

CAPÍTULO 3

1

Metabolismo Energético Durante a Embriogênese do Carrapato Bovino *Rhipicephalus microplus*.

Jorge Moraes¹, Eldo Campos¹ e Carlos Logullo²

¹Laboratório Integrado de Bioquímica Hatisaburo Masuda (LIBHM), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Campus Macaé.

²Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos e Unidade de Experimentação Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).

Copyright: © 2012 [Jorge Moraes, Eldo Campos, Carlos Logullo]. 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.

O carrapato *Rhipicephalus microplus* é o principal ectoparasita bovino, causador de enormes perdas econômicas em todo o mundo. Este organismo transmite alguns patógenos a humanos e outros animais. Os carrapatos têm uma estratégia de reprodução explosiva. Uma fêmea de *R. microplus* botou cerca de 3500 ovos e, no clima brasileiro, tem várias gerações por ano. O conhecimento do metabolismo energético durante a embriogênese é estratégico para o desenvolvimento de novas metodologias de controle contra este ectoparasita.

2

Aspectos Gerais Sobre Metabolismo Energético.

No curso da evolução, os seres vivos desenvolveram a capacidade de degradar moléculas para disponibilizar energia, através de processos enzimáticos. Especula-se que a primeira via metabólica de sua obtenção surgida na natureza, tenha sido a glicólise anaeróbica, já que nas primeiras fases de adaptação no nosso planeta não existia oxigênio ou seus níveis eram muito baixos (Dudley e Winter, 2002).

Durante o processo evolutivo houve uma enorme mudança na composição química da atmosfera. A expansão das plantas terrestres com capacidade de fixação de dióxido de carbono e liberação de oxigênio no final da era paleozóica promoveu a elevação dos níveis de oxigênio atmosférico representando uma pressão evolutiva muito grande que favoreceu o surgimento de seres eucarióticos com capacidade de degradar oxidativamente glicose até CO_2 . Com isso, estes seres foram capazes de retirar uma quantidade muitas vezes maior de energia destas moléculas (Dudley e Winter, 2002).

O processo de elucidação da via glicolítica teve início no século XIX com os experimentos de Louis Pasteur em 1860 que observou que microrganismos são responsáveis pela fermentação (Kresge e cols., 2005). Em 1897 Eduard Buchner descobriu que extratos livres de células eram capazes de realizar fermentação (Kresge e cols., 2005). Em 1905 Arthur Harden e Willian Young mostraram que fosfato inorgânico era necessário para glicólise e que a fermentação requeria uma fração termoestável denominada “cozimase” (íons metálicos, ATP, ADP e co-fatores como NAD^+) e uma termo sensível denominada “zimase” (composta principalmente por enzimas). No entanto, a elucidação completa da via glicolítica foi realizada por um conjunto de pesquisadores liderados por Otto Fritz Meyerhof em 1940 (Kresge e cols., 2005).

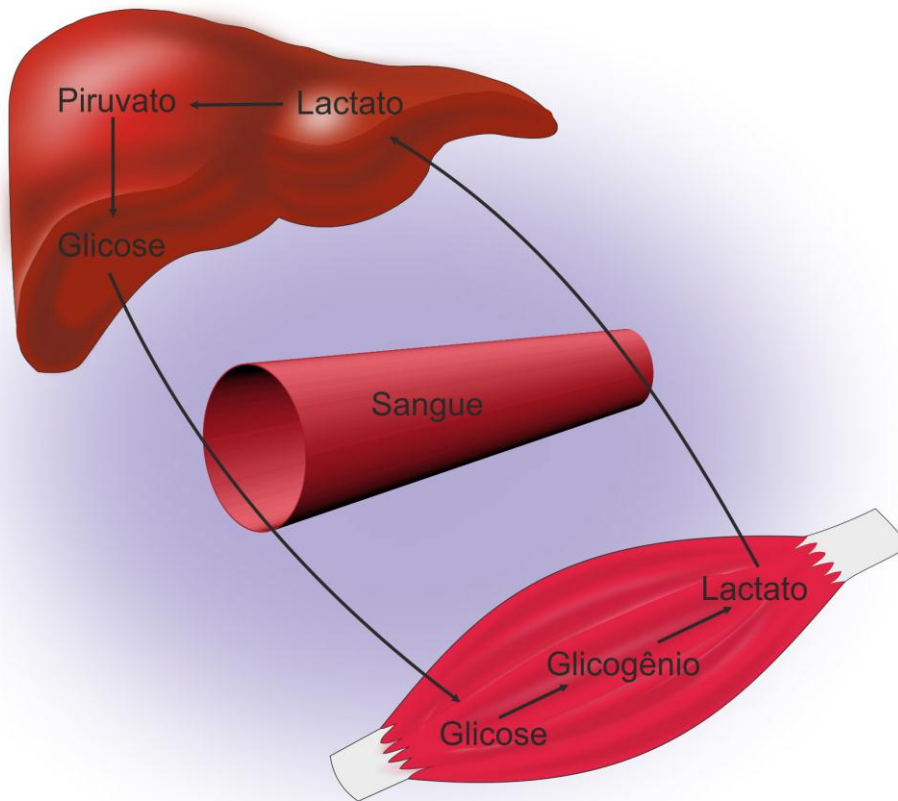
Meyerhof também determinou que o glicogênio poderia ser convertido em ácido láctico no músculo na falta de oxigênio e que na sua presença apenas uma pequena parte do ácido láctico era oxidado. Mostrou ainda que o restante é reconvertido em glicogênio (Figura 1). A descoberta do ciclo do ácido láctico representou a primeira evidência da transformação cíclica de energia em células. Estes resultados, de análise deram a Meyerhof e Hill o prêmio Nobel de fisiologia e medicina em 1922 (Kresge e cols., 2005).

Em 1932 Gustavo Embden construiu um modelo para as seqüências de reações que compõem a via glicolítica. Nos anos subseqüentes até o início da década de 40 Meyerhof e seus colaboradores trabalharam em detalhes da glicólise que por isso também passou a ser chamada de via de Embden-Meyerhof (Kresge e cols., 2005).

Os processos catabólicos, de uma forma geral, visam suprir os organismos de energia para manutenção de suas funções vitais. Esta energia, em seres heterotróficos, é retirada dos alimentos que fornecem os carboidratos, os lipídeos, as proteínas. Já em seres autotróficos a energia da luz é utilizada para converter água e dióxido de carbono (CO_2) em glicose. A utilização destas moléculas tem como objetivo principal a obtenção de ATP para as células. Quando o ATP é hidrolisado é capaz de liberar uma grande quantidade de energia, contida nas suas ligações de fosfato, permitindo que reações importantes, que “*in vitro*” são termodinamicamente desfavoráveis aconteçam com muita facilidade dentro dos seres vivos. No entanto, dentro das células a degradação de moléculas energéticas como a glicose não acontece em um único passo e sim, em múltiplas etapas reacionais coordenadas, denominadas vias metabólicas (Kresge e cols., 2005).

A glicólise, o ciclo de Krebs, a cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa têm papel central no fornecimento de energia. No catabolismo, os metabólitos convergem para um caminho central, que posteriormente poderão ser transformadas em um intermediário comum, acetil-CoA, que então é completamente oxidado a CO_2 e H_2O , através das reações do ciclo de Krebs, que é responsável pela principal produção de poder redutor, na forma de NADH e FADH_2 , que transferem elétrons para cadeia transportadora de elétrons, que gera um gradiente eletroquímico de prótons o qual impulsiona a síntese de ATP pela F_0F_1 ATP sintase (Figura 2).

Gliconeogênese



4

Figura 1 – Metabolismo em Ausência de Oxigênio. Na falta de oxigênio, o glicogênio é convertido em ácido láctico e re-convertido em glicogênio.

Estratégias de Mobilização de Energia em Artrópodes.

Os trabalhos sobre metabolismo energético em insetos abordam, em alguns casos, aspectos adaptativos de determinadas situações as quais estes seres são submetidos. Uma dessas situações é o vôo que requer demanda energética elevada e para melhor mobilização de moléculas há a necessidade de cooperação e coordenação de vários tecidos.

O sistema nervoso, através de neurohormônios, controla o metabolismo energético do músculo de vôo e do corpo gorduroso. O neurohormônio octopamina tem função central no vôo, pois coordena e estimula a contração muscular e incrementa o metabolismo energético devido à ativação da fosfofrutoquinase1, via frutose-2,6-bifosfato (Candy e cols., 1997). O músculo usa vários combustíveis, sendo o principal, o açúcar trealose, sintetizado pelo corpo gorduroso a partir de inúmeros precursores, como glicogênio,

monossacarídeos e aminoácidos (Candy e cols., 1997). Estes estudos mostram que, durante o vôo prolongado, o músculo inicialmente utiliza combustíveis energéticos nele estocados como glicogênio e fosfoarginina, além de um suplemento de trealose proveniente da hemolinfa. Com o decorrer do vôo, o músculo passa a hidrolisar diacilgliceróis, o que resulta na liberação de ácidos graxos e glicerol, que imediatamente são oxidados por este tecido (Candy e cols., 1997).

