



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

**Solubilização e Efeito de Tapsigargina em
 Ca^{2+} -ATPase de larva de
Pachymerus nucleorum (Fabricius 1792)
(Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)**

Aluno: Vinícius Luis Duarte

Orientador: Prof. Dr. Milton Vieira Coelho

UBERLÂNDIA - MG
Fevereiro de 2007



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

**Solubilização e Efeito de Tapsigargina em
 Ca^{2+} -ATPase de larva de
Pachymerus nucleorum (Fabricius 1792)
(Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)**

Aluno: Vinícius Luis Duarte

Orientador: Prof. Dr. Milton Viera Coelho

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

UBERLÂNDIA-MG
Fevereiro de 2007



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

**Solubilização e Efeito de Tapsigargina em
 Ca^{2+} -ATPase de larva de
Pachymerus nucleorum (Fabricius 1792)
(Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)**

Aluno: Vinícius Luis Duarte

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Milton Vieira Coelho (Orientador)

Examinadores:

Data da Defesa: ____ / ____ / ____

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

(Orientador)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- D812s Duarte, Vinícius Luis, 1981-
Solubilização e efeito de tapsigargina em Ca^{2+} -ATPase de larva de
Pachymerus nucleorum (Fabricius 1792) (Coleoptera: Chrysomelidae:
Bruchinae) / Vinícius Luis Duarte. - 2007.
37 f. : il.
- Orientador: Milton Vieira Coelho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Enzimas - Teses. I. Coelho, Milton Vieira. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.15

***"A mente que se abre a uma nova idéia
jamais voltará ao seu tamanho original."***

Einstein

*Aos meus pais Sebastião e Maria Piedade,
e aos irmãos Flávio e Fabrício.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Milton Vieira Coelho, pela orientação e apoio neste trabalho.

Aos companheiros e amigos de laboratório, Hugo (professor e doutorando), Decivaldo (Vicentim – Parrudo, doutorando), Gabriel (doutorando pela UNB), Rogério (agora “empresário”), Léo (“empresário” e professor), Clarissa, Viviane, Ester, Laísse, Anelise e dona Maura, por toda a assistência, e, principalmente, paciência.

À secretária e amiga do INGEB, Marlene, e ao secretário da pós-graduação, Gerson Fraissat.

Aos amigos de outros laboratórios do INGEB, pela contribuição indireta durante este tempo e pelos bons momentos nas horas de lazer.

Aos professores Veridiana, Amélia, Maria Inês, Bonetti, Foued, Luis Ricardo e Cameron, por contribuírem com seus conhecimentos na minha formação.

Às amigas Cynthia e Cynara, pelos bons conselhos.

Aos amigos Dener, Diogo, Clécio e Carol (turma do Direito-UFU) pela convivência e companhia em Uberlândia.

E a todos aqueles que, de alguma forma, me incentivaram e apoiaram durante essa caminhada.

Índice

1. Resumo Geral	1
2. Introdução Geral	2
 3. Capítulo 1: Solubilização parcial de uma Ca^{2+}-ATPase de larva de <i>Pachymerus nucleorum</i> (Fabricius 1792) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae).....	 4
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUÇÃO.....	7
MATERIAL E MÉTODOS.....	9
RESULTADOS.....	12
DISCUSSÃO.....	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
 4. Capítulo 2: Efeito de taspigargina na atividade Ca^{2+}-ATPase de larva de <i>Pachymerus nucleorum</i> (Fabricius 1792) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae).....	 23
RESUMO.....	24
ABSTRACT.....	26
INTRODUÇÃO.....	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
RESULTADOS.....	31
DISCUSSÃO.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figura 1: SDS-PAGE de solubilização de P3 com NaCl	01
Figura 2: Atividade Ca^{2+} -ATPásica e K^+ /EDTA-ATPásica das frações P3, S4 e P4	13
Figura 3: Efeito de NaCl na atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3	14
Figura 4: Efeito de cátions na atividade ATPásica de S4	15
Figura 5: Efeito de cátions na atividade Ca^{2+} -ATPásica de S4	16
Figura 6: Estabilidade da atividade Ca^{2+} -ATPásica de S4	16

Capítulo 2

Figura 1: SDS-PAGE de solubilização de P3 com NaCl	31
Figura 2: Efeito de tapsigargina na atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3 e S4	31
Figura 3: Efeito da pré-incubação com tapsigargina na atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3	32
Figura 4: Efeito da pré-incubação com ATP ou CaCl_2 na inibição da atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3 por tapsigargina	33
Figura 5: Efeito de pré-incubação com ATP e CaCl_2 na inibição da atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3 por tapsigargina	33

Lista de Abreviaturas

ATP: Adenosina Trifosfato

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilendiamino tetraacético

EGTA: ácido etilenglicol tetraacético

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de sódio

Tris: triidroximetilaminometano

RESUMO GERAL

Pachymerus nucleorum Fabricius 1792 é uma espécie de besouro predador de coco de babaçu (*Orbignya sp.*) que pertence à subfamília de coleópteros Bruchinae, cujos representantes são conhecidos como brocas de sementes. Uma fração precipitada de larva de *P. nucleorum* não solubilizada com Triton X-100 apresentou atividade Ca^{2+} -ATPásica e K^+ /EDTA. O presente trabalho teve como objetivo solubilizar a enzima responsável pela atividade Ca^{2+} -ATPásica e caracterizá-la. A atividade Ca^{2+} -ATPásica foi parcialmente solubilizada com sal e a fração solúvel (S4) do ensaio com NaCl 600 mM foi melhor caracterizada. Em SDS-PAGE foi detectada a presença mais marcante de um polipeptídeo com mobilidade relativa de 205 kDa, e mais fracamente um de 130 kDa e um de 102 kDa. NaCl 600 mM inibiu cerca de 35% da atividade de P3, chegando a 84% com NaCl 2M. A atividade Mn^{2+} -ATPásica representou cerca de 40% da Ca^{2+} -ATPásica, e não foi detectada atividade Mg^{2+} -ATPásica. Em presença de zinco ou ferro oxidado, a atividade ATPásica foi nula e quando incubada com cobalto, cobre, bário, lítio ou ferro reduzido, a atividade correspondeu a menos de 20% da Ca^{2+} -ATPásica. A atividade Ca^{2+} -ATPásica foi completamente inibida por magnésio, cobre e zinco. Cobalto, manganês, ferro (oxidado e reduzido) inibiram em mais de 60% tal atividade, e bário ou lítio não afetaram a atividade dependente de cálcio. Tapsigargina 140 μM inibiu cerca de 80% da atividade Ca^{2+} -ATPásica tanto de P3 quanto de S4, se adicionada no início da reação. Em pré-incubação com tapsigargina 140 μM , a atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3 foi inibida em cerca de 95%. Pré-incubação com ATP ou cálcio preveniu parcialmente a inibição da atividade Ca^{2+} -ATPásica por tapsigargina. A inibição foi completamente evitada com pré-incubação na presença de ATP e cálcio. A fração S4 é estável por até dois dias quando armazenada a 4°C, mas após esse período a atividade Ca^{2+} -ATPásica cai sensivelmente. Neste trabalho, atividade Ca^{2+} -ATPásica de larva de *Pachymerus nucleorum* sensível a tapsigargina foi solubilizada com sal e parcialmente caracterizada.

INTRODUÇÃO GERAL

Os besouros bruquíneos (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) são uma subfamília de coleópteros amplamente distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Mais de 1500 espécies descritas em 58 gêneros compõem esse grupo de coleópteros dos quais há espécies que se alimentam de sementes de espécies vegetais economicamente importantes. *Pachymerus nucleorum* Fabricius, 1972, espécie representante desse grupo, destaca-se por ser predador natural do coco de babaçu. O babaçu ocorre em maior concentração no Brasil nas áreas de transição entre o cerrado e a floresta amazônica, e tem grande importância econômica para famílias cuja subsistência depende da extração do fruto e seus derivados, e, ultimamente tem despertado a atenção das indústrias por ser um recurso renovável, pouco poluente e eficiente gerador de energia térmica.

Em seu desenvolvimento, a fêmea de *P. nucleorum* deposita seus ovos nos frutos caídos, suas larvas eclodem e penetram através dos canais de seiva ou do hilo (poro funcional) do coco. Elas se alimentam das amêndoas assimilando óleos e proteínas e tecem um casulo, ligando com seiva partículas farinhasas do coco. O período larval dura em média três meses e o pupal dois meses. Quando o período de desenvolvimento termina, o adulto ainda permanece no interior dos cocos por duas semanas, e então faz um orifício na rígida estrutura do coco de babaçu para sair. *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) são outros dois representantes dessa subfamília que atacam sementes de leguminosas como ervilhas e feijão (*Phaseolus vulgaris*), respectivamente. Outro predador de feijão comum, *Acanthoscelides obtectus*, é responsável por causar prejuízos importantes em estoques desses grãos. Embora produzam substâncias de defesa como taninos, glicosídeos cianogênicos e proteínas inibidoras de proteases e amilases, esses vegetais são ineficientes na defesa contra seus hospedeiros específicos.

