



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

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

Aluno: Gabriel Costa Nunes da Cruz

Orientador: Milton Vieira Coelho

UBERLÂNDIA - MG
FEVEREIRO DE 2006



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

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

Aluno: Gabriel Costa Nunes da Cruz

Orientador: Milton Vieira Coelho

Dissertação 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 2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de
Catalogação e Classificação

- C957c Cruz, Gabriel Costa Nunes da, 1982 -
Caracterização de uma Ca^{2+} -ATPase de larva de *Pachymerus nucleorum* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) / Gabriel Costa Nunes da Cruz. - Uberlândia, 2006.
65 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



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

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

Aluno: Gabriel Costa Nunes da Cruz

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dr. Milton Vieira Coelho (Orientador)
Examinadores: Dr. Pietro Ciancaglini
Dra. Hérica de Lima Santos

Data da Defesa: 28/02/2006

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

(Orientador)

Uberlândia, 28/02/2006

“Nossa maior glória não é em nunca falhar, mas em nos esquecer toda vez que falhamos.”

- Ralph Waldo Emerson -

*Aos melhores pais que uma
pessoa pode desejar, Jasmir e
Maria Olinda, minha eterna
gratidão por tudo que me
proporcionaram. Ao mestre,
Milton Vieira Coelho, meus
sinceros agradecimentos pelo
apoio, confiança e paciência.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos grandes amigos de laboratório, Rogério, Decivaldo (Vicentin), Hugo, Vinícius e Leo, que muito me ajudaram, pelo companheirismo durante as pesquisas, nos intervalos para lanches, nos momentos de distração, enfim, sempre. Obrigado pela amizade sincera e ajuda compartilhada nos experimentos.

A Maria Olinda e Jasmir, os melhores pais do mundo, aos quais serei sempre grato, meus eternos agradecimentos pelo incansável apoio e entusiasmo pelo meu sucesso e do meu irmão.

Ao meu irmão, Lucas, que me incentiva e me dá força, mesmo calado.

À minha namorada, Maira, sempre ao meu lado, pelo amor e o constante apoio em tudo.

AGRADECIMENTOS

Aos professores e funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica, que não medem esforços para melhorar a qualidade do ensino e da pesquisa, tanto na Graduação quanto na Pós-Graduação.

Aos mestres que se dedicaram a nos passar um pouco de seus conhecimentos, Milton V. Coelho, Foued S. Espíndola, Maria Inês H. Brandeburgo, Amélia Hamaguchi, Nilson Penha, Ana Maria Bonneti, Malcon Brandeburgo e Luis Ricardo G. Filho.

Ao secretário Gerson e à secretária Marlene pelo auxílio de grande valia na obtenção de informações e de materiais, essenciais para a manutenção dos experimentos.

À Dona Maura, pela cooperação, amizade e seu incansável empenho na organização e manutenção do laboratório.

Ao pessoal do Centro de Estudos Faunísticos e Ambientais (CDzoo) do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná, em especial à Dra. Cibele Stramare Ribeiro-Costa, pela identificação taxonômica do besouro que estudamos.

Aos amigos de república, Cristiano (Kitim), Luciano (Mutombo), Leonardo (Leo) e Valter (Valtim) pela ajuda de toda hora, prova da amizade verdadeira. Sem esquecer daqueles que também fizeram parte de uma segunda casa minha, Samir, Fabiano e Carlos Eduardo (Trovão).

ESTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO COM O APOIO DE:



SUMÁRIO

Resumo Geral	1
Introdução Geral	3
1. Babaçu (<i>Orbignya</i> spp.)	4
2. Besouros Bruquíneos	6
3. ATPases	10
Referências Bibliográficas	16
Capítulo Único	27
1. Resumo	28
2. Abstract	30
3. Introdução	32
4. Material e Métodos	35
4.1. Reagentes	35
4.2. Preparação da fração ATPase	35
4.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS	36
4.4. Western blotting/Imunoblotting	37
4.5. Dosagem de proteínas	37
4.6. Dosagem da atividade de hidrólise de nucleotídeos	37
4.7. Análises estatísticas	38
5. Resultados	39
6. Discussão	50
7. Referências Bibliográficas	57
Conclusão Geral	65

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1: Esquema do fruto de babaçu.

Figura 2: Exemplar de larva da espécie *Pachymerus nucleorum*.

Figura 3: Exemplar de adulto da espécie *Pachymerus nucleorum*.

Figura 4: Exemplar de fruto de babaçu (*Orbignya* sp.).

Figura 5: Representação dos principais motores moleculares.

CAPÍTULO ÚNICO

Figura 1: SDS-PAGE de frações de larva de *Pachymerus nucleorum*.

Figura 2: Atividades Mg^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ATPásica específica de frações de larva de *Pachymerus nucleorum*.

Figura 3: Atividade ATPásica específica da fração P3 em presença de diferentes cátions.

Figura 4: Efeito de compostos quelantes de cátions na atividade ATPásica de P3.

Figura 5: Efeito de cátions na atividade Ca^{2+} -ATPásica da fração ATPase.

Figura 6: Efeito do íon magnésio na atividade Ca^{2+} -ATPásica da fração ATPase.

Figura 7: Efeito do íon cálcio na atividade ATPásica da fração P3.

Figura 8: Efeito de ATP na atividade Ca^{2+} -ATPásica da fração P3.

Figura 9: Especificidade por substrato da fração P3.

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

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

Figura 10: Comparação entre as atividades Ca^{2+} -ATPásica e K^+ /EDTA-ATPásica da fração ATPase.

Figura 11: Immunoblotting usando anticorpos específicos contra miosinas II e V na fração P3.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Adenosina 5'-difosfato

AMP – Adenosina 5'-monofosfato

AMP-PNP – 5'-adenililimidodifosfato

ATP – Adenosina 5'-trifosfato

ATPase – Adenosina trifosfatase

ATPDase – ATP difosfohidrolase

BSA – Soroalbumina bovina

CTP – Citidina 5'-trifosfato

DTT – Ditionitrito

EDTA – Ácido etilenodiaminotetrassódico

EGTA – Etileno glicol-bis (β -aminoetil éter) N,N,N',N'-ácido tetracético

E-NTPase – Ecto-nucleotídeo trifosfatase

GTP – Guanosina 5'-trifosfato

kDa – Kilodalton

NBT/BCIP – Nitro blue tetrazolium / 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato

Pi – Ortofosfato inorgânico

PPi – Pirofosfato inorgânico

SDS – Dodecil sulfato de sódio (Lauril sulfato)

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

TTP – Timidina 5'-trifosfato

UTP – Uridina 5'-trifosfato

RESUMO GERAL

O babaçu (*Orbignya* sp.) é uma palmeira que ocupa vastas áreas na região meio-norte do Brasil e desempenha um papel importante na subsistência de milhares de habitantes desta região. *Pachymerus nucleorum* é um besouro da subfamília Bruchinae, cujos representantes são conhecidos como brocas de sementes, que causa muitos danos nas castanhas do babaçu. As larvas deste animal penetram o coco de babaçu logo após sua eclosão, se desenvolvem alimentando-se das castanhas e somente emergem como adultos. Neste trabalho, estudamos a atividade enzimática de hidrólise de ATP por uma fração protéica parcialmente purificada a partir das larvas de *P. nucleorum* sem o aparelho digestivo. As larvas foram extraídas dos cocos, lavadas e dissecadas para a retirada do aparelho digestivo. Seguimos o processo de purificação a partir do restante do corpo e obtivemos a fração precipitada (P3) com alta atividade ATPásica em presença de cálcio, que foi caracterizada. A dosagem da atividade ATPásica foi realizada incubando-se amostras das frações em meio de reação tamponado contendo ATP 1 mM em concentração final e os respectivos cátions metálicos em 4 mM. A fração ATPase não apresentou atividade significativa em

presença de magnésio, cobalto, cobre, zinco, bário, lítio ou ferro. Mesmo na ausência de cátions (EDTA ou EGTA 5 mM) a atividade ATPásica é baixa, mas não nula. Esta alta atividade Ca^{2+} -ATPásica é inibida em presença de cobalto, cobre, zinco, bário ou ferro 4 mM. Há uma sensível inibição (50%) pela presença de magnésio 0,25 mM. A atividade ATPásica de P3, em presença de ATP 1 mM, chega a 50% com CaCl_2 0,5 mM, atingindo um platô com 2 mM. Com CaCl_2 1 mM, a atividade ATPásica atinge 50% com 0,7 mM de ATP e o pico com 2 mM. Contudo, observa-se que há um leve decaimento desta atividade com concentrações de ATP maiores que 2 mM. P3 não utiliza pirofosfato nem nucleotídeos mono e difosfato para sua atividade, e a atividade Ca^{2+} -GTPásica é apenas 20% da Ca^{2+} -ATPásica. Esta fração não sofre inibição significativa por vanadato (em concentrações menores que 200 μM), azida, Triton X-100 ou fluoreto de alumínio. Tal fração é estável a 4 °C por pelo menos 12 dias, porém seu congelamento (–20 °C) causa perda de mais da metade da atividade com 24 horas de estocagem. A atividade K^+ /EDTA-ATPásica é 50% da Ca^{2+} -ATPásica, e não ocorreu marcação com anticorpos anti-miosinas II ou V. Neste trabalho obtivemos uma fração enriquecida em atividade Ca^{2+} -ATPásica a partir de larva de *Pachymerus nucleorum* sem aparelho digestivo, e caracterizamos parcialmente tal atividade.

INTRODUÇÃO GERAL

Confinado em uma estrutura formidável, do coco babaçu, o besouro bruquíneo *Pachymerus nucleorum* Fabricius (1792) dá início sua vida. Após sua penetração no fruto, a larva desse animal consegue se desenvolver até a forma adulta se alimentando da amêndoa do babaçu. A partir daí, o besouro perfura a estrutura extremamente rígida do fruto e ganha o ambiente. Além do homem, que extrai manualmente as amêndoas oleaginosas, nenhum outro mamífero contemporâneo é capaz de perfurar a estrutura simples, porém eficiente do coco babaçu (Anderson & May, 1985). Pouco se sabe sobre as características bioquímicas implicadas na fisiologia deste besouro, sendo de grande importância seu estudo, justificado por seu relevante interesse, principalmente na economia do babaçu.