Foi mostrado que o besouro africano *Pachnoda sinuata* consegue viver cerca de dois meses sem alimentar-se apresentando pequena diminuição da quantidade de proteína, com a utilização do glicogênio muscular e de ácidos graxos do corpo gorduroso (Gade e Auerswald, 2000). O controle de degradação das reservas energéticas pode estar relacionado com a estratégia proposto por Kolsch, (2001). O autor sugere que a diminuição da degradação das reservas energéticas do besouro *Agelastica alni* está relacionada à diminuição da sua atividade metabólica durante a anoxia.

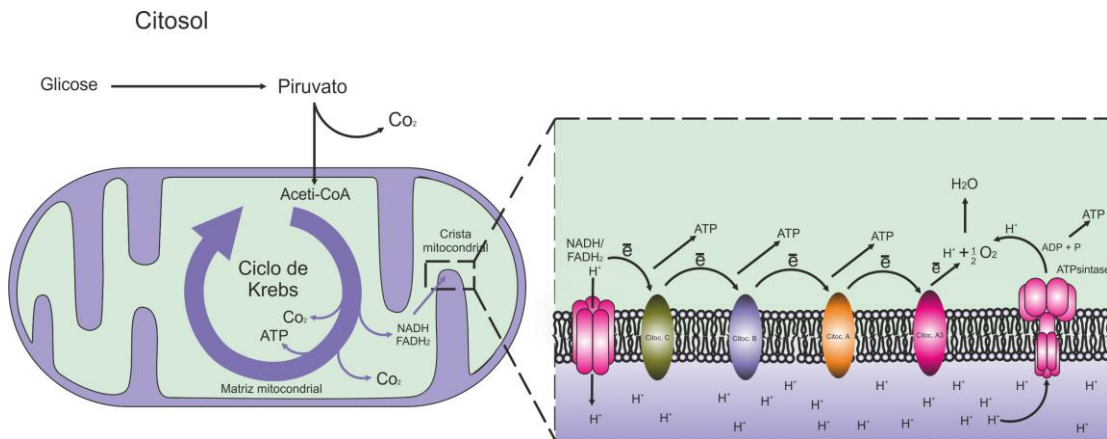


Figura 2 – A Glicólise e o Ciclo de Krebs. Tais vias fornecem poder redutor para gerar o gradiente eletroquímico de prótons que impulsiona a síntese de ATP pela ATP sintase.

No inseto *Bombyx mori* foi mostrado que a quantidade de glicogênio é reduzida significativamente de acordo com a administração de treazolina, um inibidor de trealase (Katagiri e cols., 1998). Em 2000, Mohamed, purificou e caracterizou uma α -amilase de ovos do carrapato de camelo *Hialomma dromedarii*. As α -amilases são enzimas digestivas capazes de hidrolisar amido, glicogênio, amilopectina e amilose liberando dissacarídeos e/ou trissacarídeos (Mohamed, 2000).

Recentes estudos têm como foco a participação de aminoácidos no metabolismo energético em mosquitos *Aedes aegypti*. Por exemplo, isto ocorre no período após a alimentação sanguínea do mosquito onde o aminoácido prolina tem sua concentração aumentada logo após a alimentação com sangue (Pennington e cols., 2003). Os autores sugerem que o amônio tóxico produzido durante o catabolismo de aminoácidos seja convertido temporariamente em prolina, uma forma não tóxica, sugerindo a existência de um mecanismo de eliminação neste mosquito (Pennington e cols., 2003).

Outra atividade em que o metabolismo de aminoácido está bastante envolvido nos insetos é o vôo. Scaraffia e Wells, 2003 mostraram em *Aedes aegypti* que o músculo de vôo pode utilizar o aminoácido prolina produzido pelo corpo gorduroso como uma importante fonte de energia. Neste trabalho o autor propõe que a função da prolina seja levar unidades de acetil-CoA do corpo gorduroso para o músculo de vôo (Scaraffia e Wells, 2003). Este acetil-CoA é derivado principalmente de ácidos graxos, glicose ou catabolismo de aminoácidos que são inicialmente convertidos a α -cetogluturato através do ciclo de Krebs. O α -cetogluturato é posteriormente convertido em prolina ainda no corpo gorduroso. A prolina é secretada para a hemolinfa e transportada até o músculo de vôo, onde é reconvertida em α -cetogluturato que entra no ciclo de Krebs para ser oxidado e produzir ATP (Figura 3) (Scaraffia e Wells, 2003).

Durante a embriogênese do carrapato de camelo *Hyalomma dromedari* no 12º dia de desenvolvimento deste carrapato, a prolina livre nos embriões apresenta níveis extremamente baixos, coincidentemente com os níveis extremamente altos de α -cetogluturato. Os autores sugerem que a prolina livre pode ser uma fonte de acúmulo de α -cetogluturato que estaria sendo utilizado no ciclo de Krebs, para posterior produção de energia na respiração, mostrando que a prolina pode ser uma importante fonte energética (Fahmy e cols., 2004) neste carrapato e também fazer parte do sistema de metabolização de amônio proveniente da deaminação de outros aminoácidos.

O nosso interesse está voltado para o entendimento de aspectos metabólicos envolvidos diretamente com a fisiologia de artrópodes, sendo direcionado mais especificamente para a embriogênese. Em animais ovíparos não há trocas entre a mãe e os embriões, como nos placentários. Os trabalhos relacionados ao estudo do desenvolvimento de embriões em ovíparos se preocupam principalmente com aspectos relacionados a estratégias de reservas para o novo indivíduo. O metabolismo proteico é mais estudado, provavelmente devido ao fato das proteínas serem os constituintes mais abundantes destes ovos (Logullo e cols., 2002). Uma abordagem muito recorrente na literatura é a quantificação do conteúdo de vitelo nos ovos durante a embriogênese. Em *Musca domestica* foi mostrado que a ninfa eclode com 20% do vitelo (Ribolla e Debianchi, 1995). Já em *Rhodnius prolixus* este percentual é maior, eclodindo com 40% do vitelo (Oliveira e cols., 1985). No carrapato bovino *R. microplus* mostrou-se que sua prole eclode com cerca de 60% de vitelo (Logullo e cols., 2002). Acredita-se que o conteúdo de vitelo que permanece ao final da embriogênese esteja relacionado à estratégia adaptativa de cada um desses pequenos seres em função da disponibilidade de alimento na natureza. No caso

da mosca ela voa e se alimenta de diferentes substratos. O barbeiro voa menos e se alimenta especificamente de sangue, necessitando assim de uma maior quantidade de vitelo e por último o carrapato que também se alimenta de sangue, e devido ao fato de não conseguir voar, precisa aguardar a passagem do seu hospedeiro, necessitando assim de reservas que possam sustentar a ninfa recém-eclodida por mais tempo.

7

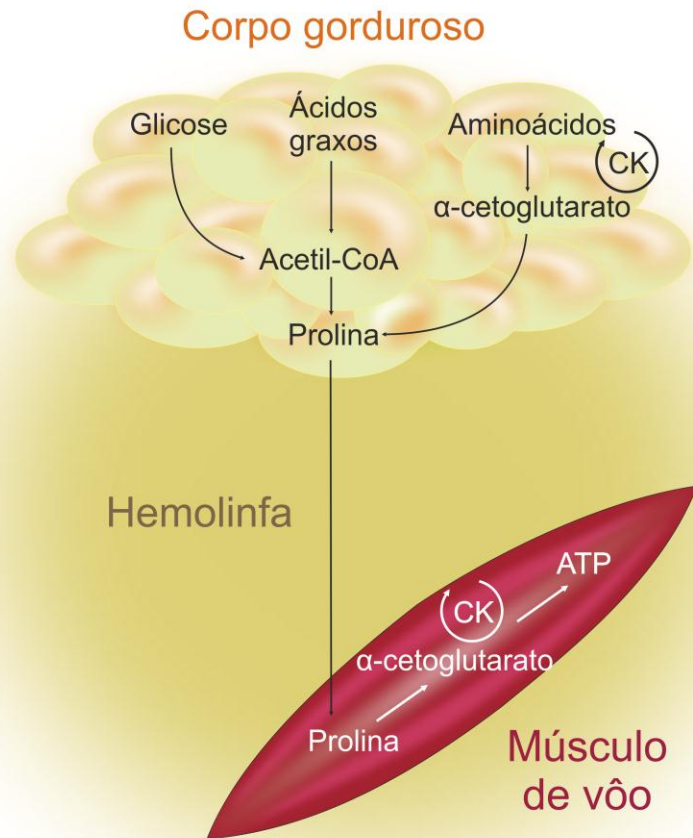


Figura 3: Destino do Acetil-CoA. O acetil CoA derivado de ácidos graxos, glicose ou aminoácidos é convertido a prolina e transportado pela hemolinfa até o músculo de voo, onde será convertido a α -cetoglutarato para geração de ATP
Cinética de Utilização de Reservas Energéticas durante a Embriogênese do Carrapato *R. microplus*.

