

CAPÍTULO 1

1

Vitelogênese nos Ecdisozoa: Nematoides e Insetos como Exemplos.

Hatisaburo Masuda¹, Isabela B. Ramos¹ e Carlos E. Winter²

¹Laboratório de Bioquímica de Insetos, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro - CCS - Bloco H, Cid. Universitária – Ilha do Fundão, 21941-590 Rio de Janeiro, RJ.

²Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, 05508-900 São Paulo – SP.

Copyright: © 2012 [Hatisaburo Masuda, Isabela B. Ramos e Carlos E. Winter]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Considerações Iniciais

Durante o desenvolvimento embrionário todo ser vivo necessita de uma fonte de nutrientes para satisfazer suas necessidades metabólicas e de crescimento. A nossa visão "mamíferocêntrica" nos impede de ver que a maioria dos animais multicelulares (metazoários) tem seu desenvolvimento embrionário num sistema fechado, o ovo. A dependência constante da mãe como fonte de alimento durante o desenvolvimento embrionário, ou viviparidade, surgiu independentemente em diversos taxa de animais. Podemos observá-lo entre quase todos os vertebrados, sendo a regra somente entre os mamíferos placentários. Entre os invertebrados há diversos exemplos. Algumas espécies de Onychophora, que teoricamente estão na base de todos os artrópodes, como a espécie brasileira *Peripatus acacioi* (habitante dos morros de Ouro Preto), apresentam uma placenta análoga àquela existente nos mamíferos placentários (Cuénot, 1949).

No entanto, a vasta maioria dos animais supre seus embriões com nutrientes suficientes para seu desenvolvimento embrionário e início da vida pós-embrionária colocando-os dentro de um ovo, que depois será depositado no ambiente externo. O investimento feito pela mãe na construção do ovo possui dois aspectos: um metabólico e outro informacional. O desenvolvimento embrionário depende das reservas depositadas no vitelo, composto principalmente de proteínas e lipídeos e dos determinantes de origem materna distribuídos desigualmente no citoplasma. Os determinantes de origem materna foram exaustivamente estudados por Christiane Nusslein-Volhard e Eric Wieschaus em *Drosophila melanogaster*, o que garantiu para eles e Edward B. Lewis o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1991.

Vitelogênese nos Metazoários¹.

O processo de "construção" do ovo em animais ovíparos é chamado de ovogênese e ocorre concomitantemente à meiose dos ovócitos existentes nos ovários. A peculiaridade deste desenvolvimento é que cada ovogônia diplóide dá origem a um único ovócito secundário haplóide, ao contrário do que ocorre com os espermatozoides, em que cada espermatogônia dá origem a quatro espermatozoides haplóides (ver Alberts e cols., 2002). Isso se deve ao fato de que somente uma célula das quatro originadas da ovogônia acumulará vitelo suficiente para se tornar um ovo apto a ser fertilizado e originar um zigoto viável. Nos insetos os ovários estão divididos em ovariolos e cada ovariolo apresenta uma série de ovócitos que amadurecem da parte distal para a proximal. Morfologicamente e funcionalmente podemos classificar os ovariolos em três tipos básicos: Panoístico, Meroístico telotrófico e meroístico politrófico (**Figura 1**) (Kunkel, 1991). Nos três tipos as células foliculares circundam as células germinativas e interagem intimamente com elas durante o desenvolvimento do ovócito. O ovário panoístico é o de morfologia mais simples: consiste de um ovócito circundado por uma camada de células foliculares. Os dois ovários meroísticos possuem uma fisiologia e desenvolvimento mais complicado. As ovogônias, localizadas no germário (**Figura 1**), se dividem por mitoses para formar um conjunto de células irmãs, os cystócitos, que permanecem conectados por pontes citoplasmáticas formando um sincício. Nos Dípteros Muscamorpha, com ovários meroísticos politróficos a ovogênese foi mais bem estudada. Após a quarta divisão mitótica, um dos dois

¹ Neste capítulo não incluiremos dados sobre vitelogênese em crustáceos e aracnídeos. Devido à importância econômica (e facilidade de cultivo) de algumas espécies de crustáceos de água doce e marinhas, há inúmeros artigos sobre essa classe de artrópodos. A revisão de Wilder e cols., (2002) apresenta uma tabela com as principais características das vitelogeninas e proteínas do vitelo de crustáceos. Para uma discussão sobre vitelogênese em carrapatos ver a revisão de Taylor e Chinzei (2002).

cistócitos com quatro pontes citoplasmáticas, diferencia-se no ovócito e sofre meiose. As outras 15 células do folículo, que serão as futuras células acessórias (“nurse cells”), sofrem sucessivas endomitoses (replicação do DNA nuclear sem citocinese) tornando-se poliplóides. As células acessórias sintetizam e transportam macromoléculas para dentro do ovócito em desenvolvimento que vão contribuir para a formação do padrão do embrião. Nos nematoides o ovário tem uma estrutura parecida com um ovário panoístico de insetos (ver <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/reproductive/Reproframeset.html>).

Durante a ovogênese, o ovócito acumula dentro de seu citoplasma o que chamamos de vitelo, uma série de nutrientes (proteínas, lipídeos, carboidratos e íons inorgânicos) que ficam contidos em organelas envolvidas por membranas, chamados de grânulos de vitelo. Esses grânulos de vitelo nada mais são do que endossomos secundários que ficam estacionados até o início da embriogênese quando o conteúdo dos grânulos começa a ser utilizado, após a ativação de uma série de hidrolases. O processo de formação do vitelo é chamado de vitelogênese, e é sobre ele que iremos falar aqui, usando como exemplo os animais pertencentes ao clado Ecdisozoa. Os Ecdisozoa pertencem ao grupo dos Metazoários Protostômios (aqueles nos quais a boca se origina do blastóporo). O crescimento do ovócito durante a

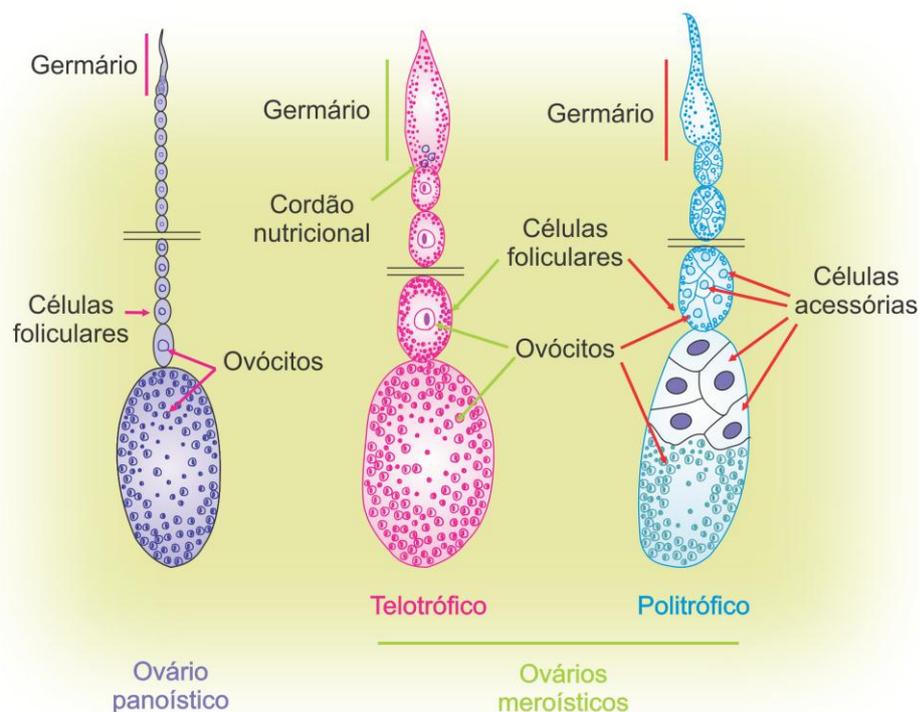


Figura 1 – Tipos de ovários de insetos. Modificado de Kunkel (1991).

ovogênese se deve a diversos fatores. Neste capítulo vamos tecer comentários sobre o acúmulo de vitelogeninas assim como de outras proteínas, lipídeos e outros componentes minoritários que são transportados e acumulados no interior dos grânulos de vitelo.

Em 1943, Vincent B. Wigglesworth descrevendo o destino de hemoglobinas em vários artrópodes hematófagos sugeriu que em *Rhodnius prolixus*, um pigmento de cor rosa (hemoproteína), de origem hemolinfática era acumulado no interior de

seus ovos. No mesmo artigo Wigglesworth mostrou ainda que fenômeno semelhante ocorria também com o carrapato bovino *Boophilus microplus* (atualmente denominado *Rhipicephalus microplus*) que produz milhares de ovos marrons após a ingestão do sangue do hospedeiro. Este artigo foi de fato o primeiro a relatar a possibilidade de que proteínas de origem extra-ovariana poderiam ser acumuladas nos ovócitos. Este trabalho pioneiro abriu o caminho para o conhecimento sobre o processo de acumulação de proteínas em ovócitos em crescimento. Telfer (1954) observou a presença na hemolinfa de uma proteína característica de fêmeas adultas de Lepidoptera e que se encontrava no interior dos ovócitos em crescimento. Essa mesma proteína que não estava presente em machos da espécie foi denominada de **VITELOGENINA**. Devido à natureza heterossintética da vitelogênese nos insetos os seus ovócitos apresentam um conjunto completo e complexo de estruturas capazes de selecionar, internalizar e estocar proteínas específicas, como microvilosidades, depressões recobertas (“coated pits”), vesículas recobertas (“coated vesicles”) e grânulos de vitelo.

A vitelogenina acumulada no interior dos ovócitos é referida como vitelina para diferenciá-la da forma circulante que é a vitelogenina. Mais tarde mostrou-se que a vitelogenina existia em outros animais ovíparos e que sua biossíntese era dependente de hormônios esteróides em anfíbios (Wallace, 1985). Na **Figura 2** mostramos um esquema de como ocorre a produção de vitelogenina nos Ecdysozoa mais estudados: insetos e nematoides (Arthromint). A produção dessas proteínas pode ser dividida em quatro etapas: biossíntese, processamento, transporte e endocitose pelos ovócitos. Uma vez que a maquinaria de biossíntese de proteínas do ovócito é pouco ativa ou mesmo inexistente nos ovócitos, durante a ovogênese, as vitelogeninas são produzidas em massa fora do ovário (uma galinha produz 5 g de vitelogenina por dia enquanto *Rhodnius prolixus* produz de 200 até 280µg/dia) e que são importadas pelo(s) ovócito(s) em crescimento onde são armazenadas nos grânulos de vitelo. *Rhodnius prolixus* pode produzir 42 ovos contendo cerca de 120 µg de vitelogenina em cada ovo em 15 dias. Esse local de síntese é sempre um órgão de origem endodérmica (tubo digestório nos nematoides e corpo gorduroso nos insetos). Uma vez sintetizada, a vitelogenina é secretada pela via normal de secreção, passando pelo Golgi e sofrendo processamento proteolítico ou não. É então transportada pela hemolinfa (insetos) ou líquido pseudocelomático (nematoides), sendo internalizada por pinocitose mediada por receptores específicos (VTGR = “vitellogenin receptor”), localizados na superfície dos ovócitos. Uma vez no citoplasma ela é armazenada nos grânulos de vitelo.

Vamos agora examinar com mais pormenores, cada uma dessas etapas.

5

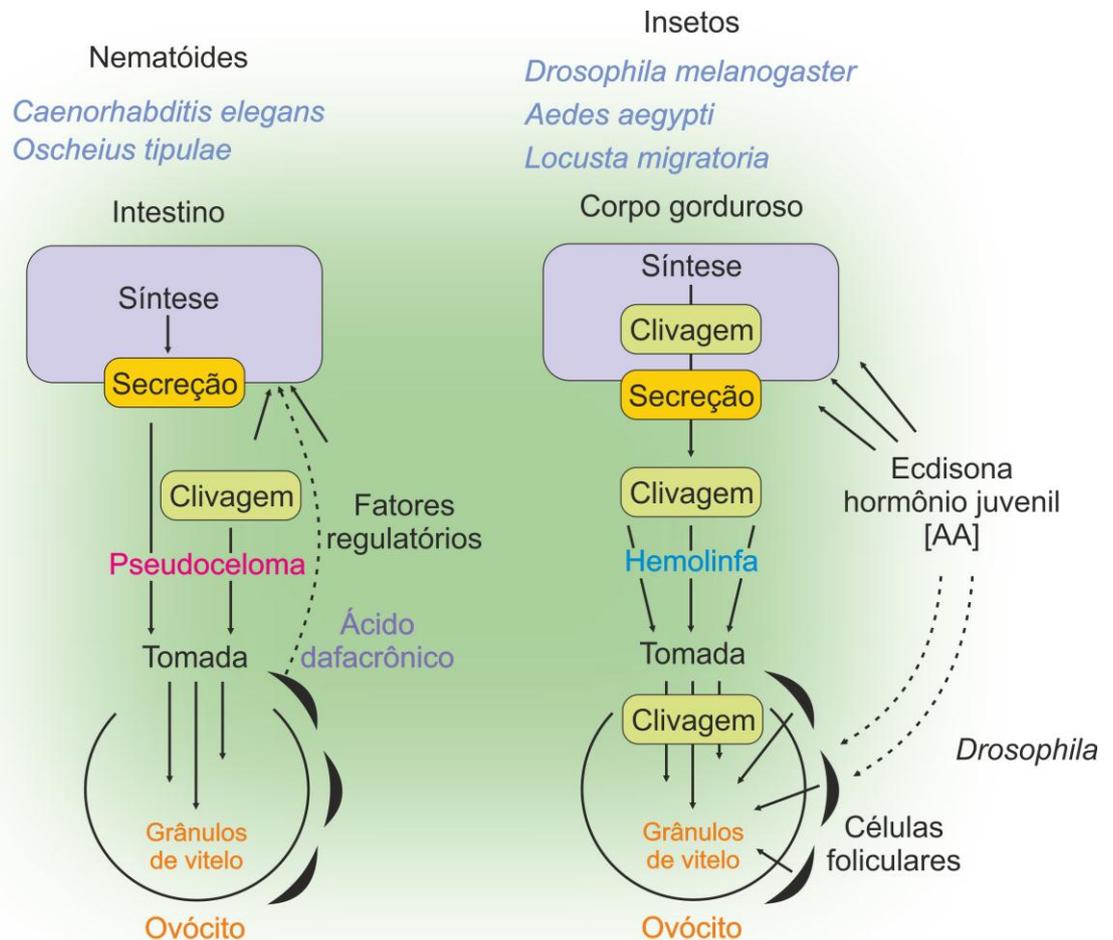


Figura 2 - Esquema da vitelogenese em ecdisozoos modelos. A presença de um esteróide em nematóides que controle a biossíntese de vitelogenina ainda é controversa, apesar de existirem alguns dados na literatura mostrando isso (ver Matyash e cols., 2005)(figura modificada de Wahli e cols., 1981).

Biossíntese.

Como discutiremos mais adiante no item sobre evolução, as vitelogeninas fazem parte da superfamília das LLTP (Large Lipid Transfer Proteins; grandes proteínas transportadoras de lipídeos).

É necessário fazer aqui um parêntese para chamar a atenção para a vitelogenese entre os Diptera Cyclorafa do clado Muscamorpha. Nestes dípteros as principais proteínas do vitelo não fazem parte das LLTP. Elas têm uma origem completamente diferente, tendo surgido de uma lipoproteína lipase ancestral (Bownes, 1992; Bownes e Pathirana, 2002). Caracterizam-se por uma massa molecular menor e são chamadas de "yolk proteins" (YP), ou na tradução literal, proteínas do vitelo. Conceitualmente não são consideradas vitelogeninas (ver discussão em Sappington e Raikhel, 2002), apesar de desempenharem as mesmas funções.

As vitelogeninas são geralmente proteínas diméricas que têm como principal grupo prostético lipídeos, que são transportados de maneira não covalente em uma região rica em folhas β das subunidades. Além disso, elas possuem carboidratos e grupos fosfato, covalentemente ligados à sua estrutura primária. Como outras lipoproteínas, as vitelogeninas carregam também cátions divalentes (principalmente Zn^{2+} e Ca^{2+}). A biossíntese ocorre no retículo endoplasmático rugoso (RER; rough endoplasmic reticulum), onde são adicionados os lipídeos por meio de um outro membro das LLTP, a MTP (*microsomal triglyceride transfer protein*; proteína microsômica de

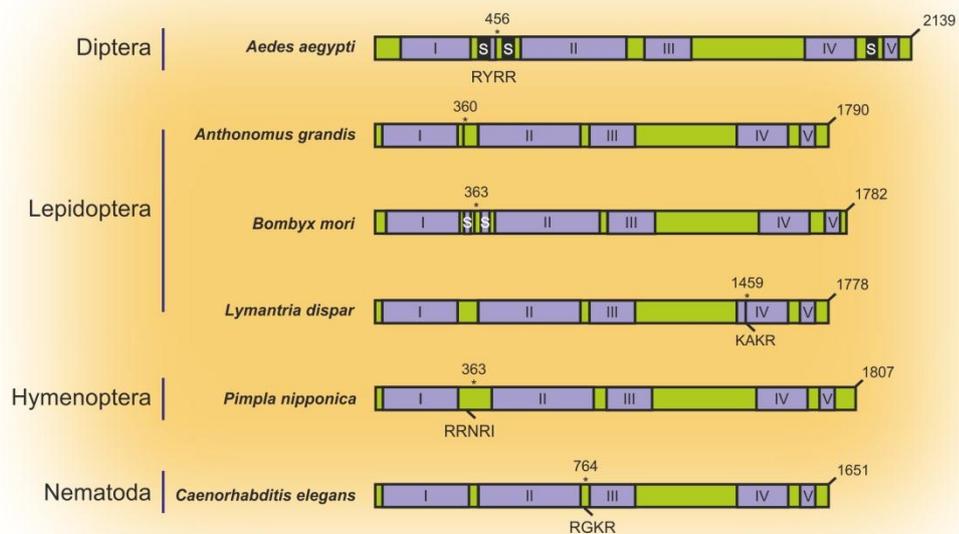


Figura 3. Comparação da estrutura primária das vitelogeninas de insetos e nematoides. Os sítios de processamento proteolítico por convertases estão indicados por asterísticos e posição do aminoácido onde ocorre a clivagem, acima dos retângulos; abaixo dos retângulos está mostrado o sítio de clivagem. Os retângulos negros marcados com S correspondem às repetições de serina. Os domínios conservados estão mostrados em lilás e numerados de I a V. O tamanho de cada vitelogenina em número de resíduos de aminoácido está mostrado na parte C-terminal de cada uma (modificado de Sappington e cols., 2002b)

transferência de triglicerídeos). A MTP é conservada em todos os eucariotos, e seu papel foi particularmente estudado na biossíntese de lipoproteínas de mamíferos. Em humanos, defeitos genéticos associados à MTP ocasionam uma doença conhecida como abetalipoproteinemia, caracterizada pela ausência quase completa de lipoproteínas que possuem apolipoproteína-B como componente (LDL e VLDL) (Schneider, 1996). A MTP é ativa no retículo endoplasmático onde atua em conjunto com a PDI (*protein disulfide isomerase*; isomerase de dissulfeto proteico), uma enzima/chaperonina da família das tioredoxinas responsável pela montagem das pontes dissulfeto entre cisteínas adjacentes na estrutura terciária das proteínas (Fink, 1999). Recentemente (Sellers e cols., 2005) mostrou-se que a MTP está envolvida na mon-

tagem da vitelogenina do anfíbio *Xenopus laevis*. Uma vez montadas as subunidades (e adicionados os açúcares e outros grupos prostéticos covalentemente ligados) da vitelogenina elas se reúnem (por meio de um domínio de dimerização existente na sua superfície; ver. Anderson e cols., 1998; Mann e cols., 1999) e passam pela via de secreção clássica no complexo de Golgi. O controle da expressão dos genes de vitelogenina será discutido num ítem separado.

