

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Biociências  
Departamento de Bioquímica

INCORPORAÇÃO DE GLICÍDIOS RADIOATIVOS DURANTE A VITELOGÊNESE  
DO CARRAPATO BOVINO Boophilus microplus: VARIAÇÃO DAS PRO-  
PRIEDADES DAS HEMEVITELINAS NO DESENVOLVIMENTO

VERA MARIA TREIS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas-Bioquímica, para a obtenção do Título de Mestre

Orientadores:

HOMERO DEWES

e

ELENA AIDA BERNARD

Porto Alegre



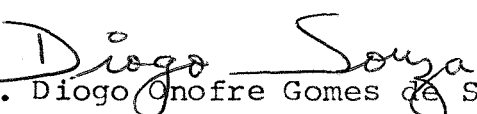
Agosto 1982

Esta dissertação foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas-Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A transcrição do material contido nesta Dissertação é permitida desde que se faça a citação apropriada.

Vera Maria Treis

DISSERTAÇÃO APROVADA POR:

 Prof. Elena Aida Bernard	Conceito <u>A</u>	Data 16/8/82
 Prof. Marcelo Alberto Dankert	<u>A</u> —	16-8-82 Data
 Prof. Diogo Onofre Gomes de Souza	<u>A</u>	16/8/82 Data

Ao Homero e ao Maia, pe  
lo exemplo de conduta cientí  
fica e amizade.

## A G R A D E C I M E N T O S

Ao Professor HOMERO DEWES pela orientação, rigor científico, estímulo permanente e sugestão do tema.

À Professora ELENA A. BERNARD pela orientação, análise crítica e apoio.

Ao Professor H. M. M. MAIA por sua dedicação no meu aprendizado científico e humano.

Aos Colegas do Departamento Bioquímica, em especial aos integrantes do "grupo do carrapato" pelo constante incentivo e colaboração.

Ao Professor J. C. GONZALES e sua equipe da Faculdade de Veterinária, em particular ao Sr. JOSÉ ZUFFO, pela manutenção dos bovinos e coleta das teleóginas.

Aos Professores MARCELO DANKERT, DIOGO O. DE SOUZA e GUILHERMO F. WASSERMANN pela doação dos compostos radioativos.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica e ao Departamento de Bioquímica que permitiram a realização desse trabalho.

Ao CNPQ pela bolsa concedida e a FAPERGS, PROPESP, FINEP pelo suporte financeiro.

Às amigas Suzan e Aninha pela compreensão.

E, especial, aos meus pais e irmãos, pelo respeito, carinho, e apoio incondicional.

## S U M Á R I O

I - INTRODUÇÃO .....	1
II - MATERIAL E MÉTODOS .....	11
A - Material .....	11
1 - Carrapato bovino <u>Boophilus microplus</u> .....	11
2 - Reagentes .....	12
B - Métodos .....	13
1 - Preparação de homogenados de ovos e larvas	13
2 - Injeção dos glicídios e aminoácidos radioa- tivos .....	14
3 - Cromatografia de gel-filtração em coluna de Agarose 1,5 .....	15
4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	16
4.1 - Eletroforese em condições não disso- ciantes .....	16
4.2 - Eletroforese em condições dissocian- tes .....	17

5 - Obtenção do "pellet" proteico marcado com [ <sup>14</sup> C] Aminoácidos .....	18
6 - Pesquisa de glicídios neutros .....	18
7 - Medida de radioatividade .....	19
8 - Determinação de proteínas .....	20
 III - RESULTADOS .....	 21
1 - Captação de D-[ <sup>3</sup> H] Manose, [ <sup>14</sup> C] Leucina, e [ <sup>3</sup> H] Glicose .....	21
2 - Radioatividade presente nos ovos e larvas duran <u>te</u> o desenvolvimento .....	25
3 - Variação da quantidade relativa de proteínas so <u>l</u> úveis presentes nos ovos e larvas durante o de <u>s</u> envolvimento .....	27
4 - Distribuição da radioatividade na coluna de Aga <u>r</u> ose 1,5 .....	28
4.1 - Fração solúvel do homogenado de ovos no dia de postura .....	28
4.2 - Fração solúvel do homogenado de larvas ..	32
5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida das pro <u>t</u> eínas solúveis de ovos e larvas durante o de <u>s</u> envolvimento .....	37
5.1 - Eletroforese em condições não dissocian <u>tes</u> dos componentes das frações obtidas na coluna de Agarose 1,5 .....	37
5.2 - Eletroforese em condições não dissocian <u>tes</u> da fração solúvel dos homogenados de ovos e larvas em diferentes idades, marca <u>dos</u> com glicídios e leucina radioativos .	37

5.3 - Eletroforese em condições dissociantes dos componentes dos picos hemeproteicos radioativos separados pela coluna de Agarose 1,5 .....	46
6 - Incorporação de glicídios radioativos utilizando L- [ $^{14}\text{C}$ (U)] Aminoácidos .....	48
IV - DISCUSSÃO .....	50
V - RESUMO E CONCLUSÕES .....	59
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60



## I - INTRODUÇÃO

O carrapato Boophilus microplus é um ácaro hematófago que parasita principalmente o gado bovino. Seu ciclo de vida é simples. Passa através dos estágios de larva, ninfa e adulto sobre o mesmo hospedeiro, alimentando-se do sangue bovino em cada estágio. A vida parasitária transcorre em três semanas. Após este período a fêmea ingurgitada cai ao solo, e depois de 2 - 3 dias inicia a postura, que se prolonga por 10 - 15 dias. Ao final da oviposição a fêmea morre (GONZALES, 1975).

Os ovários de fêmeas recém caídas são pequenos e os oócitos presentes imaturos. Sua maturação ocorre durante a pré-oviposição, período que se caracteriza por um rápido aumento do ovário (CHERRY, 1973).

Na oogênese dos ácaros, assim como na dos insetos, a fase de acelerado crescimento do oócito, com sua completa maturação, corresponde à vitelogênese (DIEHL, 1970; WYATT e

PAN, 1978; ENGELMANN, 1980). Este período envolve um acúmulo de glicídios, lipídios e proteínas de reserva, cuja função será suprir as necessidades metabólicas do embrião em desenvolvimento (CHIPPENDALE, 1978).

Durante a vitelogenese ocorrem modificações no núcleo e no citoplasma das células responsáveis pela síntese das substâncias de reserva. Há um aumento na quantidade de DNA-nuclear, de ribossomas no retículo endoplasmático rugoso, e das vesículas de Golgi, demonstrando uma importante atividade biossintética nesta etapa da oogênese (WYATT, 1980). Entre as moléculas sintetizadas nesta fase, destacam-se as vitelogeninas que são os precursores das vitelinas, as quais constituirão a reserva proteica do ovo em desenvolvimento (PAN e colaboradores, 1969).

TELFER (1954) encontrou na hemolinfa de fêmea de Hyalophora cecropia (bicho da seda), uma proteína com identidade imunológica à proteína predominante do ovo. Concluiu que a proteína do ovo tem origem extra-ovariana, sendo captada pelo oócito em desenvolvimento. Resultados idênticos foram obtidos em outras espécies de insetos de diferentes ordens (WYATT e PAN, 1978).

A síntese de vitelogenina fora do ovário foi demonstrada na barata Periplaneta americana, através de cultura "in vitro" dos corpos gordurosos com leucina marcada. A vitelogenina radioativa liberada foi identificada por imunopreci-

pitação (PAN e colaboradores, 1969). A identificação do corpo gorduroso como órgão de síntese de vitelogenina foi realizada, posteriormente, também em outras espécies de insetos (ENGELMANN, 1980). Especula-se que na Drosophila melanogaster a vitelogenina seja produzida tanto no corpo gorduroso como no ovário (BOWNES e HAMES, 1978; BOWNES, 1979).

Em ácaros foi verificado que as proteínas de reserva do ovo podem ter duas origens: uma endógena, sintetizada pelo próprio oócito em desenvolvimento e outra exógena, sintetizada no intestino (DIEHL, 1970; JENNI, 1971).

As vitelogeninas de origem extra-ovariana são secretadas na hemolinfa e posteriormente incorporadas de modo seletivo pelo oócito (ROTH e PORTER, 1964; KUNKEL e PAN, 1976). Após a incorporação, independente do processamento a que são submetidas, estas proteínas são em geral denominadas de vitelinas (GELLISSEN e colaboradores, 1976; KUNKEL e colaboradores, 1980).

Nos insetos, a biossíntese e a incorporação ao oócito das reservas utilizáveis na embriogênese são freqüentemente estimuladas por eventos específicos, como ingestão de alimentos, acasalamento e mudanças no fotoperíodo (ENGELMANN, 1980). Na maioria das espécies estudadas, este estímulo é mediado endocrinamente pela "corpora allata". WIGGLESWORTH (1936) demonstrou pioneiramente a participação da "corpora allata" na vitelogênese, trabalhando com Rhodnius prolixus.

ENGELMANN (1969) comprovou a estimulação hormonal da síntese de vitelogenina. Verificou que a injeção de hormônio juvenil (secretado pela "corpora allata") em fêmeas imaturas de Leucophaea maderae causa a síntese de uma proteína vitelogênica da hemolinfa, a qual pode ser precipitada por anti-soro contra proteínas da hemolinfa da fêmea. ENGELMANN (1971) demonstrou que a síntese induzida pelo hormônio juvenil podia ser inibida por Actinomicina D.

O hormônio juvenil regula também a incorporação da vitelogenina pelo oócito. DAVEY e HUBNER (1974) demonstraram que o epitélio folicular de Rhodnius prolixus incubado "in vitro" com hormônio juvenil apresenta um aumento dos espaços inter-celulares. Verificaram que esta modificação induzida pelo hormônio juvenil não é sensível a inibidores da síntese de RNA (Actinomicina D) e de proteínas (puromicina), sendo contudo inibida por colchicina e citocalasina B, inibidores da formação de microtúbulos e de microfilamentos, respectivamente. Isto permite deduzir que as vitelogeninas penetram nos espaços entre as células foliculares, alcançando a superfície do oócito onde sofrem pinocitose.

A ecdisona, esteróide liberado pelas glândulas pró-torácicas dos insetos, também influencia a vitelogênese. Induz a síntese de vitelogenina no Aedis aegypti (SPIELMANN e colaboradores, 1971) e Drosophila melanogaster (HANDLER e POSTLETHWAIT, 1978), inibe a sua síntese na Leucophaea maderae (ENGELMANN, 1971) e diminui o período de vitelogênese

no Rhodnius prolixus (GARCIA e colaboradores, 1979).

As informações sobre o controle endócrino no desenvolvimento de ácaros são ainda restritas a poucas publicações. Mc DANIEL e OLIVER (1978) trataram ninfas e fêmeas alimentadas do carrapato Dermacentor variabilis com dois análogos do hormônio juvenil e  $\beta$ -ecdisona. Observaram que este tratamento diminui a porcentagem das ninfas cuja ecdise transcorre com sucesso, e que estes compostos interferem na embriogênese, pois 64% dos ovos eliminados pelas fêmeas tratadas não eclodiram. POUND e OLIVER (1979) observaram que o hormônio juvenil, desfaz o bloqueio do desenvolvimento do oócito causado pela aplicação tópica nas fêmeas da anti-alactropina precocena II, indicando a importância do hormônio juvenil na reprodução do carrapato Ornithodoros parkeri. No Boophilus microplus foi demonstrado que o rápido crescimento ovariano que caracteriza o período de pré-oviposição é dependente da presença de hormônio juvenil como acontece com as outras espécies de carrapatos estudadas (GUMA e DEWES, em preparação).

As vitelogeninas e vitelinas dos insetos já analisadas, foram caracterizadas como glico-lipo-proteínas com 1 a 14% de glicídios e 6 a 12% de lipídios. Glicosamina e manose são os principais componentes glicídicos detectados (DEJMAL e BROOKES, 1972; CHEN e colaboradores, 1978; KUNKEL e colaboradores, 1978 e 1980). Na vitelina da Locusta migratoria, o oligossacarídeo que contém manose está ligado a um

resíduo de asparagina (YAMAZAKY, 1974). Na parte lipídica foram encontrados fosfolipídios e diacil-gliceróis em maior quantidade (CHINO e colaboradores, 1976; MUNDALL e LAW, 1979; CHINZEI e colaboradores, 1981).

Os glicídios podem ser estocados como grupo prostético das proteínas vitelogênicas. YAMAZAKY (1974) demonstrou que uma glicoproteína se constitui na principal reserva glicídica e proteica do ovo da Locusta migratoria. Por outro lado, glicogênio pode ser sintetizado no ooplasma no final da vitelogênese, como foi observado em Apis mellifera e Musca domestica (CHIPPENDALE, 1978).

As vitelogeninas dos insetos contêm também uma pequena quantidade de fósforo não lipídico, não tendo sido encontradas proteínas altamente fosforiladas como a fosfovitina das aves e anfíbios (ENGELMANN e FRIEDEL, 1974; GELLISSEN e colaboradores, 1976; CHEN e colaboradores, 1978; WILEY e WALLACE, 1981).

Estas proteínas são constituídas de diferentes subunidades e sua massa molecular varia entre 225 a 550.000 (WYATT, 1980).

Em parasitas hematófagos as vitelinas são frequentemente hemeproteínas. Especula-se que o grupo heme armazenado durante a vitelogênese possa ser utilizado na fase embrionária para síntese dos sistemas de citocromos e outras heme-

-enzimas. Supõe-se que estes parasitas perderam ao longo da evolução a capacidade de sintetizar o grupamento heme, tornando-se dependentes de fontes exógenas deste grupo (O'HAGAN, 1974).

A presença de hemeproteínas em ácaros hematófagos foi verificada pela primeira vez por WIGGLESWORTH (1943), estudando espectrofotometricamente a hemolinfa de fêmeas em oviposição e os ovos das espécies Ornithodoros moubata e Ixodes ricinus.

BREMNER (1959), trabalhando com extrato aquoso, demonstrou que a coloração dos ovos de Boophilus microplus é devido a uma hemeproteína. Identificou a protoporfirina IX como o grupo protético da proteína existente em altas concentrações no ovo, a que chamou de "hemixodovina".

TATCHELL (1971) verificou a existência de hemeglicoproteínas na hemolinfa e nos ovos do Boophilus microplus, utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida. Demonstrou que pelo menos uma das hemeproteínas encontradas na hemolinfa da fêmea ovipositora é incorporada pelo oócito em desenvolvimento.

Na espécie Ornithodoros moubata DIEHL (1969) encontrou que duas hemeproteínas da fração solúvel de ovos, correspondem em eletroforese em gel de poliacrilamida a duas bandas de proteínas da hemolinfa da fêmea, com as quais apresentam

semelhança antigênica. Na mesma espécie, injetando leucina tritiada nas fêmeas, JENNI (1971) verificou a incorporação de proteínas marcadas pelos oócitos, durante a vitelogênese. O oócito incorpora por pinocitose proteínas da hemolinfa, que são sintetizadas no intestino.