O aracnídeo *R. microplus* possui o desenvolvimento embrionário similar aos insetos. A confirmação destas similaridades é mais evidente quando comparada com a embriogênese do principal modelo no estudo da Biologia do

Desenvolvimento, a mosca *Drosophila melanogaster* (Bate e Arias, 1991; Monnerat e cols., 2002). No 4º dia de desenvolvimento do embrião em *R. microplus* inicia-se a formação de um blastoderma sincicial, e em seguida, o embrião se torna um organismo multicelular e começa a organogênese (Campos e cols., 2006). Estes dados possibilitam uma associação do metabolismo celular com os estágios de desenvolvimento em que o embrião se encontra. Esta abordagem permite que se defina em que evento durante o desenvolvimento o embrião mais necessita de um determinado metabólito, como observado por exemplo na cinética de utilização de macromoléculas como lipídeos totais, proteínas e carboidratos totais, nas quais apresentam importantes correlações com eventos morfológicos marcantes da embriogênese deste carrapato.

Ocorre uma abrupta diminuição do conteúdo de lipídeos totais coincidente com as modificações morfológicas que ocorrem do blastoderma celular até a segmentação do embrião. Com relação ao conteúdo de carboidratos totais observa-se uma cinética de mobilização semelhante aos dos lipídeos totais e interessantemente, o conteúdo de proteínas totais permanece constante durante toda embriogênese. No entanto, a concentração da vitelina (VT), a proteína majoritária de embriões ovíparos, que no *R. microplus* representa aproximadamente 80 % do conteúdo de proteínas totais no primeiro dia, apresenta um decréscimo em torno de 15 % do primeiro para o quarto dia momento onde ocorre a formação do sincício acelular e outro declínio de 20 % do décimo quinto para o décimo oitavo dia de desenvolvimento, a larva eclode com aproximadamente 60 % do conteúdo de vitelo inicial (Campos e cols., 2006).

Metabolismo de Glicose.

O metabolismo de glicose tem papel essencial na fisiologia e desenvolvimento de todos os organismos vivos. A embriogênese do *R. microplus* é dividida metabolicamente em duas fases, baseando-se no balanço de glicose dentro do embrião: a primeira fase abrange da oviposição até a formação das células embrionárias caracterizada pelo consumo total de glicogênio armazenado no ovo e a segunda fase, deste momento até a eclosão das larvas, caracterizada por intensa gliconeogênese provocando acúmulo de glicose, guanina (produto de excreção de nitrogênio em aracnídeos) e glicogênio. A atividade específica de uma das enzimas fundamentais da gliconeogênese, a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), aumenta consideravelmente após a formação das células embrionárias no sexto dia de desenvolvimento, reforçando a hipótese de que o acúmulo de glicogênio e glicose nesta fase seria provocado por intensa gliconeogênese (Moraes e cols., 2007).

A análise em conjunto da atividade de duas das principais enzimas da glicólise e da principal enzima da via das pentoses-fosfato, hexoquinase (HK), piruvato quinase (PK) e glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PDH)

respectivamente, leva à conclusão que a glicose-6-fosfato (G6P) formada pela HK ou proveniente da degradação do glicogênio na primeira fase segue preferencialmente a via das pentoses-fosfato gerando poder redutor (NADPH) para biossínteses redutivas e unidades fundamentais para síntese de nucleotídeos necessária para a formação das células embrionárias no sexto dia de desenvolvimento. Após a formação do blastoderma celular acredita-se que o destino da G6P seja preferencialmente a glicólise para obtenção de energia na forma de ATP (Moraes e cols., 2007).

Diante deste panorama metabólico iniciou-se estudo mais aprofundado de uma enzima envolvida diretamente em uma das etapas fundamentais do metabolismo energético, a Triose Fosfato Isomerase (TIM). O interesse em estudar a enzima TIM em embriões de *R. microplus* surgiu com a possibilidade de esta proteína estar envolvida em vários mecanismos de controle e obtenção de energia. Moraes e colaboradores, 2011 levantaram a possibilidade da molécula de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) ser um importante intermediário da integração metabólica, pois esta molécula pode estar envolvida como possível intermediário em diferentes vias metabólicas. A DHAP pode estar formando G3P que pode estar sendo utilizado na lançadeira glicerol-fosfato, onde o NADH é oxidado na mitocôndria com concomitante formação de DHAP mitocondrial regenerando o NAD^+ para glicólise, em um ciclo descrito como o ciclo do α -glicerofosfato, que está bem descrito em insetos da família diptera (Whyard e cols., 1994).

A DHAP também pode estar funcionando como intermediário na degradação de glicerol proveniente da degradação de triacilglicerol (TAG) gerando glicerol que inicialmente é fosforilado em glicerol-fosfato pela enzima glicerol quinase, em seguida, transformado em DHAP e em gliceraldeído-3-fosfato pela TIM. Então, por exemplo, pode seguir o fluxo gliconeogênico da segunda fase da embriogênese ou a glicólise para obtenção de energia na forma de ATP. A molécula de DHAP também poderia estar envolvida no metabolismo de metilglioxal, pois o intermediário enediol da reação catalisada pela TIM pode ser transformado em metilglioxal, no entanto, dentro do contexto catalítico da TIM, a formação desta molécula é considerada um fator negativo sendo considerada tóxica e sem função biológica definida (Richard, 1991). Entretanto, dentro do contexto metabólico de obtenção de energia consideramos esta hipótese viável e levantamos a hipótese do metilglioxal ser convertido no intermediário enediol da TIM, que por sua vez será convertido em gliceraldeído-3-fosfato e/ou DHAP.

A atividade da TIM durante a embriogênese do *R. microplus* apresenta uma diminuição de 50 % na primeira fase e aumenta progressivamente na segunda, após a formação das células embrionárias. Acredita-se que na segunda fase da embriogênese a TIM está acompanhando o fluxo preferencial da gliconeogênese e/ou sendo estimulada pela metabolização do glicerol proveniente da degradação de TAG (Moraes e cols., 2011).

Metabolismo de Aminoácidos.

O estudo do metabolismo de aminoácidos deve-se a sugestão que os acúmulos de glicose, glicogênio e guanina, na segunda fase da embriogênese, seriam provocados por intensa atividade gliconeogênica. Esta hipótese está baseada no fato de ter-se gliconeogênese, determinada pela atividade e concomitante aumento de expressão de PEPCK, com correlação direta com o acúmulo de guanina.

A necessidade de se entender melhor o metabolismo de aminoácidos fez com que estudos mais aprofundados fossem desenvolvidos. Sabe-se que apesar de cada grupo de aminoácidos possuírem um caminho metabólico próprio de degradação, há um mecanismo comum de remoção do nitrogênio da molécula, através da ação das aminotransferases onde os aminoácidos são divididos em duas partes: um esqueleto carbônico que é dirigido para a oxidação, geralmente como intermediário do Ciclo de Krebs, e a amônia, por ser muito tóxica, é inicialmente convertida em glutamato e posteriormente eliminada do organismo. Dentro deste contexto, a aspartato aminotransferase (AAT) tem função central, pois é capaz de converter aspartato mais α -cetogluturato em oxaloacetato mais glutamato. O destino do oxaloacetato, dependendo da situação metabólica, é na maior parte das vezes a gliconeogênese e o glutamato é então submetido à ação da glutamato desidrogenase, que é responsável pela deaminação oxidativa desta molécula, onde o mesmo é convertido em α -cetogluturato. O α -cetogluturato pode ainda seguir o ciclo de Krebs ou participar de outras transaminações, e o amônio tóxico é eliminado na forma de uréia em mamíferos, amônia em peixes, ácido úrico em insetos (Scaraffia e cols., 2005) e guanina neste carrapato (Moraes e cols., 2007).

No metabolismo de aminoácidos foi monitorada a atividade de duas enzimas importantes do catabolismo de aminoácidos. A AAT, que é capaz de converter o aspartato diretamente a oxaloacetato, para ser utilizado pela gliconeogênese, não apresenta atividade detectável na primeira fase do desenvolvimento embrionário. Após a formação das células embrionárias, a atividade de AAT torna-se progressivamente elevada. A glutamato desidrogenase (GDH), responsável pela deaminação oxidativa dos aminoácidos, apresenta-se com um padrão semelhante à AAT, reforçando nossa hipótese de que realmente após a celularização, inicia-se uma intensa degradação de aminoácidos (Moraes e cols., 2007). Durante a embriogênese do carrapato de camelo *Hyalomma dromedari* no 12^o dia de desenvolvimento deste carrapato, a prolina livre nos embriões apresenta níveis extremamente baixos coincidentemente com os níveis extremamente altos de α -cetogluturato. Os autores sugerem que a prolina livre pode ser uma fonte de acúmulo de α -cetogluturato que estaria sendo utilizado no ciclo de Krebs, para posterior produção de energia na respiração, mostrando que a prolina pode ser uma importante fonte energética neste carrapato e também um transportador temporário de amônio proveniente da deaminação de outros aminoácidos (Fahmy e cols., 2004).

