

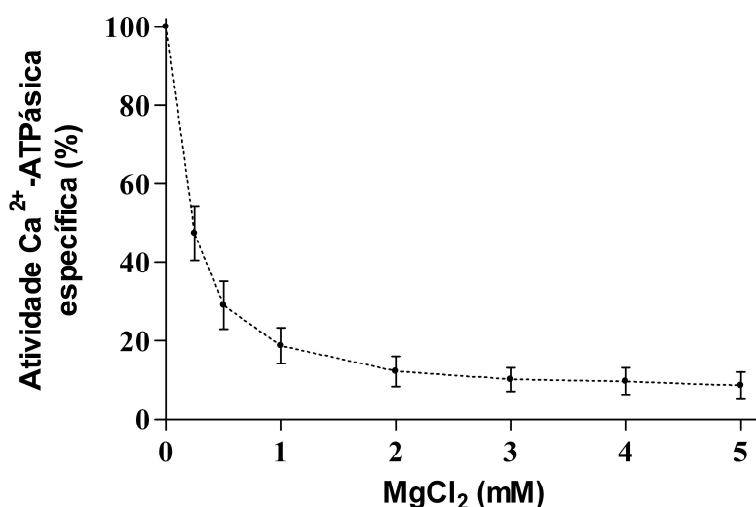


Figura 6: Efeito do íon magnésio na atividade Ca^{2+} -ATPásica da fração ATPase. Aproximadamente 170 μg de proteínas da fração P3 foram adicionados ao meio de reação imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM, KCl 60 mM, contendo CaCl_2 1 mM e MgCl_2 nas concentrações indicadas. Iniciou-se a reação com a adição de ATP 1 mM, seguindo a incubação a 37 °C durante 15 minutos e então foi parada pela adição da solução de dosagem de fosfato inorgânico. As barras verticais indicam o erro padrão (SEM) para 3 experimentos.

Em meio de reação contendo ATP 1 mM, a atividade Ca^{2+} -ATPásica aumenta conforme o aumento da concentração de cálcio, alcançando 50% da atividade máxima com apenas 0,5 mM de cloreto de cálcio. Em presença de 1 mM de Ca^{2+} (equivalente à concentração de ATP), a atividade correspondeu a 70% da máxima, atingindo um platô com 2 mM (Fig. 7). O pico de atividade ATPásica, na presença de 1 mM de cálcio, ocorreu com uma concentração de 2 mM de ATP, mostrando uma produção média de 65,5 nmols $\text{Pi}/\text{mg}/\text{min}$. Aproximadamente 50% da atividade máxima foi observada com ATP 0,7 mM. Por outro lado, em concentração fixa de cálcio (1 mM), concentrações maiores do que 2 mM de ATP causam uma leve inibição da atividade ATPásica (Fig. 8). Verifica-se que uma alta atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3 é obtida com 2 mM, tanto de Ca^{2+} quanto de ATP (Fig. 7 e 8).

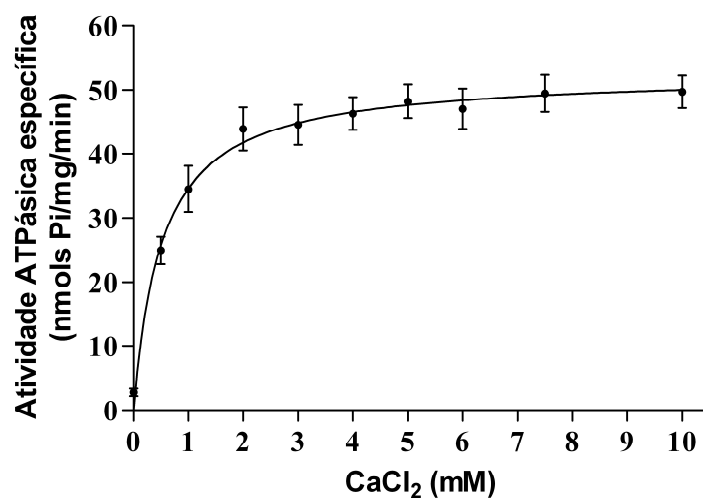


Figura 7: Efeito do íon cálcio na atividade ATPásica da fração P3. Aproximadamente 170 µg de proteínas da fração P3 foram adicionados ao meio de reação imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM, KCl 60 mM, contendo CaCl₂ nas concentrações indicadas. Iniciou-se a reação com a adição de ATP 1 mM, seguindo a incubação a 37 °C durante 15 minutos e então foi parada pela adição da solução de dosagem de fosfato inorgânico. As barras verticais indicam o erro padrão (SEM) para 3 experimentos.

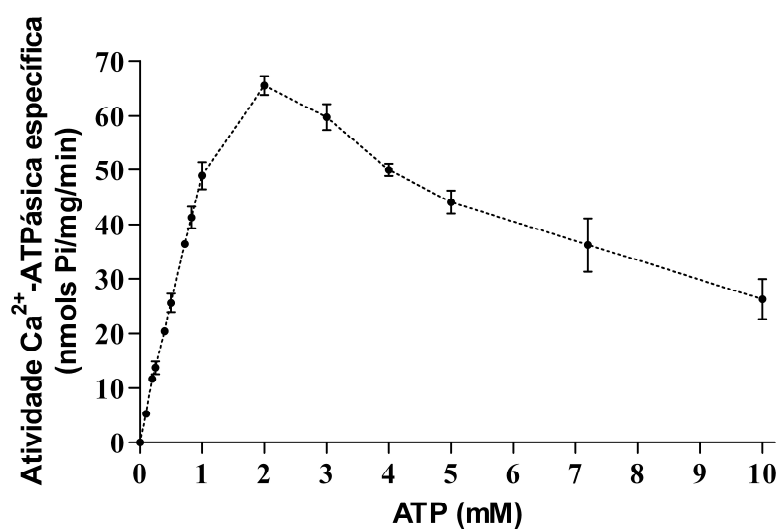


Figura 8: Efeito de ATP na atividade Ca²⁺-ATPásica da fração P3. Aproximadamente 170 µg de proteínas da fração P3 foram adicionados ao meio de reação imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM, KCl 60 mM, contendo CaCl₂ 1 mM. Iniciou-se a reação com a adição de ATP nas concentrações indicadas, seguindo a incubação a 37 °C durante 15 minutos e então foi parada pela adição da solução de dosagem de fosfato inorgânico. As barras verticais indicam o erro padrão (SEM) para 3 experimentos.