Vegetal imponente na região Meio Norte do Brasil e formando um vasto arco ao longo do sul da bacia amazônica, na transição entre a floresta úmida e o cerrado, o babaçu (*Orbignya* spp., Palmaceae) desempenha um importante papel na vida de milhares de moradores locais (Bezerra, 1999).

1. Babaçu (*Orbignya* spp.)

O nome babaçu tem origem Tupi-Guarani: *ba* = fruto; *açu* = grande. É uma palmeira nativa das regiões norte, nordeste e central do Brasil. Algumas espécies são identificadas nas diferentes regiões, como *Orbignya phalerata* Martius, *O. martiana* Barbosa Rodrigues, *O. barbosiana* Burret. A espécie *Orbignya oleifera* Burret, chamada babaçu do cerrado, é encontrada nos estados de Minas Gerais e Bahia, onde serve basicamente para produção de óleo para subsistência (Balick & Pinheiro, 1993).

As “zonas do babaçu” ou “babaçuais” são áreas de alta abundância desta palmeira (*O. phalerata* principalmente), estando presentes no sudeste da Amazônia, especialmente no Maranhão e Piauí. Os babaçuais ocupam cerca de 18 milhões de hectares no país, sendo 10 milhões no Maranhão, que produz 155 mil toneladas de amêndoas por ano de castanhas (cerca de 70% da produção nacional). Aproximadamente 400 mil famílias colhem o babaçu no Maranhão e são geralmente dependentes desta atividade para sua sobrevivência econômica (Bezerra, 1999). Todas as partes da planta são usadas na economia de subsistência doméstica. Embora seja extremamente importante nas áreas rurais, é difícil quantificar seu valor econômico porque grande parte do uso da palmeira é na subsistência. May (1986) propôs uma estimativa do valor econômico anual combinado ao de subsistência de US\$ 85 milhões.

O babaçu é considerado o maior recurso oleífero nativo do mundo, e um dos principais produtos extrativos do Brasil, contribuindo de maneira significativa para a economia de alguns Estados (Alves, 1984). Sua importância social aumenta ainda mais, porque a exploração do produto ocorre no período de entressafra das principais culturas regionais, concorrendo, portanto, para a manutenção dessas famílias, e contribuindo para conter o êxodo rural, além de exercer um papel fundamental na manutenção da fertilidade do solo (Bezerra, 1995).

Uma palmeira de babaçu produz seus frutos em grandes cachos contendo, em média, 200 deles, podendo ocorrer cachos com mais de 600 frutos. Um cacho pesa entre 40 e 90 kg e uma árvore produz de 1 a 4 cachos por ano. A produção se inicia por volta de 8 anos (Fairman, 1992). Poucos predadores conseguem ter

acesso às castanhas, uma vez que o fruto é muito duro, sendo necessárias 5 toneladas métricas de pressão para quebrá-lo (Forline, 2000).

O fruto pesa de 40 a 450 gramas e tem de 12 a 15% de seu peso total constituído pelo epicarpo (fibroso), próximo de 20% do peso composto pelo mesocarpo, a maior parte (cerca de 59%) é constituída pelo endocarpo. As castanhas compõem geralmente 6 a 8% do fruto (Fig. 1). Esses valores variam entre espécies e regiões (May et al., 1985; Pinheiro & Frazão, 1995; Baruque Filho et al., 2000).

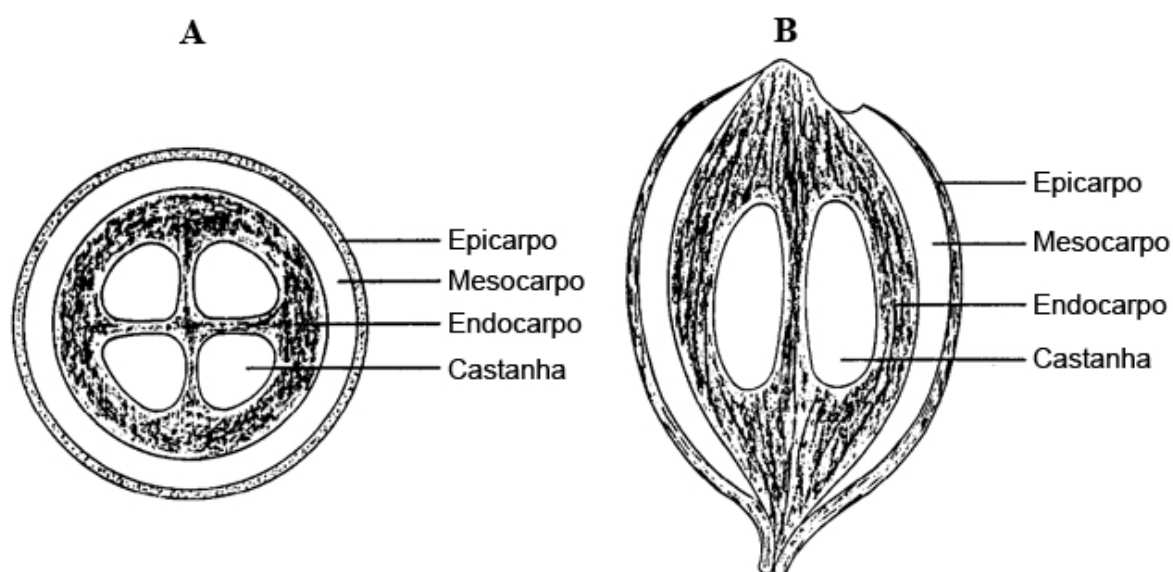


Figura 1: Esquema do fruto de babaçu. Estão representados o epicarpo, mesocarpo, endocarpo e castanhas, conforme indicado. **(A)** Secção transversal do fruto. **(B)** Secção longitudinal do fruto. Figura modificada de Emmerich & Luengo (1996).

O mesocarpo do fruto serve de alimento para as pessoas, como na forma de farinha substitutiva da de mandioca. Duas espécies de roedores também se alimentam do mesocarpo: pacas (*Agouti paca*) e cotias (*Dasyprocta punctata*), agindo também como agentes dispersores (Forline, 2000). O mesocarpo também é utilizado tradicionalmente na medicina popular para o tratamento de cólicas menstruais, artrite, leucemia, ulcerações, tumores e inflamações de útero e ovário, constipação, colite e obesidade. Com base nisso, um polissacarídeo bioativo foi isolado do mesocarpo de *O. phalerata* e apresentou propriedade antiinflamatória e estimulou fagocitose “in-vivo” em camundongos, o que ajuda a

explicar seu uso farmacológico (Silva & Parente, 2001). O extrato alcoólico do fruto do babaçu triturado apresentou um significativo efeito anti-tumoral em ratos induzidos com carcinoma de Ehrlich, inibindo 59% desse tumor (Moraes et al., 1997).

O endocarpo do babaçu é uma camada lenhosa muito dura com muitas fibras longitudinais dispersas numa matriz. Tem um conteúdo de lignina maior que a quantidade média de muitas espécies de madeira. Sua densidade de 1,27 g/cm³ é muito alta comparada a outras espécies de madeira. Estas propriedades tornam o endocarpo o principal constituinte do carvão de babaçu. Este carvão de qualidade muito alta, sendo um substituto satisfatório do carvão usado na metalurgia (coque). (Emmerich & Luengo, 1996).

A boa capacidade adaptativa do babaçu indica seu uso no reflorestamento de terras excessivamente secas ou pobres em nutrientes. A expansão de culturas de babaçu além de suas áreas de atuais ocorrências poderia fornecer produtos mercantis e de subsistência para outras populações, garantindo ainda a melhoria da qualidade ambiental por sua cobertura vegetal permanente.

A vantagem do babaçu está na sua capacidade de fornecer uma ampla variedade de produtos úteis tanto para as economias de subsistência quanto para o mercado, uma vez que não necessita de grandes investimentos.

2. Besouros bruquíneos

O estudo da biologia de coleópteros é importante, já que além da compreensão do comportamento e importância ecológica destes insetos, algumas famílias apresentam relevância na economia. A família Bruchidae foi incluída, recentemente, na família Chrysomelidae, como a subfamília Bruchinae, da ordem dos insetos que compreende os besouros (Coleoptera). Essa subfamília compreende pragas sérias de grãos armazenados (Janzen, 1969; Janzen, 1971; Meik & Dobie, 1986; Siemens et al., 1991; Credland & Dendy, 1992; Ernst, 1993; Sanon et al., 1998; Teixeira & Zucoloto, 2003).

Os bruquíneos são normalmente pragas de leguminosas, exemplos mais comuns são o *Zabrotes subfasciatus* Bohemann e o *Acanthoscelides obtectus*

Say, pragas do feijão, mas há espécies que atacam também a ervilha, *Bruchus pisorum* L. (Doss et al., 2000), acácia, *Pseudopachymerus lallemandi* Marseul (Southgate, 1979), marula, *Specularius impressithorax* (Ernst, 1993), fava (feijão java), *Bruchus rufimanus* Boh. (Tran & Huignard, 1992), enju, *Megabruchidius sophorae* (Tuda & Morimoto, 2004), entre outros.