Metabolismo de Lipídeos.

Abordagens parecidas em relação ao metabolismo de lipídeos foram desenvolvidas em outras espécies, como em camarões tropicais (Wehrtmann e Albornoz, 1998), peixes (Verreth e cols., 1994), aves (Speake e cols., 1998) e insetos (Briegel e cols., 2002), mostrando que os lipídeos representam uma das principais fontes de energia nos embriões. Estas moléculas são geralmente estocadas em tecidos especializados como o tecido adiposo em humano ou corpo gorduroso em insetos, e devem ser disponibilizadas quando necessárias ao embrião (Gronke e cols., 2005).

Em insetos os lipídeos estocados no corpo gorduroso são liberados na forma de diacilglicerol (DAG) pela lipase e transportados para o músculo de vôo por lipoproteínas denominadas lipoforinas. No músculo de vôo os DAG são hidrolisados e então os ácidos graxos (AG) são oxidados para fornecimento de energia (Ogoyi e cols., 1998; Ryan e Van der Horst, 2000).

Em insetos, a degradação de lipídeos é estimulada pelo hormônio adipocinético (AKH) em varias espécies incluindo *Locusta migratória* (Gade e Beenackers, 1977), *Manduca sexta* (Gade e Beenackers, 1977; Ziegler e cols., 1990) e *Drosophila melanogaster* (Gronke e cols., 2005; Lee e Park, 2004), sugerindo uma importante função deste hormônio no controle do balanço de energia do inseto (Gronke e cols., 2005). A lipólise estimulada por AKH no corpo gorduroso do inseto é mediada via proteína G (Gronke e cols., 2005; Staubli e cols., 2002), aumento da concentração intracelular de AMPc e ativação da proteína quinase A (PKA) (Gade e Beenackers, 1977; Staubli e cols., 2002).

A enzima lipase, que tem função fundamental na mobilização de triacilgliceróis, foi caracterizada em embriões de carrapato de camelo *Hyalomma dromedari* onde mostra que atividade aumenta do décimo segundo dia do desenvolvimento deste carrapato até o final da embriogênese (Fahmy e cols., 2004). Nos embriões de *R. microplus*, observamos que a enzima lipase tem perfil de atividade semelhante ao encontrado em carrapato de camelo, no entanto, o aumento da atividade é observado do quarto dia até o final da embriogênese. Este perfil enzimático se correlaciona diretamente com o conteúdo de lipídeos totais. Isto sugere que nesta etapa do desenvolvimento este embrião está utilizando a energia contida nas reservas lipídicas, já que nesta etapa o glicogênio está quase extinto (Campos e cols., 2006, Moraes e cols., 2007).

Também monitorou-se os principais lipídeos neutros e carregados, onde verifica-se que vários tipos estão sendo utilizados nas diferentes fases do desenvolvimento embrionário deste carrapato. As investigações mostram que os lipídeos neutros detectados nos embriões em desenvolvimento são: monoacilglicerol (MAG), 1,3 - diacilglicerol (1,3 - DAG), 1,2 - diacilglicerol (1,2 - DAG), ácidos graxos (AG), triacilglicerol (TAG) e colesterol esterificado (CE). Os lipídeos polares são formados por fosfatidilinositol (FI), fosfatidilcolina (FC), ácido fosfatídico (AF) e outros fosfolipídeos que não conseguimos determinar. A variação percentual dos lipídeos foi monitorada através de análise

densitométrica computacional das TLCs para os lipídeos neutros 1,2-DAG e 1,3-DAG (Moraes e cols., 2007).

Parâmetros Respiratórios.

O principal sítio de produção de energia na forma de ATP dentro das células eucarióticas é a mitocôndria onde estão localizadas as enzimas da β -oxidação, ciclo de Krebs, cadeia transportadora de elétrons e o complexo ATP sintase. Esta organela tem sido alvo de intensos estudos nos últimos 50 anos, onde se estabeleceu que a mitocôndria fosse considerada a “pilha” energética da célula, estes estudos combinados com os da origem evolutiva desta organela, que tem sua maquinaria genética própria, levaram a introdução de um conceito que a mitocôndria é uma organela independente de outros eventos celulares (McBride e cols., 2006). No entanto, recentemente este conceito tem perdido força com a descoberta que esta organela funciona de forma integrada com o retículo endoplasmático, onde principalmente o fluxo de cálcio do retículo para a mitocôndria pode ativar enzimas do ciclo de Krebs, da cadeia transportadora de elétrons e a ATP sintase em diversas situações, como por exemplo, na fertilização (Dumollard e cols., 2006).

A regulação do metabolismo mitocondrial pela sinalização mediada por cálcio incluem a fosforilação / defosforilação de proteínas metabólicas, como por exemplo, os complexos respiratórios I e V (McBride e cols., 2006). Na matriz mitocondrial, a fosforilação / defosforilação da piruvato desidrogenase (PDH) são reguladas através da ação das enzimas PDH quinases e PDH fosfatases. A atividade da PDH também é regulada por estímulos citosólicos como a cascata de sinalização por insulina, que ativa uma Akt mitocondrial (Bijur e Jope, 2003) que tem como um de seus alvos a enzima glicogênio sintase quinase 3β (GSK- 3β), que apesar de predominantemente citossólica, também foi encontrada na matriz mitocondrial (Coghlan e cols., 2000). A GSK- 3β é ativa na forma não fosforilada. Esta quinase tem diversos substratos entre eles a PDH, que quando fosforilada inibe a conversão de piruvato em acetil-CoA, conseqüentemente inibindo a síntese de ATP. Por outro lado, quando a GSK é fosforilada pela AKT, a PDH está ativa e a síntese de ATP é ativada (McBride e cols., 2006).

Apesar da enorme importância da mitocôndria para o metabolismo energético, a literatura sobre esta organela em artrópodes, como carrapatos e mosquitos é muito precária. Em abelhas *Pachnoda sinuata* foi mostrado que mitocôndrias isoladas do músculo de vôo são capazes de oxidar os substratos prolina, piruvato e α -glicerofosfato, no entanto não foram capazes de oxidar palmitoil-carnitina (Auerswald e Gade, 1999). No mesmo trabalho foi mostrado que a co-oxidação de piruvato e prolina tem efeito aditivo na taxa respiratória. Os autores acreditam que durante o vôo, o músculo utiliza uma mistura destes substratos. Os autores também atribuem o fato da mitocôndria utilizar como substrato energético o α -glicerofosfato à presença de um sistema de lançadeira de α -glicerofosfato que, juntamente, como o NADH, participam de um sistema de transporte de elétrons para mitocôndria e que, na presença de Ca^{+2} , este

sistema é estimulado, aumentando a taxa respiratória para oxidação do α -glicerofosfato em 100 % (Auerswald e Gade, 1999).

Embriões ovíparos de uma forma geral têm grande quantidade de ácidos graxos que são potentes desacopladores mitocondriais, por este motivo torna-se fundamental o uso de albumina essencialmente livre de ácidos graxos durante o isolamento. As mitocôndrias de embriões de *R. microplus* foram capazes de oxidar os substratos prolina, piruvato e succinato e que respondem aos inibidores da respiração como rotenona e oligomicina. A taxa do coeficiente respiratório (RCR) foi medida indicando um elevado acoplamento destas preparações mitocondriais. A medida do potencial de membrana mitocondrial foi realizada usando safranina O mostrando que os substratos piruvato, prolina e succinato aumentam o potencial de membrana e que o ADP provoca decréscimo do potencial de membrana, FCCP foi utilizado como controle, pois provoca colapso do potencial de membrana. O estabelecimento da metodologia de isolamento de mitocôndrias acopladas nos permite estudar os diferentes substratos oxidativos que podem ser usados pelas mitocôndrias destes embriões como, por exemplo, glicerol-fosfato que ainda não foi testado. Recentemente nosso grupo vem demonstrando que estas mitocôndrias são capazes de utilizar na respiração um polímero de fosfato denominado polifosfato (Campos e cols., 2007).

Metabolismo de Polifosfatos.