Além do ATP, algumas ATPases também hidrolisam outros substratos. Assim, testamos a capacidade de hidrólise de outros nucleotídeos e também de pirofosfato pela fração ATPase e constatamos que ADP, AMP, AMP-PNP ou PPi praticamente não foram hidrolisados e a atividade Ca^{2+} -GTPásica correspondeu a apenas 20% da Ca^{2+} -ATPásica (Fig. 9).

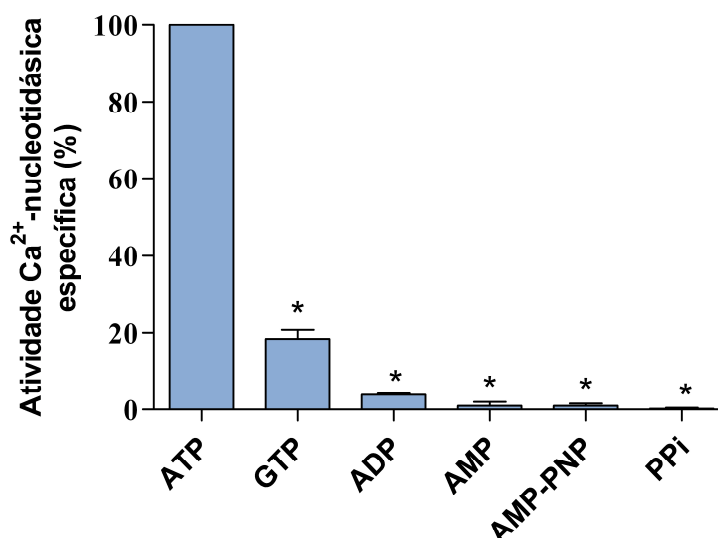


Figura 9: Especificidade por substrato da fração P3. Aproximadamente 170 μg de proteínas da fração P3 foram adicionados ao meio de reação imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM, contendo CaCl_2 4 mM. Iniciou-se a reação com a adição do respectivo substrato, a 1 mM, seguindo a incubação a 37 °C durante 15 minutos e então foi parada pela adição da solução de dosagem de fosfato inorgânico. As barras acima das colunas indicam o erro padrão (SEM) para 3 experimentos.

* Difere significativamente do controle pelo teste t ($P < 0,05$).

A fração ATPase foi incubada com alguns efetores que interferem na atividade de ATPases conhecidas. O vanadato age como um análogo do fosfato γ do ATP, inibindo a atividade de ATPases do tipo P, sendo algumas muito sensíveis inibidas por concentrações baixas de vanadato. A fração ATPase não foi inibida significativamente por vanadato 50 ou 200 μM , segundo o teste “t”, com $P < 0,05$. Porém 1 mM deste composto promoveu queda de 60% da atividade Ca^{2+} -ATPásica. Azida sódica é conhecida por inibir F_1 -ATPase em baixas concentrações (menores que 1 mM) e algumas E-NTPases em concentrações mais altas (10 mM). Diferentemente destas, a presente fração ATPase não foi inibida por azida 1 ou 10 mM. O detergente não-iônico Triton X-100 não promoveu

modificação significativa na atividade Ca^{2+} -ATPásica, tanto a 0,2% quanto a 0,8%. Várias enzimas que catalisam a hidrólise de nucleotídeos são inibidas por fluoreto de alumínio, formado por um excesso de fluoreto de sódio e cloreto de alumínio na reação. Observamos que a presente fração ATPase sofreu inibição próxima de 24% por fluoreto de alumínio, contudo não significativa, segundo o teste “t”. O AlCl_3 ou NaF causaram uma menor inibição, próxima de 11% e 7%, respectivamente (Tab. 1).

Tabela 1: Efeito de efetores na atividade Ca^{2+} -ATPásica da fração ATPase de larva de *Pachymerus nucleorum*.

Compostos	Atividade específica	Porcentagem da atividade	Porcentagem de inibição
Controle	52,55 ± 2,71	100,00	–
Na_3VO_4 50 μM	51,96 ± 4,32	98,88	1,12
Na_3VO_4 200 μM	36,84 ± 8,93	70,10	29,90
Na_3VO_4 1 mM	20,98 ± 7,32	39,92	60,08 †
Azida 1 mM	52,96 ± 4,51	100,78	-0,78
Azida 10 mM	52,62 ± 3,15	100,13	-0,13
Triton X-100 0,2%	52,57 ± 3,25	100,04	-0,04
Triton X-100 0,8%	50,83 ± 2,47	96,73	3,27
AlCl_3 0,5 mM	46,92 ± 6,32	89,29	10,71
NaF 2,5 mM	49,06 ± 6,66	93,36	6,64
AlCl_3 + NaF	39,82 ± 15,60	75,78	24,22

Aproximadamente 170 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, contendo 4 mM de CaCl_2 . A atividade ATPásica específica está expressa em nmols de Pi liberados por mg de proteína por minuto. Valores médios ± erro padrão (SEM) para 3 experimentos.

† Difere significativamente do controle pelo teste t ($P < 0,05$).