BOCTOR e KAMEL (1976) isolaram de extratos de ovos do carrapato Dermacentor andersoni duas vitelinas (A e B), caracterizando-as como lipo-glico-heme-proteínas. As duas frações purificadas são imunologicamente idênticas e seu precursor foi detectado por imunoeletroforese na hemolinfa da fêmea.

As proteínas solúveis do Boophilus microplus, quando analisadas por coluna de Agarose 1,5, se distribuem em 3 principais frações hemeproteicas (I, II, III), as quais se separam em 5 hemeproteínas através de eletroforese em gel de poliacrilamida (MAIA e colaboradores, em preparação). A concentração relativa das frações obtidas na coluna de Agarose 1,5 varia durante o desenvolvimento. Nos primeiros dias que seguem a oviposição, nos ovos predomina a fração II, cuja concentração diminui no decorrer do desenvolvimento. O desaparecimento desta fração é acompanhada pelo surgimento das demais frações hemeproteicas (I e III) que predominam nos estágios finais da embriogênese e fase larval.

Similarmente, 4 frações hemeproteicas (I, II, III e IV) foram separadas dos ovos do carrapato Hyalomma dromedarii



através de coluna de DEAE-celulose (KAMEL e colaboradores, 1982). Suas concentrações relativas também variam ao longo do desenvolvimento. As frações I e II que predominam no início da embriogênese, sofrem gradativo decréscimo em suas concentrações, enquanto as frações III e IV de baixas concentrações iniciais, aumentam seus valores atingindo um máximo poucos dias antes da eclosão das larvas.

Estes resultados em ambos carrapatos sugerem que ocorra interconversão entre os componentes hemeproteicos durante o desenvolvimento, sem contudo isto ter sido demonstrado.

Dentro do objetivo de estudar as transformações que as heme-glico-vitelinas do Boophilus microplus sofrem durante o desenvolvimento, bem como seguir os passos biossintéticos de seus precursores, é importante obter-se estas proteínas marcadas. A marcação destas vitelogeninas facilita também os estudos relativos ao controle hormonal no processo da síntese extra-ovariana, transporte na hemolinfa e captação pelo oócito em desenvolvimento.

A introdução de glicídios radioativos na estrutura das vitelinas se coloca como uma opção para marcá-las, uma vez que se tratam de glicoproteínas. Isto pode ser realizado através da inoculação direta de glicídios radioativos, ou através da inoculação de  $[^{14}\text{C}]$  aminoácidos glicogenéticos, em fêmeas no período de vitelogênese. A última alternativa se justifica pela suposição de que o carrapato bovino possua

uma gliconeogênese ativa, já que é um parasita hematófago, cuja dieta é basicamente proteica.

Este trabalho descreve a obtenção das heme-glico-vitelinas do Boophilus microplus marcadas radioativamente, utilizando-se como precursores [ $^3\text{H}$ ] Manose, [ $^{14}\text{C}$ ] Leucina, [ $^3\text{H}$ ] Glicose, e uma mistura de [ $^{14}\text{C}$ ] aminoácidos. Além disso, as propriedades das vitelinas marcadas são analisadas durante os diferentes estágios do desenvolvimento embrionário e larval.

## II - MATERIAL E MÉTODOS

### A - MATERIAL

#### 1 - Carrapato bovino Boophilus microplus

Foram utilizadas fêmeas do carrapato bovino Boophilus microplus, de cepa denominada "resistente", mantida em cultura sobre bovinos, na Faculdade de Veterinária, UFRGS, pelo Professor João Carlos Gonzales. As fêmeas recém caídas do hospedeiro foram trazidas ao laboratório, e incubadas a 27-28° C e 70-80% de umidade relativa do ar. Durante o período de oviposição, os ovos foram recolhidos diariamente, divididos em porções de 60 mg e re-incubados nas mesmas condições, para se desenvolverem até larvas.

2 - Reagentes

Fornecidos pelos seguintes laboratórios:

- a) Sigma Chemical Company: Riboflavina, Acrilamida, Temed, Imidazol, N,N'-Metileno-bis-acrilamida, "Amido-black"
- b) J. T. Backer Chemical Co.: Dowex 50W-X2 ( $H^+$ ) 200-400 mesh  
Dowex 1-X8 ( $Cl^-$ ) 40-50 mesh
- c) Bio-Rad Laboratories: Bio-Gel A-1,5 200-400 mesh
- d) New England Nuclear: D- $[2-^3H(N)]$  Manose: Atividade específica: 342 mCi/mmol  
L- $[^{14}C(U)]$  Leucina: Atividade específica: 342 mCi/mmol  
D- $[1-^3H(N)]$  Glicose: Atividade específica: 15 mCi/mmol  
Mistura de  $[L-^{14}C(U)]$  Aminoácidos: 1 mmol desta mistura contém: L-Alanina (80  $\mu$  Ci), L-Arginina (70  $\mu$  Ci), ácido-L-Aspártico (80  $\mu$  Ci), ácido L-Glutâmico

co (125 $\mu$  Ci), L-Isoleucina (50  $\mu$ Ci), L-Leucina (140 $\mu$  Ci), L-Fenilalanina (80 $\mu$  Ci), L-Tirosina (40 $\mu$  Ci), L-Treonina (50  $\mu$ Ci), L-Valina (80 $\mu$  Ci), L-Lisina (60 $\mu$  Ci).

Todos os demais reagentes e solventes empregados foram "pró-análise".

## B - MÉTODOS

### 1 - Preparação de homogenados de ovos e larvas

Cada porção de 60 mg de ovos ou larvas, na idade indicada foi triturada em gral com 0,5 ml de Tampão TRIS-HCl 0,1M pH=8,1. A seguir, foi adicionado mais 0,5 ml do Tampão ao macerado, o qual foi homogeneizado no aparelho de Potter-Elvehjem. Este material foi filtrado em papel Whatmann nº 1, e centrifugado a 27.000 xg numa centrifuga refrigerada SORVALL-superspeed RC2-B. O sedimento foi denominado de fração insolúvel, enquanto que o sobrenadante de fração solúvel.

## 2 - Injeção dos glicídios e aminoácidos radioativos

Uma micro-seringa Hamilton foi utilizada para injetar num volume de 10  $\mu$ l os precursores radioativos, dorsalmente, no intestino das fêmeas, de acordo com a tabela I.

Tabela I - Injeção dos precursores radioativos em diferentes grupos de fêmeas.

GRUPO DE FÊMEAS	RADIOATIVO INJETADO
Fêmeas recém caídas do hospedeiro	Solução aquosa de 15 $\mu$ Ci de [ $^3\text{H}$ ] Manose e 0,5 $\mu$ Ci [ $^{14}\text{C}$ ] Leucina
Fêmeas no segundo dia de postura	Solução aquosa de 15 $\mu$ Ci de [ $^3\text{H}$ ] Manose e 0,5 $\mu$ Ci de [ $^{14}\text{C}$ ] Leucina
Fêmeas no segundo dia de postura	Solução aquosa de 20 $\mu$ Ci de [ $^3\text{H}$ ] Glicose
Fêmeas no segundo dia de postura	Solução aquosa de 5 $\mu$ Ci da mistura de [ $^{14}\text{C}$ ] Aminoácidos

### 3 - Cromatografia de gel-filtração em coluna de Agarose 1,5

A fração solúvel dos homogenados de ovos e larvas marcados com [ $^3\text{H}$ ] Manose e [ $^{14}\text{C}$ ] Leucina foi cromatografada em coluna de Agarose 1,5 de 80 x 2,1 cm, com fluxo de 4,8 ml/hora. A quantidade média de proteína aplicada na coluna foi de 60 mg. O tampão de eluição utilizado foi TRIS-HCl 0,1M pH=8,1. Ao material radioativo extraído de larvas foi acrescentado proteína não marcada de larvas de mesma idade, como carregador.

A separação proteica foi acompanhada no efluente da coluna, através da leitura em 280 nm. A distribuição das hemeproteínas foi avaliada pela absorbância no comprimento de onda 410 nm.

As frações solúveis marcadas com [ $^3\text{H}$ ] Glicose foram cromatografadas numa coluna de Agarose 1,5 de 55 x 0,7 cm, com fluxo de 1,9 ml/hora. A quantidade de proteína aplicada foi 2 mg. O tampão de eluição foi TRIS-HCl 0,1M pH=8,1. A distribuição proteica foi acompanhada no efluente pela absorbância em 230 nm.

#### 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida

##### 4.1 - Eletroforese em condições não dissociantes

Os cilindros de gel de poliacrilamida a 5% foram preparados segundo a técnica de LAEMMLI (1970). A quantidade de proteína aplicada foi de 500  $\mu$ g por cilindro.

A corrente elétrica empregada no gel de entrada foi de 1 mA/cilindro, enquanto que no gel de corrida foi 4 mA/cilindro. O tampão TRIS-0,025M - Glicina-0,192M pH=8,4, foi utilizado para os eletrodos.

As bandas proteicas foram coradas com "Amido-black" 0,5 g% em ácido acético glacial, durante 15 minutos, a 40°C. Os cilindros de gel foram descorados com ácido acético a 7,5%.

As bandas heme proteicas foram identificadas por imersão dos cilindros de gel numa solução de benzidina cuja composição é a seguinte:

Benzidina	1,0 g
Nitroprussiato de sódio	0,5 g
Metanol	75 ml
Ácido acético glacial	25 gotas



#### 4.2 - Eletroforese em condições dissociantes

Os cilindros de gel de poliacrilamida a 10% com dodecil sulfato de sódio (SDS) foram preparados de acordo com a técnica de HEDRICK e SMITH (1968), adaptada para as condições dissociantes.

As amostras proteicas foram previamente incubadas a 40°C, durante 24 horas na proporção de 1:1 com a seguinte solução dissociante:

Tampão Imidazol-HCl 0,06M pH=5,7 em glicerol 50%

Uréia	8M
SDS	1%
β -mercapto-etanol	5%

A quantidade de proteína aplicada foi de 500 µg/gel.

O tampão empregado nos eletrodos foi TRIS-0,025M Glicina-0,192M pH=8,4 com 0,1% de dodecil sulfato de sódio.

As condições da corrida eletroforética, e da revelação proteica foram as descritas acima.

5 - Obtenção do "pellet" proteico marcado com  $[^{14}\text{C}]$  Aminoácidos

Ovos postos pelas fêmeas no segundo dia de postura após a injeção da mistura de  $[^{14}\text{C}]$  Aminoácidos foram homogeneizados e extraídos com butanol saturado de água (GARCIA e colaboradores, 1974). O precipitado foi lavado três vezes com água e após, extraído três vezes com uma mistura de clorofórmio:metanol:água (1:1:0,3). O resíduo insolúvel assim obtido constitui-se no "pellet" proteico.

6 - Pesquisa de glicídios neutros

O resíduo insolúvel em solventes orgânicos e água foi hidrolisado com ácido Tri-fluor-acético 2N, a  $120^{\circ}\text{C}$ , durante uma hora, numa atmosfera de nitrogênio, em ampolas fechadas (CARSON e colaboradores, 1981).

O hidrolizado ácido, diluído até 0,1 - 0,4 meq/ml foi aplicado em duas colunas sucessivas de Dowex 50W-X2 200-400 mesh ( $\text{H}^+$ ) e Dowex 1X-8 40-50 mesh ( $\text{H-COO}^-$ ). A quantidade de resina empregada tinha capacidade de interagir com o quádruplo de miliequivalentes de prótons da amostra (SPIRO, 1966).

A fração neutra do hidrolisado ácido foi totalmente evaporada num evaporador rotatório, e o resíduo foi ressuspenso em água destilada e submetido à cromatografia descendente em papel Whatmann nº 1. O solvente utilizado foi a mistura de butanol:piridina:água na proporção 6:4:3 (JEANES e colaboradores, 1951). O tempo de corrida foi de 40 horas.

Os padrões foram revelados com nitrato de prata saturado, diluído 1:200 com acetona (TREVELYAN e colaboradores, 1950).

Na tira de papel correspondente à amostra, foi acrescentado manose como padrão interno. Sua revelação foi efetuada através de aquecimento do papel a 300°C com ferro elétrico (ALPERIN e colaboradores, 1981).

## 7 - Medida da radioatividade

A radioatividade presente nas frações solúveis dos homogenados de ovos ou larvas, e nos efluentes das colunas de Agarose 1,5 e Dowex foi determinada em alíquotas separadas de cada fração, utilizando-se 5 ml de uma mistura de triton-tolueno, e PPO-POPOP (PPO-8,25 g; POPOP-0,25 g; Triton-500 ml; tolueno-1000 ml). A fração insolúvel dos homogenados de

ovos ou larvas foi previamente ressuspensa em 100  $\mu$ l de tampão TRIS-HCl 0,1M pH=8,1.

A medida da radioatividade nos cilindros de poliacrilamida foi realizada cortando-os em fatias de 5 mm. Os segmentos de gel foram incubados a 60°C, 12 horas, com 0,5 ml Peróxido de Hidrogênio a 30%. A seguir foi adicionado 5 - 10 ml da mistura triton-tolueno e PPO-POPOP (HOLLINGER e colaboradores, 1972).

A radioatividade existente na cromatografia em papel foi avaliada cortando as tiras em segmentos de 1 cm, aos quais foi acrescentado 3 ml do líquido de cintilação (PPO-4 g; POPOP-50 mg; tolueno 1000 ml).

Para esta medida utilizou-se o cintilador líquido Beckman LS-100.

## 8 - Determinação de proteínas

A concentração proteica foi determinada de acordo com a técnica de LOWRY e colaboradores (1951) usando como padrão uma mistura de proteínas extraídas do ovo do carrapato bovino, cuja concentração foi determinada pelo método de Kjeldahl.

### III - R E S U L T A D O S

#### 1 - CAPTAÇÃO DE D- $[^3\text{H}]$ MANOSE, L- $[^{14}\text{C}]$ LEUCINA, E D- $[^3\text{H}]$ GLICOSE

A injeção de Manose e Leucina radioativos em fêmeas recém caídas do hospedeiro resultou na incorporação de radioatividade nos ovos. A figura 1 mostra a distribuição da radioatividade incorporada nos ovos durante o período de postura do ácaro. A maior parte da radioatividade aparece nos ovos dos três primeiros dias da oviposição, correspondentes aos 3 - 5 dias após a injeção das substâncias radioativas.