O fosfato inorgânico é essencial para todos os organismos, sendo requerido para vários processos metabólicos, tais como: biossíntese de ácidos nucleicos e fosfolipídeos, metabolismo energético e transdução de sinal. Sendo assim, os organismos necessitaram desenvolver um eficiente mecanismo regulatório para a sua aquisição, reserva e utilização. Há mais de cem anos atrás, o pesquisador Liberman, em 1890, descreveu a existência de polímeros de ortofosfatos em leveduras. Esses compostos são polímeros lineares contendo desde poucos a centenas de resíduos de ortofosfatos ligados por pontes do tipo fosfoanidrido. Eles apresentam uma fórmula geral $M_{(n+2)}P_nO_{(3n+1)}$, e seus ânions compreendem cadeias nas quais cada átomo de fósforo é ligado a seu vizinho através de átomos de oxigênio, formando assim uma estrutura linear. (Kornberg, 1995).

Inicialmente, os polifosfatos foram considerados como “fóssil molecular” ou somente como reserva de fósforo e de energia para a sobrevivência de organismos em condições severas. Evolutivamente, alguns autores sugerem que os polifosfatos possam ter tido uma origem abiótica (West e Ponnampertuma, 1970; Yamagata e cols., 1991). Eles são gerados por desidratação simples de ortofosfatos em temperaturas elevadas, sendo encontrados em condensados vulcânicos (Brown e Kornberg, 2004). O estudo em procariontes primitivos tem mostrado um importante papel dos polifosfatos em seu metabolismo, onde foi observado que a glucoquinase tem uma atividade superior com polifosfatos do que com o ATP. Contraditoriamente, organismos mais evoluídos utilizam somente o ATP (Kulaev e Kulakovskaya, 2000). Modelos experimentais

mostraram que os polifosfatos provavelmente desempenharam um importante papel na síntese abiogênica de ácidos nucleicos e outras macromoléculas na Terra primordial (Kulaev e Vagabov, 1983). Na evolução pré-biótica, a abundância de polifosfatos como um poliânion ou um agente fosforilador, poderia interagir com alcoóis, açúcares, nucleosídeos, proteínas e com aminoácidos, gerando ácidos graxos e polipeptídeos. Dessa forma, os polifosfatos poderiam facilitar a orientação dos principais polímeros no mundo biótico: fosfolipídeos, ácidos nucleicos e proteínas (Brown e Kornberg, 2004).

Em microorganismos onde se concentram a maioria dos estudos dessas moléculas tem sido mostrado que elas regulam vários processos bioquímicos, tais como: metabolismo energético de P_i , reserva e sequestro de cátions, formação de canais de membrana, transporte de P_i , envolvimento na formação e na função do envelope celular, regulação de genes e atividades de enzimas, envolvimento na virulência de alguns patógenos e ativação de proteases (Rashid e cols., 2000; Kuroda e cols., 2001; Kim e cols., 2002; Nishii e cols., 2005; Zhang e cols., 2005; McInerney e cols., 2006).

A hidrólise de polifosfatos é catalisada pelas exopolifosfatases e endopolifosfatases (Kulaev e Kulakovskaya, 2000). Exopolifosfatases são consideradas como enzimas regulatórias centrais do metabolismo de polifosfatos (Kulaev e cols., 2000) e foram identificadas principalmente em diferentes organelas da célula eucariótica. Em *Saccharomyces cerevisiae* foram caracterizados diferenças consideráveis do papel fisiológico para os polifosfatos em diferentes compartimentos celulares. No compartimento nuclear elas tem sido relacionadas com a regulação gênica, e no mitocondrial com a bioenergética celular (Kulaev e Kulakovskaya, 2000; Lichko e cols., 2003).

Baseado na estrutura primária, exopolifosfatases são classificadas em dois tipos: uma encontrada em fungos e protozoários pertencentes à superfamília das DHH fosfoesterases, que possuem um motivo Asp – His – His conservado (Aravind e Koonin, 1998), e uma outra presente em Eubactérias e Arqueobactérias pertencente à superfamília kinase/actina/hsp-70 (Reizer e cols., 1993). Genes de ambos os tipos foram expressos em *Escherichia coli* (Akiyama e cols., 1993; Wurst e cols., 1995; Rodrigues e cols., 2002; Kristensen e cols., 2002) e a estrutura das enzimas de *E. coli* (Rangarajan e cols., 2006) e *S. cerevisiae* (Ugochukwu e cols., 2007) foram determinadas.

Em geral as duas famílias de exopolifosfatases não são similares. A de levedura possui dois domínios, enquanto a de *E. coli* possui quatro. Entretanto ambas possuem o sítio ativo localizado entre domínios conectados por um “link” flexível (Tammenkoski e cols., 2007). Adicionalmente, as exopolifosfatases de *S. cerevisiae* e de *Aquifex aeolicus* são proteínas monoméricas (Lorenz e cols., 1994; Wurst e Kornberg, 1994; Kristensen e cols., 2004) e a de *E. coli* é dimérica (Akiyama e cols., 1993; Rangarajan e cols., 2006), sendo que *S. cerevisiae* possui até cinco diferentes exopolifosfatases em diferentes compartimentos celulares (Lichko e cols., 2003).

A estrutura da exopolifosfatase de levedura possui similaridade com a família II das pirofosfatases, uma DHH fosfoesterase que catalisa uma reação similar com pirofosfato. Apesar de apresentar somente 12-17% de identidade, 11

dos 14 resíduos polares no sítio ativo da família II de pirofosfatases são conservadas nas exopolifosfatases encontradas em fungos e protozoários, implicando em uma provável relação evolucionária (Merckel e cols., 2001; Ahn e cols., 2001). Embora existam similaridades funcionais e estruturais, a especificidade para substrato é bem diferente, a exopolifosfatase é muito ativa na hidrólise de polifosfatos formados por três ou mais resíduos de fosfato, mas não hidrolisa pirofosfatos (Lorenz e cols., 1994; Wurst e Kornberg, 1994). A pirofosfatase pertencente à família II hidrolisa pirofosfato, mas também possui uma pequena atividade contra polifosfatos (Parfenyev e cols., 2001). Funcionalmente, exopolifosfatases de leveduras e de outros eucariontes têm sido preliminarmente caracterizadas, e os seus mecanismos de ação ainda não foram completamente elucidados (Tammenkoski e cols., 2007).

Polifosfatos são encontrados em todas as células desde o início da evolução, possuindo diversas funções específicas e cruciais para a sobrevivência celular, como por exemplo, a capacidade de estimular a proliferação de células cancerígenas de mamíferos (Wang e cols., 2003) e na participação com filamentos de actina nas operações celulares (Gomez-Garcia e Kornberg, 2004). Portanto, a sua vasta ocorrência e multifuncionalidade indicam que muitas importantes funções em distintos organismos ainda estão por serem descobertas possibilitando, neste caso, a ampliação do conhecimento da bioenergética celular e da embriogênese em artrópodes.

Embora a primeira evidência da presença de polifosfatos em células de mamíferos ter sido obtida na década de 70 (Gabel e Thomas, 1971), o metabolismo deste biopolímero em eucariontes superiores ainda é pouco estudado. Com o crescente interesse em caracterizar as funções dos polifosfatos em eucariontes superiores surgem importantes relatos sobre o assunto, conforme foi descrito para diferentes frações subcelulares e órgãos em roedores (Kumble e Kornberg, 1996). Também existem relatos recentes sobre a presença de polifosfatos em sangue humano e no tecido ósseo (Leyhausen e cols., 1998; Smith e cols., 2006).

A função do polifosfato como reserva de fosfato é bem caracterizada em procariontes e também em eucariontes inferiores (Kulaev, 1975; Kulaev e Vagabov, 1983; Kornberg, 1995). Em *R. microplus*, o declínio do conteúdo de polifosfato total após o 7º dia de desenvolvimento não reflete o aumento do ortofosfato, que ocorre somente a partir do 12º dia, sugerindo que estes biopolímeros também possuem outras funções, além da de reserva para o desenvolvimento do embrião (Campos e cols., 2008). Neste caso, uma fonte alternativa de fosfato para o embrião poderia ser a defosforilação da vitelina, a principal proteína do ovo, que é gradualmente defosforilada durante a embriogênese (Silveira e cols., 2006). Esta hipótese foi corroborada quando a atividade da exopolifosfatase foi analisada. Foi verificado que a mesma manteve-se elevada após o 9º dia e o conteúdo de polifosfato total se mantém estável, onde o esperado seria que ele continuasse decaindo, indicando que o embrião está recebendo fosfato de outra fonte, a qual possibilita que os níveis de polifosfato total se mantenham estáveis nesta fase do desenvolvimento (Campos e cols., 2008).