A atividade Ca^{2+} -ATPásica da fração ATPase é estável a 4 °C por pelo menos 12 dias (Tab. 2). Contudo, o seu congelamento a -20 °C promoveu a perda desta atividade em 53% e em mais de 70%, com 1 dia e 3 dias de estocagem, respectivamente. A fração ATPase é termo-lábil, sendo que quando submetida a banho em ebulição (98 °C) por 10 minutos, sua atividade é totalmente perdida.

Tabela 2: Estabilidade da atividade Ca^{2+} -ATPásica da fração ATPase de larva de *Pachymerus nucleorum*.

	Atividade específica	Porcentagem da atividade
Controle	55,00 $\pm$ 2,68	100,00
4 °C por 6 dias	55,04 $\pm$ 2,84	100,07
4 °C por 12 dias	52,16 $\pm$ 6,34	94,84
-20 °C por 1 dia	25,51 $\pm$ 3,03	46,38 †
-20 °C por 3 dias	14,53 $\pm$ 1,74	26,42 †
98 °C por 10 min.	0,00 $\pm$ 0,00	0,00

Aproximadamente 170 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, contendo 4 mM de CaCl_2 . A atividade ATPásica específica está expressa em nmols de Pi liberados por mg de proteína por minuto. Valores médios $\pm$ erro padrão (SEM) para 3 experimentos.

† Difere significativamente do controle pelo teste t ($P < 0,05$).

A fração P3 apresenta polipeptídeos de alto peso molecular, com mobilidade relativa similar a cadeias pesadas de miosinas II e V. A atividade ATPásica de miosinas é sensível ao congelamento e algumas apresentam alta atividade Ca^{2+} -ATPásica, o que condiz com os presentes resultados. Elas também têm a característica própria de apresentarem uma atividade ATPásica alta na ausência de cátions bivalentes e presença de alta força iônica, atividade K^+ /EDTA-ATPásica. A fração P3 apresentou atividade K^+ /EDTA-ATPásica significativa, cerca de 10 vezes maior que o controle (KCl 60 mM) e que correspondeu a 51% da sua atividade Ca^{2+} -ATPásica (Fig. 10). Em função destes resultados, testamos a marcação da fração P3 com anticorpos específicos para cadeias pesadas de miosinas II e V. Contudo a fração P3 não apresentou imunoreatividade por estes anticorpos, ocorrendo marcação somente na fração controle positivo (fração de actomiosina de cérebro de porco) (Fig. 11).

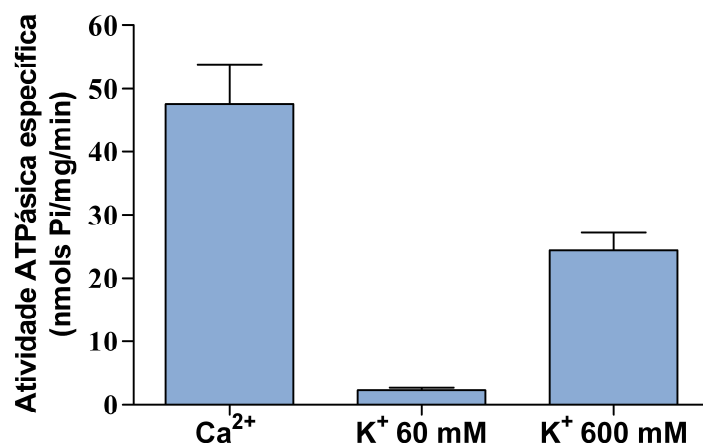


Figura 10: Comparação entre as atividades Ca²⁺-ATPásica e K⁺/EDTA-ATPásica da fração ATPase. Aproximadamente 170 µg de proteínas da fração P3 foram adicionados ao meio de reação imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM, contendo CaCl₂ 4 mM, para a dosagem da atividade Ca²⁺-ATPásica, e EDTA 2 mM e KCl 60 mM ou 600 mM, como indicado, para a dosagem da atividade K⁺/EDTA-ATPásica. Iniciou-se a reação com a adição de ATP 1 mM, seguindo a incubação a 37 °C durante 15 minutos e então foi parada pela adição da solução de dosagem de fosfato inorgânico. As barras verticais indicam o erro padrão (SEM) para 3 experimentos.

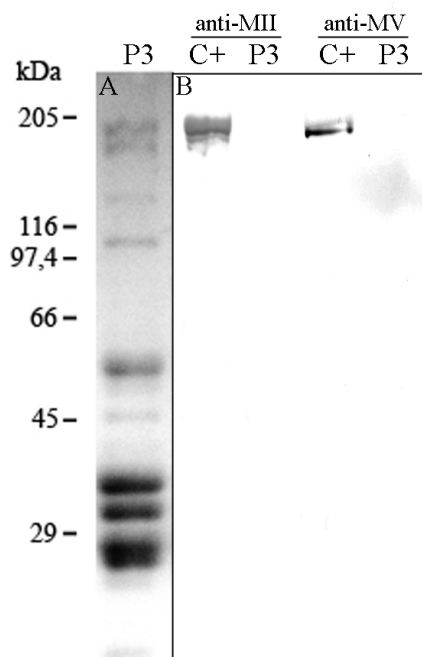


Figura 11: Imunoblotting usando anticorpos específicos contra miosinas II e V na fração P3. A fração P3 foi analisada em SDS-PAGE e Imunoblotting. **(A)** SDS-PAGE. Foram aplicados 5 µg de proteínas da fração P3 em gel gradiente de 5 a 22%. **(B)** Imunoblotting. Foram aplicados 15 µg de proteínas da fração P3 em gel a 7%, transferidas para membrana de nitrocelulose, sondadas contra anticorpos anti-miosina II (anti-MII) ou anti-miosina V (anti-MV). **C+**, controle positivo: fração de actomiosina de cérebro de porco.