As ATPases são enzimas que hidrolisam o ATP e utilizam a energia liberada para realizar suas funções. As Ca^{2+} -ATPases são ATPases de membrana e estão envolvidas na manutenção da concentração plasmática de cálcio em níveis homeostáticos, em torno de 100 nM. Sinais externos (primeiros mensageiros)

atuam nos receptores da membrana plasmática, induzindo síntese ou liberação de segundos mensageiros, ou mesmo ativam enzimaticamente a porção interna do receptor. O cálcio, tradicionalmente conhecido como segundo mensageiro, é liberado de seus reservatórios intracelulares, o retículo endoplasmático ou sarcoplasmático. O aumento da concentração citoplasmática de cálcio desencadeia uma série de processos nas células eucarióticas, incluindo contração muscular, fertilização, transporte de vesículas, apoptose, expressão gênica e controle de qualidade no enovelamento de proteínas. A ativação dos canais de cálcio na membrana plasmática permite a entrada do cátion dos espaços extracelulares, enquanto a ativação desses canais no retículo libera cálcio dessas organelas para o citoplasma. Após atuarem em seus alvos intracelulares, o excesso de cálcio deve ser bombeado para fora do citoplasma, função exercida pelas Ca^{2+} -ATPases (bombas de cálcio) localizadas na membrana plasmática e na membrana dos retículos.

Quando em concentrações elevadas no citoplasma, o cálcio liga-se à calmodulina, uma proteína reguladora pertencente à família das “EF-hand” proteínas. A calmodulina, ao se ligar ao cálcio, altera sua conformação, expõe seu domínio hidrofóbico e dessa forma regula suas enzimas-alvo, como as bombas de cálcio. Assim, os níveis plasmáticos de cálcio retornam ao estado basal pelo bombeamento do cátion para o espaço periplasmático ou para dentro de seus reservatórios intracelulares pelas Ca^{2+} -ATPases, ou seja, o próprio cálcio regula sua concentração no citoplasma. Os canais de cálcio de membrana plasmática são passivamente ativados por potencial elétrico, por ligantes como neurotransmissores ou mesmo por esvaziamento dos estoques intracelulares de cálcio. No caso de retículo endoplasmático e sarcoplasmático, a abertura dos canais de cálcio se deve a ação de outros ligantes, por exemplo o trifosfato de inositol (IP_3) e rianodina, respectivamente.

O estudo bioquímico de insetos pode gerar conhecimentos importantes que possam auxiliar no seu controle. Neste trabalho, o objetivo foi solubilizar a Ca^{2+} -ATPase de larva de *Pachymerus nucleorum* para melhor caracterizá-la.

CAPÍTULO 1

**Solubilização parcial de Ca^{2+} -ATPase de larva de
Pachymerus nucleorum (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)**

1. RESUMO

Pachymerus nucleorum Fabricius 1792 é uma espécie de besouro predador de castanhas de babaçu (*Orbignya sp.*) pertencente à subfamília de coleópteros Bruchinae, cujos representantes são conhecidos como brocas de sementes. Uma fração precipitada (P3) obtida a partir de larva de *P. nucleorum* e não solubilizada com Triton X100 apresentou atividade Ca^{2+} -ATPásica e K^+ /EDTA-ATPásica. O presente trabalho teve como objetivo solubilizar a enzima responsável pela atividade ATPásica e caracterizá-la. A atividade Ca^{2+} -ATPásica foi parcialmente solubilizada com NaCl 600 mM e a análise em SDS-PAGE mostrou a presença mais marcante de um polipeptídeo com mobilidade relativa de 205 kDa, e mais fracamente um de 130 kDa e um de 102 kDa. NaCl 600 mM inibiu cerca de 40% da atividade de P3, chegando a 84% com NaCl 2M. A atividade Mn^{2+} -ATPásica da fração solubilizada representou cerca de 40% da Ca^{2+} -ATPásica, e não foi detectada atividade Mg^{2+} -ATPásica. Em presença de zinco ou ferro oxidado, a atividade ATPásica foi nula e quando incubada com cobalto, cobre, bário, lítio ou ferro reduzido, a atividade correspondeu a menos de 20% da Ca^{2+} -ATPásica. A atividade Ca^{2+} -ATPásica foi completamente inibida por magnésio, cobre e zinco. Cobalto, manganês, ferro (oxidado e reduzido) inibiram em mais de 60% tal atividade, e bário ou lítio não afetaram a atividade dependente de cálcio. Neste trabalho, a atividade Ca^{2+} -ATPásica de larva de *Pachymerus nucleorum* foi parcialmente solubilizada com NaCl 600 mM e apresentou atividade Ca^{2+} -ATPásica inibida por magnésio.

Palavras-chave: *Pachymerus nucleorum*, larva, Ca^{2+} -ATPase, solubilização.

2. ABSTRACT

Pachymerus nucleorum Fabricius 1792 is a beetle specie that predate babaçu coconut (*Orbignya* sp.). It belong to Bruchinae coleoptera subfamily, whose representants are know as seed bits. We found a precipitated fraction from larvae of *P. nucleorum* that is not solubilized by Triton X-100 (P3) and presents Ca^{2+} -ATPase and K^+ /EDTA-ATPase activity. The objective of this work was solubilize and characterize the enzyme responsible for the Ca^{2+} -ATPase activity. The Ca^{2+} -ATPase was partially solubilized with 600 mM NaCl and the soluble fraction from this assay (S4) was better characterized. We noticed in SDS-PAGE a strongly stained polypeptide with 205 kDa and two others with 130 and 102 kDa. 600 mM NaCl inhibits about 40% of P3 Ca^{2+} -ATPase activity, and 84% with 2 M NaCl. We found in S4 Mn^{2+} -ATPasic activity, corresponding to 40% of the observed with calcium, and no Mg^{2+} -ATPase activity was detected. In presence of Zn^{2+} or Fe^{2+} the ATPase activity was null and when incubated with cobalt, copper, barium, litium or Fe^{2+} , the ATPase activity correspond to less than 20% of the Ca^{2+} -ATPase activity. The Ca^{2+} -ATPase activity was completely inhibited by magnesium, copper ou zinc. Cobalt, manganese, Fe^{3+} or Fe^{2+} inhibited in more than 60% such activity, and barium and litium didn't affect the calcium-dependent activity. In this work, the Ca^{2+} -ATPase activity of *Pachymerus nucleorum* larvae was partially solubilized with 600 mM NaCl and presents Ca^{2+} -ATPase activity inhibited by magnesium.

Keywords: *Pachymerus nucleorum*, larvae, Ca^{2+} -ATPase, solubilization.

3. INTRODUÇÃO

Pachymerus nucleorum Fabricius 1792 é uma espécie de besouro bruquíneo pertencente a uma subfamília de coleópteros tropicais (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) dos quais há espécies que se alimentam de sementes de vegetais economicamente importantes para o homem (Southgate, 1979; Anderson & May, 1985). *P. nucleorum* destaca-se por ser predador natural de castanhas babaçu e de outras palmeiras (Gallo, 1988; Alvarez, 2005). *Calosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) pertencem à mesma subfamília Bruchinae e se alimentam de sementes de leguminosas como feijão branco, *Vigna unguiculata* (Abate & Ampolfo, 1996) e feijão comum, *Phaseolus vulgaris* (Southgate, 1979; Dendy & Credland, 1991), respectivamente. *Acanthoscelides obtectus*, outro predador de feijão comum, é responsável por causar prejuízos importantes em estoques desses grãos (Goossens et al., 2000).

Em seu desenvolvimento, a fêmea de *P. nucleorum* deposita seus ovos nos frutos de babaçu caídos, as larvas eclodem e penetram através dos canais de seiva ou do hilo (poro funcional) do coco. Elas se alimentam das amêndoas assimilando óleos e proteínas e tecem um casulo, onde ficam até tornarem-se adultos. Para sair, o adulto faz um orifício na rígida estrutura do fruto do babaçu, e assim termina seu ciclo (May et al., 1985; Gallo, 1988; Fairman, 1992). Ataques por essa praga acarretam vários prejuízos para famílias subsistentes do babaçu.

As Ca^{2+} -ATPases são ATPases de membrana envolvidas no transporte de cálcio (Carafoli, 1991). Vários eventos nas células eucarióticas são desencadeados pela entrada de cálcio no citosol, incluindo contração muscular, fertilização, transporte de vesículas e expressão gênica (Carafoli, 1991; Carafoli, 2004). O papel das Ca^{2+} -ATPases de membrana plasmática e retículos é bombear o cálcio para fora da célula ou para seus reservatórios intracelulares e, dessa forma, manter os níveis plasmáticos de cálcio em estado basal, após o término de sua ação (De Meis, 1991; Abu-Abed et al., 2002; Carafoli, 2005). Ca^{2+} -ATPases isoladas de retículo sarcoplasmático possuem pesos moleculares em torno de 100 kDa (Nakamura et al., 1983), enquanto Ca^{2+} -ATPases isoladas de membrana plasmática têm de 135 a 140 kDa (Guerini et al., 2003).