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é atacado principalmente por *Zabrotes subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus*, sendo o primeiro encontrado em regiões de climas quentes e o segundo em regiões temperadas. *A. obtectus* também pode infestar feijões no campo, além dos estocados (Carvalho & Rossetto, 1968; Maldonado et al., 1996). Existe outra espécie, *Callosobruchus maculatus* F., que ataca o feijão branco (*Vigna unguiculata* L.) (Abate & Ampofo, 1996). Estas espécies são as mais estudadas, uma vez que consomem produtos que seriam consumidos pelo homem (Maldonado et al., 1996; Schmale et al., 2003). Métodos de controle biológico destes animais vêm se desenvolvendo, enfocando o aumento da resistência da planta hospedeira ou o uso de parasitóides (Sanon et al., 1998; Benrey et al., 1998; Schmale et al., 2001; Schmale et al., 2003). Muitos estudos também vêm sendo feitos enfocando a digestão destes animais, buscando inibidores de suas enzimas digestivas. A caracterização de proteases (Gatehouse et al., 1985; Wieman & Nielsen, 1988; Campos et al., 1989; Lemos et al., 1990; Terra & Cristofolletti, 1996; Silva et al., 2001a; Oliveira et al., 2002) e amilases (Lemos et al., 1990; Minney et al., 1990; Grossi de Sá & Chrispeels, 1997; Silva et al., 1999; Iulek et al., 2000; Silva et al., 2001b) tem fornecido várias bases para a busca e desenvolvimento de potenciais agentes controladores destas pestes.

A biologia dos bruquíneos é similar entre as espécies. Após a oviposição sobre frutos ou sementes, a larva emergente penetra e realiza seu desenvolvimento, passando por quatro “instars” dentro da semente ou fruto e, na maioria das vezes, somente emerge como adulto, sendo as maiores pestes de grãos de legumes estocados no mundo (Southgate, 1979).

A espécie *Pachymerus nucleorum* Fabricius, 1792 ataca diferentes espécies de palmeiras, entre elas o babaçu (*Orbignya*), macaúba (*Acrocomia*), coco da baía (*Cocos*), dendê (*Elaeis*), piaçava (*Attalea*) e gueirova (*Syagrus*) (Anderson & May, 1985; Gallo, 1988). Essa espécie é muito semelhante a outras

espécies deste gênero. Podendo inclusive ser confundida com a espécie *Pachymerus cardo*, também praga de Orbignya, Acrocomia, Attalea e Syagrus (Silvius & Fragoso, 2002).

P. nucleorum tem importância principal na ecologia do babaçu. As castanhas dos seus frutos sofrem predação pela larva desta espécie (Fig. 2). Este animal raramente come todas as amêndoas, cujo número médio é de 3,1 por fruto, de modo que pelo menos uma delas normalmente escapa da predação (Anderson & May, 1985). Todavia, cerca de 70% dos frutos têm pelo menos uma castanha destruída por esta larva, causando grande prejuízo na economia desta palmeira (May et al., 1985; Fairman, 1992).

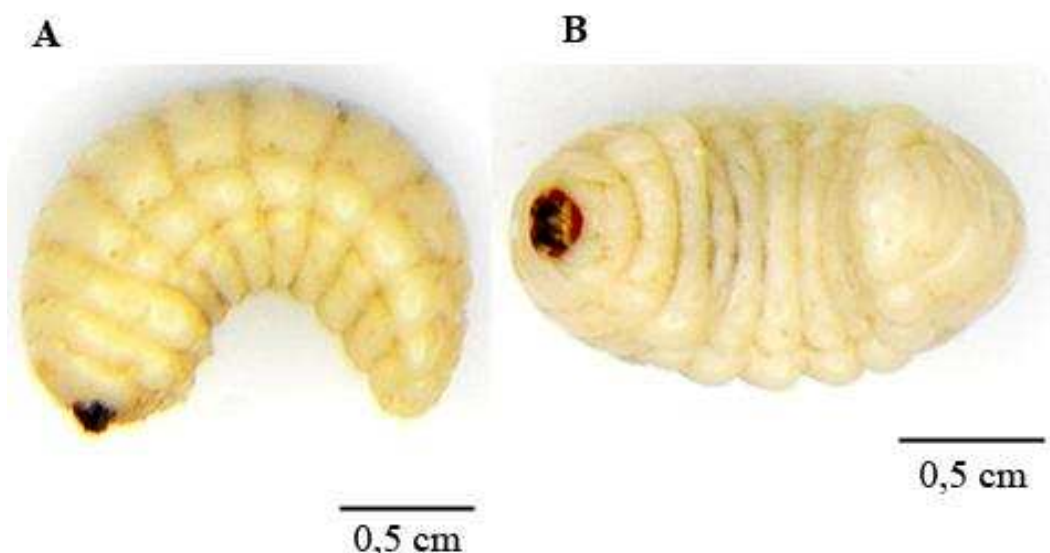


Figura 2: Exemplar de larva da espécie *Pachymerus nucleorum*. Exemplar de larva em estágio final de desenvolvimento, material biológico utilizado neste trabalho. **(A)** Vista lateral da larva. **(B)** Vista ventral da larva.

O besouro adulto de *P. nucleorum* mede de 12 a 18 mm de comprimento, por 5 a 7 mm de largura (Fig. 3). Tem coloração cinzenta, élitros estriados, coxas posteriores ovóides e denteadas. Os ovos são colocados nos frutos caídos, e cerca de 20% das larvas que eclodem penetram através dos canais de seiva ou do hilo (poro funcional). Elas então começam a se alimentar das amêndoas, assimilando óleos e proteínas, e tecem um casulo (Fig. 4-A), ligando com seiva partículas farinhasas do coco. Estas larvas, quando completamente desenvolvidas, medem mais de 20 mm de comprimento. O período larval dura,

em média, três meses e o pupal dois meses. Depois de sua emergência, os adultos permanecem no interior dos cocos por duas semanas e depois fazem um orifício de 5 mm de diâmetro para sair (Fig. 4) (Gallo, 1988).

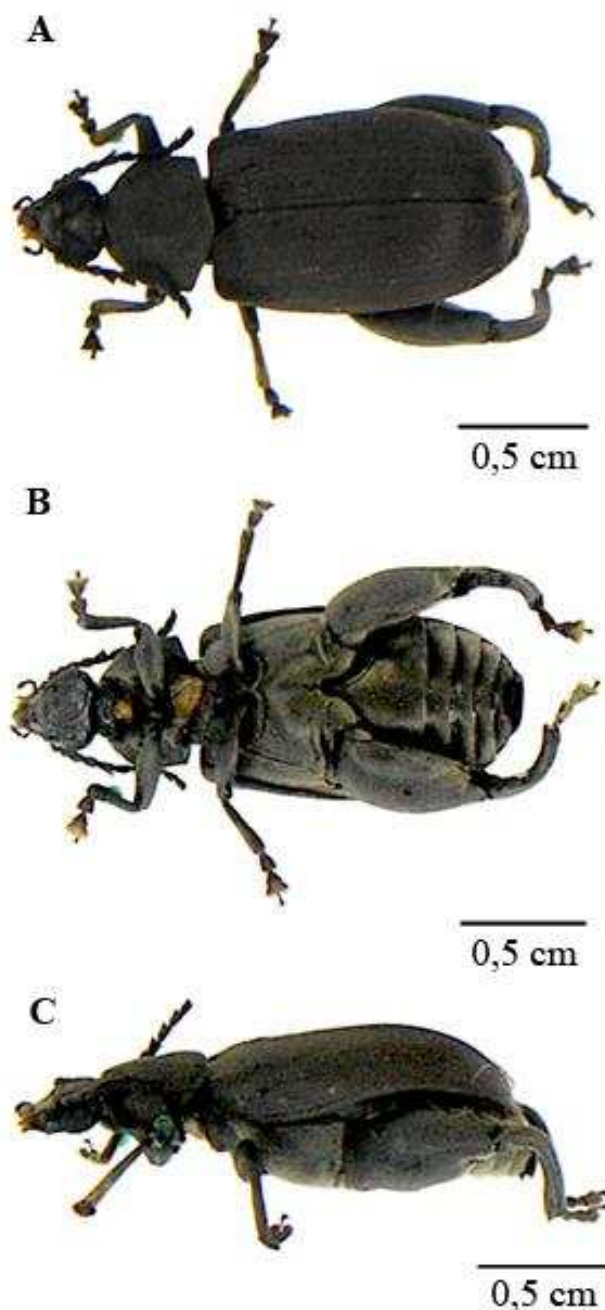


Figura 3: Exemplar adulto da espécie *Pachymerus nucleorum*. Um dos bruquíneos de maior tamanho conhecido, com comprimento de 18 mm e 7 mm de largura. **(A)** Vista dorsal do besouro. Percebe-se o corpo ovalado, élitro estriado curto, deixando desprotegida a extremidade do abdômen (pigídio). Rostro curto e antenas com 11 segmentos. **(B)** Vista ventral do besouro. Evidencia-se a cabeça livre. **(C)** Vista lateral do besouro. Verifica-se a cabeça achatada e coxas posteriores ovóides.

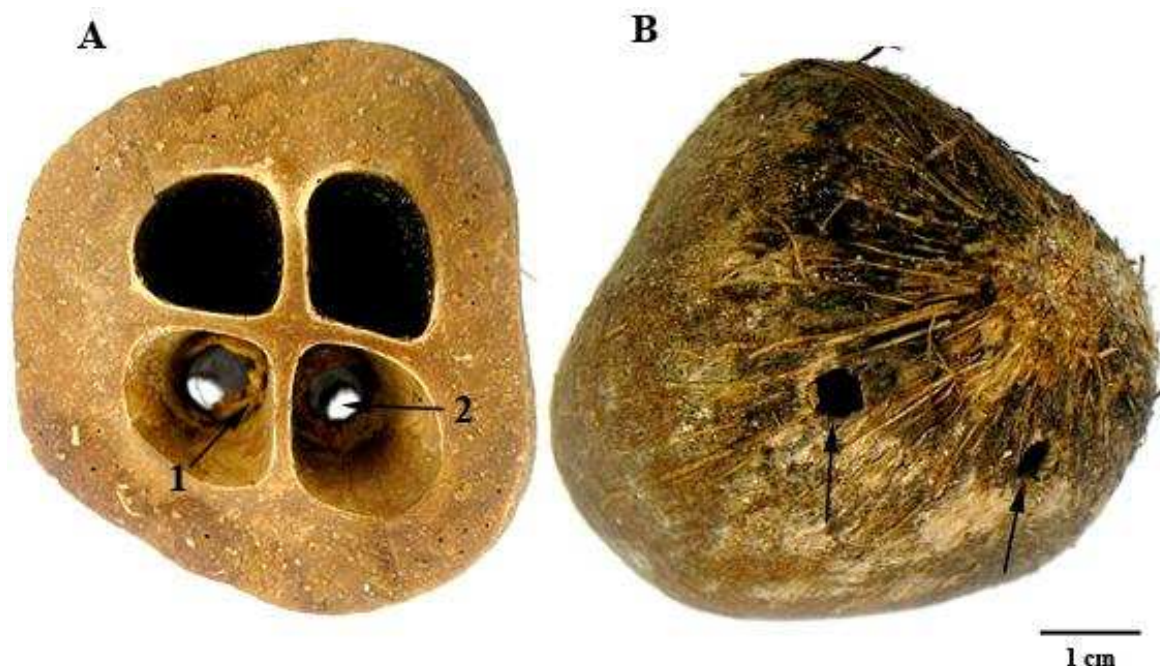


Figura 4: Exemplar de fruto de babaçu (*Orbignya* sp.). O fruto foi seccionado e as castanhas não estão presentes. **(A)** Secção transversal do fruto. **1.** Parte do casulo que a larva tece após se alimentar da castanha. **2.** Orifício feito pelo besouro adulto para sair do fruto. **(B)** Vista da parte anterior do fruto, que se liga ao cacho. As setas indicam os orifícios feitos pelos besouros.