6. DISCUSSÃO

Uma análise de proteína total foi feita a partir do material homogeneizado de larvas sem o aparelho digestivo, e verificamos que apresentam aproximadamente 7% de sua massa composta por proteínas, segundo o método de dosagem de proteínas de Bradford (1976) (dado não mostrado). Após a primeira centrifugação, grande parte das proteínas, aproximadamente 70%, fica na fração precipitada (P1), contendo ~5 mg/mL. A análise em gel mostrou polipeptídeos de diversas mobilidades relativas (Fig. 1). O polipeptídeo de mais alta massa que aparece no homogeneizado de larvas tem aproximadamente 200 kDa. Um outro com uma mobilidade relativa maior que 205 kDa, é concentrado, após a centrifugação do homogeneizado, na fração solúvel (S1). Os polipeptídeos de cerca de 84 e 74 kDa apresentam-se praticamente totalmente solúveis. Os outros que apareceram mais fortemente corados no homogeneizado ficaram na fração precipitada, P1. Esta fração apresentou atividades Mg^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ATPásica específicas mais altas que as frações homogeneizado e S1 (Fig. 2). A partir desta fração obtivemos as frações S2 e P2 pela sua incubação com o detergente Triton X-100, o qual promoveu solubilização dos polipeptídeos menos

concentrados de P1, sendo a concentração protéica de P2 (~4 mg/mL) 20% menor do que a de P1.

A fração S2, pouco concentrada em proteínas, foi a que mostrou maior atividade ATPásica específica, tanto com Mg^{2+} quanto na presença de cálcio. A fração P2 manteve a atividade Ca^{2+} -ATPásica similar à de P1 e mostrou atividade Mg^{2+} -ATPásica cerca de 70% menor que a Ca^{2+} -ATPásica (Fig. 2). Verificamos que a incubação de P2 com pirofosfato promove a solubilização de alguns polipeptídeos, que ficam divididos entre S3 e P3, como os de 200, 130, 102 e 54 kDa. Aquele de 44 kDa é quase totalmente solubilizado (Fig. 1). A concentração protéica de P3 (~3,2 mg/mL) é também 20% menor do que P2. A sua atividade Ca^{2+} -ATPásica é 65% maior do que a atividade Ca^{2+} -ATPásica de P2 e 84% maior que a do homogeneizado. Por outro lado, a sua atividade Mg^{2+} -ATPásica foi praticamente inexistente. Além disso, P3 tem uma atividade Ca^{2+} -ATPásica total 2,5 vezes maior do que a de S2 (que possui maior atividade ATPásica específica) (dado não mostrado). A falta de atividade ATPásica da fração S3 não foi revertida por diálise, o que sugere que o pirofosfato não é o responsável por essa falta de atividade. Entretanto, analisamos o efeito de pirofosfato na atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3 e verificamos que uma concentração de 0,5 mM promoveu uma inibição de cerca de 22% dessa atividade, chegando a mais de 96% de inibição com 50 mM de PPi. Outros testes sugeriram que essa inibição é do tipo não-competitiva (manuscrito em preparação).

Há indícios de que Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática ou de retículos pode estar presente na fração P3, visto que essa fração apresenta alta atividade Ca^{2+} -ATPásica. Observa-se também que a fração P3 possui polipeptídeos (130 e 102 kDa) com mobilidades relativas similares às aquelas descritas para Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática (~134 kDa) e de retículos endoplasmático e sarcoplasmático (~100 kDa) (Carafoli, 1997; Carafoli, 2003) (Fig. 1). As Ca^{2+} -ATPases necessitam da presença do cálcio, juntamente com o ATP, para a sua atividade enzimática, semelhante à enzima da fração P3 (Fig. 2 e 3). Comparado ao controle (ausência de cátions), a sua atividade Ca^{2+} -ATPásica foi 12 vezes maior (Fig. 3). A Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática bombeia cálcio para fora da célula e é amplamente distribuída entre os eucariotos. É um sistema de baixa capacidade de transporte, mas com uma afinidade alta para o cálcio. A presença

de Mg^{2+} acelera a reação de fosforilação pelo ATP e desfosforilação da enzima, embora ocorra somente na presença de Ca^{2+} (Carafoli, 1991). Essa característica contrasta com a apresentada pela presente fração ATPase, cuja atividade Ca^{2+} -ATPásica é sensivelmente inibida por baixas concentrações de magnésio (Fig. 6). Além do magnésio, a atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3 também é inibida pelos cátions: cobalto, cobre, zinco, bário, manganês e ferro (nos estados ferroso e férrico), a 4 mM no meio de reação (Fig. 5). A presença de magnésio ou outros cátions bivalentes endógenos na fração P3 foi descartada, visto que a baixa atividade ATPásica observada na reação controle (~ 4 nmols Pi/mg/min.) não foi alterada mesmo pela presença tanto de EDTA 5 mM quanto de EGTA 5 mM (Fig. 4).

A Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática contém 2 sítios de ligação para o ATP, o que promove uma ativação bifásica, sendo que o de mais alta afinidade apresenta a constante de Michaelis (K_m) de 1 a 2,5 μM , o segundo tem K_m entre 145 e 180 μM (Carafoli, 1991). Pela análise de parâmetros da fração P3 segundo a cinética de Michaelis-Menten, levando em conta a atividade Ca^{2+} -ATPásica até a concentração de ATP 3 mM, o K_m determinado foi próximo de 1,1 mM e uma $V_{m\acute{a}x}$ próxima de 15 nmols Pi/min. Enquanto que pela cinética de Lineweaver-Burk (gráfico dos duplos inversos), encontramos valores inconsistentes (dados não mostrados). Esta inconsistência talvez seja devido a se tratar de uma fração parcialmente purificada e não a uma enzima pura, uma vez que pode haver compostos competidores por cálcio e/ou ATP no meio em qual se encontra a referida ATPase. O verdadeiro substrato para Ca^{2+} -ATPases é o Ca^{2+} -ATP (Rega & Garrahan, 1975; Lacapare & Guillain, 1990), o que corrobora os presentes resultados. Contudo, a formação desse complexo parece não ocorrer em razão de 1:1 (Fig. 7 e 8), lembrando que outros compostos ligantes de cálcio e/ou ATP, além da ATPase em questão, podem estar presentes na fração. Um outro ponto importante, como verificado na literatura, é que o cálcio age estimulando a atividade não somente pela sua interação com o ATP, formando o substrato da enzima, mas também pela interação com outras proteínas, como por exemplo, a calmodulina.