Estudos mostram que além dos polifosfatos serem importantes como reserva de fosfato, nos eucariontes eles também participam em processos regulatórios (Kornberg e cols., 1999). O polifosfato em diferentes compartimentos celulares tem sido mais estudado em *S. cerevisiae*, e o seu metabolismo depende da idade da cultura e das condições de cultivo (Kulaev, 1975; Kulaev e Kulakovskaya, 2000; Lichko e cols., 2003). A participação do polifosfato nuclear em diversas etapas que ocorrem ao longo da via do gene à proteína é uma das mais importantes funções desses compostos em microorganismos eucariontes e procariontes, no qual tem sido bem documentada sua relevância no controle da expressão gênica, como por exemplo, na adaptação à fase estacionária ou outras transições de desenvolvimento (Brown e Kornberg, 2004). Embriões de *R. microplus* possuem polifosfato no núcleo e a sua mobilização reflete a atividade da exopolifosfatase nuclear durante a embriogênese. O conteúdo de polifosfato nuclear diminui no mesmo estágio de desenvolvimento em que o RNA total aumenta, após a formação do blastoderma celular no 5º dia de desenvolvimento (Campos e cols., 2008). O polifosfato nuclear está envolvido em vários aspectos da transcrição do RNA sendo capaz de interagir fisicamente com a RNA polimerase (Kusano e Ishihama, 1997). Também há relatos sobre o envolvimento destas moléculas na estabilidade do mRNA (Blum e cols., 1997), no aumento da produção de proteínas (Itoh e cols., 2006) e no aumento da estabilidade de polissomos in vivo durante a síntese protéica (McInerney e cols., 2006). Em núcleo de fígado de rato, o polifosfato relacionou-se com a fração protéica não correspondente às histonas, podendo interagir com o complexo DNA-histona se ligando à cromatina, e isto possibilita a inibição da atividade de algumas enzimas nucleares, incluindo a topoisomerase (Schroder e cols., 1999). Todos estes dados dão suporte a hipótese de que os polifosfatos estão envolvidos na regulação gênica em eucariontes superiores.

As funções dos polifosfatos na mitocôndria estão associadas com a fosforilação oxidativa e com a síntese de ATP (Beauvoit e cols., 1989). Desacopladores inibiram a acumulação de polifosfato em mitocôndrias de *S. cerevisiae* e após “sonicação” ocorreu uma rápida hidrólise dos polifosfatos sugerindo que a acumulação de polifosfatos depende da força próton – motriz da membrana (Pestov e cols., 2004; Pestov e cols., 2005). Foi demonstrado que a exopolifosfatase mitocondrial de *R. microplus* é estimulada em 100% por NADH, 35 % por ADP e é completamente inibida por P_i sugerindo uma regulação por P_i e por carga energética. Esta atividade exopolifosfatásica aumentou durante a respiração mitocondrial quando piruvato ou succinato foram adicionados, e o efeito estimulatório desapareceu após a adição de KCN, um inibidor da fosforilação oxidativa. Estes resultados indicam que o gradiente de prótons e/ou o fluxo de elétrons possivelmente regulam a exopolifosfatase para fornecer P_i para a síntese de ATP. Esta hipótese foi confirmada, ao medir o consumo de O_2 mitocondrial dependente de ADP na presença de polifosfato e na ausência de qualquer outra fonte de P_i (Campos e cols., 2007).

Para analisar um possível papel fisiológico do polifosfato mitocondrial, quantificou-se os seus níveis e mediu-se a atividade da exopolifosfatase

mitocondrial ao longo da embriogênese. A maior atividade exopolifosfatásica associada com o maior consumo dos polifosfatos ocorreu durante a formação do blastoderma celular e segmentação do embrião. Dessa maneira, a atividade da exopolifosfatase mitocondrial parece estar correlacionada com a demanda energética do embrião durante esta fase do desenvolvimento embrionário, na qual o embrião utiliza grande parte de suas reservas de carboidratos e lipídeos (Campos e cols., 2006, Campos e cols., 2011).

Exopolifosfatases descritas em procariontes apresentam maior afinidade para hidrólise de polifosfatos de cadeia longa (Kumble e Kornberg, 1996) e o mesmo é observado para microorganismos eucariontes, porém algumas enzimas de *S. cerevisiae* e *Leishmania major* são mais ativas, hidrolisando polifosfatos de cadeia curta, como o poly P₃ (Kumble e Kornberg, 1996; Rodrigues e cols., 2002). Em *R. microplus*, os resultados mostraram que a afinidade da enzima nuclear praticamente não se alterou com os substratos testados, porém, a mitocondrial apresentou um Km 10 vezes menor para o poly P₃ quando comparado com o poly P₁₅ e o poly P₆₅. Estes resultados indicam que a exopolifosfatase nuclear é única, pois em nosso conhecimento não há relato na literatura de uma enzima que atua com praticamente a mesma afinidade entre polifosfatos de cadeias curtas e longas, e a exopolifosfatase mitocondrial faz parte de um grupo específico que apresenta maior afinidade para polifosfatos de cadeias curtas (Campos e cols., 2008)

A Exopolifosfatase de *E. coli*, a qual pertence à superfamília kinase/actina/hsp-70, requer cátions divalentes e K⁺ para sua atividade máxima, enquanto a de levedura, que pertence à superfamília da DHH fosfoesterases, requer somente cátions divalentes (Lichko e cols., 2003). A exopolifosfatase nuclear de *R. microplus* foi estimulada por Mg⁺² e Co⁺² enquanto a mitocondrial foi estimulada somente por Mg⁺², e ambas foram insensíveis a K⁺, indicando que as exopolifosfatases destas frações celulares de *R. microplus* são parecidas com a superfamília da DHH fosfoesterases (Campos e cols., 2008)

São poucos os compostos descritos como efetivos inibidores da atividade exopolifosfatásica (Kornberg e cols., 1999). Tratamentos com molibdato, um inibidor de fosfohidrolases, e fluoreto, um inibidor de pirofosfatases, não inibiram nenhuma das duas exopolifosfatases de *R. microplus* testadas. Entretanto, a heparina, um bom inibidor para exopolifosfatase de bactérias e leveduras (Lichko e cols., 2003), foi efetiva em ambas as frações, sendo a cinética de inibição diferente, onde a mitocondrial foi mais sensível a heparina do que a nuclear, embora as duas fossem quase totalmente inibidas. Tais diferenças cinéticas confirmam a existência de duas diferentes enzimas expressas em núcleo e mitocôndrias, e refletem as diferentes funções dos polifosfatos nestes compartimentos celulares para o desenvolvimento do embrião (Campos e cols., 2008).

Considerações Finais.

O carrapato bovino determina perdas estimadas em dois bilhões de reais por ano para a pecuária brasileira. Este aracnídeo é responsável pela redução na produção de carne e de leite, por danos ao couro do gado e consequente perda no valor das peles. Além disso, é vetor de vários patógenos causadores de enfermidades como a babesiose, a anaplasmose e a piroplasmose. O estudo da fisiologia, genética e comportamento destes animais tem, historicamente, gerado métodos de controle de pragas e vetores, resultando em grandes benefícios para a saúde humana e no aumento da produtividade na pecuária. A eficiência desses métodos, no entanto, é limitada por um conjunto de fatores, principalmente a disseminação da resistência a acaricidas. De forma análoga ao que ocorreu com o surgimento e disseminação da resistência dos microorganismos aos antibióticos, o aparecimento de resistência dos artrópodes aos acaricidas e inseticidas disponíveis, mesmo àqueles mais recentemente desenvolvidos, vem se tornando uma ameaça ao bem estar humano. Esta resistência é ameaçadora tanto no que concerne à produção industrial de alimentos, quanto ao controle dos vetores de doenças.

A aceleração do desenvolvimento de resistência a novos inseticidas/acaricidas disponíveis é assustadora (Guerrero e cols., 2002). Os carrapatos têm uma estratégia de reprodução explosiva. Uma fêmea de *R. microplus* bota cerca de 3500 ovos e, no clima brasileiro, tem várias gerações por ano. Desta forma, a resistência adquirida a um acaricida espalha-se rapidamente pela população de carrapatos. Para que possamos desenvolver novas estratégias de controle destes vetores de doenças, em especial considerando a indispensável preservação ambiental, torna-se imperativo que se compreenda a biologia desses animais, de forma a identificar alvos moleculares para seu controle populacional.

Referências Bibliográficas.

