pH. Como o objetivo seria a caracterização da fosfatase ácida, o pH 5,5 foi escolhido como ideal para a preparação da enzima nos experimentos seguintes. A **Figura 21 B** mostra a influência da temperatura na atividade da fosfatase ácida, a partir de preparação de ovos de 0 a 24 h em pH 5,5. A temperatura de 37 °C foi determinada como ótima para os ensaios de caracterização da fosfatase ácida em ovos de *A. gemmatalis*. Estes dados permitiram o conhecimento básico do funcionamento da enzima e deram condições para o início do processo de purificação.

A amostra obtida após o homogenato de ovos em pH 5,5 foi centrifugada, e o sobrenadante foi concentrado em Centricon de poro de 30kDa. A amostra retida no filtro foi cromatografada em coluna de filtração em gel em HPLC e as frações obtidas foram testadas para atividade fosfatásica (**Figura 22 A**). Neste gráfico, verificou-se que a atividade fosfatásica ácida está concentrada em um pico, com 31 minutos de retenção na coluna (fração 31). A maior parte das proteínas saiu no final da coluna (linha cinza, correspondente a densidade óptica a 280 nm). No entanto, a **Figura 22 B** (SDS-PAGE das etapas de purificação parcial) mostrou a presença de algumas bandas na amostra da fração 31, indicando que a enzima não estaria purificada após a cromatografia. As frações 30 a 32 foram reunidas e concentradas em *Speed Vac* por duas horas, e a amostra concentrada foi utilizada nos experimentos subsequentes como AcP de *A. gemmatalis*. As etapas de purificação parcial da fosfatase ácida de ovos de 0 a 24 h estão demonstradas na **Tabela 03**. Houve um enriquecimento de aproximadamente 40 vezes em relação ao conteúdo da amostra inicial (homogenato total), a atividade específica passou de 18,2 para 723,3 nmol pNP x mg ptn⁻¹ x min⁻¹.

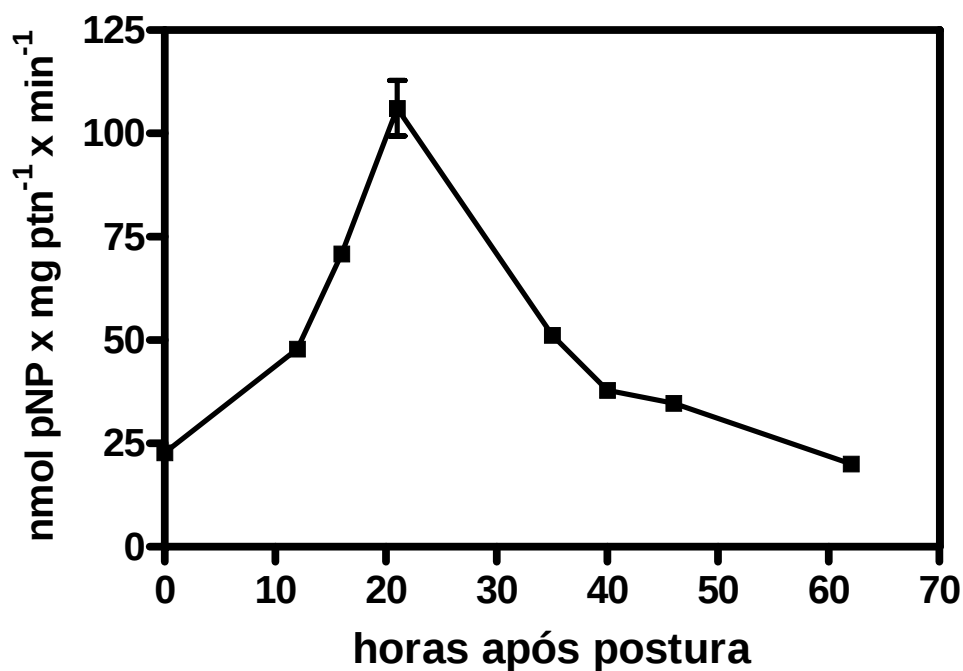


Figura 20: Atividade fosfatásica ácida durante a embriogênese de *A. gemmatilis*. Ovos coletados previamente em intervalos de tempo de embriogênese foram preparados em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5, conforme descrito em Material e Métodos. As amostras foram ensaiadas contra *p*NPP a 37 °C por 60 minutos, na concentração final de proteína 0,05 µg/µL. Os resultados foram expressos em nmol de *p*NP liberado x mg ptn⁻¹ x min⁻¹. Cada ponto representa a atividade média ± desvio padrão, feito em triplicata.

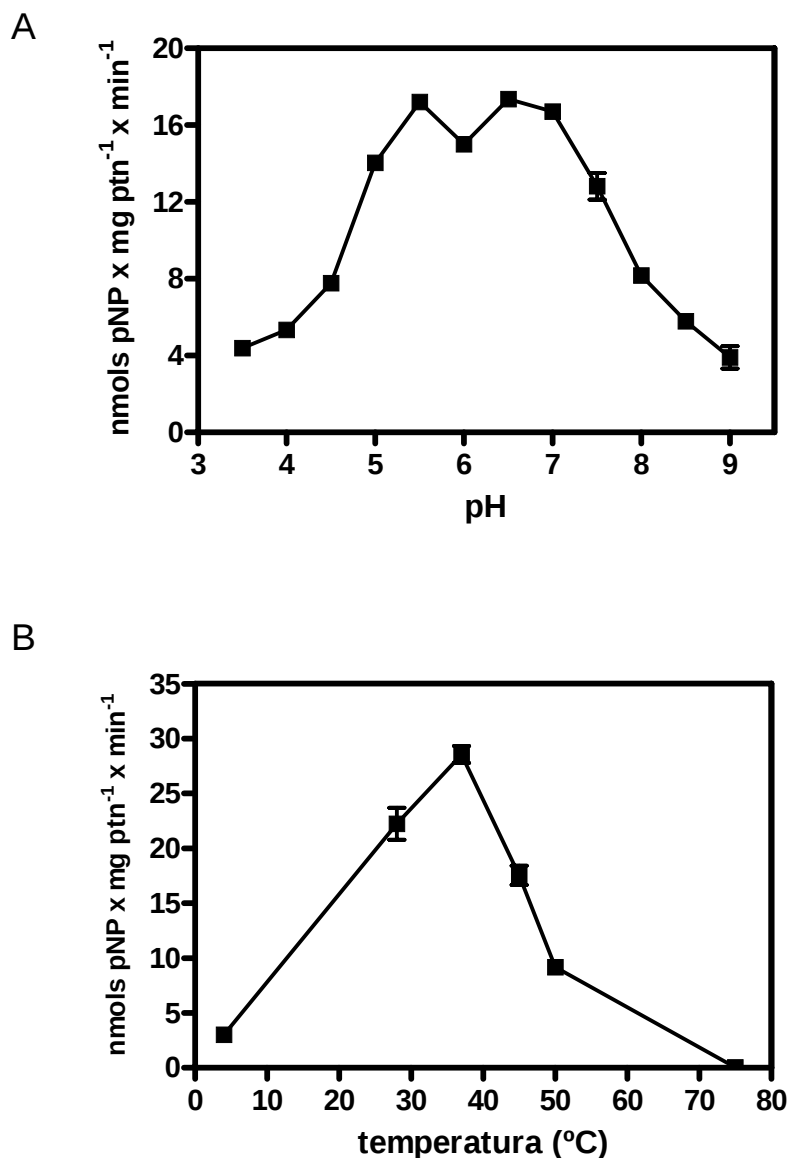


Figura 21: Atividade fosfatásica em extrato de ovos de *A. gemmatalis*. Ovos de 0 a 24 horas após a postura foram coletados e preparados no tampão adequado para o ensaio como descrito em Material e Métodos, e testados para atividade fosfatásica utilizando pNPP 4 mM por 60 minutos. **A:** Determinação de pH ótimo, variando o pH do meio de reação entre 3,5 e 9,0. A amostra foi preparada em tampão Hepes 0,1 M, pH 7,0. **B:** Determinação de temperatura ótima. As amostras foram preparadas em tampão acetato de sódio 0,1 M. O tampão do meio de reação foi o mesmo utilizado para preparar as amostras. A concentração final de proteína foi 0,2 mg/mL. Os resultados foram expressos em nmol de pNP liberado x mg ptn⁻¹ x min⁻¹. Cada ponto representa a atividade média $\pm$ desvio padrão de 02 experimentos independentes, feitos em triplicata.

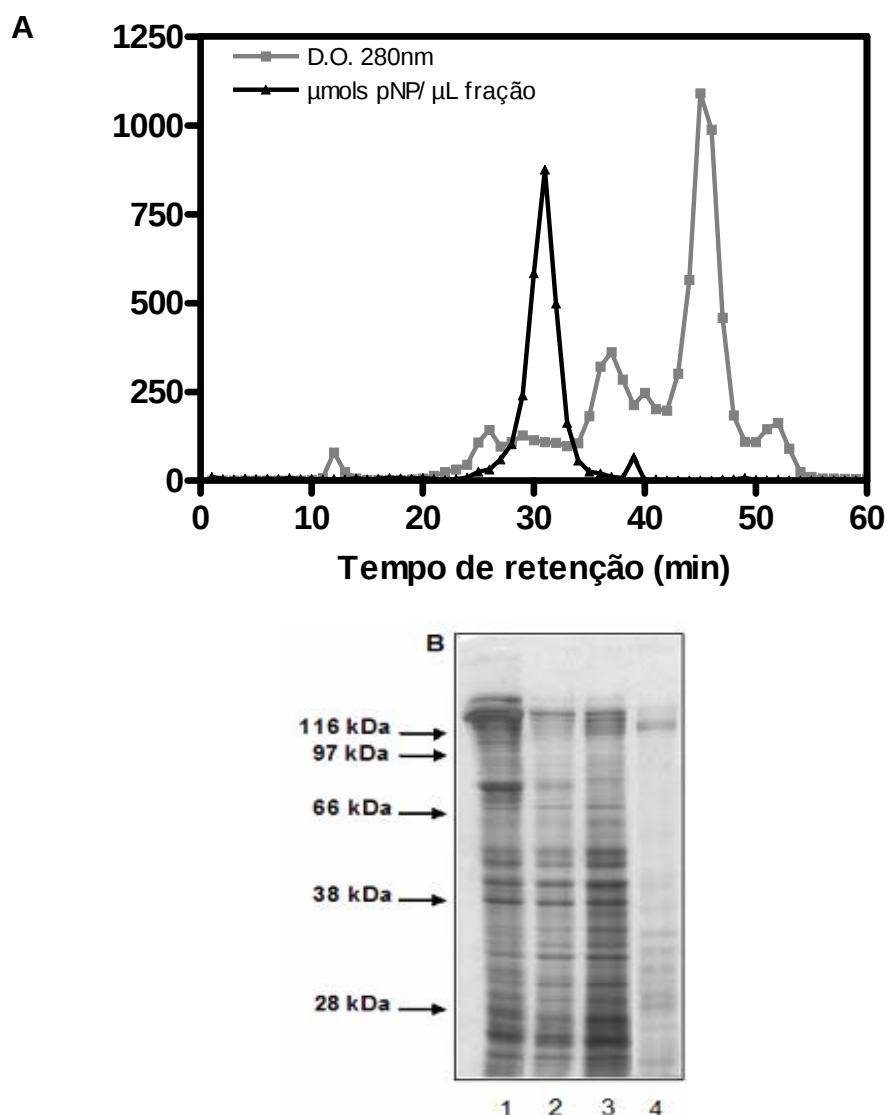


Figura 22: Purificação parcial da AcP de *A. gemmatilis*. A amostra retida no filtro de 30 kDa, obtida após a centrifugação do homogenato de ovos de 0 a 24 h foi submetida à cromatografia de filtração em gel em HPLC utilizando a coluna Superose 6HR. O tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5 contendo NaCl 0,15 M foi utilizado como tampão de eluição. A cromatografia foi realizada em 60 minutos, com fluxo de 0,5 ml/minuto. Frações coletadas a cada minuto foram testadas contra pNPP (30 μ L de fração) conforme descrito em Material e Métodos. **A:** perfil cromatográfico. A atividade está expressa em μ mol de pNP/ μ L da fração (linha preta). O perfil de eluição (densidade óptica a 280 nm) está mostrado na linha cinza. **B:** Proteínas das amostras das etapas de purificação parcial da AcP, separadas por SDS-PAGE e coradas pelo método de prata. Os números na parte inferior do painel indicam as amostras: 1: homogenato total; 2: sobrenadante 20.000 g; 3: Retido em filtro de 30 KDa; 4: fração 31 (pico de atividade fosfatásica). Cada poço tinha 7 μ g de proteína, exceto a fração 31 (total de proteína presente em 30 μ L da fração 31, precipitado com acetona gelada).

Tabela 03: Etapas de purificação parcial da Fosfatase ácida em ovos de *A. gemmatalis*

	Volume (mL)	Conteúdo de proteína (mg)	Concentração de proteína (mg / mL)	Atividade específica*	Purificação (relativo)
Homogenato total	6,0	61,8	10,3	18,2	1
Sobrenadante 20.000 x g	5,0	27,0	5,4	20,4	1,12
Centricon em filtro de 30 kDa	1,5	9,9	6,6	28,8	1,6
Fração 31 HPLC concentrada	0,5	0,053	0,105	723,3	39,8

* A atividade específica está expressa em nmol pNP x mg ptn⁻¹ x min⁻¹)

4.2.3 Caracterização da AcP de *A. gemmatalis* e determinação de peso molecular

A amostra AcP, obtida após as etapas de purificação parcial foi utilizada para a caracterização da fosfatase ácida presente em ovos de 0 a 24 h. A **Figura 23** mostra a varredura de pH do meio de reação na atividade fosfatásica. O pH ótimo de funcionamento da enzima foi 4,0 (nível máximo de atividade observada), apesar de as atividades entre os pHs 3,5 e 5,0 não terem sido significativamente diferentes após o teste de Tukey por One Way ANOVA ($P>0,05$). Em pH 5,5 cerca de 40 % da atividade foi mantida. Em pHs neutro e alcalino, a atividade foi praticamente nula. A partir do perfil observado na curva, os experimentos seguintes de caracterização da enzima foram realizados em pH 4,0.

Para determinar qual o tempo de reação ideal (região de velocidade de reação constante), a atividade fosfatásica foi medida em intervalos de tempo diferentes, de 0 a 480 minutos (**Figura 24**). No intervalo de 0 a 120 minutos, a curva de formação do produto em função do tempo foi linear, indicando a velocidade de reação constante. Após este tempo, a atividade mudou de inclinação, e a velocidade diminuiu. A regressão linear do trecho de 0 a 30 minutos estendida (linha pontilhada) mostrou a linearidade até 120 minutos. O tempo de reação de 60 minutos foi mantido nos ensaios posteriores.

Para investigar a estabilidade térmica da AcP, a amostra foi pré-incubada em três temperaturas diferentes e intervalos de tempo: 37 °C, 55 °C e 70 °C; 0, 15, 30 e 45 minutos. Em seguida, mediu-se a atividade contra o pNPP por 60 minutos a 37 °C (**Figura 25**). O resultado mostrou que a enzima mantém a atividade intacta mesmo após pré-incubação por 45 minutos, a 37 °C. Entretanto, ao incubar por 15 minutos em temperaturas mais altas, a enzima perde quase completamente sua atividade, indicando que é termossuceptível.

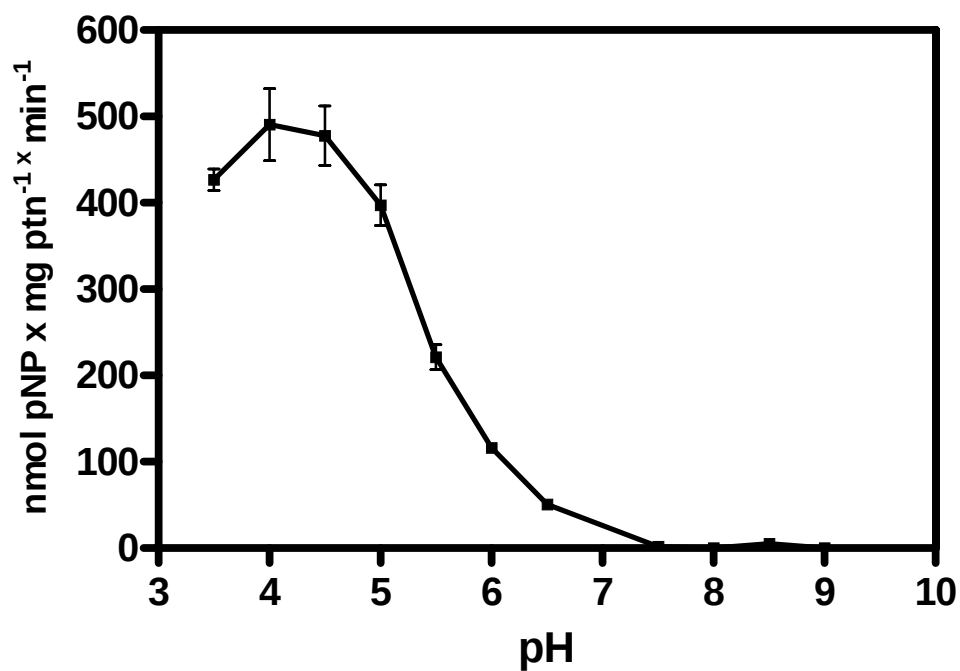


Figura 23: Determinação de pH ótimo para AcP de *A. gemmatalis*. A amostra AcP de *A. gemmatalis* foi testada para atividade fosfatásica variando o pH do meio de reação, de 3,5 a 9,0, conforme descrito em Material e Métodos. As amostras foram ensaiadas por 60 minutos contra pNPP 4 mM. Os resultados foram expressos em nmol de pNP liberado $\times \text{mg ptn}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Cada ponto representa a atividade média $\pm$ desvio padrão de 02 experimentos independentes, feitos em triplicata.

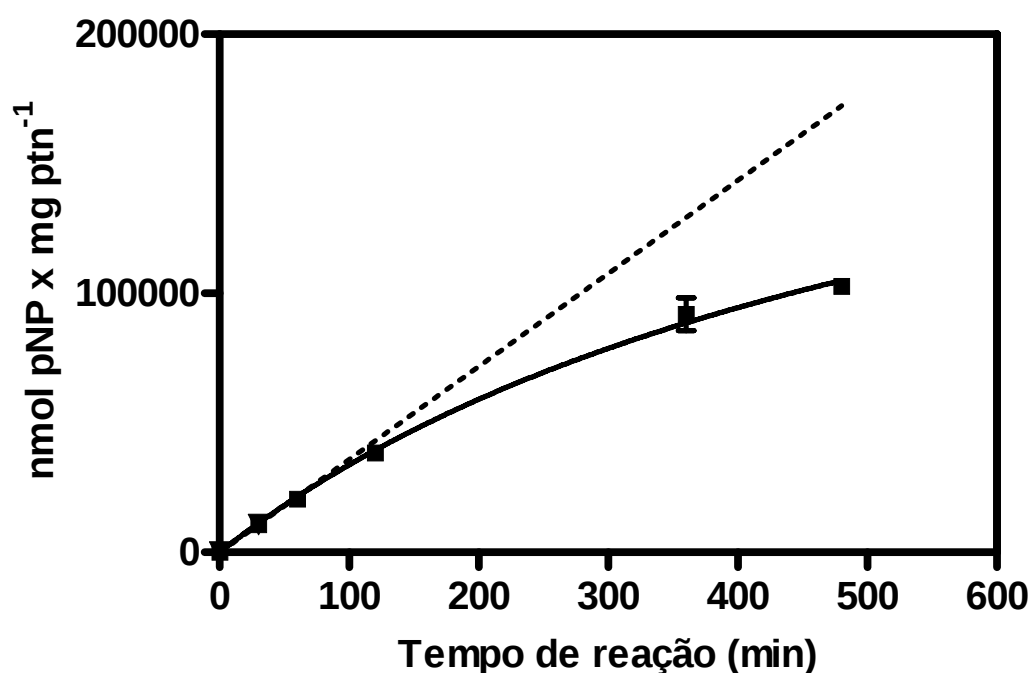


Figura 24: Curva temporal de reação da AcP de *A. gemmatalis*. A amostra AcP de *A. gemmatalis* foi testada para atividade fosfatásica variando o tempo de reação de 0 a 8 horas, conforme descrito em Material e Métodos. As amostras foram ensaiadas em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,0, DTT 10 mM e EDTA 10 mM contra *p*NPP 4 mM, durante os tempos indicados. Os resultados foram expressos em nmol de *p*NP liberado x mg ptn⁻¹. Cada ponto representa a atividade média $\pm$ desvio padrão de 02 experimentos independentes, feitos em triplicata (curva cheia). A linha pontilhada representa a regressão linear prevista para o trecho de 0 a 30 minutos, estendida até 480 minutos.

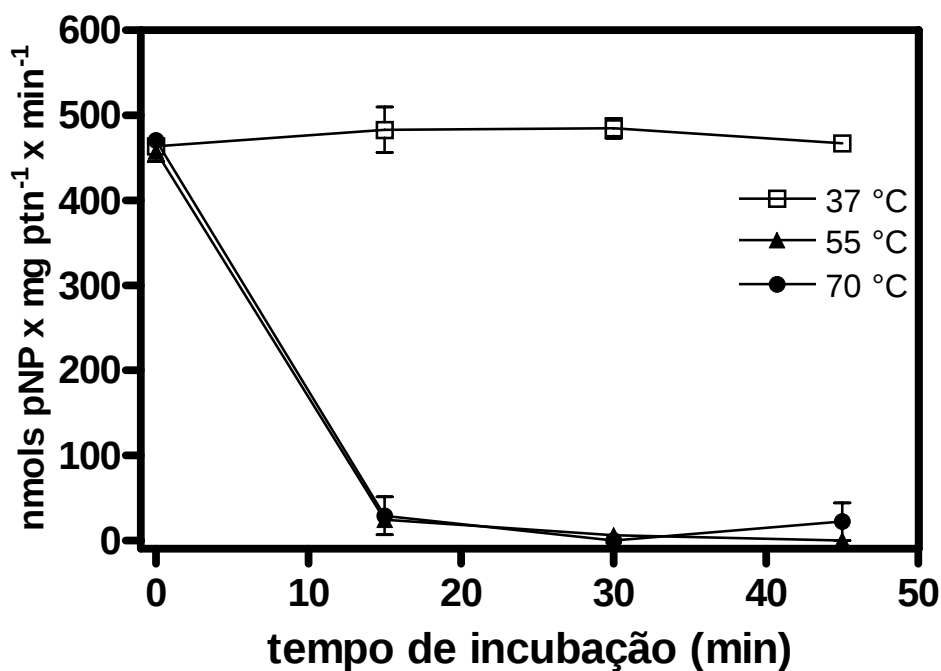


Figura 25: Curva de inativação térmica da AcP de *A. gemmatalis*. A amostra AcP de *A. gemmatalis* foi pré-incubada em três temperaturas diferentes (37 °C, 55 °C e 70 °C) em intervalos de tempo (0, 15, 30 e 45 minutos), no volume de 10 µL/ tempo/ temperatura. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas e 4 µL de cada sobrenadante foram ensaiados em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,0 contra pNPP 4 mM a 37 °C por 60 minutos. Os resultados foram expressos em nmol de pNP liberado x mg ptn⁻¹ x min⁻¹. Cada ponto representa a atividade média ± desvio padrão de 02 experimentos independentes, feitos em triplicata.

Para determinar o peso molecular aproximado da AcP, proteínas – padrão foram cromatografadas nas mesmas condições que a AcP, utilizando a mesma coluna de filtração em gel e mesmo tampão de equilíbrio e eluição. O logaritmo do peso molecular de cada um dos cinco padrões foi plotado em um gráfico em função do tempo de retenção respectivo (**Figura 26**). Após a regressão linear dos dados, foi determinado o peso molecular aproximado da AcP como 45,01 kDa a partir da equação de regressão.

4.2.4 Classificação da AcP de *A. gemmatalis*

Para determinar qual a classe da AcP de ovos de *A. gemmatalis*, testes de atividade usando o pNPP foram realizados a 37 °C, por 60 minutos na ausência ou presença de inibidores de fosfatases (**Tabela 04**). Inibidores clássicos de fosfatases ácidas foram testados. O tartarato de Na⁺ e K⁺ inibiu aproximadamente 93 % da atividade na concentração de 1 mM, e usando 10 mM, anulou a atividade. O NaF (inibidor clássico de fosfatases ácidas) e o fosfato de potássio, ou Pi (inibidor competitivo de fosfatases) inibiram a atividade de forma dose-dependente, como mostrado na tabela. Utilizando 10 mM, NaF e Pi inibiram cerca de 94 e 80 % da atividade, respectivamente.

Molibdato de amônio e ortovanadato de sódio são inibidores conhecidos de tirosina fosfatases (WYSOCKI e STRZEZEK, 2003). Ambos os inibidores foram capazes de praticamente anular a atividade da AcP, de forma dose-dependente. Nas concentrações mais altas utilizadas (1 mM para o molibdato e 0,1 mM para o vanadato), estes inibiram 100 e 96 % da AcP. Este resultado indica que a enzima pode ser uma tirosina fosfatase. Outros inibidores como a cafeína (inibidor de fosfodiesterase) ou levamisol ou tetramisol (inibidores de fosfatases alcalinas) não exerceram efeitos na atividade da enzima. O sulfato de cobre

(inibidor de tirosina fosfatase devido ao potencial redox) inibiu a atividade em apenas 30 % aproximadamente em relação ao controle.

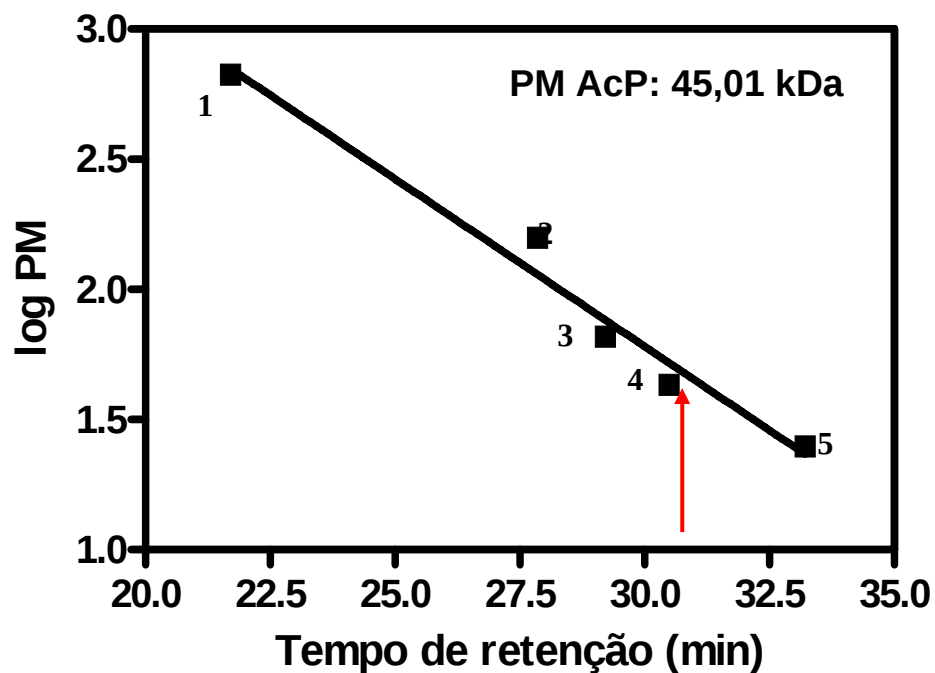


Figura 26: Determinação do peso molecular da AcP de *A. gemmatalis*. Cinco proteínas-padrão diferentes foram separadas por cromatografia de filtração em gel em HPLC utilizando a coluna Superose 6HR. O tampão de equilíbrio e eluição foi o mesmo utilizado para a AcP. A cromatografia foi realizada com fluxo de 0,5 ml/minuto. O peso molecular aproximado da AcP foi calculado a partir da correlação entre os tempos de retenção dos padrões e o logaritmo do peso molecular de cada um deles. A seta indica o tempo de retenção da AcP, baseada no pico da atividade fosfatásica dentre as frações coletadas da coluna. Os padrões utilizados foram 1: tiroglobulina (669 kDa); 2: aldolase (158 kDa); 3: BSA (66 kDa); 4: ovoalbumina (40 kDa); 5: quimotripsinogênio (25 kDa).

Tabela 04. Influência de diferentes inibidores na atividade da AcP de *A. gemmatalis*

Tipo de inibidor	Inibidor	nmol pNP x mg ptn⁻¹ x min⁻¹	% de atividade
	Controle (sem inibidor)	724,80 ± 1,46	100
Inibem fosfatases alcalinas	Levamisol 10 mM	813,60 ± 19,38	112,2
	Levamisol 1 mM	837,10 ± 29,36	115,5
	Tetramisol 10 mM	997,90 ± 115,30	137,7
	Tetramisol 1 mM	829,70 ± 37,73	114,5
Inibe fosfohidrolases	NaF 10 mM	47,23 ± 0,05	6,5
	NaF 1 mM	677,70 ± 17,22	93,5
Inibe fosfatase ácida	Tartarato 10 mM	0,00 ± 0,00	0
	Tartarato 1 mM	56,78 ± 3,13	7,8
Inibe tirosina fosfatase	Molibdato 1 mM	0,00 ± 0,00	0
	Molibdato 0,1 mM	157,70 ± 4,80	21,8
	Molibdato 0,05 mM	280,70 ± 14,41	38,7
	Pi 10 mM	157,70 ± 0,43	21,8
Inibe fosfatases	Pi 1 mM	601,60 ± 10,85	83,0
Inibe fosfodiesterasas	Cafeína 5 mM	819,80 ± 10,69	113,1
	Cafeína 0,5 mM	758,00 ± 39,35	104,6
	Controle sem DTT ou EDTA	600,10 ± 4,10	100
Inibem tirosina fosfatase	CuSO ₄ 1 mM	432,10 ± 1,08	72,0
	CuSO ₄ 0,1 mM	584,10 ± 23,91	97,3
	Vanadato 0,1 mM	27,04 ± 1,35	4,5
	Vanadato 0,05 mM	50,68 ± 9,12	8,4

A amostra AcP foi testada contra o pNPP na presença de diferentes inibidores de fosfatase. O controle representa a atividade sem inibidor. O controle sem DTT ou EDTA foi utilizado nos testes com os inibidores CuSO₄ e Vanadato. Os resultados foram expressos em nmol de pNP liberado x mg ptn⁻¹ x min⁻¹. Cada ponto representa a atividade média ± desvio padrão de 02 experimentos independentes, feitos em triplicata. O percentual de atividade foi calculado em relação ao controle.

4.2.5 Determinação dos parâmetros cinéticos da AcP de *A. gemmatalis*

Os parâmetros cinéticos (V_{max} e K_m) da AcP parcialmente purificada foram determinados a partir da produção de *p*NP ($\text{nM } p\text{NP} \times \text{s}^{-1}$) em função da concentração de *p*NPP no meio de reação (**Figura 27**). O resultado obtido mostrou um perfil hiperbólico da velocidade da reação em função da $[p\text{NPP}]$ (**Figura 27 A**). Os resultados foram utilizados na construção de um gráfico invertido, com os valores de $1/[p\text{NPP}]$ em X e $1/\text{nM } p\text{NP} \times \text{s}^{-1}$ em Y (gráfico de Lineweaver-Burk) (**Figura 27 B**). Este gráfico permitiu obter a partir dos interceptos, os parâmetros cinéticos V_{max} : $6,13 \text{ nM } p\text{NP} \times \text{s}^{-1}$ e K_m aparente: $0,32 \text{ mM } p\text{NPP}$.

4.2.6 Preferência da AcP de *A. gemmatalis* entre substratos fosforilados

A utilização de diversos substratos fosforilados como alvos *in vitro* para a AcP de *A. gemmatalis* foi testada. A atividade foi realizada em pH 4,0, e a produção de fosfato livre (P_i) foi medida após 60 minutos de reação a 37°C (**Figura 28**). A fosfotirosina teve o maior percentual de defosforilação entre os fosfoaminoácidos. Este resultado está de acordo com os resultados anteriores de inibidores seletivos, indicando se tratar de uma tirosina fosfatase. Os substratos β -glicerofosfato, ATP e PP_i (moléculas fosforiladas não protéicas, encontradas em vias bioquímicas celulares) foram defosforilados, porém em níveis menores que α -naftil fosfato (substrato sintético) e poli P-3 (polímero de três resíduos de fosfato). Poli P-75 (polímero de 75 resíduos de fosfato) praticamente não foi defosforilado. Estes resultados sugerem que além de resíduos fosforilados em tirosina em proteínas do ovo, outras moléculas fosforiladas poderiam ser alvos diretos de defosforilação pela AcP. A **Figura 28 B** mostra o perfil temporal de atividade da AcP contra estes três alvos (P-tirosina, ATP e Poli P-3), em

intervalos de tempo de 0 a 120 minutos. A velocidade de reação utilizando a fosfotirosina foi maior em relação aos outros dois substratos testados, evidenciando uma preferência por este substrato.

4.2.7 Perfil de proteínas durante a embriogênese de *A. gemmatalis* – Proteólise programada e proteínas fosforiladas em tirosina

Não existe na literatura atual a descrição das proteínas de vitelo, ou de hidrolases envolvidas com a mobilização de vitelo de *A. gemmatalis*. Neste sentido, houve a necessidade de se observar o perfil das proteínas presentes nos ovos deste inseto durante a embriogênese. A **Figura 29** exibe o padrão de proteínas encontradas nas amostras preparadas para a atividade fosfatásica descrita anteriormente, separadas por SDS-PAGE. Neste gel, observou-se que a proteólise programada é bastante sutil, tendo início já no final do desenvolvimento embrionário, com a diminuição da quantidade de algumas proteínas, provavelmente correspondentes a proteínas de vitelo.