Processamento.

Logo após a biossíntese no RER as VTG sofrem uma clivagem proteolítica para retirada do peptídeo sinal. Na passagem pela via de secreção, mais provavelmente no trans-Golgi, em alguns insetos e talvez em nematoides, as vitelogeninas podem sofrer uma clivagem endoproteolítica (**Figura 3**) que origina dois fragmentos assimétricos. Essa clivagem é realizada por uma serina protease da família das subtilisinas. Essa é uma família de proteases, coletivamente conhecidas como convertases e que estão envolvidas no processamento de precursores de proteínas, principalmente peptídeos. A mais conhecida delas é a furina, a enzima responsável pela clivagem do precursor de insulina em mamíferos. A única convertase caracterizada como tendo a vitelogenina como substrato, foi isolada por Chen e Raikhel (1996). Essa enzima foi co-expressa em lisado de reticulócito juntamente com a vitelogenina e assim foi possível mostrar que ela é capaz de fazer o processamento observado *in vivo*. No genoma de *C. elegans* foram encontrados quatro genes que codificam convertases (*kpc-1* a *kpc-4*) (v. <http://www.wormbase.org>). Esses genes provavelmente codificam em torno de 14 isoformas de convertases, por “splicing” alternativo de seus transcritos (Thacker & Rose, 2000). Baseado em similaridade de sequência com a convertase de mosquito, Winter (2002) sugeriu que KPC-1 seria a convertase envolvida no processamento do precursor de YP115 e YP88 (**Figura 4**). Experimentos de RNAi (interferência por RNA; ver http://en.wikipedia.org/wiki/RNA_interference) em linhagens mutantes de *C. elegans* para cada um dos quatro genes de convertase sugerem, no entanto, que há uma redundância de função e que todas as KPCs são capazes de processar o precursor de YP115 e YP88 (Nico, 2008). O sítio de clivagem do precursor de VT2 e VT3 de *Oscheius tipulae* (Winter, 1992) foi determinado por sequenciamento como sendo KR|SS (Almenara e cols., *em preparação*; Winter, 2002), enquanto o de *C. elegans* foi obtido por alinhamento com o de *O. tipulae* e deve ser KR|AS (Winter, 2002). Quando alinhado às outras vitelogeninas de *C. elegans* que não são processadas vemos que as mesmas posições são substituídas por RR|I/VQ. Parece, portanto, que a convertase envolvida necessita de uma lisina e uma arginina nas posições P2 e P1 respectivamente. A presença de uma glutamina na posição P2' pode ser responsável por impedir a clivagem.

Transporte.

Uma vez exocitada das células do órgão onde ocorreu a biossíntese, a vitelogenina irá para o hemoceloma ou pseudoceloma da fêmea. Se dosada neste momento em uma fêmea vitelogênica, sua concentração será muito baixa, pois a maioria da vitelogenina é imediatamente sequestrada pelos ovócitos em crescimento. No entanto, quando induzida em machos pela injeção de hormônio, sua concentração pode atingir níveis muito elevados, exatamente por não haver endocitose pelos ovócitos em animais deste sexo. Dados obtidos por Sharrock (1984) mostram que, dife-

rente da vitelogenina de *Aedes aegypti* que é processada intracelularmente, o precursor de YP88/YP115 de *C. elegans* é processado no pseudoceloma.

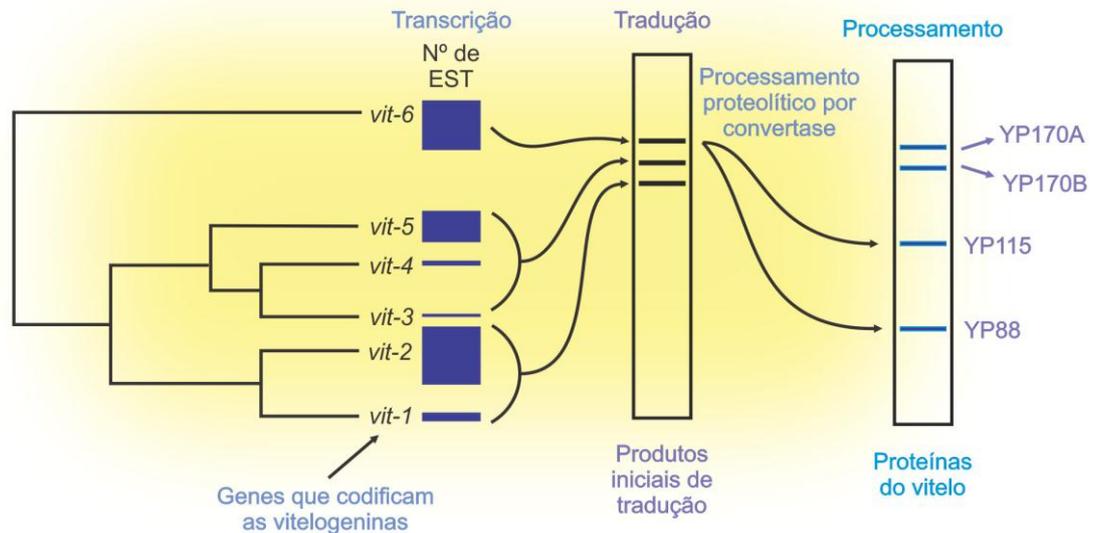


Figura 4. Genes e proteínas envolvidas na produção das proteínas do vitelo de *Caenorhabditis elegans*. Na coluna corresponde ao número de EST's a área dos retângulos corresponde ao número de EST's encontrados no WormBase, de acordo com Winter (2002).

Endocitose.

A internalização da vitelogenina pelo ovócito ocorre através da pinocitose mediada por receptores, que numa última fase gera vesículas recobertas de clatrina no citoplasma da célula. O receptor responsável pelo reconhecimento da vitelogenina pertence à família dos receptores de LDL (lipoproteína de baixa densidade) dos mamíferos. Essa família multigênica está representada somente nos metazoários e corresponde a proteínas com diversos domínios repetidos (ver **Figura 5**). O principal domínio, que caracteriza a família, é a repetição de interação com o ligante. As proteínas codificadas nesta família multigênica variam de 100 a 600 kDa e participam de diversos processos que envolvem o reconhecimento de ligantes solúveis. Os ligantes são geralmente lipoproteínas, como a LDL, VLDL ou vitelogenina (Schneider, 1996; Herz e Bock, 2002). De nosso interesse aqui são os receptores de vitelogenina

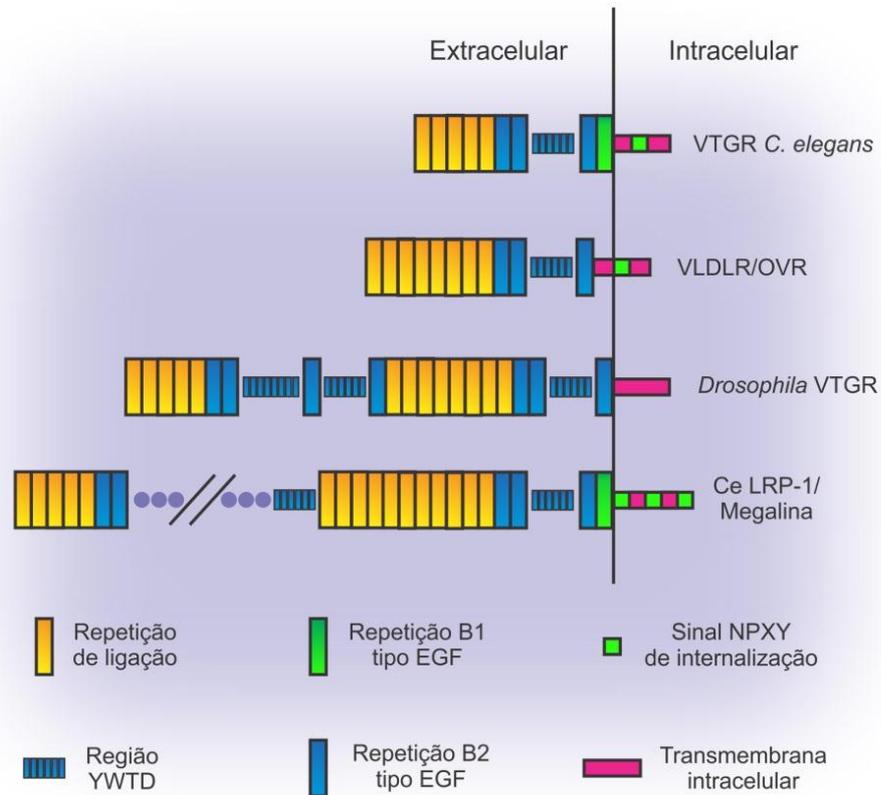


Figura 5. Esquema da estrutura primária de alguns membros da superfamília dos receptores de lipoproteína. Notar a variação do número de repetições do domínio de ligação entre os diferentes membros. Megalina é uma proteína de membrana, de aproximadamente 600 kDa, envolvida no metabolismo de vitamina D e homeostase renal, além de um papel indefinido no desenvolvimento do cérebro em mamíferos (Modificado de Grant e Hirsh, 1999).

(VTGR), cujo tamanho varia de acordo com a espécie: em vertebrados eles têm entre 95-115 kDa, enquanto em insetos eles têm praticamente o dobro do tamanho, estando entre 180 e 214 kDa (Sappington e cols., 1996). Em *C. elegans* o receptor de vitelogenina (RME-2; Grant e Sato, 2006) tem aproximadamente 106 kDa, sendo um dos menores conhecidos e colocando-o próximo dos de vertebrados. Na **Figura 5** vemos que o que varia nesses VTGR é o número de repetições que interagem com o ligante (VTG). Interessante notar que apesar das proteínas do vitelo de *Drosophila melanogaster* não pertencerem a mesma classe das vitelogeninas, elas são reconhecidas pelos receptores e internalizadas nos ovócitos de *Anopheles gambiae* (Bownes e cols., 2002) que utiliza vitelogenina e não YP. A similaridade de sequência entre os receptores de vitelogenina de *Aedes aegypti* e o receptor de YP de *Drosophila* (Sappington e cols., 1996) é a explicação para os resultados de Bownes e cols., (2002).

A via de internalização da vitelogenina está sendo muito bem estudada em *Caenorhabditis elegans* pelo grupo de Barth Grant (State University of New Jersey, NJ, EUA) (Grant e Sato, 2006). Eles construíram uma linhagem transgênica deste nematoide que secreta um dos polipeptídeos da vitelogenina fundido com GFP (Green Fluorescent Protein; proteína fluorescente verde) (YP170-GFP). Usando mutantes induzidos quimicamente ou RNAi, foram capazes de identificar o gene do nematoide que codifica o receptor de vitelogenina (denominado *rme-2*). A proteína RME-2 possui um motivo NPXY típico de domínios intracelulares que dirigem outros membros da família dos receptores de LDL para depressões cobertas de clatrina. O tráfico do vitelo e dos receptores de vitelo depende das atividades das proteínas Rab endocíticas RAB-5, RAB-7 e RAB-11, conhecidos moduladores da endocitose em todos os eucariotos. Em *Oscheius tipulae*, um nematoide rhabditídeo como *C. elegans*, experimentos de “*ligand-blotting*” mostraram que as proteínas do vitelo interagem especificamente com uma proteína de 100 kDa (P100) existente em hermafroditas adultos (Serino Jr e cols., 2008). A ligação específica com P100 também ocorre com a proteína recombinante, correspondente ao lado N-terminal de VT3, expressa em bactérias (Almenara e cols., *em preparação*).

RME-8 uma proteína envolvida na tomada de VTG em *C. elegans*, cuja função é desconhecida, possui uma ortóloga em *Drosophila melanogaster*, cujos mutantes apresentam fenótipos parecidos aos mutantes de *C. elegans*. Dentre os insetos os estudos mais recentes têm sido desenvolvidos pelo grupo do Dr. Alexander S Raikhel da Universidade da Califórnia em Riverside (ver artigos em *Reproductive Biology of Invertebrates* vol. XII part B, 2005).

Durante a embriogênese parte do vitelo será utilizada e parte será mantida como um “seguro” para o animal recém-nascido. Os lipídeos serão utilizados na construção da membrana das células durante as clivagens embrionárias e como fonte de energia. As proteínas serão degradadas a aminoácidos que serão reutilizados na biossíntese de novas proteínas. Este processo não ocorre aleatoriamente e deve ser muito bem regulado, mas pouco se sabe sobre como isso acontece. Nem todo o vitelo é consumido durante a embriogênese e o animal recém nascido ainda tem um resto de vitelinas nas células do intestino. Em *C. elegans* dados recentes mostraram que uma catepsina L é essencial para esse processo (Britton e Murray, 2004). Mutações no gene *cpl-1* que inativam uma catepsina L de *C. elegans* levam a um processamento aberrante e/ou a mudanças conformacionais nas proteínas do vitelo que resultam em fusão anormal dos grânulos de vitelo (Britton e Murray, 2004). Mutantes de *Drosophila* num gene homólogo de *cpl-1* apresentam um fenótipo semelhante (Gray e cols., 1998), mostrando que o papel desta catepsina é conservado nos Ecdisozoa.

Características Estruturais das Vitelogeninas.

As vitelogeninas apresentam algumas propriedades em comum, apesar da similaridade de sequência entre as proteínas de diversas espécies estar em torno de 35%. O esquema da **Figura 3** mostra um resumo dos dados compilados por Sappington e cols., (2002) sobre a estrutura primária das vitelogeninas de Ecdisozoa. Esses autores dividem a sequência primária de aminoácidos das subunidades de vitelogenina em cinco domínios conservados, numerados de I a V. Entre os insetos a inserção de sequências ricas em serina ocorre entre os domínios I e II (em mosquito há uma região deste tipo também entre os domínios IV e V). Quando há processamento proteolítico por convertases, o sítio de clivagem está geralmente também entre os domínios I e II, o que sugere que esta região não está envolvida na manutenção da conformação tridimensional da proteína. Existem poucos resultados sobre o processamento pós-traducional das vitelogeninas de ecdisozoas, especialmente quanto aos açúcares covalentemente ligados. Nada se sabe sobre modificações por lipídeos ou glicolipídeos covalentemente ligados às vitelogeninas. Em determinadas espécies algumas regiões da molécula possuem serinas agrupadas que são fosforiladas por proteínas quinase, geralmente caseína quinases que reconhecem “clusters” (grupos) de fosfoserinas (Byrne e cols., 1989). Nos vertebrados essa região rica em serina é chamada de fosvitina, sendo retirada proteoliticamente após sua internalização pelo ovócito (Wallace, 1985).

O estudo de difração de raios-X de Anderson e cols., (1998) com a lipovitelina de lampréia permitiu ter uma idéia da estrutura das vitelogeninas. Foi possível mostrar que a estrutura das lipoproteínas plasmáticas humanas são comparáveis à estrutura das vitelogeninas (Mann e cols., 1999).

Genes de Vitelogenina: Estrutura e Controle de Expressão.

Os genes de vitelogenina em ecdisozoas fazem parte uma família multigênica. Cada espécie contém um número de genes que varia entre um e seis por genoma haplóide e geralmente estão localizados em pontos próximos do mesmo cromossomo, sugerindo origem por duplicação. O fato de não haver uma relação conhecida entre sequência de aminoácidos e função torna muito difícil definir os ortólogos entre espécies diferentes de animais. A estrutura dos genes de vitelogenina foi estudada em *Aedes aegypti* (Sappington e cols., 2002) e no nematoide *Caenorhabditis elegans*, além de *Oscheius tipulae* (Winter e cols., 1996; Winter, 2002). Em outros insetos como *Riptortus clavatus* (Hirai e cols., 1998), *Blattella germanica* (Comas e cols., 2000), *Periplaneta americana* Tufail e cols., (2000) e *Leucophaea maderae* (Tufail and Takeda, 2002) foram isolados cDNAs de mRNAs transcritos dos genes de vitelogenina e feitos estudos sobre controle hormonal da expressão, mas não a caracterização da região promotora.

O controle hormonal da expressão é feito por ecdisterona ou hormônio juvenil em insetos e fatores desconhecidos em nematoides. Os genes que codificam vitelogeninas em vertebrados possuem promotores com elementos que respondem a estrógeno (ERE, *estrogen responsive element*), nos quais se liga o receptor do hormônio que então dispara a transcrição. O produto de transcrição dos genes de vitelogenina (mRNA_{VTG}) tem em torno de 5Kb. O mRNA_{VTG} é extremamente estável; em vertebrados chega ter uma meia vida de alguns dias no citoplasma dos hepatócitos (Wallace, 1985).

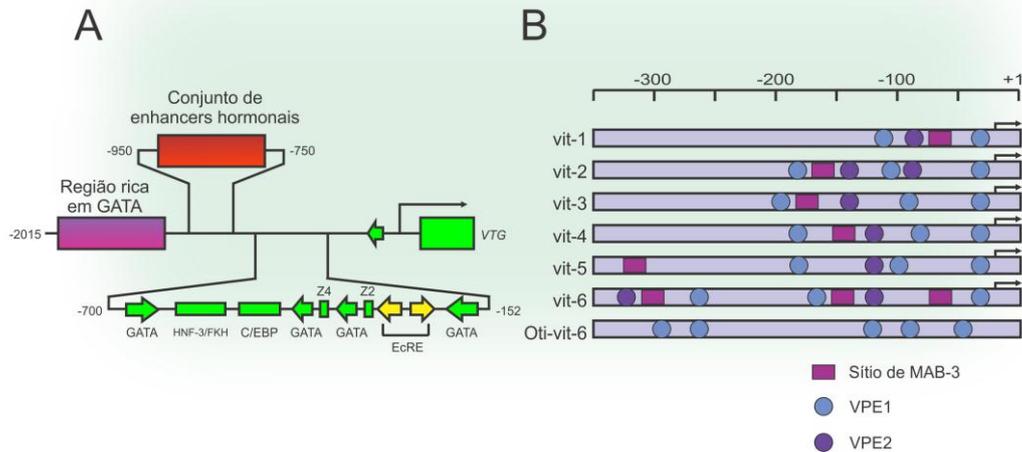


Figura 6. Esquema das regiões promotoras dos genes de vitelogenina de *Aedes aegypti* (A) e *Caenorhabditis elegans* (B). Notar a presença de elementos GATA em ambos os genes. (modificado de Attardo e cols (2005)(A) e Yi e Zarkower (1999)(B)). A proteína MAB-3 é um fator de transcrição de *C. elegans* que se encontra no fim da via de determinação de sexo, e está envolvida no desenvolvimento da cauda do macho, além da síntese de vitelogenina (A, modificado de Attardo e cols., 2005; B, modificado de Yi e Zarkower, 1999 e Winter e cols., 1996).