Em presença de 1 mM de ATP, a fração P3 mostrou uma alta atividade ATPásica específica também com 2 mM de $CaCl_2$, atingindo seu platô (Fig. 7).

Recentes ensaios mostraram que em presença de concentrações maiores de ATP, 2 e 5 mM, o platô de atividade é atingido com concentrações de CaCl_2 próximas de 3 e 5 mM, respectivamente (dados não mostrados).

A purificação de Ca^{2+} -ATPases é feita pela solubilização de membrana usando o detergente Triton X-100, porém ocorre sua inativação (Hidalgo et al., 1978; Carafoli, 1991). Na preparação da presente fração ATPase utilizamos o Triton X-100 a 0,2% em um dos passos de purificação, mas não foi observada a solubilização daqueles polipeptídeos com mobilidades relativas próximas a 102 e 130 kDa (Fig. 1). Além disso, a atividade Ca^{2+} -ATPásica total de P2 é cerca de 40% maior do que a de S2 (dado não mostrado), assim, seguimos a purificação a partir de P2. Não constatamos também interferência deste detergente (0,2 ou 0,8%) na atividade Ca^{2+} -ATPásica da fração P3 (Tab. 1).

Vanadato é um inibidor conhecido de algumas ATPases, dentre estas as do tipo P, como Ca^{2+} -ATPases (Barrabin et al., 1980). Ele causa inibição dessas enzimas por ligação ao resíduo de aspartato, onde há a fosforilação, sendo que a potência desta inibição depende da concentração de ATP e a força iônica do meio. Os cátions Mg^{2+} , K^+ , e Na^+ aumentam a inibição, e em condições fisiológicas, na presença de Mg^{2+} e K^+ , a constante de inibição (K_i) é 2 a 3 μM . O cálcio não causa interferência na inibição por vanadato em baixas concentrações (até 7 μM), mas a diminui em concentrações elevadas (Carafoli, 1991). Os presentes resultados mostram que P3 é pouco sensível ao vanadato, uma vez que sofreu apenas cerca de 30% de inibição por 200 μM de vanadato (Tab. 1). Entretanto, os ensaios com vanadato foram realizados em meio de reação contendo apenas CaCl_2 4 mM e KCl 60 mM, visto que baixas concentrações de magnésio inibem sensivelmente a atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3 (Fig. 6).

O fluoreto de alumínio tem alta afinidade pelos sítios ligantes de nucleotídeos das ATPases, sendo também um análogo do fosfato γ do ATP. Em soluções aquosas de fluoreto de sódio, o alumínio forma complexos iônicos com o flúor, que depende do excesso de íons fluoreto (Chabre, 1990). Em Ca^{2+} -ATPase de retículo sarcoplasmático, o complexo “fluoroaluminato” se estabiliza juntamente com o cálcio e ADP e inibe totalmente sua atividade (Troullier et al., 1992). A presente fração ATPase foi inibida em 24% quando em presença de fluoreto de alumínio, inibição pouco maior do que em presença somente do

fluoreto (NaF) ou do alumínio (AlCl_3), que não promoveram inibição maior que 11% (Tab. 1).

A calmodulina estimula a atividade de Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática, aumentando a sua afinidade a sua taxa de transporte (Carafoli, 1991). Nenhuma estimulação da atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3 foi verificada em presença de calmodulina (dado não mostrado).

Entretanto, há indícios da existência de Ca^{2+} -ATPase na presente fração ATPase, com propriedades distintas daquelas já caracterizadas.

O tratamento com Triton X-100 promove a solubilização de proteínas associadas a membranas, contudo, o citoesqueleto celular e as proteínas associadas não são solubilizados, sendo este um processo usado na purificação destas proteínas (Gibbons & Fronk, 1979; Cheney, 1998). Observamos que após o tratamento com este detergente, a fração P2 apresenta polipeptídeos com mobilidades relativas similares a actina (43 kDa) e tubulina (54 kDa) (Fig. 1), componentes do citoesqueleto. Deste modo, motores moleculares (miosinas, cinesinas e dineínas) ligados ao citoesqueleto também podem permanecer na fração precipitada P2, e em seguida P3.

Miosinas geralmente são compostas por cadeias pesadas variando entre 100 e 200 kDa. Por exemplo, a miosina I é constituída de uma única cadeia pesada entre 110 e 140 kDa, diferindo conforme o tecido (Pollard & Korn, 1973; Conzelman & Mooseker, 1987; Barylko et al., 1992). As miosinas II e V são constituídas por duas cadeias pesadas com mobilidade relativa próxima de 200 kDa (Warrick & Spudich, 1987; Larson et al., 1988). Algumas miosinas apresentam alta atividade Ca^{2+} -ATPásica, mas a atividade Mg^{2+} -ATPásica é expressa somente na presença de actina filamentar (Maruta & Korn, 1977; Conzelman & Mooseker, 1987; Barylko et al., 1992; Espíndola et al., 1992; Cheney et al., 1993). Vanadato também é um inibidor conhecido de motores moleculares, porém as miosinas são menos sensíveis a este reagente. Miosina de músculo tem sua atividade Mg^{2+} -ATPásica inibida em 50% por 0,5 mM (Goodno, 1979). As atividades Mg^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ATPásica de miosina I de intestino sofrem 50% de inibição com vanadato 250 μM (Conzelman & Mooseker, 1987). Miosina II de músculo tem sua atividade Mg^{2+} -ATPásica inibida em 55% pelo

complexo formado entre o ADP e fluoreto de alumínio, em presença de ADP 1 mM, NaF 2,5 mM e AlCl_3 0,5 mM (Maruta et al., 1993).