3. ATPases

Nosso laboratório tem se dedicado ao estudo de enzimas da larva de *Pachymerus nucleorum*. Procuramos purificar e caracterizar proteases, amilases e, como enfoque do presente trabalho, ATPases. Estas enzimas são responsáveis pela quebra e aproveitamento da principal “moeda” de energia da célula, o ATP. A energia liberada pela reação catalisada fornece a energia necessária para a realização de diversos trabalhos celulares, como contração muscular, batimento de cílios e flagelos, transporte de organelas e de vesículas, transporte de metabólitos através de membranas, emissão de pseudópodes em amebas, fagocitose, migração de cromossomos na divisão celular e citocinese são alguns exemplos do papel desempenhado pelas ATPases celulares (Clarke & Spudick, 1977; Endow & Titus, 1992; Hirokawa, 1998; Karcher et al., 2002). Estas enzimas se apresentam na célula na forma solúvel no citoplasma ou ligada a membranas.

ATPases, em geral, requerem cátions bivalentes para sua atividade hidrolítica. Os principais utilizados são o cálcio e o magnésio, para as atividades Ca^{2+} -ATPásica e Mg^{2+} -ATPásica, respectivamente. Dentre as ATPases, os chamados motores moleculares usam esta energia para a produção de movimento. Miosina, cinesina e dineína, constituem as principais famílias de motores moleculares (Fig. 5), e são as principais ATPases solúveis (Mermall et al., 1998; Hirokawa, 1998; Vale, 1999). A miosina II de músculo (miosina convencional), por exemplo, acopla a quebra do ATP ao processo de contração muscular através da interação com filamentos de actina (Huxley, 1969). Outras enzimas como cinesina e dineína acoplam a quebra do ATP aos processos de transporte de vesículas no interior celular, através da interação com microtúbulos, bem como a movimentação de cílios e flagelos (Hirokawa, 1998; Vale, 1999; Vale, 2003; Schliwa & Woehlke, 2003).

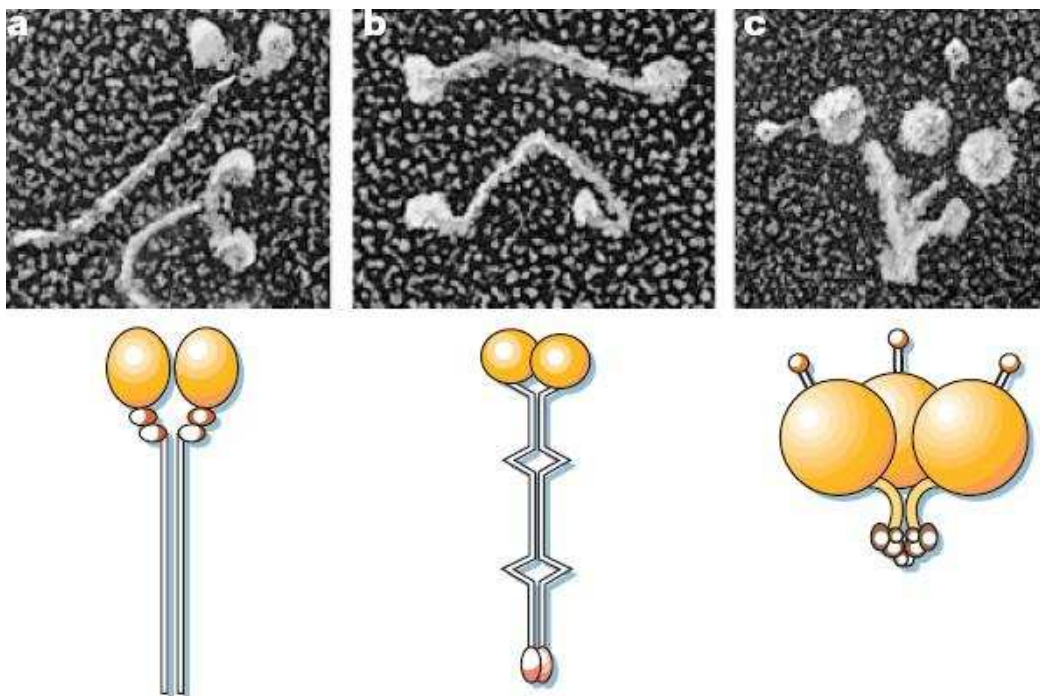


Figura 5: Representação dos principais motores moleculares. (a) Miosina II. **(b)** Cinesina convencional. **(c)** Dineína ciliar. As ilustrações acima são micrografias eletrônicas de alta resolução. Os domínios motores estão em amarelo, proteínas associados estão em marrom e os domínios espiralados estão representados por linhas pretas paralelas (extraído de Schliwa & Woehlke, 2003).

As miosinas 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). Outra propriedade de algumas miosinas é sua estimulação pelo complexo Ca^{2+} /calmodulina (Espíndola et al., 1992; Wolenski, 1995). A atividade Mg^{2+} -ATPásica de miosinas é geralmente baixa na ausência de actina, mas é fortemente estimulada na sua presença (Maruta & Korn, 1977). Miosina II de ameba e miosina I de intestino, por exemplo, apresentam uma atividade Ca^{2+} -ATPásica maior do que a Mg^{2+} -ATPásica, na ausência de actina (Maruta & Korn, 1977; Collins & Borysenko, 1984; Conzelman & Mooseker, 1987). Cinesina de cérebro também mostra uma alta atividade Ca^{2+} -ATPásica, que ainda é estimulada por microtúbulos (Kuznetsov & Gelfand, 1986). Dineínas apresentam atividade Mg^{2+} -ATPásica maior do que a Ca^{2+} -ATPásica em presença de microtúbulos, na ausência destes estas atividades são similares (Shpetner et al., 1988).

Dentre as ATPases de membrana, destacam-se as do tipo P, F e V (Pedersen, 2002). Aquelas do tipo P, como Ca^{2+} -ATPases e Na^+/K^+ -ATPase, são responsáveis pelo bombeamento de cátions através de membranas celulares, translocação realizada pela fosforilação de um resíduo de aspartato (Moller et al., 1996). Essa classe de ATPases de membrana está envolvida em diferentes funções, como absorção, secreção, sinalização, transmissão de impulso nervoso, acoplamento de excitação/contração, crescimento e diferenciação. Elas são constituídas de um polipeptídeo próximo de 100 kDa, que está envolvido no transporte de íons dependente de ATP (Scarborough, 1999).

Ca^{2+} -ATPases, ou bombas de cálcio, estão presentes na membrana plasmática, nos retículos endoplasmático e sarcoplasmático, no complexo de Golgi e no envelope nuclear. Em leveduras existem Ca^{2+} -ATPases em outras organelas. Estas bombas impulsionam o cálcio para os espaços extracelulares ou para o lúmen dos retículos. A célula necessita dessa diversidade de Ca^{2+} -ATPases para manter a homeostase do cálcio (Carafoli, 1991; Marín et al., 1999; Carafoli, 2002; Carafoli, 2003). A Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática é constituída por uma única cadeia polipeptídica de ~134 kDa, com domínio de ligação à calmodulina na extremidade C-terminal (Carafoli, 1997). A Ca^{2+} -ATPase

de retículo endoplasmático/sarcoplasmático tem cerca de 100 kDa e foi purificada primeiramente por MacLennan (1970) e sua estrutura cristalizada foi definida, com o Ca^{2+} ligado, (Toyoshima et al., 2000) e livre de cálcio (Toyoshima & Nomura, 2002).

A Na^+/K^+ -ATPase, uma proteína integral de membrana, utiliza a energia da hidrólise do ATP para o transporte de Na^+ e K^+ através da membrana celular (Lingrel & Kuntzweiler, 1994; Woo et al., 1999). Ela é constituída por uma subunidade α de ~113 kDa e uma subunidade β de ~35 kDa (Lingrel & Kuntzweiler, 1994).

ATPase tipo F é composta de um complexo de subunidades hidrofóbicas embebido em membrana, F_0 , e um complexo F_1 catalítico ligado a F_0 por uma haste. Esta enzima é chamada F_1F_0 -ATP sintase, ou F_1F_0 -ATPase, e realiza a síntese do ATP em condições fisiológicas. In vitro, a enzima age hidrolisando o ATP (Boyer, 1997; Weber & Senior, 1997). O complexo F_0 é inibido por oligomicina (Boyer, 1997) e a F_1 -ATPase é inibida por azida em concentrações inferiores a 1 mM (Murataliev et al., 1991).