Em insetos, os estudos sobre o controle da expressão dos genes de vitelogenina foram feitos principalmente com mosquitos anautógenos, onde a transcrição desses e de outros genes envolvidos na vitelogênese, é desencadeada pela alimentação sanguínea (Attardo e cols., 2005). A região reguladora do gene de vitelogenina de mosquito pode ser dividida em três unidades principais (**Figura 6A**). A mais proximal é responsável pela expressão específica no corpo gorduroso e é necessária para estimulação por ecdisterona. O motivo principal desta região é aquele reconhecido pelo receptor de ecdisterona (Ec/RE). A segunda região reguladora parece ser um enhancer “hormonal”. A ecdisterona ativa indiretamente o gene de vitelogenina através de uma hierarquia de genes intermediários, chamados de genes precoces que codificam fatores que são ativados por ecdisterona. Esses fatores se ligam a essa região “enhancer” e ativam a transcrição. Finalmente, a terceira e mais distal porção, da região 5’ do gene de vitelogenina de *Ae. aegypti* contém sete sítios de ligação da GATA. Deleção desta porção reduz o nível de expressão de um gene repórter. Os fatores GATA são importantes reguladores transcricionais que apresentam tanto efeitos negativos como positivos sobre a transcrição. A presença de 11 sítios de ligação de GATA na região reguladora da vitelogenina de *Ae. aegypti* sugerem que esses fatores têm um papel importante na regulação deste gene.

Em nematoides, os estudos de Blumenthal e cols., (v. revisão em Winter, 2002) mostraram que a região promotora dos genes de vitelogenina é rica em um motivo da família GATA, chamado VPE2 (CTGATAA) (**Figura 6B**). Um outro motivo detectado na região 5’ dos genes de vitelogenina de *C. elegans* foi chamado de VPE1 (TGTC AAT). VPE1 e VPE2 são responsáveis pelo controle da intensidade de transcrição desses genes, mas não pela transcrição tecido específica ou período específica. Como é feito o controle temporal e tecidual dos genes de vitelogenina em nematoides ainda é uma pergunta sem resposta (ouvir “The Unanswered Question” de Charles Ives!). O controle sexo específico depende de um outro motivo, reconhe-

cido pela proteína MAB-3 (homóloga de DSX de drosófila). Os dados de Yi e Zarkower (1999) mostraram que a proteína codificada no gene *mab-3*, um dos genes que estão no fim da cascata de genes envolvidos na determinação de sexo de *C. elegans*, é responsável pela inibição da transcrição dos genes de vitelogenina em machos. O reconhecimento de VPE2 talvez seja feito por ELT-2, um fator de transcrição da família dos fatores GATA de *C. elegans*, mas faltam dados experimentais para isso (v. discussão em Winter, 2002). Em *Oscheius tipulae*, um nematoide brasileiro da mesma família de *C. elegans*, o único gene de vitelogenina sequenciado também apresenta motivos VPE1 e VPE2 na região promotora (Winter e cols., 1996). No entanto, não foi possível encontrar motivos que fossem reconhecidos por um homólogo de MAB-3. Ou não existe um homólogo de MAB-3 em *O. tipulae* ou os motivos reconhecidos por OTI-MAB-3 estão acima da região pesquisada. O controle hormonal dos genes de vitelogenina de *C. elegans* não pode ser confirmado até o momento. É possível que controle seja feito através de um derivado do colesterol (que os vermes não são capazes de sintetizar, como os insetos) chamado de *gamravalí* (em georgiano, “alguma coisa que ajuda na reprodução”) (Matyash e cols., 2005) envolvido na entrada em diapausa (formação da larva “dauer” – de “dauerhaft” = duradouro em alemão - em *C. elegans*) (ver **Figura 3**). Ainda sobre este aspecto, recentemente foi identificado quimicamente o hormônio da diapausa de *C. elegans* (Motola e cols., 2006; Rottiers e cols., 2006), denominado ácido dafacrônico (ácido Δ^4 -dafacrônico e Δ^7 -dafacrônico).

Evolução da Vitelogênese e o Transporte de Lipídios.

Durante a evolução dos seres vivos um dos eventos mais importantes foi o aparecimento de uma membrana lipídica semipermeável. No entanto, se a membrana impedia a diluição dos solutos necessários ao metabolismo ela impunha uma barreira para a troca desses solutos com o meio. Um problema ainda mais complicado também surgiu: a membrana precisava ser biossintetizada a partir de precursores muito pouco solúveis em meio aquoso, os ácidos graxos. Além disso, como nos organismos atuais, esses ácidos graxos deveriam ser uma importante fonte de energia para a célula. Assim, o transporte, armazenamento e metabolismo de lipídeos foram alguns dos primeiros problemas a serem resolvidos pela célula primitiva.

Para transportar e armazenar esses lipídeos dentro da célula surgiram proteínas específicas para cada um dos compostos dessa classe, chamadas LIPOPROTEÍNAS. Hoje em dia essas proteínas são encontradas em todos os procariontes e eucariotes (multi e unicelulares). A sobrevivência de animais unicelulares não depende exclusivamente da troca de metabólitos entre indivíduos.

No entanto, quando a multicelularidade aparece, com ela surge a diferenciação celular: algumas células produzem (ou captam do meio) metabólitos que são necessários para a sobrevivência das outras. Entre esses metabólitos essenciais estão, com certeza, os lipídeos. Assim, as proteínas que antes eram responsáveis pelo transporte intracelular de ácidos graxos, agora deverão transportar lipídeos extracelularmente. Como os estudos recentes de filogenia parecem mostrar que o celoma é um traço basal entre os metazoários, o seu desaparecimento em alguns *taxa* dos Bilateria pode ser considerado como uma característica derivada. Essa transição em *taxa* acelomados pode ter sido concomitante à perda das lipoproteínas secretadas para o meio líquido extra-tecidual (celoma ou pseudoceloma), agora não mais necessárias. Os cestóides, parasitas acelomados, possuem células especiais dentro de seus ovos que são responsáveis pela biossíntese de lipídeos que serão utilizados pelo embrião em crescimento (Swiderski e Xylander, 2000), mas não produzem lipo-

proteínas extracelulares. Até o momento não foi detectada nenhuma proteína homóloga à vitelogenina entre os platelmintos (ver discussão em Winter, 2002). Este é um ponto controverso e que certamente precisa ser esclarecido por algum “arthromíntico” intrépido!

As lipoproteínas se dividem em duas classes baseadas no tamanho das suas apoproteínas: LLTP (Large lipid transfer proteins; grandes proteínas transportadoras de lipídeos) e SLTP (Small lipid transfer proteins; pequenas proteínas transportadoras de lipídeos) (sobre a SLTPs de nematoides ver Solovyova e cols., 2003). Ambas as classes apresentam membros intracelulares e membros extracelulares. As LLTP são na sua maioria proteínas extracelulares. As suas apolipoproteínas possuem em torno de 1400-1600 aminoácidos (160-200 kDa), mas podem chegar a mais de 4000 aminoácidos (apo B de reptéis, aves e mamíferos). As SLTP apresentam membros intracelulares, envolvidos no transporte e armazenamento de ácidos graxos, e membros extracelulares. As suas apoproteínas são pequenas e possuem menos de 20 kDa (Storch e Thumser, 2000).

O alinhamento de diversas LLTP permitiu a Babin e cols., (1999) sugerir que todas elas têm um mesmo ancestral comum (**Figura 7**). Esta hipótese pode ser verdadeira, mas não podemos descartar que as similaridades de sequência possam estar relacionadas à similaridade de função, uma vez que regiões conservadas nas vitelogeninas são semelhantes a outras proteínas que nada têm a ver com transporte de lipídeos.

Uma outra hipótese para a origem das diversas lipoproteínas é que elas tenham surgido por recombinação intragênica. Isso explicaria a existência de domínios com alta similaridade entre proteínas de funções tão diferentes quanto apolipoproteína B e fator de von Willebrand, ou entre vitelina de *Boophilus microplus* (um aracnídeo) e a luciferase secretada de *Vargula hilgendorffii* (um crustáceo; Thompson e cols., 1989).

Nos protostômios as LLTP extracelulares compreendem principalmente as vitelogeninas (em ecdisozoa e alguns lofotrocozoa) e as lipoforinas (em insetos).

Macromoléculas que possuem uma afinidade específica, mas sem atividade catalítica são chamadas de “emphores” (Pardee, 1968). Este termo cunhado há mais de quarenta anos atrás por Arthur Pardee, um aluno de Linus Pauling, engloba principalmente proteínas que carregam pequenas moléculas através do corpo. Nesta época pouco se sabia sobre as lipoproteínas plasmáticas. Mas a transferrina já foi considerada por ele como um “emphore”.

O motivo pelo qual Pardee sugere o nome “emphore” é que algumas proteínas, que não possuem atividade enzimática nem são proteínas estruturais (como hemoglobina, anticorpos e albumina) possuem uma grande importância biológica. Essas proteínas fazem parte de um grupo de macromoléculas que se ligam especificamente a pequenas moléculas ou subgrupos moleculares, e assim permitem sua atividade biológica. Uma classe importante de “emphores” são as lipocalinas, pequenas proteínas secretadas que possuem diversas propriedades de reconhecimento molecular: capacidade de se ligar moléculas hidrofóbicas pequenas (como o retinol), ligação a receptores específicos na superfície de células e formação de complexos macromoleculares (ver Flower, 1996).

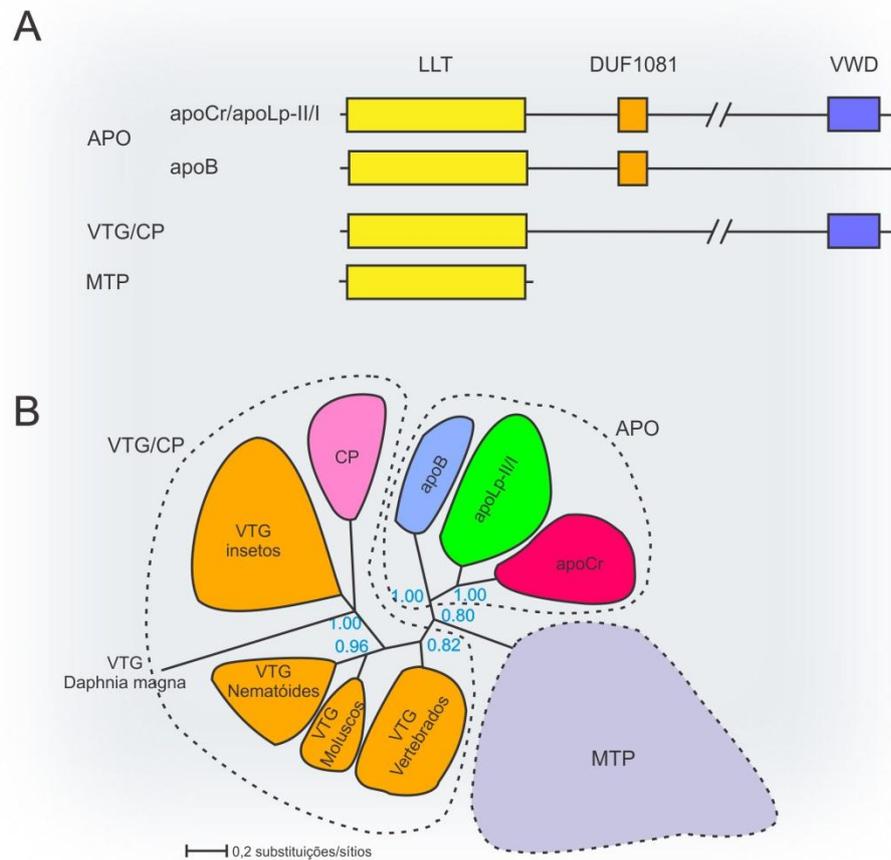


Figura 7. Estrutura e Filogenia das LLTPs. (A) Domínios presentes nos membros das LLTPs. O módulo LLT (também chamado de domínio Vitelogenina_ N ou domínio LPD-N), domínios DUF1081 (DUF = domain of unidentified function) e VWD (von Willebrand domain) estão indicados do lado N-terminal para o lado C-terminal das proteínas. **(B)** Reconstrução filogenética da superfamília de LLTPs por inferência Bayesiana. Valores nos ramos correspondem a probabilidades posteriores. Somente probabilidades posteriores >0,80 são mostradas. APO = apoB-like (apoB = apolipoproteína B; apo Cr = apolipoproteína crustácea; apoLp-II/I = apolipoproteína II/I); VTG/C = VTG-like (VTG = vitelogenina; CP = proteína coaguladora de crustáceos); MTP = proteína microssômica de transferência de triacilgliceróis. (A, modificado de BABIN e GIBBONS, 2009; B, modificado de Avarre e cols., 2007)

Entre os metazoários com simetria bilateral, muitos aspectos da vitelogênese são comuns a diversas espécies ovíparas, incluindo a estrutura da vitelogenina. Similaridades do processo (**Figura 2**) em diferentes filos de animais sugerem que a vitelogênese apareceu com o primeiro metazoário ovíparo cerca de 600 milhões de anos atrás (Conway Morris, 1998, 2000; Lynch, 1999). Durante a evolução dos metazoários, as proteínas vitelogênicas foram recrutadas para desempenhar outras funções de transporte, principalmente no metabolismo de lipídeos. Provavelmente muitas, se não todas, as lipoproteínas plasmáticas (e talvez algumas outras proteínas secretadas neste meio, como o fator de von Willebrand envolvido na coagulação) dos vertebrados atuais, originaram-se, por duplicação gênica e divergência, de proteínas envolvidas na vitelogênese dos Bilateria ancestrais (Baker, 1988 a,b; Chen e cols., 1997).

16

No inseto *Rhodnius prolixus*, embora não se tenha conhecimento da história evolutiva da vitelogenina, foram detectadas três populações distintas de vitelinas facilmente separáveis em coluna de troca iônica. Elas foram denominadas de VT1, VT2 e VT3 por ordem de eluição na coluna (Salerno e cols., 2002). A marcação das três populações de vitelinas com FITC e sua posterior injeção em uma fêmea em fase vitelogênica resultou em reconhecimento pelo ovário e localização diferencial no interior dos ovócitos. A VT1 foi a única população que se posicionou na região periférica dos ovócitos (Salerno, 2001; tese de doutorado). As funções desenvolvidas por estas diferentes populações de vitelinas é ainda uma incógnita, mas há já algumas evidências de que a VT1 é a primeira população a ser utilizada na fase inicial da embriogênese deste inseto. Em *Bombyx mori*, este papel está reservado para a proteína eff-specific protein (Irie e Yamashita, 1983). Em *Rhodnius prolixus* foram identificados dois genes para vitelogeninas (Melo, comunicação pessoal). A síntese de vitelogeninas ocorre no corpo gorduroso (Valle e cols., 1993), mas também nos ovários, especificamente no epitélio folicular (Melo e cols., 2000). A vitelogenina ovariana é produzida preponderantemente em folículos maduros (acima de 1,5 mm de comprimento) e quando analisada em coluna de troca iônica se posiciona na coluna exatamente na posição da VT1 sugerindo ser ela a molécula que é distribuída na periferia do ovócito. A existência no genoma de *Rhodnius prolixus* de dois genes de vitelogeninas (Melo, comunicação pessoal) sugere que a terceira vitelina é produto de uma modificação pós-traducional. A análise mais detalhada das vitelinas mostrou que a VT1 é a única população que se encontra associada à ubiquitina (Mendonça comunicação pessoal). A presença de vitelinas associadas às ubiquitinas não é nova. Foi já caracterizada, em outros insetos, a presença de ubiquitina associada à vitelina

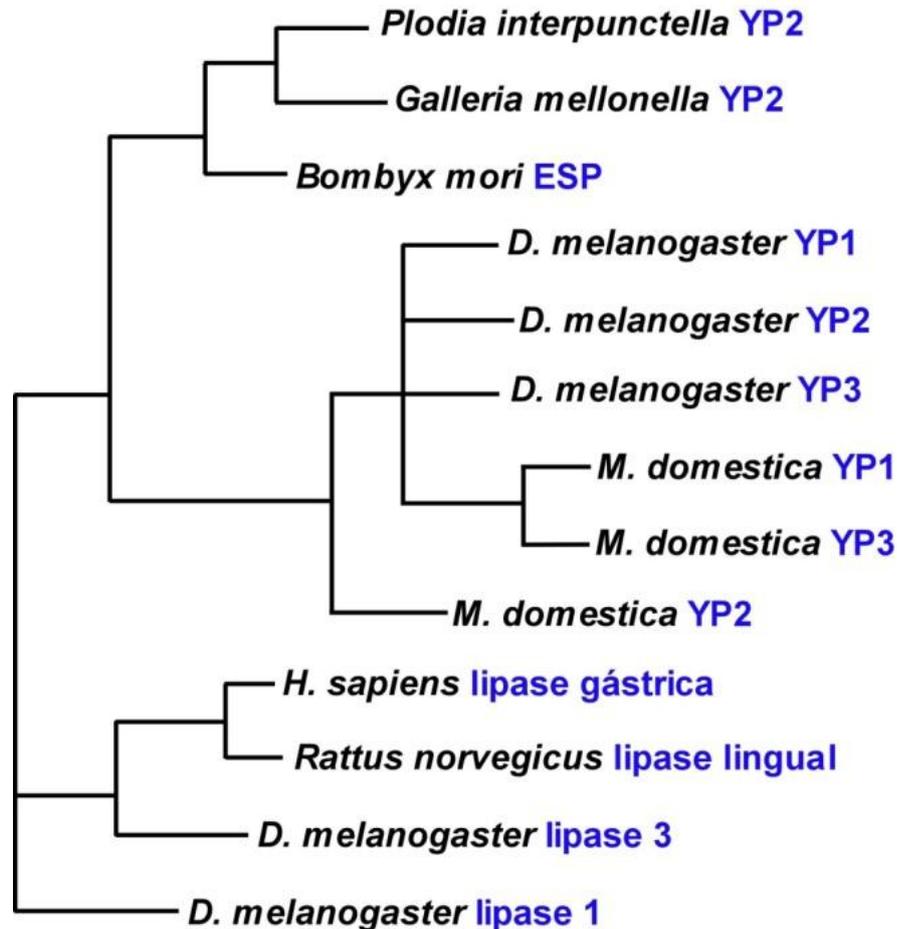


Figura 8 – Cladograma das proteínas do vitelo (YP) de *D. melanogaster* e *M. domestica*, ESP (egg specific protein) de diferentes espécies de lepidóptera e lipases de mamíferos e insetos. Árvore obtida por máxima parcimônia. Notar a relação entre as ESP e as YP de dípteros muscamorfos. Modificado de Sappington (2002d).

(Dorai-Raj and Bradley, 1993; Giorgi e cols., 1999 and Cecchetti e cols., 2003). Associou-se inicialmente a função dessas vitelinas ubiquitinadas para serem degradadas em proteasomas, mas no caso de *Rhodnius prolixus* observou-se que se trata de monoubiquitinação (Mendonça comunicação pessoal) e assim não poderia ter a função de degradação em proteasomas já que estes degradam somente proteínas poliubiquitinadas (Coux e cols., 1996).

Gostaríamos de citar aqui um parágrafo inteiro de Gerhart e Kirschner (1997) sobre o papel da evolução de novas proteínas na evolução dos metazoários, que me parece bastante apropriado para encerrar essa discussão:

“É difícil identificar quais proteínas novas permitiram aos animais seguir uma via evolutiva determinada que levou a um alto grau de diferenciação e especialização celular, uma vez que a multicelularidade acompanhada por alguma diferenciação celular certamente foi tentada diversas vezes... Em muitos casos a invenção de uma nova estrutura pode ser de menor significado que a invenção de um novo uso. Usando a analogia do computador, o programa (“software”) geralmente dirige o desenvolvimento do “hardware”, não vice-versa.”

As lipoproteínas parecem ser um bom exemplo de qual foi o papel das proteínas associado a uma estrutura importante como o celoma entre os metazoários. E, uma vez que o celoma é somente uma cavidade derivada da mesoderme podem ser prováveis origens múltiplas ou perdas múltiplas na filogenia (Wilkins, 2002).