- Ahn, S., Milner, A.J., Futterer, K., Konopka, M., Ilias, M., Young, T.W., White, S.A., 2001. The "open" and "closed" structures of the type-C inorganic pyrophosphatases from *Bacillus subtilis* and *Streptococcus gordonii*. *J. Mol. Biol.* 313, 797-811.
- Akiyama, M., Crooke, E., Kornberg, A., 1993. An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its ppx gene in a polyphosphate operon. *J. Biol. Chem.* 268, 633-639.
- Aravind, L., Koonin, E.V., 1998. The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem. Sci.* 23, 469-472.
- Auerswald, L., Gade, G., 1999. Effects of metabolic neuropeptides from insect corpora cardiaca on proline metabolism of the African fruit beetle, *Pachnoda sinuata*. *J. Insect Physiol.* 45, 535-543.
- Bate, M., Arias, A.M., 1991. The embryonic origin of imaginal discs in *Drosophila*. *Develop.* 112, 755-761.
- Beauvoit, B., Rigoulet, M., Guerin, B., Canioni, P., 1989. Polyphosphates as a source of high-energy phosphates in yeast mitochondria: a ³¹P NMR-study. *FEBS Lett.* 252, 17-21.
- Bijur, G.N., Jope, R.S., 2003. Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J. Neurochem.* 87, 1427-1435.
- Blum, E., Py, B., Carpousis, A.J., Higgins, C.F., 1997. Polyphosphate kinase is a component of the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Mol. Microbiol.* 26, 387-398
- Briegel, H., Hefti, A., DiMarco, E., 2002. Lipid metabolism during sequential gonotrophic cycles in large and small female *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 48, 547-554.
- Brown, M.R., Kornberg, A., 2004. Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101, 16085-16087.
- Candy, D.J., Becker, A., Wegener, G., 1997. Coordination and Integration of Metabolism in Insect Flight. *Comp. Biochem. Physiol.* 117, 497-512.
- Campos, E., Façanha, A.R., Costa, E.P., Fraga, A., Moraes, J., da Silva Jr., V.I., Masuda, A., Logullo, C., 2011. A mitochondrial membrane exopolyphosphatase is modulated by, and plays a role in, the energy metabolism of hard tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryos. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 3525-3535.
- Campos, E., Façanha, A.R., Costa, E.P., da Silva, V.I., Jr., Masuda, A., Logullo, C., 2008. Exopolyphosphatases in nuclear and mitochondrial fractions during *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryonic development. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 151, 311-316.
- Campos, E., Facanha, A., Moraes, J., da Silva Jr., V.I., 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.

- Campos, E., Moraes, J., Facanha, A.R., Moreira, E., Valle, D., Abreu, L., Manso, P.P., Nascimento, A., Pelajo-Machado, M., Lenzi, H., Masuda, A., Vaz Ida S Jr, Logullo, C., 2006. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. *Vet. Parasitol.* 138, 349-357.
- Coghlan, M.P., Culbert, A.A., Cross, D.AE., Corcoran, S.L., Yates, J.W., Pearce, N.J., Rausch O.L., Murphy, G.J., Carter, P.S., Cox, L.R., Mills, D., Brown, M.J., Haigh, D., Ward, R.W., Smith D.G., Murray, K.J., Reith, A.D., Holder, J.C., 2000. Selective small molecule inhibitors of glycogen synthase kinase-3 modulate glycogen metabolism and gene transcription. *Chem. Biol.* 7, 793-803.
- Dudley, R., Winter, Y., 2002. Hovering flight mechanics of neotropical flower bats (Phyllostomidae: Glossophaginae) in normodense and hypodense gas mixtures. *J. Exp. Biol.* 205, 3669-3677.
- Dumollard, R., Duchen, M., Sardet, C., 2006. Calcium signals and mitochondria at fertilisation. *Sem. Cell Develop. Biol.* 17, 314-323.
- Fahmy, A.S., bdel-Gany, S.S., Mohamed, T.M., Mohamed, S.A., 2004. Esterase and lipase in camel tick *Hyalomma dromedarii* (Acari : Ixodidae) during embryogenesis. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 137, 159-168.
- Gabel, N.W., Thomas, V., 1971. Evidence for the occurrence and distribution of inorganic polyphosphates in vertebrate tissues. *J. Neurochem.* 18, 1229-1242.
- Gade, G., Auerswald, L., 2000. Flight substrates and their regulation by a member of the AKH/RPCH family of neuropeptides in Cerambycidae. *J. Insect Physiol.* 46, 1575-1584.
- Gade, G., Beenackers, A.M.T., 1977. Adipokinetic Hormone-Induced Lipid Mobilization and Cyclic-Amp Accumulation in Fat-Body of *Locusta-Migratoria* During Development. *General Comp. Endocrinol.* 32, 481-487.
- Gomez-Garcia, M.R., Kornberg, A., 2004. Formation of an actin-like filament concurrent with the enzymatic synthesis of inorganic polyphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101, 15876-15880.
- Gronke, S., Mildner, A., Fellert, S., Tennagels, N., Petry, S., Muller, G., Jackle, H., Kuhnlein, R.P., 2005. Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell Metabolism* 1, 323-330.
- Guerrero, F.D., Li, A. Y., Hernandez, R., 2002. Molecular diagnosis of pyrethroid resistance in Mexican strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 39, 770-776.
- Itoh, H., Kawazoe, Y., Shiba, T., 2006. Enhancement of protein synthesis by an inorganic polyphosphate in an *E. coli* cell-free system. *J. Microbiol. Methods* 64, 241-249.
- Katagiri, N., Ando, O., Yamashita, O., 1998. Reduction of glycogen in eggs of the silkworm, *Bombyx mori*, by use of a trehalase inhibitor, trehazolin, and diapause induction in glycogen-reduced eggs. *J. Insect Physiol.* 44, 1205-1212.

- Kim, K.S., Rao, N.N., Fraley, C.D., Kornberg, A., 2002. Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 99, 7675-7680.
- Kolsch, G., 2001. Anoxia tolerance and anaerobic metabolism in two tropical weevil species (Coleoptera, Curculionidae). J. Comp. Physiol. B. 171, 595-602.
- Kornberg, A., Rao, N.N., Ilt-Riche, D., 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. Annu. Rev. Biochem. 68, 89-125.
- Kornberg, A., 1995. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. J. Bacteriol. 177, 491-496.
- Kresge, N., Simoni, R.D., Hill, R.L., 2005. JBC Centennial – 1905-2005 – 100 years of biochemistry and molecular biology – Otto Fritz Meyerhof and the elucidation of the glycolytic pathway. J. Biol. Chem. 280.
- Kristensen, O., Laurberg, M., Liljas, A., Kastrup, J.S., Gajhede, M., 2004. Structural characterization of the stringent response related exopolyphosphatase/guanosine pentaphosphate phosphohydrolase protein family. Biochemistry 43, 8894-8900.
- Kristensen, O., Laurberg, M., Gajhede, M., 2002. Crystallization of a stringent response factor from *Aquifex aeolicus*. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 58, 1198-1200.
- Kulaev, I., Kulakovskaya, T., 2000. Polyphosphate and phosphate pump. Annu. Rev. Microbiol. 54, 709-734.
- Kulaev, I.S., Vagabov, V.M., Kulakovskaya, T.V., Lichko, L.P., Andreeva, N.A., Trilisenko, L.V., 2000. The development of A. N. Belozersky's ideas in polyphosphate biochemistry. Biochem. (Mosc.) 65, 271-278.
- Kulaev, I.S., Vagabov, V.M., 1983. Polyphosphate metabolism in microorganisms. Adv. Microb. Physiol. 24, 83-171.
- Kulaev, I.S., 1975. Biochemistry of inorganic polyphosphates. Rev. Physiol Biochem. Pharmacol. 73, 131-158.
- Kumble, K.D., Kornberg, A., 1996. Endopolyphosphatases for long chain inorganic polyphosphate in yeast and mammals. J. Biol. Chem. 271, 27146-27151.
- Kuroda, A., Nomura, K., Ohtomo, R., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H., Kornberg, A., 2001. Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. Sci. 293, 705-708.
- Kusano, S., Ishihama, A., 1997. Functional interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with inorganic polyphosphate. Gen. Cells 2, 433-441.
- Leyhausen, G., Lorenz, B., Zhu, H., Geurtsen, W., Bohnensack, R., Muller, W.E., Schroder, H.C., 1998. Inorganic polyphosphate in human osteoblast-like cells. J. Bone Miner. Res. 13, 803-812.
- Lee, G.H., Park, J.H., 2004. Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. Genetics 167, 311-323.