Similar às cadeias pesadas de miosinas II e V, observamos um polipeptídeo de mobilidade relativa de ~200 kDa presente na fração P3 (Fig. 1). Similarmente a algumas miosinas, a fração P3 também não apresenta atividade Mg^{2+} -ATPásica considerável (Fig. 2). P3 apresentou pouca sensibilidade frente ao vanadato, como miosinas, sendo inibido em apenas 60% com 1 mM desse inibidor (Tab. 1). Diferente de miosina II, a fração P3 foi inibida em apenas 24% pelo complexo de fluoreto de alumínio (Tab. 1).

A fração ATPase pode ser estocada em geladeira (4 °C), uma vez que sua atividade Ca^{2+} -ATPásica se mostrou estável por pelo menos 12 dias. Porém o seu congelamento (a -20 °C) não é recomendado, já que mais da metade da atividade Ca^{2+} -ATPásica é perdida após 24 horas de congelamento. A atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3 é termo-lábil, não resistindo a banho em ebulição (Tab. 2).

Sabe-se que miosinas perdem sua atividade ATPásica quando submetidas a congelamento, o que condiz com os presentes resultados. Também o polipeptídeo com mobilidade relativa próxima a 200 kDa na fração P3 migra em gel similarmente às cadeias pesadas de miosinas II e V. Estas propriedades, juntamente com a presença de atividade Ca^{2+} -ATPásica, baixa atividade Mg^{2+} -ATPásica na ausência de actina filamentar e a baixa sensibilidade ao vanadato, são indícios da presença de miosina(s) na presente fração ATPase. As miosinas também apresentam uma característica particular de exibir, além de atividade Mg^{2+} e Ca^{2+} -ATPásica, uma alta atividade K^+ /EDTA-ATPásica (Pollard, 1982). P3 apresentou atividade K^+ /EDTA-ATPásica significativa, cerca de metade da atividade Ca^{2+} -ATPásica (Fig. 10). Tais resultados nos levaram a testar a imunoreatividade da presente fração ATPase com anticorpos policlonais contra cadeia pesada de miosina II e V de cérebro de rato. Não observamos, contudo, marcação de nenhum polipeptídeo da fração P3 (Fig. 11). Este resultado não exclui a presença dessas miosinas na fração P3, o que é plausível sendo que os anticorpos foram produzidos contra rato, razão talvez atribuída à distância filogenética. Além disso, a presença de outros membros da família das miosinas na presente fração ATPase é possível, uma vez que isoformas de miosinas são

encontradas em diferentes seres vivos expressando características distintas entre membros de uma mesma classe.

Há indícios de que a atividade ATPásica da fração P3 não seja devida a outras ATPases como dineínas, cinesinas, Na^+/K^+ -ATPase, E-NTPases ou F_1 -ATPase. Dineínas e cinesinas são sensíveis a baixas concentrações de vanadato, sendo que dineína citoplasmática tem 50% de sua atividade ATPásica inibida por 10 μM de vanadato (Shpetner et al., 1988) e dineína axonemal é quase totalmente inibida por vanadato de 10 a 100 μM (Gibbons et al., 1978; Yokota & Mabuchi, 1994). A atividade ATPásica de cinesina de cérebro sofre inibição próxima de 30% com vanadato 10 μM (Kuznetsov & Gelfand, 1986). Na^+/K^+ -ATPase, que tem sua atividade inibida pela metade com 4 nM de vanadato, em um sítio de alta afinidade, e 0,5 μM em um sítio de menor afinidade (Cantley et al., 1978). Também, a atividade de dineína axonemal é estimulada de 10 a 15 vezes por Triton X-100 0,1% (Gibbons & Fronk, 1979, Evans & Gibbons, 1986).

Dentre as E-NTPases, as ATP difosfohidrolases (ATPDases, ecto-ATPDases ou apirases) são ATPase de membrana que hidrolisam tanto ATP quanto ADP (Kaczmarek et al., 1996; Komoszynski & Wojtczak, 1996), diferentemente de P3, que não apresentou atividade hidrolítica considerável de nucleotídeos difosfato (ADP) e monofosfato (AMP) ou de pirofosfato. Ecto-ATPase solúvel (Smith et al., 1997) apresenta atividade Ca^{2+} -ATPásica, porém possui atividade Mg^{2+} -ATPásica maior (Shpetner et al., 1988).

A ATPase mitocondrial, F_1 -ATPase é inibida por azida 1 mM (Murataliev et al., 1991). Diferente disto, a presente fração ATPase não tem sua atividade alterada por azida, tanto em presença de 1 ou 10 mM (Tab. 1). Contrastando também com a fração P3, o fluoreto de alumínio causa uma inibição de 69% em F_1 -ATPase com NaF 5 mM e AlCl_3 0,1 mM (Lunardi et al., 1988).

Este trabalho fornece informações para estudos mais aprofundados sobre as implicações bioquímicas inerentes à biologia de *Pachymerus nucleorum*. O processo de purificação utilizado no presente trabalho fornece grande quantidade da fração ATPase, próxima a 100 mL por preparação, com uma alta concentração protéica: ~3,2 mg/mL. Isso permite o emprego de outras técnicas de purificação para a separação da(s) enzima(s) responsável(eis) pela atividade Ca^{2+} -ATPásica da fração ATPase.