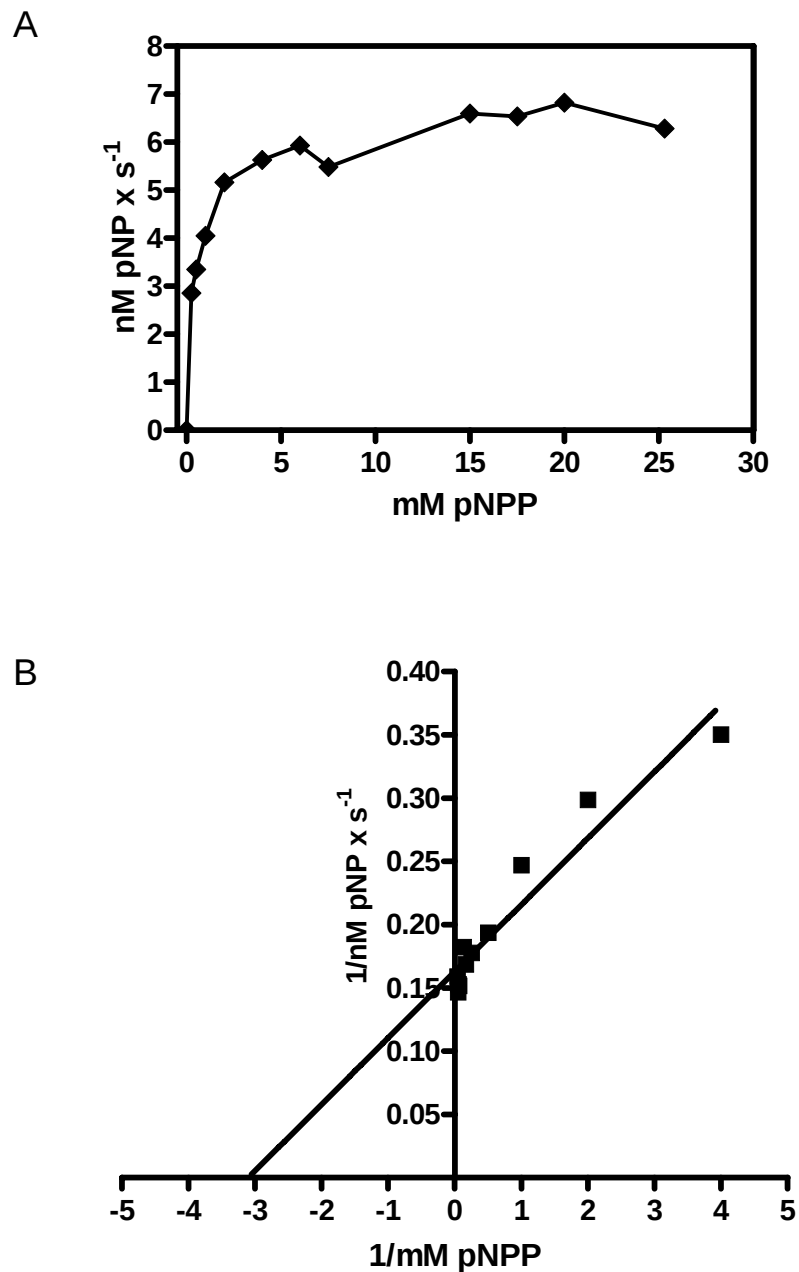


Figura 27: Determinação dos parâmetros cinéticos da AcP de *A. gemmatilis*. A amostra AcP de *A. gemmatilis* foi ensaiada em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,0 variando a concentração de pNPP, a 37 °C por 60 minutos. A: Resultado representativo expressando a produção de pNP em nM por segundo em função da concentração de pNPP (mM). B: Gráfico duplo-recíproco com os resultados invertidos e a regressão linear (reta) para a determinação dos parâmetros K_m aparente (0,32 mM pNPP) e V_{max} (6,13 nM pNP x s⁻¹) após interceptos.

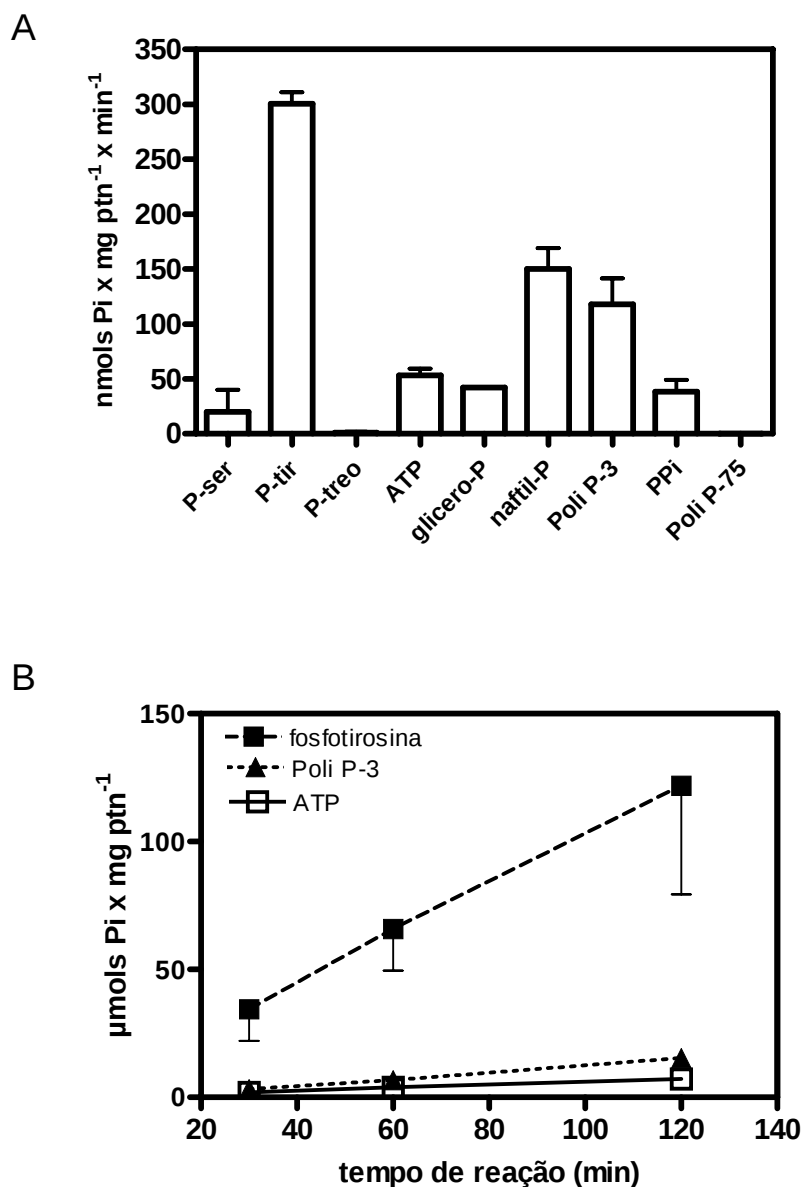


Figura 28: Atividade da AcP de *A. gemmatalis*: determinação de preferência de substrato. A amostra AcP de *A. gemmatalis* foi testada utilizando substratos fosforilados diferentes para determinar preferência. A amostra foi ensaiada em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,0 conforme descrito em Material e Métodos e os substratos fosforilados. A reação ocorreu a 37 °C por 60 minutos. **A:** Cada substrato fosforilado foi ensaiado na concentração final de 4 mM, exceto Poli P-3 (1,3 mM), PPi (2 mM), Poli P-75 (52 μM). Os resultados foram expressos em nmol de Pi liberado x mg ptn⁻¹ x min⁻¹. **B:** P-tir, Poli P-3 e ATP foram utilizados em diferentes intervalos de tempo como substratos fosforilados para a AcP. Os resultados foram expressos como μmol de Pi x mg ptn⁻¹. Cada ponto representa a atividade média ± desvio padrão de 02 experimentos independentes, feitos em triplicata.

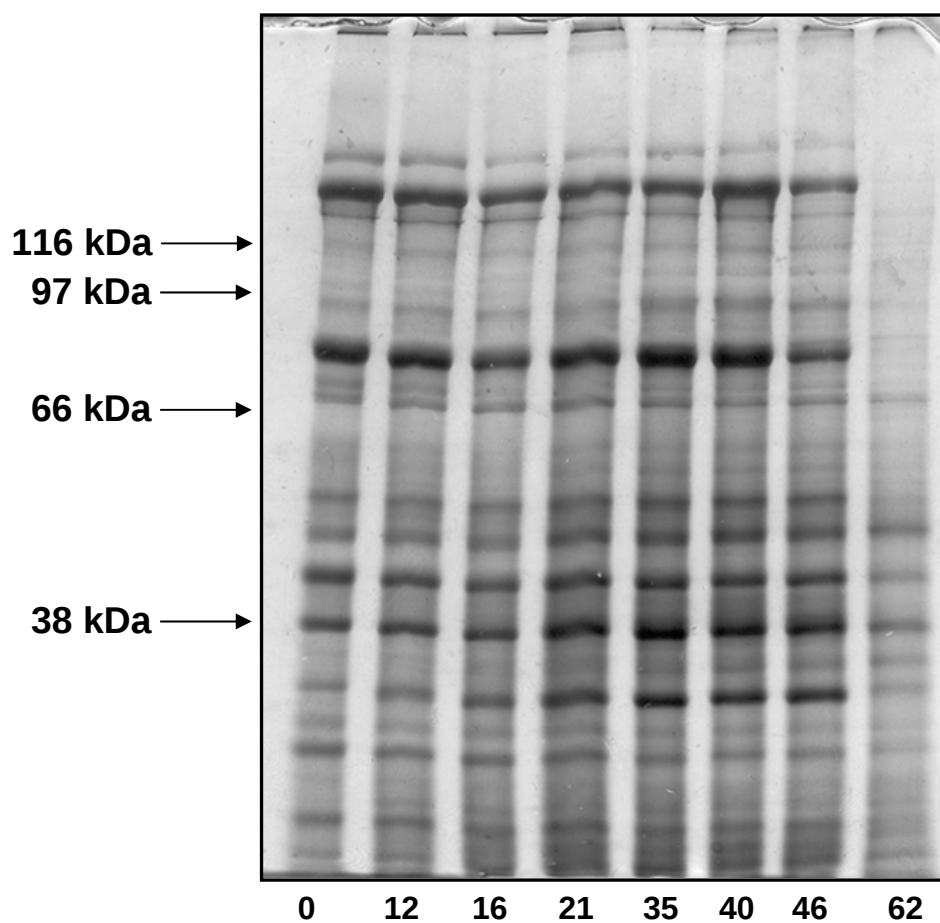


Figura 29: Proteólise de vitelo durante a embriogênese de *A. gemmatalis*. Ovos foram coletados após a postura em intervalos de tempo de embriogênese. As amostras de proteínas de vitelo foram preparadas em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5 conforme descrito em Material e Métodos. As proteínas (4 µg por poço) foram separadas por SDS-PAGE e coradas pelo método de prata. A numeração abaixo de cada poço indica a amostra de ovo de cada intervalo de tempo de embriogênese (de 0 a 62 horas após a postura). As setas à esquerda representam os padrões de peso molecular.

Os resultados anteriores sugerem que a AcP tem preferência por resíduos de fosfotirosina. Neste sentido, as proteínas presentes em ovos durante o desenvolvimento embrionário foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde houve a reação com o anticorpo monoclonal contra fosfotirosina, revelando resíduos de tirosina fosforilada durante a embriogênese (**Figura 30**). O resultado mostrou a presença de algumas proteínas fosforiladas em tirosina. Entretanto, não houve uma defosforilação evidente destas proteínas em ovos de 21 horas, apenas já no final da embriogênese. Este resultado não esclarece se estas proteínas seriam alvos diretos da AcP. Testes que mostrariam a defosforilação destas proteínas *in vitro* não foram conclusivos (dados não mostrados).

4.2.8 Evidência de presença de uma cisteíno peptidase em ovos de *A. gemmatalis*

Ovos de 0 a 24 horas foram utilizados para a preparação de amostras em pH neutro ou ácido, na tentativa de demonstrar a existência de proteases durante este intervalo de tempo da embriogênese. A **Figura 31 A** mostra a atividade peptidásica destas amostras a utilizando Phe-Arg-AMC, e os meios de reação incluíram os mesmos tampões da preparação (pHs 7,0 e 5,5) (**Figura 31 A e B, respectivamente**). Não foi detectada atividade peptidásica em pH neutro, o que sugere a ausência de uma serino protease ativa nesta fase do desenvolvimento embrionário destes ovos. No entanto, em pH ácido houve atividade peptidásica, e esta foi totalmente inibida por E-64 30 μ M, indicando a presença de uma cisteíno protease do tipo papaína neste momento da embriogênese de *A. gemmatalis*.

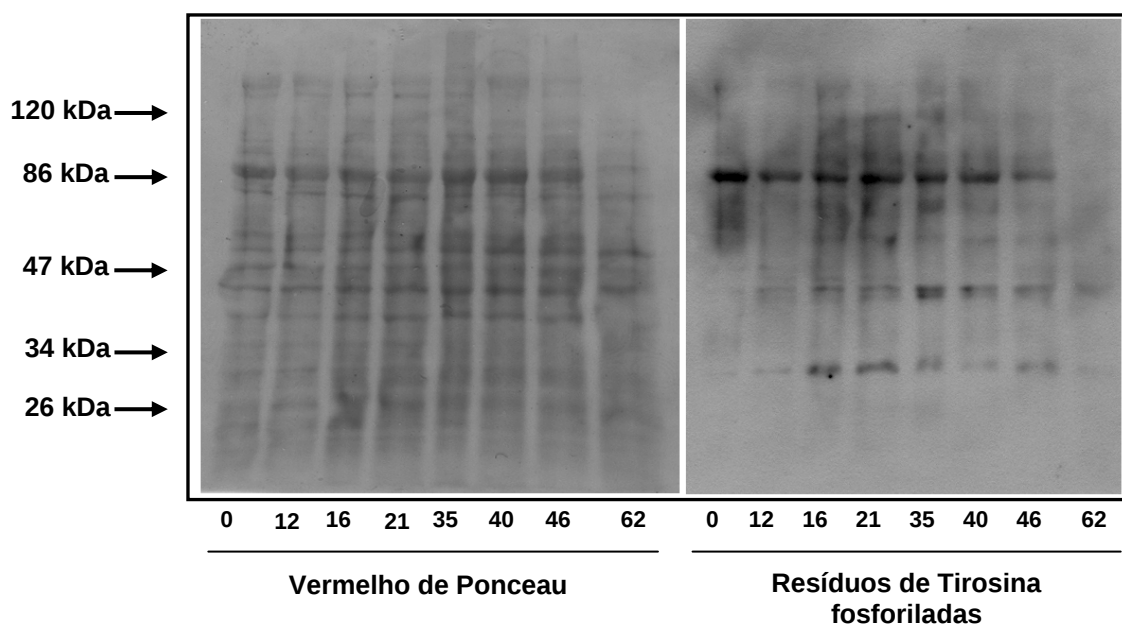


Figura 30: Perfil de proteínas de vitelo fosforiladas em resíduos de tirosina durante a embriogênese de *A. gemmatalis*. As amostras de ovos foram preparadas em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,5 conforme descrito em Material e Métodos. As proteínas (15 µg) foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose, e foram coradas por Vermelho de Ponceau (painel à esquerda). Em seguida, a membrana foi submetida à *Western Blotting* para anti-fosfotirosina (painel à direita). A numeração abaixo de cada poço indica a amostra de ovo de cada intervalo de tempo de embriogênese (de 0 a 62 horas após a postura). As setas à esquerda representam os padrões de peso molecular.

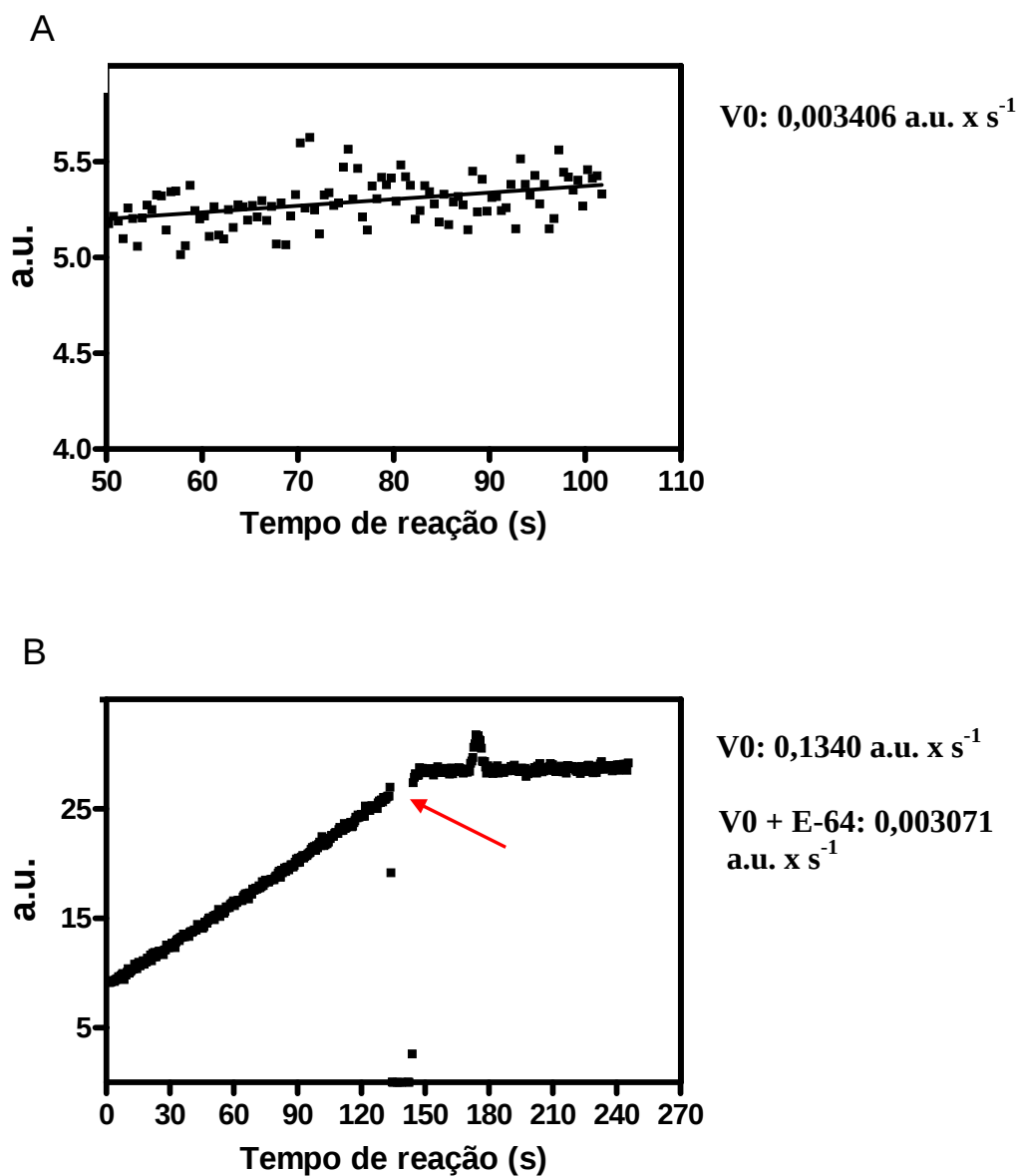


Figura 31: Atividade peptidásica em ovos de *A. gemmatalis*. Ovos de 0 a 24 horas foram preparados em tampão em pH neutro ou ácido, conforme descrito em Material e Métodos. As amostras (50 µg de proteína total) foram ensaiadas nos mesmos tampões de preparação utilizando como substrato Phe-Arg-AMC a 25 °C. A hidrólise do substrato foi monitorada: **A:** curva temporal de hidrólise do substrato em pH neutro; **B:** curva temporal de hidrólise do substrato em pH ácido. A seta em B indica o ponto em que foi adicionado o inibidor E-64 (30 µM). Os resultados foram expressos como unidade arbitrária de fluorescência (a.u.) em função do tempo de reação em segundos, e mostram a curva representativa de dois experimentos independentes. As velocidades (V0) indicadas nos gráficos foram calculadas conforme descrito em Material e Métodos.

4.2.9 Correlação entre a proteólise ácida *in vitro* e a AcP

A influência da AcP na proteólise parcial em pH ácido foi demonstrada utilizando uma preparação a partir de ovos de 0 h (YP) em pH 7,0 como substrato. A amostra AcP foi incubada em pH 5,5 por diferentes intervalos de tempo com a YP, na presença ou ausência de inibidores de fosfatase e de protease. As proteínas das amostras após a incubação foram separadas por SDS-PAGE (**Figura 32**). Os resultados mostraram que a presença da AcP favoreceu a proteólise parcial de algumas proteínas ao longo do tempo (painel A), e esta proteólise não ocorreu na presença de inibidores de protease (painel B), ou de inibidores de fosfatase (painel C), ou ainda na presença de ambos (painel D). Este dado indicou que a proteólise ácida é dependente da ação da fosfatase ácida, e este efeito é inibido na presença de inibidores de fosfatase, demonstrando uma correlação entre as duas hidrolases ácidas. Não foi observada diferença no perfil eletroforético das proteínas de vitelo ao incubar apenas a amostra YP sem a AcP.

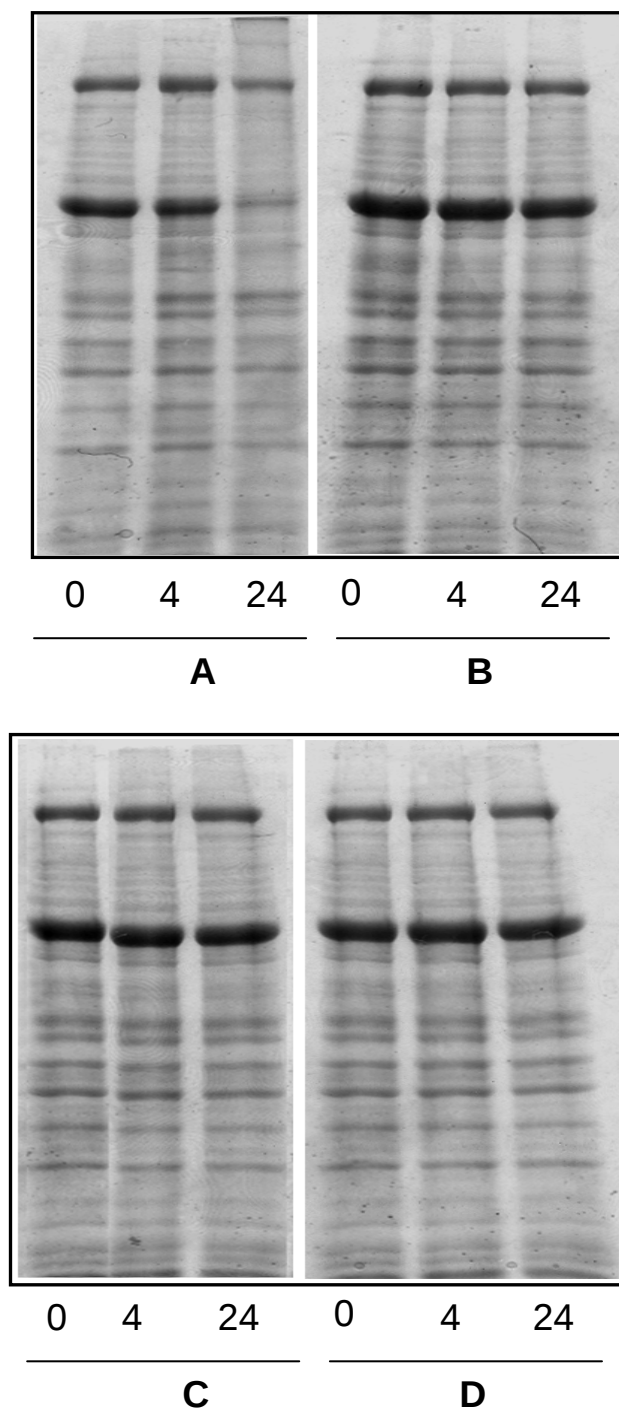


Figura 32: Efeito da AcP na proteólise *in vitro* das proteínas de vitelo de *A. gemmatalis*. A amostra YP (30 µg de proteína) foi incubada durante intervalos de tempo com a amostra AcP (1 µg de proteína) nas ausências ou presenças de inibidores de protease e/ou de fosfatase, em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,5, DTT 10 mM e EDTA 10 mM, a 37 °C. Após as incubações, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE e coradas por Azul de Coomassie R. **Painel A:** AcP + YP. **Painel B:** AcP + YP + inibidores de protease (E-64 30 µM, aprotinina 10 µg/ml, pepstatina A 7 µM). **Painel C:** AcP + YP + inibidores de fosfatase (NaF e tartarato Na⁺ e K⁺ 10 mM e molibdato de amônio 1 mM). **Painel D:** AcP + YP + inibidores de protease + inibidores de fosfatase. A numeração abaixo de cada poço indica o tempo de incubação (horas). Os géis são representativos de dois experimentos independentes.

5 Discussão

O estudo de hidrolases durante o desenvolvimento embrionário tem sido realizado dentre os mais diversos modelos de animais ovíparos, como em peixe (KWON *et al.*, 2001), nematódeos (WIMMER *et al.*, 1998; BRITTON e MURRAY, 2004) ou insetos (CHO *et al.*, 1991; NUSSENZVEIG *et al.*, 1992; CHO *et al.*, 1999). A caracterização destas hidrolases durante a embriogênese tem sido abordada aos níveis celular, bioquímico e molecular (YAMAGUCHI *et al.*, 1999; ZHAO *et al.*, 2005). Neste trabalho, foi demonstrada a presença de fosfatases e proteases no desenvolvimento embrionário de *P. americana* e de *A. gemmatilis*. Em *P. americana*, uma atividade fosfatásica ácida foi detectada a partir do dia 6 após a postura (**Figura 08**). O teste utilizando inibidores indicou se tratar de fosfatase ácida lisosomal, tendo características semelhantes à tirosina fosfatases (**Tabela 01**). A partir do dia 10 houve preferência por fosfotirosina e fosfoserina (**Figura 09**). A descrição prévia da tirosina fosfatase acídica em YG deste inseto indica que a atividade detectada no dia 06 seja referente a uma enzima de origem materna, incorporada durante a ovogênese (OLIVEIRA E MACHADO, 2006) (**Anexo 01**). Este fenômeno já foi observado para fosfatase ácida em outros insetos, como em *M. domestica* (RIBOLLA *et al.*, 2001). A atividade detectada contra resíduos de fosfoserina no dia 10 sugere o surgimento de outra classe de fosfatase, a qual poderia ser de origem materna, ou derivada do embrião. A VG- 2 de *P. americana* poderia ser um dos alvos desta fosfatase, visto que possui 4 *clusters* de serina, que seriam alvos potenciais de fosforilação (TUFAIL *et al.*, 2001). No dia 10, as duas classes de fosfatase poderiam ser responsáveis pela defosforilação das proteínas de vitelo.

A **Figura 10** confirmou o padrão de proteólise programada a partir do dia 6, como já havia sido demonstrado (STORELLA *et al.*, 1985). Observou-se que existem proteínas de

vitelo fosforiladas em resíduos de tirosina, e a defosforilação aparente destes resíduos sugere a ocorrência deste evento *in vivo*. De fato, as seqüências de VG-1 e VG-2 (precursores das VTs) possuem 45 e 93 resíduos de tirosina respectivamente, e alguns destes são alvos potenciais de fosforilação (TUFAIL *et al.*, 2000; TUFAIL *et al.*, 2001). No entanto, não foi possível a observação da defosforilação *in vitro* destas proteínas pela fosfatase, os resultados não foram reprodutíveis. Em *R. prolixus*, a vitelina é defosforilada durante a embriogênese (FIALHO *et al.*, 2002). Posteriormente, verificou-se que a proteólise da VT é bloqueada se a fosfatase for inibida, porém não foi observada uma relação direta com a defosforilação da VT, sugerindo fortemente que o alvo da fosfatase seria outra molécula, funcionando na regulação da proteólise (FIALHO *et al.*, 2005). Este dado demonstra que os alvos destas fosfatases podem não ser unicamente as proteínas de vitelo. O conhecimento de outras moléculas fosforiladas, que poderiam ser alvos potenciais seria de grande interesse para compreender a função destas enzimas, e conseqüentemente, compreender melhor os mecanismos envolvidos com a mobilização de vitelo durante a embriogênese.

Em *Drosophila melanogaster* e em *S. peregrina*, a proteína EDTP foi identificada no início do desenvolvimento embrionário (YAMAGUCHI *et al.*, 1999; YAMAGUCHI *et al.*, 2005). Esta tirosina fosfatase é expressa na ovogênese e no início da embriogênese destes insetos, sendo indispensáveis para formação normal do embrião. Em *S. peregrina*, os autores verificaram que esta proteína é altamente susceptível a protease do tipo catepsina-L, sendo degradada após a fase de blastoderme celular. Os dados destes dois modelos demonstram uma função para esta fosfatase no início da embriogênese, visto que mutações homozigóticas no gene são letais para o embrião, e esta função é desempenhada antes da sua degradação por uma cisteíno protease. Estes exemplos reforçam novamente a relação coordenada entre proteases e fosfatases durante o desenvolvimento embrionário de artrópodes.

A participação de mais de um tipo de protease na degradação de vitelo é observada em diversas espécies de artrópodes. No carrapato *R. (B.) microplus*, foram descritas duas proteases ácidas durante a embriogênese: uma aspartil protease (LOGULLO *et al.*, 1998) e uma cisteíno protease (SEIXAS *et al.*, 2003). Em *A. aegypti*, foram identificadas a VCP (serino carboxipeptidase vitelogênica) e a VCB (catepsina B vitelogênica), ambas ativas durante a embriogênese e estocadas em grânulos de vitelo, de origem materna, estando a VCB envolvida diretamente com a degradação da vitelina neste inseto (CHO *et al.*, 1991; CHO *et al.*, 1999). Em *B. mori* existe a descrição de serino e cisteíno proteases participando da degradação das proteínas de vitelo, e estas enzimas possuem aparentemente especificidade de substratos e atuação em momentos diferentes da embriogênese. (INDRASITH, IZUHARA *et al.*, 1988; YAMAMOTO *et al.*, 1993; MAKI e YAMASHITA, 2001). Nesta tese observou-se em *P. americana* que a atividade peptidásica foi mediada por dois tipos de proteases: Uma atividade cisteíno proteásica, inibida por E-64 e insensível ao CA 074 (sendo classificada como do tipo catepsina L), com funcionamento em pH ácido e que teve início no dia 3 após a postura; e por uma atividade serino proteásica, com funcionamento em pH neutro e que teve início mais tardio (a partir do dia 6) (**Figuras 11 e 12**). A atividade tipo cisteíno protease atingiu níveis basais no dia 3, no entanto esta atividade foi aumentada ao ser pré-incubada em pH ácido (**Figura 15**). Cisteíno proteases pertencentes à família C1 (Papaína) são sintetizadas como zimogênios, e sofrem auto-ativação após exposição a pH ácido (MCGRATH, 1999). Neste sentido, é possível que cisteíno proteases que degradam o vitelo sejam sintetizadas e mantidas como precursores inativos, até que sofram ativação após acidificação dos YG. Em *B. germanica*, a cisteíno protease encontrada nos grânulos apresenta este perfil de ativação *in vivo* e *in vitro* após acidificação dos grânulos (LIU *et al.*, 1996). A cisteíno protease de *B. mori* é sintetizada maternalmente como um precursor, e é acumulada em YG pequenos durante a ovogênese (YAMAMOTO *et al.*, 2000), sendo ativados por acidificação durante a

embriogênese (YAMAHAMA *et al.*, 2003). No modelo *C. morosus*, a cisteína protease é encontrada em poucos YG e durante a embriogênese, a maioria dos YG está ativo proteoliticamente (FAUSTO *et al.*, 2001), sugerindo uma passagem destas enzimas a outros YG durante o desenvolvimento embrionário. Baseado nestes dados sugere-se que a acidificação dos YG de *P. americana* seja um mecanismo necessário para a ativação da proteólise do vitelo durante o início da embriogênese.

A localização da atividade proteásica em YG do dia 6 mostrou que os YG de tamanhos pequeno e grande possuíam proteases ativas (**Figura 13**). Durante o início da embriogênese de *P. americana*, populações de YG pequenos são acidificados e, posteriormente, se fundem a YG grandes, mediado por mudança nos níveis de Ca^{+2} intracelular (RAMOS *et al.*, 2006). Em *R. prolixus*, a fusão de YG mediada pelos níveis de Ca^{+2} intracelular modificados se mostrou importante para a transferência da fosfatase ácida e de próton-pirofosfatase de YG pequenos para YG grandes (RAMOS *et al.*, 2007) (**Anexo 03**). No dia 6 os YG já sofreram acidificação e fusão. A detecção de proteases em suspensão de YG de *P. americana* de ootecas do dias anteriores não foi obtida, a atividade proteásica foi muito baixa nestes ovos, e a detecção por microscopia não foi realizada. Devido a isto, não foi possível afirmar se a cisteína protease é encontrada inicialmente em YG pequenos e transferida após fusão, ou a distribuição da enzima é homogênea entre as diferentes populações de YG.

A investigação da proteólise *in vitro* das VTs a partir da cisteína protease (proteólise ácida) demonstrou que esta enzima não foi capaz de degradar as proteínas (**Figura 16**). Entretanto, a pré-incubação desta amostra de VT com a preparação de fosfatase ácida tornou estas proteínas susceptíveis à degradação pela cisteína protease (**Figura 17**). Este resultado indica que a proteólise ácida *in vitro* é dependente do funcionamento da fosfatase ácida. Esta cooperação entre as hidrolases foi sugerida em *B. germanica* (PURCELL *et al.*, 1988), e

demonstrada em *R. prolixus* como discutido anteriormente, e no carrapato *B. microplus* (SILVEIRA *et al.*, 2006), entre as aspartil proteases e fosfatases ácidas nos dois modelos. Se a atividade da fosfatase ácida é especificamente sobre as VTs, ou sobre alguma outra molécula presente em quaisquer das amostras, não poderia ser afirmado, tendo em vista que as amostras utilizadas nestes experimentos não estavam purificadas. O mecanismo exato de fosforilação ou defosforilação, e a participação destas moléculas na regulação da proteólise ainda necessitam de definição. Este trabalho apresentou a primeira descrição de cooperação entre uma cisteíno protease e fosfatase ácida na proteólise durante a embriogênese inicial de inseto (OLIVEIRA *et al.*, 2008) (**Anexo 02**).

A atividade serino proteásica foi detectada a partir do dia 6 após a postura, aumentando os níveis em aproximadamente seis vezes do dia 6 ao dia 10 (**Figura 18**). Esta atividade foi classificada como serino protease, semelhante à família S1 (quimiotripsina), devido à inibição por aprotinina. A enzima encontrada na preparação em pH neutro de ooteca do dia 6 foi pouco eficiente na proteólise das VTs, como observado na **Figura 19**. Este perfil proteolítico não foi alterado após a pré-incubação com a fosfatase ácida. Em *B. mori*, a serino protease que degrada especificamente as proteínas de 30 kDa (protease 30KP) é sintetizada no final da embriogênese pelo embrião, e é encontrada no trato digestivo da lagarta recém-eclodida (MAKI e YAMASHITA, 2001), enquanto a cisteíno protease é ativada por acidificação no início da embriogênese (YAMAHAMA *et al.*, 2003). Baseado em dados da literatura e nos resultados apresentados nesta tese, é possível afirmar que a cisteíno protease e a serino protease possuem dinâmicas de ativação distintas durante a embriogênese, a primeira sendo ativada por pH ácido e a segunda se tornando ativa posteriormente.

O padrão de proteólise ácida *in vitro* mostrou dois polipeptídeos sofrendo degradação: aproximadamente 100 e 45 kDa, segundo comparação por padrão de peso molecular (**Figura 17 A**). Apenas um polipeptídeo (aproximadamente 130 kDa) foi degradado parcialmente, na

proteólise em pH neutro *in vitro* (**Figura 19**). Este dado é interessante, tendo em vista que o peso molecular destes polipeptídeos se assemelha aos de subunidades das VTs 1 e 2 encontrados em ootecas e ovários de *P. americana* (TUFAIL *et al.*, 2001). Isto indicou que os alvos de proteólise observados *in vitro* são semelhantes aos alvos da proteólise *in vivo* (STORELLA *et al.*, 1985).