Outro componente do vitelo cuja origem foi recentemente estabelecida são as proteínas do vitelo dos Muscamorpha (ver explicação no item sobre biossíntese). Essas proteínas (YP) são semelhantes a uma classe minoritária de proteínas encontradas no vitelo de Lepidoptera (Sappington, 2002), mostrando um caso claro de co-optação de uma proteína minoritária para substituir a vitelogenina entre os Muscamorpha (**Figura 8**).

A Evolução das Proteínas do Vitelo.

A origem evolutiva das vitelogeninas remonta a período anterior ao aparecimento dos animais com simetria bilateral, há 500-580 milhões de anos atrás (Gerhart e Kirschner, 1997; Conway Morris, 1998), uma vez que este tipo de lipoproteína já foi detectado em Cnidários (Hayakawa e cols., 2006). As LLTPs incluem três grupos de proteínas diferentes: VTG/CP (vitelogeninas/ proteínas coaguladoras de crustáceos), APO (apolipoproteínas plasmáticas) e MTP (proteína microssômica transferidora de triacilgliceróis). Babin e colaboradores (Babin e cols., 1999; Avarre e cols., 2007) estudaram a relação filogenética entre essas proteínas transportadoras de lipídeos por comparação de suas sequências de aminoácidos. Esses autores mostraram que todas as LLTPs apresentam um módulo conservado do lado N-terminal envolvido em funções compartilhadas por todas elas. Já havia sido observado anteriormente que a região N-terminal das vitelogeninas é mais conservada que a C-terminal (Winter e cols., 1996; Chen e cols., 1997). Mais recentemente, ao estudar a “vitelogenina” de crustáceos Avarre e cols., (2007) mostraram que essa lipoproteína está mais próxima das lipoforinas de insetos (grupo APO,) do que das VTG/CP, devido principalmente à presença do domínio DUF1081, de função desconhecida, que compartilham com outras lipoproteínas do grupo APO. Este domínio está ausente do grupo VTG/CP (Vitelogeninas/Proteína Coaguladora de crustáceos) e talvez esteja envolvido na interação intracelular das LLTPs do grupo APO com a MTP o que, segundo Avarre e cols., (2007), talvez explicasse a montagem da vitelogenina do anfíbio *Xenopus laevis* por uma forma mutante da MTP humana incapaz de montar corretamente a apo-B humana (Sellers e cols., 2005).

Se a maioria dos animais existentes na face da terra é ovípara e consequentemente utiliza a vitelogenina como precursor do vitelo, podemos imaginar que o ancestral comum também era ovíparo e produzia vitelogenina. Portanto, os animais vivíparos seriam derivados deste ancestral ovíparo pela perda da capacidade de produzir ovos. Alguns insetos, como *Glossina morsitans morsitans*, a mosca tsé-tsé transmissora da tripanossomíase africana, são ovo-vivíparos. As fêmeas de tsé-tsé só fertilizam um ovo por vez e mantêm cada ovo dentro de seu útero para que a larva se desenvolva ali após a eclosão até o terceiro estágio (= *instar*, em inglês), uma estratégia conhecida como viviparidade adenotrófica. Durante o tempo que as larvas passam dentro da mãe elas se alimentam de uma secreção produzida por glândulas especiais na parede do útero. A análise dos genes de proteínas do vitelo (YP) de *G. m. morsitans* mostrou que essa mosca, diferente de drosófila, mosca doméstica e outros dípteros ciclorafo, possui somente um gene de YP. Além disso, esse gene não é transcrito no corpo gorduroso e a produção de YP é restrita às células folicula-

res do ovário (Hens e cols., 2004). Assim, durante a evolução da viviparidade houve uma redução do número de genes de YP e uma mudança do sítio de expressão. No entanto o caso mais bem documentado de perda de genes de vitelogenina é o dos vertebrados, especialmente no caso dos mamíferos.

O sequenciamento dos genomas de diversos vertebrados ovíparos permitiu analisar a evolução da organização dos genes de vitelogenina dentro dos cromossomos. Foi possível assim, começar a resolver qual seria o destino dos genes de vitelogenina nos vertebrados vivíparos. Uma vez que os ancestrais destes vertebrados deveriam ser ovíparos, teriam os genes de vitelogenina desaparecido do genoma, ou teriam sido eles cooptados para outras funções? O sequenciamento do genoma do ornitorrinco (Warren e cols., 2008) forneceu a chave para que se começasse a responder esta pergunta. Estudos sobre as vitelogeninas de monotremos, marsupiais e placentários mostrou que os genes de vitelogenina foram perdidos nos mamíferos à medida que se adquiria a capacidade de produzir leite de maneira contínua (Brawand e cols., 2008; Babin, 2008). Brawand e cols., (2008) observaram que o acúmulo de indels e códon de parada restringe-se aos pseudogenes de vitelogenina presentes nos genomas. Além disso, esse acúmulo também pode ser observado nos exons de genes de vitelogenina restantes no genoma de marsupiais. Mesmo em mamíferos placentários as regiões sintênicas às vitelogeninas de ornitorrinco ainda possuem restos “fósseis” dos exons dos genes de vitelogeninas observados nos monotremados (Brawand e cols., 2008). A análise filogenética dos genes de vitelogenina de peixes permitiu associar a duplicação desses genes com a irradiação dos peixes (Finn e Kristoffersen, 2007). Esses autores propuseram uma classificação dos genes de vitelogenina de vertebrados baseada no padrão de duplicação gênica ocorrida durante a evolução deste grupo e eventos de poliploidização. Pelos dados destes autores, vemos que os vertebrados terrestres possuem somente genes derivados dos genes ancestrais VtgA e VtgB. Já os peixes ósseos mantiveram VtgA e VtgC. A grande irradiação adaptativa dos peixes ósseos (os vertebrados com maior número de espécies no planeta) se deveu em parte a diferentes estratégias de utilização da proteína codificada em VtgA (v. discussão em Finn e Kristoffersen, 2007; Kristoffersen e cols., 2009).

As Proteínas de Vitelo Não-Vitelinas em Insetos.

Como discutido anteriormente a vitelina é uma forma pouco processada da vitelogenina circulante que é acumulada nos ovócitos em crescimento no interior de grânulos de vitelo. Embora as vitelinas sejam as proteínas majoritárias dos ovos outras proteínas de origem não vitelínica são também acumuladas nos ovócitos e exercem funções específicas e importantes durante o desenvolvimento embrionário (Telfer, 2002, Sappington et.al., 2002, Masuda e cols., 2004; Atella e cols., 2005).

O vitelo é composto de uma grande quantidade de proteínas que auxiliam o desenvolvimento embrionário fornecendo energia e precursores para a construção da larva. Uma pequena quantidade de carboidratos, vitaminas, outros compostos não protéicos e minerais são também encontrados no vitelo (Yamashita e Indrasith, 1988).

Dentre as proteínas não vitelínicas as mais conhecidas estão a Lipoforina (Lp) que é a proteína majoritária na hemolinfa dos insetos (Chino et.al. 1981). Microvitelogenina (mVTG) (Telfer e Pan, 1988; Kawooya et.al., 1983; Kawooya et.al. 1986); paravitelina (Telfer e Kulakosky, 1984); egg-specific protein (ESP) semelhante à paravitelina e proteína de 30 kDa (Zhu et.al. 1986); follicle-specific protein ou proteína específica de folículo (Tsuchida et.al. 1992); insectcyanin (Cherbas, 1973 e Kang e

cols., 1995); proteína ligadora de cálcio de *Rhodnius* (RCBP=*Rhodnius* calcium binding protein) (Silva-Neto e cols., 1996); proteína ligadora de heme de *Rhodnius* (RHBP=*Rhodnius* Haem-binding protein) (Oliveira e cols., 1995), enzimas associadas a vitelo como fosfatases e proteases (Fagotto, 1990; Fagotto, 1991; Takahashi e cols., 1993; Izumi et.al, 1994; Giorgi e cols., 1999, Oliveira e cols., 2008; Fialho e cols., 2002) e caseína quinases II (CKII) (Silva-neto e cols., 1996). Outras proteínas existem, mas vamos discutir somente algumas. Para uma discussão mais completa ver Telfer (2002) Sappington et.al., 2002 e Masuda et.al. 2004, Atella et.al 2005. Além de proteínas, organelas de vitelo que se diferenciam dos grânulos de vitelo clássicos (especializados no acúmulo de proteínas de vitelo) também foram caracterizadas, como os acidocalciosomos em ovos de *Rhodnius prolixus*. Estas organelas se caracterizam por serem ácidas e apresentarem um conteúdo luminal bastante peculiar, acumulando grandes quantidades de elementos como fósforo (na forma de PPI e polifosfatos), cálcio, magnésio, sódio, ferro e potássio e, curiosamente, contendo baixas concentrações de proteínas. Para melhor entendimento do leitor, os possíveis papéis funcionais dos acidocalciosomos e dos polímeros de polifosfato em ovos de *Rhodnius prolixus* serão posteriormente discutidos nesta seção, dentro do contexto das outras proteínas não vitelínicas.

- **Lipoforina** - Durante o processo de ovogênese nos insetos, os ovócitos acumulam uma grande quantidade de lipídeos, que são transportados por uma lipoproteína denominada lipoforina. Portanto, em insetos o transporte de lipídeos para o ovário não é feito exclusivamente pela vitelogenina como ocorre, aparentemente, nos nematoides. A lipoforina é uma lipoproteína hemolinfática que funciona como uma transportadora reciclável de lipídeos entre os órgãos que acumulam ou sintetizam e aqueles que os utilizam (Chino e cols., 1981; Chino, 1985; Shapiro et.al. 1988). Em adição a esta função de entregadora reciclável de lipídeos entre os diversos órgãos, foram encontradas quantidades significativas de lipoforinas no interior de ovócitos de *Hyalophora cecropia* (Telfer et.al. 1991), *Manduca sexta* (Kawooya e Law, 1988) *Aedes aegypti* (Sun e cols., 2000). Em *Rhodnius prolixus*, ao contrário do observado em outros insetos, somente uma pequena quantidade de lipoforina foi encontrada nos ovócitos (Gondim, et.al. 1989) e associada primariamente às microvilosidades (Machado et.al., 1996).

Detalhes sobre este processo de transporte de lipídeos associado à lipoforina será analisado e discutido em um outro capítulo deste livro (Capítulo 7) e, portanto, este assunto não será aqui estendido.

- **Proteína Específica de Ovo (ESP), Proteína de 30 kDa (30 kDa protein), Microvitelogenina e Paravitelina** - De ovos de *Bombyx mori* (bicho da seda) foram isoladas três proteínas principais: a vitelogenina, a proteína específica de ovo (ESP = egg-specific protein) e a proteína de 30kDa. A ESP é relacionada à YP de *Drosophila*. A proteína de 30 kDa é uma proteína presente na hemolinfa de machos e fêmeas e homóloga à microvitelogenina de *Manduca sexta*. Esta proteína é sintetizada no corpo gorduroso, liberada para a hemolinfa onde constitui a proteína mais abundante. Esta proteína permanece na hemolinfa durante a fase larval e de pupa e na fase adulta é endocitada pelos ovócitos (Irie e Yamashita, 1980; Izumi e cols., 1980). A proteína isolada da hemolinfa e dos ovos são idênticas sugerindo que não há modificações pós-endocíticas (Zhu e cols., 1986). A sua função é desconhecida, porém sabe-se que é utilizada durante a embriogênese período no qual 50% dela é consumida.

A microvitelogenina foi originalmente descrita em *Hyalophora cecropia* por

Telfer e Pan (1988). A microvitelogenina foi descrita também em *Manduca sexta* (Kawooya e Law, 1983). As propriedades físico-químicas analisadas de amostras de microvitelogenina originárias da hemolinfa ou do ovócito mostram que elas são idênticas nestes dois compartimentos. A sequência de nucleotídeos do cDNA da microvitelogenina foi determinada e codifica uma proteína com 232 resíduos de aminoácidos (Wang e cols., 1988). Apesar de uma extensa caracterização molecular a sua função específica é ainda desconhecida. Curiosamente em *Hyalophora cecropia* ovócitos produzidos por ovários implantados em machos não apresentam vitelogenina, como esperado, mas apresentam microvitelogeninas (Pan e cols., 1994).

A proteína ESP é produzida no ovário e acumulada no interior dos ovócitos de *Bombyx mori* (Irie e Yamashita, 1983; Ono e cols., 1975). Proteínas similares têm sido descritas em outros insetos como *Hyalophora cecropia* (Bast e Telfer 1976; Telfer e Kulakosky, 1984) e *Aedes aegypti* (Borowky e Van Handel, 1980). Experiências de imunofluorescência demonstraram que em *Bombyx mori* essas proteínas se encontram no epitélio folicular e em grânulos de vitelo (Irie e Yamashita, 1983).

Em *Manduca sexta* duas proteínas específicas de folículo (FSP) semelhantes a ESP foram isoladas do ovo e caracterizadas por Tsuchida e cols., 1992. Estas proteínas não estão presentes na hemolinfa, mas acumulam-se nos ovócitos.

Durante a fase inicial da embriogênese (6 a 7 dias) em *Bombyx* as concentrações relativas de vitelina e proteína 30kDa permanecem inalteradas, mas a ESP é degradada desde o início (Irie e Yamashita., 1980). Ao final da embriogênese a ESP é toda consumida, um terço da vitelina e cerca de metade do conteúdo da proteína de 30kDa permanece na larva recém-eclodida para a sua diferenciação. Este padrão de utilização sugere que a proteína ESP é utilizada na formação do embrião desde suas fases iniciais, mas as outras são transferidas para a fase larval.

- Insectcianina - Muitos insetos são verdes e produzem ovos pigmentados, que se ajustam à cor das plantas, sugerindo uma camuflagem. A proteína azul, insectcianina, foi isolada pela primeira vez da epiderme e hemolinfa de *Manduca sexta* por Cherbas (1973). O grupo prostético que confere cor a insectcianina é a biliverdina. Esta proteína é sintetizada durante a fase larval e persiste durante o estágio de pupa. Na fase adulta, as fêmeas sequestram a insectcianina da hemolinfa e a acumula no interior dos ovócitos (Kang e cols., 1995) através de um processo mediado por receptor específico (Kang e cols., 1997). Esta proteína azul, quando combinada com a de carotenoides derivado da dieta e associados à lipoforina produz a cor verde característica destes insetos assim como do ovo (Kawooya e cols., 1985).

- Transferrina e Ferritina - O ferro é um nutriente essencial para a maioria dos organismos vivos especialmente para aqueles que apresentam metabolismo aeróbico. O ferro é necessário à síntese de proteínas envolvidas no processo de respiração, transdução de sinal, metabolismo de oxigênio. As principais proteínas envolvidas no metabolismo do ferro são a transferrina e ferritina.

A transferrina já foi descrita em vários insetos como *Manduca sexta* (Bartfeld e Law, 1990); *Blaberus discoidalis* (Jamroz., 1993), *Sarcophaga peregrina* (Kurama et.al., 1995), *Aedes aegypti* (Yoshiga et.al., 1997); *Drosophila melanogaster* (Yoshiga et.al., 1999); *Riptortus clavatus* (Hirai et.al, 2000). Recentemente a transferrina foi caracterizada em *Rhodnius prolixus* e reconhecida tanto na hemolinfa assim como no interior dos ovócitos. A transferrina isolada da hemolinfa e marcada com FITC quando reinjetada na hemolinfa, a proteína é reconhecida, endocitada e dirige-se para a região cortical dos ovócitos. Tal como a VT1, a transferrina encontra-se também ubiquitinada ovos (Coelho, comunicação pessoal). A função conhecida da trans-

ferrina nos vertebrados é transportar o íon férrico do intestino para os tecidos periféricos onde são utilizados ou estocados. Nos insetos, o metabolismo do ferro foi revisito por Nichol et.al, (2002) e Law (2002).

Em *Sarcophaga peregrina* o ferro é transportado na hemolinfa pela transferrina e sequestrado pelos ovócitos (Kurama e cols., 1995). Foi sugerido que uma vez dentro do ovócito o ferro seria transferido para uma proteína maior possivelmente a ferritina. A análise do genoma de *Drosophila melanogaster* não mostrou nenhum gene semelhante ao receptor de transferrina de vertebrados. Por causa disso, foi sugerido que a transferrina de insetos poderiam ter uma função algo diversa daquela de vertebrados (Nichol e cols., 2002). Neste mesmo ano, Van Hoof e cols.,(2002), demonstraram que células CHO transfectadas com receptores de lipoforinas de alta densidade (HDLp) eram capazes de internalizar lipoforinas. O fato curioso é que as lipoforinas co-localizavam com a transferrina de mamíferos nos mesmos compartimentos sugerindo que o lipoforina é internalizada via o mesmo sistema da transferrina. O receptor de lipoforina é homólogo ao receptor de VLDL (Dantuma e cols., 1999) e capaz de internalizar proteínas não relacionadas ao metabolismo de lipídeos. É possível, portanto, especular que o receptor de lipoforina poderia ser em si o receptor para transferrina, o que explicaria a sua internalização nos ovócitos (Kurama e cols., 1995) mesmo na ausência de receptor de transferrina de mamíferos. De qualquer maneira, independente do que possa ser receptor transferrina nos insetos, se é que ele existe, este assunto merece ser reinvestigado. É interessante notar que a “vitelogenina” de ouriço-do-mar (um deuterostômio, como os vertebrados) é uma proteína ligadora de ferro tipo transferrina, sendo a principal proteína do vitelo, mas estando presente também na gônada masculina de *Strongylocentrotus purpuratus* (Brooks e Wessel, 2002). Recentemente foi identificado a presença de transferrina na hemolinfa e ovos de *Rhodnius prolixus*. A curiosidade adicional é que elas estão associadas à ubiquitina. O papel da ubiquitina está sendo investigada no momento (Coelho e Soares comunicação pessoal).

- Proteínas Ligadoras de Cálcio -

- Proteína Ligadora de Cálcio de *Rhodnius* (RCBP) - A RCBP (*Rhodnius calcium binding protein*) é uma fosfoproteína capaz de ligar cálcio, tem cerca de 18kDa e foi isolada tanto da hemolinfa como dos ovo de *R. prolixus*. Experimentos utilizando a RCBP isolada da hemolinfa e reinjetada em uma fêmea em fase vitelogênica demonstraram que somente os ovários eram capazes de internalizá-la (Silva-Neto e cols., 1996). Embora a função desta proteína não esteja esclarecida, acredita-se que ela controle os níveis intracelulares de cálcio nos ovócitos e/ou ovos e esteja envolvida nos processos de fusão de vesículas, descritos acima, colocando em contato enzimas e substratos que haviam sido previamente empacotados separadamente. Adicionalmente, a caracterização de organelas similares a acidocalcisomos em ovos de *Rhodnius prolixus* (Ramos e cols, dados não publicados), nos permite especular que a RCBP possa também estar envolvida na biogênese dessas organelas, já que acidocalcisomos contém além de cálcio uma grande quantidade de fósforo na forma de polifosfatos, o que explicaria em parte a baixa concentração dessa proteína no interior dos ovócitos (Silva-Neto e cols., 1996).