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.

Barrabin, H., Garrahan, P.J., Rega, F., 1980. Vanadate inhibition of the Ca^{2+} ATPase from human red cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 600, 796-804.

Barylko, B., Wagner, M.C., Reizes, O., Albanesi, J.P., 1992. Purification and characterization of a mammalian myosin I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 490-494.

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.

Cantley Jr., L.C., Cantley, L.G., Josephson, L., 1978. A characterization of vanadate interactions with the (Na,K)-ATPase. *J. Biol. Chem.* 253, 7361-7368.

Carafoli, E., 1991. Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol. Rev.* 71, 129-151.

Carafoli, E., 1997. Plasma membrane calcium pump: structure, function and relationships. *Basic. Res. Cardiol.* 92 suppl 1, 56-61.

Carafoli, E., 2002. Calcium signaling: A tale for all seasons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 1115-1122.

Carafoli, E., 2003. The calcium-signalling saga: tap water and protein crystals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 326-332.

Carvalho, R.P.L., Rossetto, C.J., 1968. Biologia de *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann) (Coleoptera, Bruchidae). *Rev. Bras. Entomol.* 13, 105–117.

Chabre, M., 1990. Aluminofluoride and beryllifluoride complexes: new phosphate analogs in enzymology. *Trends Biochem. Sci.* 15, 6-10.

Cheney, R.E., 1998. Purification and assay of myosin V. *Method. Enzymol.* 298, 3-18.

Cheney, R.E., O'Shea, M.K., Heuser, J.E., Coelho, M.V., Wolenski, J.S., Espreafico, E.M., Forscher, P., Larson, R.E., Mooseker, M.S., 1993. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell* 75, 13-23.

Clarke, M., Spudick, J.A., 1977. Nonmuscle contractile proteins: the role of Actin and Myosin in cell motility and shape determination. *Ann. Rev. Biochem.* 46, 797-822.

Collins, J.H., Borysenko, C.W., 1984. The 110,000-Dalton actin- and calmodulin-binding protein from intestinal brush border is a myosin like ATPase. *J. Biol. Chem.* 259, 14128-14135.

Conzelman, K.A., Mooseker, M.S., 1987. The 110-kDa protein-calmodulin complex of the intestinal microvillus is an actin-activated MgATPase. *J. Cell Biol.* 105, 313-324.

Endows, A., Titus, M.A., 1992. Genetic approaches to molecular motors. *Ann. Rev. Inc.* 8, 29-65.

Espíndola, F.S., Espreafico, E.M., Coelho, M.V., Martins, A.R., Costa, F.R.C., Mooseker, M.S., Larson, R.E., 1992. Biochemical and immunological characterization of p190-calmodulin complex from vertebrate brain: a novel calmodulin-binding myosin. *J. Cell. Biol.* 118, 359-368.

Evans, J.A., Gibbons, I.R., 1986. Activation of dynein 1 adenosine triphosphatase by organic solvents and by Triton X-100. *J. Biol. Chem.* 261, 14044-14048.

Funk, D.J., Futuyma, D.J., Ortí, G., Meyer, A., 1995. Mitochondrial DNA sequences and multiple data sets: a phylogenetic study of phytophagous beetles (Chrysomelidae: *Ophraella*). *Mol. Biol. Evol.* 12, 627-640.

Gibbons, I.R., Fronk, E., 1979. A latent adenosine triphosphatase form of dynein 1 from sea urchin sperm flagella. *J. Biol. Chem.* 254, 187-196.

Gibbons, I.R., Cosson, M.P., Evans, J.A., Gibbons, B.H., Houck, B., Martinson, K.H., Sale, W.S., Tang, W.J.Y., 1978. Potent inhibition of dynein adenosinetriphosphatase and of the motility of cilia and sperm flagella by vanadate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75, 2220-2224.

Goodno, C.C., 1979. Inhibition of myosin ATPase by vanadate ion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 2620-2624.

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

Hidalgo, C., Thomas, D.D., Ikemoto, N., 1978. Effect of the lipid environment on protein motion and enzymatic activity of the sarcoplasmic reticulum calcium ATPase. J. Biol. Chem. 253, 6879-6887.

Hirokawa, N., 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. Science 279, 519-526.

Jongsma, M.A., Bolter, C., 1997. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. J. Insect Physiol. 43, 885-895.

Kachar, B., Albanesi, J.P., Fujisaki, H., Korn, E.D., 1987. Extensive purification from *Acanthamoeba castellanii* of a microtubule-dependent translocator with microtubule activated Mg^{2+} -ATPase activity. J. Biol. Chem. 262, 16180-16185.

Kaczmarek, E., Koziak, K., Sévigny, J., Siegel, J.B., Anrather, J., Beaudoin, A.R., Bach, F.H., Robson, S.C., 1996. Identification and characterization of CD39/vascular ATP dyphosphohydrolase. J. Biol. Chem. 271, 33116-33122.

Karcher, R.L., Deacon, S.W., Gelfand, V.I., 2002. Motor-cargo interactions: the key to transport specificity. Trends Cell Biol. 12, 21-27.

Kergoat, G.J., Delobel, A., Silvain, J.F., 2004. Phylogeny and host-specificity of European seed beetles (Coleoptera, Bruchidae), new insights from molecular and ecological data. Mol. Phylogenet. Evol. 32, 855-865.

Komoszynski, M., Wojtczak, A., 1996. Apyrases (ATP diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. Biochem Biophys Acta 1310, 233-241, 1996.

Krendel, M., Mooseker, M.S., 2005. Myosins: tails (and heads) of functional diversity. Physiol. 20, 239-251.

Kuznetsov, S.A., Gelfand, V.I., 1986. Bovine brain kinesin is a microtubule activated-ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. 83, 8350-8354.