Na segunda parte experimental desta tese, estudou-se o desenvolvimento embrionário de *A. gemmatalis*. Esta espécie de Lepidoptera é uma das pragas agrícolas mais importantes no Brasil, e o controle da lagarta tem sido realizado a partir do manejo integrado, reduzindo a utilização de agentes químicos e favorecendo o uso do controle biológico, principalmente a partir do Baculovírus Anticarsia (HOFFMANN-CAMPO *et al.*, 2000). Entretanto, poucos estudos tratam dos aspectos biológicos deste inseto, tendo em vista a importância agrícola. Não são conhecidos trabalhos que abordem aspectos bioquímicos dos eventos reprodutivos, sequer ovogênese ou embriogênese desta espécie.

Neste sentido, a presença de uma atividade fosfatásica ácida foi demonstrada durante o desenvolvimento embrionário (**Figura 20**), que tem duração aproximada entre 3 e 4 dias após a postura do ovo no campo. A atividade foi detectada desde o início da embriogênese, tendo nível máximo em ovos de 21 horas. Após este dado momento, a atividade diminuiu a níveis basais, sugerindo que a enzima possa ter origem materna, e funcionamento no início da embriogênese, semelhante ao que ocorre com a espécie de mosca *S. peregrina* (YAMAGUCHI *et al.*, 1999).

A atividade fosfatásica em ovos de 0 a 24 horas teve funcionamento máximo em pH 5,5 e pH 6,5, sugerindo a existência de mais de uma classe de fosfatase nesta preparação (**Figura 21 A**). Fosfatases alcalinas foram clonadas a partir de intestinos de lagartas de *B. mori* (ITOHO *et al.*, 1999). O perfil da atividade com dois picos poderia ser efeito da

sobreposição entre as atividades da fosfatase ácida e de uma provável fosfatase alcalina intestinal do embrião. Resultados preliminares indicaram a presença de fosfatases alcalinas do intestino de lagartas de *A. gemmatalis*, semelhante ao que ocorre em *B. mori*.

As etapas de separação de proteínas utilizadas neste trabalho indicam que houve uma purificação parcial da AcP em ovos de 0 a 24 horas, com um enriquecimento da enzima de aproximadamente 40 X (**Tabela 3**). Outras etapas seriam necessárias para o isolamento da enzima, tendo em vista que a amostra AcP foi composta de algumas proteínas diferentes (observadas no gel em SDS-PAGE, **Figura 22 B**). Entretanto, a atividade estava concentrada num determinado ponto da cromatografia (entre as frações 30 e 32) (**Figura 22 A**), sugerindo que a atividade detectada foi desempenhada por uma única fosfatase ácida, ou isoformas de mesmo peso molecular (devido ao tempo de retenção na coluna).

Esta enzima teve o peso molecular aproximado determinado (45 kDa) (**Figura 26**), classificando a enzima como de baixo peso molecular (< 100 kDa). Este peso molecular é semelhante ao descrito para fosfatase ácida encontrada em músculo de ratos (SAFADI *et al.*, 1997), em matriz óssea bovina (LAU *et al.*, 1987), e nos ovos de *R. prolixus* (FIALHO *et al.*, 2002) e *B. microplus* (SILVEIRA *et al.*, 2006).

As análises dos parâmetros bioquímicos da AcP utilizando o pNPP como substrato mostraram que a enzima parcialmente purificada tem atividade máxima em pH 4,0 (**Figura 23**). Este resultado foi similar a outras fosfatases ácidas de invertebrados (STUBBERUD *et al.*, 2000; FIALHO *et al.*, 2002; JING *et al.*, 2006; OLIVEIRA e MACHADO, 2006). A termorresistência foi observada em algumas fosfatases ácidas descritas, como em sementes de soja (FERREIRA *et al.*, 1998) ou em vesículas seminais de porco (WYSOCKI e STRZEZEK, 2003). A inativação da AcP após a pré-incubação por 15 minutos em temperaturas mais altas (55 °C e 70 °C) indica que a enzima de ovos de *A. gemmatalis* é termo susceptível (**Figura 25**).

Utilizando *p*NPP como substrato, a velocidade de reação da AcP foi constante até 120 minutos de reação (**Figura 24**). Após este tempo, a velocidade diminuiu progressivamente até o intervalo de tempo de 480 minutos. A curva de concentração de *p*NPP permitiu a determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} (0,32 mM *p*NPP e 6,13 nM *p*NP x s⁻¹, respectivamente (**Figura 27**). Estes resultados foram obtidos com o intuito de caracterizar bioquimicamente a AcP. Os dados produzidos demonstram que a enzima possuiu baixa afinidade pelo substrato sintético nas condições analisadas, semelhante ao descrito para a AP-II de molusco (JING *et al.*, 2006).

A classificação da AcP foi determinada a partir de testes com inibidores específicos (**Tabela 04**). NaF e fosfato de potássio inibiram a enzima de forma dose dependente. Entretanto, a atividade foi totalmente inibida na presença de molibdato e tartarato, além do vanadato (inibiu 95 % da atividade). O tartarato é um inibidor de fosfatase lisosomal, e é utilizado para classificar estas enzimas. Neste caso, a AcP se mostrou sensível ao tartarato, não sendo classificada como um tipo de TRAP (*Tartrate Resistant Acid Phosphatase*) (ODDIE *et al.*, 2000). A inibição potente da AcP por molibdato e vanadato classificaram a enzima como tirosina fosfatase (GORDON, 1991). Juntos, estes dados indicaram que a enzima é uma tirosina fosfatase acídica, semelhante à de ovócitos de *P. americana* (OLIVEIRA e MACHADO, 2006) e à de ovos de *B. microplus*, já comentada anteriormente. Os inibidores de fosfatase alcalina (levamisol e tetramisol), ou de fosfodiesterase (cafeína) não modularam a AcP.

A atividade da AcP de *A. gemmatalis* utilizando moléculas fosforiladas como substrato foi determinada (**Figura 28**). Observou-se a preferência da enzima por fosfotirosina em relação aos fosfoaminoácidos testados, confirmando a classificação da enzima como tirosina fosfatase. Outros substratos como ATP, Poli P-3 e PPi foram defosforilados com menor intensidade pela enzima, indicando que estas moléculas poderiam ser substratos endógenos da

AcP. Polímeros de fosfato como Poli P-3 são poliânions ligantes de cálcio, sendo encontrados nos mais diversos tipos celulares (BROWN *et al.*, 2004). O conteúdo de Poli P endógeno foi modificado durante a embriogênese de *R. (B) microplus*, e esta variação foi relacionada à demanda energética do embrião (CAMPOS *et al.*, 2007). Além desta função, já foi identificada a influência destes compostos fosforilados na modulação da atividade aspartil proteásica em extrato de baço bovino, aumentando a atividade (WATABE *et al.*, 1979). Recentemente o grupo de pesquisa do Dr. Ednildo Machado demonstrou que a aspartil protease que degrada o vitelo de *R. prolixus* poderiam ser moduladas negativamente por polímeros de fosfato, de forma que a atividade da fosfatase ácida sobre estes polímeros poderia estar relacionada com o controle da degradação do vitelo neste inseto. A detecção destes polímeros de fosfato em ovos de *A. gemmatalis*, e a influência das mesmas na mobilização do vitelo seriam interessantes, no intuito de compreender os mecanismos regulatórios deste evento neste outro inseto.

O perfil das proteínas de vitelo durante a embriogênese de *A. gemmatalis* foi demonstrado na **Figura 29**. Este resultado mostrou que a degradação endógena das proteínas de vitelo foi tardia, e o perfil de proteólise foi parcial. Este perfil é semelhante ao observado em outras espécies de Lepidoptera, como em *B. mori* (INDRASITH *et al.*, 1987) e *Antheraea Yamamai* (FURUSAWA *et al.*, 1993). Apesar de não haver descrição de VT em *A. gemmatalis*, foram observadas algumas proteínas majoritárias, de alto peso molecular. Estas proteínas foram parcialmente degradadas durante a embriogênese, reforçando a hipótese de serem estas proteínas subunidades de VT. A caracterização das proteínas de vitelo seria de grande auxílio para a determinação exata da mobilização de reservas protéicas neste inseto.

Tendo em vista que a AcP foi classificada como tirosina fosfatase, o perfil de proteínas fosforiladas em tirosina durante o desenvolvimento embrionário foi demonstrado na **Figura 30**. Observou-se algumas proteínas fosforiladas, sendo uma proteína de cerca de 90

kDa fortemente marcada. Não houve um padrão de defosforilação em todas as proteínas marcadas ao longo da embriogênese, sendo que esta proteína foi defosforilada parcialmente. Algumas proteínas de baixo peso molecular foram fosforiladas no início da embriogênese. Em *B. mori*, é sugerido que a fosforilação das proteínas de vitelo promovem o acesso da protease a estas proteínas, favorecendo o início da proteólise durante a embriogênese (YAMAMOTO e TAKAHASHI, 1993). A presença de uma caseína cinase II na embriogênese de *R. prolixus* foi demonstrada (FIALHO *et al.*, 1999). Esta enzima foi capaz de fosforilar a VT no início da embriogênese, e a diminuição da atividade foi temporalmente correlacionada ao início da proteólise. Estes dados juntos indicam a possibilidade de algumas proteínas de vitelo de *A. gemmatalis* serem fosforiladas em tirosina no início da embriogênese, e este efeito favoreceria a proteólise. Os testes de defosforilação de proteínas de ovo de *A. gemmatalis* pela AcP não foram conclusivos, sugerindo que a AcP funcione para alvos distintos, como ocorre em *R. prolixus* (FIALHO *et al.*, 2005).

A determinação da atividade peptidásica em ovos de 0 a 24 horas demonstrou a existência de uma atividade tipo cisteíno protease (em pH ácido, inibida totalmente por E-64) (**Figura 31**). Este resultado foi interessante, demonstrando a existência de uma protease ácida no início da embriogênese. A existência de cisteíno proteases em outros Lepidoptera foram relatadas (KAGEYAMA *et al.*, 1990; ZHAO *et al.*, 1996). Em *Helicoverpa armigera*, um lepidóptero noctuídeo, a protease tipo Catepsina B de ovário foi clonada e caracterizada (ZHAO *et al.*, 2002), e a expressão da enzima foi identificada no corpo gorduroso, ovários e ovos durante o desenvolvimento embrionário deste inseto, sendo localizada em YG (ZHAO *et al.*, 2005). Esta enzima foi capaz de degradar a vitelina *in vitro*, sugerindo seu funcionamento na degradação do vitelo.

Tendo em vista a cooperação entre a fosfatase ácida e a cisteíno protease em *P. americana*, demonstrada previamente nesta tese, e a presença de uma atividade tipo cisteíno

protease, o efeito da AcP sobre a proteólise ácida *in vitro* em proteínas de ovo de *A. gemmatalis* foi estudado (**Figura 32**). Este resultado indicou que a presença da AcP parcialmente purificada favoreceu a proteólise ácida, e inibidores (de fosfatase e de cisteíno protease) bloquearam este efeito. Este resultado demonstrou a existência de uma cooperação, *in vitro*, entre estas atividades na degradação parcial de proteínas presentes em ovos deste inseto. O estudo da atividade tipo cisteíno protease identificada em ovos de *A. gemmatalis* iniciado nesta tese, assim como a correlação da AcP com esta protease e suas atribuições durante a embriogênese certamente irá favorecer a compreensão da degradação do vitelo neste inseto. Ampliar os conhecimentos a respeito da embriogênese poderá beneficiar a utilização de novos mecanismos de controle deste inseto-praga de soja.

6 Conclusões

Como conclusões desta tese, destacam-se a identificação e caracterização de uma fosfatase ácida e de duas classes de protease durante a embriogênese inicial de *P. americana*: Uma cisteíno protease da família C1 (tipo Papaína), ativada por pH ácido, classificada como do tipo catepsina-L. A atividade proteásica localizou-se em YG pequenos e grandes no dia 6 após a postura. A serino protease da família S1 (tipo quimotripsina) foi inibida por aprotinina. A AcP favoreceu a proteólise mediada pela cisteíno protease *in vitro*, o que não ocorreu para a proteólise em pH neutro, mediada pela serino protease. Em *A. gemmatilis*, foi demonstrado o perfil de proteólise e de proteínas fosforiladas em tirosina durante a embriogênese, e a atividade fosfatásica ácida foi determinada nesta fase. A fosfatase ácida presente em ovos de 0 a 24 horas foi purificada parcialmente, teve peso molecular aproximado de 45 kDa. Esta enzima foi classificada como tirosina fosfatase acídica, através de inibidores específicos de atividade contra substratos fosforilados. Verificou-se a presença de uma atividade tipo cisteíno protease em ovos de 0 a 24 horas, e o favorecimento da proteólise ácida *in vitro* mediado pela AcP indicam haver uma cooperação entre as hidrolases, semelhante ao observado durante a embriogênese inicial de *P. americana*. Foi possível observar que a atividade fosfatásica mantém características semelhantes nos dois modelos de inseto, ainda que pertencentes a ordens distantes evolutivamente. Nos dois modelos analisados, a fosfatase tem perfil ácido, com preferência por fosfotirosina, e inibição por tartarato, vanadato, NaF e molibdato, além de possuir níveis de atividade em momentos semelhantes da embriogênese nos insetos testados.

7 Referências Bibliográficas

ABREU, L. A., *et al.* Proteolytic activity of *Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v.34, n.5, May, p.443-9. 2004.

ANDERSON, E. Oocyte Differentiation and Vitellogenesis in the Roach *Periplaneta americana*. Journal of Cell Biology, v.20, Jan, p.131-55. 1964.

ARAÚJO, P. S., MIES, V. e MIRANDA, O. Subcellular distribution of low- and high-molecular weight acid phosphatases. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology, v.452, n.1, p.121-130. 1976.

ARLIAN, L. G. Arthropod allergens and human health. Annual Review of Entomology, v.47, p.395-433. 2002.

BAKALARA, N., *et al.* Purification, cloning, and characterization of an acidic ectoprotein phosphatase differentially expressed in the infectious bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. Journal of Biological Chemistry, v.275, n.12, Mar 24, p.8863-71. 2000.

BELL, W. e ADIYODI, K. The American Cockroach
Londres: Chapman and Hall. 1981

BERRY, S. J. Maternal Direction of Oogenesis and Early Embryogenesis in Insects. Annual Review of Entomology, v.27, n.1, p.205-227. 1982.

BLAGBURN, J. M. e SATTELLE, D. B. Nicotinic acetylcholine receptors on a cholinergic nerve terminal in the cockroach, *Periplaneta americana*. Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology, v.161, n.2, Aug, p.215-25. 1987.

BLAGOEV, B., *et al.* Temporal analysis of phosphotyrosine-dependent signaling networks by quantitative proteomics. Nature Biotechnology, v.22, n.9, Sep, p.1139-45. 2004.

BOUTS, D. M., *et al.* Biochemical properties of the major proteins from *Rhodnius prolixus* eggshell. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v.37, n.11, Nov, p.1207-21. 2007.

BRITTON, C. e MURRAY, L. Cathepsin L protease (CPL-1) is essential for yolk processing during embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. Journal of Cell Science, v.117, n.Pt 21, Oct 1, p.5133-43. 2004.

BROWN, M. R. e KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.101, n.46, Nov 16, p.16085-7. 2004.

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.

CHAPMAN, R. F. Insects: Structure and Function London: The English Language Book Society. 1982

CHEN, X., *et al.* Isolation, cloning, and expression of an acid phosphatase containing phosphotyrosyl phosphatase activity from *Prevotella intermedia*. Journal of Bacteriology, v.181, n.22, Nov, p.7107-14. 1999.

CHO, W. L., DEITSCH, K. W. e RAIKHEL, A. S. An extraovarian protein accumulated in mosquito oocytes is a carboxypeptidase activated in embryos. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.88, n.23, Dec 1, p.10821-4. 1991.

CHO, W. L., *et al.* Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. Journal of Biological Chemistry, v.274, n.19, May 7, p.13311-21. 1999.

COUNCE, S. J. The Analysis of Insect Embryogenesis. Annual Review of Entomology, v.6, n.1, p.295-312. 1961.

DE DUVE, C. e WATTIAUX, R. Functions of Lysosomes. Annual Review of Physiology, v.28, n.1, p.435-492. 1966.

DEN HERTOOG, J. Protein-tyrosine phosphatases in development. Mechanisms of Development, v.85, n.1-2, Jul, p.3-14. 1999.

DUNN, M. J. e CRISP, S. J. Detection of proteins in polyacrylamide gels using an ultrasensitive silver staining technique. Methods in Molecular Biology, v.32, p.113-8. 1994.

FAGOTTO, F. Yolk degradation in tick eggs: I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v.14, n.4, p.217-35. 1990a.

_____. Yolk degradation in tick eggs: II. Evidence that cathepsin L-like proteinase is stored as a latent, acid-activable proenzyme. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v.14, n.4, p.237-52. 1990b.

_____. Yolk degradation in tick eggs: III. Developmentally regulated acidification of yolk spheres. . Develop. Growth and Differ., v.33, p.57-66. 1991.

_____. 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.

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.

FERREIRA, C. V., *et al.* Soybean seed acid phosphatases: unusual optimum temperature and thermal stability studies. Biochemical and Biophysical Research Communications, v.242, n.2, Jan 14, p.282-6. 1998.

FIALHO, E., MASUDA, H. e SILVA-NETO, M. A. Protein phosphorylation during *Rhodnius prolixus* embryogenesis: protein kinase casein kinase II activity. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v.29, n.3, Mar, p.215-23. 1999.

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.

_____. Oocyte fertilization triggers acid phosphatase activity during *Rhodnius prolixus* embryogenesis. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v.32, n.8, p.871-880. 2002.

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

FITZPATRICK, K. A., *et al.* Expression of protein tyrosine phosphatase genes during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. Mechanisms of Development, v.53, n.2, Oct, p.171-83. 1995.

FUGI, C. G. Q. Aspectos Biológicos de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 em genótipos de soja com diferentes graus de resistência a insetos. (Dissertação). Instituto Agrônomo Campinas, 2003. 59 p.

FURUSAWA, T., *et al.* Stage-dependent limited degradation of vitellin and its localization in the Japanese oak silkworm, *Anthereae yamamai*, during embryonic development. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v.104, n.4, p.787-794. 1993.

GAZZONI, D. L. Manejo de Pragas de Soja: Uma abordagem histórica. EMBRAPA - Serviço de Produção de Informação. Brasília, DF. 1994

GILBERT, S. F. Developmental Biology. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 2000

GIORGI, F., BRADLEY, J. T. e NORDIN, J. H. Differential vitellin polypeptide processing in insect embryos. Micron, v.30, n.6, p.579-596. 1999.

GORDON, J. A. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. Methods in Enzymology, v.201, p.477-82. 1991.

GURANOWSKI, A. Fluoride is a strong and specific inhibitor of (asymmetrical) Ap4A hydrolases. FEBS Letters, v.262, n.2, Mar 26, p.205-8. 1990.

HOFFMAN-CAMPO, C. B. H., OLIVEIRA, E. B. e MOSCARDI, F. Criação Massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*). Embrapa, CNPSo. Londrina, p.23. 1985

HOFFMANN-CAMPO, C. B., *et al.* Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. Londrina, p.70. 2000

IKEDA, M., *et al.* cDNA cloning, sequencing and temporal expression of the protease responsible for vitellin degradation in the silkworm, *Bombyx mori*. Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry, v.99, n.2, p.405-11. 1991.

INDRASITH, L. S., *et al.* Limited degradation of vitellin and egg-specific protein in *Bombyx* eggs during embryogenesis. Insect Biochemistry, v.17, n.4, p.539-545. 1987.

_____. In vitro translation of the protease catalyzing *Bombyx mori* egg-specific protein and identification of a nascent peptide with biological activity. Archives of Biochemistry and Biophysics, v.267, n.1, Nov 15, p.328-33. 1988.

INDRASITH, L. S., SASAKI, T. e YAMASHITA, O. A unique protease responsible for selective degradation of a yolk protein in *Bombyx mori*. Purification, characterization, and cleavage profile. Journal of Biological Chemistry, v.263, n.2, Jan 15, p.1045-51. 1988.

INGEBRITSEN, T. S. e COHEN, P. Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. Science, v.221, n.4608, Jul 22, p.331-8. 1983.

ITOH, M., *et al.* Cloning of soluble alkaline phosphatase cDNA and molecular basis of the polymorphic nature in alkaline phosphatase isozymes of *Bombyx mori* midgut. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v.29, n.2, Feb, p.121-9. 1999.

JING, G., *et al.* Purification and partial characterization of two acid phosphatase forms from pearl oyster (*Pinctada fucata*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology, v.143, n.2, Feb, p.229-35. 2006.

KAGEYAMA, T. e TAKAHASHI, S. Y. Purification and characterization of a cysteine proteinase from silkworm eggs. European Journal of Biochemistry, v.193, n.1, Oct 5, p.203-10. 1990.

KAWAMOTO, M., FUJIWARA, A. e YASUMASU, I. Changes in the activities of protein phosphatase type 1 and type 2A in sea urchin embryos during early development. Development Growth and Differentiation, v.42, n.4, Aug, p.395-405. 2000.

KAWOOYA, J. K., OSIR, E. O. e LAW, J. H. Physical and chemical properties of microvitellogenin. A protein from the egg of the tobacco hornworm moth, *Manduca sexta*. Journal of Biological Chemistry, v.261, n.23, August 15, 1986, p.10844-10849. 1986.

KIM, H. R. e SANG DAE, L. Purification and characterization of vitellin-2 from the ovary of the American cockroach, *Periplaneta americana*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v.108, n.1, p.135-145. 1994.

KIM, J. H., *et al.* Effects of metal ions on the activity of protein tyrosine phosphatase VHR: highly potent and reversible oxidative inactivation by Cu²⁺ ion. Archives of Biochemistry and Biophysics, v.382, n.1, Oct 1, p.72-80. 2000.

KWON, J. Y., *et al.* Molecular characterization of putative yolk processing enzymes and their expression during oogenesis and embryogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biology of Reproduction, v.65, n.6, Dec, p.1701-9. 2001.

LAU, K. H., FREEMAN, T. K. e BAYLINK, D. J. Purification and characterization of an acid phosphatase that displays phosphotyrosyl-protein phosphatase activity from bovine cortical bone matrix. Journal of Biological Chemistry, v.262, n.3, Jan 25, p.1389-97. 1987.

LEMANSKI, L. F. e ALDOROTY, R. Role of acid phosphatase in the breakdown of yolk platelets in developing amphibian embryos. Journal of Morphology, v.153, p.419-426. 1977.

LENOIR-ROUSSEAU, J. J. e LENDER, T. Table de développement embryonnaire de *Periplaneta americana* (L.) Insecte, Dictyoptère. Bulletin de la Société Zoologique de France, v.95, n.04, p.737-751. 1970.

LIMA, A. P., *et al.* Cysteine protease isoforms from *Trypanosoma cruzi*, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility to inhibitors. Molecular and Biochemical Parasitology, v.114, n.1, Apr 25, p.41-52. 2001.

LIU, X., MCCARRON, R. C. e NORDIN, J. H. A cysteine protease that processes insect vitellin. Purification and partial characterization of the enzyme and the proenzyme. Journal of Biological Chemistry, v.271, n.52, Dec 27, p.33344-51. 1996.

LOGULLO, C., *et al.* Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. Parasitology, v.116 (Pt 6), Jun, p.525-32. 1998.

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.

MAGRINI, E. A., BOTELHO, P. S. M. e SILVEIRA NETO, S. Biologia de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura da soja: sciELO. 56: 547-555 p. 1999.

MAKI, N. e YAMASHITA, O. The 30kP protease A responsible for 30-kDa yolk protein degradation of the silkworm, *Bombyx mori*: cDNA structure, developmental change and regulation by feeding. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v.31, n.4-5, Mar 15, p.407-13. 2001.

MALLYA, S. K., *et al.* Proteolysis of the major yolk glycoproteins is regulated by acidification of the yolk platelets in sea urchin embryos. Journal of Cell Biology, v.117, n.6, Jun, p.1211-21. 1992.

- MCGRATH, M. E. The Lysosomal Cysteine Proteases. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, v.28, n.1, p.181-204. 1999.
- MEDINA, M., LEON, P. e VALLEJO, C. G. *Drosophila* cathepsin B-like proteinase: a suggested role in yolk degradation. Archives of Biochemistry and Biophysics, v.263, n.2, Jun, p.355-63. 1988.
- MEDINA, M. e VALLEJO, C. G. A Serine Proteinase in *Drosophila* Embryos: Yolk localization and developmental activation. Insect Biochemistry, v.19, n.7, p.687-691. 1989.
- 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.
- NORDIN, J. H., BEAUDOIN, E. L. e LIU, X. Proteolytic processing of *Blattella germanica* vitellin during early embryo development. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v.15, n.3, p.119-135. 1990.
- NUSSENZVEIG, R. H., OLIVEIRA, P. L. e MASUDA, H. 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.
- ODDIE, G. W., *et al.* Structure, function, and regulation of tartrate-resistant acid phosphatase. Bone, v.27, n.5, Nov, p.575-84. 2000.
- OLIVEIRA, D. M. e MACHADO, E. A. Characterization of a tyrosine phosphatase activity in the oogenesis of *Periplaneta americana*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v.63, n.1, Sep, p.24-35. 2006.
- OLIVEIRA, D. M., *et al.* Interplay between acid phosphatase and cysteine proteases in mediating vitellin degradation during early embryogenesis of *Periplaneta americana*. Journal of Insect Physiology, v.54, n.5, May, p.883-891. 2008.
- PAGANELLI, C. Baratas urbanas: Biologia e controle., p.26. 1997
- PENEFSKY, H. S. Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. Journal of Biological Chemistry, v.252, n.9, May 10, p.2891-9. 1977.
- PERKINS, L. A., LARSEN, I. e PERRIMON, N. *corkscrew* encodes a putative protein tyrosine phosphatase that functions to transduce the terminal signal from the receptor tyrosine kinase torso. Cell, v.70, n.2, Jul 24, p.225-36. 1992.
- POLGÁR, L. The catalytic triad of serine peptidases. Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS), v.62, n.19, p.2161-2172. 2005.
- PURCELL, J. P., *et al.* Correlation of yolk phosphatase expression with the programmed proteolysis of vitellin in *Blattella germanica* during embryonic development. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v.9, n.3, p.237-250. 1988.
- RAIKHEL, A. S. e DHADIALLA, T. S. 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. 2007.

RAWLINGS, N. D., *et al.* MEROPS: the peptidase database. Nucleic Acids Research, v.36, n.suppl_1, January 11, 2008, p.D320-325. 2008.

RIBOLLA, P. E., BIJOVSKY, A. T. e DE BIANCHI, A. G. Procathepsin and acid phosphatase are stored in *Musca domestica* yolk spheres. Journal of Insect Physiology, v.47, n.3, Mar, p.225-232. 2001.

RIBOLLA, P. E. M., DAFFRE, S. e DE BIANCHI, A. G. Cathepsin B and acid phosphatase activities during *Musca domestica* embryogenesis. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v.23, n.2, p.217-223. 1993.

RUST, M. K., REIERSON, D. A. e HANSGEN, K. H. Control of American cockroaches (Dictyoptera: Blattidae) in sewers. Journal of Medical Entomology, v.28, n.2, Mar, p.210-3. 1991.

SAFADI, A., LIVNE, E. e REZNICK, A. Z. Characterization of alkaline and acid phosphatases from skeletal muscles of young and old rats. Archives of Gerontology and Geriatrics, v.24, n.2, Mar-Apr, p.183-96. 1997.

SCHELL, D., STIERHOF, Y. D. e OVERATH, P. Purification and characterization of a tartrate-sensitive acid phosphatase of *Trypanosoma brucei*. FEBS Letters, v.271, n.1-2, Oct 1, p.67-70. 1990.

SEIXAS, A., *et al.* A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. Parasitology, v.126, n.Pt 2, Feb, p.155-63. 2003.

SHENG, Z. e CHARBONNEAU, H. The baculovirus *Autographa californica* encodes a protein tyrosine phosphatase. Journal of Biological Chemistry, v.268, n.7, Mar 5, p.4728-33. 1993.

SILVEIRA, A. B., *et al.* Tick vitellin is dephosphorylated by a protein tyrosine phosphatase during egg development: Effect of dephosphorylation on VT proteolysis. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v.36, n.3, p.200-209. 2006.

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

SNIGIREVSKAYA, E. S., SAPPINGTON, T. W. e RAIKHEL, A. S. Internalization and recycling of vitellogenin receptor in the mosquito oocyte. Cell and Tissue Research, v.290, n.1, Oct, p.175-83. 1997.

SPECHT, A., SILVA, E. J. E. e LINK, D. Owllet Moth (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE) of Museu Entomológico Ceslau Biezanko, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, RS. Revista Brasileira de Agrociência, v.10, n.4, p.389-409. 2004.

STOKER, A. W. Receptor tyrosine phosphatases in axon growth and guidance. Current Opinion in Neurobiology, v.11, n.1, Feb, p.95-102. 2001.

STORELLA, J. R., WOJCHOWSKI, D. M. e KUNKEL, J. G. Structure and embryonic degradation of two native vitellins in the cockroach, *Periplaneta americana*. Insect Biochemistry, v.15, n.2, p.259-275. 1985.

STUBBERUD, H. E., HONSI, T. G. e STENERSEN, J. Purification and partial characterisation of tentatively classified acid phosphatase from the earthworm *Eisenia veneta*. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology, v.126, n.4, Aug, p.487-94. 2000.

SUGIMOTO, Y., *et al.* Comparison of egg and embryo proteins and a trial to detect proteolytic activities in eggs of *Bombyx mori*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v.96, n.2, p.253-256. 1990.

THEODOSIOU, A. e ASHWORTH, A. MAP kinase phosphatases. Genome Biology, v.3, n.7, p.reviews3009.1 - reviews3009.10. 2002.

TUFAIL, M., HATAKEYAMA, M. e TAKEDA, M. Molecular evidence for two vitellogenin genes and processing of vitellogenins in the American cockroach, *Periplaneta americana*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v.48, n.2, p.72-80. 2001.

TUFAIL, M., *et al.* Cloning of vitellogenin cDNA of the American cockroach, *Periplaneta americana* (Dictyoptera), and its structural and expression analyses. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v.45, n.1, p.37-46. 2000.

TURK, V., TURK, B. e TURK, D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. EMBO Journal, v.20, n.17, Sep 3, p.4629-33. 2001.

TURNIPSEED, S. G. e KOGAN, M. Soybean Entomology. Annual Review of Entomology, v.21, p.247-282. 1976.

UCHIDA, K., *et al.* Preoviposition activation of cathepsin-like proteinases in degenerating ovarian follicles of the mosquito *Culex pipiens pallens*. Developmental Biology, v.237, n.1, Sep 1, p.68-78. 2001.

ULLAH, A. H. e GIBSON, D. M. Purification and characterization of acid phosphatase from cotyledons of germinating soybean seeds. Archives of Biochemistry and Biophysics, v.260, n.2, Feb 1, p.514-20. 1988.

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.

VIHKO, P., *et al.* Rat acid phosphatase: overexpression of active, secreted enzyme by recombinant baculovirus-infected insect cells, molecular properties, and crystallization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.90, n.3, Feb 1, p.799-803. 1993.

VILLAFRANCA, J. E., KISSINGER, C. R. e PARGE, H. E. Protein serine/threonine phosphatases. Current Opinion in Biotechnology, v.7, n.4, Aug, p.397-402. 1996.

WALTON, K. M. e DIXON, J. E. Protein tyrosine phosphatases. Annual Review of Biochemistry, v.62, p.101-20. 1993.

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.

WIMMER, M., *et al.* *Ascaris suum*: protein phosphotyrosine phosphatases in oocytes and developing stages. Experimental Parasitology, v.88, n.2, Feb, p.139-45. 1998.

WO, Y. Y., *et al.* Sequencing, cloning, and expression of human red cell-type acid phosphatase, a cytoplasmic phosphotyrosyl protein phosphatase. Journal of Biological Chemistry, v.267, n.15, May 25, p.10856-65. 1992.

WYSOCKI, P. e STRZEZEK, J. Purification and characterization of a protein tyrosine acid phosphatase from boar seminal vesicle glands. Theriogenology, v.59, n.3-4, Feb, p.1011-25. 2003.

YAMAGUCHI, S., HOMMA, K. e NATORI, S. A novel egg-derived tyrosine phosphatase, EDTP, that participates in the embryogenesis of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). European Journal of Biochemistry, v.259, n.3, Feb, p.946-53. 1999.

YAMAGUCHI, S., *et al.* Involvement of EDTP, an Egg-Derived Tyrosine Phosphatase, in the Early Development of *Drosophila melanogaster*. Journal of Biochemistry (Tokyo), v.138, n.6, Dec, p.721-8. 2005.

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.

YAMAMOTO, Y. e TAKAHASHI, S. Y. Cysteine proteinase from *Bombyx* eggs: role in programmed degradation of yolk proteins during embryogenesis. Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry, v.106, n.1, Sep, p.35-45. 1993.

YAMAMOTO, Y., *et al.* Molecular cloning and sequencing of cDNA that encodes cysteine proteinase in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. J Biochem, v.116, n.6, Dec, p.1330-5. 1994.

_____. *Bombyx* acid cysteine protease (BCP): hormonal regulation of biosynthesis and accumulation in the ovary. Journal of Insect Physiology, v.46, n.5, May 1, p.783-791. 2000.

YOSHIZAKI, N., MORIYAMA, A. e YONEZAWA, S. Purification and properties of embryonic cysteine proteinase which participates in yolk-lysis of *Xenopus laevis*. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology, v.119, n.3, Mar, p.571-6. 1998.

ZHANG, Z. Y. Protein-tyrosine phosphatases: biological function, structural characteristics, and mechanism of catalysis. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, v.33, n.1, p.1-52. 1998.

_____. Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics. Current Opinion in Chemical Biology, v.5, n.4, Aug, p.416-23. 2001.

_____. Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, v.42, p.209-34. 2002.

ZHANG, Z. Y., ZHOU, B. e XIE, L. Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors. Pharmacology and Therapeutics, v.93, n.2-3, Feb-Mar, p.307-17. 2002.

ZHAO, X., *et al.* Occurrence of a cathepsin B-like acid cysteine proteinase in the eggs of silkworm moth, *Antheraea pernyi*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v.113, n.1, p.95-103. 1996.

ZHAO, X. F., *et al.* Expression of the *Helicoverpa* cathepsin B-like proteinase during embryonic development. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v.58, n.1, Jan, p.39-46. 2005.

_____. Molecular cloning and characterization of the cathepsin B-like proteinase from the cotton boll worm, *Helicoverpa armigera*. Insect Molecular Biology, v.11, n.6, p.567-575. 2002.