Algumas miosinas II também expressam alta atividade Ca^{2+} -ATPásica (Pollard & Korn, 1973; Pollard, 1982). Elas possuem duas cadeias pesadas de aproximadamente 200 kDa e caracterizam-se por apresentar, em condições fisiológicas, estimulação de atividade Mg^{2+} -ATPásica por F-actina (Maruta & Korn, 1977). As miosinas expressam também atividade K^+ /EDTA-ATPásica, ou seja, atividade ATPásica na ausência de cátions divalentes e presença de alta concentração de íons potássio. (Pollard & Korn, 1973). No caso das miosinas, essa classe de ATPases têm a característica particular de exibir, além de atividade Mg^{2+} e Ca^{2+} -ATPásica, uma alta atividade na presença de KCl 600 mM e ausência de cátions bivalentes (atividade K^+ /EDTA-ATPásica) (Pollard & Korn, 1973; Pollard, 1982). Miosina V, por exemplo, apresenta atividade Mg^{2+} -ATPásica estimulada por cálcio, que é regulada pela ligação de calmodulina no domínio pescoço da cadeia pesada (Nascimento et al., 1996).

Em estudos sobre ATPases de insetos neste laboratório, foi obtida a partir de larva de *Pachymerus nucleorum*, uma fração precipitada rica em atividade Ca^{2+} -ATPásica. Essa fração apresentou, além de atividade Ca^{2+} -ATPásica, atividade K^+ /EDTA-ATPásica equivalente à metade da Ca^{2+} -ATPásica. A atividade Ca^{2+} -ATPásica foi inibida 50% por magnésio 0,25 mM (Cruz & Coelho, 2006) e em cerca de 90% por cobre 0,5 mM ou zinco 0,25 mM (Dias e Coelho, 2006). O objetivo deste trabalho foi solubilizar a enzima responsável pela atividade ATPásica obtida a partir de larva de *Pachymerus nucleorum* no intuito de posterior purificação e caracterização.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Os reagentes imidazol, EDTA, EGTA, β -mercaptoetanol, ATP, inibidores de proteases, reagentes para eletroforese, sacarose, pirofosfato tetrasódico, Triton X-100, KCl, CoCl_2 , FeSO_4 foram obtidos de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

O perfil de polipeptídeos das frações foi analisado em SDS-PAGE usando o sistema descontínuo de Laemmli (1970) e o sistema de placas empregado por Studier (1973). Os mini-géis foram preparados em gradiente de concentração de 5 a 22% ou concentração fixa de 7% de acrilamida. Os géis foram montados entre placas de vidro e alumina de 10 x 7,5 x 0,06 cm.

A separação eletroforética dos polipeptídeos foi conduzida em tampão Tris 25 mM pH 8,5, EDTA 2mM, glicina 0,2 M, SDS 2,5 mM, sob corrente constante de 30 mA. Os géis foram corados com coomassie brilliant blue R250 0,125% em metanol 50% e ácido acético 10% e descorados em solução de metanol 10% e ácido acético 12,5%.

As amostras para gel foram preparadas adicionando 90 μL da fração em 10 μL de tampão de amostra (Tris-HCl 187 mM, pH 6,8, SDS 6%, EDTA 6 mM, glicerol 27,6%, bromofenol 3 mM e β -mercaptoetanol 28,8 mM), e aquecendo a 100°C por 5 minutos.

O cálculo do peso molecular aproximado dos polipeptídeos em gel foi realizado segundo o método de Lambin et al. (1976).

4.3. Dosagem de proteínas

A concentração protéica das amostras foi determinada segundo o método quantitativo de Bradford (1976). Uma curva padrão de dosagem de soroalbumina bovina (BSA) foi preparada para cada análise.

4.4. Dosagem da atividade de hidrólise de ATP

A dosagem colorimétrica do ortofosfato inorgânico liberado durante a reação de hidrólise de ATP foi realizada segundo o método de Heinonen & Lahti (1981), o qual utiliza solução de dosagem de fosfato inorgânico composta por acetona PA, ácido sulfúrico 5N e molibdato de amônio 10 mM, na proporção de 2:1:1. Para a dosagem de atividade cátião-ATPásica, utilizou-se o meio de reação imidazol 25 mM pH 7,5; DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM e cátions em concentração 4 mM.

Volumes pré-determinados de amostras das frações protéicas foram adicionados aos meios de incubação e o volume final de 200 µL foi completado com adição de água Milli-Q. A reação foi iniciada com adição do substrato (concentração final de 1 mM), seguida de incubação a 37°C durante 15 minutos. Após este tempo, a reação foi interrompida com a adição de 2 mL de solução de dosagem de fosfato inorgânico.

4.5. Obtenção da fração solúvel rica em atividade Ca^{2+} -ATPásica

As larvas foram retiradas dos frutos de babaçu, lavadas com água Milli-Q e dissecadas para a retirada do aparelho digestivo. O corpo gorduroso foi homogeneizado em tampão de extração (imidazol 50 mM pH7,5, sacarose 250 mM, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM, β-mercaptoetanol 2 mM, aprotinina 2 µg/mL e benzamidina 1 mM) na proporção de 0,1 g de tecido por mL de tampão em triturador elétrico ESGE®. O homogeneizado foi filtrado em gaze esterilizada e centrifugado a 15.000 x g durante 30 minutos a 4°C. O precipitado (P1) foi homogeneizado em tampão 1 (Imidazol 20 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 2 mM, benzamidina 0,1 mM) contendo Triton X-100 0,2%, deixado em temperatura ambiente por 20 minutos e centrifugado a 15.000 x g durante 30 minutos a 4°C. A

fração precipitada (P2) foi ressuspensa em tampão 1, contendo pirofosfato de sódio 50 mM, incubado a temperatura ambiente (25°C) por 20 minutos e centrifugada a 40.000 $\times$ g a 4°C durante 40 minutos. O precipitado (P3) foi ressuspenso em tampão 1 contendo NaCl 600 mM e centrifugado a 40.000 $\times$ g a 4°C por 40 minutos. A fração S4 foi recuperada e o precipitado ressuspenso em tampão 1.

5. RESULTADOS

A Ca^{2+} -ATPase isolada de larva de *Pachymerus nucleorum* encontra-se na forma de precipitado, e para sua melhor caracterização, é importante purificá-la. No processo de purificação, torna-se necessário que a fração esteja em um estado solúvel, desagregado de outros componentes que de alguma forma interfiram na sua ligação ao grupamento ligante das resinas de cromatografia de troca iônica, ou mesmo impeça uma boa separação no caso das colunas de filtração em gel. No caso de enzimas, a incubação com seus substratos ou o aumento da força iônica pode proporcionar a solubilização.

Ensaio preliminares mostraram que o efeito de NaCl e KCl na solubilização da atividade Ca^{2+} -ATPásica foi gradativo à medida que a concentração do sal foi aumentada (resultados não mostrados). NaCl 600 mM recuperou parte da atividade ATPásica de P3 e o seu principal polipeptídeo foi o de 205 kDa (Figura 1). Observou-se, também, polipeptídeos de 130, 102 e 45 kDa, que aparecem corados mais fracamente no gel, e esta fração solúvel foi utilizada para os ensaios de caracterização.

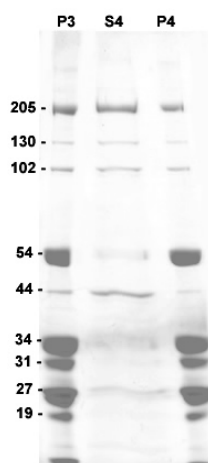


Figura 1: SDS-PAGE de solubilização de P3 com NaCl. Foram aplicados 6 μL de P3 e P4, e 20 μL de S4 em gel gradiente de poliácridamida de 5 a 22%, que foi corado com Comassie Brilliant Blue-R 250. Os valores à esquerda representam os pesos moleculares dos principais polipeptídeos da fração P3.

A atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3 foi de cerca de 100 nmols Pi/mL/min e a K^{+} -EDTA-ATPásica 50 nmols Pi/mL/min (Figura 2) A fração solúvel S4 apresentou atividade Ca^{2+} -ATPásica de 10 nmols Pi/mL/min e não apresentou atividade K^{+} /EDTA-ATPásica. A fração recuperada P4 apresentou atividade Ca^{2+} -ATPásica por volta de 50 nmols Pi/mL/min, enquanto que a K^{+} /EDTA-ATPásica correspondeu à cerca de metade desse valor.