ATPase tipo V ou V-ATPase, inicialmente encontrada em vacúolos, é composta de várias subunidades com similaridades de seqüências com as subunidades de ATPase tipo F (Nishi & Forgac, 2002). Ela é composta por dois complexos, V_1 e V_0 , sendo o primeiro o complexo catalítico e o segundo, ligado à membrana, transloca prótons (Forgac, 1992). Estão envolvidas em vários processos celulares, como endocitose, transporte intracelular, fusão de membranas, reabsorção óssea e balanço renal ácido/base (Pedersen, 2002). Essas H^+ -ATPases têm sido estudadas no sistema excretor de insetos, bombeando prótons para o lúmen dos túbulos de Malpighi, mas seu papel ainda não foi bem esclarecido (O'Donnell et al., 2003). Estas ATPases são inibidas por bafilomicina e *N*-etilmaleimida (NEM) (Schweikl et al., 1989).

ATPases comumente utilizam o ATP como substrato, mas outros nucleotídeos também podem ser hidrolisados. Por exemplo, as cinesinas e dineínas axonemais utilizam preferencialmente o ATP, já a dineína citoplasmática hidrolisa mais o GTP, TTP, UTP, CTP (Shpetner et al., 1988), enquanto as dinaminas hidrolisam especificamente o GTP (Schmid et al., 1998).

Um outro grupo de enzimas hidrolisa tanto o fosfato γ como o β do ATP, mas elas não usam a energia liberada para realizar trabalho. Essas enzimas (ATPases tipo E), que geralmente estão localizadas na superfície da célula, são referidas como ecto-ATPases ou E-NTPases e apresentam ampla distribuição em seres eucariotos (Plesner, 1995). Segundo Komoszynski e Wojtczak (1996), estas enzimas estão relacionadas aos processos fisiológicos regulados por ATP e/ou ADP como neurotransmissão, agregação plaquetária, regulação da pressão sanguínea, permeabilidade de membranas celulares e também na reciclagem de nucleotídeos. A maior parte das E-NTPases identificadas até o momento são proteínas integrais de membrana, mas parece que alguns membros desse grupo de enzimas são solúveis (Zimmermann, 1999).

Um membro deste grupo, a ATP difosfohidrolase (apirase, ATPDase) é uma enzima que catalisa a conversão de nucleotídeos di e trifosfatos a monofosfato e fosfato inorgânico na presença de Ca^{2+} ou Mg^{2+} (Wink et al., 2000). Todavia, a purificação das E-NTPases é dificultada pela sua co-purificação com outras proteínas, inibição da atividade enzimática por detergentes que normalmente solubilizam proteínas ligadas à membrana (como Triton X-100), sua baixa concentração, além da falta de especificidade de substrato e cátions bivalentes (Plesner, 1995). As ATPDases são inibidas por azida em concentrações de 10 a 20 mM, inibição que varia conforme a concentração de substrato, íons bivalentes e pH (Plesner, 1995; Knowles & Nagy, 1999).

Assim como azida, outros compostos são usados para a identificação de ATPases, uma vez que causam alterações diferenciadas na atividade ATPásica destas enzimas. Detergentes como o Triton X-100 comumente solubilizam ATPases de membrana, afetando sua atividade hidrolítica. Este detergente não iônico aumenta a atividade ATPásica de cinesina purificada de cérebro (Kutznetsov & Gelfand, 1986), mas não tem efeito em dineína de cérebro (Shpetner et al., 1988). O fluoreto de alumínio tem alta afinidade pelos sítios ligantes de nucleotídeos das ATPases, sendo um análogo do fosfato γ do ATP.

O enfoque do presente trabalho é a caracterização bioquímica de uma fração protéica parcialmente purificada a partir da larva de *P. nucleorum*. Essa fração apresenta alta atividade enzimática de hidrólise de ATP em presença de cálcio (atividade Ca^{2+} -ATPásica). Assim, este trabalho fornece uma base

bioquímica para estudos mais aprofundados na biologia molecular deste inseto, o qual causa prejuízo na economia do babaçu, vegetal do qual dependem muitas famílias numa das regiões mais pobres do Brasil.

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.

Alves, E.R.A., 1984. Apresentação. In: EMBRAPA. Departamento de Orientação e Apoio à Programação de Pesquisa. Babaçu: programa nacional de pesquisa. Brasília. 3-4.

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

Balick, M.J., Pinheiro, C.U.B., 1993. Babassu. In: Selected species and strategies to enhance income generation from Amazonian forests.
www.fao.org/docrep/v0784e/v0784e0u.htm. Disponível em Dez/2005.

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

Benrey, B., Callejas, A., Rios, L., Oyama, K., Denno, R.F., 1998. The effect of domestication of *Brassica* and *Phaseolus* on the interaction between phytophagous insects and parasitoids. *Biol. Control* 11, 130-140.

Bezerra, O.B., 1995. Localização de postos de coleta para apoio ao escoamento de produtos extrativistas - um estudo de caso aplicado ao babaçu. Florianópolis. Dissertação de mestrado. Curso de Pós-graduação em Engenharia de Produção. Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC.

Bezerra, J.A., 1999. Babaçu: As guerreiras do Mearim. *Rev. Globo Rural*. 14, 38-45.

Boyer, P.D., 1997. The ATP synthase - a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 717-749.

Campos, F.A.P., Xavier-Filho, J., Silva, C.P., Ary, M.B., 1989. Resolution and partial characterization of proteinases and α -amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F.). *Comp. Biochem. Physiol.* 92B, 51-57.

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.

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.

Credland, P.F., Dendy, J., 1992. Intraspecific variation in bionomic characters of the Mexican bean weevil, *Zabrotes subfasciatus*. Entomol. Exp. Appl. 65, 39-47.

Doss, R.P., Oliver, J.E., Proebsting, W.M., Potter, S.W., Kuy, S., Clementi, S.L., Williamson, R.T., Carney, J.R., DeVilbiss, E.D., 2000. Bruchins: Insect-derived plant regulators that stimulate neoplasm formation. Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 6218-6223.

Emmerich, F.G., Luengo, C.A., 1996. Babassu charcoal: a sulfurless renewable thermo-reducing feedstock for steelmaking. Biomass Bioenerg. 10, 41-44.

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

Ernst, W.H.O., 1993. Food consumption, life history and determination of host range in the bruchid beetle *Specularius impressithorax* (Coleoptera: Bruchidae). J. Stored Prod. Res. 29, 53-62.

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.

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.

Forgac, M., 1992. Structure, function and regulation of the coated vesicle V-ATPase. *J. Exp. Biol.* 172, 155-169.

Forline, L.C., 2000. Using and sustaining natural resources: the Guajá Indians and the babassu palm (*Attalea speciosa*). www.nuffic.nl/ciran/ikdm/8-3/forline.html. Disponível em Dez/2005.

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

Gatehouse, A.M.R., Butler, K.J., Fenton, K.A., Gatehouse, J.A., 1985. Presence and partial characterisation of a major proteolytic enzyme in the larval gut of *Callosobruchus maculatus*. *Entomol. Exp. Appl.* 39, 279-286.

Grossi de Sá, M.F., Chrispeels, M.J., 1997. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*) α -amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 27, 271-281.

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

Huxley, H.E., 1969. The mechanism of muscle contraction. *Science* 164, 1359-1366.

Iulek, J., Franco, O.L., Silva, M., Slivinski, C.T., Bloch Jr., C., Rigden, D.J., Grossi de Sá, M.F., 2000. Purification, biochemical characterization and partial primary structure of a new α -amylase inhibitor from *Secale cereale* (rye). Int. J. Biochem. Cell Biol. 32, 1195-1204.

Janzen, D.H., 1969. Seed-eaters versus seed size, number, toxicity and dispersal. Evolution 23, 1-27.

Janzen, D.H., 1971. Seed predation by animals. Annu. Rev. Ecol. Syst. 2, 465-492.

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

Knowles, A.F., Nagy, A.K., 1999. Inhibition of an ecto-ATP-diphosphohydrolase by azide. Eur. J. Biochem. 262, 349-357.

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.

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

Lemos, F.J.A., Campos, F.A.P., Silva, C.P., Xavier-Filho, J., 1990. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. Entomol. Exp. Appl. 56, 219-227.

Lingrel, J.B., Kuntzweiler, T., 1994. Na⁺/K⁺-ATPase. J. Biol. Chem. 269, 19659-19662.

MacLennan, D.H., 1970. Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 245, 4508-4518.

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.

May, P.A., 1986. A modern tragedy of the non-commons: agro-industrial change equity in Brazil's babaçu palm zone. Ithaca N.Y.: Latin American Program Dissertation Series, Cornell University.

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.

Meik, J., Dobie, P., 1986. The ability of *Zabrotes subfasciatus* to attack cowpeas. Entomol. Exp. Appl. 42, 151-158.

Mermall, V., Post, P.L., Mooseker, M.S., 1998. Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic and signal transduction. Science 279, 527-533.

Minney, B.H.P., Gatehouse, A.M.R., Dobie, P., Dendy, J., Cardona, C., Gatehouse, J.A., 1990. Biochemical bases of seed resistance to *Zabrotes subfasciatus* (bean weevil) in *Phaseolus vulgaris* (common bean); a mechanism for arcelin toxicity. J. Insect Physiol. 36, 757-767.

Moller, J.V., Juul, B., Maire, M., 1996. Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* 1286, 1-51.

Moraes, M.O., Fonteles, M.C., Moraes, M.E.A., Machado, M.I.L., Matos, F.J.A., 1997. Screening for anticancer activity of plants from the Northeast of Brazil. *Fitoterapia* 68, 235-239.

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.

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

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.

Oliveira, A.S., Pereira, R.A., Lima, L.M., Morais, A.H.A., Melo, F.R., Franco, O.L., Bloch Jr., C., Grossi de Sá, M.F., Sales, M.P., 2002. Activity toward bruchid pest of a Kunitz-type inhibitor from seeds of the Algaroba tree (*Prosopis juliflora* D.C.). *Pestic. Biochem. Physiol.* 72, 122-132.

Pedersen, P.L., 2002. Transport ATPases in biological systems and relationship to human disease: a brief overview. *J. Bioenerg. Biomembr.* 34, 327-332.