- Lichko, L.P., Andreeva, N.A., Kulakovskaya, T.V., Kulaev, I.S., 2003. Exopolyphosphatases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res. 3, 233-238.
- Logullo, C., Moraes, J., Dansa-Petretski, M., Vaz, I.S., Masuda, A., Sorgine, M.H., Braz, G.R., Masuda, H., Oliveira, P.L., 2002. Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, *Boophilus microplus*. Insect Biochem. Mol. Biol. 32, 1805-1811.
- Lorenz, B., Muller, W.E., Kulaev, I.S., Schroder, H.C., 1994. Purification and characterization of an exopolyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 269, 22198-22204.
- McBride, H.M., Neuspiel, M., Wasiak, S., 2006. Mitochondria: More than just a powerhouse. Current Biology 16, R551-R560.
- McInerney, P., Mizutani, T., Shiba, T., 2006. Inorganic polyphosphate interacts with ribosomes and promotes translation fidelity *in vitro* and *in vivo*. Mol. Microbiol. 60, 438-447.
- Merckel, M.C., Fabrichniy, I.P., Salminen, A., Kalkkinen, N., Baykov, A.A., Lahti, R., Goldman, A., 2001. Crystal structure of *Streptococcus mutans* pyrophosphatase: a new fold for an old mechanism. Structure. 9, 289-297.
- Monnerat, A.T., Machado, M.P., Vale, B.S., Soares, M.J., Lima, J.B., Lenzi, H.L., Valle, D., 2002. *Anopheles albiparvus* embryogenesis: morphological identification of major events. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 97, 589-596.
- Mohamed, S.A., 2000. Alpha-Amylase from developing embryos of the camel tick *Hyalomma dromedarii*. Comp. Biochem. Physiol. B. 126, 99-108.
- Moraes, J., Galina, A., Alvarenga, P.H., Rezende, G.L., Masuda, A., Vaz Jr., I.S., Logullo, C., 2007. Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *Boophilus microplus*. Comp. Biochem. Physiol. Part 146, 528-533.
- Moraes, J., Arreola, R., Cabrera, N., Saramago, L., Freitas, D., Masuda, A., Vaz Jr, I. da S., Gomez-Puyou, M.T., Gomez-Puyou, A.G., Logullo, C., 2011. Structural and biochemical characterization of a recombinant triosephosphate isomerase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Insect Biochem. Mol. Biol. 41, 400-409.
- Nishii, W., Suzuki, T., Nakada, M., Kim, Y.T., Muramatsu, T., Takahashi, K., 2005. Cleavage mechanism of ATP-dependent Lon protease toward ribosomal S2 protein. FEBS Lett. 579, 6846-6850.
- Ogoyi, D.O., Osir, E.O., Olembo, N.K., 1998. Fat body triacylglycerol lipase in solitary and gregarious phases of *Schistocerca gregaria* (Forsk.) (Orthoptera : Acrididae). Comp. Biochem. Physiol. B. 119, 163-167.
- Oliveira, P.L., Gondim, K.C., Guedes, D.S., Masuda, H., 1985. Regulation of Vitellogenin Uptake in *Rhodnius-Prolixus* (Hemiptera). Anais da Academia Brasileira de Ciencias 57, 530.
- Parfenyev, A.N., Salminen, A., Halonen, P., Hachimori, A., Baykov, A.A., Lahti, R., 2001. Quaternary structure and metal ion requirement of family II pyrophosphatases from *Bacillus subtilis*, *Streptococcus gordonii*, and *Streptococcus mutans*. J. Biol. Chem. 276, 24511-24518.

- Pennington, J.E., Goldstrohm, D.A., Wells, M.A., 2003. The role of hemolymph proline as a nitrogen sink during blood meal digestion by the Mosquito *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 49, 115-121.
- Pestov, N.A., Kulakovskaya, T.V., Kulaev, I.S., 2004. Inorganic polyphosphate in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* at phosphate limitation and phosphate excess. *FEMS Yeast Res.* 4, 643-648.
- Pestov, N.A., Kulakovskaya, T.V., Kulaev, I.S., 2005. Effects of inactivation of the PPN1 gene on exopolyphosphatases, inorganic polyphosphates and function of mitochondria in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 5, 823-828.
- Rangarajan, E.S., Nadeau, G., Li, Y., Wagner, J., Hung, M.N., Schrag, J.D., Cygler, M., Matte, A., 2006. The structure of the exopolyphosphatase (PPX) from *Escherichia coli* O157:H7 suggests a binding mode for long polyphosphate chains. *J. Mol. Biol.* 359, 1249-1260.
- Rashid, M.H., Rumbaugh, K., Passador, L., Davies, D.G., Hamood, A.N., Iglewski, B.H., Kornberg, A., 2000. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97, 9636-9641.
- Reizer, J., Reizer, A., Saier, M.H., Jr., Bork, P., Sander, C., 1993. Exopolyphosphate phosphatase and guanosine pentaphosphate phosphatase belong to the sugar kinase/actin/hsp 70 superfamily. *Trends Biochem. Sci.* 18, 247-248.
- Ribolla, P.E.M. Debianchi, A.G., 1995. Cathepsin in *Musca-Domestica* Embryogenesis. *J. Cellular Biochem.* 230.
- Richard, J.P., 1991. Kinetic-Parameters for the Elimination-Reaction Catalyzed by Triosephosphate Isomerase and An Estimation of the Reactions Physiological Significance. *Biochem.* 30, 4581-4585.
- Rodrigues, C.O., Ruiz, F.A., Vieira, M., Hill, J.E., Docampo, R., 2002. An acidocalcisomal exopolyphosphatase from *Leishmania major* with high affinity for short chain polyphosphate. *J. Biol. Chem.* 277, 50899-50906.
- Ryan, R.O. Van der Horst, D.J., 2000. Lipid transport biochemistry and its role in energy production. *Annual Review of Entomol.* 45, 233-260.
- Scaraffia, P.Y., Isoe, J., Murillo, A., Wells, M.A., 2005. Ammonia metabolism in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 491-503.
- Scaraffia, P.Y. Wells, M.A., 2003. Proline can be utilized as an energy substrate during flight of *Aedes aegypti* females. *J. Insect Physiol.* 49, 591-601.
- Schroder, H.C., Lorenz, B., Kurz, L., Muller, W.E., 1999. Inorganic polyphosphate in eukaryotes: enzymes, metabolism and function. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 23, 45-81.
- Silveira, A.B., Castro-Santos, J., Senna, R., Logullo, C., Fialho, E., Silva-Neto, M.A., 2006. Tick vitellin is dephosphorylated by a protein tyrosine phosphatase during egg development: effect of dephosphorylation on VT proteolysis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 200-209.
- Speake, B. K., Murray, A. M. B., Noble, R. C., 1998. Transport and transformations of yolk lipids during developmental of the avian embryo. *Prog. Lipid Research.* 37, 1-32.

- Smith, S.A., Mutch, N.J., Baskar, D., Rohloff, P., Docampo, R., Morrissey, J.H., 2006. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103, 903-908.
- Staubli, F., Jorgensen, T.J.D., Cazzamali, G., Williamson, M., Lenz, C., Sondergaard, L., Roepstorff, P., Grimmelikhuijzen, C.J.P., 2002. Molecular identification of the insect adipokinetic hormone receptors. *Proc. Nat Acad. Sciences* 99, 3446-3451.
- Tammenkoski, M., Moiseev, V.M., Lahti, M., Ugochukwu, E., Brondijk, T.H., White, S.A., Lahti, R., Baykov, A.A., 2007. Kinetic and mutational analyses of the major cytosolic exopolyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 282, 9302-9311.
- Ugochukwu, E., Lovering, A.L., Mather, O.C., Young, T.W., White, S.A., 2007. The crystal structure of the cytosolic exopolyphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* reveals the basis for substrate specificity. *J. Mol. Biol.* 371, 1007-1021.
- Verreth, J., Coppoolse, J., Segner, H., 1994. The Effect of Low Hufa-Enriched and High Hufa-Enriched Artemia, Fed at Different Feeding Levels, on Growth, Survival, Tissue Fatty-Acids and Liver Histology of Clarias-Gariepinus Larvae. *Aquaculture* 126, 137-150.
- Yamagata, Y., Watanabe, H., Saitoh, M., Namba, T., 1991. Volcanic production of polyphosphates and its relevance to prebiotic evolution. *Nature* 352, 516-519.
- Wang, L., Fraley, C.D., Faridi, J., Kornberg, A., Roth, R.A., 2003. Inorganic polyphosphate stimulates mammalian TOR, a kinase involved in the proliferation of mammary cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100, 11249-11254.
- Wehrtmann, I.S. Albornoz, L., 1998. Larval development of *Nauticaris magellanica* (A. Milne Edwards, 1891) (Decapoda : Caridea : Hippolytidae), reared under laboratory conditions. *Bulletin Marine Science* 62, 45-72.
- West, M.W., Ponnampereuma, C., 1970. Chemical evolution and the origin of life. A comprehensive bibliography. *Space Life Sci.* 2, 225-295.
- Whyard, S., Russell, R.J., Walker, V.K., 1994. Insecticide Resistance and Malathion Carboxylesterase in the Sheep Blowfly, *Lucilia-Cuprina*. *Biochem. Genetics* 32, 9-24.
- Wurst, H., Shiba, T., Kornberg, A., 1995. The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 177, 898-906.
- Wurst, H., Kornberg, A., 1994. A soluble exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* 269, 10996-11001.
- Zhang, H., Gomez-Garcia, M.R., Brown, M.R., Kornberg, A., 2005. Inorganic polyphosphate in *Dictyostelium discoideum*: influence on development, sporulation, and predation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2731-2735.

Ziegler, R., Eckart, K., Law, J.H., 1990. Adipokinetic Hormone Controls Lipid-Metabolism in Adults and Carbohydrate-Metabolism in Larvae of *Manduca-Sexta*. *Peptides* 11, 1037-1040.