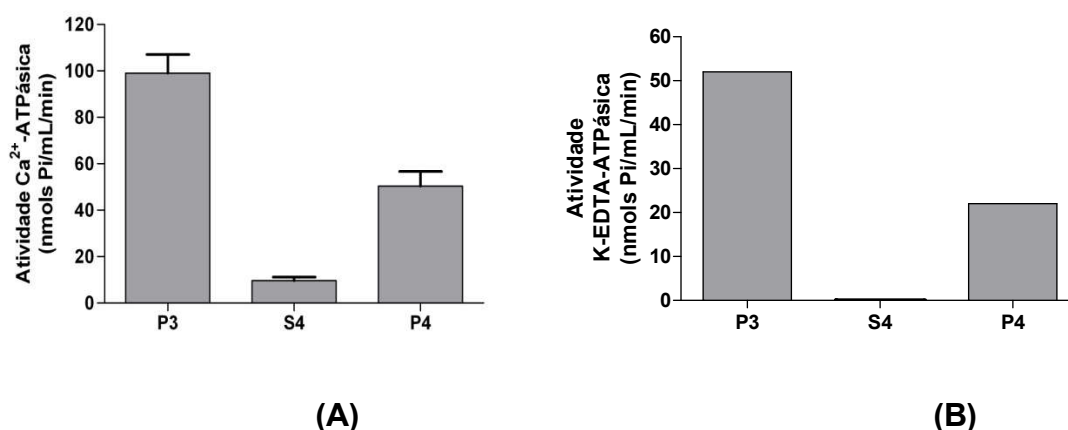


Figura 2: Atividade Ca^{2+} -ATPásica e K^{+} /EDTA-ATPásica das frações P3, S4 e P4: 50 μL de P3 e P4 e 100 μL de S4 foram adicionados ao meio de reação Imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM, contendo CaCl_2 4 mM (A) ou KCl 600 mM (B). A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM, seguido de incubação a 37°C durante 15 minutos e foi interrompida com adição de solução de dosagem de fosfato inorgânico.

Para detectarmos se NaCl exerce interferência na atividade Ca^{2+} -ATPásica, foram feitos ensaios utilizando várias concentrações do sal. O aumento da concentração de NaCl causou inibição crescente da atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3. NaCl 600 mM inibiu cerca de 35% da atividade controle, chegando a 84% com NaCl 2 M (Figura 3).

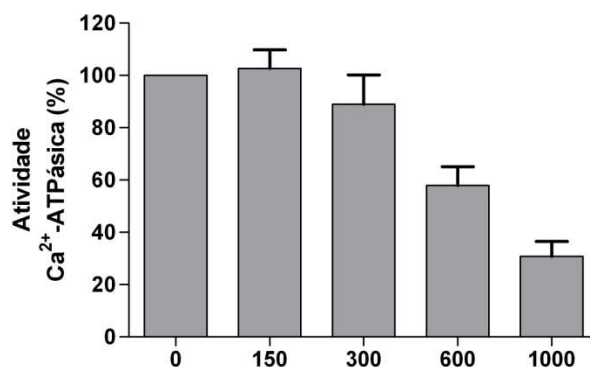


Figura 3: Efeito de NaCl na atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3. 125 μg de proteínas da fração P3 foram adicionados ao meio de reação Imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM, CaCl_2 4 mM e NaCl nas concentrações indicadas. A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM, seguido de incubação a 37°C durante 15 minutos e foi interrompida com adição de solução de dosagem de fosfato inorgânico.

No intuito de comparar a atividade ATPásica de S4 e P3 em relação ao requerimento de cátions, a atividade ATPásica da fração S4 foi testada na ausência e presença de vários cátions (Figura 4). A atividade ATPásica na presença de cálcio foi mais evidente, liberando cerca de 24 nmols $\text{Pi}/\text{mL}/\text{min}$ (ou 2490 nmols $\text{Pi}/\text{mg}/\text{min}$). A atividade ATPásica na presença de manganês foi 40% da correspondente ao cálcio. Na ausência de cátion ou quando adicionado cobalto, cobre, bário, lítio ou ferro no estado reduzido a atividade ATPásica correspondeu a menos de 20% da observada quando em presença de cálcio. Na presença de magnésio, zinco ou ferro no estado oxidado a atividade ATPásica foi nula. Este fato também observado quando adicionado ascorbato, utilizado para evitar a oxidação espontânea do ferro do estado ferroso para férrico.

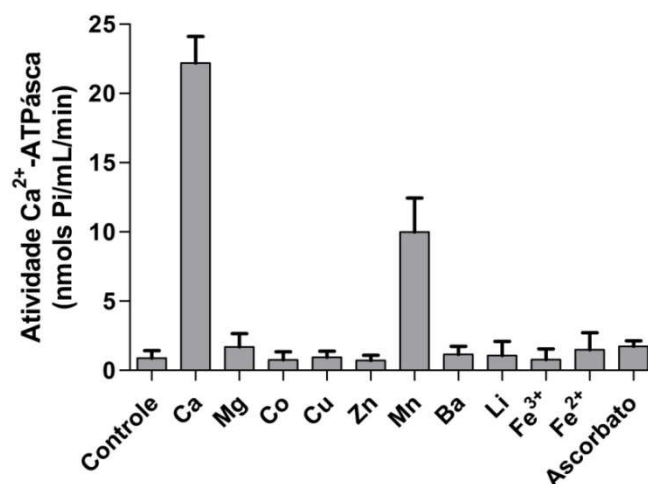


Figura 4: Efeito de cátions na atividade ATPásica de S4. 1 µg de proteína da fração S4 foi adicionado ao meio de reação Imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM e 4 mM de cada cátion indicado. A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM, seguido de incubação a 37°C durante 15 minutos e foi interrompida com adição de solução de dosagem de fosfato inorgânico.

O efeito de cátions na atividade Ca²⁺-ATPásica de S4 também foi testado. Magnésio, cobre, zinco e ferro no estado reduzido causaram alta inibição da atividade Ca²⁺-ATPásica (Figura 5). Ferro no estado oxidado e cobalto inibiram, mas em menor proporção, a atividade Ca²⁺-ATPásica. Bário e lítio não inibiram a atividade. Em presença de ascorbato, a atividade Ca²⁺-ATPásica de S4 não foi alterada.

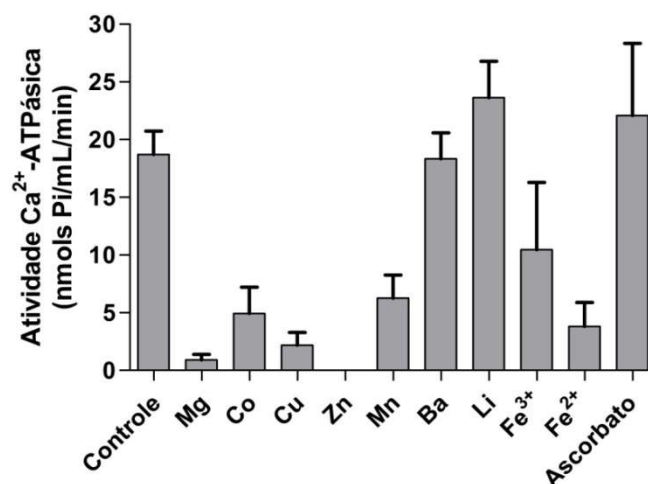


Figura 5: Efeito de cátions na atividade Ca^{2+} -ATPásica de S4. 1 μg de proteína da fração S4 foi adicionado ao meio de reação Imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM, CaCl_2 4 mM e 4 mM de cada cátion indicado. A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM, seguido de incubação a 37°C durante 15 minutos e foi interrompida com adição de solução de dosagem de fosfato inorgânico.

A estabilidade da atividade Ca^{2+} -ATPásica de S4 foi testada, como representado no histograma a seguir (Figura 6). Após três dias, mais de 70% da atividade Ca^{2+} -ATPásica foi perdida quando a fração foi mantida a 4°C.

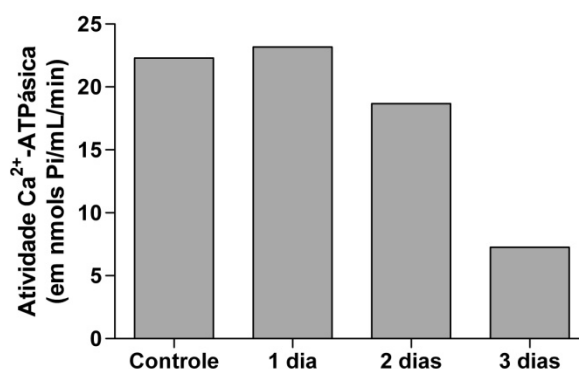


Figura 6: Estabilidade da atividade Ca^{2+} -ATPásica de S4. 1 μg de proteínas da fração S4 armazenada a 4°C pelo tempo indicado foi adicionado ao meio de reação Imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM e CaCl_2 4 mM. A reação foi iniciada com a adição de ATP 1 mM, seguido de incubação a 37°C durante 15 minutos e foi interrompida com adição de solução de dosagem de fosfato inorgânico.