Lacapare, J.J., Guillain, F., 1990. Reaction mechanism of Ca^{2+} ATPase of sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 265, 8583-8589.

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.

Larson, R.E., Pitta, D.E., Ferro, J.A., 1988. A novel 190 kDa calmodulin-binding protein associated with brain actomyosin. Braz. J. Med. Biol. Res. 21, 213-217.

Lockyer, P.J., Puente, E., Windass, J., Earley, F., East, J.M., Lee, A.G., 1998. Cloning and expression of an insect Ca^{2+} -ATPase from *Heliothis virescens*. Biochim. Biophys. Acta 1369, 14-18.

Lunardi, J., Dupuis, A., Garin, J., Issartel, J.P., Michel, L., Chabre, M., Vignais, P.V., 1988. Inhibition of H^{+} -transporting ATPase by formation of a tight nucleoside diphosphate-fluoroaluminate complex at the catalytic site. Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 8958-8962.

Maldonado, S.H.G., Marin-Jarillo, A., Castellanos, J.Z., Mejia, E.G., Acosta-Gallegos, J.A., 1996. Relationship between physical and chemical characteristics and susceptibility to *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae) and *Acanthoscelides obtectus* (Say) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. J. Stored Prod. Res. 32, 53-58.

- Marín, J., Encabo, A., Briones, A., Garcia-Cohen, E.C., Alonso, M.J., 1999. Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: calcium pumps. *Life Sci.* 64, 279-303.
- Maruta, H., Korn, E.D., 1977. *Acanthamoeba* myosin II. *J. Biol. Chem.* 252, 6501-6509.
- Maruta, S., Henry, G.D., Sykes, B.D., Ikebe, M., 1993. Formation of the stable myosin-ADP-aluminum fluoride and myosin-ADP-beryllium fluoride complexes and their analysis using ^{19}F NMR. *J. Biol. Chem.* 268, 7093-7100.
- 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.
- Mermall, V., Bonafé, N., Jones, L., Sellers, J.R., Cooley, L., Mooseker, M.S., 2005. *Drosophila* myosin V is required for larval development and spermatid individualization. *Dev. Biol.* 286, 238-255.
- Murataliev, M.B., Milgrom, Y.M., Boyer, P.D., 1991. Characteristics of the combination of inhibitory Mg^{2+} and azide with F_1 ATPase from chloroplasts. *Biochemistry* 30, 8305-8310.
- O'Donnell, M.J., Janowski, J.P., Linton, S.M., Rheault, M.R., 2003. Inorganic and organic anion transport by insect renal epithelia. *Biochim. Biophys. Acta* 1618, 194-206.
- Ping, G., Yanping, L., Shigui, L., 2004. Effect of dp-B on ATPase activity of insect plasma membrane. *Pestic. Biochem. Physiol.* 80, 157-162.
- 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.

Pullikuth, A.K., Gill, S.S., 1999. Identification of a *Manduca sexta* NSF ortholog, a member of the AAA family of ATPases. Gene 240, 343-354.

Rega, A.F., Garrahan, P.J., 1975. Calcium ion-dependent phosphorylation of human erythrocyte membranes. J. Membr. Biol. 22, 313-327.

Rodríguez-Pérez, M.A., Dumpit, R.F., Lenz, J.M., Powell, E.N., Tam, S.Y., Beckage, N.E., 2005. Host refractoriness of the tobacco hornworm *Manduca sexta*, to the braconid endoparasitoid *Cotesia flavipes*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 60, 159-171.

Sanon, A., Ouedraogo, A.P., Tricault, Y., Credland, P.F., Huignard, J., 1998. Biological control of bruchids in cowpea stores by release of *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae) adults. Environ. Entomol. 27, 717-725.

Schmale, I.S., Wackers, F.L., Cardona, C., Dorn, S., 2003. Combining parasitoids and plant resistance for the control of the bruchid *Acanthoscelides obtectus* in stored beans. J. Stored Prod. Res. 39, 401-411.

Shpetner, H.S., Paschal, B.M., Vallee, R.B., 1988. Characterization of the microtubule-activated ATPase of brain cytoplasmic dynein (MAP 1C). J. Cell. Biol. 107, 1001-1009.

Smith, T.M., Kirley Jr., T.L., Hennessey, T.M., 1997. A soluble ecto-ATPase from *Tetrahymena thermophila*: purification and similarity to the membrane-bound ecto-ATPase of smooth muscle. Arch. Biochem. Biophys. 337, 351-359.

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.

Teixeira, I.R.V., Zucoloto, F.S., 2003. Seed suitability and oviposition behaviour of wild and selected populations of *Zabrotes subfasciatus* (Boehman) (Coleoptera: Bruchidae) on different hosts. J. Stored Prod. Res. 39, 131-140.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 4350-4354.

Troullier, A., Girardet, J.L., Dupont, Y., 1992. Fluoroaluminate complexes are bifunctional analogues of phosphate in sarcoplasmático reticulum Ca^{2+} -ATPase. J. Biol. Chem. 267, 22821-22829.

Warrick, H.M., Spudich, J.A., 1987. Myosin Structure and Function in Cell Motility. Annu. Rev. Cell Biol. 3, 379-421.

Welte, M.A., 2004. Bidirectional transport along microtubules. Curr. Biol. 14, R525-R537.

Yokota, E., Mabuchi, I., 1994. C/A dynein isolated from sea urchin sperm flagellar axonemes. J. Cell Sci. 107, 353-361.

CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho obtivemos uma fração rica em atividade Ca^{2+} -ATPásica parcialmente purificada a partir de larva de *Pachymerus nucleorum* sem aparelho digestivo. Os resultados indicam a presença de algum membro da família das miosinas ou das Ca^{2+} -ATPases de membranas, porém com propriedades distintas das descritas na literatura.