8 Anexos

8.1 Anexo 01: Artigo publicado na Revista “Archives of Biochemistry and Molecular Biology”, em 2006.

Characterization of a Tyrosine Phosphatase Activity in the Oogenesis of *Periplaneta americana*

D.M.P. Oliveira¹ and E.A. Machado^{1*}

In this work, phosphatase activity was characterized in the ovary and the haemolymph of *Periplaneta americana*. The optimum pH for these activities was 4.0, and a temperature of 44°C was ideal for the maximal enzyme activity. The phosphatase activities were inhibited by NaF, sodium tartrate, Pi, sodium orthovanadate, and ammonium molybdate. The ovarian phosphatase activity at pH 4.0 was almost exclusive against phosphotyrosine, with little or no effect on the residues of phosphoserine or phosphothreonine. These results indicate that this phosphatase activity is due to the presence of an acid tyrosine phosphatase. The phosphatase activities of acid extracts from *P. americana* ovaries (OEX) and an acid extract from *P. americana* haemolymph (HEX) were analyzed in non-denaturing gel electrophoresis using an analog substrate β -naphthyl phosphate. The gel revealed two bands with phosphatase activity in the ovary and one band in the haemolymph; these bands were excised and submitted to a 10% SDS-PAGE showing a single 70-kDa polypeptide in both samples. Histochemistry of the ovary with α -naphthyl phosphate for localization of acid phosphatase activity showed mainly labeling associated to the oocyte peripheral vesicles, basal lamina, and between follicle cells. Electron microscopy analysis showed that acid phosphatase was localized in small peripheral vesicles in the oocyte, but not inside yolk granules. The possible role of this phosphatase during oogenesis and embryogenesis is also discussed in this article. Arch Insect Biochem Physiol 63:24–35, 2006. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

KEYWORDS: *Periplaneta americana*; acid phosphatase; oogenesis

INTRODUCTION

Insect oogenesis involves massive yolk protein incorporation through receptor-mediated endocytosis (Oliveira et al., 1986; Raikhel and Dadhiella, 1992). Much of the knowledge about endocytosis associated with oogenesis is related to the incorporation of the lipophosphoglycoprotein vitellogenin (VG) (Valle, 1993; Sappington and Raikhel, 1998). Once inside the oocyte, the VG is referred

to as vitellin (VT). Moreover, the incorporation of several non-VG yolk proteins has been described in several insects, such as the *Rhodnius* calcium binding protein in *Rhodnius prolixus* (Silva-Neto et al., 1996), microvitellogenin in *Manduca sexta* (Kawooya et al., 1986), lipophorin in *Manduca sexta* and *Aedes aegypti* (Kawooya et al., 1988; Sun et al., 2000), and a heme binding-protein in *R. prolixus* (Machado et al., 1998). These proteins are stored in yolk granules, being mobilized during

¹Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil

Abbreviations used: ATP = adenosine triphosphate; BSA = bovine serum albumin; cAMP = cyclic adenosine monophosphate; CAPS = 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonic acid; DTT = dithiothreitol; EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid; GAG = glycosaminoglycans; HEX = acid extract from haemolymph of *Periplaneta americana*; NaOH = sodium hydroxide; OEX = acid extract from ovaries of *Periplaneta americana*; PBS = phosphate-buffered saline (10 mM phosphate buffer), 150 mM NaCl, pH 7.4; p-CMB = p-Chloromercuribenzoate; Pi = phosphate; PMSF = phenylmethylsulfonyl fluoride; PNP = p-nitrophenol; pNPP = p-nitrophenyl phosphate; PTP = protein tyrosine phosphatase; SBTI = soybean trypsin inhibitor; SDS = sodium dodecylsulphate; SDS-PAGE = polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of SDS; TCA = trichloroacetic acid; VG = vitellogenin; VT = vitellin.

Contract grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Contract grant sponsor: Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ); Contract grant sponsor: Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT); Contract grant sponsor: FINEP/PRONEX/FUJB; Contract grant number: 76.97.1000.000.

*Correspondence to: Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Parasitologia e Biologia Celular, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, 21.941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. E-mail: ednildo@biof.ufrj.br

Received 8 November 2005; Accepted 14 April 2006

embryo development (Oliveira et al., 1989; Giorgi et al., 1999).

The origin of the enzymes involved in yolk mobilization is poorly understood, but in *A. aegypti*, a carboxypeptidase has been described (Cho et al., 1991) and also a Cathepsin B-like protease (Cho et al., 1999), which are produced from fat body, secreted to the haemolymph during oogenesis process. In *Blattella germanica*, the proenzyme form of the vitellin-processing protease is also produced from fat body and incorporated by oocytes during the oogenesis process (Liu and Nordin 1998; Yin et al., 2001). In *Xenopus laevis*, the incorporation of lysosomal enzymes involved in yolk mobilization occurs throughout oogenesis (Wall and Meleka, 1985). Thus, the incorporation of yolk-mobilizing enzymes and their storage in oocytes during oogenesis is critical for yolk degradation during embryogenesis.

In vertebrates as well as in invertebrates, the mobilization of yolk proteins inside the granules occurs due to the associated acid hydrolytic enzymes, which are activated during embryonic development. This type of yolk mobilization has been reported for tick *Ornithodoros moubata* development (Fagotto, 1991), sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (Mallya et al., 1992), and the African clawed frog, *X. laevis* (Lemanski and Aldoroty, 1974; Fagotto and Maxfield, 1994). In insects, the presence of acid hydrolases, such as proteinases (Yamamoto and Takahashi, 1993), glycosidase (Purcell et al., 1988), and acid phosphatases (Ribolla et al., 1993; Fialho et al., 2002), has also been described. A decrease in pH in yolk granules is strongly inhibited by bafilomycin, a specific inhibitor of V-ATPase (Fagotto, 1995; Abreu et al., 2004). Recently, Motta et al. (2004) described a proton pyrophosphatase activity that could be involved, concomitantly with proton ATPase, in acidification of yolk granules during embryogenesis. In *B. germanica*, there is a correlation between acidification of yolk granules and proteolytic processing of vitellin (Nordin et al., 1991).

Also the participation of phosphatases during embryogenesis was observed in several insects: in the cockroach *B. germanica*, the yolk phosphatase expression and programmed proteolysis of VT are

correlated during embryonic development (Purcell et al., 1988); in *R. prolixus*, the VT is targeted by an acid phosphatase during embryogenesis process (Fialho et al., 2002); and in *Bombyx mori*, the dephosphorylation of ecdysteroid-phosphates is catalyzed by ecdysteroid-phosphate phosphatase, during early embryonic development (Yamada et al., 2005).

Protein tyrosine phosphatases (PTPs) and specifically dephosphorylate tyrosyl residues act together with protein tyrosine kinases to control the extent of protein tyrosine phosphorylation (Zhang et al., 2002). The protein tyrosine phosphatases can be divided into four major subfamilies: tyrosine-specific, dual-specific, low molecular weight phosphatases, and a novel class of non-thiol-based PTPs (Zhang, 2001). In *D. melanogaster*, the expression of several PTP genes during insect oogenesis was described. These PTPs are involved in several processes such as chorion formation, body axis formation, and axonal guidance (Fitzpatrick et al., 1995). In *Sarcophaga peregrina*, a new PTP that participates in the early embryogenesis of this fly has been characterized (Yamaguchi et al., 1999). In the present study, the authors partially characterized a tyrosine phosphatase activity and its localization during the oogenesis process in the cockroach *P. americana*.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Acrylamide, antipain, bis-acrylamide, bovine serum albumin, fast garnet gbc, glycine, leupeptin, levamisole, molecular weight standards, p-CMB, pepstatin A, phosphoserine, phosphotyrosine, phosphothreonine, PMSE, *p*-Nitrophenyl Phosphate, sodium acetate, SBTI, TEMED, and tetramisole were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Phenylarsine oxide was purchased from Calbiochem–Novabiochem Corp. (La Jolla, CA). All other chemicals were of analytical grade.

Insects

Insects were taken from our colony of *Periplaneta americana* maintained at 25–28°C and 60–70%

relative humidity. Animals were fed with dog chow and water ad libitum. The acid extract of *Periplaneta* ovary (OEX) and hemolymph (HEX) was prepared from the ovaries and hemolymph of adult mated females.

p-Nitrophenylphosphate Hydrolysis

Unless otherwise stated, p-nitrophenyl phosphate (pNPP) hydrolysis was measured at 44°C as follows: the reaction medium contained 4 mM pNPP, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 20 mM sodium acetate, pH 4.0, and ovary homogenate with a final protein concentration between 0.015–0.04 mg. All reactions, which were carried out using 96-well flat bottom microplates, were started by the addition of pNPP and stopped at different times by the addition of 1N NaOH corresponding to 10% of total volume. The amount of p-nitrophenol (PNP) formed was read at 405 nm in an ELISA plate reader (Thermomax, Molecular Devices, Orleans Drive Sunnyvale, CA). Specific activity is expressed as nmol of (PNP) released $\times$ mg⁻¹ $\times$ min⁻¹. Controls lacking homogenates were used as blanks and the extinction coefficient for p-nitrophenolate ion (1.75×10^4 M⁻¹ $\times$ cm⁻¹) was utilized for the determination of enzyme specific activity (Sheng and Charbonneau, 1993). The optimum pH for pNPP hydrolysis using ovaries from vitellogenic females was determined by adjusting the pH values in each medium from 3.0 to 9.0 at 25°C. The reactions contained the following mixture of buffers: glycine, sodium acetate, sodium citrate, and Tris in 0.1 M final concentrations. To determine the optimal temperature for pNPP hydrolysis, experiments using different incubation temperatures were carried out.

Determination of Phosphatase Activity Against Phosphoaminoacids

The phosphatase activity of OEX against phosphoaminoacids was measured colorimetrically by determining the rate of release of Pi (Fiske and Subbarow, 1925). Phosphatase activity was assayed in a reaction medium containing 4 mM phosphoaminoacid, 50 mM sodium acetate, pH 4.0, and ovary homogenate with a final protein con-

centration of 0.1 mg/ml. The activity was calculated by the rate of Pi released from different phosphoaminoacids (μ mol Pi liberated $\times$ mg⁻¹ protein). The reaction was started by addition of OEX. Aliquots of 0.2 mL were removed and the reaction was stopped by addition of 0.04 mL of 50% (w/v) trichloroacetic acid.

Preparation of OEX and HEX

Ovaries were homogenized with a plastic pestle in 20 mM acetate buffer, pH 4.0, containing 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 2 mM PMSE, 0.01 mM pepstatin, 1.7 mM antipain, and 50 μ M SBTI (buffer 1). The homogenate was centrifuged twice at 14,000g for 5 min at 4°C. The supernatant (OEX) was collected and frozen at -20°C.

The haemolymph was collected in buffer 1 and centrifuged at 10,000g for 10 min at 4°C to remove the hemocytes. The resulting plasma (HEX) was collected and frozen at -20°C. OEX and HEX protein concentrations were determined by the method of Lowry et al. (1951) using BSA as standard. The OEX and HEX were used in the experiments of pNPP hydrolysis at pH 4.0 and 44°C in the presence of different protein phosphatase modulators.

Phosphatase Activity in Gel Electrophoresis

The phosphatase activities of OEX and HEX were detected by staining the non-denaturing gel (5%) with a buffered solution (pH 6.0) containing β -naphthyl phosphate and Fast Blue Salt (Sigma) as chromogens (Curn, 1994). To determine the effect of the inhibitor, 0.1 mM ammonium molybdate was added to the incubation media. The bands that showed activity in this gel were excised, homogenized in sample buffer with SDS, and reanalyzed in 10% SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Gels were stained with silver nitrate or Coomassie Brilliant Blue G.

Histochemical Localization of Phosphatase at Ovary of *P. americana*

Ovaries were removed from mated females of *P. americana*, washed in PBS, and then fixed for 30

min at 4°C in a solution containing 0.5% glutaraldehyde (type I, Sigma), 0.5 % freshly prepared formaldehyde in PBS, pH 7.2. The tissue was then washed in PBS and incubated for 2 h at 37°C in medium for localization of acid phosphatase that consisted of 4 mM α -naphthyl phosphate, fast garnet gbc, in 100 mM acetate buffer, pH 5.0 (Hulstaert et al., 1983). Controls were carried out by tissue incubation in the medium without the substrate. After the reaction for localization of phosphatase, the ovaries were postfixed in 4% formaldehyde in PBS overnight at 4°C, then the ovaries were dissected, immersed in PBS containing 20% sucrose, and embedded in Optimal Cutting Temperature compound (Sabura Finetechnical Co. Tokyo, Japan) obtained from TEK. Sagittal frozen sections (6–10 μ M) through the oocytes were attached to microscope slides coated with poly-L-lysine and the sections were coverslipped in glycerol and analyzed by light microscopy.

For transmission electron microscopy, the ovaries were fixed in 0.5% glutaraldehyde (type I, Sigma), 0.5% freshly prepared formaldehyde in 0.1M sodium PBS, pH 7.2, for 30 min at 4°C. Afterwards, they were washed twice in the same buffer and once in acetate buffer, pH 5.0. The cells were then incubated for 60 min in acetate buffer, pH 5.0, with 1 mM sodium- β -glycerophosphate, 5%

(w/v) sucrose, and 2 mM CeCl_3 . After that, the ovaries were washed in the same buffer and fixed in 2.5% glutaraldehyde, 4% freshly prepared formaldehyde in PBS, pH 7.2, for 60 min at 25°C. Then the ovaries were washed in PBS, postfixed for 60 min at 25°C in a solution containing 1% osmium tetroxide. Subsequently, the ovaries were washed three times in PBS, dehydrated in acetone series, and embedded in Epon (Machado et al., 1996). The grids with thin sections (~ 70 nm) were examined in a Zeiss 900 electron microscope.

RESULTS

pNPPase Activity in the Ovaries of *P. americana*

The optimum pH for phosphatase activity of *P. americana* is 3.5–4.0 (Fig. 1), and at pH values of 5.0 or higher a strong decrease in phosphatase activity was observed. These data showed that the acidic profile of this enzyme group is involved in yolk degradation, as has been observed in other insects such as *R. prolixus* (Fialho et al., 2002), fly, *M. domestica* (Ribolla et al., 1993), and cockroach, *B. germanica* (Purcell et al., 1988).

Acid phosphatases present in soybean (Ferreira et al., 1998) and seminal vesicles of pigs (Wysocki and Strzezek, 2003) were stable at high tempera-

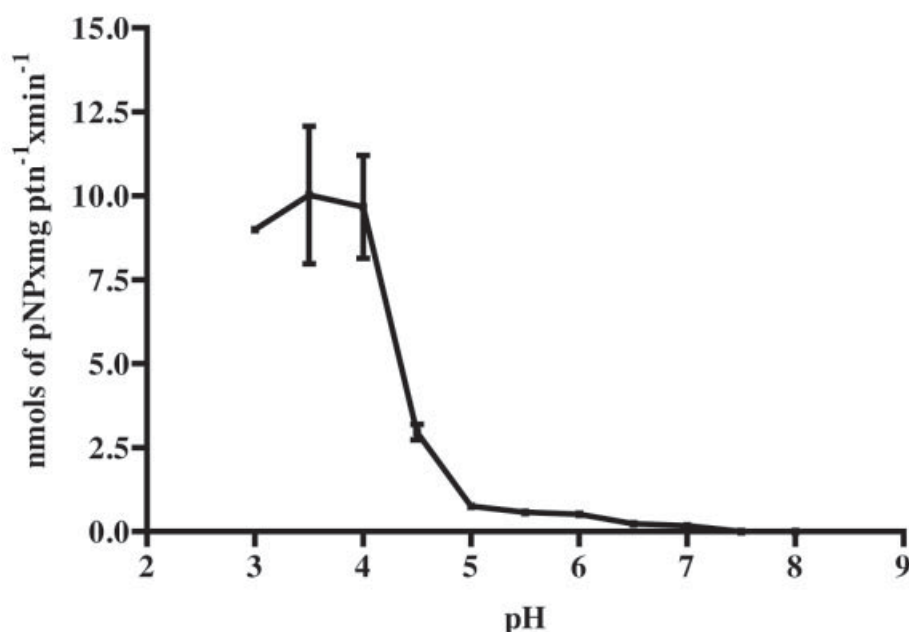


Fig. 1. pH dependence for the hydrolysis of pNPP by acid phosphatase from *P. americana* ovaries. p-nitrophenyl phosphatase activity was measured in the vitellogenic female ovaries. Sample solutions were prepared with buffers at a final concentration of 0.1 M. The incubation medium contained 0.015 mg of total protein and 4 mM pNPP after 60 min at 25°C. The results are expressed as nmol of (PNP) released $\times$ mg⁻¹ $\times$ min⁻¹. Each point represents the mean $\pm$ SE of three independent experiments.

tures. Thus, it has been recently proposed that the thermoresistance can be an additional factor of phosphatase classification. The optimal temperature for pNPP hydrolysis is around 44°C (Fig. 2). At 56°C phosphatase activity decreased by approximately 55% and at higher temperatures the phosphatase activity of OEX was completely stopped. Thus we can conclude that this phosphatase is a thermolabile enzyme. The phosphatase activity from HEX showed a very similar temperature profile when compared to OEX (data not shown).

The influence of phosphatase inhibitors on OEX and HEX phosphatase activity was also tested here. The effect of classical phosphatase inhibitors is shown in Table 1. The *P. americana* phosphatase from OEX has the profile of classical lysosomal phosphatases, which are inhibited by Na^+/K^+ tartrate, Pi, and NaF. A strong inhibition in the presence of tyrosine phosphatase inhibitors such as ammonium molybdate and sodium orthovanadate was recorded (Table 1). However, the presence of caffeine and Zn^{+2} sulfate (other inhibitors of tyrosine phosphatase) was not so effective in phosphatase inhibition, while the presence of alkaline phosphatase inhibitors, such as Phenylarsine oxide, Levamisole, and Tetramisole, did not inhibit the phosphatase activity in OEX. A similar inhibition profile was obtained with the phosphatase activity from the HEX, suggesting the

TABLE 1. Influence of Phosphatase Inhibitors on Phosphatase Activity of OEX and HEX of *P. americana*.

Effectors	OEX	HEX
Control (without drug)	1.00	1.00
Levamisole (1 mM)	1.045	ND
Levamisole (10 mM)	1.0315	ND
Tetramisole (1 mM)	1.065	ND
Tetramisole (10 mM)	1.045	ND
Caffeine (0.5 mM)	1.09	0.72
Caffeine (5 mM)	1.165	0.68
Phenylarsine oxide (0.13 mM)	1.06	0.81
Phenylarsine oxide (0.28 mM)	1.03	ND
Zn^{+2} Sulfate (0.1 mM)	0.9	0.9
Pi (1 mM)	0.81	0.9
Pi (10 mM)	0.38	0.3
Na^+/K^+ Tartrate (1 mM)	0.46	0.1
Na^+/K^+ Tartrate (10 mM)	0.20	0.02
NaF (1 mM)	0.99	0.5
NaF (10 mM)	0.16	0
Vanadate (0.05 mM)	0.37	0.18
Vanadate (0.1 mM)	0.2	0.13
Ammonium molybdate (0.05 mM)	ND	0
Ammonium molybdate (0.1 mM)	0.21	0.1
Ammonium molybdate (1 mM)	0.04	0
Ammonium molybdate (2 mM)	0.0012	0

*Ovaries and haemolymph from vitellogenic females were assayed against pNPP in the presence of different phosphatase inhibitors. The control values, without inhibitors, were considered 1.00 as reference. The values of experimental groups represent proportions of enzyme activity compared to controls. Each point represents, at least, the average of three different experiments, performed in duplicate, with three different ovary and haemolymph homogenates. ND=not determined.

haemolymphatic origin of the phosphatase found in the ovaries (Table 1).

The ovarian phosphatase activity at pH 4.0 of OEX is directed mainly against phosphotyrosine, which was strongly inhibited in the presence of

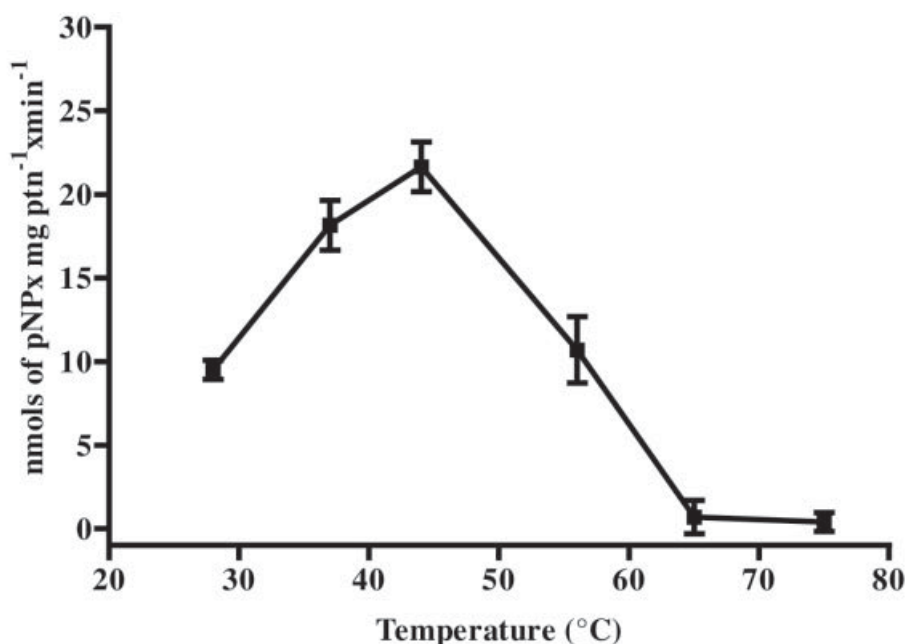


Fig. 2. Determination of optimal temperature of phosphatase activity of OEX. p-nitrophenyl phosphatase activity was measured for OEX at different temperatures. The incubation medium contained 0.015 mg of total protein and 4 mM pNPP. The results are expressed as nmol of (PNP) released $\times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Each point represents the mean $\pm$ SE of three independent experiments.

ammonium molybdate (data not shown). Low activity was observed in phosphothreonine and phosphoserine residues (Fig. 3). This set of results indicates that the main acid phosphatase activity observed in the ovaries of *P. americana* is a phosphotyrosyl acid phosphatase, discarding the dual-specific activity of this enzyme.

Determination of Molecular Weight of Phosphatase From *Periplaneta americana*

The tyrosine phosphatases reported in the literature have a wide range of molecular weights. Figure 4A shows that the phosphatase activity in the ovaries and haemolymph in non-denaturing gel was identified in three bands. Band B3 had a similar migration observed for the bovine ferritin standard. Band B2 showed a stronger reaction against phosphatase activity, but a lower migration in gel than the band B3. In haemolymph, band B1 had a migration similar to that observed for band B2 from the ovary. When these bands (from the ovary and haemolymph samples) were excised and loaded into a 10% SDS-PAGE, all bands presented a band with a similar migration corresponding to a protein of 70 kDa (Fig. 4B).

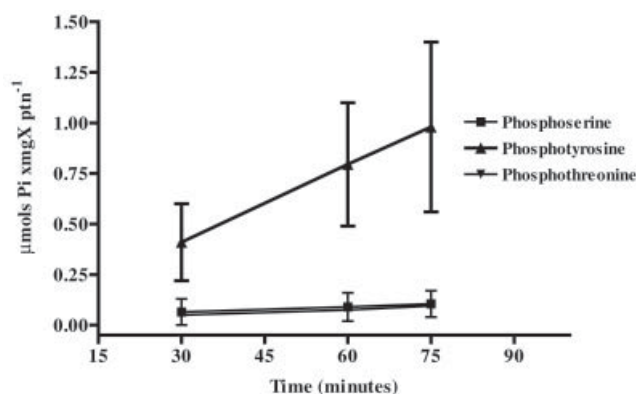


Fig. 3. Phosphatase activity of OEX against different phosphoaminoacids. The phosphatase activity was assayed in a reaction medium containing 20 mM acetate buffer, pH 4.0, and 4 mM of each phosphoaminoacid. The results are expressed as the rate of Pi released from different phosphoaminoacids ($\mu\text{mol Pi liberated/mg protein}$). Each point represents the mean $\pm$ SE of three independent experiments.

Localization of Acid Phosphatase

Histochemical localization of acid phosphatase was carried out by incubation of the ovaries with α -naphthyl phosphate, and analyzed by light microscopy. The present results of light microscopy (Fig. 5A and C) and transmission electron microscopy (Fig. 6C) show intense deposition of the reaction product, which is indicative of acid phosphatase activity in the basal lamina of follicular epithelium of the oocyte during previtellogenesis and vitellogenesis. Band B2 showed a stronger reaction of the oocyte during previtellogenesis and vitellogenesis. The positive reaction of phosphatase on extracellular components of the matrix suggests the presence of binding sites associated with its structure. At the vitellogenic follicles, a stronger label in the spaces between the follicle cells than inside them was observed. The localization pattern of this tyrosine phosphatase between follicle cells suggests that this enzyme can be incorporated from haemolymph to oocytes during oogenesis.

A label for phosphatase activity associated with small structures inside the oocyte was observed (Figs. 5C and D). With electron microscopy, using a cytochemical approach for revealing phosphatase activity, it could be seen that the small structures were labeled (Fig. 6A). No label to phosphatase activity was seen inside yolk granules (Fig. 6B). The control groups showed no visible reaction in any structure by optical microscopy (Fig. 5B) and electron microscopy (data not shown).

DISCUSSION

Acid phosphatases [orthophosphoric-monoester phosphohydrolase (acid optimum) EC 3.1.3.2)] are enzymes classically described by their ability to hydrolyze phosphate esters. In oviparous animals, acid phosphatase has long been recognized as one of the main yolk-associated enzymes. Several reports are available concerning the presence of these enzymes in the yolk, such as in *D. melanogaster* (Giorgi and Jacob, 1977; Sawicki and MacIntyre, 1978), *A. aegypti* (Raikhel and Lea, 1986), *Ornithodoros moubata* (Fagotto, 1990), and *R. prolixus*

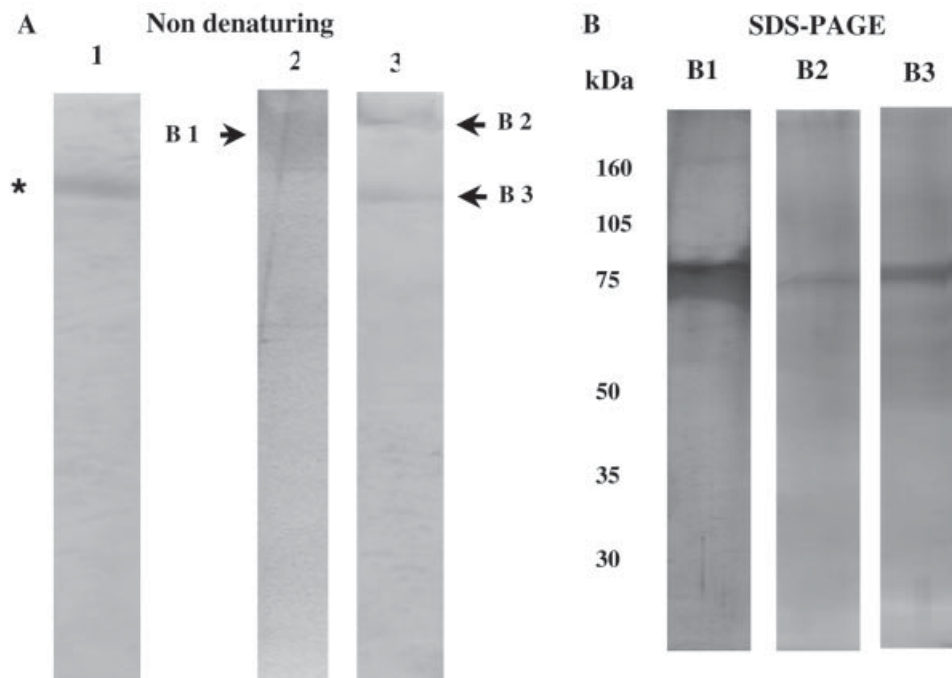


Fig. 4. Determination of molecular weight of acid phosphatase from ovary and haemolymph of *P. americana*. The OEX and HEX were subjected to non-denaturing gel electrophoresis (5%). A: Lane A1 shows bovine ferritin (*); lanes A2 (HEX) and A3 (OEX) show the acid phosphatase activity in gel as described in Materials and Methods. Bands

B1, B2, and B3 (lanes A2 and A3, arrows) were excised from the non-denaturing gel and subjected to SDS PAGE (10%) as described in Materials and Methods. B: Silver-stained denaturing gels (lanes B1, B2, and B3). The numbers on the left indicate the molecular weight standards.

(Nussenzveig et al., 1992). The origin of the enzymes involved in yolk degradation during oogenesis is poorly known. However, carboxipeptidase of *Aedese aegypti* (Cho et al., 1991) and Cathepsin B (Cho et al., 1999) are involved in yolk breakdown and are synthesized in fat body, secreted to haemolymph, and stored in yolk granules. In this work, the authors characterized the phosphatase activity during the oogenesis process in the ovaries of *P. americana*. Hence, the data here show that tyrosine phosphatases (from the haemolymph and ovaries) have similar properties and molecular weights, suggesting a haemolymphatic origin of this enzyme (found/seen) in the ovary (Table 1 and Fig. 4).

Although, there is not yet any clear evidence of the role played by tyrosine phosphatase in the ovary of *P. americana*, the PTPs are involved in different processes such as cellular growth, differentiation, cell-to-cell communication, gene transcription, and also in the fertilization processes (Bhaduri and

Sowdhamini, 2003; Tootle et al., 2003). Some of these processes could be involved in the oogenesis and/or embryogenesis of this insect. One attractive possibility concerning the role of this phosphatase is that this enzyme can dephosphorylate the VT during embryonic development of *P. americana*. This cockroach has two VGs (precursors of VT), the VG1 and VG2, that present 45 tyrosine and 93 tyrosine residues, respectively (Tufail et al., 2000, 2001). These amino acids can represent the putative sites to tyrosine phosphorylation. VG and VT of *P. americana* show reactivity to the phosphotyrosine-raised antibody, providing evidence for the phosphorylation of these amino acids during oogenesis and embryogenesis (data not shown). In *R. prolixus*, the VT was exclusively phosphorylated in serine residues, while phosphotyrosine is absent or at a very low content (Masuda and Oliveira, 1985). At the egg or chorionated oocyte of *R. prolixus*, VT is specifically dephosphorylated

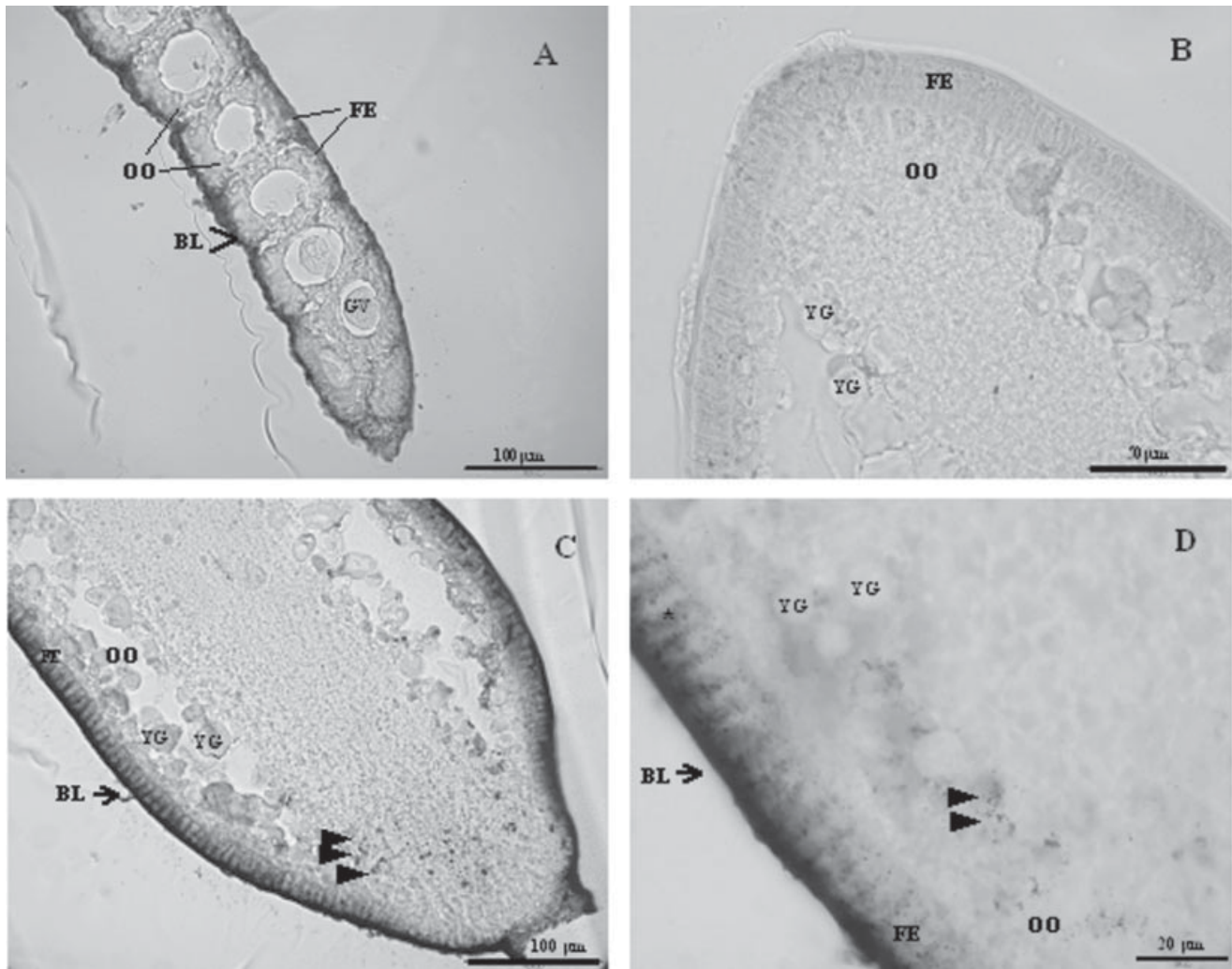


Fig. 5. Histochemical localization of acid phosphatase of *P. americana* (optical microscopy). Histochemical localization of phosphatase activity in the ovary was carried out by incubation with α -naphthyl phosphate, fast garnet gbc, and light microscopy analysis. A: Previtellogenic follicles where the reaction product is mostly localized in the basal lamina (arrows), below the follicular epithelium. B–D: Vitellogenic follicle. B: The control

group, where a vitellogenic follicle was incubated in the absence of α -naphthyl phosphate. C,D: The vitellogenic follicle where the reaction product is seen again mostly in the basal lamina (arrows), but also between the follicle cells (*) and inside the oocyte at small vesicles (arrowheads). BL, basal lamina; FE, follicular epithelium; GV, germinal vesicle; OO, oocyte; YG, yolk granule.

by an acid phosphatase during the embryogenesis process (Fialho et al. 2002). More recently, Fialho et al. (2005) showed that the Cathepsin D-mediated yolk protein degradation is blocked by acid phosphatase inhibitors, showing an important cooperation between acid hydrolases during yolk breakdown of *R. prolixus*. Thus, the characterization of possible target proteins of this tyrosine phosphatase during oogenesis and em-

bryogenesis of *P. americana* is under investigation by our group.