6. DISCUSSÃO

A atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3 (cerca de 100 nmols $\text{Pi}/\text{mL}/\text{min}$) obtida neste trabalho foi o dobro da K^+/EDTA -ATPásica (Figura 2), dados semelhantes àqueles apresentados por Cruz & Coelho (2006). Como a fração P3 apresenta atividade K^+/EDTA -ATPásica, uma característica de miosinas, que por sua vez são solubilizadas com alto sal, a fração P3 foi tratada com alta concentração do mesmo. A fração solubilizada (S4) apresentou somente atividade Ca^{2+} -ATPásica (10 nmols $\text{Pi}/\text{mL}/\text{min}$), e a fração precipitada (fração P4) tanto atividade Ca^{2+} -ATPásica quanto K^+/EDTA -ATPásica. Desta forma, o tratamento da fração P3 com NaCl solubiliza apenas a atividade Ca^{2+} -ATPásica, ficando a K^+/EDTA -ATPásica no precipitado.

O efeito de NaCl na atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3 foi testado, e analisando a Figura 3, 600 mM do sal inibiu cerca de 35% da atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3, inibição esta que chegou a 85% quando em alta concentração (2 M). Esse resultado é importante, pois foi usado NaCl para solubilizar a atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3, e concentrações elevadas deste estão presentes nos sobrenadantes e podem inibir a hidrólise de ATP.

Alto sal promoveu solubilização mais eficiente do polipeptídeo de mobilidade relativa de 205 kDa e mais fracamente aqueles de 130 kDa e 102 kDa, correspondentes a massa molecular próxima de Ca^{2+} -ATPases isoladas de membrana plasmática, 135 a 140 kDa (Guerini et al., 2003), e de Ca^{2+} -ATPases isoladas de retículo sarcoplasmático de músculo, 102 kDa a 105 kDa (Nakamura et al., 1983) (Figura 1). Embora o principal polipeptídeo da fração S4 possua mobilidade relativa similar à cadeia pesada de miosina II (Warrick & Spudich, 1987) e V (Espindola et al., 1992) não foi detectada atividade K^+/EDTA -ATPásica nessa fração. Provavelmente este polipeptídeo não está relacionado com miosina II. A sensibilidade da atividade Ca^{2+} -ATPásica da fração S4 a tapsigargina (ver capítulo 2) indica que uma Ca^{2+} -ATPase, e não miosina seja a responsável pela atividade Ca^{2+} -ATPásica dessa fração. Outros ensaios mostraram solubilização da atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3 com valores crescentes até 600 mM de NaCl, sendo que a partir dessa concentração, a atividade do sobrenadante é reduzida (dados não mostrados). A atividade Ca^{2+} -ATPásica da fração solubilizada com 600 mM de

NaCl (S4) foi cerca de 10% da atividade Ca^{2+} -ATPásica observada em P3, enquanto a atividade Ca^{2+} -ATPásica de P4 foi de cerca de 40%.

A atividade ATPásica da fração S4 foi testada na presença de diferentes cátions (Figura 4). As Ca^{2+} -ATPases necessitam da presença de cálcio juntamente com o ATP para realizar sua atividade enzimática, sendo que alguns íons com cargas e raios com dimensões semelhantes podem substituí-lo (Edwards et al., 1966). Metais pesados como Sr^{2+} , Ba^{2+} , Ni^{2+} , dentre outros, podem exercer efeito estimulatório na atividade ATPásica sensível a cálcio de membranas de hemácias em humanos (Pfleger & Wolf, 1975). A fração S4 apresentou atividade ATPásica apenas na presença de cálcio (25 nmols $\text{Pi}/\text{mL}/\text{min}$) ou manganês (10 nmols $\text{Pi}/\text{mL}/\text{min}$). Em P3 também foi revelado apenas atividade em presença de cálcio e manganês, esta última equivalendo a 50% da Ca^{2+} -ATPásica (Cruz & Coelho, 2006). Quando incubada com os demais íons (magnésio, cobalto, cobre, zinco, bário, lítio, Fe^{3+} , Fe^{2+}) a atividade ATPásica foi muito baixa ou nula. Ascorbato, utilizado para reduzir o ferro, não teve efeito na atividade ATPásica.

A atividade Ca^{2+} -ATPásica da fração P3 foi fortemente inibida por magnésio, cobalto, cobre ou zinco (Cruz & Coelho, 2006). Ensaios de inibição por cobre e zinco sobre a atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3 mostraram que cobre 0,5 mM ou zinco 0,25 mM inibem em 90% a atividade em presença de cálcio (Dias & Coelho, 2006). A fração solúvel S4 obtida neste trabalho também teve sua atividade Ca^{2+} -ATPase sensivelmente inibida por magnésio, cobre, zinco, e mais levemente por cobalto (Figura 5). Estudos mostraram que Ca^{2+} -ATPases de membrana também requerem magnésio, além do cálcio, em sua atividade de hidrólise de ATP (Sæmark & Vilhardt, 1979; Hakim et al., 1982), e que o magnésio acelera a reação de fosforilação e desfosforilação da enzima, mas sempre na presença de cálcio (Carafoli, 1991). A atividade Ca^{2+} -ATPásica de larva de *P. nucleorum* em questão contrasta com esses trabalhos, pois foi sensivelmente inibida na presença de magnésio. Ao ser incubada com bário ou lítio, a atividade Ca^{2+} -ATPásica não foi alterada.

A atividade Ca^{2+} -ATPásica de S4 foi levemente perdida se estocada por até 2 dias a 4°C, sendo que a partir do 3º dia a perda foi de cerca de 70% (Figura 4). Este tempo foi significativamente menor se comparado à estabilidade da fração P3, cuja

atividade foi mantida por até 12 dias de armazenamento sob as mesmas condições (Cruz & Coelho, 2006).

Neste trabalho foi obtida uma fração solúvel a partir de larva de *Pachymerus nucleorum* com presença de atividade Ca^{2+} -ATPásica sensivelmente inibida por cobre e zinco, e, diferentemente das outras Ca^{2+} -ATPases conhecidas, não apresentou atividade Ca^{2+} -ATPásica em presença de magnésio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abate, T., Ampofo, J.K.O., 1996. Insect pests of beans in Africa: Their ecology and management. *Annu. Rev. Entomol.* 41, 45-73.
- Abu-Abed, M. et al, 2002. Characterization of the ATP-binding domain of the sarco(endo)_plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase: probing nucleotide binding by multidimensional NMR. *Biochemistry.* 41, 1156-1164.
- Anderson, A., May, P., 1985. A palmeira de muitas vidas. *Ciência Hoje.* 4, 58-64.
- Alvarez, N., Mckey, D., Hossaert-Mckey, M., Born, C., Mercier, L., Benrey, B., 2005. Ancient and recent evolutionary history of the bruchid beetle, *Acanthoscelides obtectus* Say, a cosmopolitan pest of beans. *Molecular Ecology*, 14, 1015-1-24.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation or microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Carafoli, E., 1991. Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol. Rev.* 71, 129-151.
- Carafoli, E., 2005. Calcium – a universal carrier of biological signals. *FEBS Journal*, 272, 1073-1089.
- Cruz, G. C. N. & Coelho, M. V., 2006. Caracterização parcial de uma Ca^{2+} -ATPase de larva de *Pachymerus nucleorum* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). Dissertação de mestrado
- de Meis, L., 1991. Fast efflux of Ca^{2+} mediated by the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 5736-5742.
- Dendy, J. & Credland, P. F., 1991. Development, fecundity and egg dispersion of *Zabrotes subfasciatus*. *Entomol. exp. appl.* 59, 9-17.
- Dias, D. S., & Coelho, M. V., 2007. Efeito de ions Cu^{2+} e Zn^{2+} em atividade Ca-ATPásica isolada de larvas de *Pachymerus nucleorum* (Fabricius) (Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae). *Neotropical entomology*, 36(1), 65-69.

Espindola, F.S., E. M. Espreafico, M.V. Coelho, A.R. Martins, F.R.C. Costa, M.S. Mooseker & R.E. Larson. Biochemical and immunological characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: A novel calmodulin-binding myosin. *The Journal of Cell Biology*. 118: 359-368.

Fairman, R.M., 1992. Edible oils. In: *Minor oil crops*. FAO Agricultural Services Bulletin, 94. <http://www.fao.org/docrep/X5043E/x5043E04.htm>. Disponível em Dez/2005.

Gallo, D., 1988. *Manual de entomologia agrícola*. 2 ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 649 p.

Goossens, A., Quintero, C., Dillen, W., de Rycke, R., Valor, J.F., De Clercq, J., Van Montagu, M., Cardona, C., Angenon, G., 2000. Analysis of bruchid resistance in the wilde common bean accession G02771: no evidence for insecticidal activity of arcelin 5. *Journal of Experimental Botany*, 51, 1229-1236.

Guerini, D., Pan, B., Carafoli, E., 2003. Expression, purification, and characterization of isoform 1 of the plasma membrane Ca^{2+} pump. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, n40, 38141-38148.

Haaker, H. & Racker, E., 1979. Purification and reconstitution of the Ca^{2+} -ATPase from plasma membranes of pig erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 254, n14, 6598-6602.

Hakim, G., et al, 1982. Purification of the Ca^{2+} - and Mg^{2+} - requiring ATPase from rat brain synaptic plasma membrane. *Biochemistry Journal*, 207, 225-231.