- Calmodulina (CaM) - A CaM é uma proteína pequena (~17KDa) e acídica, envolvida na regulação de vários processos celulares controlados por via sinalizadas por Ca^{2+} (Chin and Means, 2000). Esta pode ser considerada a principal *calcium sensor* das células sendo encontrada em todos os modelos eucarióticos estudados

até hoje. A CaM é formada por dois domínios globulares conectados por uma longa α -hélice, sendo que cada domínio tem duas *EF-hands* (pequenos *motifs* que ligam Ca^{2+}). Dessa forma, cada molécula de CaM liga quatro moléculas de Ca^{2+} . Sua afinidade por Ca^{2+} é de $\sim 10^{-6}\text{M}$, e por isso funciona como decodificadora, pois consegue “sentir” quando a concentração de Ca^{2+} no citoplasma aumenta. Sua interação com íons Ca^{2+} leva a exposição de sítios hidrofóbicos que interagem diretamente com os chamados “domínios ligadores de CaM”, encontrados em uma enorme variedade de proteínas alvo (James e cols., 1995).

Em ovos de *Blatella germanica*, foi mostrado que a CaM é estocada em grandes quantidades, chegando a 0,9% do total de proteínas solúveis (Zhang e Kunkel, 1992; Yengar and Kunkel, 1995). Além disso, a ausência da CaM na hemolinfa e a sua biossíntese em folículos vitelogênicos sugerem que a CaM do ovo tem origem ovariana. A CaM estocada nos ovos está presente no compartimento citoplasmático que circunda os ovos e ausente nos grânulos de vitelo (Zhang e Kunkel, 1994). A relação molar de CaM e vitelina na barata é de 1:1. Porém, durante o processo de proteólise limitada da vitelina, o conteúdo de CaM decresce muito, sugerindo sua participação no programa de utilização de vitelina.

Em *Rhodnius prolixus*, a CaM também parece estar associada aos processos de degradação do vitelo. Foi observado, por RT-PCR quantitativo a partir de RNA ovariano, que o mRNA de CaM de ovos de *Rhodnius* é encontrado em grandes quantidades no 1º dia de desenvolvimento embrionário e que sua concentração tende a diminuir durante a embriogênese inicial, até o terceiro dia de desenvolvimento. Nos insetos *Rhodnius prolixus* e *Periplaneta americana*, foi demonstrado a ocorrência de eventos de fusão de membranas entre as diferentes organelas de vitelo, e que este processo é regulado por um aumento na concentração de Ca^{2+} nos ovos, sendo indispensável para a degradação das proteínas de vitelo (Ramos e cols., 2006, 2007). Assim, é possível que a elevação na concentração de Ca^{2+} necessária para a fusão das organelas de vitelo seja o evento ativador de uma cascata de sinalização via CaM durante a embriogênese inicial. De acordo com esses dados, quando se injeta VT1 marcada com FITC em fêmeas vitelogênicas, elas são rapidamente endocitadas e são estocadas em pequenas vesículas no cortex dos ovos quando observadas ao microscópio de fluorescência. No entanto, a adição de cálcio ao meio induz uma rápida migração da VT1 marcada com FITC das vesículas menores para as vesículas maiores, provavelmente através de processos de fusão de membranas (Mendonça comunicação pessoal).

- **Calreticulina** - A CRT é uma proteína de $\sim 46\text{KDa}$ que funciona como proteína ligadora de Ca^{2+} (*calcium buffer*) e chaperona no lúmen do RE em diversas espécies (Michalak e cols., 1999). A CRT liga Ca^{2+} com alta capacidade, e baixa afinidade e também participa do dobramento de proteínas e glicoproteínas recém sintetizadas pelo RE (Trombetta, 2003). A CRT é estrita de RE, sendo por isso, comumente utilizada como marcador desta organela (Gelebart e cols., 2005). Outras funções tais como o seu envolvimento com o sistema imune de insetos, modulação da adesão celular, e apoptose (Johnson e cols., 2001) foram também relatadas. A CRT é composta de dois domínios funcionais e estruturalmente diferentes (Ellgard e cols., 2001). O domínio N forma uma estrutura globular com uma ponte dissulfeto. Essa região liga metais pesados como Zn^{2+} e interage com outras chaperonas do RE (Michalak, 1999). O domínio P contém uma região rica em prolina e forma uma estrutura de braço estendido. O domínio N e o domínio P juntos são responsáveis pela unidade chaperona da CRT. Já o domínio C é ácido, liga Ca^{2+} com alta capacidade (20-

30mol Ca^{2+} / mol proteína), e por isso é envolvido na sua função de armazenar Ca^{2+} no lúmen do RE.

Em *Rhodnius prolixus* Ramos e cols. (2011) demonstraram que a expressão de calreticulina é alta em folículos vitelogênicos quando comparados com folículos maduros (início da coriogênese) sugerindo que o epitélio folicular desliga os genes associados à ovogênese em geral, para ligar aqueles associados à coriogênese. No entanto, a expressão da calreticulina é aumentada cerca de duas a três vezes no primeiro dia de embriogênese indicando a necessidade da presença de retículo endoplasmático nesta fase de desenvolvimento. Por microscopia de fluorescência demonstrou-se que esta proteína se localiza na periferia dos ovos não fertilizados, indicando a presença de retículo endoplasmático nesta região. Observou-se, por microscopia eletrônica de transmissão (utilizando aticorpos acoplados a ouro coloidal), que o retículo endoplasmático é majoritariamente formado por lamelas dispersas na região cortical do ovoplasma. Após a fertilização, durante as primeiras 24 horas (quando ocorre a divisão nuclear e a celularização (Kelly e Huebner, 1989), foram observadas alterações estruturais no retículo endoplasmático para uma configuração típica de retículo rugoso (Ramos e cols., 2011), fato que foi associado com o aumento da expressão da calreticulina. Estes dados sugerem fortemente que a fertilização inicia o processo de maturação do retículo endoplasmático para que este se tornasse funcional especialmente para a fase inicial do processo de embriogênese. É provável que, nesse contexto, o retículo endoplasmático participe de eventos de liberação de Ca^{2+} , possivelmente participando da cascata que dispara a fusão entre as vesículas, e na síntese/montagem de novas proteínas importantes para as etapas do desenvolvimento inicial, antes da transição do controle do desenvolvimento maternal para o zigoto.

- Proteína Ligadora de Heme de *Rhodnius* (RHBP) - O pigmento rosa presente na hemolinfa de *Rhodnius prolixus*, que é acumulado nos ovócitos como descrito por Wigglesworth em 1943, é na realidade a proteína RHBP descrita por Oliveira e cols (1995), não relacionada à hemoglobina. Wigglesworth denominou essa proteína de “katahemoglobina”, uma forma parcialmente degradada da hemoglobina do hospedeiro. Hoje sabemos que se trata de uma proteína de 15 kDa sintetizada pelo corpo gorduroso. O cDNA da RHBP já foi clonado e sequenciado (Paiva-e-Silva e cols., 2002). Sabe-se que a RHBP é uma proteína de 128 aminoácidos e a sua sequência não apresenta similaridade com qualquer outra proteína conhecida até o momento (Paiva-e-Silva e cols., 2002). A sua estrutura vem sendo investigada (Nagem e cols., 2001).

A forma circulante da RHBP na hemolinfa desses insetos não se encontra saturada com heme (Oliveira e cols., 1995), o que permite que a apoproteína possa se associar com uma molécula de heme se esta estiver disponível. Isto de fato acontece na hemolinfa destes insetos e tem uma função antioxidante importante. Isto porque o grupamento heme, liberado da molécula de hemoglobina durante o processo de digestão, do sangue do hospedeiro vertebrado, é um gerador de radicais livres (Vincent e cols., 1988; Vincent, 1989; Aft e Muller, 1983; Smith, 1990). Na hemolinfa o grupo heme, que atravessa a barreira digestiva (Dansa-Petretski e cols., 1995), se associa prontamente à RHBP, que exerce sua ação antioxidante já que a forma associada não gera ou gera muito menos radicais livres. A apoRHBP tem portando uma clara função antioxidante protegendo as moléculas da hemolinfa (Dansa-Petretski e cols., 1995).

A RHBP é sequestrada da hemolinfa pelos ovócitos vitelogênicos por um processo mediado por receptor e direcionado aos grânulos de vitelo (Machado e cols.,

1998). Embora vários tecidos possam internalizar a RHBP o ovário é de longe o órgão mais ativo que acumula esta proteína.

Um fato curioso é que quando se limita a quantidade de RHBP saturada na hemolinfa, diminuindo a ingestão de heme, mas mantendo níveis normais de vitelogenina e lipoforina, as fêmeas de *Rhodnius* diminuem o número de ovos, apesar de ter concentrações normais de vitelogenina e lipoforina circulante. A simples adição de heme na dieta faz com que as fêmeas produzam o dobro do número de ovos indicando que não se tratava de restrição protéica (Machado e cols., 1998). As fêmeas adotam a estratégia de diminuir o número de ovos, mas não produzem ovos sem RHBP. Qual seria então a função da RHBP nos ovos?

Uma vez que a RHBP isolada de ovócitos se encontrava saturada de heme (Oliveira e cols., 1995), sendo incapaz de interagir com outras moléculas do ligante, ficava difícil estudar a sua função antioxidante.

Braz e col., 2002 mostraram que a RHBP era utilizada durante o embriogênese, mas que a quantidade total de heme não variava até a eclosão da ninfa de primeiro estágio. Isto significava que a RHBP estava funcionando como uma transportadora de heme (do hospedeiro vertebrado) para a ninfa de primeiro estágio.

A primeira linha de defesa antioxidante do *Rhodnius prolixus* não é a RHBP, mas sim a formação de um agregado de heme conhecido como hemozoína, que é formado ainda no interior do intestino (Oliveira e cols., 1999). Este agregado evita a passagem de heme, em larga escala, do lúmen para a hemolinfa. Além desses mecanismos de neutralização dos efeitos do heme livre, foram descritas também enzimas (Paes e Oliveira, 1999; Paes e cols., 2001) e presença de ácido úrico (Souza e cols., 1997), mostrando que a adaptação à dieta de sangue requer a associação de um eficiente sistema de defesa antioxidante.

Independentemente da dieta dentre os insetos de diferentes ordens, todos produzem vitelogeninas que se acumulam no interior dos ovócitos, e que servem como material de reserva para o desenvolvimento do embrião. As vitelinas chegam a constituir de 60 a 90% do conteúdo de proteínas de um ovócito maduro, e talvez por esta razão tem se negligenciado o estudo sobre as outras proteínas não vitelínicas. No entanto, estas proteínas não vitelínicas, características de cada inseto, parecem exercer funções bastante específicas como a que vimos em *Rhodnius prolixus*. As fêmeas de *Rhodnius prolixus* não produzem espontaneamente ovos sem RHBP (Machado e cols., 1998). No entanto, a utilização da tecnologia de RNAi mostrou que as fêmeas de *Rhodnius prolixus* nesta condição experimental são capazes de produzir ovos sem RHBP, mas que ovos mesmo fertilizados são inviáveis mostrando a importância dessa molécula na vida desse inseto (Paiva-e-Silva comunicação pessoal). De fato, a ausência de grupamentos heme torna inviável a vida desses embriões. Braz e cols., (2002) já haviam demonstrado que a RHBP tinha como função transportar grupamentos heme do organismo materno para o desenvolvimento do embrião.

Em *Bombyx mori* foi possível produzir ovos viáveis na ausência de vitelina (Yamashita e Irie, 1980). Estes dados mostram que a vitelina ou vitelogenina podem ser substituídas por outras proteínas, sugerindo que sejam importantes, mas não essenciais para a maturação de um ovo e formação de um embrião. Por outro lado, as proteínas não vitelínicas do ovo parecem ser essenciais para o desenvolvimento do embrião. Durante a evolução este fenômeno pode ter ocorrido no ancestral dos Diptera muscamorfa, cuja vitelogenina foi substituída por uma lipoproteína lipase que originou o que hoje chamamos de “yolk proteins” (YP) desses insetos (ver ítem 2; Sappington, 2002).

- **Caseína-Quinase II** - A caseína quinase II (CKII) é uma enzima oligomérica, que fosforila preferencialmente resíduos de serina e treonina e são encontradas na maioria das células. Elas regulam atividades fundamentais da célula como crescimento e diferenciação (Hanks e cols., 1988). Esta enzima fosforila um largo espectro de substratos como fatores de transcrição, proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular, enzimas do metabolismo intermediário e proteínas do citoesqueleto (Pina, 1994). O envolvimento da CKII com o desenvolvimento embrionário foi relatado por Glover e cols., (1983) em *Drosophila melanogaster*, e Schneider e cols., (1986) em camundongos e em células tumorais. Hu e Rubin (1990) em *C. elegans* mostraram que a atividade da CKII é muitas vezes maior no embrião do que em extratos citossólicos e que estavam associados ao aumento dos níveis de RNA mensageiros. Em *Rhodnius prolixus*, foi também demonstrado por Fialho e cols., (1999) aumento na atividade da CKII associado ao desenvolvimento embrionário com um pico marcante da fosforilação da vitelina em torno do terceiro dia após a ovoposição, e que este aumento da atividade era dependente de fertilização. Estes dados sugerem que a CKII deva estar associada principalmente à utilização da vitelina para dar apoio ao processo de proliferação celular do embrião, já que o processo inicial de celularização ocorre ainda no 1º dia de desenvolvimento (Kelly e Huebner, 1989). Adicionalmente foi verificado que a atividade da CKII quando ensaiada contra caseína exógena a atividade continua aumentando ao longo da embriogênese atingindo o seu pico de atividade em torno do 7º dia e se mantendo alto até o 12º dia quando então decresce. Estes dados sugerem a existência de um complexo jogo de fosforilações da vitelina e desfosforilações de polifosfatos para que a vitelina possa ser acessada pela catepsina D para ser utilizada pelo embrião.

- **H⁺-Pirofosfatase Vacuolar (V-H⁺-PPase)** - A atividade proton-pirofosfatásica foi inicialmente descrita em vacúolos de plantas (Karlsson, 1975), associada à membrana e capaz de gerar um gradiente de prótons, pela sua translocação, acoplada à hidrólise de PPI (Baykov e cols., 1999; Maeshima, 2000). Em animais a atividade desta enzima foi descrita pela primeira vez em *Rhodnius prolixus* por Motta e cols., 2004, em frações de membrana de ovos e ovários deste inseto. Esta enzima foi localizada por imunomarcagem em membranas de grânulos de vitelo por microscopia óptica e eletrônica de transmissão. Tanto a adição de PPI assim como ATP foram capazes de acidificar alguns grânulos mostrando a presença dessas duas enzimas no interior dos ovócitos. A atividade de hidrólise de PPI e o bombeamento de H⁺ são inibidos na presença de NaF, cálcio e anticorpos anti V-H⁺-PPase. Dois tipos diferentes de V-H⁺-PPases foram descritas: o tipo I é fortemente dependente de K⁺ e moderadamente inibido por Ca⁺⁺. O tipo II é independente de K⁺ e altamente sensível à inibição por Ca⁺⁺. Embora se observe somente 36% de identidade entre as V-H⁺-PPases do tipo I e tipo II (Drozdowicz e cols., 2000; Drozdowicz and Rea, 2001; McIntosh e cols., 2001), observa-se alta homologia entre as V-H⁺-PPases do tipo I de diferentes organismos. V-H⁺-PPases são comumente encontradas em vacúolos, cromatóforos, archeobactérias, bactérias fotosintéticas e em acidocalcisomos de protozoários parasitos como *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii* (Baltscheffsky e cols., 1999; Rodrigues e cols., 1999; Mitsuda e cols., 2001; Docampo and Moreno, 2001; Perez-Castineira e cols., 2002). Tendo em vista que organelas similares a acidocalcisomos foram recentemente encontradas nos ovos de *Rhodnius prolixus* (Ramos e cols., dados não publicados) acredita-se que a atividade PPásica descrita por Motta e cols., 2004 esteja associada a esta organela, com discutido abaixo.

Acidocalcisomos e Polifosfatos

Acidocalcisomos são organelas encontradas em vários microrganismos, sendo mais bem descritas em modelos de protozoários (Docampo e cols., 2005). Estas organelas são caracterizadas por sua natureza acídica e eletrondensa, e por acumular fosfato (na forma de Pi, P_{PPi} e polifosfato) e vários cátions como Mg²⁺, Ca²⁺, Na⁺ e K⁺. O conteúdo de elementos dos acidocalcisomos é comumente estudado usando a técnica de microanálise de raio-X por energia dispersiva, onde altas concentrações de oxigênio, fósforo, cálcio, sódio, zinco, potássio e, em menor quantidade, ferro são comumente detectadas. Diferentes enzimas envolvidas com o transporte de Ca²⁺ já foram descritas na membrana dos acidocalcisomos como Ca²⁺-ATPases e trocadores Ca²⁺/H⁺, sendo este último importante na liberação de cálcio por estas organelas. Além dos trocadores, duas bombas envolvidas com o transporte de prótons também foram caracterizadas: uma H⁺-ATPase vacuolar, e uma H⁺-PPase, sendo esta última considerada como um marcador para acidocalcisomos (Docampo e cols., 2005). Recentemente, a presença de acidocalcisomos tem sido descrita em ovócitos e ovos de diferentes animais, como os ouriços do mar, galinha e insetos como a *P. americana* (Motta e cols., 2009) e *Rhodnius prolixus* (Ramos e cols., 2011). O papel funcional dos acidocalcisomos em modelos de embriogênese ainda não foi descrito, mas recentemente foram investigadas algumas especulações, principalmente em relação a seu conteúdo de polifosfatos.

Polifosfatos são polímeros de fosfatos unidos por ligações fosfoanidridos de alta energia. Estes compostos foram encontrados em diferentes compartimentos subcelulares como núcleo (Kumble and Kornberg, 1995; Lichko e cols., 2003), mitocôndrias (Abramov e cols., 2007; Campos e cols., 2008), lisossomos (Pisoni and Lindley, 1992) e acidocalcisomos (Docampo e cols., 2005; Ruiz e cols., 2001). A presença de polifosfatos foi descrita em uma grande variedade de organismos desde leveduras, algas e invertebrados (Kornberg, 1999; Kulaev and Kulakovskaya, 2000; Kulaev e cols., 1999) até humanos (Docampo e cols., 2005). A presença de polifosfatos em ovos de insetos foi inicialmente caracterizada por Gomes e cols., 2008 em *Periplaneta americana* e posteriormente em *Rhodnius prolixus* (Gomes e cols., 2010), onde se mostrou uma inibição parcial da proteólise de proteínas de vitelo na presença de polímeros de polifosfato (através da inibição de uma protease de vitelo, explicado na próxima seção). Além disso, estes autores demonstraram também que polifosfatos são também substratos para a fosfatase ácida de *Rhodnius prolixus*. As possíveis funções biológicas desses polímeros nos insetos serão discutidas adiante, tendo como pano de fundo o processo de embriogênese, especialmente no caso do *Rhodnius prolixus* que será o modelo biológico utilizado para a discussão da embriogênese nos insetos.

- **Hidrolases** - Os ovos de artrópodes acumulam uma grande quantidade de vitelo durante a ovogênese (Hagedorn e Kunkel, 1979; Postlethwait and Giorgi, 1985 e Raikhel e Dhadialla, 1992, Atella e cols., 2005), que serão utilizados durante o processo de embriogênese pela ação de hidrolases por um processo altamente regulado (Fagotto, 1990; Fagotto, 1991; Takahashi e cols., 1993; Yamamoto e Takahashi, 1993; Izumi et. al, 1994; Giorgi e cols., 1999).

- **Proteases** - Diferentes classes de proteases foram implicadas no processo de degradação vitelo, desde proteases ácidas como cysteino proteinases do tipo Catepsi-

nas B e L (Medina e cols., 1988; Fagotto, 1990, Takahashi et.al. 1993), ou aspártico proteinases (catepsinas D) (Nussenzveig e cols., 1992) a serino proteases neutras (Ikeda et.al., 1990).