The band that showed a positive reaction to phosphatase in gels (Fig. 4) could not be attributed to the endosymbionts described in *P. americana* (Anderson, 1964; Sacchi et al., 2000), because there was no observation of phosphatase activity associated with these bacteria by cytochemical for phosphatase localization in the ovary of *P. americana*

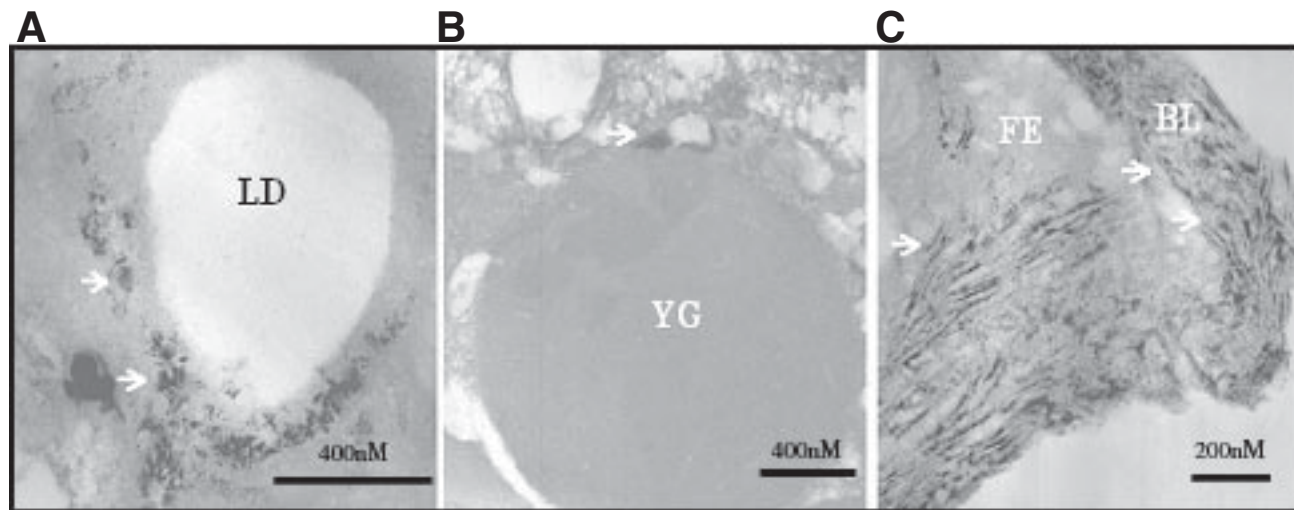


Fig. 6. Cytochemical localization of acid phosphatase of *P. americana* (transmission electron microscopy). Electron microscopy localization of phosphatase activity in the ovary following incubation in a medium containing β -glycerophosphate as substrate. A,B: Some reactions at the

small vesicles inside the oocyte (white arrows), but not in yolk granules. C: The vitellogenic follicle where the reaction product is seen mostly localized in the basal lamina, below the follicular epithelium. BL, basal lamina; FE, follicular epithelium; LD, lipid droplet; YG, yolk granule.

(data not shown). The data obtained from electronic and optical microscopy reinforced the association of the enzyme to small vesicles (Figs. 5C and 6A). These results suggest that phosphatase activity presents some compartmentalization during insect oogenesis. In the stick insect, *Carausius morosus*, the yolk granules are differently acidified during embryogenesis (Fausto et al., 2001). Only small acidified yolk granules possess characteristics such as the presence of hydrolytic enzymes and proton pumps. Indeed, the presence of proton pumps associated to small vesicles during the early embryogenesis of *P. americana* (data not shown) as observed in *C. morosus* has also been detected. The participation of proton pyrophosphatase and proton ATPases in the acidification of yolk granules and their association with phosphatase activation during the embryogenesis process of *P. americana* are under intense investigation by our group. This could represent an attractive model to study compartmentalization of enzymes involved in yolk mobilization during insect embryogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

We express our gratitude to Dr. Suzete Bressan for providing the animals for this work; to Marcelo

Neves de Medeiros, Mario Alberto da Silva Neto, Wanderley de Souza, and Gabriela Paiva-Silva for a critical reading of the manuscript; and to Flavia C.G. Reis, Rafael Linden, Leny A. Cavalcante, and Ana Paula C.A. Lima for generously providing laboratory supplies and facilities.

LITERATURE CITED

- Abreu LA, Valle D, Manso PP, Facanha AR, Pelajo-Machado M, Masuda H, Masuda A, Vaz I Jr, Lenzi H, Oliveira PL, Logullo C. 2004. Proteolytic activity of *Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis. *Insect Biochem Mol Biol* 34:443–449.
- Anderson E. 1964. Oocyte differentiation and vitellogenesis in the roach *Periplaneta americana*. *J Cell Biol* 20:131–155.
- Bhaduri A, Sowdhamini R. 2003. A genome-wide survey of human tyrosine phosphatases. *Prot Eng* 16:881–888.
- Cho WL, Deitsch KW, Raikhel AS. 1991. An extraovarian protein accumulated in mosquito oocytes is a carboxypeptidase activated in embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10821–10824.
- Cho K, Tsao SM, Hays AR, Walter R, Chen JS, Snigirevskaya ES, Raikhel AS. 1999. Mosquito Cathepsin B-like protease

- involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. *J Biol Chem* 274:13311–13321.
- Curn V. 1994. Isozymes of acid phosphatase and leucine aminopeptidase as biochemical markers for purity testing in rapeseed androgenetic lines. *Sci Agric Biochem* 25:117–126.
- Fagotto F. 1990. Yolk degradation in tick eggs: I. Occurrence of a Cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. *Arch Insect Biochem Physiol* 14:217–235.
- Fagotto F. 1991. Yolk degradation in tick eggs: III. Developmentally regulated acidification of the yolk spheres. *Dev Growth Differ* 33:57–66.
- Fagotto F. 1995. Regulation of yolk degradation, or how to make sleepy lysosomes. *J Cell Sci* 108:3645–3647.
- Fagotto F, Maxfield FR. 1994. Changes in yolk platelet pH during *Xenopus laevis* development correlate with yolk utilization. *J Cell Sci* 107:3325–3337.
- Fausto AM, Gambellini G, Mazzini M, Cecchetti A, Masetti M, Giorgi F. 2001. Yolk granules are differentially acidified during embryo development in the stick insect *Carausius morosus*. *Cell Tissue Res* 305:433–443.
- Ferreira CV, Granjeiro JM, Taga EM, Aoyama H. 1998. Soybean seed acid phosphatases: unusual optimum temperature and thermal stability studies. *Biochem Biophys Res Commun* 242:282–286.
- Fialho E, Silveira AB, Masuda H, Silva-Neto MAC. 2002. Oocyte fertilization triggers acid phosphatase activity during *Rhodnius prolixus* embryogenesis. *Insect Biochem Mol Biol* 32:871–880.
- Fialho E, Nakamura A, Juliano L, Masuda H, Silva-Neto MA. 2005. Cathepsin D-mediated yolk protein degradation is blocked by acid phosphatase inhibitors. *Arch Biochem Biophys* 436:246–253.
- Fiske CF, Subbarow Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 66:375–400.
- Fitzpatrick KA, Gorski SM, Ursuliak Z, Price JV. 1995. Expression of protein tyrosine phosphatase genes during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mech Dev* 53:171–183.
- Giorgi F, Jacob J. 1977. Recent findings in oogenesis of *Drosophila melanogaster*. III. Lysosomes and yolk platelets. *J Embryol Exp Morphol* 39:45–57.
- Giorgi F, Bradley JT, Nordin JH. 1999. Differential vitellin polypeptide processing in insect embryos. *Micron* 30:579–596.
- Hulstaert CE, Kalicharan D, Hardonk MJ. 1983. Cytochemical demonstration of phosphatases in the rat liver by a cerium-based method in combination with osmium tetroxide and potassium ferrocyanide postfixation. *Histochemistry* 78:71–79.
- Kawooya JK, Osir EO, Law JH. 1986. Physical and chemical properties of microvitellogenin. A protein from the egg of the tobacco hornworm moth, *Manduca sexta*. *J Biol Chem* 261:10844–10849.
- Kawooya JK, Osir EO, Law JH. 1988. Uptake of the major haemolymph lipoprotein and its transformation in the insect egg. *J Biol Chem* 263:8740–8747.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature (Lond)* 227:680–685.
- Lemanski LF, Aldoroty R. 1974. Role of acid phosphatase in the breakdown of yolk platelets in developing amphibian embryos. *J Morph* 153:419–426.
- Liu X, Nordin JH. 1998. Localization of the proenzyme form of the vitellin-processing protease in *Blattella germanica* by affinity-purified antibodies. *Arch Insect Biochem Physiol* 38:109–118.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AB, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
- Machado EA, Atella GC, Gondim KC, De Souza W, Masuda H. 1996. Characterization and Immunocytochemical localization of lipophorin binding sites in the oocytes of *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem Physiol* 31:185–196.
- Machado EA, Oliveira PL, Moreira MF, de Souza W, Masuda H. 1998. Uptake of *Rhodnius* heme-binding protein (RHBP) by the ovary of *Rhodnius prolixus*. *Arch Insect Biochem Physiol* 39:133–143.
- Mallya SK, Partin JS, Valdizan MC, Lennarz WJ. 1992. Proteolysis of the major yolk glycoproteins is regulated by acidification of the yolk platelets in sea urchin embryos. *J Cell Biol* 117:1211–1221.
- Masuda H, Oliveira PL. 1985. Characterization of vitellin and vitellogenin of *Rhodnius prolixus*. Identification of phos-

- phorylated compounds in the molecule. *Insect Biochem* 15:543–550.
- Motta LS, Seixas WS, Oliveira DM, de Souza W, Machado EA. 2004. A new model for proton pumping in animal cells: the role of pyrophosphate. *Insect Biochem Mol Biol* 34:19–27.
- Nordin JH, Beaudoin EL, Lin X. 1991. Acidification of yolk granules in *Blattella germanica* eggs coincides with proteolytic processing of vitellin. *Arch Insect Biochem* 18:177–192.
- Nussenzveig RH, Oliveira PL, Masuda H. 1992. Identification of yolk platelet-associated hydrolases in the oocytes of *Rhodnius prolixus*. *Arch Insect Biochem Physiol* 21: 253–262.
- Oliveira PL, Gondim KC, Guedes D, Masuda H. 1986. Uptake of yolk protein in *Rhodnius prolixus*. *J Insect Physiol* 32:859–866.
- Oliveira PL, Petretski MDA, Masuda H. 1989. Vitellin processing and degradation during embryogenesis in *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem* 19:489–498.
- Purcell JP, Quinn TM, Kunkel JG, Nordin JH. 1988. Correlation of yolk phosphatase expression with the programmed proteolysis of vitellin in *Blattella germanica* during embryonic development. *Arch Insect Biochem Physiol* 9:237–251.
- Raikhel AS, Dadhialla TS. 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu Rev Entomol* 37:217–251.
- Raikhel AS, Lea AO. 1986. Internalized protein direct into accumulative compartments of mosquito oocytes by the specific ligand vitellogenin. *Tissue Cell* 18:559–574.
- Ribolla PEM, Dafree S, De Bianchi AG. 1993. Cathepsin B and acid phosphatase activities during *Musca domestica* embryogenesis. *Insect Biochem Mol Biol* 23:217–223.
- Sacchi L, Nalepa CA, Lenz M, Bandi C, Corona S, Grigolo A, Bigliardi E. 2000. Transovarial transmission of symbiotic bacteria in *Mastotermis darwiniensis* (Isoptera: Mastotermitidae) ultrastructural aspects and phylogenetic inferences. *Mol Biol Evol* 16:1114–1116.
- Sappington TW, Raikhel AS. 1998. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochem Mol Biol* 28:277–300.
- Sawicki JA, MacIntyre RJ. 1978. Localization at the ultrastructural level of maternally derived enzyme and determination of the time of paternal gene expression for acid phosphatase-1 in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 63: 47–58.
- Sheng Z, Charbonneau H. 1993. The baculovirus *Autophaga californica* encodes a protein tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem* 268:4728–4733.
- Silva-Neto MAC, Atella GC, Fialho E, Paes MC, Zingali RB, Petretski JH, Alves E, Masuda H. 1996. Isolation of a calcium-binding phosphoprotein from the oocytes and haemolymph of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *J Biol Chem* 271:30227–30232.
- Sun J, Hiraoka T, Dittmer NT, Cho K, Raikhel A. 2000. Lipophorin as a yolk precursor in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 20:1161–1171.
- Tootle TL, Silver SJ, Davies EL, Newman V, Latek RR, Mills IA, Selengut JD, Parlikar BE, Rebay I. 2003. The transcription factor Eyes absent is a protein tyrosine phosphatase. *Nature* 426:299–302.
- Tufail M, Lee JM, Hatakeyama M, Oishi K, Takeda M. 2000. Cloning of vitellogenin cDNA of the American cockroach, *Periplaneta americana* (Dictyoptera), and its structural and expression analyses. *Arch Insect Biochem Physiol* 45:37–46.
- Tufail M, Hatakeyama M, Takeda M. 2001. Molecular evidence for two vitellogenin genes and processing of vitellogenins in the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Arch Insect Biochem Physiol* 48:72–80.
- Valle D. 1993. Vitellogenesis in insects and other groups: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88:1–26.
- Wall DA, Meleka I. 1985. An unusual lysosome compartment involved in vitellogenin endocytosis by *Xenopus* oocytes. *J Cell Biol* 101:1651–1664.
- Wysocki P, Strzezek J. 2003. Purification and characterization of a protein tyrosine acid phosphatase from boar seminal vesicle glands. *Theriogenology* 59:1011–1025.
- Yamada R, Yamahama Y, Sonobe H. 2005. Release of ecdysteroid-phosphates from egg yolk granules and their dephosphorylation during early embryonic development in silkworm, *Bombyx mori*. *Zool Sci* 22:187–198.
- Yamaguchi S, Homma K, Natori S. 1999. A novel egg-derived

- tyrosine phosphatase, EDTP that participates in the embryogenesis of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). Eur J Biochem 259:946–953.
- Yamamoto Y, Takahashi SY. 1993. Cysteine proteinase from *Bombyx* eggs: role in programmed degradation of yolk proteins during embryogenesis. Mini review. Comp Biochem Physiol 106B:35–45.
- Yin L, Nordin JH, Lucches P, Giorgi F. 2001. Cysteine protease colocalizes with vitellogenin in compound granules of the cockroach fat body. Cell Tissue Res 304:391–399.
- Zhang ZY. 2001. Protein Tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics. Curr Opin Chem Biol 5:416–423.
- Zhang ZY, Zhou B, Xie L. 2002. Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors. Pharmacol Ther 93:307–317 (review).

8.2 Anexo 02: Artigo publicado na Revista “Journal of Insect Physiology” em 2008



Interplay between acid phosphatase and cysteine proteases in mediating vitellin degradation during early embryogenesis of *Periplaneta americana*

Danielle M.P. Oliveira^a, Isabela B. Ramos^a, Flavia C.G. Reis^b, Ana P.C.A. Lima^b, Ednildo A. Machado^{a,*}

^a Laboratório de Entomologia Médica, Programa de Parasitologia e Biologia Celular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, CEP 21941-590, RJ, Brazil

^b Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Proteases, Programa de Immunobiologia, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, CEP 21941-590, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 December 2007

Received in revised form

4 March 2008

Accepted 8 April 2008

Keywords:

Cockroach
Development
Proteolysis
Yolk

ABSTRACT

In this work, we characterized the activities of two classes of proteases and AcP during early embryogenesis of *Periplaneta americana*. AcP activity was first detected at day 6 and reached a maximum level at day 10 of development. Using phosphoamino acids, phosphatase activity was shown to be directed only against phosphotyrosine at day 6 while at day 10 it was also active against phosphoserine. In parallel, two classes of proteases were detected and located within yolk granules: a clan CA-cysteine protease, which was inhibited by E-64, insensitive to CA 074 and activated by acidic pH at day 3; and a neutral serine protease, which was inhibited by aprotinin at day 6. Assays of vitellin (Vt) degradation evidenced that incubations at neutral pH induced slight proteolysis, while the incubations at acidic pH did not result in Vt degradation. However, pre-incubations of Vt with AcP increased the levels of Vt acidic proteolysis and this could be inhibited by the addition of phosphatase inhibitors. On the other hand, the same pre-incubations showed no effects on the profile of degradation at neutral pH. We propose that AcP and cysteine protease cooperate to assure Vt breakdown during early embryogenesis of *P. americana*.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Periplaneta americana, commonly known as the American cockroach, is the main peridomestic cockroach found in the urban environment. They occur around the world as potential carriers of various pathogenic organisms (Rust et al., 1991). Its obnoxious behavior and movement frequently result in contamination of food and water either by regurgitation or defecation. In this context, this insect can become a public health problem for urban pest management control. In this sense, the comprehension of its reproductive processes such as oogenesis and embryogenesis may offer new insights for alternative population control strategies.

Insect oogenesis involves the massive incorporation of yolk proteins into oocytes through receptor-mediated endocytosis. In general, the phospholipoglycoprotein vitellin (Vt) is the major yolk protein found in eggs. This macromolecule is synthesized as a precursor called vitellogenin (Vg) mainly by fat body; it is then

secreted into the hemolymph and finally incorporated into the developing oocytes (Raikhel and Dhadialla, 1992). Inside the oocytes, the yolk proteins are accumulated in special organelles called yolk granules (YG) (Snigirevskaya et al., 1997), which can vary in size, density and macromolecule content (Wallace, 1985; Fausto et al., 2001). In *P. americana*, two Vgs were cloned and their sequences showed a high similarity to those of other insects (Tufail et al., 2000, 2001). Storella et al. (1985) isolated two vitellins, Vt-1 and Vt-2, which are composed of four and three subunits, respectively. These proteins are processed during embryogenesis, undergoing a limited and specific cleavage.

During embryogenesis, the content of YG is mobilized to provide molecules such as phosphate, monosaccharides, fatty acids and aminoacids for embryo nourishment, giving metabolic support to its development. YG are assembled during egg formation and these organelles are commonly described as quiescent lysosomes due to the presence of hydrolases typically found in lysosomes (Fagotto, 1995). Degradation of yolk proteins (mainly Vt) is due to the action of several hydrolases and mainly by proteases and AcP, which have been described in many arthropods (Perona and Vallejo, 1985; Logullo et al., 1998; Cho et al., 1999). The exact origin of the hydrolases is poorly understood but some proteases are also taken into the oocytes during oogenesis and are stored inside the small and large YG

Abbreviations: E-64, L-trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane; Z-Phe-Arg-AMC, Z-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride; CA 074, (L-3-trans-(propylcarbamoyl) oxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline; Z-Arg-Arg-AMC, Z-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin hydrochloride.

* Corresponding author. Tel.: +55 212 562 6589; fax: +55 212 280 8193.

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

nearby the yolk proteins in an inactive form (Cho et al., 1999; Yamamoto et al., 2000; Ramos et al., 2007).

To achieve Vt degradation, YG undergo acidification mediated by proton pumps such as proton ATPases ($H^+ATPases$) (Fagotto, 1991; Nordin et al., 1991; Mallya et al., 1992; Abreu et al., 2004) and proton pyrophosphatases ($H^+PPases$) (Motta et al., 2004), leading to the activation of hydrolases, resulting in yolk degradation. This process is widely conserved within oviparous animals being essential for yolk utilization during embryo development.

Acid phosphatases (EC 3.1.3.2) (AcP) are enzymes that catalyze the hydrolysis of orthophosphoric monoester from a wide variety of substrates. In general, they are distributed among several cells occurring as multiple isoforms. AcP are often associated with digestion of proteins, and their participation in yolk degradation of an amphibian model was first described by Lemansky and Aldoroty (1974). Later, the action of AcP during oogenesis and embryogenesis of other oviparous models was further demonstrated (Steinert and Hanocq, 1979; Kawamoto et al., 2000; Fialho et al., 2002). The presence of AcP specifically directed to phosphotyrosine residues (tyrosine phosphatases) was also detected in arthropod ovaries and eggs (Wimmer et al., 1998; Yamaguchi et al., 1999; Silveira et al., 2006; Oliveira and Machado, 2006).

Several proteases of different classes are associated with yolk protein degradation. The presence of a serine protease activity involved in the degradation of specific yolk proteins has been described for several insects such as *Bombyx mori* and *Drosophila melanogaster* (Indrasith et al., 1988; Medina and Vallejo, 1989; Maki and Yamashita, 2001). Cysteine proteases, in particular cathepsins B and L, are the hydrolases most commonly described as being responsible for yolk utilization for distinct oviparous animals such as nematode, tick, frog and insects (Medina et al., 1988; Takahashi et al., 1992; Liu et al., 1996; Yoshizaki and Yonezawa, 1998; Cho et al., 1999; Hashmi et al., 2002; Seixas et al., 2003). However, in the bug *Rhodnius prolixus* and in the bovine tick *Boophilus microplus*, aspartyl proteases have also been linked to yolk degradation (Nussenzveig et al., 1992; Logullo et al., 1998).

Recently, it was suggested that Vt dephosphorylation by AcP increases its susceptibility to proteolysis by aspartyl proteases in *R. prolixus* (Fialho et al., 2005). Besides the participation during programmed proteolysis, the correlation between AcP and proteases was also suggested in *Blattella germanica* (Purcell et al., 1988) and *B. mori* (Yamamoto and Takahashi, 1993). In this context, we characterized the AcP and protease activities during early embryogenesis of *P. americana*. We provide evidence of a possible cooperation between AcP and cysteine proteases in VT proteolysis. These data could give new insights into the yolk metabolism of this important urban pest.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Aprotinin, bovine serum albumin, DTT, E-64, phosphoserine, phosphotyrosine, *p*-nitrophenyl phosphate, Sephadex G-50 and Z-Phe-Arg-AMC were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). CA 074 was purchased from Calbiochem-Novabiochem (La Jolla, CA, USA). Ultrafree-MC centrifugal filter unit was purchased from Millipore Co. (Billerica, MA, USA). All other chemicals were of analytical grade.

2.2. Insects and eggs

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 aquarium and were allowed to develop until they reached the required embryogenesis stage. Day 0 after oviposition corresponds to oothecae laid, up to 24 h. The collected oothecae were grouped and kept under the same conditions for rearing the colony. The total period of embryogenesis takes from 30 to 33 days after oviposition at room temperature (laboratory observations).

2.3. Protease samples

Unless otherwise stated, preparations were conducted as follows. Oothecae from each day of embryogenesis were gently disrupted using a plastic pestle in a modified HEPES-buffered saline (without addition of $CaCl_2$) containing 5 mM HEPES, 5 mM sucrose, 3.1 mM KCl and 214 mM NaCl, pH 7.2 (HBCS) (Blagburn and Sattelle, 1987). These samples were centrifuged at 400g for 2 min at 4 °C and the pellets, enriched in YG, were resuspended in the same solution. The YG fraction was recentrifuged under the same conditions and the pellets were resuspended in the appropriated buffer, according to the experiment. For acidic preparations, 50 mM sodium acetate, 200 mM NaCl and 5 mM EDTA, pH 5.5 were used; for neutral preparations 50 mM HEPES, 200 mM NaCl and 5 mM EDTA, pH 7.0 were used. All samples were then submitted to three cycles of freeze and thaw and centrifuged at 20,000g for 30 min at 4 °C. The supernatants were collected and used as protease preparations. For proteolysis experiments *in vitro*, protease preparations were concentrated in an Ultrafree-MC-30 centrifugal filter unit at 4300g for 2 h at 4 °C, and the retained samples were used. The protein concentration of each sample was quantified by the Lowry method, using bovine serum albumin as standard (Lowry et al., 1951).

2.4. Acid phosphatase samples

Oothecae from each day of embryogenesis were homogenized using a plastic pestle in 100 mM sodium acetate, 10 mM DTT and 10 mM EDTA, pH 4.0. Samples were centrifuged at 20,000g for 5 min at 4 °C, and this procedure was carried out twice. The supernatants were collected and used as AcP preparation. For experiments of proteolysis *in vitro*, the samples were concentrated as described earlier.

2.5. Determination of specific phosphatase activity

The *p*-nitrophenyl phosphate (pNPP) hydrolysis was measured at 44 °C (optimal temperature, data not shown) in reaction medium containing 4 mM pNPP, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 20 mM sodium acetate, pH 5.0 plus the egg preparations, from each day, at protein concentration of 0.1 µg/µl. Reactions were stopped after 60 min with 2 N NaOH. The amount of *p*-trophanol (pNP) released was calculated by reading the absorbance at 405 nm in an ELISA plate reader (Thermomax, Molecular Devices, Orleans Drive Sunnyvale, CA, USA). Samples from days 6 and 10 were tested with the following inhibitors: 10 mM NaF, 1 and 10 mM Na^+K^+ tartrate and 0.1 and 1 mM ammonium molybdate.

2.6. Determination of phosphatase activity against phosphoamino acids

Egg preparations from days 6 and 10 were tested against phosphoserine and phosphotyrosine. The activity was assayed in reaction medium containing 4 mM phosphoamino acid, 50 mM sodium acetate, pH 5.0 and the egg preparations in a final protein concentration of 0.1 µg/µl. The activities were measured

colorimetrically (Fiske and Subbarow, 1925) and calculated by the rate of Pi released from each phosphoamino acid tested.

2.7. Determination of specific peptidase activity

All the protease assays were performed using the fluorogenic substrate Z-Phe-Arg-AMC. Assays with different samples were performed by incubating egg preparations of different days, at room temperature, in 50 mM sodium acetate or 50 mM HEPES plus 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2.5 mM DTT and 5 μ M Z-Phe-Arg-AMC. Substrate hydrolysis was monitored in a Hitachi F4500 fluorimeter at 380 nm excitation and 440 nm emission wavelengths. Steady-state velocities before and after addition of the inhibitors were obtained by linear regression of the substrate hydrolysis curve (Lima et al., 2001).

2.8. Localization of active peptidases in the yolk granules

Oothecae from day 6 were gently disrupted in modified HBSC at room temperature using a plastic pestle. The samples were decanted for 1 min and then the supernatants were collected. This fraction was further decanted for 5 min and the pellet containing the YG (about 10 μ l) was incubated for 5 min in the following medium: 2.5 mM DTT, 2.5 mM PPi, 0.5 mM ATP, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM Z-Phe-Arg-AMC. The samples were placed on glass slides and observed in a Zeiss Axioplan epifluorescent microscope equipped with a DAPI filter set. Control experiments were observed without Z-Phe-Arg-AMC or with the protease inhibitors E-64 (30 μ M) and aprotinin (10 μ g/ml).

2.9. Preparation of Vt-enriched fraction

Oothecae from day 0 were homogenized in a grinder in ice-cold 20 mM HEPES, pH 7.5 and centrifuged twice at 20,000g for 5 min at 4°C. The supernatant was applied to a Penefsky centrifuge column prepared with Sephadex G-50, as previously described (Penefsky, 1977). The volume collected after centrifugation was concentrated under vacuum (Savant Instruments, Inc.) for 2 h at low temperature and this Vt-enriched fraction was used as substrate for assays of proteolysis *in vitro*.

2.10. Assays of Vt degradation

The Vt degradation assay was performed by incubating the Vt-enriched fraction (1.6 mg) at room temperature in the acid preparation (0.8 mg) of 50 mM sodium acetate, 200 mM NaCl and 5 mM EDTA, pH 5.5 or in the neutral preparation (0.8 mg) of 50 mM HEPES, 200 mM NaCl and 5 mM EDTA, pH 7.0. Both preparations (acidic and neutral) were obtained from day 6 oothecae. Aliquots of different times of incubation were collected, and reactions were stopped by addition of the sample buffer and subsequently boiled for 5 min. Eighty micrograms of total protein was analyzed by SDS-PAGE on 12.5% gels and stained with Coomassie brilliant blue R (Laemmli, 1970). To observe the interplay between AcP and cysteine protease, the Vt-enriched fraction (0.2 mg) was pre-incubated with AcP preparation from oothecae of day 6 (0.07 mg), for 1 h at room temperature, followed by the addition of the acid preparation (0.18 mg). Aliquots of different times of incubation were taken and processed as described above for SDS-PAGE. Controls were performed as follows: For inhibition of acidic proteolysis, 30 μ M E-64 was used; for inhibition of neutral proteolysis, 10 μ g/ml aprotinin was used; to inhibit AcP during pre-incubation, we used 1 mM molybdate, 10 mM NaF and 10 mM tartrate and additionally the samples were boiled for 5 min before incubation.

3. Results

3.1. Acid phosphatase activity during early embryogenesis

The levels of AcP were practically undetectable from day 0 to day 4 and then began to increase at day 5. Maximum levels were observed from day 6 to day 10 (Fig. 1A). After 12 days, AcP activity was reduced to basal levels until the end of embryogenesis (data not shown). For this reason, we used oothecae of days 6 and 10 for determination of AcP against different phosphoamino acids (phosphoserine and phosphotyrosine) as substrates (Fig. 1B and C, respectively). At day 6 (Fig. 1B) AcP activity was exclusively against phosphotyrosine and low activity against phosphoserine was detected. However, oothecae from day 10 showed AcP activities against both phosphoaminoacids at similar levels (Fig. 1C).

Table 1 shows the influence of classical inhibitors of lysosomal phosphatases (Fialho et al., 2002). These were efficient at inhibiting 90% of AcP activity for both days. When ammonium molybdate (tyrosine phosphatase inhibitor) was tested, a pronounced inhibition was shown at day 6 (about 97% of total activity) and at day 10 (about 90% of total activity).

3.2. Characterization of protease activity during early embryogenesis

To investigate the profile of protease activity during embryogenesis, egg preparations from different days were tested *in vitro* for peptidase activity at pH 6.5, using a fluorogenic substrate (Fig. 2). At day 0 no peptidase activity was detected and until day 3 very low activity levels were observed. Starting at day-6, up to day 10, increasing activity levels were detected and so samples from these days were selected for further tests. To determine which classes of proteases were present in the preparations two classical protease inhibitors were used: E-64 (cysteine protease inhibitor) and aprotinin (serine protease inhibitor). In the presence of 30 μ M E-64, approximately 50% of the detected activity was inhibited on both days (Fig. 2B). When 10 μ g/ml aprotinin was tested together with E-64, activity at day 6 was abolished while at day 10 there was a 20% residual activity. These data indicate the presence of active cysteine and serine proteases during embryogenesis.

3.3. Detection of peptidase activity in YG

To investigate the location of active proteases, a suspension of YG from day 6 was incubated with the fluorogenic substrate and observed in a fluorescence microscope, as previously described by Uchida and co-workers (2001) (Fig. 3). We observed intense labeling in small YG (<10 μ m in diameter) (Figs. 3A and B) and occasionally in larger ones (>20 μ m). Controls without substrate (Fig. 3C and D) or with proteases inhibitors (Fig. 3E and F) showed no labeling.

3.4. Characterization of cysteine protease activity

The activity from each sample (acidic or neutral) was measured and the specific inhibitor was added after 100 s. The cysteine protease activity determined was the difference between total activities of the residual activities after E-64. We showed that the peptidase activity tested at pH 5.0 (specifically inhibited by E-64) belongs to Clan CA-cysteine protease in this assay. E-64 inhibits cysteine proteases from the C1 papain superfamily and C2 Calpain family. Our assay was performed in the presence of EDTA and at acidic pH, thus preventing the detection of calpain activity (which requires Ca²⁺ and neutral pH). The cysteine protease

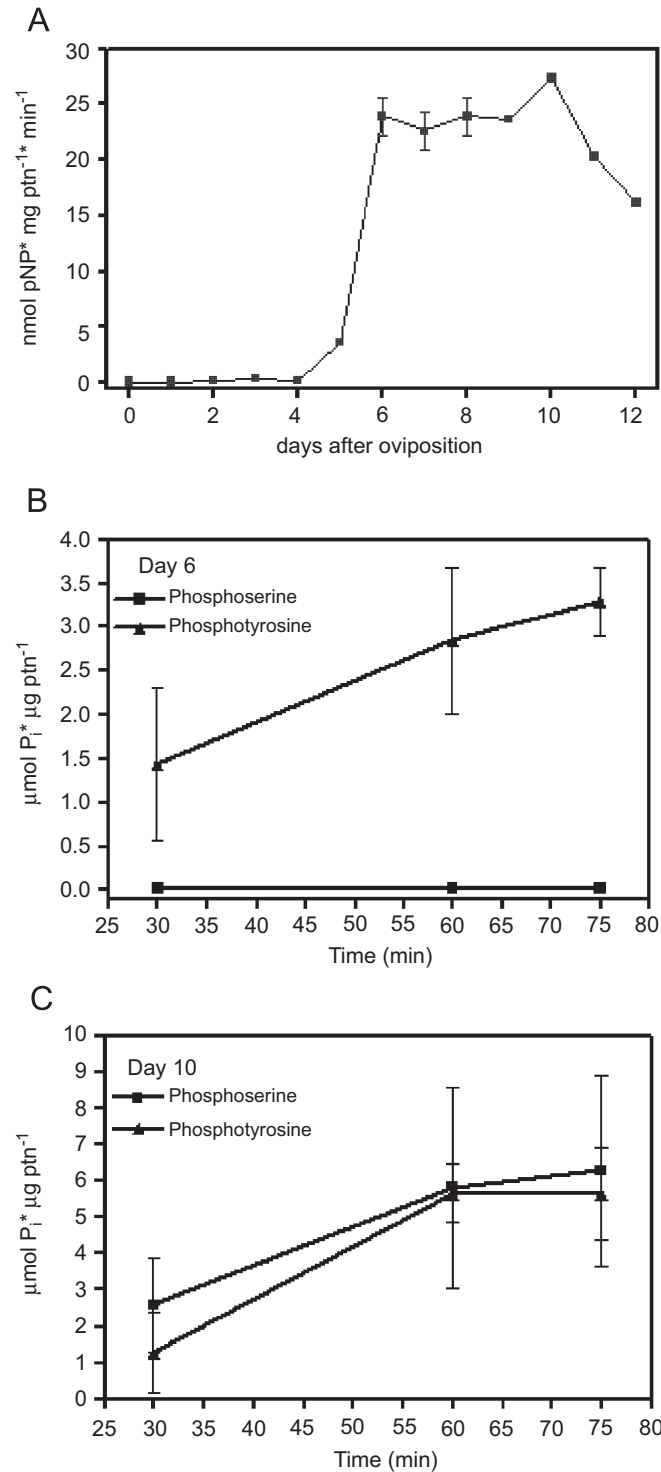


Fig. 1. AcP activity levels during early embryogenesis. (A) Oothecae from each day of embryogenesis were prepared and assayed against pNPP. The results are expressed as nmol of (pNP) released (mg ptn⁻¹ min⁻¹). (B and C) Samples from day 6 (B) and day 10 (C) were assayed against two phosphoamino acids. The results are expressed as the rate of Pi released (μmol Pi μg ptn⁻¹). Each point represents the mean ± S.E.M. of two independent experiments, each of them carried out in triplicate.

activity started at day 3 and increased until day 10 (Fig. 4A). The C1 papain superfamily can be roughly divided in two groups: Cathepsin B-like and cathepsin L-like enzymes. To determine which type of cysteine protease was present in egg preparations, samples from days 6 and 10 were tested in the presence

Table 1
Influence of different inhibitors on AcP activity

Effectors	Day 6	Day 10
Control	2.84 ± 0.53	13.3 ± 0.75
Molybdate (0.1 mM)	1.78 ± 0.21	5.39 ± 0.44
Molybdate (1 mM)	0.11 ± 0.21	1.66 ± 0.50
NaF (10 mM)	0.43 ± 0.20	1.88 ± 0.39
Na ⁺ K ⁺ tartrate (1 mM)	1.54 ± 0.35	4.97 ± 0.66
Na ⁺ K ⁺ tartrate (10 mM)	0.11 ± 0.22	1.49 ± 0.20

Oothecae from days 6 and 10 were assayed against pNPP in the presence of different phosphatase inhibitors. The results are expressed as nmol of (pNP) released (mg ptn⁻¹ min⁻¹). Each point represents the average of three independent experiments, performed in duplicate.