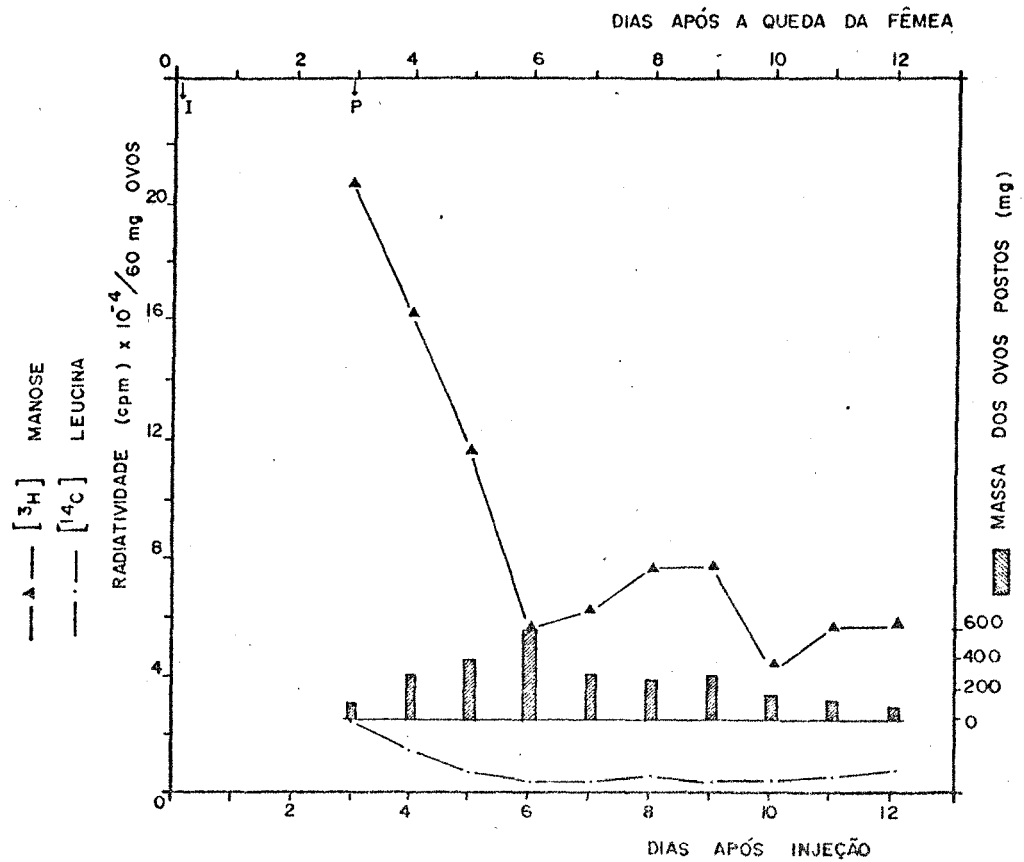


Fig. 1 - Incorporação de D- $[^3\text{H}]$  Manose e L- $[^{14}\text{C}]$  Leucina na fração solúvel dos ovos postos por fêmeas injetadas no dia de queda.

P - dia de início de postura I - dia da injeção

Também é indicada a massa total de ovos postos em cada dia.

A injeção de Manose e Leucina no segundo dia de postura determina uma maior incorporação dos precursores radioativos no dia de maior produção de ovos (Fig. 2).

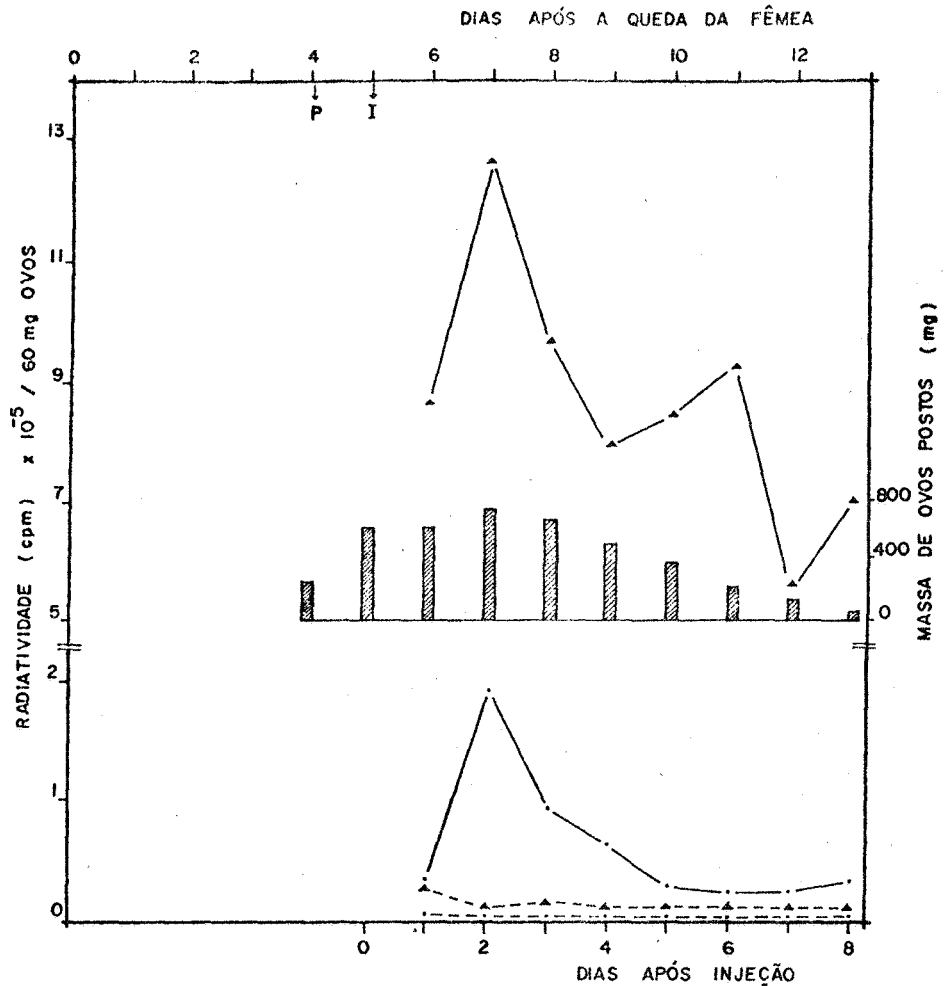


Fig. 2 - Incorporação de D- $[^3\text{H}]$  Manose e L- $[^{14}\text{C}]$  Leucina nos ovos postos por fêmeas injetadas no segundo dia de postura.

Fração solúvel ———▲—————  $[^3\text{H}]$  Manose  
 ———·—————  $[^{14}\text{C}]$  Leucina  
 Fração insolúvel - - - -▲- - - -  $[^3\text{H}]$  Manose  
 - - - -·- - - -  $[^{14}\text{C}]$  Leucina

▨ Massa de ovos

P - dia do início da postura I - dia da injeção

A injeção de  $[^3\text{H}]$  Glicose no segundo dia de postura determina um máximo de incorporação de radioatividade nos ovos postos no dia seguinte a injeção (Fig. 3).

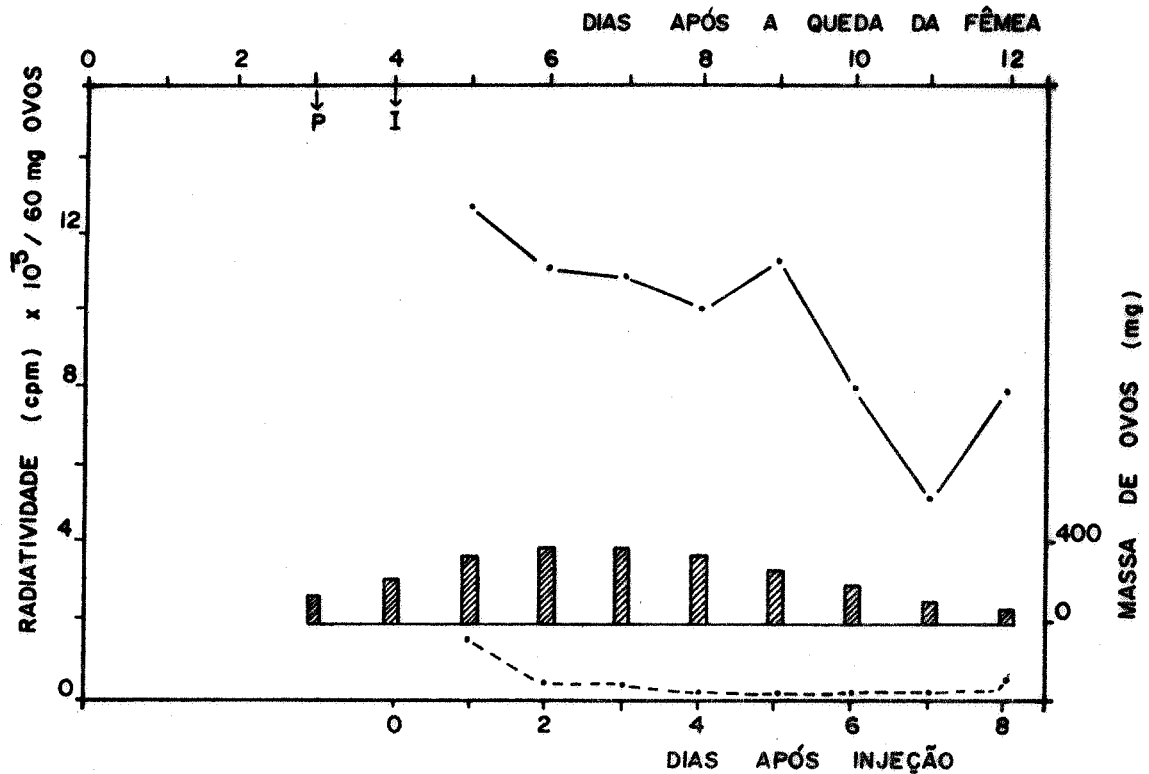


Fig. 3 - Incorporação de  $[^3\text{H}]$  Glicose nos ovos postos por fêmeas injetadas no segundo dia de postura.

- fração solúvel
- - - - - fração insolúvel
- ▨ massa de ovos postos em cada dia
- P - dia do início da postura
- I - dia da injeção



A tabela II mostra as porcentagens dos precursores injetados no segundo dia de postura que são incorporados às frações solúvel e insolúvel de toda a produção de ovos de uma fêmea.

Tabela II - Distribuição (%) dos precursores radioativos injetados e incorporados às frações solúvel e insolúvel dos ovos postos por uma fêmea (Fig. 2, 3).

PRECURSOR	INJETADO POR FÊMEA	FRAÇÃO SOLÚ VEL	FRAÇÃO INSOLÚ VEL
[ <sup>3</sup> H] Manose	15 µCi (100)	12,0	0,2
[ <sup>14</sup> C] Leucina	0,5 µCi (100)	30,0	0,8
[ <sup>3</sup> H] Glicose	20 µCi (100)	14,0	0,7

## 2 - RADIOATIVIDADE PRESENTE NOS OVOS E LARVAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO

As figuras 4a e 4b mostram que a radioatividade incorporada nos ovos durante a oogênese decresce durante o desenvolvimento do carrapato bovino.

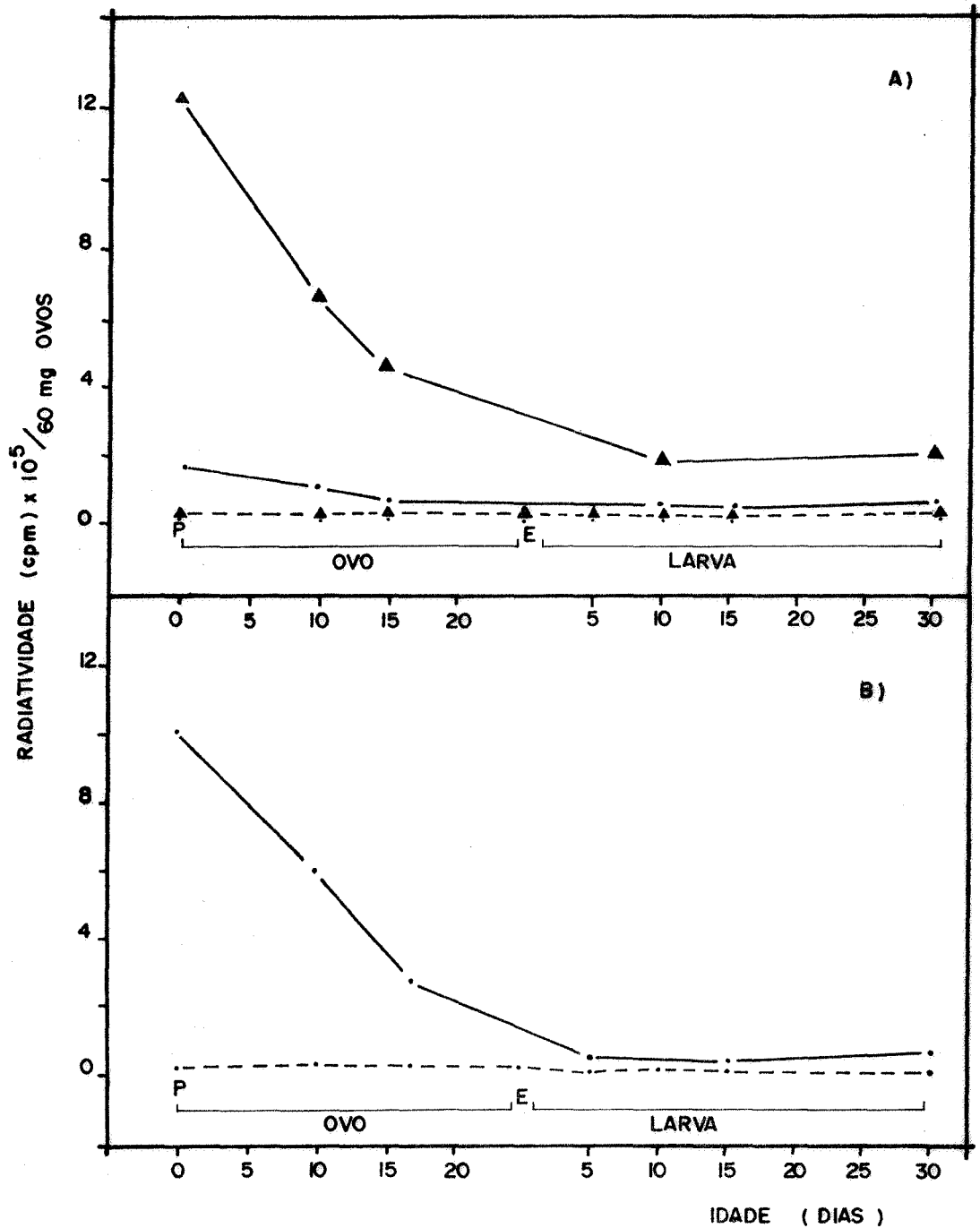


Fig. 4 - Radioatividade nos homogenados de ovos e larvas em diferentes idades.  
 4a - homogenados marcados com  $[^3\text{H}]$  Manose e  $[^{14}\text{C}]$  Leucina  
 —▲— fração solúvel marcada com  $[^3\text{H}]$  Manose  
 —•— fração solúvel marcada com  $[^{14}\text{C}]$  Leucina  
 - - - - - frações insolúveis marcadas com  $[^3\text{H}]$  Manose e  $[^{14}\text{C}]$  Leucina  
 4b - homogenados marcados com  $[^3\text{H}]$  Glicose  
 —•— fração solúvel  
 - - - - - fração insolúvel  
 P - dia da postura      E - dia da eclosão das larvas

### 3 - VARIAÇÃO DA QUANTIDADE RELATIVA DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS PRESENTES NOS OVOS E LARVAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO

A figura 5 mostra que a quantidade relativa das proteínas solúveis presentes na embriogênese decresce perceptivelmente no final deste período, prosseguindo este declínio na eclosão e nos primeiros dias da fase larval.