Heinonen, J.K., Lahti, R.J., 1981. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal. Biochem.* 113, 313-317.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lambin, P., Rocher, D., Fine, J.M., 1976. A new method for determination of molecular weights of proteins by electrophoresis across a sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gradient gel. *Anal. Biochem.* 74, 567-575.

Maruta, H., Korn, E.D., 1977. *Acanthamoeba* myosin II. J. Biol. Chem. 252, 6501-6509.

May, P.H., Anderson, A.B., Balick, M.J., Frazão, J.M., 1985. Subsistence benefits from the Babassu palm (*Orbignya martiana*). Econ. Bot. 39, 113-129.

Nakamura, J., Wang, T., Tsai, L., Schwartz, A., 1983. Properties and characterization of a highly purified sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase from dog cardiac and rabbit skeletal muscle. The Journal of Biological Chemistry, 258, n8, 5079-5083.

Pollard, T.D., 1982. Structure and polymerization of *Acanthamoeba* myosin-II filaments. J. Cell Biol. 95, 816-825.

Pollard, T.D., Korn, E.D., 1973. *Acanthamoeba* Myosin. I. Isolation from *Acanthamoeba castellanii* of an enzyme similar to muscle myosin. J. Biol. Chem. 248, 4682-4690.

Sæmark, T. & Vilhardt, H., 1979. Isolation and partial characterization of magnesium ion- and calcium ion-dependent adenosine triphosphatase activity from bovine brain microsomal fraction. Biochemical Journal, 181, 321-330.

Shivanna, B. D. & Rowe, E. S., 1997. Preservation of the native structure and function of Ca^{2+} -ATPase from sarcoplasmic reticulum: solubilization and reconstitution by new short-chain phospholipid detergent 1,2-diheptanoyl-*sn*-phosphatidylcholine. Biochem. J., 325, 533-542.

Southgate, B.J., 1979. Biology of the Bruchidae. Ann. Rev. Entomol. 24, 449- 473.

Studier, F.W., 1973. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slabgels. J. Mol. Biol. 79, 237-248.

Warrick, H.M., A. Spudich. 1987. Myosin structure and function in cell motility. Annu.Rev. Cell Biol. 3: 379-421.

CAPÍTULO 2

**Efeito de tapsigargina na atividade Ca^{2+} -ATPásica de larva de
Pachymerus nucleorum (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)**

1. RESUMO

Ca^{2+} -ATPases são ATPases envolvidas no transporte de cálcio através de membranas. As Ca^{2+} -ATPases de retículo sarcoplasmático e endoplasmático são irreversivelmente inibidas por concentrações micromolares de tapsigargina. O objetivo deste trabalho foi testar o efeito de tapsigargina na atividade Ca^{2+} -ATPásica isolada a partir de larva de *Pachymerus nucleorum*, um besouro pertencente à subfamília Bruchinae. As larvas de *P. Nucleorum* foram homogeneizadas, e a fração precipitada (fração P3) não solubilizada com Triton X-100 e pirofosfato, foi utilizada para os testes de inibição por tapsigargina. Tapsigargina 140 μM inibiu cerca de 80% e 95% da atividade Ca^{2+} -ATPásica da fração P3, quando adicionada no início ou 5 minutos antes de iniciar reação, respectivamente. Pré-incubação com ATP ou cálcio preveniu parcialmente a inibição da atividade Ca^{2+} -ATPásica por tapsigargina, assim como pré-incubação na presença de ATP e cálcio. Os resultados mostrados neste trabalho sugerem que a ATPase isolada de larva de *P. Nucleorum* trata-se de uma Ca^{2+} -ATPase.

Palavras-chave: *Pachymerus nucleorum*, Ca^{2+} -ATPase, tapsigargina.

2. ABSTRACT

Ca^{2+} -ATPases are ATPases involved in transport of calcium across membranes. Sarcoplasmic and endoplasmic Ca^{2+} -ATPases are irreversibly inhibited by thapsigargin in micromolar concentrations. The objective of this work was to test the effect of thapsigargin on Ca^{2+} -ATPase activity isolated from *Pachymerus nucleorum* larvae, a beetle especie that belongs to Bruchinae coleoptera subfamily. The *P. nucleorum* larvae were homogeneized and the precipitated fraction (P3 fraction) not solubilized with Triton X-100 was used to thapsigargin inhibition tests. Thapsigargin 140 μM inhibit about 80% and 90% of Ca^{2+} -ATPase activity of P3, when added in the begin or 5 minutes before the start reaction, respectively. Pre-incubation with ATP or calcium partially prevented the inhibition of Ca^{2+} -ATPase activity. The inhibition was completely prevented with pre-incubation with both ATP e calcium. The results showed in this work suggest that the ATPase isolated from *P. Nucleorum* larvae treats of a Ca^{2+} -ATPase.

Keywords: *Pachymerus nucleorum*, Ca^{2+} -ATPase, thapsigargin.

3. INTRODUÇÃO

As ATPases são enzimas que utilizam energia liberada da hidrólise do fosfato γ do ATP para realizar suas funções. As Ca^{2+} -ATPases são ATPases envolvidas no transporte de cálcio através de membranas e são constituídas por 10 domínios transmembrana organizados na estrutura da bicamada lipídica (Carafoli, 2005). Fertilização, transporte de vesículas e regulação da expressão gênica são processos celulares regulados pelo aumento transiente dos níveis de cálcio plasmáticos (de Meis, 1991). As Ca^{2+} -ATPases possuem uma longa cauda C-terminal onde se localiza o domínio ligante de calmodulina, constituindo um exemplo de autorregulação da sinalização por cálcio. O sistema é ativado pela interação com Ca^{2+} -calmodulina para expulsar para fora da célula o excesso de cálcio presente no interior celular (Carafoli, 2002). Ca^{2+} -ATPases são encontradas também em organelas, fazendo parte da membrana de retículo sarcoplasmático e endoplasmático, sendo que nesses casos, sua função é bombear o cálcio de volta para seus reservatórios, mantendo assim os níveis homeostáticos de cálcio no citoplasma (Carafoli, 2005).

As Ca^{2+} -ATPases utilizam como substrato o ATP e são estimuladas pelo aumento da concentração do cálcio no citoplasma (Carafoli, 1991). As Ca^{2+} -ATPases são fortemente inibidas estequiometricamente e irreversivelmente por tapsigargina, um sesquiterpeno natural promotor de tumores pertencente à família das lactonas (Ley et al., 2004). Suas ações incluem perda de transporte de cálcio e de atividade ATPásica dependente de cálcio, bem como impedimento da formação do complexo enzima-ATP quando na ausência do cátion (Thastrup et al., 1990; Kijima et al., 1991). Estudos comprovaram que a inibição por tapsigargina ocorre em uma etapa do ciclo ATPásico da enzima no qual ela está livre de cálcio, e pré-incubações com o íon previne a inibição (Sagara et al., 1992; Wells & Arbercrombie, 1998). A interação enzima-inibidor é muito forte mesmo em baixas concentrações deste último e extremamente rápida e, ao contrário de outros estudos que defendem que a inibição ocorre no estado enzimático livre de cálcio, o estado fosforilado da ATPase também foi inibido por esse efetor (Lytton et al., 1991).

Recentes pesquisas neste laboratório obtiveram uma fração de larva de *Pachymerus nucleorum* rica em atividade Ca^{2+} -ATPásica, cujo perfil eletroforético

apresenta polipeptídeos com mobilidades relativas similares à Ca^{2+} -ATPases de retículo e membrana plasmática. O objetivo deste trabalho foi testar o efeito de tapsigargina sobre a atividade Ca^{2+} -ATPásica isolada de larva de *Pachymerus nucleorum*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Os reagentes imidazol, EDTA, EGTA, β -mercaptoetanol, ATP, inibidores de proteases, reagentes para eletroforese, sacarose, pirofosfato tetrasódico, Triton X-100, KCl, e tapsigargina foram obtidos de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2. Obtenção da fração rica em atividade Ca^{2+} -ATPásica

As larvas foram retiradas dos frutos de babaçu, lavadas com água Milli-Q e dissecadas para a retirada do aparelho digestivo. O corpo gorduroso foi homogeneizado em tampão de extração (imidazol 50 mM pH7,5, sacarose 250 mM, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM, β -mercaptoetanol 2 mM, aprotinina 2 $\mu\text{g/mL}$ e benzamidina 1 mM) na proporção de 0,1 g de tecido por mL de tampão em triturador elétrico ESGE[®]. O homogeneizado foi filtrado em gaze esterilizada e centrifugado a 15.000 $\times$ g durante 30 minutos a 4°C. O precipitado (P1) foi homogeneizado em tampão 1 (Imidazol 20 mM, pH 7,5, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 2 mM, benzamidina 0,1 mM) contendo Triton X-100 0,2%, deixado em temperatura ambiente por 20 minutos e centrifugado a 15.000 $\times$ g durante 30 minutos a 4°C. A fração precipitada (P2) foi ressuspensa em tampão 1, contendo pirofosfato de sódio 50 mM, incubado em temperatura ambiente (25°C) por 20 minutos e centrifugado a 40.000 $\times$ g a 4°C durante 40 minutos. O precipitado (P3) foi utilizado para ensaios de inibição por tapsigargina. Uma fração solúvel obtida por tratamento de P3 com NaCl (ver capítulo 1) também foi submetida a inibição por tapsigargina.