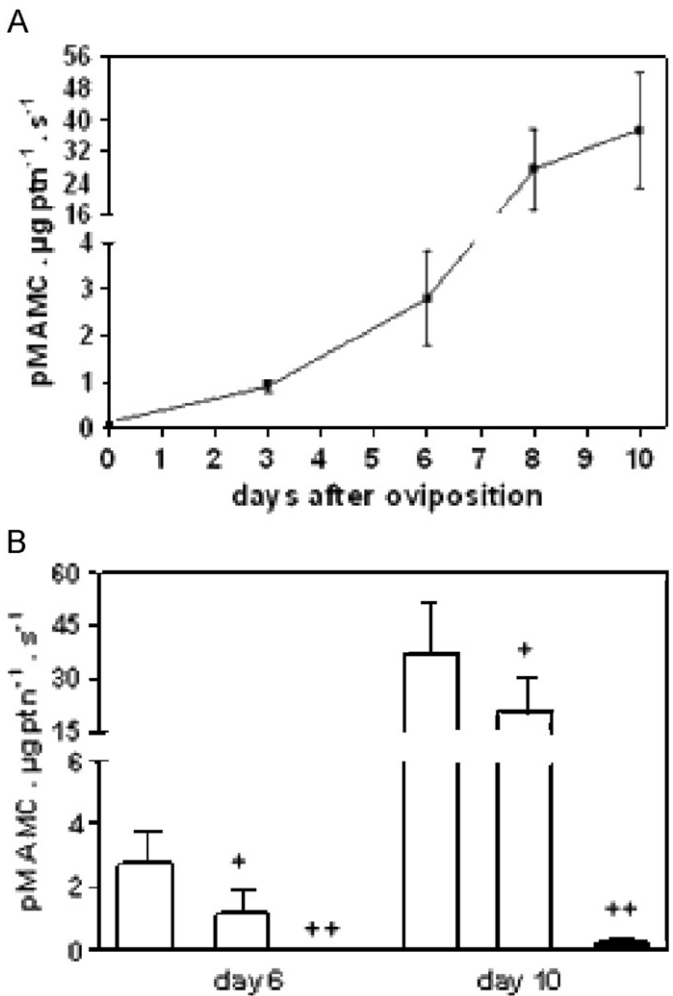


Fig. 2. Peptidase activity levels during early embryogenesis. (A) Oothecae from each day of embryogenesis were prepared and assayed with the fluorogenic substrate Phe-Arg-AMC at 25 °C, pH 6.5 and substrate hydrolysis was monitored continuously for 5 min. (B) Samples from days 6 and 10 were tested for peptidase activity by using the same substrate and after 100 s the inhibitor E-64 (30 μM) was added; After 300 s the inhibitor aprotinin (10 μg/μL) was added to the same reaction. The product formation was expressed as AMC concentration (μg of ptn⁻¹ s⁻¹). Each point represents the mean activities ± S.E.M. of three independent groups. At day 6, peptidase activity was null after addition of two inhibitors together.

of a specific inhibitor of cathepsin B (CA 074). No significant alterations were observed for day 6 (1.44 ± 0.50 pM AMC/μg ptn/s to control and 1.60 ± 0.53 pM AMC/μg ptn/s with inhibitor) or day

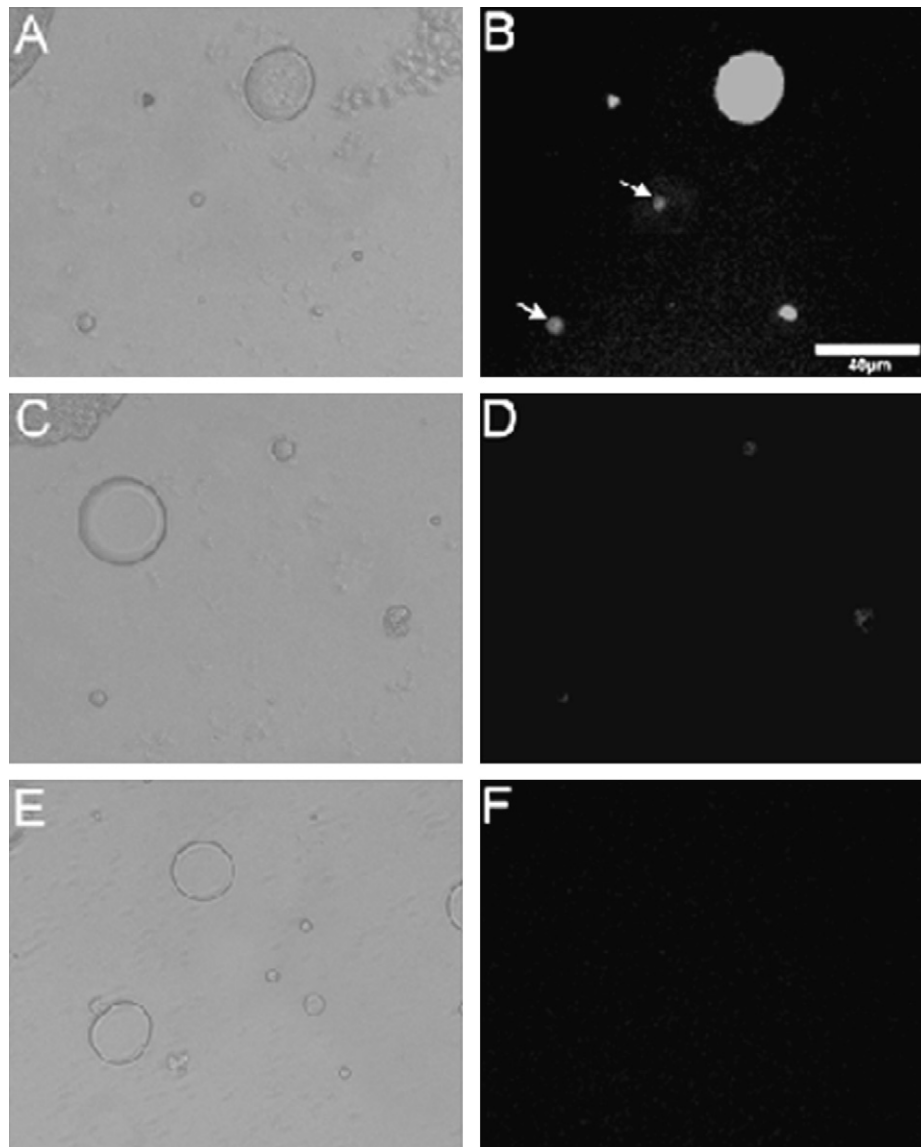


Fig. 3. Localization of active proteases in YG. At day 6 YG suspension was incubated with the substrate Phe-Arg-AMC and observed in fluorescence microscope. Left panels are phase contrast micrographs and right panels are their correspondent fluorescence images. (A, B) YG incubated with Phe-Arg-AMC. (C, D) YG incubated in the absence of Phe-Arg-AMC. (E, F) YG incubated with Phe-Arg-AMC plus the protease inhibitors aprotinin ($10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) and E-64 ($30 \mu\text{M}$). The results are representative for 3 experiments and at least 5 fields per experiment were observed. The arrows indicate labeled small YG.

$10 (5.15 \pm 0.27 \text{ pMAMC}/\mu\text{g ptn/s}$ to control and $6.1 \pm 0.98 \text{ pMAMC}/\mu\text{g ptn/s}$ with inhibitor). In addition, when a specific substrate for cathepsin B (Arg-Arg-AMC) was used, no protease activity was detected (data not shown). These results suggest that cysteine protease present in the eggs is a cathepsin L-like enzyme.

Several cysteine proteases described in eggs from other oviparous are from maternal origin and these precursors need to undergo activation at acidic pH (Cho et al., 1999; Ribolla et al., 2001; Yamahama et al., 2003). A day 3 egg homogenate, prepared at pH 7.0 (to avoid activation by acidic pH) was incubated in pH 5.0 and protease activity was measured at different time intervals (Fig. 4B). Cysteine protease activity increased four-fold after 20 min of incubation at pH 5.0, and continued to increase up to 120 min. These results suggest that the cysteine proteases present in the YG might require acidification of their environment in order to become activated. Controls using E-64 fully inhibited activity (data not shown).

3.5. Proteolysis of yolk proteins *in vitro*—correlation between AcP and cysteine protease

To determine the natural substrates of the cysteine proteases during early embryogenesis, a Vt-enriched fraction from day 0 was incubated for different time intervals with the acidic preparation (pH 5.0) from day 6 in the presence (Fig. 5A, left panel) or absence of the inhibitor E-64 (Fig. 5A, right panel). No degradation of high molecular weight Vt subunits (approximately 110 kDa at the gel) was observed. One hypothesis could be that Vt subunits were protected from cysteine protease by phosphate residues. In order to test this hypothesis, we pre-incubated the Vt-enriched fraction with AcP followed by incubation with the acidic preparation and then removed aliquots at specified time intervals (Fig. 5B). As shown in the left panel, when the proteolysis assay was made in the presence of AcP, the intact Vt subunit could no longer be observed after 24 h. This effect was inhibited when the AcP pre-incubation was made in the presence of AcP inhibitors

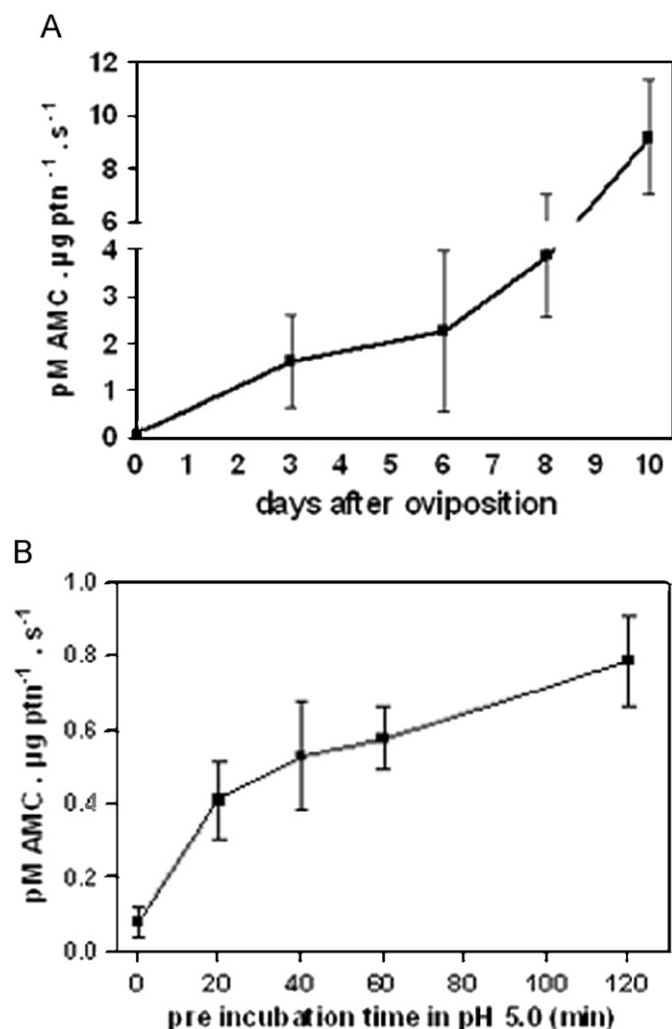


Fig. 4. Cysteine protease activity levels during early embryogenesis and acid activation. (A) Oothecae from each day of embryogenesis were prepared and assayed (at pH 5.0) with the fluorogenic substrate Phe-Arg-AMC at 25 °C. Substrate hydrolysis was monitored continuously for 200 s. E-64 30 µM was added and the final activity represents the difference between total activities minus residual activity after the inhibitor. Each point represents the mean activities ± S.E.M. of three independent groups. (B) At day 3 oothecae were prepared (at pH 7.0) and pre incubated for different times at pH 5.0. Just after incubation they were tested for peptidase activity. Each point represents the mean ± S.E.M. of three independent experiments.

(right panel). Controls with E-64 during incubations showed partial inhibition of the hydrolysis up to 24 h (Fig. 5C). These data suggest the degradation of Vt by cysteine protease requires the presence of AcP.

3.6. Characterization of serine protease activity and proteolysis of yolk proteins *in vitro*

To analyze the levels of serine protease activity, the neutral preparation was tested in neutral pH using aprotinin as a specific inhibitor as described earlier for cysteine protease. Differently from cysteine protease, serine protease activity (Fig. 6A) only appeared at day 6 and continued to increase from day 8 to day 10. To investigate if serine proteases contributed to Vt degradation, the Vt-enriched fraction from day 0 was incubated for different times at neutral pH with the neutral egg preparation. As shown in Fig. 6B, a subunit of 130 kDa was

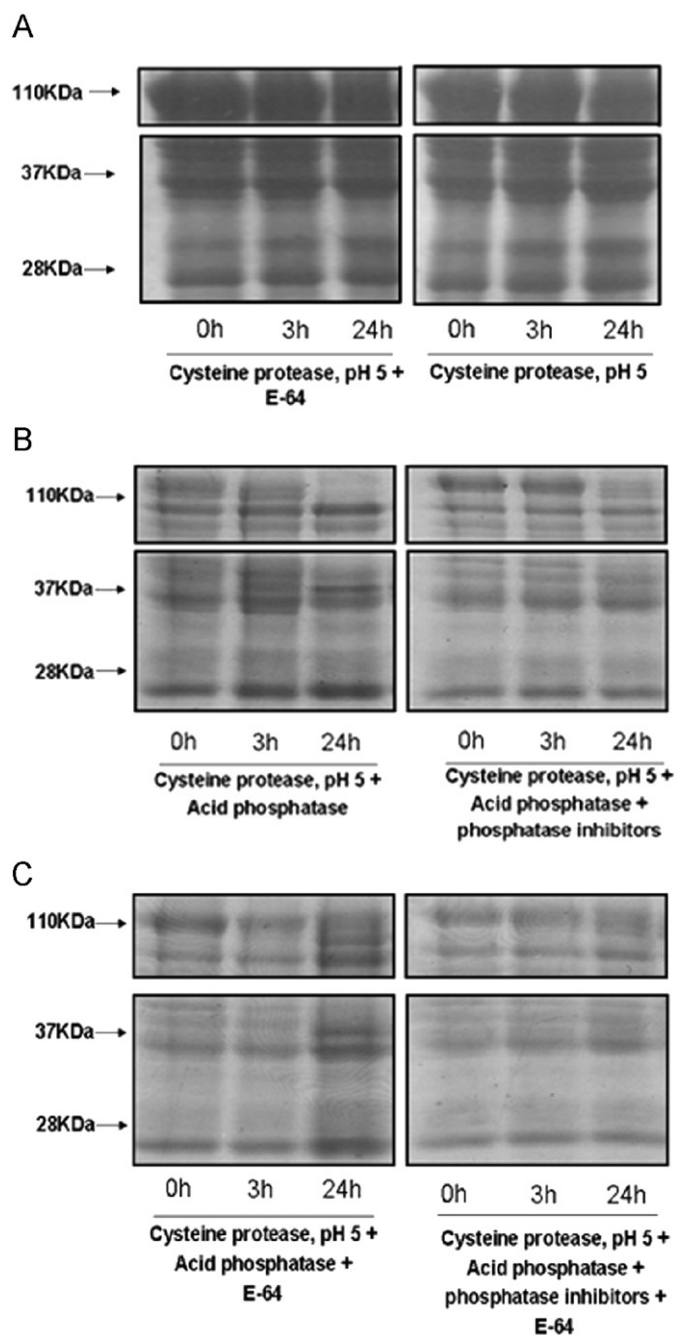


Fig. 5. Acid Vts proteolysis and effect of AcP. (A) Vt-enriched sample was incubated with the acid protease preparation for the indicated times (right panel). Controls were incubated plus E-64 30 µM (left panel). Samples from each group were separated by SDS-PAGE. (B) The same experiment as described above was pre-incubated with AcP (right panel). Controls were incubated with molybdate (1 mM), NaF (10 mM) and tartrate (10 mM) (left panel). Samples from each group were separated by SDS-PAGE. (C) The same experiment as described for B, controlling proteolysis with E-64 30 µM. Samples from each group were separated by SDS-PAGE. The results are representative of 3 experiments.

slightly degraded during the incubation, while two proteins of lower molecular mass, possibly the products of proteolysis, were detected (28.8 and 19.3 kDa, arrows at the right panel). Pre-incubations with AcP did not alter the proteolytic profile (data not shown). Taken together this data suggests that endogenous serine protease activity is independent of AcP and contributes only minimally to Vt degradation in YG at early embryogenesis.

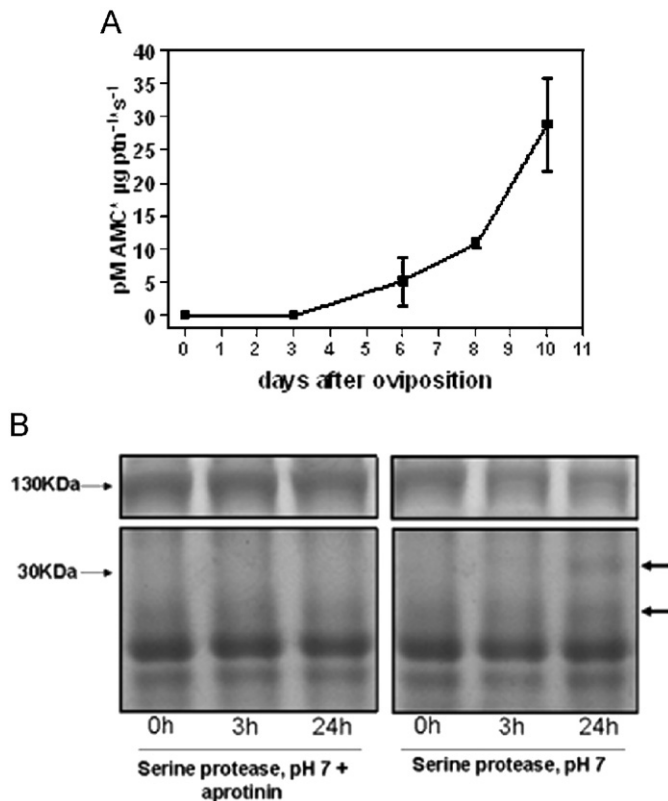


Fig. 6. Serine protease activity levels during early embryogenesis and neutral Vts proteolysis. (A) Oothecae from each day of embryogenesis were prepared and assayed (at pH 7.0) with the fluorogenic substrate Phe-Arg-AMC at 25 °C. Substrate hydrolysis was monitored continuously for 200 s. Aprotinin (10 µg/µL) was added and the final activity represents the difference between total activities minus residual activity after the inhibitor. Each point represents the mean activities $\pm$ S.E.M. of three independent groups. (B) Vt-enriched sample was incubated with neutral protease preparation for the indicated times. Controls were incubated with aprotinin (10 µg/µL). Samples from each group were separated by SDS-PAGE. Arrows at left panel indicate new bands after proteolysis.

4. Discussion

Total embryonic development of *P. americana* takes about 32 days and the first 10 days represent the period when the most important stages of embryo formation, such as gastrulation, metamerization and organogenesis occur (Lenoir-Rousseaux and Lender, 1970). During this period, Vt utilization is not detectable until day 5, when yolk proteins undergo a limited and specific cleavage process that takes place until day 13 (Storella et al., 1985). In this paper, we showed the presence of AcP and the activities of two classes of proteases during this period, being coincident with yolk degradation. In addition, we showed that Vt degradation *in vitro* is largely promoted by cysteine protease, which requires AcP to accomplish Vt proteolysis.

AcP are classical hydrolases commonly described as lysosomal markers. Previous works have characterized this enzyme as a YG component, being activated during embryogenesis after an unknown signal (Nussenzveig et al., 1992; Ribolla et al., 2001). Although the origin of AcP remains unknown, our group has previously characterized an acidic tyrosine phosphatase in *P. americana* oocytes, which was located inside small vesicles and was probably sequestered from hemolymph during oogenesis (Oliveira and Machado, 2006). These data suggest a maternal origin of this enzyme. In this work, we demonstrated an AcP activity starting at day 6 after oviposition with preference for tyrosine residues. In *P. americana* both vitellogenins I and II

(precursors of Vt I and II) present 45 and 93 residues of tyrosine, respectively, which represent important putative sites of phosphorylation (Tufail et al., 2000; Tufail et al., 2001). In addition, phosphotyrosine residues in Vt of *P. americana* were detected by Western blot (data not shown), reinforcing the possibility that Vts are substrates for AcP activity. On the other hand, we observed a serine phosphatase activity, detected on day 10, by using phosphoserine as substrate (Fig. 1C). This could be due to some other maternally originated phosphatase or to an embryo-derived serine phosphatase. Independently of the origin of the enzyme, it is reasonable that VG-2 could be a substrate for this activity because it presents clusters of serine residues, which might represent a potential site for phosphorylation (Tufail et al., 2001). Thus, by this time (day 10), a serine and a tyrosine phosphatase might be active and involved in yolk utilization.

In many insects, more than one protease is responsible for utilization of yolk proteins during development. In *B. mori*, both cysteine and serine proteases take active participation in yolk degradation, with specific substrates (Indrasith et al., 1988; Takahashi et al., 1992; Maki and Yamashita, 2001). In this work, the cysteine protease activity seemed to appear earlier (day 3) than the serine protease activity (day 6). The cysteine protease activity detected in this paper was activated, *in vitro*, by acidic pH. The activity present at day 3 was low but could be significantly increased under pre-incubation of the sample in acidic pH. C1-family of papain-like cysteine proteases are synthesized as precursors that undergo self activation upon exposure to acidic pH. It is possible that YG cysteine proteases are also kept as inactive precursors, which become active upon acidification of the granules. This profile of activation was previously observed in other models like in the cockroach *B. germanica* (Liu et al., 1996) in which cysteine proteases could be activated *in vivo* and *in vitro* by acidification during embryogenesis. The cysteine protease from *B. mori* is synthesized by the body fat and stored inside small YG during oogenesis (Yamamoto et al., 2000), being activated by acidification at embryogenesis (Yamahama et al., 2003). In the stick insect *Carausius morosus*, cysteine protease activities are located in a few YG and during embryogenesis, after acidification, more granules become proteolytically active (Fausto et al., 2001). Thus, our results indicate that pH acidification could be a possible mechanism for proteolytic activation during *Periplaneta*'s embryogenesis. Our data showed peptidase activity is associated to different populations of YG at day 6 (Fig. 3).

The serine protease activity was detected only at the end of early embryogenesis (from day 6 to day 10) and it was less effective in Vt degradation (Fig. 6B). In *B. mori*, a serine protease (designed by 30kP) is expressed in the midgut of newly hatched larvae and this enzyme has its initial expression at the end of embryogenesis (Maki and Yamashita, 2001), although a cysteine protease was activated by acidification at the beginning of embryogenesis (Yamahama et al., 2003). Taken together our data suggest that cysteine protease and serine protease follow different kinetics of activation during embryogenesis with cysteine protease being activated by acidic pH and a serine protease becoming active later, reinforcing distinct dynamics of these enzymes.

In *R. prolixus* and *B. microplus*, a correlation between AcP and aspartyl protease on Vts degradation was demonstrated (Fialho et al., 2005; Silveira et al., 2006). In Vt degradation assays, we observed that the endogenous cysteine protease at day 6 was unable to promote proteolysis (Fig. 5A). However, when Vt preparations were pre incubated with AcP, Vt processing was promptly observed (Fig. 5B) suggesting that Vt should be dephosphorylated before degradation by cysteine protease,

i.e., a previous Vt dephosphorylation could facilitate protease access to the substrate. Phosphorylation–dephosphorylation of yolk proteins participating on yolk degradation has occurred as an important mechanism during embryogenesis (Yamamoto and Takahashi, 1993) although the defined role of these events is not well determined.

In *P. americana* a calcium-regulated process of membrane fusion of egg vesicles during early embryogenesis was described (Ramos et al., 2006) and the same happened to *R. prolixus* (Ramos et al., 2007). In *R. prolixus*, the transfer of AcP from small vesicles to large YG was observed and it was suggested that this event could regulate the access of hydrolases and/or proton-pumps to the yolk proteins and thus modulate Vt degradation. This model could be applied to our findings, since that without AcP the endogenous cysteine proteases were unable to process Vt. Thus the transfer of AcP to the large YG population could be used for modulation of yolk degradation earlier on in the embryogenesis. Whether *P. americana* hydrolases are originally present in both YG populations or are transferred to the large YG after fusion events, as observed for *R. prolixus*, remains to be investigated. We showed the presence of coincident hydrolases activities and partial characterization of these enzymes, evidencing interplay between AcP and cathepsin-L to degrade Vt. Our findings therefore contribute to understand yolk degradation during early embryogenesis of *P. americana*.

Acknowledgments

We express our gratitude to Luiz Gustavo Taveira Pilize and Tatiana Rocha Costa, for generously providing laboratory materials and facilities and to Marcelo Neves de Medeiros, for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the following Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo a Pesquisa Carlos Chagas Filho (FAPERJ)/Pensa rio, Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), FINEP/FUJB (no. 76.97.1000.000) and Programa de Apoio a Núcleos de Excelência do Ministério da Ciência e Tecnologia (PRONEX-MCT).

References

- Abreu, L.A., Valle, D., Manso, P.P.A., Façanha, A.R., Machado, M.P., Masuda, H., Masuda, A., Vaz Jr., I., Lenzi, H., Oliveira, P.L., Logullo, C., 2004. Proteolytic activity of *Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 443–449.
- Blagburn, J.M., Sattelle, D.B., 1987. Presynaptic depolarization mediates presynaptic inhibition at a synapse between an identified mechanosensory neurone and giant interneurone three in the first instar cockroach *P. americana*. *Journal of Experimental Biology* 127, 135–157.
- Cho, W.L., Tsao, S.M., Hays, A.R., Walters, R., Chen, J.S., Snigirevskaya, E.S., Raikhel, A.S., 1999. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. *Journal of Biological Chemistry* 274, 13311–13321.
- Fagotto, F., 1991. Yolk degradation in tick eggs: III. Developmentally regulated acidification of yolk spheres. *Developmental and Growth Differentiation* 33, 57–66.
- Fagotto, F., 1995. Regulation of yolk degradation, or how to make sleepy lysosomes. *Journal of Cell Science* 108, 3645–3647.
- Fausto, A.M., Gambellini, G., Mazzini, M., Cecchetti, A., Masetti, M., Giorgi, F., 2001. Yolk granules are differentially acidified during embryo development in the stick insect *Carausius morosus*. *Cell and Tissue Research* 305, 433–443.
- Fialho, E., Silveira, A.B., Masuda, H., Silva-Neto, M.A.C., 2002. Oocyte fertilization triggers acid phosphatase activity during *Rhodnius prolixus* embryogenesis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32, 871–880.
- Fialho, E., Nakamura, A., Juliano, L., Masuda, H., Silva-Neto, M.A.C., 2005. Cathepsin D-mediated yolk protein degradation is blocked by acid phosphatase inhibitors. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 436, 246–253.
- Fiske, C.F., Subbarow, Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorous. *Journal of Biological Chemistry* 66, 375–400.
- Hashmi, S., Britton, C., Liu, J., Guiliano, D.B., Oksov, Y., Lustigman, S., 2002. Cathepsin L is essential for embryogenesis and development of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 3477–3486.
- Indrasith, L.S., Sasaki, T., Yamashita, O., 1988. A unique protease responsible for selective degradation of a yolk protein in *Bombyx mori*. Purification, characterization, and cleavage profile. *Journal of Biological Chemistry* 263, 1045–1051.
- Kawamoto, M., Fujiwara, A., Yasumasu, I., 2000. Changes in the activities of protein phosphatase type 1 and type 2A in sea urchin embryos during early development. *Developmental and Growth Differentiation* 42, 395–405.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lemansky, L.F., Aldoroty, R., 1974. Role of acid phosphatase in the breakdown of yolk platelets in developing amphibian embryos. *Journal of Morphology* 153, 419–426.
- Lenoir-Rousseaux, J.J., Lender, Th., 1970. Table de développement embryonnaire de *Periplaneta americana* (L.) Insecte, Dictyoptère. *Bulletin de la Société Zoologique de France* 95, 737–751.
- Lima, A.P., dos Reis, F.C., Serveau, C., Lalmanach, G., Juliano, L., Ménard, R., Vernet, T., Thomas, D.Y., Storer, A.C., Scharfstein, J., 2001. Cysteine protease isoforms from *Trypanosoma cruzi*, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility to inhibitors. *Molecular Biochemistry and Parasitology* 114 (1), 41–52.
- Liu, X., McCarron, R.C., Nordin, J.H., 1996. A cysteine protease that processes insect vitellin. Purification and partial characterization of the enzyme and the proenzyme. *Journal of Biological Chemistry* 271, 33344–33351.
- Logullo, C., Vaz Jr., I.S., Sorgine, M.H.F., Paiva-Silva, G.O., Faria, F.S., Zingali, R.B., Lima, M.F.R., Abreu, L., Oliveira, E.F., Alves, E.W., Masuda, H., Gonzales, J.C., Masuda, A., Oliveira, P.L., 1998. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology* 116, 525–532.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.
- Maki, N., Yamashita, O., 2001. The 30kP protease A responsible for 30-kDa yolk protein degradation of the silkworm, *Bombyx mori*: cDNA structure, developmental change and regulation by feeding. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 407–413.
- Mallya, S.K., Partin, J.S., Valdizan, M.C., Lennarz, W.J., 1992. Proteolysis of the major yolk glycoproteins is regulated by acidification of the yolk platelets in sea urchin embryos. *Journal of Cell Biology* 117, 1211–1221.
- Medina, M., Vallejo, C.G., 1989. A serine proteinase in *Drosophila* embryos: yolk degradation and developmental activation. *Insect Biochemistry* 19, 687–691.
- Medina, M., León, P., Vallejo, C.G., 1988. *Drosophila* cathepsin B-like proteinase: a suggested role in yolk degradation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 263, 355–363.
- Motta, L.S., da Silva, W.S., Oliveira, D.M.P., de Souza, W., Machado, E.A., 2004. A new model for proton pumping in animal cells: the role of pyrophosphate. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34, 19–27.
- Nordin, J.H., Beaudoin, E.L., Lin, X., 1991. Acidification of YGs in *Blattella germanica* eggs coincides with proteolytic processing of vitellin. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 18, 177–192.
- Nussenzweig, R.H., Oliveira, P.L., Masuda, H., 1992. Identification of yolk platelet-associated hydrolases in the oocytes of *Rhodnius prolixus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 21, 253–262.
- Oliveira, D.M.P., Machado, E.A., 2006. Characterization of a tyrosine phosphatase activity in the oogenesis of *Periplaneta americana*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 62, 24–35.
- Penefsky, H.S., 1977. Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 252 (9), 2891–2899.
- Perona, R., Vallejo, C.G., 1985. Acid hydrolysis during *Artemia* development: a role in yolk degradation. *Comparative Biochemistry and Physiology* B 81, 993–1000.
- Purcell, J.P., Quinn, T.M., Kunkel, J.G., Nordin, J.H., 1988. Yolk hydrolase activities associated with polypeptide and oligosaccharide processing of *Blattella germanica* vitellin. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 9, 237–250.
- Raikhel, A.S., Dhadialla, T.S., 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annual Review of Entomology* 37, 217–251.
- 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, 1247–1258.
- Ramos, I.B., Miranda, K., de Souza, W., Oliveira, D.M.P., Lima, A.P.C.A., Sorgine, M.H.F., 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, 138–148.
- Ribolla, P.E.M., Bijovski, A.T., de Bianchi, A.G., 2001. Procathepsin and acid phosphatase are stored in *Musca domestica* yolk spheres. *Journal of Insect Physiology* 47, 225–232.
- Rust, M.K., Reiersen, D.A., Hansgen, K.H., 1991. Control of American cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) in sewers. *Journal of Medical Entomology* 28, 210–213.
- Seixas, A., dos Santos, P.C., Velloso, F.F., Vaz Jr., I.S., Masuda, A., Horn, F., Termignoni, C., 2003. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology* 126, 155–163.
- Silveira, A.B., Castro-Santos, J., Senna, R., Logullo, C., Fialho, E., Silva-Neto, M.A.C., 2006. Tick vitellin is dephosphorylated by a protein tyrosine phosphatase during egg development: effect of dephosphorylation on VT proteolysis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36, 200–209.

- Snigirevskaya, E.S., Sappington, T.W., Raikhel, A.S., 1997. Internalization and recycling of vitellogenin receptor in the mosquito oocytes. *Cell and Tissue Research* 290, 175–183.
- Steinert, G., Hanocq, J., 1979. Ultrastructural localization of acid phosphatase activity in matured *Xenopus laevis* oocyte. *Biologie Cellulaire* 34, 247–254.
- Storella, J.R., Wojchowski, D.M., Kunkel, J.G., 1985. Structure and embryonic degradation of two native vitellins in the cockroach, *Periplaneta americana*. *Insect Biochemistry* 15, 259–275.
- Takahashi, S.Y., Zhao, X., Kageyama, T., Yamamoto, Y., 1992. Acid cysteine proteinase from the eggs of silkworm *Bombyx mori*: tissue distribution, developmental changes and the sites of synthesis for the enzyme. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 22, 369–377.
- Tufail, M., Lee, J.M., Hatakeyama, M., Oishi, K., Takeda, M., 2000. Cloning of vitellogenin cDNA of the American cockroach, *Periplaneta americana* (Dictyoptera), and its structural and expression analyses. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 45, 37–46.
- Tufail, M., Hatakeyama, M., Takeda, M., 2001. Molecular evidence for two vitellogenin genes and processing of vitellogenins in the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 48, 72–80.
- Ushida, K., Ohmori, D., Ueno, T., Nishizuka, M., Eshita, Y., Fukunaga, A., Kominami, E., 2001. Preoviposition activation of cathepsin-like proteinases in degenerating ovarian follicles of the mosquito *Culex pipiens pallens*. *Developmental Biology* 237, 68–78.
- Wallace, R.A., 1985. Vitellogenesis and oocytes growth in non-mammalian vertebrates, In: Browder, W.L. (ed.), *Developmental Biology: A Comprehensive Synthesis*, vol. 1, Oogenesis. Plenum Press, New York, pp. 127–166.
- Wimmer, M., Schmid, B., Tag, C., Hofer, H.W., 1998. *Ascaris suum*: protein phosphotyrosine phosphatases in oocytes and developing stages. *Experimental Parasitology* 88, 139–145.
- Yamaguchi, S., Homma, K., Natori, S., 1999. A novel egg-derived tyrosine phosphatase, EDTP, that participates in the embryogenesis of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *European Journal of Biochemistry* 259, 946–953.
- 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) silkworm eggs: localization of yolk proteins and BCP, and acidification of yolk granules. *Journal of Insect Physiology* 49, 131–140.
- Yamamoto, Y., Takahashi, S.Y., 1993. Cysteine protease from *Bombyx* eggs: role in programmed degradation of yolk proteins during embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology* 106B, 35–45.
- Yamamoto, Y., Yamahama, Y., Katou, K., Watabe, S., Takahashi, S.Y., 2000. *Bombyx* acid cysteine protease (BCP): hormonal regulation of biosynthesis and accumulation in the ovary. *Journal of Insect Physiology* 46, 783–791.
- Yoshizaki, N., Yonezawa, S., 1998. Cysteine proteinase plays a key role for the initiation of yolk digestion during development of *Xenopus laevis*. *Developmental and Growth Differentiation* 40, 659–667.