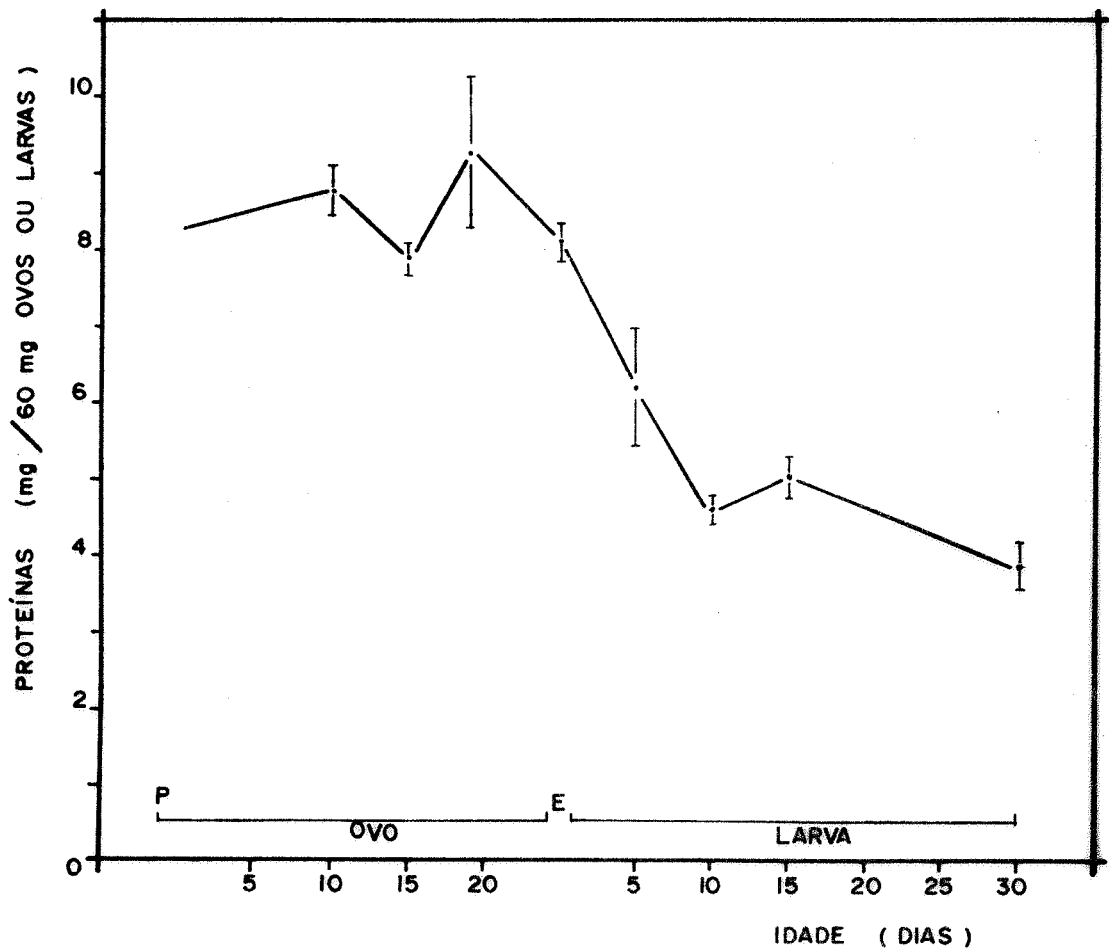


Fig. 5 - Quantidade relativa de proteínas solúveis presentes nos ovos e larvas durante o desenvolvimento.

P - dia de postura

E - dia da eclosão das larvas

## 4 - DISTRIBUIÇÃO DA RADIOATIVIDADE NA COLUNA DE AGAROSE 1,5

4.1 - Fração solúvel do homogenado de ovos no dia de postura

A cromatografia em Agarose 1,5 da fração solúvel dos ovos homogeneizados no dia de postura, marcados com  $[^3\text{H}]$  Manose e  $[^{14}\text{C}]$  Leucina é mostrada na figura 6.

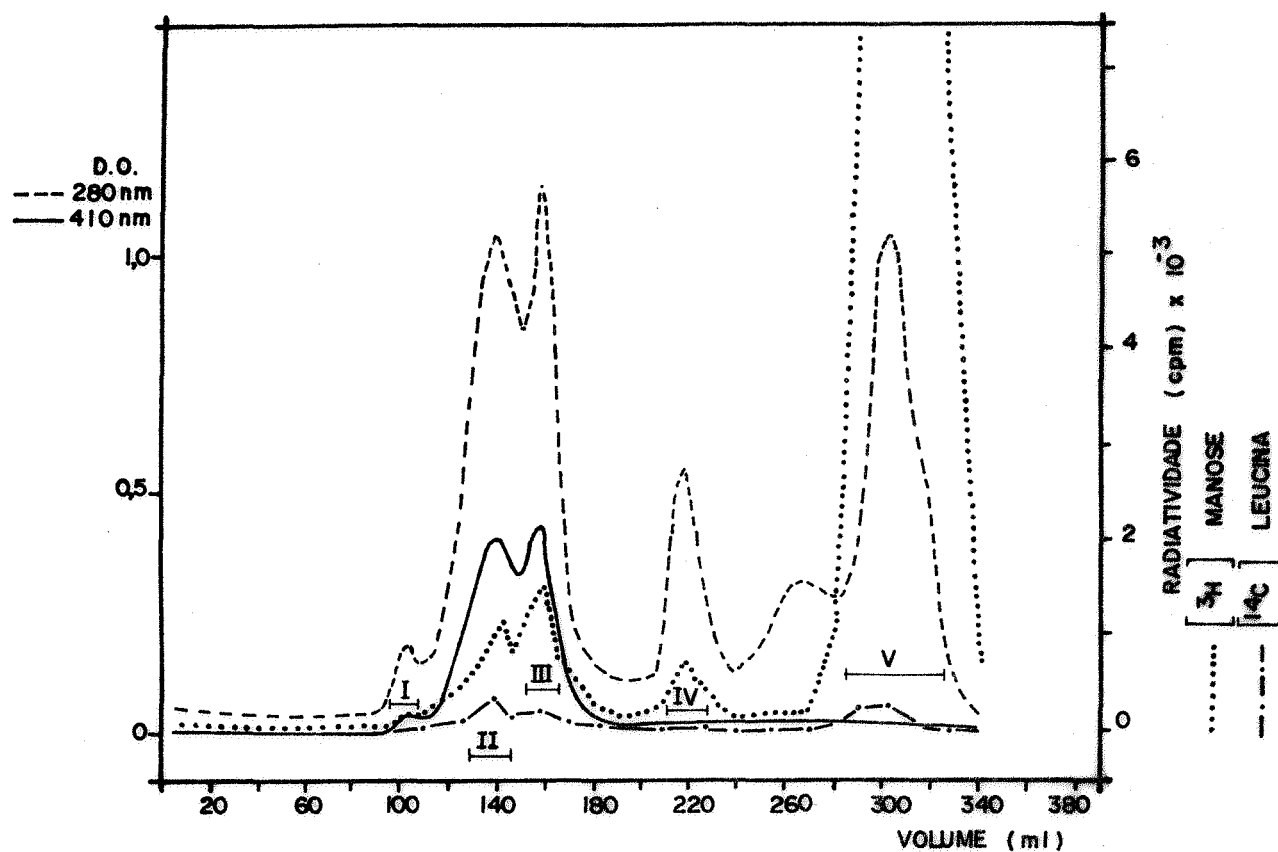


Fig. 6 - Cromatografia em coluna de Agarose 1,5 das proteínas marcadas com  $[^3\text{H}]$  Manose e  $[^{14}\text{C}]$  Leucina extraídas de ovos.

Proteína aplicada: 60 mg  
 Radioatividade aplicada:  $[^3\text{H}]$  Manose 4 849 900 cpm  
 $[^{14}\text{C}]$  Leucina 258 775 cpm

Tampão TRIS-HCl 0,1M pH=8,1

Tamanho da coluna: 80 x 2,1 cm

As frações I, II e III são hemeproteínas, como se verifica com a absorção em 410 nm.

As frações I, II, III, IV e V apresentam radioatividade de ambos os precursores injetados.

Na fração solúvel de ovos homogeneizados no dia de postura e marcados com  $[^3\text{H}]$  Glicose, a maior parte da radioatividade está distribuída entre 3 frações separadas na coluna de Agarose 1,5 (Fig. 7), as quais correspondem aos picos II, IV e V mostrados na figura 6.

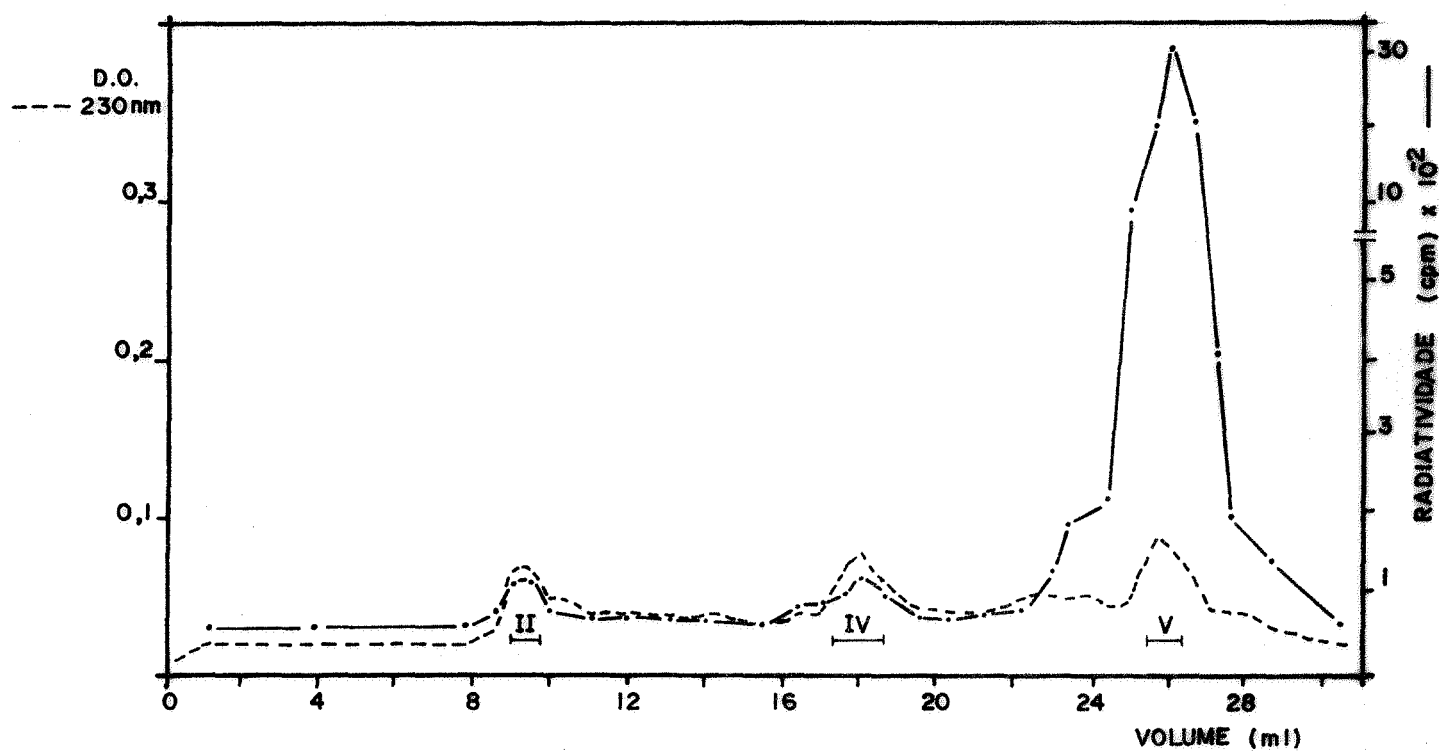


Fig. 7 - Cromatografia em coluna de Agarose 1,5 das proteínas solúveis marcadas com  $[^3\text{H}]$  Glicose extraídas de ovos no dia de postura.

Proteína aplicada: 2 mg

Radioatividade aplicada: 32 160 cpm

Tamanho da coluna: 55 x 0,7 cm

Na tabela III, é mostrada a distribuição porcentual da radioatividade aplicada, entre os picos separados pela Agarose 1,5, da fração solúvel dos homogenados de ovos no dia de postura.

Tabela III - Distribuição (%) da radioatividade aplicada, entre os picos principais separados pela Agarose 1,5, da fração solúvel de ovos no dia de postura (Fig. 6 e 7) (\*)

PICOS	I	II	III	IV	V
PRECURSOR					
[ <sup>3</sup> H] Manose	0,3	2,7	3,1	3,4	92,2
[ <sup>14</sup> C] Leucina	1,8	20,8	24,5	5,5	44,4
[ <sup>3</sup> H] Glicose	-	8,2	-	8,1	52,0

\* Área total do gráfico = 100%

$$\frac{\text{Área do pico}}{\text{Área total do gráfico}} \times 100 = \% \text{ de cada pico}$$

Os picos V em ambos os cromatogramas (Fig. 6 e 7) apresentam a maior porcentagem de radioatividade. O volume de eluição deste pico corresponde ao volume de eluição de substâncias de baixo peso molecular, como oses e aminoácidos livres (resultados não ilustrados).

4.2 - Fração solúvel do homogenado de larvas

A cromatografia da fração solúvel do homogenado de larvas de 30 dias, marcadas com  $[^3\text{H}]$  Manose e  $[^{14}\text{C}]$  Leucina em coluna de Agarose 1,5 é mostrada na figura 8.