- **Fosfatase Ácida** - Em *Rhodnius prolixus*, além de uma catepsina D foi também descrita a presença de uma fosfatase ácida (Nussenzveig e cols., 1992). Uma curiosa relação entre a atividade da fosfatase ácida de *Rhodnius prolixus*, com a proteólise da vitelina foi observada por Fialho et.al., 2005. Neste trabalho foi demonstrado que inibidores de fosfatases ácidas eram capazes de inibir a proteólise de vitelinas pela Catepsina-D, em *Rhodnius prolixus*. Este resultado, de difícil compreensão à época, foi resolvido pela descoberta recente de (Gomes e cols., 2010), que polifosfatos são inibidores de Catepsina D e que os polifosfatos são substratos para a fosfatase ácida de *Rhodnius prolixus*. Assim, a presença de polifosfatos inibe a atividade da catepsina D enquanto a fosfatase ácida, ao remover o polifosfato, ativa a catepsina D, explicando assim o resultado de Fialho e cols., (2005) mostrando que inibidores de fosfatases ácidas inibem a atividade proteolítica. Esta relação entre atividades de fosfatases ácidas e proteases não parece estar restrita ao modelo *Rhodnius prolixus*. Em *Periplaneta americana* foi também relatada a existência de uma interrelação entre a atividade de uma fosfatase ácida com a atividade de uma cisteíno-proteinase associada à degradação de vitelina deste inseto (Oliveira e cols., 2008).

Uma visão bioquímica do Desenvolvimento Embrionário no Modelo *Rhodnius prolixus*.

O *Rhodnius prolixus* talvez seja o modelo experimental onde um maior número de informações sobre proteínas de ovos não vitelínicas tenham sido acumuladas na última década e com algumas de suas funções caracterizadas. Talvez por essa razão, ele nos permita desenvolver a seguinte hipótese de trabalho para ser explorada em futuro próximo.

- Uma hipótese de trabalho -

Os dados sobre as proteínas presentes no interior dos ovócitos de *Rhodnius prolixus*, quando reunidos, nos permitem propor o seguinte raciocínio sobre o desenvolvimento do embrião em sua fase mais precoce: a catepsina D é inibida pela presença de polifosfatos (Gomes e cols., 2010), portanto, para que a catepsina exerça a sua função será necessário remover o polifosfato. O polifosfato por sua vez é substrato para a fosfatase ácida (Gomes et.al. 2010) e assim a fosfatase ácida pode ativar a catepsina D pela remoção do polifosfato. Inibidores de fosfatases ácidas inibem a proteólise (Fialho e cols., 2005) indicando com clareza a existência desta relação entre estas duas enzimas. A fosfatase ácida por sua vez para ser ativada depende do processo de fertilização (Fialho e cols., 2002). As fosfatases de ovos não fertilizados de *Rhodnius prolixus*, não são ativadas mesmo quando incubadas em meio ácido, o que diz a favor de um processo de ativação ainda desconhecido e dependente de fertilização. A ativação da fosfatase ácida pelo processo de fertilização não é suficiente para que o todo o processo de desenvolvimento embrionário possa ocorrer. É necessário que simultaneamente à ativação da fosfatase e conseqüente ativação da catepsina D, pela remoção do polifosfato, ocorra também acidificação do meio, pois ambas são ativas somente em baixo pH. O processo de fertilização deve, portanto, criar também um ambiente ácido favorável as enzimas mencionadas e para isso podemos especular sobre o papel das V-H⁺-PPases presentes no ovo de *Rhodnius* (Motta e cols., 2004). Se durante o processo de fertilização ocorrer a produção

de PPI tão comuns em inúmeros processos metabólicos, este PPI pode ser utilizado como fonte energética para a geração de um gradiente de próton e conseqüente acidificação do meio, criando as condições iniciais necessárias para disparar o processo. Por outro lado, a $V-H^+-PPase$ está associada também a organelas conhecidas como acidocalcisomos que se encontram no interior dos ovos de *Rhodnius prolixus* e contém, além disso, polifosfatos e cálcio. A acidificação desta organela pode agora liberar íons cálcio que cria as condições necessárias para que localmente ocorra outro evento que é a fusão de membranas, dependente de íons cálcio, entre organelas de vitelo (Ramos e cols., 2006 e 2007), aparentemente importante para reunir a maquinaria de degradação do vitelo em um compartimento único, i.e vitelinas e catepsina D funcional, em uma vesícula ácida. Agora, diferentes vesículas contendo diferentes substâncias como (VT1) que provavelmente estavam fisicamente separadas das catepsinas podem se encontrar e iniciar o processo de degradação da vitelina. Ao final das primeiras 24 horas de desenvolvimento embrionário de *Rhodnius prolixus* os processos de divisão nuclear e celularização já terão ocorrido (Kelly e Huebner, 1989) (**Figura 9**). A partir deste ponto, temos a provável participação adicional da CKII no processo de mobilização da vitelina (Fialho et.al. 1999). A atividade da CKII atinge o seu pico em torno do 7º dia e se mantém alto até o 12º dia, enquanto o pico de fosforilação da vitelina ocorre no 3º dia, sugerindo a existência de um complexo jogo de fosforilações e desfosforilações da vitelina para que ela possa ser acessada pela catepsina D.

Simultaneamente ao processo de utilização de vitelinas, outras proteínas como a RHBP e transferrinas são também degradadas para disponibilizar grupamentos heme e íons ferro para a síntese de proteínas fundamentais de uma célula, que necessita de respiração.

Ao longo do desenvolvimento embrionário, e por volta do décimo dia de desenvolvimento o embrião já se encontra completo e todo o vitelo remanescente encontra-se no interior do sistema digestivo do embrião (Kelly e Huebner, 1986). A quantidade de vitelina utilizada até este momento é cerca de 15% do conteúdo inicial de vitelina (Oliveira e cols., 1989), o que corresponde grosseiramente a quantidade de VT1 encontrada no interior de um ovócito (Salerno et.al. 2002), e que se encontrava na região periférica dos ovos (Salerno, 2001), assim como os acidocalcisomos (Ramos comunicação pessoal) e provavelmente as fosfatases e catepsina D.

A natureza parece assim ter utilizado a estratégia de acumular na periferia dos ovócitos o material necessário (substratos, enzima e retículo endoplasmático) para dar apoio ao processo de divisão nuclear e celularização que no *Rhodnius prolixus* ocorre nas primeiras 24 horas de desenvolvimento (Kelly e Huebner, 1989). Neste modelo experimental, a VT1, transferrina, acidocalcisomos, $V-H^+-PPase$, $V-H^+-ATPase$, calreticulina encontram-se na região cortical do ovócito. Simultaneamente ao aumento da expressão de calreticulina, provavelmente disparado pela fertilização (Ramos e cols., 2010), observa-se aumento e maturação do retículo endoplasmático rugoso, que pode iniciar o processo de síntese das primeiras proteínas, agora codificada pelo próprio embrião, que completou com a fertilização, o material genético necessário para o seu desenvolvimento. O desenvolvimento embrionário segue o seu curso, imposto pelo programa genético do embrião, mas sempre utilizando o material previamente acumulado pelo organismo materno (e provavelmente por algum tipo de controle local) já que o processo de utilização do vitelo é lento e localizado. Aos dez dias de desenvolvimento o embrião já se encontra completo, no entanto, até este momento, somente uma pequena parte do total de vitelina foi utilizada (cerca de 15%) e que corresponde a quantidade de VT1 previamente acumulada no ovo. Coincidentemente a VT1 é a única forma de vitelina que se encontra na periferia do ovo

(Salerno, 2001). A partir do décimo dia de desenvolvimento, quando o vitelo fica enclausurado no interior do sistema digestivo (Kelly e Huebner, 1986), o processo de utilização de vitelo acelera, e no décimo quinto dia quando ocorre a eclosão da ninfa de 1^o estágio (Oliveira e cols., 1989), observa-se o consumo de aproximadamente 50% do conteúdo inicial de vitelina. A ninfa nasce já alimentada e a utiliza em vida livre pelos próximos cinco dias, quando então terá de encontrar algum hospedeiro vertebrado que lhe forneça sangue, que é o seu alimento natural.

Evidentemente trata-se apenas de uma hipótese de trabalho (**Figura 9**) cheia de conjecturas, mas que por ter uma linha de raciocínio aparentemente “correta ou aceitável”, ela nos permite testá-la, e validá-la ou não em função dos resultados que serão obtidos no futuro.

- A Organização Espacial dos Componentes de Vitelo -

Embora a localização exata de todos os componentes do vitelo ainda não seja conhecida, algumas delas já foram relatadas na literatura e serão aqui utilizadas para compor e discutir um possível esquema que explique os dados até agora encontrados, especialmente em relação ao modelo *Rhodnius prolixus*, e mostrando ainda os pontos desconhecidos que requerem investigação.

- a. Os grandes grânulos de vitelo contém vitelina no seu interior (Oliveira, e cols. 1989) especialmente VT2 e VT3 enquanto a VT1 encontra-se associada aos pequenos grânulos na região cortical dos ovócitos (Salerno, 2001).
- b. Acidocalcisomas que também são encontráveis na região cortical dos ovos têm associado polifosfatos, cálcio e na sua membrana a H+Pirofosfatase capaz de acidificar a organela a custas da hidrólise de PPi (Ramos comunicação pessoal).
- c. Polifosfatos além de serem encontrados nos acidocalcisomas parecem também estar presentes em grânulos de vitelo (Gomes et.al., 2009).
- d. A atividade da fosfatase ácida é encontrada tanto em acidocalcisomos assim como em grânulos de vitelo (Ramos comunicação pessoal) e provavelmente na fração solúvel das organelas. A ativação da fosfatase ácida é dependente de fertilização (Fialho e cols., 2002) e inibidores de fosfatase ácida inibem a proteólise da catepsina D (Fialho et.al. 2005).
- e. A catepsina D foi localizada na fração de membrana de grânulos de vitelo (Nussenzeig e t al. 1992).
- f. Calreticulina encontra-se em membranas dispersas no citoplasma periférico do ovo (primórdio de retículo endoplasmático?)

A reunião desse conjunto de informações nos permite propor o seguinte modelo esquemático para o início da embriogênese deste inseto.

Considerações Finais

Nós nunca saberemos tudo sobre todos os organismos e talvez nem tudo sobre um único organismo (com exceção talvez do *Homo sapiens*). Por isso temos que escolher alguns organismos que sejam mais simples de abordar experimentalmente. Isso foi proposto inicialmente pela escola de fisiologia francesa fundada por Bichat e cujo expoente máximo foi Claude Bernard (ver Conti, 2001). Em 1948 o pesquisador inglês Sir Vincent B. Wigglesworth sugeriu que os insetos poderiam ser excelentes modelos experimentais para entender diversos fenômenos fisiológicos dos animais.

No século passado dezenas ou centenas de modelos biológicos foram desenvolvidos para os mais diversos estudos experimentais. Dentre eles devemos destacar principalmente dois membros dos Ecdisozoa, *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans*.

Para sabermos se um animal é um bom sistema modelo em biologia devemos nos fazer as seguintes perguntas:

- O organismo é fácil de manter?
- O seu tamanho é conveniente?
- É barato mantê-lo?
- Tem um ciclo de vida curto?
- É geneticamente manipulável?
- É economicamente importante?
- Existem muitas pessoas interessadas nele?
- Interações entre os critérios

in: <http://www.bio.umass.edu/biology/kunkel/modelsys.html>

Somente para alguns dos sistemas modelo atualmente em uso nos nossos laboratórios podemos responder afirmativamente a todas essas perguntas, mas as quatro primeiras são essenciais. Somente se algumas das outras características são muito mais importantes, poderíamos considerar o sistema como um modelo adequado.

O Brasil possui uma biodiversidade ainda não explorada devidamente do ponto de vista de estabelecimento de modelos animais. Com raríssimas exceções, poucos animais nativos (invertebrados ou vertebrados) foram reconhecidos como modelos para pesquisa no Brasil e menos ainda no mundo. Podemos citar o caso de *Trypanosoma cruzi* e dos tripanossomatídeos de importância médica, como Leishmanias. Uma análise cientométrica feita por um de nós (CEW) revelou alguns dados interessantes sobre o número de publicações brasileiras com modelos estabelecidos ou nativos (ver Winter, 2008). Assim, por exemplo, o artigo mais citado no período analisado (1974-2006) publicado por um grupo brasileiro usou *Schistosoma mansoni* como modelo. Outro dado interessante é que comunidades pequenas tendem a ter grandes variações percentuais na quantidade de artigos publicados por ano. A Coreia do Sul, um país de nível econômico semelhante ao nosso, começa a sua publicação em modelos estabelecidos, como *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* e *C. elegans*, somente em meados da década de 1980, mas em poucos anos atinge níveis superiores aos dos trabalhos publicados nestes mesmos organismos no Brasil.

O modelo de estudo *Rhodnius prolixus*, se apresenta hoje para o Brasil, com alguma vantagem competitiva em relação a outros países. Por razões históricas, que não há necessidade de discorrer neste momento, o Brasil reuniu ao longo dos anos, um grande número de laboratórios e cientistas interessados em diferentes aspectos da biologia deste inseto e publicaram um grande número de artigos científicos em suas respectivas áreas de atuação. Estes cientistas por sua vez estão e continuarão treinando um grande número de estudantes de iniciação científica e alunos de pós-graduação no uso desse modelo. Além disso, vários laboratórios criam este inseto em seus respectivos laboratórios e em alguns casos em grandes quantidades, apesar da dificuldade inerente para a criação e manutenção de uma colônia deste inseto que se alimenta de sangue. Com o projeto genoma de *Rhodnius prolixus*, que teve a participação brasileira, o Brasil é o país hoje que reúne o maior número de laboratórios e pessoas interessadas em utilizar as informações que estão sendo geradas por este projeto. A união de cientistas brasileiros em projetos específicos em torno deste modelo trará para o Brasil recompensas no curto, médio e longo prazo. Esta união já vem sendo observada em muitas áreas, o que nos permite antever um futuro pro-

missor para este grupo de pesquisadores no Brasil. O mesmo fenômeno se observa também em torno do modelo *Boophilus microplus*, *Aedes aegypti*, que tem a participação de vários laboratórios em torno de projetos específicos comuns. A reunião desses grupos em torno do Instituto Nacional em Entomologia Molecular é o melhor exemplo dessa possibilidade de união. O Brasil precisa ampliar ainda mais esta base de interações produtivas para fortalecer a competitividade internacional da ciência brasileira.

32

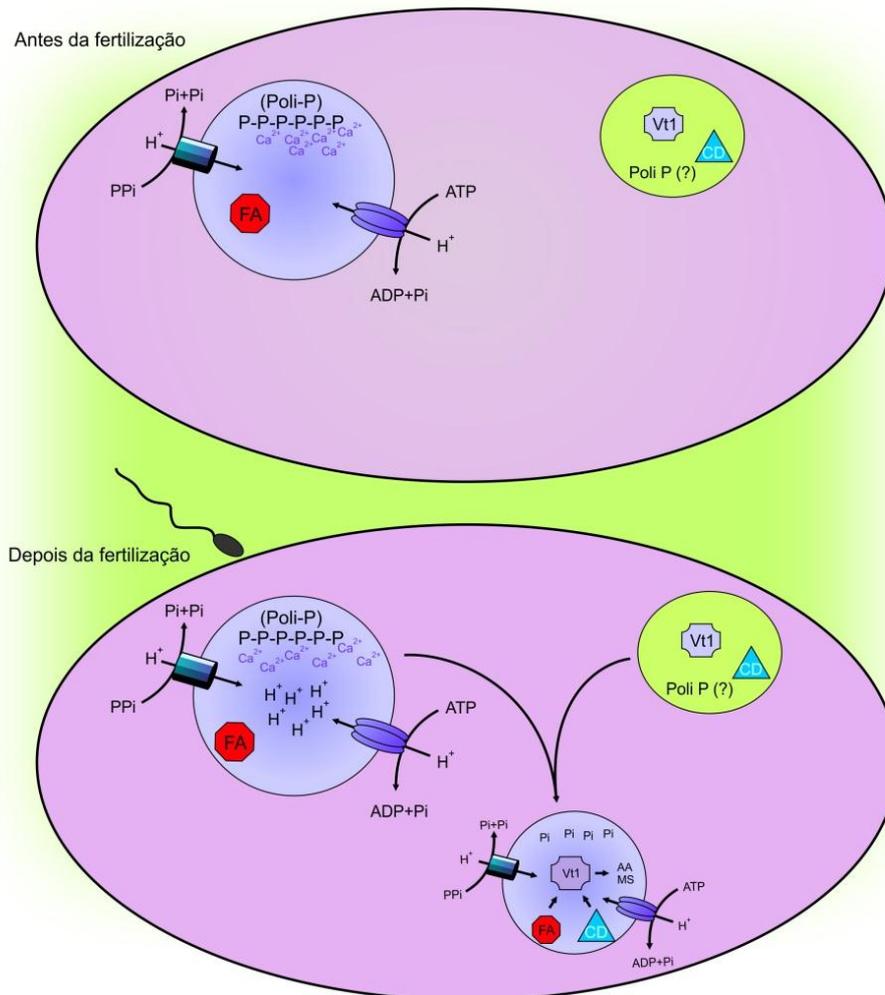


Figura 9 – Esquema da hipótese de trabalho descrita no texto acerca dos possíveis mecanismos que disparam a degradação de vitelo durante a embriogênese inicial em ovos de *R. prolixus*. Após a fertilização a liberação de Ca^{2+} promoveria a fusão entre os diferentes grânulos de vitelo e a reunião da maquinária de degradação das vitelinas. A catepsina-D seria concomitantemente ativada a partir da degradação dos polifosfatos, que pode ter sido disparada pela ativação da fosfatase ácida após a fertilização.

Referências Bibliográficas.

- Abramov, A.Y., Fraley, C., Diao, C.T., Winkfein, R., Colicos, M.A., Duchon, M.R., French, R.J., Pavlov, E., 2007. Targeted polyphosphatase expression alters mitochondrial metabolism and inhibits calcium-dependent cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 18091-18096.
- Aft, R.L., Mueller, G.C., 1983. Hemin mediated DNA strands scission. *J. Biol. Chem.* 258, 12069-12072.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. *Molecular Biology of the Cell*, fourth ed. Garland Science, New York.
- Anderson, T.A., Levitt, D.G., Banaszak, L.J., 1998. The structural basis of lipid interactions in lipovitellin, a soluble lipoprotein. *Structure* 6, 895-909.
- Atella, G.C., Gondim, K.C., Machado, E.A., Medeiros, M.N., Silva-Neto, M.A.C., Masuda, H., 2005. Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. *A Acad Bras Cienc* 77, 405-430.
- Attardo, M.A., Hansen, I.A., Raikhel, A.S., 2005. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 661-675.
- Avarre, J.-C., Lubzens, E., Babin, P.J., 2007. Apolipocrustacein, formerly vitellogenin, is the major egg yolk precursor protein in decapod crustaceans and is homologous to insect apolipophorin II/I and vertebrate apolipoprotein B. *BMC Evolutionary Biology* 7, 3.
- Babin, P.J., 2008. Conservation of a vitellogenin gene cluster in oviparous vertebrates and identification of its traces in the platypus genome. *Gene* 413, 76-82.
- Babin, P.J., Bogerd, J., Kooiman, F.P., Van Marrewijk, W.J.A., Van der Horst, D.J., 1999. Apolipophorin II/I, apolipoprotein B, vitellogenin and microsomal triglyceride transfer protein genes are derived from a common ancestor. *J. Mol. Evol.* 49, 150-160.
- Babin, P.J., Gibbons, G.F., 2009. The evolution of plasma cholesterol: direct utility or a "spandrel" of hepatic lipid metabolism? *Progress in Lipid Research* 48, 73-91.
- Baker, M.E., 1988a. Invertebrate vitellogenin is homologous to human von Willebrand factor. *Biochem. J.* 256, 1059-1063.
- Baker, M.E., 1988b. Is vitellogenin an ancestor of apolipoprotein B-100 of human low-density lipoprotein and human lipase? *Biochem. J.* 255, 1057-1060.
- Baltscheffsky, M., Nadanaciva, S., Schultz, A., 1998. A pyrophosphate synthase gene: molecular cloning and sequencing of the cDNA encoding the inorganic pyrophosphate synthase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1364, 301-306.
- Bartfeld, N.S., Law, J.H., 1990. Isolation and molecular cloning of transferrin from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* 265, 21684-21691.
- Bast, R.E., Telfer, W.H., 1976. Follicle cell protein synthesis and its contribution to the yolk of the cecropia moth oocyte. *Dev. Biol.* 52, 83-97.
- Baykov, A. A., Cooperman, B. S., Goldman, A. and Lahti, R., 1999. Cytoplasmic inorganic pyrophosphatase. *Prog Mol Subcell Biol* 23, 127-50.