Pinheiro, C.U.B., Frazão, J.M.F., 1995. Integral processing of babassu palm (*Orbignya phalerata*, Arecaceae) fruits: Village level production in Maranhão, Brazil. *Econ. Bot.* 49, 31-39.

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

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.

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.

Scarborough, G.A., 1999. Structure and function of P-type ATPases. Curr. Opin. Cell Biol. 11, 517-522.

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

Schmale, I.S., Wackers, F.L., Cardona, C., Dorn, S., 2001. Control potential of three hymenopteran parasitoid species against the bean weevil in stored beans: the effect of adult parasitoid nutrition on longevity and progeny production. Biol. Control 21, 134-139.

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.

Schmid, S.L., McNiven, M.A., De Camilli, P., 1998. Dynamin and its partners: a progress report. Curr. Opin. Cell Biol. 10, 504-512.

Schweikl, H., Klein, U., Schindlbeck, M., Wieczorek, H., 1989. A vacuolar-type ATPase, partially purified from potassium transporting plasma membranes of tobacco hornworm midgut. J. Biol. Chem. 164, 11136–11142.

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.

Siemens, D.H., Johnson, C.D., Woodman, R.L., 1991. Determinants of host range in bruchid beetles. Ecology 72, 1560-1566.

Silva, B.P., Parente, J.P., 2001. An anti-inflammatory and immunomodulatory polysaccharide from *Orbignya phalerata*. Fitoterapia 72, 887-893.

Silva, C.P., Terra, W.R., Xavier-Filho, J., Grossi de Sá, M.F., Lopes, A.R., Pontes, E. G., 1999. Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on α -amylases and oligosaccharidases. Insect Biochem. Molec. Biol. 29, 355-366.

Silva, C.P., Terra, W.R., Lima, R.M., 2001a. Differences in midgut serine proteinases from larvae of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 47, 18-28.

Silva, C.P., Terra, W.R., Xavier-Filho, J., Grossi de Sá, M.F., Isejima, E.M., DaMatta, R.A., Miguens, F.C., Bifano, T.D., 2001b. Digestion of legume starch granules by larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) and the induction of α -amylases in response to different diets. Insect Biochem. Molec. Biol. 31, 41-50.

Silvius, K.M., Fragoso, J.M.V., 2002. Pulp handling by vertebrate seed dispersers increases palm seed predation by bruchid beetles in the northern Amazon. J. Ecol. 90, 1024-1032.

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

- 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.
- Terra, W.R., Cristofolletti, P.T., 1996. Midgut proteinases in three divergent species of Coleoptera. Comp. Biochem. Physiol. 113B, 725-730.
- Toyoshima, C., Nomura, H., 2002. Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium. Nature 418, 605-611.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., Ogawa, H., 2000. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. Nature 405, 647-655.
- Tran, B., Huignard, J., 1992. Interactions between photoperiod and food affect the termination of reproductive diapause in *Bruchus rufimanus* (Boh.), (Coleoptera, Bruchidae). J. Insect Physiol. 38, 633-637.
- Tuda, M., Morimoto, K., 2004. A new species *Megabruchidius sophorae* (Coleoptera, Bruchidae), feeding on seeds of *Styphnolobium* (Fabaceae) new to Bruchidae. Zool. Sci. 21, 105-110.
- Vale, R.D., 1999. Millennial musings on molecular motors. Trends Cell Biol. 9, M38-M42.
- Vale, R.D., 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. Cell 112, 467-480.
- Weber, J., Senior, A.E., 1997. Catalytic mechanism of F₁-ATPase. Biochim. Biophys. Acta 1319, 19-58.

Wieman, K.F., Nielsen, S.S., 1988. Isolation and partial characterization of a major gut proteinase from larval *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera, Bruchidae). Comp. Biochem. Physiol. 89B, 419-426.

Wink, M.R., Buffon, A., Bonan, C.D., Valenzuela, M.A., Sarkis, J.J.F., Battastini, A.M.O., 2000. Effect of protein-modifying reagents on ecto-apyrase from rat brain. Int. J. Biochem. Cell Biol. 32, 105-113.

Wolenski, J.S., 1995. Regulation of calmodulin-binding myosins. Trends Cell Biol. 5, 310-316.

Woo, A.L., James, P.F., Lingrel, J.B., 1999. Characterization of the fourth α isoform of the Na^+/K^+ -ATPase. J. Membrane Biol. 169, 39-44.

Zimmermann, H., 1999. Two novel families of ectonucleotidases: molecular structure, catalytic properties and a search for function. Trends Pharmacol. Sci. 20, 231-236.

CAPÍTULO ÚNICO

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

1. RESUMO

Uma fração com alta atividade Ca^{2+} -ATPásica foi obtida a partir de larvas de *Pachymerus nucleorum*. As larvas foram dissecadas para a retirada do aparelho digestivo. O restante do corpo foi homogeneizado em tampão de extração e centrifugado a $15000\times g$ por 30 minutos. A fração precipitada resultante P1 foi homogeneizada em tampão de ressuspensão contendo Triton X-100 0,2%, incubada por 20 minutos em temperatura ambiente e centrifugada nas mesmas condições. O precipitado, fração P2, foi então homogeneizado em tampão de ressuspensão contendo pirofosfato 50 mM. Após incubação por 20 minutos em temperatura ambiente seguiu-se centrifugação a $40000\times g$ por 30 minutos. A fração precipitada P3 foi homogeneizado em tampão de ressuspensão e apresentou alta atividade Ca^{2+} -ATPásica, que foi caracterizada. A fração P3 não apresentou atividade ATPásica significativa em presença de alguns cátions: magnésio, cobalto, cobre, zinco, bário, lítio ou ferro. A alta atividade Ca^{2+} -ATPásica é inibida em presença de cobalto, cobre, zinco, bário ou ferro 4 mM. Magnésio 0,25 mM causa inibição de 50% desta atividade. Em presença de ATP 1 mM, a atividade ATPásica de P3 chega a 50% com CaCl_2 0,5 mM, atingindo um

platô com 2 mM. Com CaCl_2 1 mM, a atividade ATPásica atinge 50% com 0,7 mM de ATP e o pico com 2 mM. Contudo, observa-se que há um leve decaimento desta atividade com concentrações de ATP maiores que 2 mM. P3 não utiliza pirofosfato nem nucleotídeos mono e difosfato como substratos, e a atividade Ca^{2+} -GTPásica é apenas 20% da Ca^{2+} -ATPásica. Esta fração não sofre inibição significativa por vanadato, em concentrações menores que 200 μM , azida, Triton X-100 ou fluoreto de alumínio. A atividade K^+ /EDTA-ATPásica é 50% da Ca^{2+} -ATPásica, e não ocorreu marcação com anticorpos anti-miosinas II ou V. Neste trabalho obtivemos uma fração enriquecida em atividade Ca^{2+} -ATPásica a partir de larva de *Pachymerus nucleorum* sem aparelho digestivo, e caracterizamos parcialmente tal atividade.

2. ABSTRACT

A high Ca^{2+} -ATPase activity fraction was obtained from *Pachymerus nucleorum* larvae. The larvae were dissected in order to take off the digestive system. The remaining material was homogeneized in extraction buffer and centrifuged at $15000\times g$ for 30 minutes. The resulting precipitate, fraction P1, was homogeneized in imidazole buffer containing Triton X-100 0.2%, incubated for 20 minutes at room temperature and centrifuged under the aforementioned conditions. The precipitate fraction P2 was homogeneized in imidazole buffer containing 50 mM pyrophosphate. After incubation for 20 minutes at room temperature, a centrifugation at $40000\times g$ for 30 minutes was done. The precipitate fraction P3 was homogeneized in imidazole buffer and presented high Ca^{2+} -ATPase activity that was characterized. The fraction P3 did not present significant ATPase activity in presence of some cations: magnesium, cobalt, copper, zinc, barium, lithium or iron. The high Ca^{2+} -ATPase activity was inhibited in presence of 4 mM cobalt, copper, zinc, barium or iron. 0.25 mM magnesium caused 50% inhibition of this activity. In presence of 1 mM ATP the P3 ATPase activity gets 50% with 0.5 mM CaCl_2 , reaching a plateau with 2 mM. In presence of 1 mM

CaCl₂ the ATPase activity gets 50% with 0.7 mM ATP and the pick with 2 mM. However we observed that there is a slight decline of this activity with ATP concentrations higher than 2 mM. P3 used neither pyrophosphate nor mono- or diphosphate nucleotides as substrate, and the Ca²⁺-GTPase activity is only 20% that of the Ca²⁺-ATPase. This fraction did not undergo significant inhibition by vanadate, in concentrations smaller than 200 µM, azide, Triton X-100 or aluminum fluoride. The K⁺/EDTA-ATPase activity was 50% of the Ca²⁺-ATPase and did not occur immunoreactivity with anti-myosin II or V antibodies. In this work we obtained a Ca²⁺-ATPase activity enriched fraction from *Pachymerus nucleorum* larvae lacking digestive system and partially characterized this activity.

3. INTRODUÇÃO

Os bruquíneos são conhecidos como besouros de sementes ou carunchos. Após a oviposição sobre frutos ou sementes, a larva emergente penetra e realiza seu desenvolvimento dentro da semente ou fruto e, na maioria das vezes, somente emerge como adulto, sendo as maiores pragas de grãos de legumes estocados no mundo (Southgate, 1979).

Os insetos da subfamília Bruchinae são normalmente pragas de leguminosas, exemplos mais comuns são *Callosobruchus maculatus* F., *Zabrotes subfasciatus* Bohemann e o *Acanthoscelides obtectus* Say, ambas pragas de feijão armazenado, sendo as espécies mais estudadas (Carvalho & Rossetto, 1968; Abate & Ampofo, 1996; Maldonado et al., 1996; Sanon et al., 1998; Schmale et al., 2003; Teixeira & Zucoloto, 2003), mas há espécies que atacam outras famílias vegetais como palmeiras. A espécie *Pachymerus nucleorum* (Fabricius) ataca diferentes espécies vegetais, entre elas o babaçu (*Orbygnia* spp.). Muito pouco é conhecido sobre a bioquímica deste inseto, que causa

prejuízo na economia do babaçu, vegetal do qual dependem muitas famílias numa das regiões mais pobres do Brasil (May et al., 1985).