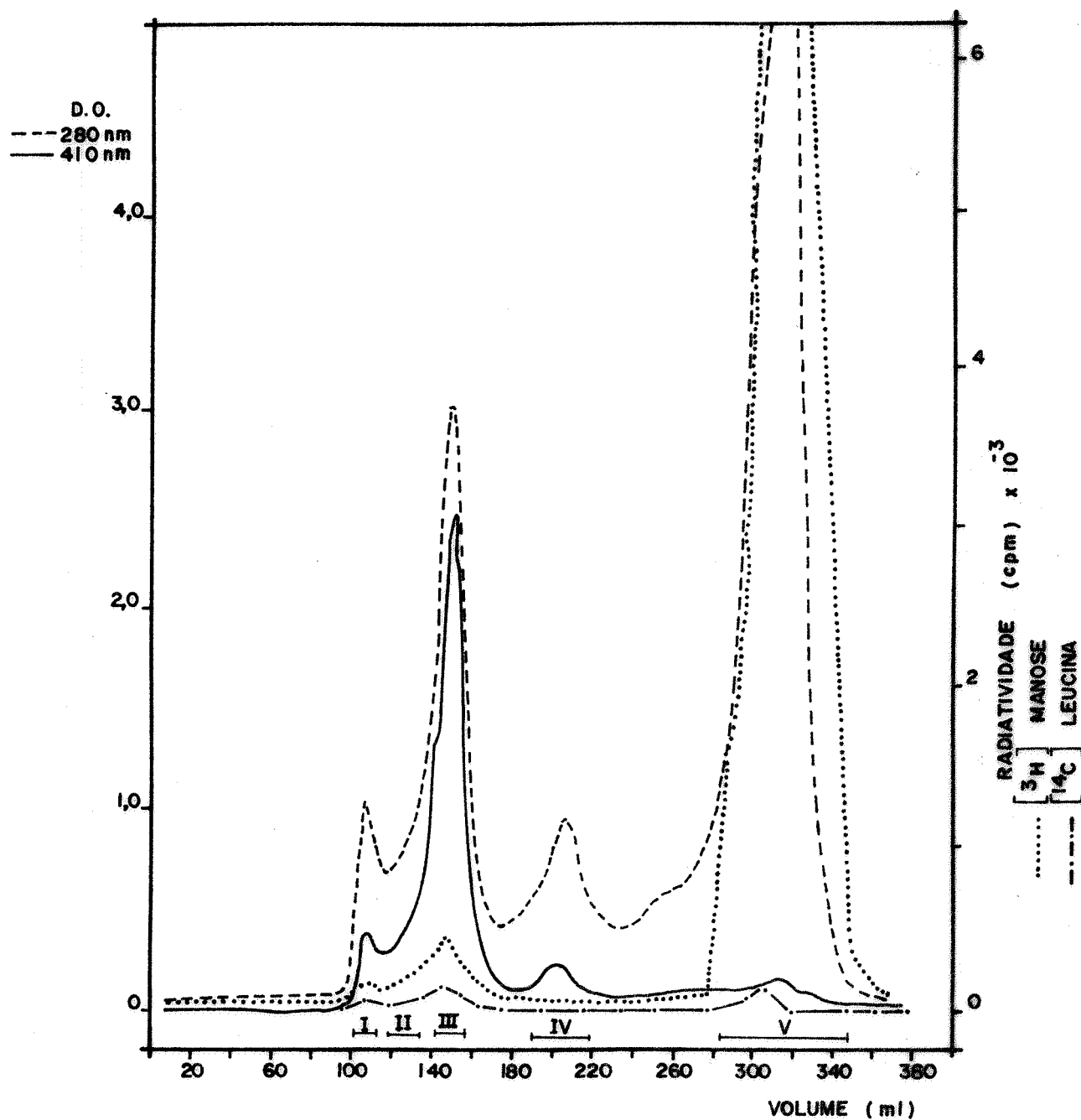


Fig. 8 - Cromatografia em coluna de Agarose 1,5 das proteínas solúveis marcadas com  $[^3\text{H}]$  Manose e  $[^{14}\text{C}]$  Leucina, extraídas de larvas de 30 dias.  
 Proteína aplicada: 5,3 mg marcada + 55,8 mg não marcada (carregador)  
 Radioatividade aplicada:  $[^3\text{H}]$  Manose = 716 128 cpm  
 $[^{14}\text{C}]$  Leucina = 46 224 cpm



As cinco frações observadas nas larvas (I, II, III, IV e V) apresentam radioatividade de ambos os precursores injetados. A distribuição porcentual da radioatividade encontrada nas frações separadas pela Agarose 1,5 é mostrada na tabela IV.

A figura 9 corresponde ao cromatograma das proteínas solúveis extraídas de larvas contendo radioatividade proveniente de [<sup>3</sup>H] Glicose.

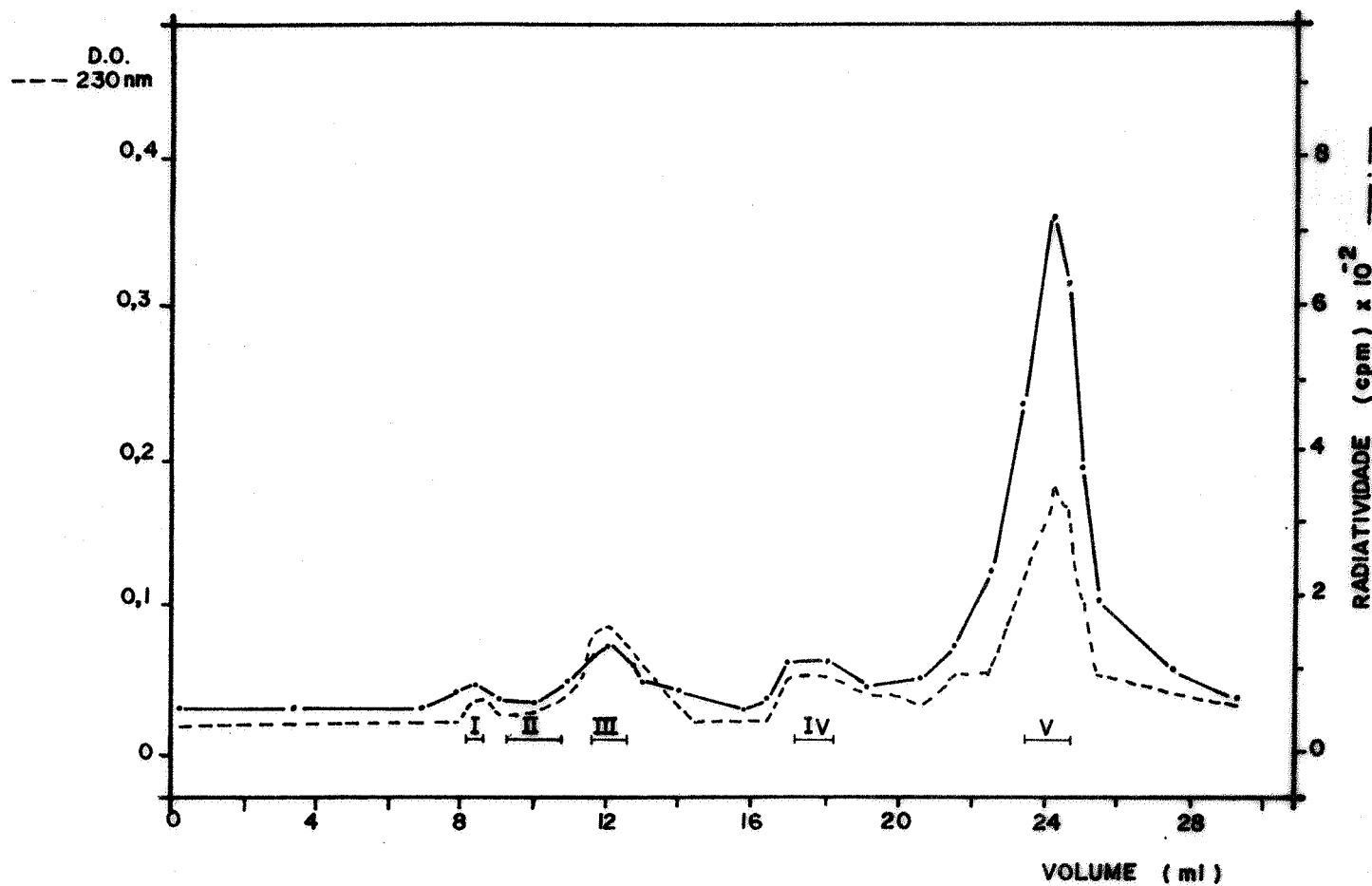


Fig. 9 - Cromatografia em coluna de Agarose 1,5 das proteínas marcadas com  $[^3\text{H}]$  Glicose extraídas de larvas de 15 dias.

Proteína aplicada: 2 mg

Radioatividade aplicada:  $[^3\text{H}]$  Glicose = 9844 cpm

Neste caso, a radioatividade também se distribue em cinco picos. A respectiva distribuição porcentual é apresentada na tabela IV.

Tabela IV - Distribuição (%) da radioatividade aplicada, entre os picos separados pela Agarose 1,5, da fração solúvel de larvas (Fig. 8 e 9) (\*)

PICOS	I	II	III	IV	V
PRECURSOR					
[ <sup>3</sup> H] Manose	0,6	1,1	2,7	1,1	93,5
[ <sup>14</sup> C] Leucina	6,6	12,9	23,4	2,6	52,5
[ <sup>3</sup> H] Glicose	6,5	3,1	14,6	10,5	54,5

(\*) Área total do gráfico = 100%

$$\frac{\text{Área do pico}}{\text{Área total do gráfico}} \times 100 = \% \text{ de cada pico}$$

Também nos cromatogramas das figuras 8 e 9, correspondentes a fração solúvel de larvas, o pico V contém a maior porcentagem da radioatividade aplicada na coluna de Agarose 1,5.

O mesmo perfil proteico das frações solúveis de ovos e larvas na coluna de Agarose 1,5 é obtido utilizando o sobre-

nadante de uma centrifugação a 100 000 x g das frações solúveis de ovos e larvas (Resultados não ilustrados).

A comparação da distribuição porcentual da radioatividade de entre os picos hemeproteicos I, II e III separados pela coluna de Agarose 1,5, das frações solúveis de ovos e larvas é mostrada na tabela V.

Tabela V - Comparação da distribuição (%) da radioatividade entre os picos hemeproteicos I, II e III separados pela coluna de Agarose 1,5, das frações solúveis de ovos e larvas (\*)

		I	II	III
M A N O S E	Ovo	4,8	44,3	50,9
	Larva	14,4	24,3	61,2
L E U C I N A	Ovo	3,8	43,8	52,8
	Larva	15,6	30,0	54,4
G L I C O S E	Ovo	-	100,0	-
	Larva	27,7	12,9	59,4

(\*) 
$$\frac{\text{Área do pico}}{\text{Somatório das áreas dos picos I, II e III}} \times 100 = \% \text{ de cada pico}$$

## 5 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DAS PROTEÍNAS SOLÚVEIS DE OVOS E LARVAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO

### 5.1 - Eletroforese em condições não dissociantes dos componentes das frações obtidas na coluna de Agarose 1,5

Os resultados da análise da eletroforese em gel de poliacrilamida das frações hemeproteicas separadas pela coluna de Agarose 1,5 são mostrados na figura 10a.

A fração I, obtida por coluna de Agarose 1,5, contém um componente hemeproteico de alto peso molecular que não penetra no gel a 5%.

Em cada uma das outras frações separadas pela coluna de Agarose 1,5 (II e III) foram detectados dois componentes hemeproteicos de distintas mobilidades eletroforéticas, os quais foram denominados  $II_1$ ,  $II_2$ ,  $III_1$  e  $III_2$ , respectivamente.

### 5.2 - Eletroforese em condições não dissociantes da fração solúvel dos homogenados de ovos e larvas em diferentes idades, marcadas com glicídios e leucina radioativos

A eletroforese em gel de poliacrilamida da fração solú-

vel dos homogenados de ovos e larvas em diferentes idades, marcados com  $[^3\text{H}]$  Manose e  $[^{14}\text{C}]$  Leucina é mostrada na figura 10b.

O eletroferograma da fração solúvel de ovos homogenizados no dia de postura (oviposição) revela a existência de dois componentes hemepróteicos principais de  $R_m$  0,25 e 0,39. Estes componentes correspondem respectivamente às bandas  $II_1$  e  $II_2$  obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida do pico II isolado da coluna de Agarose 1,5 a partir da fração solúvel do homogenado de ovos (Comparar com figura 10a).

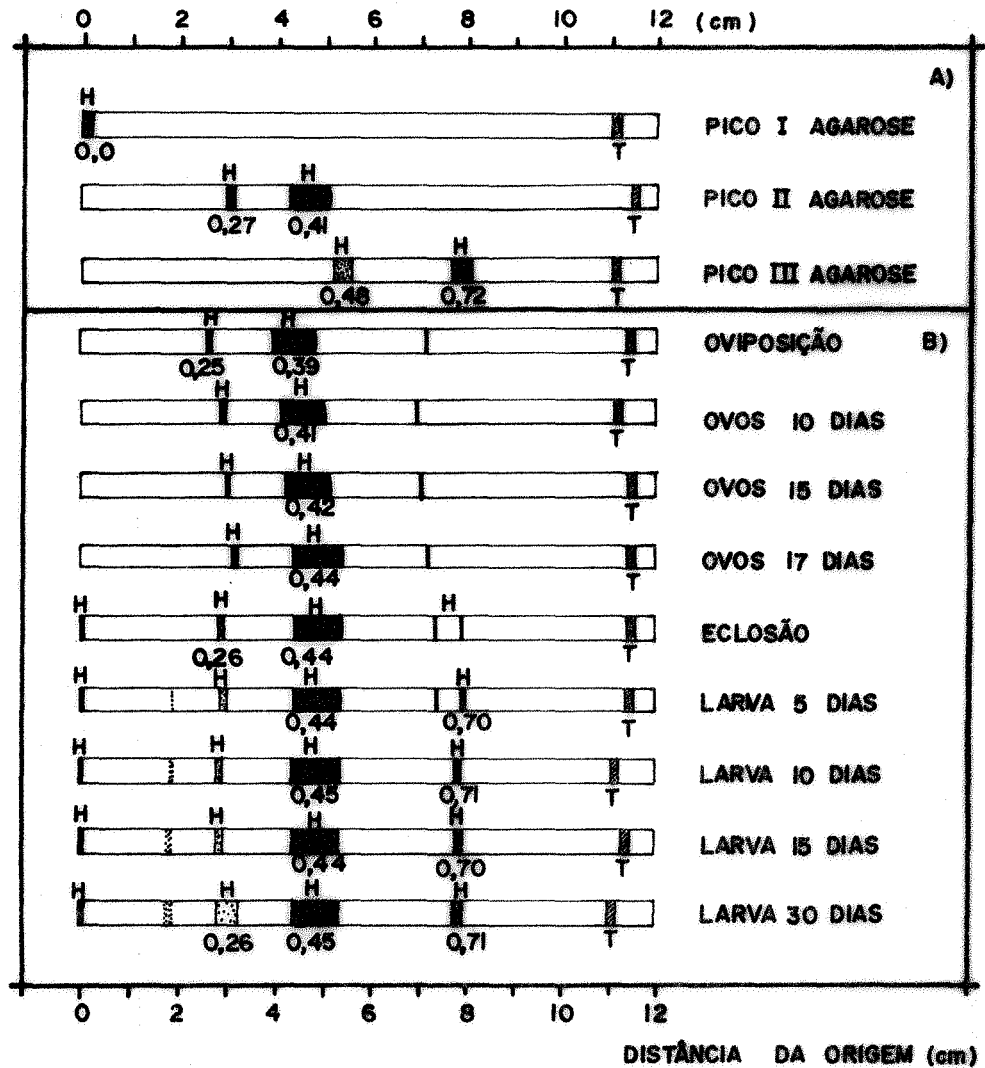


Fig. 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 5% em condições não dissociantes.