8.3 Anexo 03: Artigo publicado na Revista “Journal of Experimental Biology” em 2007.

Calcium-regulated fusion of yolk granules is important for yolk degradation during early embryogenesis of *Rhodnius prolixus* Stahl

I. B. Ramos¹, K. Miranda², W. de Souza², D. M. P. Oliveira¹, A. P. C. A. Lima³, M. H. F. Sorgine⁴ and E. A. Machado^{1,*}

¹Laboratório de Entomologia Médica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), ²Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF), ³Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Proteases, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF) and ⁴Laboratório de Artrópodos Hematófagos, Instituto de Bioquímica Médica (IBQM), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Cidade Universitária – Ilha do Fundão, 21941-590 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

*Author for correspondence (e-mail: ednildo@biof.ufrj.br)

Accepted 8 November 2006

Summary

This study examined the process of membrane fusion of yolk granules (YGs) during early embryogenesis of *Rhodnius prolixus*. We show that eggs collected at days 0 and 3 after oviposition contain different populations of YGs, for example day-3 eggs are enriched in large YGs (LYGs). Day-3 eggs also contain the highest free $[Ca^{2+}]$ during early embryogenesis of this insect. *In vitro* incubations of day-0 YGs with $[Ca^{2+}]$ similar to those found in day-3 eggs resulted in the formation of LYGs, as observed *in vivo*. Fractionation of LYGs and small YGs (SYGs) and their subsequent incubation with the fluorescent membrane marker PKH67 showed a calcium-dependent transference of fluorescence from SYGs to

LYGs, possibly as the result of membrane fusion. Acid phosphatase and H^+ -PPase activities were remarkably increased in day-3 LYGs and in calcium-treated day-0 LYGs. Both fractions were found to contain vitellins as major components, and incubation of YGs with calcium induced yolk proteolysis *in vitro*. Altogether, our results suggest that calcium-induced membrane fusion events take part in yolk degradation, leading to the assembly of the yolk mobilization machinery.

Key words: calcium, embryogenesis, membrane fusion, yolk degradation, yolk granules.

Introduction

Chagas disease is the first cause of cardiac lesions in countries of Latin America, where it is endemic (Moncayo, 2003), and *Rhodnius prolixus* is one of the most important vectors of this disease (World Health Organization, 2002). In this context, this insect is crucial for the propagation of Chagas disease and consequently is an important target for vector control. From this point of view, the understanding of reproductive processes, such as oogenesis and embryogenesis, can offer new insights and targets for population control of this insect.

Oogenesis in insects, as in all oviparous animals, occurs by massive incorporations of yolk protein through receptor-mediated endocytosis (Engelman, 1979; Raikhel and Dadhialla, 1992). Endocytic activities during insect oogenesis involve the incorporation of the lipophosphoglycoprotein vitellogenin (Oliveira et al., 1986; Raikhel and Dadhialla, 1992; Valle, 1993; Sappington and Raikhel, 1998). Once inside the oocyte the vitellogenin, now referred to as vitellin (VT), is

stored in organelles known as yolk granules (YGs) (Kunkel and Nordin, 1985; Purcell et al., 1988; Machado et al., 1998). After oviposition, the YGs fill almost the entire volume of the fresh egg and can vary significantly in size and density. During embryogenesis, *R. prolixus* VT represents the major yolk protein, being mobilized as the main amino acid source for embryo development.

Yolk degradation occurs by activation of acidic hydrolases also stored within YGs. The exact origin of these hydrolases is poorly understood but some of these enzymes are also taken into the oocytes during oogenesis, being stored near yolk proteins in an inactive state. *Aedes aegypti* carboxypeptidase (Cho et al., 1991) and cathepsin B-like protease (Cho et al., 1999), *Blattella germanica* vitellin-processing protease and *Xenopus laevis* lysosomal enzymes have been shown to accumulate in the oocytes during oogenesis (Wall and Meleka, 1985; Liu and Nordin, 1998; Yin et al., 2001). To activate hydrolases, YGs undergo a process of acidification mediated by proton pumps, such as proton ATPases (H^+ -ATPases)

(Fagotto, 1991; Nordin et al., 1991; Mallya et al., 1992; Fagotto, 1995) and proton pyrophosphatases (H^+ -PPases) (Motta et al., 2004). In insects, several hydrolytic enzymes found in YGs such as cathepsins (Takahashi et al., 1996; Cho et al., 1999; Ribolla et al., 2001), acid phosphatases (Nussenzveig et al., 1992; Ribolla et al., 1993; Fialho et al., 2002; Fialho et al., 2005) and glycosidases (Purcell et al., 1988) were shown to be activated by low pH. Acidification of YGs, therefore, results in activation of hydrolases and degradation of VT. This process is widely conserved within oviparous animals, being essential for yolk mobilization during embryo development. Processing and degradation of VT during embryogenesis of *R. prolixus* is also dependent on acidification of YGs (Oliveira et al., 1989). In addition, YG-associated hydrolases such as cathepsin D (CD) and acid phosphatase (AP) have been identified in the oocytes of this insect (Nussenzveig et al., 1992; Fialho et al., 2002).

It is generally believed that the YG population is not homogeneous since the vesicles can vary in their macromolecule content and can be fractionated according to their different size and density (Fagotto, 1991; Chestkov et al., 1998; McNeil et al., 2000; Yamahama et al., 2003). For example, in echinoderms, such as starfish and sea urchin, the egg vesicle population is divided in two main groups: reserve and cortical granules. Each group has distinct functions in fertilization signaling and embryo nourishment (Chestkov et al., 1998). In the silkworm *Bombyx mori*, the acid enzymes are only present in the small YGs (SYGs), whereas the yolk proteins are localized in the large ones (Yamahama et al., 2003). In the stick insect *Carausius morosus*, small YGs are frequently more acidic than large YGs and are often seen surrounding the large ones (Fausto et al., 2001). For the hard tick *Boophilus microplus*, proteolytic activity has also been correlated with differential acidification of YGs and the presence of small vesicles at the periphery of the egg (Abreu et al., 2004). However, the exact origin of the different YGs remains unknown.

Intracellular fusion machinery is composed of dynamic proteins that are assembled upon a signal and are dismantled immediately after the fusion is over, being reutilized. In general, this process is mediated by proteins of the Rab complex (Rabs), SNARES and SM protein families (Jahn et al., 2003). Many proteins involved in membrane fusion are made active by intracellular signaling, involving phosphorylation and protease cleavage (Rutledge and Whiteheart, 2002; Lilja et al., 2004; Huyng et al., 2004; Hepp et al., 2005). Calcium binding proteins, such as calmodulin, are known to work as calcium sensors, leading to activation of kinases that in turn activate membrane fusion proteins (Hilfiker et al., 1999). Many membrane fusion events are therefore calcium-dependent and $[Ca^{2+}]$ elevation has been described as a fusion signal for several processes (Burgoyne, 1995; Burgoyne and Morgan, 1998). This variation in $[Ca^{2+}]$ could be due to Ca^{2+} mobilization from specialized internal stores (Tse et al., 1997; Petersen et al., 1999) or influx through plasma membrane (Augustine et al., 1991). In addition, free Ca^{2+} concentration

can also be regulated by calcium binding proteins (Meldolesi and Pozzan, 1998). In echinoderms, such as the starfish (McNeil et al., 2000; Chestkov et al., 1998) Ca^{2+} was shown to mediate YG fusion, and Ca^{2+} -dependent membrane interactions were recently described in sea urchin eggs (Hayley et al., 2006). In this work, we show that YGs from the blood sucking bug *R. prolixus* undergo a process of membrane fusion. We show that these events might occur *in vivo* in a calcium-dependent manner, being important for yolk processing during early embryogenesis of this insect.

Materials and methods

Chemicals

Arsenazo III, bovine serum albumin, leupeptin, aprotinin, pepstatin A, dithiothreitol (DTT), phenylmethylsulphonyl-fluoride (PMSF), *p*-nitrophenyl phosphate (*p*NPP) and PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit were purchased from Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA). OCT was obtained from Tissue-Tek (Torrance, CA, USA). All other chemicals were of analytical grade.

Insects

Rhodnius prolixus Stahl were reared in a colony maintained at 28°C and 70–80% relative humidity. The animals were fed with rabbit blood in an artificial apparatus according to Garcia et al. (Garcia et al., 1975). Eggs were collected daily and used promptly or allowed to develop to the required embryogenesis stage.

Isolation of yolk granules

YGs were extracted by gently disrupting the eggs with a plastic pestle in ice cold modified Ringer saline (without addition of $CaCl_2$) containing 130 mmol l^{-1} NaCl, 8.8 mmol l^{-1} KCl, 8.6 mmol l^{-1} $MgCl_2$, 10.2 mmol l^{-1} $NaHCO_3$, 4.4 mmol l^{-1} NaH_2PO_4 , 34 mmol l^{-1} glucose, pH 7.2 and supplied with a protease inhibitors cocktail (aprotinin, leupeptin, pepstatin A and PMSF).

Fractionation of yolk granules

Approximately 90 eggs, from day 0 or day 3 of development, were disrupted in 500 μ l of Ringer saline in the presence of 10 mmol l^{-1} EGTA and centrifuged at 50 *g* for 12 min at 4°C. Pellet and top fractions (enriched in LYGs and SYGs, respectively) were carefully collected, separately resuspended in Ringer saline and centrifuged for 5 min (4°C) at 1000 *g*, to obtain LYGs, and 17 000 *g*, for SYGs. The pellets were then resuspended in Ringer saline containing 10 mmol l^{-1} EGTA and used in assays.

Light microscopy

Opercula from freshly laid eggs or eggs that were allowed to develop until day 3 after oviposition were carefully detached using sharp forceps and a histological blade. The eggs were then fixed in 2.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde in PBS for 24 h at 4°C. For cryosections, samples were washed

and incubated for 12 h in 20% sucrose in PBS and infiltrated for 96 h in increasing concentrations of OCT (25%, 50%, 75% and pure OCT). After freezing in liquid nitrogen, 7 μm thick transverse sections were obtained, which were adhered to poly-L-lysine-coated glass slides and mounted in glycerol. Alternatively, the fixed material was washed followed by dehydration in an ethanol series (70%, 90% and $2\times 100\%$) and embedded in HistoresinTM (Leica Historesin Embedding Kit, Nu loch, Heidelberg, Germany). Transverse sections of 7 μm were obtained and stained with 0.1% Toluidine Blue. For LYG counting, 10 different OCT-embedded sections from days 0 and 3 were observed.

Determination of calcium concentrations

Eggs from 0 to 6 days of development were collected and the contents from a pool of four eggs were extracted in 1 ml of modified Ringer saline (pH 7.2). The material was then centrifuged at 10 000 g for 10 min at 4°C and the supernatants incubated in the presence of 4 $\mu\text{mol l}^{-1}$ Arsenazo III. Measurements were taken using a CINTRA 20 spectrophotometer (GVC Scientific Equipment Pty Ltd, Dandenog, Australia) at the wavelength pair 675/685. In parallel, calcium titers were added to modified Ringer saline and measured in the presence of 4 $\mu\text{mol l}^{-1}$ Arsenazo III (Yingst and Hoffman, 1983).

Calcium-dependent fusion assay

Day 0 eggs were extracted in 50 μl of modified Ringer saline containing 10 mmol l^{-1} EGTA (for chelating of endogenous Ca^{2+}) and incubated in increasing concentrations of CaCl_2 (15 mmol l^{-1} , 17 mmol l^{-1} and 27 mmol l^{-1}), at 25°C. Because endogenous $[\text{Ca}^{2+}]$ can vary among individuals, the Ca^{2+} concentration for each experimental group was measured and adjusted to achieve final calcium concentrations of $6.6\pm 1.8 \text{ mmol l}^{-1}$, $11.6\pm 3.1 \text{ mmol l}^{-1}$ and $23.4\pm 2.2 \text{ mmol l}^{-1}$ (mean $\pm$ s.d.). After 1 min, 5 μl of each experimental group were deposited on glass slides and observed using differential interference contrast (DIC) light microscopy. The YGs in one random field of each slide were measured and counted. We considered large YGs (LYGs) as structures $>40 \mu\text{m}$ in diameter and small YGs (SYGs) as structures $<10 \mu\text{m}$ in diameter. Statistical analyses were performed using Graph Pad Instat 4.0 software ($P=0.05$). Results are representative of at least three experiments.

Calcium-dependent transfer of membrane components from small to large yolk granules

SYGs membranes were labeled with PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma Chemical Co.) according to the manufacturer's protocol. Aliquots of labeled fractions were observed in a fluorescence microscope to assure their purity. For fusion assays, 5 μl of the labeled SYGs were mixed with 20 μl of day 0 total YG fraction and incubated in the presence of 23 mmol l^{-1} CaCl_2 . The material was observed in a Zeiss Axioplan epifluorescence microscope equipped with a fluorescein filter set and a TK-1270 JVC color video camera.

SDS-PAGE of large and small yolk granules

LYGs and SYGs were obtained and their protein concentration determined by the Lowry method (Lowry et al., 1951). 15 μg of protein of each sample were subjected to SDS-PAGE 7.5% (Laemmli, 1970). The gel was stained with silver nitrate (Merril et al., 1981).

Immunolocalization of egg vitellin

Day 0 and 3 eggs were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS, pH 7.2, for 24 h at 4°C followed by infiltration in OCT and sectioning as described above. Sections were blocked for 30 min in 100 mmol l^{-1} NH_4Cl in TBS, washed and incubated for 30 min in 3% BSA in TBS plus 0.8% Triton X-100 at room temperature. Sections were then incubated for 1 h in polyclonal antibodies raised against *R. prolixus* vitellins diluted 1:100 in TBS 3% BSA, washed and incubated for 1 h at room temperature in Cy3-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibodies. Samples were then washed again, mounted in *N*-propyl gallate and observed in a Zeiss Axioplan epifluorescence microscope equipped with a rhodamine filter set and a TK-1270 JVC color video camera.

Hydrolase activities

For the determination of acid phosphatase (AP) specific activity, SYGs and LYGs were subjected to three cycles of freeze and thaw and centrifuged at 20 000 g for 30 min. Protein concentrations of the supernatants were determined by the Lowry method (Lowry et al., 1951). For each fraction, aliquots containing 30 μg of protein were assayed at 37°C against 4 mmol l^{-1} *p*NPP in the following reaction medium: 20 mmol l^{-1} sodium acetate, pH 4.0, 1 mmol l^{-1} DTT and 1 mmol l^{-1} EDTA. Reactions were stopped after 1 h by the addition of 0.2 mol l^{-1} NaOH (corresponding to 10% of the total reaction volume) and each sample, containing the reaction hydrolysis product (*p*-nitrophenol, *p*NP), had their absorbance measured at 405 nm in a Thermomax microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). For cathepsin D (CD) specific activity, SYGs and LYGs were submitted to freeze and thaw, centrifuged as described above and assayed using the CD-specific fluorogenic peptide substrate Abz-AIAFFSRQ-EDDnp (Pimenta et al., 2001). For each fraction, 300 μg of protein were incubated with 5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ fluorogenic peptide diluted in 20 mmol l^{-1} sodium acetate, pH 4.0, 1 mmol l^{-1} DTT and 1 mmol l^{-1} EDTA at 37°C for 10 min. The fluorescent products were monitored with an F-max fluorometer (Molecular Devices) using a 320 nm excitation filter and 460 nm emission filter.

H^+ -PPase and vacuolar H^+ -ATPase activities

Membrane fractions of SYGs and LYGs were obtained as follows: samples were resuspended in equal volumes of ice-cold buffer containing 10% (v/v) glycerol, 0.13% (w/v) BSA, 5 mmol l^{-1} EDTA, 150 mmol l^{-1} KCl, 3.3 mmol l^{-1} DTT, 1 mmol l^{-1} PMSF and 100 mmol l^{-1} Tris-HCl, pH 8.0. The YG suspensions were homogenized using a glass Potter-Elvehjem homogenizer and then centrifuged at 10 000 g for 20 min at

4°C. The supernatants obtained were centrifuged at 100 000 *g* for 40 min at 4°C and the pellet was resuspended in 10% glycerol, 10 mmol l⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol l⁻¹ EDTA and 1 mmol l⁻¹ DTT, pH 7.5 and recentrifuged at 100 000 *g* for 40 min at 4°C. The final pellet was resuspended in a small volume of the last buffer and assayed for H⁺-PPase and vacuolar H⁺-ATPase activities (Motta et al., 2004). Protein concentration was determined as described above. Reactions were started by the addition of 40 µg of protein in reaction medium containing 50 mmol l⁻¹ Mops-Tris, 100 mmol l⁻¹ KCl, 0.3 mmol l⁻¹ NaPPi (sodium pyrophosphate), 0.6 mmol l⁻¹ MgCl₂, pH 7.5 for H⁺-PPase and 50 mmol l⁻¹ Mops-Tris, 100 mmol l⁻¹ KCl, 1 mmol l⁻¹ ATP, 2 mmol l⁻¹ MgCl₂, pH 7.5, for vacuolar H⁺-ATPase. After 1 h at 28°C, reactions were stopped by the addition of 50 µl of trichloroacetic acid (50% w/v) and colorimetrically measured by determining the rate of Pi release (Fiske and Subbarow, 1925). For vacuolar H⁺-ATPase, all samples were also incubated in the presence of 50 mmol l⁻¹ nitrate (KNO₃), which is a specific vacuolar H⁺-ATPase inhibitor (Moriyama and Nelson, 1989). Only the nitrate inhibited activity was considered. Statistical analyses were performed in Graph Pad Instat 4.0 software (*P*=0.05). Results are representative of at least three experiments.

Acidification of YG

To investigate the location of proton pumps (H⁺-PPase and vacuolar H⁺-ATPase), day-0 and day-3 eggs were extracted and incubated in the dark for 10 min in Ringer saline plus 10 mmol l⁻¹ EGTA containing 5 µg ml⁻¹ Acridine Orange (AO). For experimental groups, PPi and ATP were added for final concentrations of 0.3 mmol l⁻¹ and 1 mmol l⁻¹, respectively. After incubation the YGs were deposited on glass slides and observed at an excitation wavelength of 418 nm in a Zeiss Axioplan epifluorescence microscope equipped with a fluorescein filter set and a TK-1270 JVC color video camera.

Calcium-dependent yolk proteolysis assay

YGs were extracted from day-0 and day-3 eggs and

incubated in Ringer saline plus 10 mmol l⁻¹ EGTA containing 1 mmol l⁻¹ ATP and 1 mmol l⁻¹ PPi. For experimental groups ~23 mmol l⁻¹ Ca²⁺ was added. The samples were incubated for 1 h at 37°C and 13 µg of protein, for each sample, were submitted to 10% SDS-PAGE. The gel was stained with silver nitrate (Merrill et al., 1981).

Results

Day-3 eggs contain enlarged yolk granules

Transverse sections revealed differences in the internal morphology between eggs from day 0 and day 3 of development. In day-0 eggs, the YG population filled the entire egg, whereas in day-3 eggs the YG population was variable in size and LYGs were often more abundant (Fig. 1A,B, white arrows). A visible embryo, at the gastrula stage, could be observed only during day 3 of development (Fig. 1B). To differentiate between YGs and lipid droplets, the material was also prepared for HistoresinTM, a procedure in which the material is submitted to a dehydration series in organic solvents and part of the lipid component is extracted leaving the protein content intact. Fig. 1C,D shows that day-3 eggs had a higher number of LYGs (black arrows), as observed in DIC images of unstained material. Morphometric analysis showed that LYGs are sixfold more frequent in eggs during day 3 than during day 0 of early embryogenesis. The number of LYGs per egg section were: 2±1 on day 0 and 12±2 on day 3 (mean ± s.d.).

Eggs at day 3 of development contain the highest [Ca²⁺] during early embryogenesis

Calcium concentration was determined in eggs from 0 to 6 days of development. Fig. 2 illustrates an increase in free calcium concentration in eggs from 0 to 3 days of development. [Ca²⁺] remained at ~7 mmol l⁻¹ during days 0 and 1, beginning to increase on day 2 (~12 mmol l⁻¹). The highest free [Ca²⁺] was found to be 23±2.3 mmol l⁻¹ on the third day of embryogenesis. This period is coincident with the beginning of

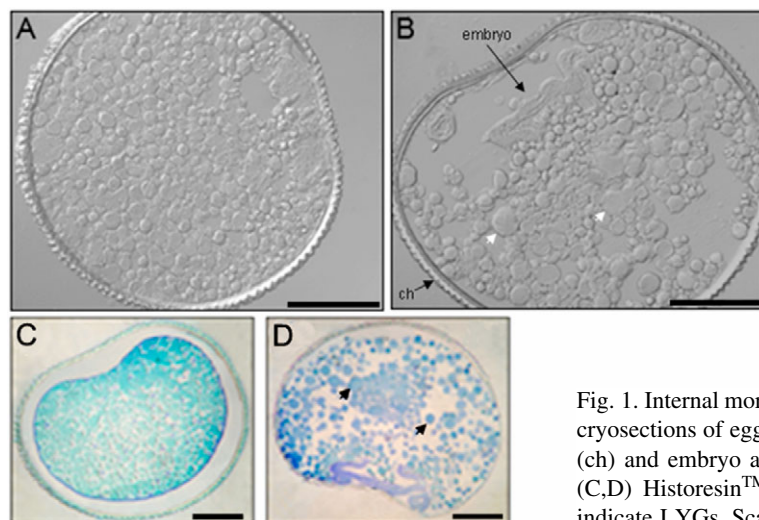


Fig. 1. Internal morphology of *R. prolixus* eggs. (A,B) DIC micrographs of transverse cryosections of eggs at days 0 and 3 after oviposition, respectively. In B, the chorion (ch) and embryo are visible and white arrows indicate large yolk granules (LYG). (C,D) HistoresinTM sections of day 0 and day 3 eggs, respectively. Black arrows indicate LYGs. Scale bars, 200 µm.

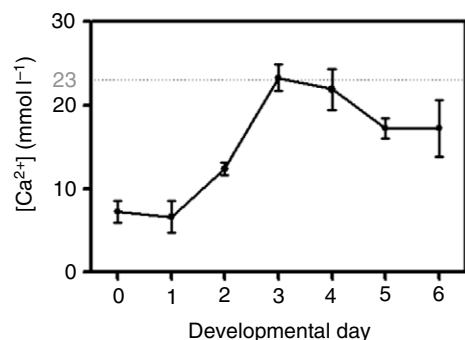


Fig. 2. $[Ca^{2+}]$ during *R. prolixus* early embryogenesis. Ca^{2+} was measured in eggs using the sensor dye Arsenazo III. The highest $[Ca^{2+}]$ (23 ± 2.3 mmol l $^{-1}$) was found on the third day of embryogenesis. Values are means $\pm$ s.e.m. of 5 different experiments.

the yolk mobilization in *Rhodnius prolixus* embryogenesis (Fialho et al., 2005). After that, $[Ca^{2+}]$ continuously decreased until day 5 and remained at similar levels (~ 18 mmol l $^{-1}$) until the sixth day of embryogenesis.

Calcium-induced formation of large yolk granules

Fig. 3A shows that incubation of YGs obtained from day 0 eggs with ~ 7 mmol l $^{-1}$ Ca^{2+} (the amount of Ca^{2+} found in day-0 and -1 eggs) led to the appearance of threefold more LYGs

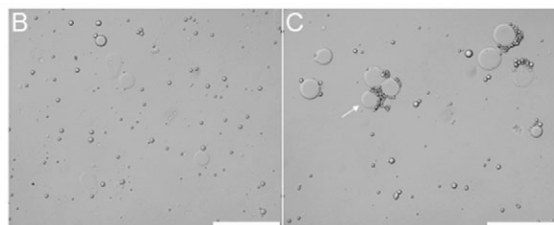
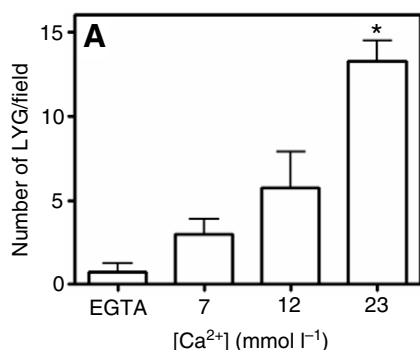


Fig. 3. Induction of large yolk granule (LYG) formation by *in vitro* calcium treatment. (A) Formation of LYGs (>40 μ m) as a function of calcium concentration. Incubation of day 0 SYGs with increasing concentrations of calcium lead to the formation LYGs (a 13-fold increase of LYGs can be observed in 23 mmol l $^{-1}$ Ca^{2+}). Values are means $\pm$ s.e.m. of 4 different experiments. *Statistically significant difference ($P < 0.05$, one-way ANOVA). (B,C) DIC microscopy showing the general views of YGs incubated with 10 mmol l $^{-1}$ EGTA (B) and ~ 23 mmol l $^{-1}$ Ca^{2+} (C). Note the presence of a higher number of LYGs (arrow) after incubation with calcium. Scale bars, 200 μ m.

in comparison with those incubated with EGTA. Incubation of day 0 YGs with the $[Ca^{2+}]$ found in day-2 eggs (~ 12 mmol l $^{-1}$) increased the number of LYGs sevenfold and, ~ 23 mmol l $^{-1}$ Ca^{2+} , found in day-3 eggs, induced the formation of 13-fold more LYGs in day 0 eggs. LYG formation showed a dose-response profile to Ca^{2+} addition. Treatment of day 0 YGs with $[Ca^{2+}]$ over 23 mmol l $^{-1}$ did not result in any significant LYG increase (data not shown). In Fig. 3B a general view of day-0 YGs in the presence of 10 mmol l $^{-1}$ EGTA (calcium-free conditions) is illustrated, and in Fig. 3C day-0 YGs in the presence of ~ 23 mmol l $^{-1}$ Ca^{2+} is shown. In the latter, the appearance of LYGs is clearly evident. Because day-3 eggs contained the highest $[Ca^{2+}]$ found during embryogenesis and this concentration (~ 23 mmol l $^{-1}$) is the most effective in inducing LYG formation, all subsequent experiments were performed in the presence of ~ 23 mmol l $^{-1}$ Ca^{2+} , and day-0 and day-3 eggs were compared.

Calcium-induced transfer of membrane components from small to large yolk granules

After centrifugation, two fractions of YGs, enriched in either LYGs or SYGs, were obtained (Fig. 4) and they were then labeled with the lipophilic fluorescent membrane marker PKH67 and incubated with calcium. Incubation of SYGs with PKH67 resulted in labeling of the membranes (Fig. 5A,B). To investigate if the increase in the amount of LYGs found in day-0 eggs incubated in the presence of calcium was the result of calcium-induced membrane fusion, PKH67-labeled SYGs was added to day 0 total YG fraction (without labeling) in the presence of 23 mmol l $^{-1}$ Ca^{2+} (the calcium concentration found in day-3 eggs). Fig. 5C,D shows that incubation with calcium induces the transfer of the dye from SYGs to LYGs. When the labeled SYGs were incubated with day 0 total YG fraction in the presence of 10 mmol l $^{-1}$ EGTA (no free calcium), no transfer of the dye from SYGs to LYGs could be observed (Fig 5E,F).

Small and large yolk granules express different levels of proton-pump activity

Membrane fractions of SYGs and LYGs were separated as described in the Materials and methods and assayed for H^{+} -PPase and vacuolar H^{+} -ATPase-specific activities. The results showed that SYGs from days 0 and 3 contain similar levels of H^{+} -PPase activity but higher levels than LYGs (Fig. 6A). By contrast, LYG H^{+} -PPase activities showed differences between day 0 and day 3 with a 90% increase in H^{+} -PPase activity on day 3 (Fig. 6A). Because egg homogenate activity levels did not change, i.e. it seems that there is no H^{+} -PPase synthesis between days 0 and 3, this suggests that the increase in LYG H^{+} -PPase activity could be the result of transfer of the enzyme from SYGs to LYGs. To investigate whether this increase in H^{+} -PPase activity was the result of calcium-mediated events, day-0 eggs were incubated in the presence of 23 mmol l $^{-1}$ Ca^{2+} and the H^{+} -PPase activity was measured. Results showed that incubation with calcium increased the H^{+} -PPase activity in day-0 LYGs (Fig. 6B), suggesting that the calcium-induced events observed

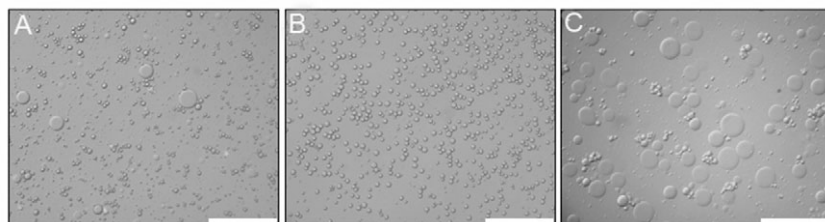


Fig. 4. Fractionation of yolk granules (YGs). (A) DIC light microscopy showing the day 0 total yolk granules before fractionation by differential centrifugation. (B,C) YG fractions after differential centrifugation. Note that the top (B) and pellet (C) fractions are enriched in small YGs (SYGs) and large YGs (LYGs), respectively. Scale bars, 200 μm .

in vitro (Figs 3 and 5) are also able to cause increase in H^+ -PPase activity in LYGs. To further investigate whether the H^+ -PPase could be relocated during embryogenesis, YGs were incubated with PPi in the presence of AO, which has been proved to be a reliable marker of intracellular acidic compartments (Anderson and Orci, 1988), and observed with a fluorescence microscope. Results showed that addition of PPi preferentially induced the acidification of SYGs on day 0 (Fig. 6C,D) whereas on day 3 it also induced the acidification

of large ones (Fig. 6E,F). During embryogenesis the YGs undergo endogenous acidification, thus incubation of day 3 YGs with AO in the absence of PPi showed SYGs and LYGs already acidified (not shown). To confirm if PPi addition was able to induce further acidification of LYGs, acidified LYGs from day-3 eggs incubated, or not, with PPi were counted and compared.

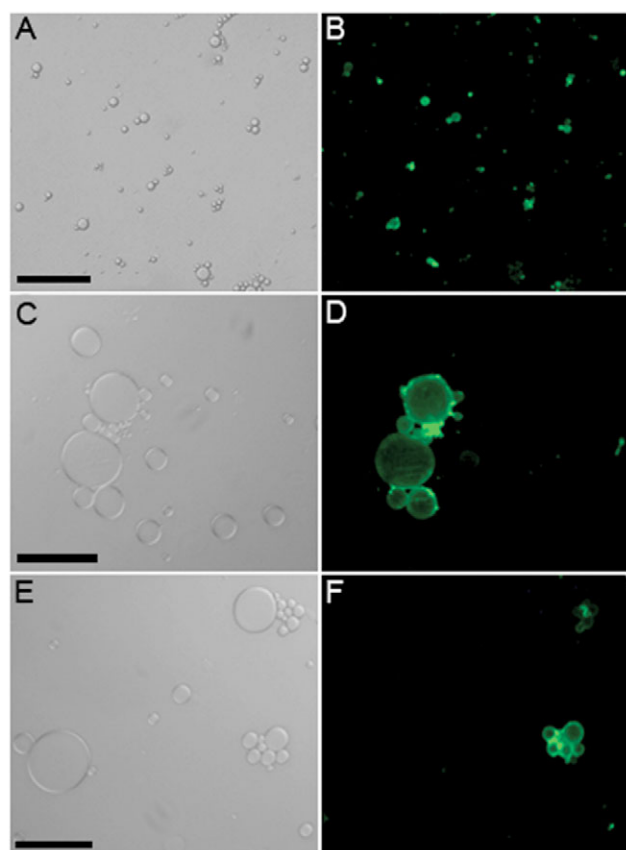


Fig. 5. Transfer of the fluorescent membrane dye, PKH67 from labeled small yolk granules (SYGs) to larger YGs after calcium treatment. (A,C,E) DIC images; (B,D,F) corresponding fluorescence images. (A,B) SYGs. Scale bar, 50 μm . (C,D) Dye transfer from SYGs to large ones. Note the appearance of large stained YGs as the result of incubation with Ca^{2+} . Scale bar, 25 μm . (E,F) Incubation of labeled SYGs with day 0 YGs in the presence of 10 mmol l^{-1} EGTA (calcium-free medium). Note that dye transfer did not occur. Scale bar, 25 μm .

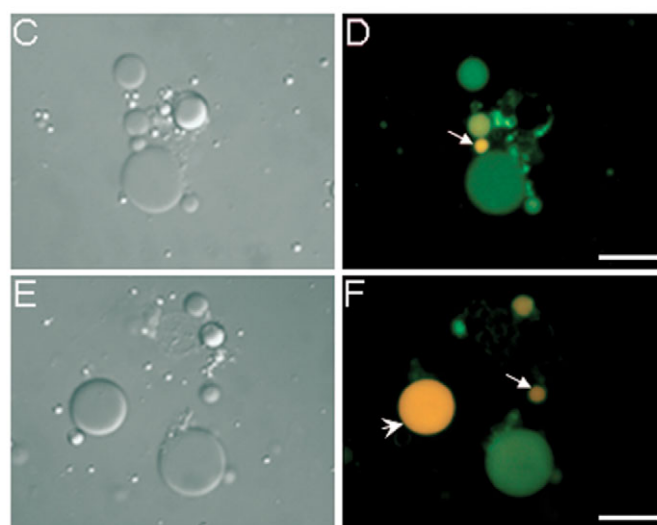
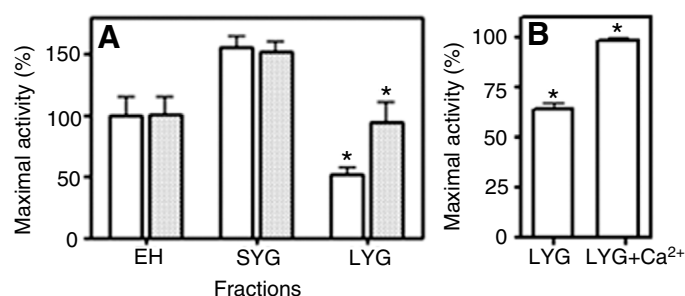


Fig. 6. H^+ -PPase specific activity levels in different yolk granule (YG) fractions at days 0 and 3 of development. Membrane fractions were separated from LYGs and SYGs and assayed for H^+ -PPase activity. (A) H^+ -PPase activity levels during days 0 and 3 of embryogenesis. White bars, day 0 activity; gray bars day 3 activity. EH, total egg homogenate activity. Values are means $\pm$ s.e.m. of 3 different experiments. (B) H^+ -PPase specific activity levels in day 0 LYGs with and without Ca^{2+} . *Statistically significant difference ($P < 0.05$, t -test). (C–F) To determine the location of the H^+ -PPase, YGs were also incubated with Acridine Orange in the presence of PPi during day 0 (C,D) and day 3 (E,F) of embryogenesis. Arrows indicate acidic SYGs and arrowheads indicate acidic LYGs. (C,E) DIC images; (D,F) corresponding fluorescence images. Scale bars, 25 μm .