A bioquímica e biologia molecular de insetos têm sido bastante pesquisadas (Funk et al., 1995; Jongsma & Bolter, 1997; Kergoat et al., 2004; Rodríguez-Pérez et al., 2005), sendo amplo o estudo de enzimas como as ATPases (Lockyer et al., 1998; Pullikuth & Gill, 1999; O'Donnell et al., 2003; Ping et al., 2004; Mermall et al., 2005). As ATPases hidrolisam o fosfato γ da molécula de ATP e usam a energia liberada nesse processo para a realização de trabalho celular, como contração muscular, batimento de cílios e flagelos, transporte de organelas e de vesículas, transporte de metabólitos através de membranas, emissão de pseudópodes em amebas, fagocitose, migração de cromossomos na divisão celular e citocinese são alguns exemplos do papel desempenhado pelas ATPases celulares (Clarke & Spudick, 1977; Endow & Titus, 1992; Hirokawa, 1998; Karcher et al., 2002; Welte, 2004).

Ca^{2+} -ATPases, ou bombas de cálcio, são ATPases tipo P que requerem cálcio para sua atividade ATPásica e estão presentes na membrana plasmática, nos retículos endoplasmático e sarcoplasmático, no complexo de Golgi, no envelope nuclear, entre outras organelas. Estas bombas impulsionam o cálcio para os espaços extracelulares ou para o lúmen dos retículos. A célula necessita dessa diversidade de Ca^{2+} -ATPases para manter a homeostase do cálcio (Marín et al., 1999; Carafoli, 2002; Carafoli, 2003). Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática é constituída por uma única cadeia polipeptídica de ~134 kDa, com domínio de ligação à calmodulina na extremidade C-terminal (Carafoli, 1997). Ca^{2+} -ATPase de retículo tem cerca de 100 kDa (variando conforme a isoforma) e não é regulada por calmodulina (Marín et al., 1999). As Ca^{2+} -ATPases de membrana plasmática são mais sensíveis ao vanadato do que as presentes em retículos (Marín et al., 1999).

Algumas ATPases motoras, ou motores moleculares, também apresentam alta atividade Ca^{2+} -ATPásica. Dentre estes, as miosinas compõem uma superfamília com pelo menos 20 classes distintas estrutural e funcionalmente (Krendel & Mooseker, 2005). A atividade Mg^{2+} -ATPásica de miosinas é baixa na ausência de actina, mas é fortemente estimulada na sua presença (Maruta & Korn, 1977). Algumas miosinas da classe I e também da classe II, por exemplo,

apresentam uma alta atividade Ca^{2+} -ATPásica (Maruta & Korn, 1977; Collins & Borysenko, 1984; Conzelman & Mooseker, 1987). Miosinas são menos sensíveis ao vanadato em relação aos outros motores moleculares: cinesinas e dineínas (Gibbons et al., 1978; Goodno, 1979; Kuznetsov & Gelfand, 1986; Conzelman & Mooseker, 1987; Kachar et al., 1987; Shpetner et al., 1988; Yokota & Mabuchi, 1994). O objetivo do presente trabalho foi caracterizar atividade ATPásica de larva do besouro *Pachymerus nucleorum*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Os reagentes imidazol, EDTA, EGTA, β -mercaptoetanol, nucleotídeos, inibidores de proteases, reagentes para eletroforese, sacarose, pirofosfato tetrasódico, Na_3VO_4 , KCl, CoCl_2 , FeSO_4 e NBT/BCIP foram obtidos de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.2. Preparação da fração ATPase

As larvas foram retiradas dos frutos de babaçu, lavadas com água e dissecadas para a retirada do aparelho digestivo. O restante dos tecidos das larvas foi colocado em tampão de extração (imidazol 50 mM pH 7,5, sacarose 250 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, β -mercaptoetanol 2 mM, aprotinina 2 $\mu\text{g/mL}$ e

benzamidina 1 mM) na proporção de 0,1 g de tecido para cada mL de tampão, e homogeneizado em triturador elétrico, ESGE[®]. O material homogeneizado foi centrifugado a 15.000_xg durante 30 minutos a 4 °C em centrífuga Sigma[®] 3K30. O precipitado (P1) foi homogeneizado em tampão de ressuspensão (imidazol 20 mM pH 7,5, EDTA 0,2 mM, β-mercaptoetanol 2 mM e benzamidina 0,1 mM) contendo Triton X-100 0,2%, incubado em temperatura ambiente por 20 minutos e centrifugado a 15.000_xg durante 30 minutos a 4 °C, sendo a fração precipitada P2 ressuspensa em tampão de ressuspensão contendo pirofosfato de sódio 50 mM e uma nova centrifugação foi realizada a 40.000_xg durante 30 minutos a 4 °C. A fração precipitada P3 foi homogeneizada em tampão de ressuspensão, denominada fração ATPase. As frações precipitadas foram homogeneizadas no mesmo volume do homogeneizado de larvas.

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%.

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

4.4. Western blotting/Imunoblotting

Realizou-se SDS-PAGE utilizando gel de poliacrilamida a 7%. Os polipeptídeos separados em gel foram então transferidos para membrana de nitrocelulose seguindo o método descrito por Towbin et al. (1979).

Após transferência, a membrana foi bloqueada com leite em pó desnatado a 5% (w/v). Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo primário policlonal contra cadeia pesada de miosina II de cérebro de rato ou contra cadeia pesada de miosina V de cérebro de rato, ambos produzidos em coelho. Após lavagem, a membrana foi incubada com anticorpo secundário contra IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina e revelada com NBT/BCIP. O controle positivo usado para o ensaio foi uma fração de actomiosina de cérebro de porco.

4.5. 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.

4.6. Dosagem da atividade de hidrólise de nucleotídeos

A dosagem colorimétrica do ortofosfato inorgânico liberado durante a reação de hidrólise do substrato foi realizada segundo o método de Heinonen & Lahti (1981). Para a dosagem de atividade cátion-ATPásica, utilizou-se o meio de reação imidazol 25 mM pH 7,5; DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM contendo 4 mM dos respectivos cátions. A atividade K^+ /EDTA-ATPásica foi dosada em meio de reação imidazol 25 mM pH 7,5; DTT 1 mM, EDTA 2 mM contendo KCl 60 ou 600 mM.

Volumes pré-determinados de amostras das frações protéicas foram adicionados aos meios de reação e o volume final de 200 μ L foi completado com adição de H₂O 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.

4.7. Análises estatísticas

Os resultados estão representados graficamente como médias $\pm$ erro padrão (SEM) com um número mínimo de três experimentos ($n = 3$). Os dados foram comparados ao valor hipotético da média dos ensaios controles para cada tipo de dosagem, utilizando o teste “t” pelo software GraphPad Prism® versão 4.00.

5. RESULTADOS

O perfil protéico do fracionamento do homogeneizado de larvas para a obtenção da fração ATPase foi analisado em SDS-PAGE (Fig. 1). Observa-se que alguns polipeptídeos, como um de mobilidade relativa superior à cadeia pesada de miosina II (205 kDa) e outros em torno de 84 e 74 kDa apresentaram-se mais fortemente corados na fração S1. A fração precipitada P1 apresentou polipeptídeos de variadas mobilidades relativas, destacando-se alguns corados mais intensamente com mobilidades relativas de cerca de 200, 130, 102, 54, 44, 34, 31, 27, 26 e 19 kDa. A incubação dessa fração com o detergente Triton X-100 0,2% solubilizou vários polipeptídeos, resultando em uma fração precipitada P2 mais límpida. A concentração protéica de P1 é cerca de 5 mg/mL, enquanto que P2 apresenta aproximadamente 4 mg/mL, ou seja, cerca de 20% das proteínas foram solubilizadas com tampão contendo Triton X-100 0,2%.

A incubação da fração P2 com PPI 50 mM causou a solubilização parcial de polipeptídeos de 200, 130, 102, 54, 44 e 26 kDa, sendo que o de 44 kDa apresentou-se em maior parte na fração solúvel S3 e os outros se apresentaram

divididos entre a fração solúvel e a precipitada P3 e os polipeptídeos de 180, 34, 31, 27, 26 e 19 kDa praticamente não foram solubilizados (Fig. 1). A concentração protéica da fração ATPase é, em média, 3,2 mg/mL, sendo que 20% do conteúdo protéico ficou solúvel.

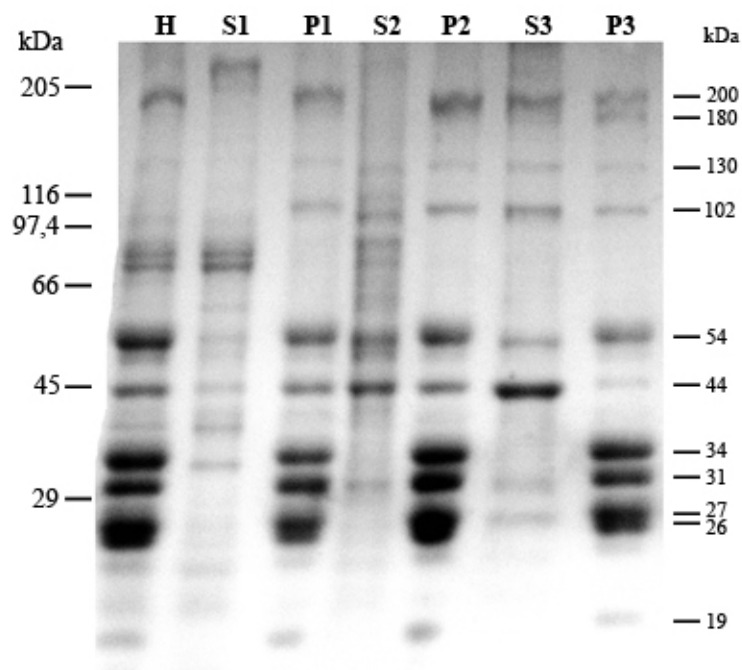


Figura 1: SDS-PAGE de frações de larva de *Pachymerus nucleorum*. Foram aplicados 5 µg de proteínas de cada fração em gel gradiente de poliácridamida de 5 a 22%. Os valores à esquerda correspondem aos marcadores de massa molecular. Os valores à direita indicam as massas aproximadas dos principais polipeptídeos presentes na fração P3.