10a - frações hemoproteicas isoladas da coluna de Agarose 1,5

10b - fração solúvel de homogenados marcados com  $[^3\text{H}]$  Manose e  $[^{14}\text{C}]$  Leucina de ovos e larvas em diferentes idades

H - hemoproteínas - Os números sob as bandas indicam o  $R_m$  (mobilidade relativa)

T - corante traçador

Na fração solúvel do homogenado de larvas de 30 dias são detectadas por eletroforese 4 componentes hemeproteicos. Um destes corresponde ao componente  $II_1$  encontrado nos ovos, cuja concentração na larva está diminuída. Os demais correspondem respectivamente ao componente presente no pico I da Agarose 1,5 e aos componentes  $III_1$  e  $III_2$  encontrados no pico III da Agarose 1,5.

Quando se analisa por eletroforese as frações solúveis dos homogenados de ovos e larvas em estados intermediários ao longo do desenvolvimento, verifica-se que o componente  $II_2$  apresenta uma crescente mobilidade eletroforética, evoluindo do  $R_m = 0,39$  a  $0,45$ .

A distribuição da radioatividade proveniente de  $[^3H]$  Manose e  $[^{14}C]$  Leucina nos géis correspondentes a figura 10b, contendo as frações solúveis dos homogenados de ovos recém-postos (Oviposição), larvas em eclosão, e larvas de 30 dias é mostrada na figura 11. A radioatividade acompanha as bandas hemeproteicas  $II_2$  no ovo, I e  $III_1$  na larva. A tabela VI apresenta a distribuição porcentual da radioatividade aplicada no gel, entre as diferentes bandas proteicas reveladas.

A eletroforese das frações solúveis marcadas, utilizando  $[^3H]$  Glicose como precursor, é mostrada na figura 12, juntamente com a distribuição da radioatividade ao longo do gel. Na fração solúvel dos ovos homogenados no dia de postura são encontradas 3 bandas hemeproteicas que correspondem



aos componentes  $II_1$ ,  $II_2$  e  $III_1$  mencionados anteriormente. Encontrou-se radioatividade na posição correspondente ao componente I embora não se tenha visualizado uma banda proteica por "Amido-black". Na fração solúvel do homogenado de larvas de 15 dias são detectadas 5 bandas hemeoproteicas que correspondem aos componentes I,  $II_1$ ,  $II_2$ ,  $III_1$  e  $III_2$  mencionados anteriormente. Com o desenvolvimento do ovo em larva, a concentração relativa do componente  $II_2$  diminui e a do  $III_1$  aumenta, o que é acompanhado pela marca radioativa. A distribuição porcentual da radioatividade aplicada no gel é apresentada na tabela VI.

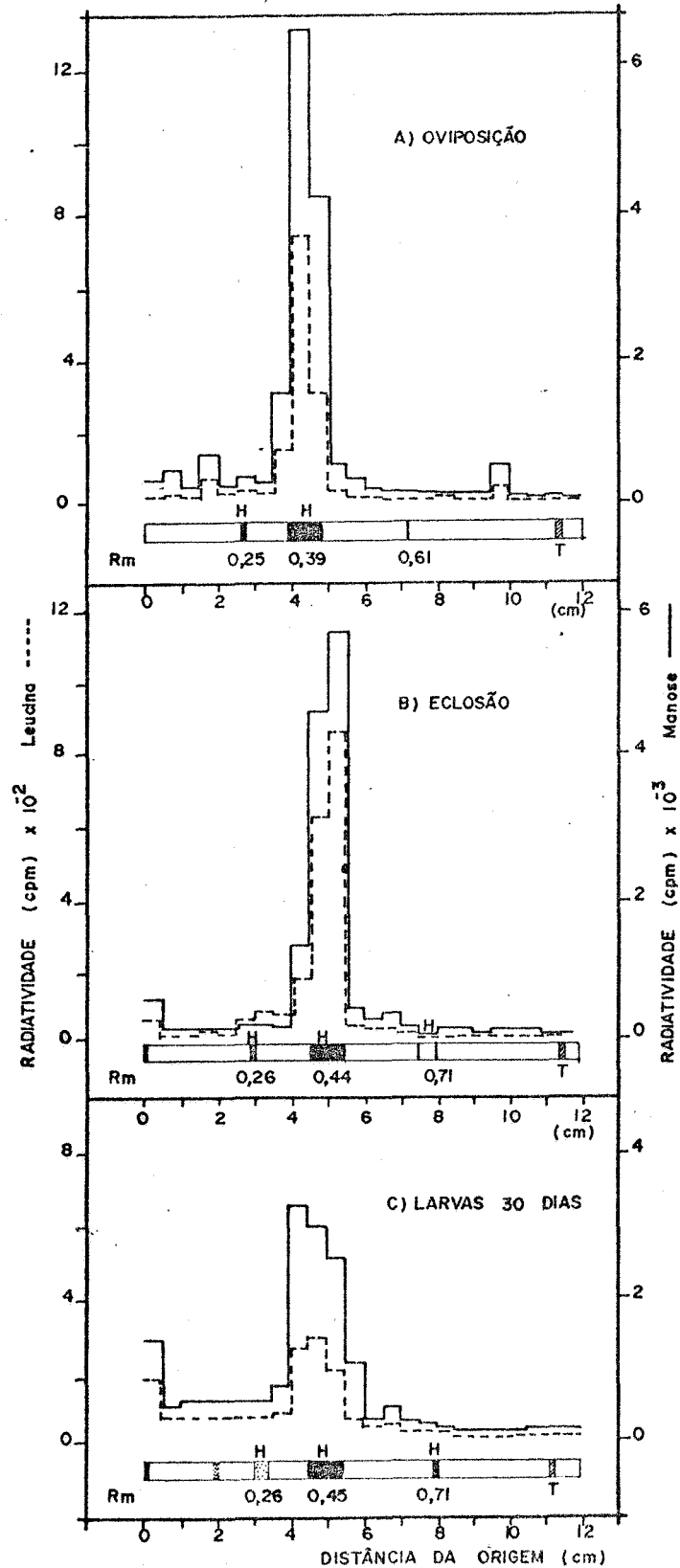


Fig. 11 - Distribuição da radioatividade em eletroforese em gel de poli(acrilamida) de proteínas marcadas, utilizando-se [<sup>3</sup>H] Manose e [<sup>14</sup>C] Leucina como precursores.

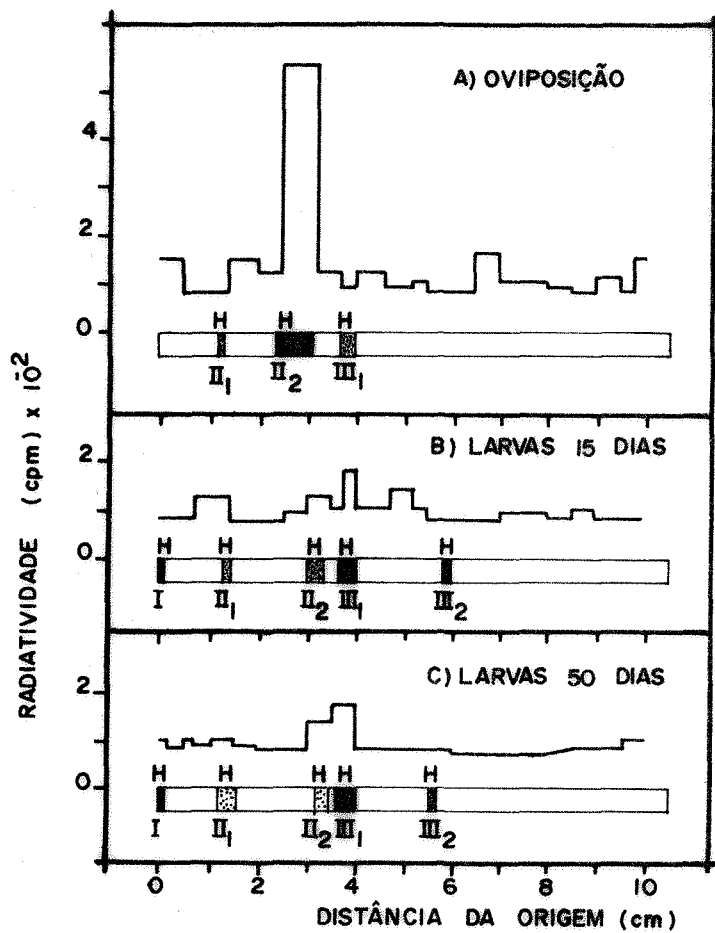


Fig. 12 - Distribuição da radioatividade em eletroforese em gel de poliácridamida de proteínas solúveis marcadas, utilizando-se  $[^3\text{H}]$  Glicose como precursor.  
H. Hemeproteína

Tabela VI - Distribuição (%) da radioatividade aplicada no gel entre as bandas proteicas obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida das frações solúveis de ovos e larvas em diferentes idades (Fig. 11 e 12) (\*)

		Rm	0,0	0,25	0,39	0,45	0,71
		BANDA	I	II <sub>1</sub>	II <sub>2</sub>	III <sub>1</sub>	III <sub>2</sub>
M A N O S E	Ovo	-	0,6	19,7	-	-	-
	Larva (30 dias)	3,8	1,5	-	26,2	0,5	-
L E U C I N A	Ovo	-	0,5	13,9	-	-	-
	Larva (30 dias)	2,2	0,9	-	9,9	0,3	-
G L I C O S E	Ovo	7,2	1,0	5,6	1,0	-	-
	Larva (15 dias)	2,7	2,7	3,8	4,9	2,2	-

(\*) Radioatividade aplicada no gel = 100%

$$\frac{\text{Radioatividade da banda}}{\text{Radioatividade aplicada no gel}} \times 100 = \% \text{ de cada banda}$$

As hemeproteínas II<sub>1</sub> e III<sub>2</sub> apresentam baixa incorporação de [<sup>3</sup>H] Manose e [<sup>14</sup>C] Leucina.

A comparação da distribuição porcentual da radioatividade de entre as bandas hemeproteicas I, II<sub>2</sub> e III<sub>1</sub> é apresentada na tabela VII.

Tabela VII - Comparação da distribuição (%) da radioatividade de entre as bandas hemeproteicas I, II<sub>2</sub> e III<sub>1</sub> separadas por eletroforese das frações solúveis de ovos e larvas (\*).

		Rm	0,0	0,39	0,45
		BANDA	I	II <sub>2</sub>	III <sub>1</sub>
M A N O S E	Ovo		-	100	-
	Larva (30 dias)		12,7	-	87,3
L E U C I N A	Ovo		-	100	-
	Larva (30 dias)		18,2	-	81,8
G L I C O S E	Ovo		18,1	60,2	10,8
	Larva (15 dias)		23,8	33,3	42,9
(*)		Radioatividade da banda			
		Somatório das radioatividades das bandas I, II <sub>2</sub> e III <sub>1</sub> x 100			

5.3 - Eletroforese em condições dissociantes dos componentes dos picos hemeproteicos radioativos separados pela coluna de Agarose 1,5

Os resultados da eletroforese em gel de poliacrilamida em condições dissociantes dos picos hemeproteicos separados pela coluna de Agarose 1,5 são apresentados na figura 13. O pico II foi isolado da fração solúvel de ovos homogeneizados no dia de postura. Os picos I e III foram isolados da fração solúvel de larvas de 30 dias.

O tratamento com agentes dissociantes determinou o aparecimento de pelo menos 16 bandas proteicas no pico II, 15 no pico III e 11 no pico I; sendo que 7 delas são comuns aos 3 picos analisados.

A radioatividade de  $[^3\text{H}]$  Manose está distribuída entre as subunidades constituintes das proteínas existentes em cada pico estudado. As subunidades que apresentam maior radioatividade mostram crescente mobilidade eletroforética ao longo do desenvolvimento embrionário e larval. (Rm está assinalado na figura 13). A radioatividade proveniente de  $[^{14}\text{C}]$  Leucina foi demasiadamente baixa para se poder estudar a sua distribuição.

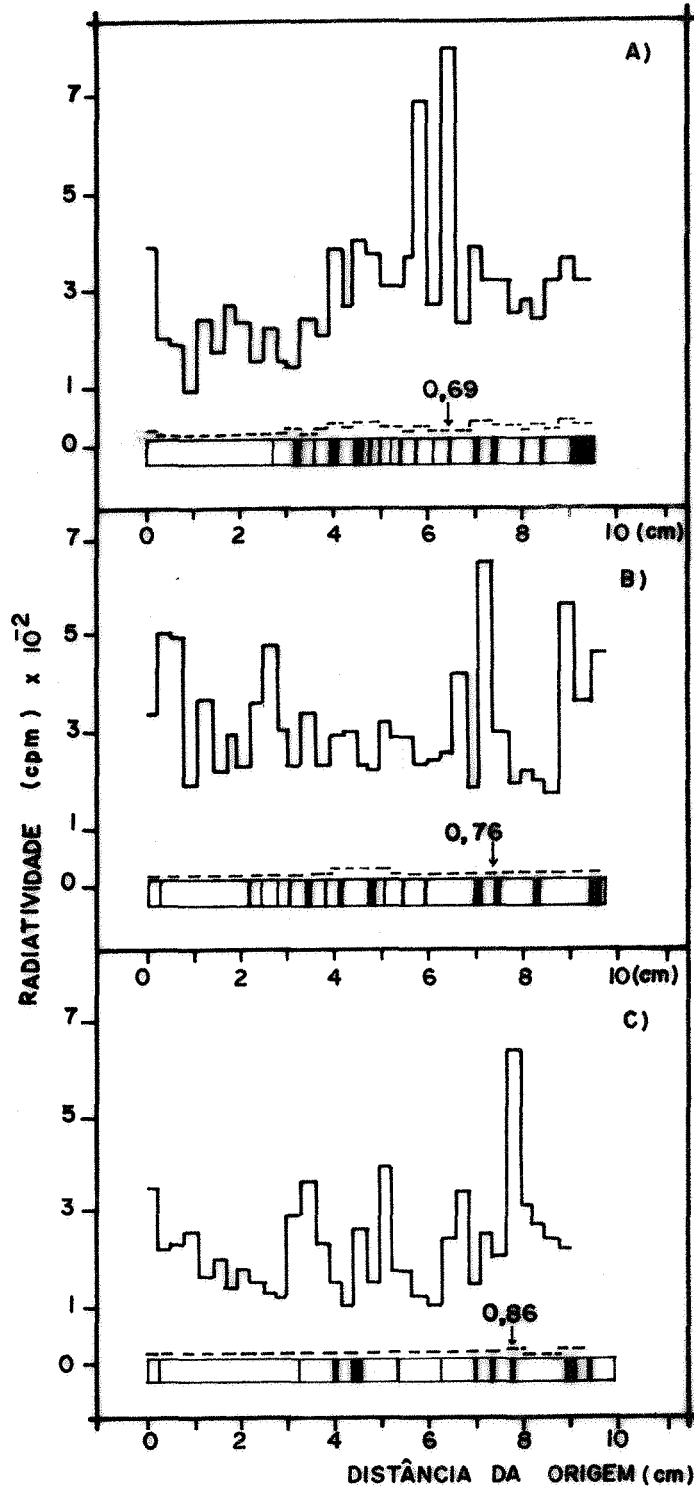


Fig. 13 - Distribuição da radioatividade em eletroforese em gel de poliácridamida em condições dissociantes dos componentes dos picos hemeproteicos isolados da coluna de Agarose 1,5.