- Borovsky, D., Van Handel, E., 1980. Synthesis of ovary-specific proteins in mosquitoes. *Int. J. Invert. Reprod.* 2, 153-163.
- Bownes, M., 1992. Why is there similarity between insect yolk proteins and vertebrate lipases. *J. Lipid Res.* 33, 777-790.
- Bownes, M., Pathirana, S., 2002. The yolk proteins of higher Diptera. in: *Reproductive Biology of Invertebrates - Progress in Vitellogenesis* (edit AS Raikhel e TW Sappington), 12A, 103-130.
- Bownes, M., Hurd, H., Busgen, T., Servay, D., Alvis, S., Popovic, B., Bruce, S., Burns, I., Rothwell, K., Walkinshaw, M., 2002. *Drosophila* yolk protein produced in *E. coli* is accumulated by mosquito ovaries – *Insect Mol. Biol.* 11, 487-496.
- Brawand, D.; Wahli, W. Kaessmann, H., 2008. Loss of egg yolk genes in mammals and the origin of lactation and placentation. *PLoS Biology* 6, 507-517.
- Braz, G.R.C., Moreira, M.F., Masuda, H., Oliveira, P.L., 2002. *Rhodnius* heme-binding protein (RHBP) is a heme source for embryonic development in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 32, 709-717.
- Britton, C., Murray, L., 2004. Cathepsin L protease (CPL-1) is essential for yolk processing during embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Sci.* 117, 5133-5143.
- Brooks, J.M., Wessel, G.M., 2002. The major yolk protein in sea urchin is a transferrin-like, iron binding protein. *Dev. Biol.* 245, 1-12.
- Byrne, B.M., Gruber, M., 1989. The evolution of egg yolk proteins. *Progr. Biophys. molec. Biol.* 53, 33-69.
- Campos, E., Facanha, A., Moraes, J., da Silva Vaz, I., Jr., Masuda, A., Logullo, C., 2007. A mitochondrial exopolyphosphatase activity modulated by phosphate demand in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 1103-1107.
- Chin, D., Means, A.R., 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* 10, 322-328.
- Cecchettini, A., Locci, M.T., Masetti, M., Fausto A., M., Gambellini, G., Mazzini, M., Giorgi, F., 2003. Vitellin cleavage products are proteolytic degraded by ubiquitination in stick insect embryos. *Micron.* 34, 39-48.
- Chino, H., 1985. Lipid transport: biochemistry of hemolymph lipophorin, In: Kerkut, G.A. and Gilbert, L.I.), *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. SInauer., New York, 10, pp. 115-134.
- Chen, J.S., Raikhel, A.S., 1996. Subunit cleavage of mosquito pro-vitellogenin by a subtilisin-like convertase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6186-6190.
- Chen, J.S., Sappington, T.W., Raikhel, A.S., 1997. Extensive sequence conservation amount insect, nematode and vertebrate vitellogenins reveals ancient common ancestry. *J. Mol. Evol.* 44, 440-451.
- Chino, H., Downer, R.G.H., Wyatt G.R., Gilbert, L., 1981, Lipophorin a major class of lipoprotein of insect hemolymph. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 11, 491-493.
- Comas, D., Piulachs, M.D., Bellés, X., 2000. The vitellogenin of *Blattella germanica* (L) (Dictyoptera, Blattellidae): nucleotide sequence of the cDNA and analysis of the protein structure. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 45, 1-11.

- Conti, F., 2001. Claude Bernard: primer of the second biomedical revolution. *Nature Rev. Mol. Biol.* 2, 703-708.
- Conway Morris, S., 1998. Eggs and embryos from the Cambrian. *BioEssays* 20, 676-682.
- Conway Morris, S., 2000. Evolution: bringing molecules into the fold. *Cell* 100, 1-11.
- Conway Morris S., 1998. *The crucible of creation – the Burgess shale and the rise of animals*, first ed. Oxford University Press, Oxford.
- Coux, O., Tanaka, K., Goldberg., A.L., 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasome. *A. Rev. Biochem.* 65, 801-847.
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., Moreno, S. N., 2005. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 251-261.
- Docampo, R., Moreno, S. N., 2001. The acidocalcisome. *Mol. Biochem. Parasitol.* 114, 151-159.
- Dorai-Raj, S., Bradley, J.T., 1993. Ubiquitinated yolk proteins in insects. *J. Al. Acad. Sci.* 30, 64-97.
- Drozdowicz, Y. M., Rea, P.A., 2001. Vacuolar H(+) pyrophosphatases: from the evolutionary backwaters into the mainstream. *Trends Plant Sci.* 6, 206-121.
- Cuénot, L., 1949. Les Onychophores, in: *Traité de Zoologie – Anatomie, Systématique, Biologie.* (PP Grassé, edit), vol VI, Masson et C^{le}. Editeurs, Paris, 3-37.
- Dansa-Petretski, M., Ribeiro, J.M.C., Atella, G.C., Masuda, H., Oliveira. P.L., 1995. Antioxidant role of heme-binding protein. *J. Biol. Chem.* 270, 10893-10896.
- Dantuma, N.P., Potters, M., de Winther, M.P., Tensen, C.P., Kooiman, F.P., Bogerd, J., Van Der Horst, D.J., 1999. An insect homolog of the vertebrate very low density lipoprotein receptor mediates endocytosis of lipophorins. *J. Lipid Res.* 40, 973-978.
- Ellgaard, L., Frickel, E.M., 2003. Calnexin, calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding. *Cell Biochem. Biophys.* 39, 223-247.
- Ellgaard, L., Helenius, A., 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 181-191.
- Fagotto, F., 1990. Yolk degradation in tick eggs: II. Evidence that cathepsin L-like proteinase is stored as a latent, acid-activable proenzyme. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 14, 237-252.
- Fagotto, F., 1991. Yolk degradation in tick eggs: III. Developmentally regulated acidification of the yolk spheres. *Dev. Growth Dif.* 33, 57-66
- Fialho, E., Masuda, H., Silva-Neto, M. A., 1999. Protein phosphorylation during *Rhodnius prolixus* embryogenesis: protein kinase casein kinase II activity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 215-223.
- Fialho, E., Nakamura, A., Juliano, L., Masuda, H., Silva-Neto, M. A., 2005. Cathepsin D-mediated yolk protein degradation is blocked by acid phosphatase inhibitors. *Arch. Biochem. Biophys.* 436, 246-253.
- Fialho, E., Silveira, A. B., Masuda, H., Silva-Neto, M. A., 2002 . Oocyte fertilization triggers acid phosphatase activity during *Rhodnius prolixus* embryogenesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 871-880.
- Fink, A.L., 1999. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol. Rev.* 79, 425-449.

- Finn, R.N., Kristoffersen, B.A., 2007. Vertebrate vitellogenin gene duplication in relation to the "3R Hypothesis": correlation to the pelagic egg and the oceanic radiation of Teleosts. *PLoS One* 1, 169.
- Flower, D.R., 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* 318, 1-14.
- Gelebart, P., Opas, M., Michalak, M., 2005. Calreticulin, a Ca²⁺-binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 260-266.
- Gerhart, J., Kirschner, M., 1997. *Cells, Embryos and Evolution – Toward a cellular and developmental understanding of phenotypic variation and evolutionary adaptability*, Blackwell Science, New York.
- Giorgi, F., Bradley, J.T., Nordin, J.H., 1999. Differential vitellin polypeptide processing in insect embryos. *Micron* 30, 579-596.
- Gomes, F.M., Ramos, I.B., Motta, L.M., Miranda, K., Santiago, M.F., Souza, W., Machado, E.A., 2008. Polyphosphate polymers during early embryogenesis of *Periplaneta Americana*. *J. Insect Physiol.* 54, 1459–1466
- Gomes, F.M., Oliveira, D.M.P., Motta, L.S., Ramos, I.B., Miranda, K.M. and Machado, E.A. 2010. Inorganic Polyphosphate Inhibits an Aspartic Protease-Like Activity in the eggs of *Rhodnius prolixus* (Stahl) and Impairs Yolk Mobilization In Vitro. *J. Cell. Physiol.* 222, 606–611.
- Gondim, K.C., Oliveira, P.L., Masuda, H., 1989. Lipophorin and oogenesis in *Rhodnius prolixus*: Transfer of phospholipids. *J. Insect Physiol.* 35, 19-27.
- Grant, B.D., Sato M., 2006. Intracellular trafficking (January 21, 2006), *WormBook* (edit. The *C. elegans* Research Community), Wormbook, doi/10.1895/wormbook.1.77.1, <http://www.wormbook.org>
- Gray, Y.H.M., Sved, J.A., Preston, C.R., Engels, W.R., 1998. Structure and associated mutational effects of the cysteine proteinase (CP1) gene of *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol. Biol.* 7, 291-293.
- Hagedorn, H.H., Kunkel, J.G., 1979. VG and VT in insects. *Ann. Rev. Entomol.* 24, 475–505.
- Hayakawa, H., Andoh, T., Watanabe, T., 2006. Precursor structure of egg proteins in the coral *Galaxea fascicularis*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 344, 173– 80.
- Hens, K., Macours, N., Claeys, I., Francis, C., Hybrechys, R., 2004. Cloning and expression of the yolk protein of the tsetse fly *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 1281-1287.
- Herz, J., Bock, H.H., 2002. Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 405-414.
- Hirai, M., Watanabe, D., Kiyota, A., Chinzei, T., 1998. Nucleotide sequence of vitellogenin mRNA in the bean bug *Riptortus clavatus*: Analysis of processing in the fat body and ovary. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 537-547.
- Hirai, M., Watanabe, D., Chinzei, Y., 2000. A juvenile hormone-repressible transferin-like protein from the bean bug, *Riptortus clavatus* :cDNA sequence analysis and protein identification during diapause and vitellogenesis. *Arch. Insect Biochem. and Physiol.* 44, 17-26.
- Hue, E., Rubin, C.S., 1990. Casein Kinase II from *C. elegans*-Properties and developmental regulation of the enzyme; cloning and sequence analysis of cDNA

and the gene for the catalytic subunit. *J. Biol. Chem.* 256, 5072-5080.

- Ikeda, S., Morioka, S. and Ogawa, H., 1990. Influence of culturing temperature and proteinase inhibitors on the spontaneously occurring changes in the organ culture of psoriatic skin. *J. Dermatol. Sci.* 1, 85-92.
- Irie, K., Yamashita, O., 1980. Changes in vitellin and other yolk proteins during embryonic development in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect. Physiol.* 26, 811-817.
- Irie, K., Yamashita, O., 1983. Egg-specific protein in the silkworm, *Bombyx mori*: purification, properties, localization and titre changes during oogenesis and embryogenesis. *Insect Biochem.* 13, 71-80.
- Iyengar, A.R., Kunkel, J.G., 1995. Follicle cell calmodulin in *Blattella germanica*: transcript accumulation during vitellogenesis is regulated by juvenile hormone. *Dev. Biol.* 170, 314-320.
- Izumi, S., Tomino, S., Chino, H., 1980. Purification and molecular properties of vitellin from the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 10, 199-208.
- Izumi, S., Yano, K., Yamamoto, Y., Takahashi, S.Y., 1994. Yolk proteins from insect eggs: structure, biosynthesis and programmed degradation during embryogenesis. *J. Insect Physiol.* 40, 735-746.
- Jamroz, R.C., Gasdaska, J.R., Bradfield, J.Y., Law, J.H., 1993. Transferrin in a cockroach: molecular cloning, characterization, and suppression by juvenile hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1320-1324.
- James, P., Vorherr, T., Carafoli, E., 1995. Calmodulin-binding domains: just two faced or multi-faceted? *Trends Biochem. Sci.* 20, 38-42.
- Johnson, S., Michalak, M., Opas, M., Eggleton, P., 2001. The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. *Trends Cell Biol.* 11, 122-129.
- Kang, Y., Kykajisjt, T.C., Antwerpen, R.V., Law, J.H., 1995. Sequestration of insecticyanin, a blue hemolymph protein, into the egg of hawkmoth *Manduca Sexta* - Evidence for receptor-mediated endocytosis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 503-510.
- Kang, Y., Ziegler, R., Van Antwerpen, R., Law, J H., 1997. Characterization of the solubilized oocyte membrane receptor for insecticyanin, a biliprotein of the hawkmoth *Manduca sexta*. *Biochim. Biophys. Acta* 1324, 285-295.
- Kawooya JK., and Law J.H., 1988. Role of lipophorin in lipid transport to the insect egg. *J. Biol. Chem.* 263, 8748-8753.
- Kawooya, J.K., Osir, E.O., Law, J.H., 1986. Physical and chemical properties of microvitellogenin – a protein form the egg of the tobacco hornworm moth *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* 261, 10844-10849.
- Kawooya, J.K., Law, J.H., 1983. Purification and properties of microvitellogenin of *Manduca sexta* role of juvenile hormone in appearance and uptake. *Biochem. Biophys. Research Comm.* 117, 643-650.
- Kawooya, J.K., Kein, P.S., Law, J.H., Riley, C.T., Ryan, R.O., Sjapiro, J.P., 1985. Bio-regulators for Pest Control, Logman, Washington DC.
- Kelly, G. H., Huebner, E., 1989. Embryonic development of the hemipteran insect *Rhodnius prolixus*. *J. Morph.* 199, 175-196.

- Kornberg, A., 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 23, 1-18.
- Kristoffersen, B.A., Nerland, A., Nilsen, F., Kolarevic, J., Finn, R.N., 2009. Genomic and proteomic analyses reveal non-neofunctionalized vitellogenins in a basal Clupeocephalan, the atlantic herring, and point to the origin of maturational yolk proteolysis in marine teleosts. *Mol. Biol. Evol.* 26, 1029-1044.
- Kulaev, I., Kulakovskaya, T., 2000. Polyphosphate and phosphate pump. *An. Rev. Microbiol.* 54, 709-734.
- Kulaev, I., Vagabov, V., Kulakovskaya, T., 1999. New aspects of inorganic polyphosphate metabolism and function. *J. Biosci. Bioeng.* 88, 111-129.
- Kumble, K. D.; Kornberg, A., 1995. Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues. *J. Biol. Chem.* 270, 5818-5822.
- Kunkel, J.G., 1991. Models of pattern formation in insect oocytes. *In vivo* 5, 443-456.
- Kurama, T., Kurata, S., Natori, S., 1995. Molecular characterization of an insect transferrin and its selective incorporation into eggs during oogenesis. *Eur. J. Biochem.* 228, 229-235.
- Law, J.H., 2002. Insect, Oxygen and Iron. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 292, 1191-1195.
- Lichko, L.P., Kulakovskaya, T.V., 1998. Membrane-bound and soluble polyphosphatases of mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*: identification and comparative characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 1372, 153-62.
- Lichko, L.P., Kulakovskaya, T.V., 2003. Nuclear exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae* is not encoded by the PPX1 gene encoding the major yeast exopolyphosphatase. *FEMS Yeast Res.* 3, 113-117.
- Lynch, M., 1999. The age relationships of major animal phyla. *Evolution* 53, 319-325.
- Machado, E.A., Atella, G.C., Gondim, K.C., Souza W., Masuda, H., 1996. Characterization and Immunocytochemical localization of lipophorin binding sites in the oocytes of *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 31, 185-196.
- Machado, E.A., Oliveira, P.L., Moreira, M.F., Souza, W., Masuda, H., 1998. Uptake of *Rhodnius* Heme-Binding Protein (RHBP) by the ovary of *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 39, 133-143.
- Mann, C.J., Anderson, T.A., Read, J., Chester, S.A., Harrison, G.B., Köchl, S., Ritchie, P.J., Bradbury, P., Hussain, F.S., Amey, J., Vanloo, B., Rosseneu, M., Infante, R., Hancock, J.M., Lefitt, D.G., Banaszak, L.J., Scott, J., Shoulders, C.C., 1999. The structure of vitellogenin provides a molecular model for the assembly and secretion of atherogenic lipoproteins. *J. Mol. Biol.* 285, 391-408.
- Maeshima, M., 2000. Vacuolar H(+)-pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 37-51.
- Masuda, H., Braz, G., Paiva e Silva, G.O., Silva-Neto, M.A.C., Oliveira, P.L., 2004. Non-vitelin yolk proteins, In: Raikhel, A. (ed), *Reproductive Biology of Invertebrates*. Science Publishers. Inc., New York, pp. 289-314.
- Matyash, V., Entchev, E.V., Mende, F., Wilsch-Brauninger, M., Thiele, C., Schmidt, A.W., Knolker, H.J., Ward, S., Kurzchalia, T.V., 2005. Sterol-derived hormone(s) controls entry into diapause in *Caenorhabditis elegans* by consecutive activation of DAF-12 and DAF-16. *PLoS Biol.* 10, 1561-1571.