Results showed that PPI addition increased by 18% the number of acidic LYGs during day 3 of embryogenesis, indicating that PPI addition also induces LYG acidification during day 3.

In contrast to the previous finding with the vacuolar H⁺-PPase, the vacuolar H⁺-ATPase activity did not significantly alter between days 0 and 3 of development (Fig. 7A). Incubation of YGs with ATP in the presence of AO induced acidification of both SYGs and LYGs at both stages of development (Fig. 7B–E).

Small and large yolk granules express different levels of hydrolase activity

SYGs and LYGs were assayed for determination of acid phosphatase (AP) and cathepsin D (CD)-specific activities. It has been shown that day-0 egg homogenates contain very low

levels of CD (Fialho et al., 2005) and AP (Fialho et al., 2002) activities. Thus, to better understand the data, both samples were normalized and expressed as a percentage of the total activity of the egg homogenate (relative activity) for each day. Results showed that day-0 SYGs contained the highest levels of AP activity, twofold higher than LYGs (Fig. 8A). However, on day 3 this profile was strongly altered and LYGs showed 30% more activity than SYGs. As observed for H⁺-PPase, this data suggests that LYG AP activity increases could possibly be achieved by enzyme relocation mediated by transfer from SYGs to LYGs. By contrast, as observed for vacuolar H⁺-ATPase, no significant differences in the levels of CD activity between day 0 and 3 of embryogenesis or between SYGs and LYGs were observed (Fig. 8B).

Calcium induced events are important for yolk proteolysis but do not interfere in vitellin location

To analyze the protein profile of different YG fractions, LYGs and SYGs were submitted to SDS-PAGE. Fig. 9A reveals that vitellin apoproteins are equally present in egg homogenate, SYGs and LYGs. Arrows indicate the four apovitellins, as described elsewhere (Masuda and Oliveira, 1985). Immunofluorescence analysis using antibodies against these proteins showed the presence of vitellins in both LYGs and SYGs on days 0 (Fig. 9B,C) and 3 (Fig. 9D,E) of embryogenesis, confirming the previous results with SDS-PAGE. To investigate whether incubation with calcium could have an effect on the VT apoprotein degradation in the eggs from different days, day-0 and

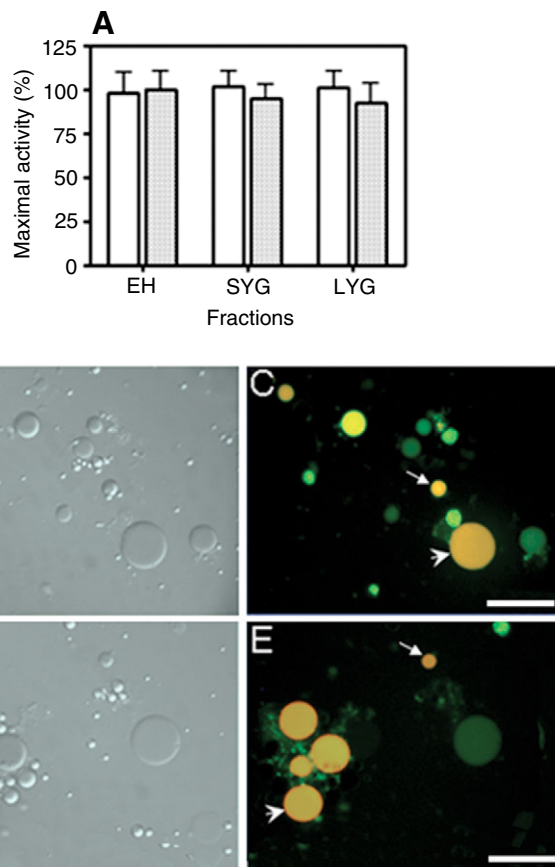


Fig. 7. Vacuolar H⁺-ATPase specific activity levels in different yolk granule (YG) fractions during days 0 and 3 of development. LYGs and SYGs were submitted to membrane fraction separation and assayed for H⁺-ATPase activity. (A) Vacuolar H⁺-ATPase activity levels during days 0 and 3 of embryogenesis. White bars represent day 0 activities and gray bars represent day 3 activities. Values are means $\pm$ s.e.m. of 3 different experiments. To investigate the location of the H⁺-ATPase, YGs were incubated with AO in the presence of ATP during day 0 (B,C) and day 3 (D,E) of embryogenesis. Arrows indicate acidic SYGs and arrowheads indicate acidic LYGs. (B,D) DIC images; (C,E) corresponding fluorescence images. Scale bars, 25 μ m.

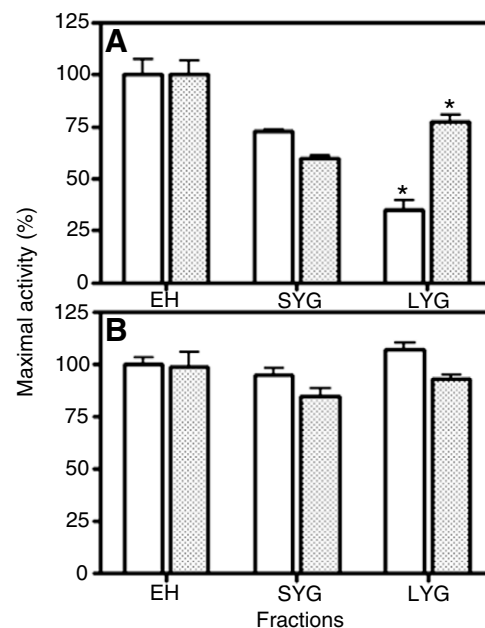


Fig. 8. Specific activity levels of hydrolases in different yolk granule (YG) fractions during days 0 and 3 of development. (A) Acid phosphatase activity levels. (B) Cathepsin D activity levels. White bars, activity on day 0; gray bars, activity on day 3. Values are means $\pm$ s.e.m. of 3 different experiments. EH, total egg homogenate. *Statistically significant difference ($P < 0.05$, t -test).

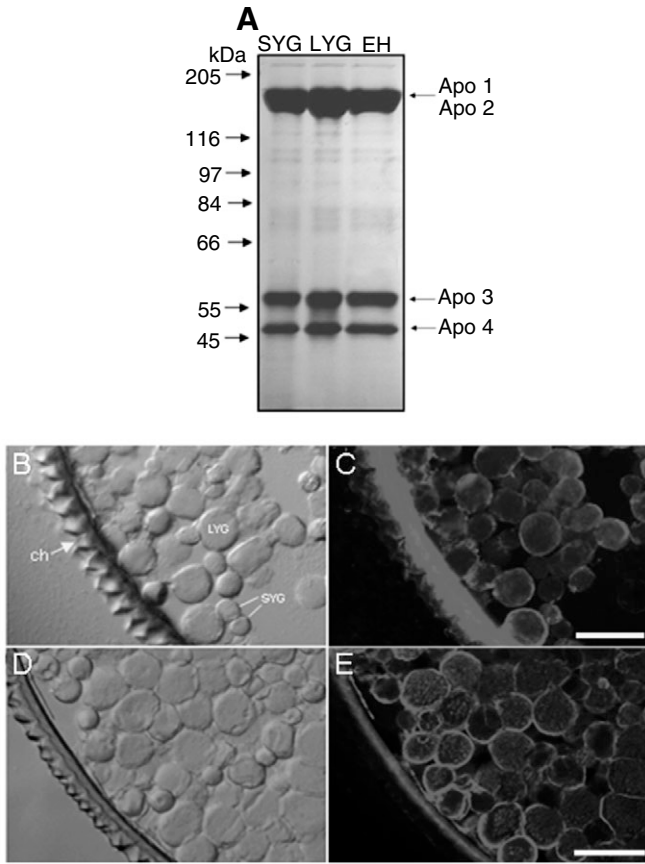


Fig. 9. SDS-PAGE of yolk granule (YG) fractions and vitellin (VT) immunolocalization. (A) SDS-PAGE of the different YG fractions. Arrows indicate the four apoproteins in SYGs, LYGs and total egg homogenate (EH); molecular mass is given on the left. (B–E) Vitellin immunolocalization in *R. prolixus* eggs. Vitellins were present in both LYGs and SYGs during day 0 (B,C) and day 3 (D,E) of embryogenesis. The chorion (ch) was shown to be auto-fluorescent in control groups (data not shown). (B,D) DIC images; (C,E) corresponding fluorescence images. Scale bars, 50 μm .

-3 YGs were submitted to degradation assay in the presence, or absence, of 23 mmol l^{-1} calcium. EGTA-treated day-0 YGs showed no degradation whereas incubation with 23 mmol l^{-1} Ca^{2+} led to mild VT proteolysis (Fig. 10A, lanes 1 and 2, respectively). Because day 3 of embryogenesis is the period when *R. prolixus* VT proteolysis starts (Fialho et al., 2005), incubation of day-3 YGs in the presence of EGTA presented a typical endogenous VT proteolysis profile (lane 3), which shows more proteolysis-derived fragments than day-0 eggs incubated in the presence of EGTA or calcium (lanes 1 and 2). Even so, incubation of day-3 YGs in the presence of calcium still resulted in an increase of VT proteolysis (lane 4). Because both ATP and PPI were added to all samples (EGTA and calcium), this data suggests that acidification of YGs *per se* is not sufficient to activate all yolk degradation machinery, indicating that the observed calcium-induced events take part in this process, probably allowing the assembly of the yolk degradation machinery. To

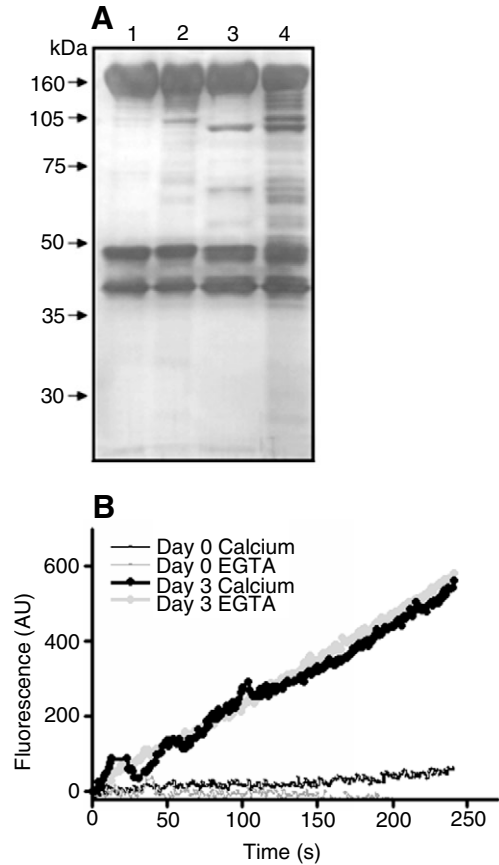


Fig. 10. Vitellin (VT) proteolysis after calcium incubation. (A) SDS-PAGE showing VT proteolysis after calcium incubation. Yolk granules (YGs) were extracted from day 0 and day 3 eggs and incubated in Ringer saline containing 1 mmol l^{-1} ATP and 1 mmol l^{-1} PPI. For experimental groups $\sim 23 \text{ mmol l}^{-1}$ Ca^{2+} was added. (Lane 1) Day-0 YGs after incubation with EGTA; (lane 2) day-0 YGs after incubation with calcium; (lane 3) day-3 YGs after incubation with EGTA; (lane 4) day-3 YGs after incubation with calcium. (B) Cathepsin D activities tested in all samples used in A. AU, arbitrary units.

exclude the possibility that VT degradation was the result of calcium activation of CD activity, EGTA and Ca^{2+} samples were assayed for CD activities as described before (Fig. 10B). Results showed that calcium addition did not have any significant effect on increasing CD activity, which suggests that the induction of VT proteolysis was the result of the previously observed calcium-induced events, probably the YG fusions.

Discussion

It is generally accepted that, in insects, yolk degradation occurs at the onset of embryonic development. In this process VT undergoes proteolysis, triggered by activation of latent pro-teases (Fagotto, 1990; Nordin et al., 1991). Activation of these enzymes is achieved by luminal acidification of YGs, a process that is mediated by proton pumps (Fagotto, 1991; Nordin et al., 1991; Mallya et al., 1992; Fagotto, 1995). VT and

hydrolases, such as cathepsin B and carboxypeptidase, are known to accumulate in the oocytes during oogenesis and to be stored in YGs (Wall and Meleka, 1985; Oliveira et al., 1986; Raikhel and Dadhialla, 1992; Valle, 1993; Sappington and Raikhel, 1998; Cho et al., 1991; Cho et al., 1999; Liu and Nordin, 1998; Yin et al., 2001). Newly laid eggs are therefore able to initiate VT degradation. *In vitro*, measurements of hydrolase activities and yolk degradation using fresh eggs have been investigated by many groups (Nussenzveig et al., 1992; Logullo et al., 1998; Sorgine et al., 2000; Fialho et al., 2002). However, even though freshly laid eggs carry all the yolk mobilization machinery, the massive yolk proteolysis does not occur *in vivo* immediately after the egg is laid, but starts at a certain time later, during early embryogenesis. In *R. prolixus*, massive yolk proteolysis starts at day 3 of embryogenesis (Fialho et al., 2005).

Fusion of YGs during oviparous embryogenesis has been suggested and described by several groups (Nordin et al., 1991; Chestkov et al., 1998; McNeil et al., 2000; Yamahama et al., 2003) and the impressive capacity of YGs to form large structures by homotypic fusion is well illustrated by formation of large membrane barriers in sea urchin eggs (McNeil et al., 2000). Calcium has been shown to mediate YG fusion, *in vitro*, in the starfish *Asterina miniata*, the sea urchin *Lytechinus pictus* and the insect *Periplaneta americana* (Chestkov et al., 1998; McNeil et al., 2000; Ramos et al., 2006). Numerous egg responses, such as production of the fertilization envelope, utilize Ca^{2+} as a messenger (Steinhardt et al., 1977).

In this work, we suggest that YGs undergo membrane fusion *in vivo*, in a calcium-dependent manner, during the third day of embryogenesis in the blood sucking insect *Rhodnius prolixus*. This process is followed by mobilization of vacuolar H^+ -PPase, acid phosphatase activation and VT proteolysis. Because of the large amounts of calcium ingested in the *R. prolixus* diet, it is known that several metabolic processes operate with high calcium concentrations in this insect. *Rhodnius* hemolymph contains 1–8 mmol l^{-1} of calcium, whereas the Malpighian tubules can store calcium at concentrations close to 1 mol l^{-1} (Maddrell et al., 1991). The origin of calcium inside the eggs is unknown, but a calcium-binding protein has been described for *R. prolixus* and shown to play some role on its transport to the oocytes during oogenesis (Silva-Neto et al., 1996). The finding of such high amounts of calcium inside the egg could be explained by the existence of calcium stores. Since the egg is filled with vesicles, it would be relatively easy for this type of system to operate with calcium pumps, channels and/or exchangers, modulating the amount of free calcium remaining in the ooplasm or inside compartments. Variation of $[\text{Ca}^{2+}]$ during *R. prolixus* embryogenesis could also be explained by the possible presence of high amounts of calcium-binding proteins, such as calmodulin, modulating its availability. The presence of calmodulin has been reported in *B. germanica* eggs, corresponding to 1.5% of the total volume of its soluble proteins, which can be reduced to almost undetectable levels at the beginning of yolk protein cleavage (Zhang and Kunkel, 1992), suggesting a connection between Ca^{2+} availability and yolk degradation. This is in agreement with our observations that the

highest $[\text{Ca}^{2+}]$ is found on the third day of development, the time when yolk degradation starts in *R. prolixus* eggs (Fialho et al., 2005). Moreover, elevation of $[\text{Ca}^{2+}]$ represents a controlled way to regulate the YG fusion events. Calcium signaling during embryonic development has been elegantly reviewed (Webb and Miller, 2003), and shown to take part in fertilization, embryonic cleavage, blastula formation and other embryogenesis events. Yolk degradation during embryogenesis is probably modulated by the embryo demands. In this regard, Ca^{2+} signaling inside the egg could also be regulated by the growing embryo.

Whether or not $[\text{Ca}^{2+}]$ varies between different egg locations (by local release from internal stores and/or association with calcium binding proteins) is still uncertain. Unfortunately *R. prolixus* eggs contain an opaque and impermeable eggshell, precluding efficient clarification or permeability increase. Thus, experiments involving direct calcium imaging in the ooplasm *in vivo* are still not possible in this model. However, even though we cannot access the organization of global or local calcium signaling in eggs of *R. prolixus*, the presence of calcium wave pacemakers and local calcium signaling (as calcium puffs) in eggs (Dumollard et al., 2002) and oocytes (Parker and Yao, 1995) from other models support our findings that Ca^{2+} elevation during early embryogenesis can trigger the fusion of YGs as a slow calcium release on the ooplasm.

To start yolk degradation, the YGs must contain at least three components: yolk proteins, proton pumps and hydrolases. If one of these three components is not found in a common vesicle, yolk degradation does not proceed. As highlighted in this paper, the YG population is not homogeneous and it has been extensively shown that YGs can vary in size, density, macromolecule content, and that not all of them undergo acidification during embryogenesis (Postlethwait and Giorgi, 1985; Wallace, 1985; Fagotto, 1995; Chestkov et al., 1998; McNeil et al., 2000; Fausto et al., 2001).

Our findings that $[\text{Ca}^{2+}]$ elevation *in vivo* is coincident with the appearance of more LYGs, combined with the fact that LYG formation and membrane label transfer could be achieved *in vitro* after Ca^{2+} treatment provide evidence for the suggestion that *R. prolixus* YGs undergo a process of membrane fusion. LYG formation observed at day 3 could also be the result of SYGs fusing together, and participation of medium sized YGs in this process cannot be disregarded. However, scanning electron microscopy observations of day 3 YGs commonly evidenced SYGs in association with LYGs (data not shown), suggesting that this type of fusion event might occur more frequently. The observation of higher H^+ -PPase activity in SYGs at the beginning of embryogenesis and the elevation of this activity in LYGs during the third day of development, when the massive YG fusion events are taking place, in combination with an increase of AP activity, suggest the presence of a functional mechanism of macromolecule transference from SYGs to LYGs during the third day of development. This is consistent with this being the time when yolk mobilization begins in *R. prolixus* embryogenesis (Fialho et al., 2005).

However, it is important to emphasize that H^+ -ATPase and CD levels were unaltered between days 0 and 3, being very

similar within the different YG fractions, indicating that these enzymes are not affected by calcium-induced events. Fialho et al. (Fialho et al., 2005) showed that *Rhodnius* CD and AP are involved in VT degradation in a process in which CD is only able to induce yolk degradation after previous VT dephosphorylation, mediated by AP. This model of modulation of yolk degradation is consistent with our findings that only AP seemed to be transferred by fusion events and could be used for modulation of yolk degradation. Analysis on VT location showed that it seems to be present in all YGs and this pattern does not alter between days 0 and 3, which suggests that VT location is independent of calcium-induced events.

A basic feature of eukaryotic cells is that compartmental organization works through regulated mechanisms of macromolecule sorting to their appropriate compartment. In this context, membrane fusion is a fundamental cellular process, being indispensable for compartmental organization (Alberts et al., 2001).

Altogether, the results indicate that calcium-induced events could have a role in the transfer of components of yolk machinery, regulating the access of hydrolases and/or proton pumps to the yolk proteins and modulating their degradation. This hypothesis is further supported by the finding that VT proteolysis is stimulated by calcium-induced events. Incubation of day 0 YGs in the absence of Ca^{2+} resulted in no VT proteolysis, even when acidified in the presence of ATP and PPi. During day 3, where the membrane fusion events take place, VT proteolysis (higher than on day 0) could also be stimulated by calcium. As Ca^{2+} did not induce any significant increase in CD activity, VT degradation seems to be achieved after YG fusion events, suggesting that it brings all components together, allowing the assembly of the yolk degradation machinery.

Our findings, therefore, provide evidence that calcium-regulated YG membrane fusion is a potential mechanism for macromolecule transfer between different compartments inside the egg. This process probably works on modulation of yolk degradation during embryogenesis, which is essential for VT degradation. Understanding exactly how this process occurs could clarify the dynamics of yolk degradation during insect embryo development. Further studies on this mechanism, such as the presence of calcium binding proteins (sensors and buffers) and calcium stores inside the egg, isolation and location of enzymes involved with yolk degradation and characterization of proteins involved with membrane fusion are currently under intense investigation by our group.

List of abbreviations

AP	acid phosphatase
CD	cathepsin D
DIC	differential interference contrast
LYG	large YG
NaPPi	sodium pyrophosphate
SYG	small YG
VT	vitellin
YG	yolk granule

We express our gratitude to Hatisaburo Masuda, Hector Barrabin and Ulysses Lins for kindly providing laboratory supplies and facilities, to Litiane Silva and José de S. L. Junior for excellent technical assistance, and to Marcelo Medeiros for critical reading of this manuscript. This work was supported by grants from the following Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa (FAPERJ), Programa de Nanociência e Nanotecnologia MCT-CNPq and Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), FINEP/PRONEX/FUJB (no. 76.97.1000.000).

References

- Abreu, L. A., Valle, D., Manso, P. P., Façanha, A. R., Pelajo-Machado, M., Masuda, H., Masuda, A., Vaz, I., Jr, Lenzi, H., Oliveira, P. L. et al. (2004). Proteolytic activity of *Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**, 443-449.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2001). Internal organization of the cell. In *Molecular Biology of the Cell*, pp. 659-711. New York: Garland Science.
- Anderson, R. G. W. and Orci, L. (1988). A view of acidic intracellular compartments. *J. Cell Biol.* **106**, 539-543.
- Augustine, G. J., Adler, E. M. and Charlton, M. P. (1991). The calcium signal for transmitter secretion from presynaptic nerve terminals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **635**, 365-381.
- Burgoyne, R. D. (1995). Fast exocytosis and endocytosis triggered by depolarisation in single adrenal chromaffin cells before rapid Ca^{2+} current run-down. *Pflügers Arch.* **430**, 213-219.
- Burgoyne, R. D. and Morgan, A. (1998). Calcium sensors in regulated exocytosis. *Cell Calcium* **24**, 367-376.
- Chestkov, V. V., Radko, S. P., Cho, M. S., Chrambach, A. and Vogel, S. S. (1998). Reconstitution of calcium-triggered membrane fusion using "reserve" granules. *J. Biol. Chem.* **273**, 2445-2451.
- Cho, W. L., Deitsch, K. W. and Raikhel, A. S. (1991). An extraovarian protein accumulated in mosquito oocytes is a carboxypeptidase activated in embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10821-10824.
- Cho, W. L., Tsao, S. M., Hays, A. R., Walter, R., Chen, J. S., Snigirevskaya, E. S. and Raikhel, A. S. (1999). Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. *J. Biol. Chem.* **274**, 13311-13321.
- Dumollard, R., Carroll, J., Dupont, G. and Sardet, C. (2002). Calcium wave pacemakers in eggs. *J. Cell Sci.* **115**, 3557-3564.
- Engelman, F. (1979). Insect vitellogenin: identification, biosynthesis and role in vitellogenesis. *Adv. Insect Physiol.* **14**, 49-108.
- Fagotto, F. (1990). Yolk degradation in tick eggs. I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **14**, 217-235.
- Fagotto, F. (1991). Yolk degradation in tick eggs. III. Developmentally regulated acidification of yolk spheres. *Dev. Growth Differ.* **33**, 57-66.
- Fagotto, F. (1995). Regulation of yolk degradation, or how to make sleepy lysosomes. *J. Cell Sci.* **108**, 3645-3647.
- Fausto, A. M., Gambellini, G., Mazzini, M., Cecchetti, A., Masetti, M. and Giorgi, F. (2001). Yolk granules are differentially acidified during embryo development in the stick insect *Carausius morosus*. *Cell Tissue Res.* **305**, 433-443.
- Fialho, E., Silveira, A. B., Masuda, H. and Silva-Neto, M. A. C. (2002). Oocyte fertilization triggers acid phosphatase activity during *Rhodnius prolixus* embryogenesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**, 871-880.
- Fialho, E., Nakamura, A., Juliano, L., Masuda, H. and Silva-Neto, M. A. C. (2005). Cathepsin D-mediated yolk protein degradation is blocked by acid phosphatase inhibitors. *Arch. Biochem. Biophys.* **436**, 246-253.
- Fiske, C. F. and Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**, 375-400.
- Garcia, E. S., Macarini, J. D., Garcia, M. L. M. and Ubatuba, F. B. (1975). Alimentação de *Rhodnius prolixus* no laboratório. *An. Acad. Bras. Cienc.* **47**, 539-545.
- Hayley, M., Perera, A. and Robinson, J. J. (2006). Biochemical analysis of

- a Ca^{2+} -dependent membrane-membrane interaction mediated by the sea urchin yolk granule protein, toposome. *Dev. Growth Differ.* **48**, 401-409.
- Hepp, R., Puri, N., Hohenstein, A. C., Crawford, G. L., Whiteheart, S. W. and Roche, P. A. (2005). Phosphorylation of SNAP-23 regulates exocytosis from mast cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 6610-6620.
- Hilfiker, S., Pieribone, V. A., Czernik, A. J., Kao, H. T., Augustine, G. J. and Greengard, P. (1999). Synapsins as regulators of neurotransmitter release. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **354**, 269-279.
- Huyng, H., Bottini, N., Williams, S., Cherepanov, V., Musumeci, L., Saito, K., Bruckner, S., Vachon, E., Wang, X., Kruger, J. et al. (2004). Control of vesicle fusion by a tyrosine phosphatase. *Nat. Cell Biol.* **6**, 831-839.
- Jahn, R., Lang, T. and Sudhof, T. C. (2003). Membrane fusion. *Cell* **112**, 519-533.
- Kunkel, J. G. and Nordin, J. H. (1985). Yolk proteins. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (ed. G. A. Kerkut and L. J. Gilbert), pp. 83-111. Oxford: Pergamon Press.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lilja, L., Johansson, J. U., Gromada, J., Mandic, S. A., Fried, G., Berggren, P. O. and Bark, C. (2004). Cyclin-dependent kinase 5 associated with p39 promotes Munc18-1 phosphorylation and Ca^{2+} -dependent exocytosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 29534-29541.
- Liu, X. and Nordin, J. H. (1998). Localization of the proenzyme form of the vitellin-processing protease in *Blattella germanica* by affinity-purified antibodies. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **38**, 109-118.
- Logullo, C., Vaz Ida, S., Sorgine, M. H., Paiva-Silva, G. O., Faria, F. S., Zingali, R. B., De Lima, M. F., Abreu, L., Oliveira, E. F., Alves, E. W. et al. (1998). Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology* **116**, 525-532.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. B. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Machado, E. A., Oliveira, P. L., Moreira, M. F., de Souza, W. and Masuda, H. (1998). Uptake of *Rhodnius* heme-binding protein (RHBP) by the ovary of *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **39**, 133-145.
- Maddrell, S. H., Whittenbury, G., Mooney, R. L., Harrison, J. B., Overton, J. A. and Rodriguez, B. (1991). The fate of calcium in the diet of *Rhodnius prolixus*: storage in concretion bodies in the Malpighian tubules. *J. Exp. Biol.* **157**, 483-502.
- Mallya, S. K., Partin, J. S., Valdzian, M. C. and Lennarz, W. J. (1992). Proteolysis of the major yolk glycoproteins is regulated by acidification of the yolk platelets in sea urchin embryos. *J. Cell Biol.* **117**, 1211-1221.
- Masuda, H. and Oliveira, P. L. (1985). Characterization of vitellin and vitellogenin of *Rhodnius prolixus*. Identification of phosphorylated compounds in the molecule. *Insect Biochem.* **15**, 543-550.
- McNeil, P. L., Vogel, S. S., Miyake, K. and Terasaki, M. (2000). Patching plasma membrane disruptions with cytoplasmic membrane. *J. Cell Sci.* **113**, 1891-1902.
- Meldolesi, J. and Pozzan, T. (1998). The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: a view from the lumen. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 10-14.
- Merrill, C. R., Dunau, M. L. and Goldman, D. (1981). A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **110**, 201-207.
- Moncayo, A. (2003). Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone Countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **98**, 577-591.
- Moriyama, Y. and Nelson, N. (1989). Cold inactivation of vacuolar proton-ATPases. *J. Biol. Chem.* **264**, 3577-3582.
- Motta, L. S., da Silva, W. S., Oliveira, D. M., de Souza, W. and Machado, E. A. (2004). A new model for proton-pumping in animal cells: the role of pyrophosphate. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**, 19-27.
- Nordin, J. H., Beaudoin, E. L. and Lin, X. (1991). Acidification of yolk granules in *Blattella germanica* eggs coincides with proteolytic processing of vitellin. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **18**, 177-192.
- Nussenzeig, R. H., Oliveira, P. L. and Masuda, H. (1992). Identification of yolk platelet-associated hydrolases in the oocytes of *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **21**, 253-262.
- Oliveira, P. L., Gondim, K. C., Guedes, D. and Masuda, H. (1986). Uptake of yolk protein in *Rhodnius prolixus*. *J. Insect Physiol.* **32**, 859-866.
- Oliveira, P. L., Petretski, M. D. A. and Masuda, H. (1989). Vitellin processing and degradation during embryogenesis in *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **19**, 489-498.
- Parker, I. and Yao, Y. (1995). Calcium puffs in *Xenopus* oocytes. *Ciba Found. Symp.* **188**, 50-60.
- Petersen, O. H., Burdakov, D. and Tepikin, A. V. (1999). Polarity in intracellular calcium signaling. *BioEssays* **21**, 851-860.
- Pimenta, D. C., Oliveira, A., Juliano, M. A. and Juliano, L. (2001). Substrate specificity of human cathepsin D using internally quenched fluorescent peptides derived from reactive site loop of kallistatin. *Biochim. Biophys. Acta* **1544**, 113-122.
- Postlethwait, J. H. and Giorgi, F. (1985). Vitellogenesis in insects. In *Developmental Biology: A Comprehensive Synthesis*. Vol. 1, *Oogenesis* (ed. W. L. Browner), pp. 85-126. New York: Plenum Press.
- Purcell, J. P., Quinn, T. M., Kunkel, J. G. and Nordin, J. H. (1988). Correlation of yolk phosphatase expression with the programmed proteolysis of vitellin in *Blattella germanica* during embryonic development. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **9**, 237-251.
- Raikhel, A. S. and Dadhialla, T. S. (1992). Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu. Rev. Entomol.* **37**, 217-251.
- Ramos, I. B., Miranda, K., de Souza, W. and Machado, E. A. (2006). Calcium-regulated fusion of yolk granules during early embryogenesis of *Periplaneta americana*. *Mol. Reprod. Dev.* **73**, 1247-1254.
- Ribolla, P. E. M., Dafre, S. and de Bianchi, A. G. (1993). Cathepsin B and acid phosphatase activities during *Musca domestica* embryogenesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **23**, 217-223.
- Ribolla, P. E. M., Bijovski, A. T. and de Bianchi, A. G. (2001). Procathepsin and acid phosphatase are stored in *Musca domestica* yolk spheres. *J. Insect Physiol.* **47**, 225-232.
- Rutledge, T. W. and Whiteheart, S. W. (2002). SNAP-23 is a target for calpain cleavage in activated platelets. *J. Biol. Chem.* **277**, 37009-37015.
- Sappington, T. W. and Raikhel, A. S. (1998). Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **28**, 277-300.
- Silva-Neto, M. A., Atella, G. C., Fialho, E., Paes, M. C., Zingali, R. B., Petretski, J. H., Alves, E. W. and Masuda, H. (1996). Isolation of a calcium-binding phosphoprotein from the oocytes and hemolymph of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *J. Biol. Chem.* **271**, 30227-30232.
- Sorgine, M. H., Logullo, C., Zingali, R. B., Paiva-Silva, G. O., Juliano, L. and Oliveira, P. L. (2000). A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.* **275**, 28659-28665.
- Steinhardt, R., Zucker, R. and Schatten, G. (1977). Intracellular calcium release at fertilization in the sea urchin egg. *Dev. Biol.* **58**, 185-196.
- Takahashi, S. Y., Yamamoto, Y., Zhao, X. and Watabe, S. (1996). Bombyx acid cysteine proteinase. *Int. J. Invert. Rep. Dev.* **30**, 265-281.
- Tse, F. W., Tse, A., Hille, B. and Almers, W. (1997). Local Ca^{2+} release from internal stores control exocytosis in pituitary gonadotrophs. *Neuron* **18**, 121-132.
- Valle, D. (1993). Vitellogenesis in insects and other groups: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **88**, 11-26.
- Wall, D. A. and Meleka, I. (1985). An unusual lysosome compartment involved in vitellogenin endocytosis by *Xenopus* oocytes. *J. Cell Biol.* **101**, 1651-1664.
- Wallace, R. A. (1985). Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In *Developmental Biology: A Comprehensive Synthesis*. Vol. 1 (ed. R. W. Browder), pp. 127-177. New York: Plenum.
- Webb, S. E. and Miller, A. L. (2003). Calcium signalling during embryonic development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 539-551.
- World Health Organization (2002). Report of the expert committee on the control of Chagas disease. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* **905**, 985.
- Yamahama, Y., Uto, N., Tamotsu, S., Miyata, T., Yamamoto, Y., Watabe, S. and Takahashi, S. Y. (2003). *In vivo* activation of pro-form Bombyx cysteine protease (BCP) in silkworm eggs: localization of yolk proteins and BCP, and acidification of yolk granules. *J. Insect Physiol.* **49**, 131-140.
- Yin, L., Nordin, J. H., Lucches, P. and Giorgi, F. (2001). Cysteine propeptase colocalizes with vitellogenin in compound granules of the cockroach fat body. *Cell Tissue Res.* **304**, 391-399.
- Yingst, D. R. and Hoffman, J. F. (1983). Intracellular free Ca and Mg of human red cell blood cell ghosts measured with entrapped arsenazo III. *Anal. Biochem.* **132**, 431.
- Zhang, Y. and Kunkel, J. G. (1992). High abundance calmodulin from *Blattella germanica* eggs binds to vitellin subunits but disappears during vitellin utilization. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **22**, 293-304.

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](#)