Os números sob as bandas correspondem ao  $R_m$  (mobilidade relativa).

A) pico II

B) pico III

C) pico I

6 - INCORPORAÇÃO DE GLICÍDIOS RADIOATIVOS UTILIZANDO  
L-[<sup>14</sup>C (U)] AMINOÁCIDOS COMO PRECURSORES

O "pellet" proteico obtido de ovos marcados com [<sup>14</sup>C] Aminoácidos foi submetido a hidrólise ácida total. Os glicídios neutros foram separados em colunas sucessivas de troca iônica para a retenção de compostos dotados de carga elétrica. O eluato das duas colunas apresenta 6% da radioatividade do hidrolisado ácido total, indicando a presença de glicídios neutros nesta fração.

A cromatografia em papel destas oses revela um componente que migra na posição correspondente à manose (Fig. 14).



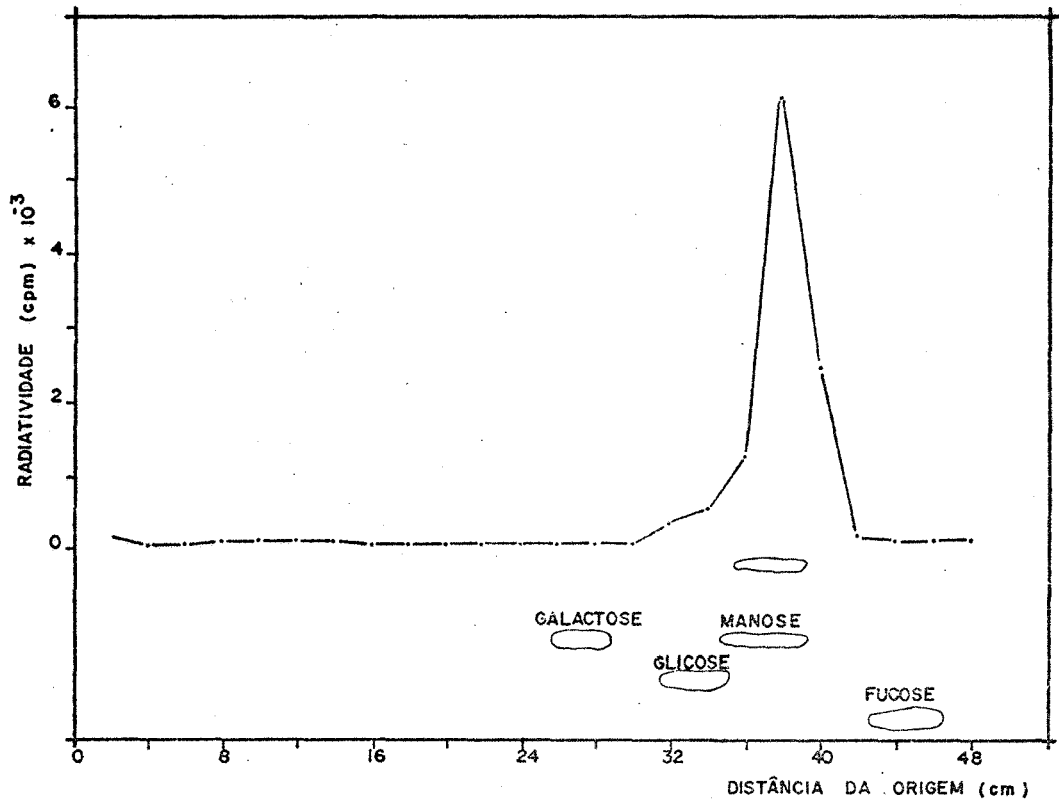


Fig. 14 - Cromatografia descendente em papel da fração neutra obtida do hidrolisado ácido total do "pellet" marcado, utilizando-se [<sup>14</sup>C] Aminoácidos como precursores.

Solvente: butanol:piridina:água (6:4:3)

#### IV - D I S C U S S Ã O

Após a injeção de  $[^3\text{H}]$  Manose,  $[^{14}\text{C}]$  Leucina e  $[^3\text{H}]$  Glicose numa fêmea no período de vitelogênese, cerca de 12%, 30% e 14% da radioatividade dos respectivos precursores injetados, aparece nos ovos postos pela fêmea (Tab. II). A maior incorporação de radioatividade ocorre nos componentes da fração solúvel (Fig. 1, 2, 3, 4), entre os quais se encontram as vitelinas, cujas concentrações em ovos de ácaros atingem 50 - 80% das proteínas presentes (DIEHL, 1970). A radioatividade da fração insolúvel é insignificante.

A inoculação de  $[^{14}\text{C}]$  Leucina e  $[^3\text{H}]$  Manose no segundo dia de postura proporciona uma maior incorporação de radioatividade na fração solúvel do homogenado correspondente ao dia de maior produção de ovos (Fig. 2).

O máximo de incorporação de radioatividade proveniente de  $[^3\text{H}]$  Glicose, aparece nos ovos postos no dia seguinte à inoculação (Fig. 3). Este resultado pode ser justificado pe-

la rápida metabolização desta ose na fêmea (TATCHELL e SCHUNTNER,1972).

A prolongada postura de ovos contendo baixa radioatividade, até 8 dias após o pulso dos precursores, pode ser decorrente da diluição das substâncias radioativas injetadas no aparelho digestivo da fêmea (Fig. 1, 2, 3).

A quantidade relativa das proteínas solúveis presentes nos ovos não varia de modo perceptível durante os primeiros dias que seguem a oviposição, havendo um decréscimo no final da embriogênese, o qual se estende até o início da fase larval (Fig. 5). BREMNER (1959) obteve resultados semelhantes, medindo a extinção em 530 nm, pelo que avaliou a concentração de hemeproteínas nos ovos e larvas do Boophilus microplus. BOCTOR e KAMEL (1977) não encontraram alterações na concentração de proteínas solúveis dos ovos do carrapato Dermacentor andersoni durante a embriogênese. Estes resultados são contrastantes aos descritos aqui, obtidos no Boophilus microplus. KAMEL e colaboradores (1982) sugeriram um balanço entre a degradação das proteínas de reserva e a síntese de novas proteínas, uma vez que encontraram uma invariabilidade no conteúdo proteico total dos ovos, com alterações acentuadas nas hemeproteínas durante o desenvolvimento embrionário do carrapato Hyalomma dromedarii.

O decréscimo da concentração de proteínas solúveis acompanhado pelo declínio de radioatividade ligada às proteínas

pode ser interpretado, como sendo devido ao consumo das vitelinas, que constituem a fonte de aminoácidos para o metabolismo do embrião em desenvolvimento.

A fração solúvel de ovos homogeneizados no dia da postura, contendo radioatividade originária de  $[^3\text{H}]$  Manose e  $[^{14}\text{C}]$  Leucina é separada em 5 picos radioativos principais (I, II, III, IV e V), quando analisada por uma coluna de Agarose 1,5 (Fig. 6). A maior parte da radioatividade aplicada aparece no pico V (Tab. III). Neste volume são eluídas substâncias de baixo peso molecular como peptídios, oses e aminoácidos livres. A ocorrência de grande quantidade de manose livre em ovos de carrapatos foi reportada por LEVENBOOK e colaboradores (1980). O resultado acima confirma esta informação, que reforça a idéia de que a manose seja captada pelo oócito em desenvolvimento, para desempenhar um papel importante no metabolismo do embrião. Os picos I, II e III são constituídos de heme-proteínas, como se verifica através da absorção em 410 nm. Estes 3 picos contem a maior parte das proteínas presentes na fração solúvel de ovos, assim como contem a maior parte de radioatividade ligada às proteínas. As heme-proteínas solúveis presentes em ovos de carrapatos constituem a reserva proteica para o desenvolvimento embrionário, e são denominadas de heme-vitelinas (BREMNER, 1959; TATCHELL, 1971; DIEHL, 1970; JENNI, 1971; BOCTOR e KAMEL, 1976). O pico IV de relativa baixa absorção em 410 nm, é constituído, entre outras proteínas, por catalase e peroxidase (BARRADAS e colaboradores, 1980).

Ao se analisar a fração solúvel de larvas contendo radioatividade originária de  $[^3\text{H}]$  Manose e  $[^{14}\text{C}]$  Leucina na coluna de Agarose 1,5 obtêm-se os mesmos 5 picos radioativos separados da fração solúvel de ovos (Comparar fig. 6 e 8). Também aqui no pico V aparece a maior parte da radioatividade aplicada na coluna (Tab. IV). Como ocorre na fração solúvel dos ovos, os picos hemeproteicos I, II e III contêm a maior parte da radioatividade ligada às proteínas. Quando se comparam os cromatogramas relativos a ovos no dia de postura e larvas de 30 dias, observa-se que a área correspondente ao pico II diminui, enquanto que as áreas correspondentes aos picos I e III aumentam. A tabela V mostra que o decréscimo de radioatividade no pico II é acompanhado por um correspondente acréscimo nos picos I e III. Estes valores indicam que os picos I e III podem ser derivados da transformação dos componentes presentes no pico II.

As mesmas conclusões podem ser deduzidas da observação dos resultados obtidos por cromatografia em Agarose 1,5 das frações solúveis contendo radioatividade proveniente de  $[^3\text{H}]$  Glicose (Fig. 7, 9 e Tab. V).

Com a tabela VI se deduz que a maior parte da radioatividade aplicada no gel de poliacrilamida, independente do precursor utilizado, não está ligada às bandas proteicas separadas por eletroforese, e sim é arrastada pela solução de descoramento do gel, associada portanto, a componentes de baixa massa molecular. Estes resultados se assemelham aos ob

tidos com a coluna de Agarose 1,5, onde a maior parte da radioatividade aplicada na coluna é eluída no volume correspondente ao volume de eluição de substâncias de baixo peso molecular.

A eletroforese em gel de poliacrilamida das frações solúveis de ovos e larvas em diferentes idades, contendo radioatividade proveniente de  $[^3\text{H}]$  Manose e  $[^{14}\text{C}]$  Leucina, apresenta uma banda proteica principal cuja Rm (mobilidade relativa) varia durante o desenvolvimento (Fig. 10b). Na fração solúvel de ovos homogeneizados no dia da postura, esta banda corresponde ao componente denominado  $\text{II}_2$  e na larva de 30 dias ao componente  $\text{III}_1$ . A variação gradual da mobilidade eletroforética dessa banda hemoproteica indica a transformação, durante a embriogênese, do componente  $\text{II}_2$ , presente no ovo recém posto, em  $\text{III}_1$ . Esta transformação é acompanhada pelo aparecimento do componente I, presente na larva.

A tabela VII e figura 11 mostram o decréscimo da radioatividade no componente  $\text{II}_2$ , e o correspondente aumento dos componentes I e  $\text{III}_1$ . Nos estados intermediários os componentes  $\text{II}_2$  e  $\text{III}_1$ , podem estar na mesma banda larga, pois suas propriedades eletrocinéticas são muito semelhantes.

Resultados similares são obtidos pela eletroforese em gel de poliacrilamida das frações solúveis de ovos e larvas contendo radioatividade proveniente de  $[^3\text{H}]$  de Glicose (Fig. 12 e Tab. VII). Na fração solúvel de ovos homogeneizados no

dia de postura são detectadas duas bandas hemepr<sup>o</sup>teicas principais, que correspondem aos componentes II<sub>2</sub> e III<sub>1</sub>. É possível verificar-se que a variação da radioatividade presente no componente II<sub>2</sub>, acompanha o decréscimo de sua concentração e o aumento da concentração e radioatividade do componente III<sub>1</sub>, durante a embriogênese e fase larval.

A eletroforese em condições dissociantes dos componentes das frações I, II e III separadas pela coluna de Agarose 1,5, mostra que a radioatividade originária de [<sup>3</sup>H] Manose e [<sup>14</sup>C] Leucina se distribui entre as subunidades dos componentes radioativos das frações I, II e III (Fig. 13). A presença de 7 subunidades comuns reforça a idéia de que existe um estreito relacionamento entre os componentes radioativos dessas frações, ou seja, I, II<sub>2</sub> e III<sub>1</sub>, respectivamente.

A diminuição da massa molecular das subunidades que possuem a maior radioatividade nos componentes radioativos de fração II, III e I pode ser justificada pela ação de enzimas proteolíticas sobre as hemevitelinas durante o desenvolvimento embrionário e larval.

A concentração relativa de 4 frações hemepr<sup>o</sup>teicas (I, II, III, IV) separadas de ovos da Hyalomma dromedarii através de coluna de DEAE-celulose, também varia durante a embriogênese. KAMEL e colaboradores (1982) sugeriram a conversão da fração II em III no 12º dia após a postura e a conversão da III em IV no 24º dia. Contudo estes autores não de

monstraram experimentalmente as suas interpretações.

A variação na concentração das bandas hemeproteicas  $II_2$ ,  $III_1$  e I nos experimentos de eletroforese explicam as alterações verificadas nos cromatogramas de Agarose 1,5. O componente  $II_2$  é o responsável pela radioatividade presente na fração II, a qual predomina no início da embriogênese. Na larva existem as frações III e I cujos componentes radioativos são respectivamente  $III_1$  e I, os quais derivam do componente  $II_2$  (Tab. VII). Os componentes  $II_2$  e  $III_1$  são comparáveis às lipo-glico-heme-vitelinas A e B isoladas dos ovos da Dermacentor andersoni, cujas propriedades eletroforéticas são semelhantes entre si (BOCTOR e KAMEL, 1976).