- McIntosh, M. T., Drozdowicz, Y. M., Laroija, K., Rea, P. A., Vaidya, A. B., 2001. Two classes of plant-like vacuolar-type H(+)-pyrophosphatases in malaria parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* 114, 183-195.
- Medina, M., P. Leon, e cols., 1988. *Drosophila* cathepsin B-like proteinase: a suggested role in yolk degradation. *Arch. Biochem. Biophys.* 263, 355-63.
- Melo, A.C.A., Valle, D., Machado, E.A., Salerno, A.P., Paiva-Silva, G.O., Cunha-E-Silva, N.L., Souza, W., Masuda, H., 2000. Synthesis of vitellogenin by the follicle cells of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 549-557
- Michalak, M., Corbett, E. F., Mesaeli, N., Nakamura, K., Opas, M., 1999. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem. J.* 344, 281-292.
- Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L. I., Opas, M., 2009. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* 417, 651-666.
- Michalak, M., Mariani, P., Opas, M., 1998. Calreticulin, a multifunctional Ca²⁺ binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem. Cell Biol.* 76, 779-785.
- Motta, L.S., Silva, W.S, Oliveira, D.M.P., Souza, W., Machado, E.A., 2004. A new model for proton pumping in animal cells: the role of pyrophosphate. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 19–27.
- Motola, D.L., Cummins, C.L., Rottiers, V., Sharma, K.K., Li, T., Li, Y., Suino-Powell, K., Xu, H.E., Auchus, R.J., Antebi, A., Mangelsdorf, D.J., 2006. Identification of ligands for DAF-12 that govern dauer formation and reproduction in *C. elegans*. *Cell* 124, 1209-1223.
- Nico, J.A., 2008. Evidências de redundância funcional entre as pró-hormônio convertases no processamento pós-traducional do precursor da vitelogenina VIT-6 do nematoide *Caenorhabditis elegans*. 133 p. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Nagem, R.A.P., Brandão Neto, J.R., Forrer, V.P., Meneghini, R., Paiva-Silva, G.O., Oliveira, P.L., Masuda, H., Polikarpov, I., 2001. Crystallization and preliminary X-ray study of heme binding protein from the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *Acta Crystallographica D* 57: 860-861.
- Nichol, H., Law, J.H., Winzerling, J.J., 2002. Iron Metabolism in Insects. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 535-559.
- Nussenzveig, R.H., Oliveira, P.L., Masuda, H., 1992. Identification of yolk platelet-associated hydrolases in the oocytes of *R. prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 21, 252–262.
- Oliveira, P. L., Petretski, M. D. A., Masuda, H., 1989. Vitelling processing and degradation during embryogenesis of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem.* 19, 489-498.
- Oliveira, D.M.P., Ramos, I.B., Reis, F.C.G., Lima, A.P.C.A., Machado, E.A., 2008. Interplay between acid phosphatase and cysteine proteases in mediating vitellin degradation during early embryogenesis of *Periplaneta americana*. *Journal of Insect Physiology* 54, 883–891.
- Oliveira, F.O., Silva, J.R., Dansa-Petretski, M., de Souza, W., Lins, U., Braga, C.S., Masuda, H., Oliveira, P.L., 1999. Haem detoxification by an insect. *Nature* 400, 517-518.
- Oliveira, P.L., Kawooya, J.K., Ribeiro, J.M.C., Meyer, T., Poorman, R., Alves, E.W.,

- Walker, F.A., Machado, E.A., Nussenzveig, R.H., Padovan, G.J., Masuda, H., 1995. A haem-binding protein from haemolymph and oocytes of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. *J. Biol. Chem.* 270, 19897-19901.
- Ono, S., Nagayama, H., Shimura, K., 1975. The occurrence and synthesis of female and egg-specific proteins in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 5, 313-329.
- Paes, M.C., Oliveira, P.L., 1999. An extracellular glutathione peroxidase from the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 41, 171-177.
- Paes, M.C., Borges, O.M., Oliveira, P.L., 2001. Hydrogen peroxide detoxification in the midgut of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *Archives Insect Biochem. Physiol.* 48, 63-71.
- Paiva-Silva, G.O., Sorgine, M.H.F., Benedeti, C.E., Meneghini, R., Almeida, I.C., Machado, E.A., Dansa-Petretski, M., Plascencia, G.Y., Law, J.H., Oliveira, P.L., Masuda, H., 2002. On the biosynthesis of *Rhodnius prolixus* heme-binding protein. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1533-1541.
- Pan, M.L., Wiemerslage, L.J., Telfer, W.H., 1994. Male-grown eggs in *Hyalophora*-deficient follicle cell secretion as well as protein and lipid deposition. *J. Insect Physiol.* 40, 765-773.
- Perez-Castineira, J. R., Alvar, J., Ruiz-Perez, L. M., Serrano, A., 2002. Evidence for a wide occurrence of proton-translocating pyrophosphatase genes in parasitic and free-living protozoa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 567-573.
- Pisoni, R. L., Lindley, E.R., 1992. Incorporation of [³²P]orthophosphate into long chains of inorganic polyphosphate within lysosomes of human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 267, 3626-3631.
- Postlethwait, J.H., Giorgi, F., 1985. Vitellogenesis in insects. In: Browder, L.W., (Ed.), *Developmental Biology, a Comprehensive Synthesis*, New York, Plenum Press, pp. 85–136.
- Pardee, A.B., 1968. Emphores. in: *Structural Chemistry and Molecular Biology* (eds. A. Rich e N. Davidson), W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 216-222.
- Raikhel, A. S., Dhadialla, S.S., 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annu. Rev. Entomol.* 37, 217-251.
- Ramos, I. B., Campos, C. B., Sorgine, M. H., de Souza, W., Machado, E. A., 2011. Calreticulin expression levels and endoplasmic reticulum during late oogenesis and early embryogenesis of *Rhodnius prolixus* Stahl. *Mol. Biol. Rep.* 38, 1757-1767.
- Ramos, I. B., Miranda, K., de Souza, W., Machado, E. A., 2006. Calcium-regulated fusion of yolk granules during early embryogenesis of *Periplaneta americana*. *Mol. Reprod. Dev.* 73, 1247-1254.
- Ramos, I. B., Miranda, K., de Souza, W., Oliveira, D. M., Lima, A. P., Sorgine, M. H., Machado, E. A., 2007. Calcium-regulated fusion of yolk granules is important for yolk degradation during early embryogenesis of *Rhodnius prolixus* Stahl. *J. Exp. Biol.* 210, 138-148.
- Rodrigues, C. O., Ruiz, F. A., Rohloff, P., Scott, D. A., Moreno, S. N., 2002. Characterization of isolated acidocalcisomes from *Toxoplasma gondii* tachyzoites reveals a novel pool of hydrolyzable polyphosphate. *J. Biol. Chem.* 277, 48650-48656.

- Ruiz, F. A., Rodrigues, C. O., Docampo, R., 2001. Rapid changes in polyphosphate content within acidocalcisomes in response to cell growth, differentiation, and environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 276, 26114-26121.
- Rodrigues, C. O., Scott, D. A.; Docampo, R., 1999. Characterization of a vacuolar pyrophosphatase in *Trypanosoma brucei* and its localization to acidocalcisomes. *Mol. Cell Biol.* 19, 7712-7723.
- Rottiers, V., Motola, D.L., Gerisch, B., Cummins, C.L., Nishiwaki, K., Mangelsdorf, D.J., Antebi, A., 2006. Hormonal control of *C. elegans* dauer formation and life span by a Rieske-like oxygenase. *Dev. Cell* 10, 1-10.
- Salerno AP. 2001. Origem e processamento das populações de vitelina de *R. prolixus*: comparação com vitelogenina. PhD thesis – Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Salerno, A.P., Dansa-Petretski, M., Silva-Neto, M.A.C., Coelho, H.S.L., Masuda H., 2002. *Rhodnius prolixus* vitellin is composed of three different populations: comparison with vitellogenin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 709-717.
- Sappington, T.W., 2002. The major yolk proteins of higher Diptera are homologs of a class of minor yolk proteins in Lepidoptera. *J. Mol. Evol.* 55, 470-475.
- Sappington, T.W., Oishi, K., Raikhel, A.S., 2002. Structural characteristics of insect vitellogenins, in: Raikhel, A.S., Sappington, T.W. (eds), *Reproductive Biology of Invertebrates - Progress in Vitellogenesis*, Plenum Press, New York, pp: 69-101.
- Sappington, T.W., Raikhel, A.S., 2002. Preface to volume XII, Part A, in: Raikhel, A.S., Sappington, T.W. (eds), *Reproductive Biology of Invertebrates - Progress in Vitellogenesis*, Plenum Press, New York, pp: ix-xii.
- Sappington, T.W., Kokoza, V.A., Cho, W.L., Raikhel, A.S., 1996. Molecular characterization of the mosquito vitellogenin receptor reveals unexpected high homology to the *Drosophila* yolk protein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8934-8939.
- Schneider, W.J., 1996. Vitellogenin receptors: oocyte-specific members of the low-density lipoprotein receptor supergene family. *Int. Rev. Cytol.* 166, 103-137.
- Sellers, J.A., Hou, L., Schoenberg, D.R., de Medeiros, S.R.B., Wahli, W., Shelness, G.S., 2005. Microsomal triglyceride transfer protein promotes the secretion of *Xenopus laevis* vitellogenin A1. *J. Biol. Chem.* 280, 13902-13905.
- Serino Jr., J.C., Almenara, D.P., Penha-Scarabotto, C., de Moura, J.P., Winter, C.E. 2008. Vitellin-binding proteins in the nematode *Oscheius tipulae* (Nematoda, Rhabditida) - *Comp. Biochem. Physiol.* 151B, 330-335.
- Shapiro, J.T., Law, J.H., Wells, M.A., 1988. Lipid transport in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 33, 297.
- Sharrock, W.J., 1984. Cleavage of two yolk proteins from a precursor in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* 174, 419-431.
- Silva-Neto, M.A.C., Atella, G.C., Fialho, E., Paes, M.C., Zingali, R.B., Petretski, J.H., Alves, E.W., Masuda, H., 1996. Isolation of a calcium-binding phosphoprotein from the oocytes and haemolymph of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *J. Biol. Chem.* 271, 30227-30232.
- Smith, A., 1990. Transport of Tetrapyrroles: Mechanisms and Biological and Regulatory Consequences. In: *Biosynthesis of heme and chlorophylls* (edit. Dailey HA),

McGraw-Hill Publishing Company, New York, pp. 435-490.

- Solovyova, A.S., Meenan, N., McDermott, L., Garofalo, A., Bradley, J.E., Kennedy, M.W., Byron, O., 2003. The polyprotein and FAR lipid binding proteins of nematodes: shape and monomer/dimer states in ligand-free and bound forms. *Eur. Biophys. J.* 32, 465-476.
- Souza, A.V.G., Petretski, J.H., Demasi, M., Bechara, E., Oliveira, P.L., 1997. Urate protects a blood-sucking insect against hemin-induced oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 22, 209-214.
- Storch, J., Thumser, A.E., 2000. The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1486, 28-44.
- Sun, S.H., Dittmer, N.T., Cho, K., Raikhel, A.S., 2000. Lipophorin as a yolk protein precursor in the mosquito, *Aedes aegypti*, *Insect Biochem. Molecular biology*, 30, 1161-117.
- Swiderski, Z., Xylander W., 2000. Vitellocytes and vitellogenesis in cestodes in relation to embryonic development, egg production and life cycle. *Int. J. Parasitol.* 30, 805-817.
- Takahashi, S.Y., Yamamoto, Y., Shionoya, Y., Kageyama, T., 1993. Cysteine proteinase from the eggs of silkworm *Bombyx mori*: indication of latent enzyme and characterization of activation and proteolytic processing in vivo and in vitro. *Journal of Biochemistry* 114, 267-272.
- Taylor, D., Chinzei, Y., 2002. Vitellogenesis in ticks, in: Raikhel, A.S., Sappington, T.W. (eds), *Reproductive Biology of Invertebrates - Progress in Vitellogenesis*, Plenum Press, New York, pp: 175-199.
- Telfer, W., 1954 Immunological studies of insect metamorphosis II: the role of a sex-limited blood protein in egg formation by the cecropia silkworm. *J. Gen. Physiol.* 37, 539-558.
- Telfer, W.H., 2002. Insect yolk proteins: a progress report. in: *Reproductive Biology of Invertebrates - Progress in Vitellogenesis* (edit A.S. Raikhel e T.W. Sappington), 12A, 29-67.
- Telfer, W.H., Pan, M.L., 1988. Adsorptive endocytosis of vitellogenin, lipophorin and microvitellogenin during yolk formation in *Hyalophora*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 9, 339-355.
- Telfer, W.H., Kulakosky, P.C., 1984. Isolated haemolymph proteins as probes of endocytotic yolk formation in *Hyalophora cecropia*. *Adv. Invert. Rep.* 3, 81-86.
- Telfer W.H., Pan, M., Law J.H., 1991. Lipophorin in developing adults of *Hyalophora cecropia*: support of yolk formation and preparation for flight. *Insect Biochem.* 21, 653-663.
- Thacker, C., Rose, A.M., 2000. A look at the *C. elegans* kex2/subtilisin-like proprotein convertase family. *BioEssays* 22, 545-553.
- Thompson, E.M., Nagata, S., Tsuji, F.I., 1989. Cloning and expression of cDNA for the luciferase from the marine ostracod *Vargula hilgendorfii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6567-6571.
- Trombetta, E. S., Parodi, A., 2003. Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 649-676.
- Tsuchida, K., Kawooya, J.K., Law, J.H., Wells, M.A., 1992. Isolation and characteriza-

tion of two follicle-specific proteins from eggs of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 22, 89-92.

- Tufail, M., Takeda, M., 2002. Vitellogenin of the cockroach, *Leucophaea maderae*; nucleotide sequence, structure and analysis of processing in the fat body and oocyte. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 32, 117-134.
- Tufail, M., Lee, J.M., Hatakeyama, M., Oishi, K., Takeda, M., 2000. Cloning of vitellogenin cDNA of the american cockroach, *Periplaneta americana* (Dictyoptera), and its structural and expression analyses. *Arch. Insect Physiol.* 45, 37-46.
- Valle, D., Kun J., Linns, J., Garcia, E.S., Goldenberg, S., 1993. *R. prolixus* VG is synthesized as high molecular weight precursors. Isolation of a VG cDNA clone. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23, 457-465.
- Van Hoof, D., Rodenburg, K.W., Van der Horst, D.J., 2002. Insect lipoprotein follows a transferrin-like recycling pathway that is mediated by the insect LDL receptor homologue. *J. Cell Sci.* 115, 4001-4012.
- Vincent, S.H., 1989. Oxidative effects of heme and porphyrins on proteins and lipids. *Seminars in Hematology* 26,105-113.
- Vincent, S.H., Grady, R.W., Snider, J.M., Muller-Eberhard, U., 1988. The influence of heme-binding proteins in heme-catalyzed oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* 265, 539-550.
- Wahli, W., Dawid, I.B., Ryffel, G.U., Weber, R., 1981. Vitellogenesis and the vitellogenin gene family. *Science* 212, 298-304.
- Wallace, R.A., 1985. Vitellogenesis and oocyte growth: nonmammalian vertebrates, in: Browder, I., (ed), *Developmental Biology: A comprehensive synthesis, (Oogenesis)*, Plenum Press, New York, pp: 127-177.
- Wang, X., Cole, K.D., Law, J.H., 1988. cDNA cloning and deduced amino acid sequence of microvitellogenin, a female specific hemolymph and egg protein from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* 263, 8851-8855.
- Warren, W.C., Hillier, L.W., Graves, J.A., Birney, E., Ponting, C.P., Grützner, F., Belov, K., Miller, W., Clarke, L., Chinwalla, A.T., Yang, S.P., Heger, A., Locke, D.P., Miethke, P., Waters, P.D., Veyrunes, F., Fulton, L., Fulton, B., Graves., T.; Wallis, J., Puente, X.S., López-Otín, C., Ordóñez, G.R., Eichler, E.E., Chen, L., Cheng, Z., Deakin, J.E., Alsop, A., Thompson, K., Kirby, P., Papenfuss, A.T., Wakefield, M.J., Olender, T., Lancet, D., Huttley, G.A., Smit, A.F.A., Pask, A., Temple-Smith, P., Batzer, M.A., Walker, J.A., Konkel, M.K., Harris, R.S., Whittington, C.M., Wong, E.S.W., Gemmell, N.J., Buschiazio, E., Vargas-Jentsch, I.M., Merkel, A., Schmitz, K., Zemmann, A., Churakov, G., Kriegs, J.O., Brosius, J., Murchison, E.P., Sachidanandam, R., Smith, C., Hannon, G.J., Tsend-Ayush, E., Mcmillan, D., Attenborough, R., Rens, W., Ferguson-Smith, M., Lefèvre, C.M., Sharp, J.A., Nicholas, K.R., Ray, D.A., Kube, M., Reinhardt, R., Pringle, T.H., Taylor, J., Jones, R.C., Nixon, B., Dacheux, J.-L., Niwa, H., Sekita, Y., Huang, X., Stark, A., Kheradpour, P., Kellis, M., Flicek, P., Chen, Y., Webber, C., Hardison, R., Nelson, J., Hallsworth-Pepin, K., Delehaunty, K., Markovic, C., Minx, P., Feng, Y., Kremitzki, C., Mitreva, M., Glasscock, J., Wylie, T., Wohldmann, P., Thiru, P., Nhan, M.N., Pohl, C.S., Smith, S.M., Hou, S., Nefedov, M., De Jong, P.J., Renfree, M.B., Mardis, E.R., Wilson, R.K., 2008. Genome analysis of the platypus reveals unique signatures of evolution. *Nature*, 453, 175-183.
- Wigglesworth, V.B., 1943. The fate of the hemoglobin in *Rhodnius prolixus* and other

blood-sucking arthropods. Proc. Roy. Soc. 131, 313-339.

- Wigglesworth, V.B., 1948 Croonian Lecture: The Insect as a Medium for the Study of Physiology. Proc. Roy. Soc. 135, 430-446.
- Wilder, M.N., Subramoniam, T., Anda, K., 2002. Yolk proteins of Crustacea, In: Raikhel, A.S., Sappington, T.W. (eds), *Reproductive Biology of Invertebrates - Progress in Vitellogenesis*, Plenum Press, New York, pp: 131-174.
- Winter, C.E., 1992. The yolk polypeptides of a free-living Rhabditid Nematode. Comp. Biochem. Physiol. 103, 189-196.
- Winter, C.E., 2002. Yolk proteins and their precursors in non-arthropod protostomes, with emphasis on nematodes, In: Raikhel, A.S., Sappington, T.W. (eds), *Reproductive Biology of Invertebrates - Progress in Vitellogenesis*, Plenum Press, New York, pp: 1-27.
- Winter, C.E., 2008. Quantitative analysis of indexed publications on seventeen model organisms in nine countries, from 1974 to 2006. J. Amer. Soc. Informat. Science Technol. 59, 1598-1607.
- Winter, C.E., Penha, C., Blumenthal, T., 1996. Comparison of a vitellogenin gene between two distantly related Rhabditid nematode species. Mol. Biol. Evol. 13, 674-684.
- Yamamoto, Y., Takahashi, S.Y., 1993. Cysteine proteinase from *Bombyx* eggs: role in programmed degradation of yolk proteins during embryogenesis. Mini-review. Comp. Biochem. Physiol. 106, 35-45.
- Yamashita, O., Indrasith, L.S., 1988. Metabolic fates of yolk proteins during embryogenesis in arthropods. Develop. Growth Differ. 30, 347-359.
- Yamashita, O., Irie, K., 1980. Larval hatching from vitellogenin-deficient eggs developed in male hosts of the silkworm. Nature 283, 385-386.
- Yi, W., Zarkower, D., 1999. Similarity of DNA binding and transcriptional regulation by *Caenorhabditis elegans* MAB-3 and *Drosophila melanogaster* DSX suggests conservation of sex determining mechanisms. Development 126, 873-881.
- Yoshiga, T., Hernandez, V.P., Fallon, A.M., Law, J.H., 1997. Mosquito transferrin, an acute-phase protein that is up-regulated upon infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 12337-12342.
- Yoshiga, T., Georgieva, T., Dunkov, B.C., Harizanova, N., Ralchev, K., Law, J.H., 1999. *Drosophila melanogaster* transferrin: cloning deduced protein sequence, expression during the life cycle, gene localization and up-regulation on bacterial infection. Eur. J. Biochem. 260, 414-420.
- Zhang, Y., Kunkel, J.G., 1992. High abundance calmodulin from *Blatella germanica* eggs binds to vitellin subunits but disappears during vitellin utilization. Insect Biochem. Mol. Biol. 22, 293-304.
- Zhang, Y., Kunkel, J.G., 1994. Most egg calmodulin is a follicle cell contribution to the cytoplasm of *Blatella germanica* oocyte. Dev. Biol. 161, 513-521.
- Zhu, J., Indrasith, L.S., Yamashita, O., 1986. Characterization of vitellin, egg-specific protein and 30 kDa protein from *Bombyx* eggs, and their fates during oogenesis and embryogenesis. Biochim. Biophys. Acta 882, 427-436.