4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

O perfil de polipeptídeos das frações foi analisado em SDS-PAGE usando o sistema descontínuo de Laemmli (1970) e o sistema de placas empregado por Studier (1973). Os mini-géis foram preparados em gradiente de concentração de 5 a 22% ou concentração fixa de 7% de acrilamida. Os géis foram montados entre placas de vidro e alumina de 10 x 7,5 x 0,06 cm.

A separação eletroforética dos polipeptídeos foi conduzida em tampão Tris 25 mM pH 8,5, EDTA 2 mM, glicina 0,2 M, SDS 2,5 mM, sob corrente constante de 30 mA. Os géis foram corados com coomassie brilliant blue R250 0,125% em metanol 50% e ácido acético 10% e descorados em solução de metanol 10% e ácido acético 12,5%.

As amostras foram preparadas adicionando 90 µL da fração em 10 µL de solução contendo Tris-HCl 187 mM, pH 6,8, SDS 6%, EDTA 6 mM, glicerol 27,6%, bromofenol 3 mM e β-mercaptoetanol 28,8 mM. Em seguida, foram submetidas a fervura a 100°C por cinco minutos e aplicadas em gel.

O cálculo do peso molecular aproximado dos polipeptídeos em gel foi realizado segundo o método de Lambin et al. (1976).

4.4. Dosagem de proteínas

A concentração protéica das amostras foi determinada segundo o método quantitativo de Bradford (1976). Uma curva padrão de dosagem de soroalbumina bovina (BSA) foi preparada para cada análise.

4.5. Dosagem da atividade de hidrólise de ATP

A dosagem colorimétrica do ortofosfato inorgânico liberado durante a reação de hidrólise do substrato foi realizada segundo o método de Heinonen & Lahti (1981), o qual utiliza solução de dosagem de fosfato inorgânico composta por acetona P.A., ácido sulfúrico 5N e molibdato de amônio 10 mM, na proporção de 2:1:1. Para a dosagem de atividade Ca^{2+} -ATPásica, utilizou-se o meio de reação imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM e KCl 60 mM.

Volumes pré-determinados de amostras das frações protéicas foram adicionados aos meios de incubação e o volume final de 200 µL foi completado com adição de água Milli-Q. A reação foi iniciada com adição do substrato (concentração final de 1 mM), seguida de incubação a 37°C durante 15 minutos. Após este tempo,

a reação foi interrompida com a adição de 2 mL de solução de dosagem de fosfato inorgânico.

5. RESULTADOS

A fração P3 e S4 apresentaram atividade Ca^{2+} -ATPásica e possuem polipeptídeos com mobilidades relativas similares à Ca^{2+} -ATPases de retículo endoplasmático e sarcoplasmático (Figura 1).

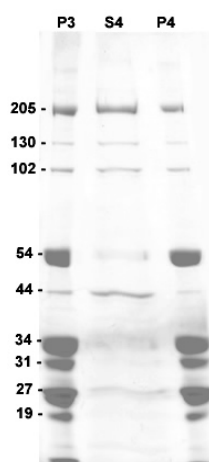


Figura 1: SDS-PAGE de solubilização de P3 com NaCl. Foram aplicados 6 μL de P3 e P4, e 20 μL de S4 em gel gradiente de poliacrilamida de 5 a 22%, que foi corado com Coomassie Brilliant Blue-R 250. Os valores à esquerda representam os pesos moleculares dos principais polipeptídeos da fração P3.

Tapsigargina, um inibidor específico dessas Ca^{2+} -ATPases, inibiu a atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3 e S4 em cerca de 80% (Figura 2).

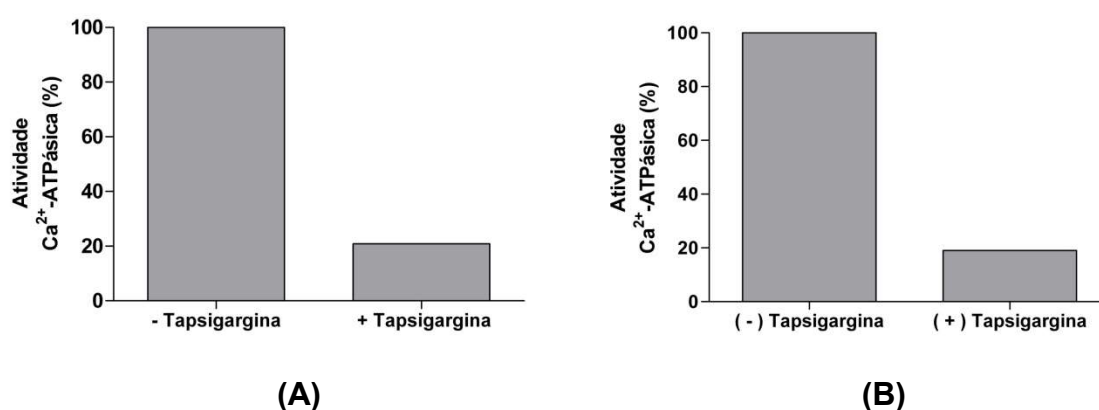


Figura 2: Efeito de tapsigargina na atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3 e S4. 50 μL da fração P3 (A) e 100 μL de S4 (B) foram adicionados ao meio de reação Imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM, CaCl_2 4 mM. A reação foi iniciada com adição de ATP 1 mM na ausência ou presença de tapsigargina 140 μM , conforme indicado, seguido de incubação a 37°C durante 15 minutos e interrompida com adição de solução de dosagem de fosfato inorgânico.

A inibição da atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3 por tapsigargina foi menor quando não houve pré-incubação com o inibidor (Figura 3). No ensaio pré-incubando a fração com tapsigargina por cinco minutos, a inibição foi mais acentuada. Pré-incubação com tapsigargina 50 e 140 μM inibiram respectivamente cerca de 45 e 95% da atividade Ca^{2+} -ATPásica total de P3.

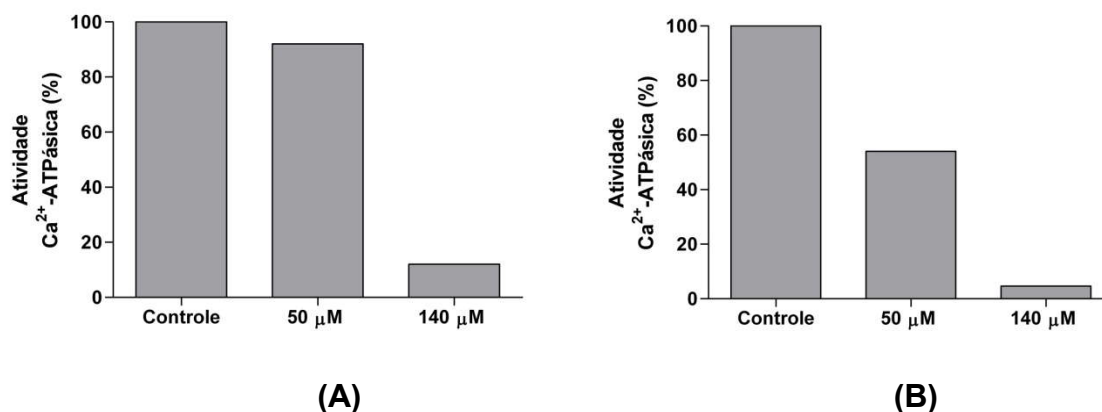


Figura 3: Efeito da pré-incubação com tapsigargina na atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3. 100 μL da fração P3 foram adicionados ao meio de reação imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM e KCl 60 mM e incubados na ausência ou presença de tapsigargina conforme indicado. (A) Tapsigargina adicionada imediatamente após o início da reação. (B) Tapsigargina adicionada 5 minutos antes do início da reação. Iniciou-se a reação com a adição de ATP 1 mM e CaCl_2 4 mM, seguido de incubação a 37°C durante 15 minutos e interrompida com adição de solução de dosagem de fosfato inorgânico.

Estudos demonstraram que a inibição de Ca^{2+} -ATPases por tapsigargina pode ser prevenida por pré-incubação com cálcio. A inibição da atividade Ca^{2+} -ATPásica por tapsigargina foi parcial com pré-incubação com ATP 1 mM ou CaCl_2 4 mM (40% e 32%, respectivamente) (Figura 4).