ATPases, em geral, necessitam da presença de cátions bivalentes para a sua atividade de hidrólise do ATP, sendo cálcio e magnésio os principais. Dosando-se a atividade enzimática de hidrólise do ATP das frações, em presença tanto de magnésio quanto de cálcio, verificamos que existem atividades Mg^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ATPásica similares para o homogeneizado de larvas e para as frações P1 e S2, sendo o S2 a fração com maior atividade específica (Mg^{2+} -ATPásica próxima de 88 nmols Pi/mg/min. e Ca^{2+} -ATPásica com cerca de 84 nmols Pi/mg/min.). A fração P2 apresentou atividade Mg^{2+} -ATPásica específica aproximada de 12 nmols Pi/mg/min., diferente da Ca^{2+} -ATPásica, de 34 nmols Pi/mg/min. A fração solúvel S3 não apresentou atividade hidrolítica de ATP

relevante e P3 mostrou uma alta atividade Ca^{2+} -ATPásica (56,5 nmols Pi/mg/min.) e Mg^{2+} -ATPásica baixa (3 nmols Pi/mg/min.), 18 vezes menor que a Ca^{2+} -ATPásica (Fig. 2).

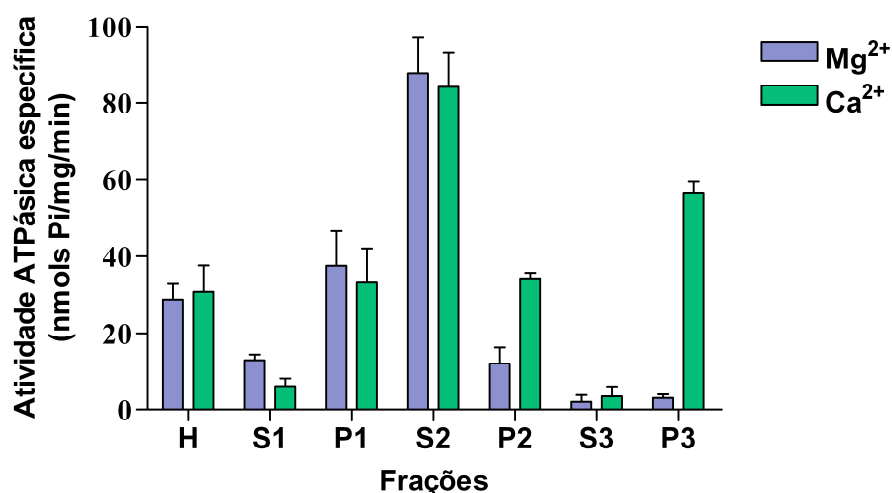


Figura 2: Atividades Mg^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ATPásica específica de frações de larva de *Pachymerus nucleorum*. A respectiva fração foi adicionada ao meio de reação imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM, contendo MgCl_2 4 mM ou CaCl_2 4 mM, como indicado. Iniciou-se a reação com 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 acima das colunas indicam o erro padrão (SEM) para 3 experimentos.

A atividade ATPásica da fração P3 foi testada em presença de diferentes cátions (Fig. 3). O ensaio controle, na ausência de cátions, mostrou uma baixa taxa de hidrólise de ATP de cerca de 4 nmols Pi/mg/min. Em presença de cálcio, essa fração apresentou a atividade ATPásica mais elevada, sendo aproximadamente 12 vezes maior que o controle. P3 não apresentou atividade ATPásica significativa em presença de cobalto, cobre, zinco, bário, lítio ou ferro (férico ou ferroso). O ascorbato, usado para evitar a oxidação espontânea do ferro do estado ferroso para férico, também não apresentou alteração na atividade. O manganês mostrou uma significativa atividade ATPásica (27,5 nmols Pi/mg/min), cerca de 55% da atividade Ca^{2+} -ATPásica (Fig. 3). Na ausência de cátions, a atividade ATPásica de P3 é baixa, mas não é nula, mesmo na presença de quelantes (Fig. 4).

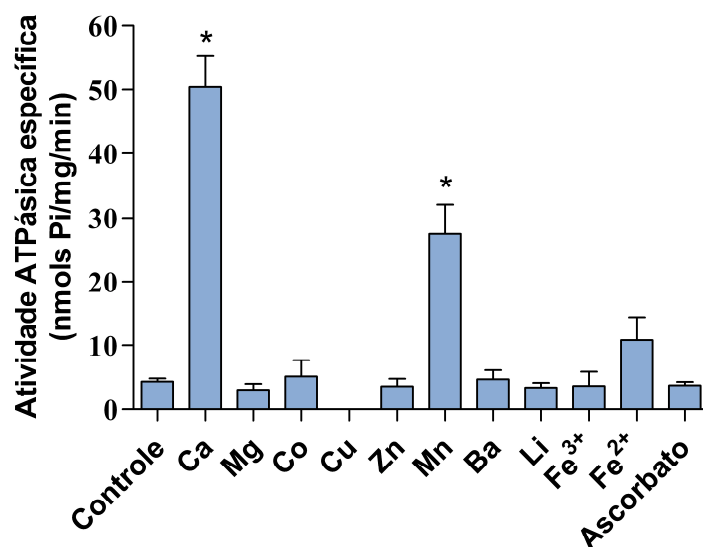


Figura 3: Atividade ATPásica específica da fração P3 em presença de diferentes cátions.

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 cada cátion indicado. 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 acima das colunas indicam o erro padrão (SEM) para 3 experimentos.

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

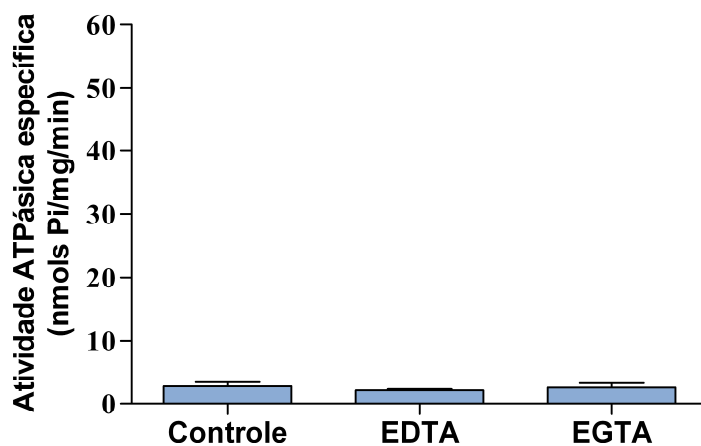


Figura 4: Efeito de compostos quelantes de cátions na atividade ATPásica de P3.

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 EDTA 5 mM ou EGTA 5 mM, como indicado. 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 acima das colunas indicam o erro padrão (SEM) para 3 experimentos.

Levando-se em conta que a fração P3 utiliza preferencialmente o cátion cálcio, analisamos a influência de outros cátions na sua atividade Ca^{2+} -ATPásica. Os cátions bivalentes magnésio, cobalto e zinco causaram inibição próxima de 90% desta atividade. O cobre inibiu totalmente a atividade Ca^{2+} -ATPásica de P3. O manganês inibiu metade da atividade, bário inibiu 15% e ferro, no estado ferroso 25%, e no estado férrico 33%. O cátion lítio não promoveu alteração na atividade Ca^{2+} -ATPásica. Ascorbato também não mostrou influência nessa atividade (Fig. 5).

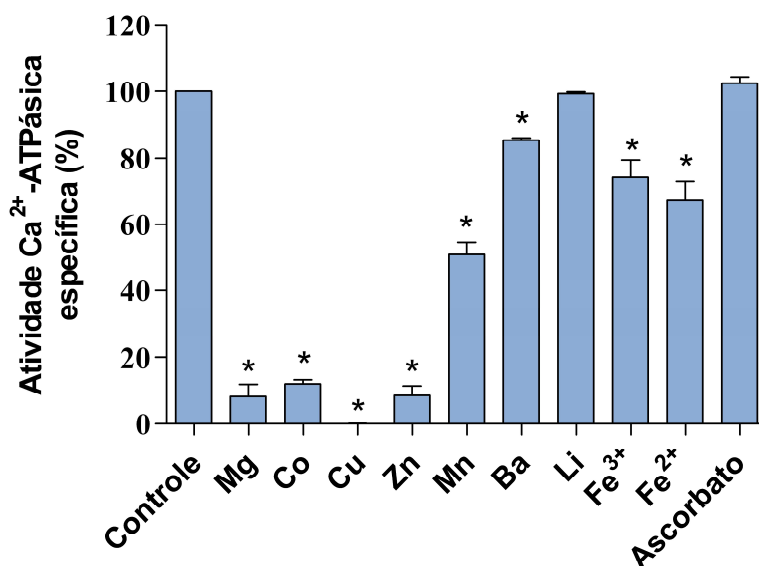


Figura 5: Efeito de cátions na atividade Ca^{2+} -ATPásica da fração ATPase. Aproximadamente 170 μg de proteínas da fração P3 foram adicionados ao meio de reação imidazol 25 mM pH 7,5, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, KCl 60 mM, contendo CaCl_2 4 mM e 4 mM de cada cátion indicado. Iniciou-se a reação com a adição 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 acima das colunas indicam o erro padrão (SEM) para 3 experimentos.

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

A atividade Ca^{2+} -ATPásica da presente fração P3 foi sensivelmente inibida por magnésio (Fig. 6). Observa-se que 50% de inibição ocorre com 0,25 mM de cloreto de magnésio, bem como verificamos 70% de inibição com 0,5 mM de magnésio. Com 2 mM de MgCl_2 a atividade Ca^{2+} -ATPásica mostrou-se apenas 12% do controle.