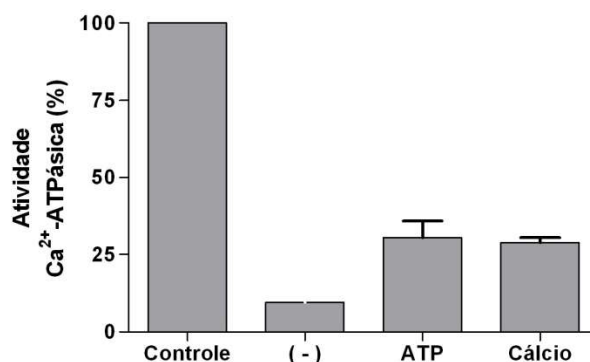


Figura 4: Efeito da pré-incubação com ATP ou CaCl₂ na inibição da atividade Ca²⁺-ATPásica de P3 por tapsigargina. 100 µL da fração P3 foram adicionados ao meio de reação (Imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM e KCl 60 mM), e pré-incubado a 37°C por 5 minutos, na ausência (-) ou presença de ATP ou cálcio, conforme indicado. A reação foi iniciada com ATP e, imediatamente adicionou-se tapsigargina. O tempo de incubação foi de 15 minutos e a reação foi interrompida com adição de solução de dosagem de fosfato inorgânico. No controle não foi adicionado tapsigargina.

Pré-incubação com ATP e cálcio preveniu parcialmente a inibição da atividade Ca²⁺-ATPásica de P3 por tapsigargina (Figura 5). Após 5 minutos pré-incubando com ATP em presença de cálcio, a adição de tapsigargina 140 µM não foi capaz de reduzir a atividade Ca²⁺-ATPásica.

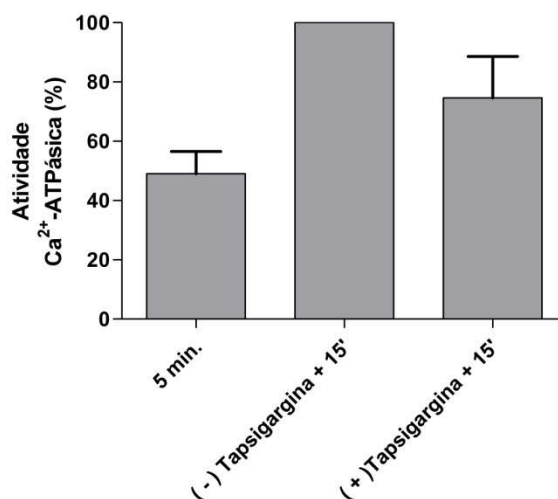


Figura 5: Efeito de pré-incubação com ATP e CaCl₂ na inibição da atividade Ca²⁺-ATPásica de P3 por tapsigargina. 100 µL da fração P3 foram pré incubados com ATP 1 mM e CaCl₂ 4 mM em meio de reação Imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM e KCl 60 mM por 5 minutos a 37°C. Em seguida, foi adicionado ou não tapsigargina 140 µM, conforme indicado, incubado por mais 15 minutos e a reação interrompida com adição de solução de dosagem de fosfato inorgânico.

6. DISCUSSÃO

Tapsigargina é um inibidor estequiométrico e irreversível de Ca^{2+} -ATPases de retículo endoplasmático e sarcoplasmático (Lytton et al., 1991), e sua ação causa perda de transporte de cálcio e de atividade ATPásica dependente de cálcio (Thastrup et al., 1990; Kijima et al., 1991), além de impedir a formação do complexo enzima-ATP no estado de baixa afinidade por cálcio, (Sagara et al., 1992). As respostas inibitórias são extremamente rápidas mesmo em baixas concentrações do inibidor, além de não serem revertidas com aumento da concentração de ATP (Lytton et al., 1991). Tapsigargina 140 μM inibiu sensivelmente a atividade Ca^{2+} -ATPásica tanto da fração P3 quanto de S4 de larva de *P. Nucleorum* (Figura 2). No ensaio de pré-incubação com tapsigargina 140 μM , a inibição da atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3 foi cerca de 95% (Figura 3), valor maior que o observado no ensaio sem pré-incubação com inibidor, que foi de cerca de 80%. Esse resultado indica que a inibição é mais acentuada quando é dado um tempo de interação entre enzima e inibidor antes do início da reação de hidrólise do ATP.

Estudos evidenciaram que pré-incubações de Ca^{2+} -ATPases com cálcio pode impedir que a tapsigargina se ligue à enzima e inative-a (Kijima et al., 1991; Sagara et al., 1992). Neste trabalho este fato também foi observado, visto que a atividade Ca^{2+} -ATPásica da fração P3 pré-incubada com cálcio seguida de adição de tapsigargina foi de 32% do controle (sem inibidor) (Figura 4). Pré-incubação com ATP também evitou que a inibição da atividade Ca^{2+} -ATPásica por tapsigargina fosse maior, restando 40% do total. Estes resultados mostram que tanto o cálcio quanto o ATP proporcionam efeito protetor na enzima contra a inibição por tapsigargina. Uma vez obtidos esses resultados, era esperado que pré-incubação com ATP e cálcio também prevenisse a inibição por tapsigargina. Após cinco minutos de reação da enzima em presença de ATP e cálcio, a adição de tapsigargina resultou em interrupção parcial da atividade hidrolítica de ATP, a qual correspondeu à cerca de metade da apresentada no controle (sem tapsigargina), cujo tempo foi também de 15 minutos (Figura 5). Observa-se nessa fração que a atividade ATPásica específica diminui com o tempo de incubação, assim como observado por Dias & Coelho (2006). Após 5 minutos de pré-incubação com ATP e

cálcio, a atividade Ca^{2+} -ATPásica foi de 47 nmols Pi/mL/min. Já após 20 minutos de incubação, a atividade Ca^{2+} -ATPásica foi de apenas 55 nmols Pi/mL/min.

Este trabalho forneceu evidências de que a atividade Ca^{2+} -ATPásica isolada de larva de *Pachymerus nucleorum* pode ser proveniente de uma Ca^{2+} -ATPase de retículo, uma vez que é sensível a tapsigargina (Sæmark & Vilhardt, 1979). Diferentemente de Ca^{2+} -ATPase de retículo, a ATPase da fração obtida de larva de *P. Nucleorum* é sensivelmente inibida por magnésio (Hakim et al., 1982; Peinelt & Apell, 2002). Cobre e zinco também inibem fortemente a atividade Ca^{2+} -ATPásica desta fração.

Embora algum fator endógeno possa ser o responsável pela inibição por magnésio, vale ressaltar que essa inibição manteve-se também na fração S4, na qual alguns polipeptídeos foram eliminados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Carafoli, E., 1991. Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol. Rev.* 71, 129-151.
- Carafoli, E., 2002. Calcium signaling: A tale for all seasons. *PNAS*, 99, 1115-1122.
- de Meis, L., 1991. Fast efflux of Ca^{2+} mediated by the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *The Journal of Biological Chemistry*, 265, 5736-5742.
- Carafoli, E., 2005. Calcium – a universal Carrier of biological signals. *FEBS Journal*, 272, 1073-1089.
- Dias, D. S. & Coelho, M. V. Efeito do pH e da Temperatura em Atividade Ca^{2+} -ATPásica de *Pachymerus nucleorum* (Fabricius) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). (Submetido para publicação).
- Hakim, G., et al, 1982. Purification of the Ca^{2+} - and Mg^{2+} - requiring ATPase from rat brain synaptic plasma membrane. *Biochemistry Journal*, 207, 225-231.
- Heinonen, J.K., Lahti, R.J., 1981. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal. Biochem.* 113, 313-317.
- Kijima, Y., Ogunbunmi, E., Fleischer, S., 1991. Drug action of thapsigargin on the Ca^{2+} pump protein of sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, n34, 22912-22918.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lambin, P., Rocher, D., Fine, J.M., 1976. A new method for determination of molecular weights of proteins by electrophoresis across a sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gradient gel. *Anal. Biochem.* 74, 567-575.

Ley, S. V., Antonello, A., Balskus, E. P., Booth, D. T., Christensen, S. B., Cleator, E., Gold, H., 2004. Synthesis of the thapsigargin. PNAS, 101, n 33, 12073-12078.

Lytton, J., Westlin, M., Hanley, R., 1991. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. The Journal of Biological Chemistry, 266, n 26, 17067-17071.

Peinelt, C. & Apell, H.J., 2002. Kinetics of the Ca^{2+} , H^{+} , and Mg^{2+} interaction with the ion-binding sites of the SR Ca-ATPase. Biophysical Journal, 82, 170-181.

Sæmark, T. & Vilhardt, H., 1979. Isolation and partial characterization of magnesium ion- and calcium ion-dependent adenosine triphosphatase activity from bovine brain microsomal fraction. Biochemistry Journal, 181, 321-330.

Sagara, Y., Wade, J. B., Inesi, G., 1992. A conformational mechanism for formation of a dead-end complex by the sarcoplasmic reticulum ATPase with thapsigargin. The Journal of Biological Chemistry, 267, n2, 1286-1292.

Thastrup, O., Cullen, P. J., Drøbak, B. K., Hanley, M. R. Dawson, A. P., 1990. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. Biochemistry, 87, 2466-2470.

Wells, K. M. & Abercrombie, R. F., 1998. Luminal Ca^{2+} protects against thapsigargin inhibition in neuronal endoplasmic reticulum. The Journal of Biological Chemistry, 273, n9, 5020-5025.