A tabela VIII mostra que a proporção entre as radioatividades originárias da  $[^{14}C]$  Leucina e  $[^3H]$  Manose (relação L/M) na hemeproteína  $II_2$  é maior que a da hemeproteína  $III_1$  e menor que na hemeproteína I. A variação desta relação pode estar intimamente relacionada com a transformação dos componentes  $II_2$  nos componentes  $III_1$  e I. Estes resultados devem ser encarados com ressalva, dada a incerteza de sua significância.



Tabela VIII - Relação Leucina/Manose das bandas hemeproteicas I, II<sub>2</sub>, III<sub>1</sub> obtidas por eletroforese das frações solúveis de ovos e larvas

	Rm	BANDA	LEUCINA (cpm)	MANOSE (cpm)	L/M
O					
V	0,39	II <sub>2</sub>	1200	12400	0,096
O					
L					
A	0,0	I	180	1450	0,124
R					
V	0,45	III <sub>1</sub>	810	9950	0,081
A					

Os componentes II<sub>1</sub> e III<sub>2</sub>, também visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida, apresentam baixa incorporação de material radioativo. Isto pode significar que estes componentes não sejam sintetizados no período da vitelogênese, que segue à inoculação dos precursores radioativos. O componente II<sub>1</sub> pode ser encarado como sendo a vitelina endógena do oócito, não derivada de precursores extra-ovarianos (DIEHL, 1970). O componente III<sub>2</sub> pode ser considerado como uma proteína sintetizada no período larval.

A detecção da [<sup>14</sup>C] Manose nas proteínas dos ovos pos-

tos por fêmeas injetadas com uma mistura de  $[^{14}\text{C}]$  Aminoácidos (Fig. 14) demonstra uma importante atividade gliconeogênica na fêmea ovipositora e confirma a Manose como o principal componente glicídico das hemevitelinas. Manose livre é o glicídio predominante também nos ovos recém eliminados pelas fêmeas do carrapato Dermacentor andersoni (LEVENBOOK e colaboradores, 1980).

## V - RESUMO E CONCLUSÕES

Durante a vitelogenese, a biossíntese proteica na fêmea de carrapato bovino Boophilus microplus está concentrada na síntese de precursores das vitelinas do ovo. A injeção de glicídios e aminoácidos radioativos no intestino da fêmea, neste período, permite a obtenção das vitelinas marcadas.

A vitelina principal do ovo, denominada  $II_2$ , é uma heme-glico-proteína constituída de diferentes subunidades, e que possui manose como componente glicídico principal. As propriedades eletrocinéticas desta heme-glico-vitelina variam durante o desenvolvimento, dando origem a um componente de mobilidade eletroforética maior, denominada  $III_1$ , e um componente de pequena mobilidade eletroforética, denominado I, cuja massa molecular é maior que a massa molecular do componente  $II_2$ . Estas alterações estão relacionadas com modificações na composição das suas subunidades constituintes.

## VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALPERIN, M.; IDOYAGA-VARGAS, V.; CARMINATTI, H. Detección termica de compuestos separados por cromatografía e electroforesis in papel. XVII Reunion Anual Sociedad Argentina de Investigacion Bioquimica. Mar del Plata, noviembre, 1981.
- BARRADAS, J. C. D.; PRICLADNITZKY, S.; TREIS, V. M.; ZANELLA, T.; MAIA, H. M. M.; DEWES, H. Atividades Peroxidásica e Catalásica na larva do carrapato bovino Boophilus microplus. XXII Semana Universitária Gaúcha de Debates Biológicos. Porto Alegre, novembro, 1980.
- BOCTOR, F. N. & KAMEL, M. Purification and characterization of two lipovitellins from eggs of the tick, Dermacentor andersoni. Insect Biochemistry, 6 : 233-240, 1976.
- BOCTOR, F. N. & KAMEL, M. Biochemical studies of tick embryo genesis. Free Amino Acid pools during embryogenesis of Dermacentor andersoni. Comparative Biochemistry and Physiology, 56 B : 169-173, 1977.

- BOWNES, M. & HAMES, D. Analysis of the yolk proteins in Drosophila melanogaster. Translation in a cell free system and peptide analysis. Febs Letters, 96 (2):327-330, 1978.
- BOWNES, M. Three genes for three yolk proteins in Drosophila melanogaster. Febs Letters, 100 (1): 95-98, 1979.
- BREMNER, K. C. Studies on "haemixodovin", the pigment in the eggs of the cattle tick Boophilus microplus. (Acarina:Ixodidae). Australian Journal of Biological Sciences, 12:263-273, 1959.
- CARSON, D. D. & LENARZ, W. J. Relationship of dolichol synthesis to glycoprotein synthesis during embryonic development. Journal of Biological Chemistry, 256 : 4679-4686 1981.
- CHEN, T. T.; STRAHLENDORF, P. W.; WYATT, G. Vitellin and Vitellogenin from Locusts (Locusta migratoria) Properties and post-translation modification in the fat body. Journal of Biological Chemistry, 253 : 5325-5331, 1978.
- CHERRY, L. M. The accumulation and utilization of food reserves by adult female cattle tick, Boophilus microplus (Caneistrini). Australian Journal of Zoology, 21 : 403-412, 1973.

- CHINO, H.; MAYA, Y.; TAKAHASHI, K. Isolation and characterization of insect vitellogenin. Its identity with hemolymph lipoprotein II. Biochemistry and Biophysic Acta, 441 (2): 349-353, 1976.
- CHINZEI, Y.; CHINO, H.; WYATT, G. Purification and properties of vitellogenin and vitellin from Locusta migratoria. Insect Biochemistry, 11 : 1-7, 1981.
- CHIPPENDALE, G. M. Carbohydrates in Reproduction and Embryonic Development. In: ROCKSTEIN, M., ed. Biochemistry of Insect. New York, Academic Press, Cap. 1, sec XI, p. 42-45, 1978.
- DAVEY, K. G. & HAUBNER, E. Canadian Journal of Zoology, 52 : 1407-1412, 1974. Apud: RIDDIFORD, L. M. & TRUMAN, J. W. Hormonal Control of Reproduction . In: ROCKSTEIN, M., ed. Biochemistry of Insect. New York, Academic Press, Cap. 7, sec VII, p. 341-347, 1978.
- DEJMAL, R. K. & BROOKES, V. Insect lipovitellin: Chemical and Physical characteristics of a yolk protein from the ovaries of Leucophaea maderae. Journal of Biological Chemistry, 247 (3): 869-874, 1972.
- DIEHL, P. A. Hämolympfenproteine und vitellogenese bei Ornithodoros moubata. Murray (Ixodoidea:Argasidae). Bull. Soc. ent. Suisse, 42 : 117-125, 1969.

DIEHL, P. A. Zur Oogenese bei Ornithodoros moubata Murray (Ixodoidea:Argasidae) unter besonderer Berücksichtigung der Vitellogenese. Acta Tropica, 27 (4): 301-355, 1970.

ENGELMANN, F. Female specific protein: biosynthesis controlled by corpus allatum in Leucophaea maderae. Science (Wash), 165 : 407-409, 1969.

ENGELMANN, F. Juvenile Hormone Controlled Synthesis of Female-Specific Protein in the cockroach Leucophaea maderae. Archives of Biochemistry and Biophysics, 145: 439-447, 1971.

ENGELMANN, F. & FRIEDEL, T. Insect yolk protein precursor, a Juvenile Hormone induced phosphoprotein. Life Science, 144 : 587-594, 1974.

ENGELMANN, F. Endocrine control of vitellogenin synthesis. In: LOCKE, M. & SMITH, D. S., eds. Insect Biology in the Future. London, Academic Press, p. 311-324, 1980.

GARCIA, R. C.; RECONDO, E.; DANKERT, M. Polysaccharide biosynthesis in Acetobacter xylinum. Enzymatic synthesis of lipid diphosphate and monophosphate sugars. Europe Journal of Biochemistry, 43 : 93-105, 1974.

- GARCIA, M. L. M.; MELLO, R. P.; GARCIA, E. S. Ecdysone, juvenile hormone and oogenesis in Rhodnius prolixus. Journal of Insect Physiology, 25 : 695-700, 1979.
- GELLISSEN, G.; WAJC, E.; COHEN, E.; EMMERICH, H.; APPLEBAUM, W. S.; FLOSSDORF, J. Purification and Properties of oocyte vitellin from Migratoria locust. Journal of Comparative Physiology. B, 108 : 287-301, 1976.
- GONZALES, J. C. O controle do carrapato dos bovinos. Porto Alegre, Ed. Sulina, 1975.
- GUMA, F. T. C. R. & DEWES, H. Efeito do Hormônio Juvenil no desenvolvimento ovariano no carrapato bovino Boophilus microplus. (Em preparação).
- HANDLER, A. M. & POSTLETHWAIT, J. H. Regulation of vitellogenin synthesis in Drosophila by ecdysterone and Juvenile hormone. The Journal of Experimental Zoology, 26 (2): 247-254, 1978.
- HEDRICK, J. L. & SMITH, A. Size and Charge Isomer Separation and Estimation of Molecular weights of Proteins by Disc Gel Electrophoresis. Archives of Biochemistry and Biophysics, 126 : 155-164, 1968.



- HOLLINGER, M. A. & HWANG, F. Effect of Glucose on the synthesis of testicular proteins separated by disc electrophoresis. Biochemica et Biophysica Acta, 281 : 652-657, 1972
- JEANES, A.; WISE, C. S.; DIMLER, R. J. Analytical Chemistry, 23 : 415, 1951. Apud: PIRAS, R. & CABIB, E. Microscale Identification of Several Sugars Phosphates by Paper chromatography and electrophoresis. Analytical Chemistry, 35 (6): 755-760, 1963.
- JENNI, L. Synthesis and uptake of proteins during vitellogenesis in ovocytes of Ornithodoros moubata, Murray (Ixodoidea:Argasidae). Acta Tropica, 28 (2): 105-163, 1971.
- KAMEL, M. Y.; SHALABY, F. Y.; GHAZY, A. E. M. Biochemical studies of tick embryogenesis DNA, RNA, Haemoprotein, Guanosine and Guanine in developing eggs of Hyalomma dromedarii. Insect Biochemistry, 12 : 15-23, 1982.
- KUNKEL, J. G. & PAN, M. L. Selectivity of yolk protein uptake: Comparison of vitellogenins of two insects. Journal of Insect Physiology, 22 : 809-818, 1976.
- KUNKEL, J. G.; ETHIER, D. B.; NORDIN, J. H. Carbohydrate structure and immunochemical properties of Blattella vittellin. Federations Proceedings, 37 : 943, 1978.

- KUNKEL, J. G.; SHEPARD, G. L.; MCCARTHY, R. A.; ETHIER, D. B.; NORDIN, J. H. Concanavalin A Reactivity and Carbohydrate structure of Blattella germanica vitellin. Insect Biochemistry, 10 : 703-714, 1980.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature, 227 : 680-685, 1970.
- LEVENBOOK, L.; BOCTOR, F. N.; FALES, H. M. Biochemical studies of tick embryogenesis. Free sugars in adult haemolymph and during embryogenesis of Dermacentor andersoni. Journal of Insect Physiology, 26 : 381-383, 1980.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193 : 265-275, 1951.
- MAIA, H. M. M.; TREIS, V. M.; NICOLA, M. H.; DEWES, H. Isolamento e caracterização das Heme proteínas do ovo e larva do carrapato bovino Boophilus microplus. (Em preparação).
- MCDANIEL, R. & OLIVER, J. H. Jr. Effects of two juvenile hormone analogs and  $\beta$ -ecdysone on nymphal development, spermatogenesis and embryogenesis in Dermacentor variabilis (Say) (Acari: Ixodidae) Journal of Parasitology, 64 (3): 571-573, 1978.

- MUNDALL, E. C. & LAW, J. H. Physical and chemical characterization of vitellogenin from the hemolymph and eggs of the tobacco hornworm Manduca sexta. Comparative Biochemistry and Physiology, 63 B : 459-468, 1979.
- O'HAGAN, J. E. Boophilus microplus: Digestion of Hemoglobins by the Engorged Female tick. Experimental Parasitology, 35 : 110-118, 1974.
- PAN, M. L.; BELL, W. J.; TELFER, W.H. Vitellogenic Blood Protein synthesis by Insect Fat Body. Science (Wash) 165 : 393-394, 1969.
- POUND, J. M. & OLIVER, J. H. Jr. Juvenile hormone: Evidence of its role in the reproduction of ticks. Science, 206 : 355-357, 1979.
- ROTH, T. F. & PORTER, K. R. Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito Aedes Aegypti L. The Journal of Cell Biology, 20 : 313-332, 1964.
- SPIELMAN, A.; GWANDZ, R. W.; ANDERSON, W. A. Ecdysone initiated ovarian development in mosquitoes. Journal of Insect Physiology, 17 : 1807-1814, 1971.
- SPIRO, R. G. Analysis of Sugars found in Glycoproteins. Methods in Enzymology, 8 : 3-25, 1966.

- TATCHELL, R. J. Eletrophoretic studies on the proteins of the haemolymph, saliva, and eggs of the cattle tick Boophilus microplus. Insect Biochemistry, 1 : 47-55, 1971.
- TATCHELL, R. J.; SCHUNTNER C. A. Glucose metabolism in the cattle tick Boophilus microplus. Journal of Insect Physiology, 18 : 283-288, 1972.
- TELFER, W. H. Immunological studies of insect metamorphosis-II The role of a sex-limited female protein in egg formation by the cecropia silkworm. Journal of General Physiology, 37 : 539-558, 1954.
- TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P.; HARRISON, J. S. Detection of Sugars on paper chromatograms. Nature, 166 : 444-445, 1950.
- WIGGLESWORTH, V. B. The function of the corpus allatum in the growth and reproduction of Rhodnius prolixus (Hemiptera) Quart. J. Micr. Scic. 79 : 91-121, 1936. Apud: ENGELMANN, F. Endocrine control of vitellogenin synthesis. In: LOCKE, M. & SMITH, A. S., eds. Insect biology in the Future. London, Academic Press, p. 311-324, 1980.
- WIGGLESWORTH, V. B. The fate of haemoglobin in Rhodnius prolixus (Hemiptera) and other blood sucking arthropods. Proc. R. Soc. London, 131 : 313-339, 1943.

WILEY, H. S. & WALLACE, J. A. The esturcture of vitellogenins in Xenopus laevis give rise use to multiple form of the yolk protein. Journal of Biological Chemistry, 256 : 8626-8634, 1981.

WYATT, G. R. & PAN, M. L. Insect Plasma Proteins. Annual Review of Biochemistry, 47 : 779-817, 1978.

WYATT, G. R. Vitellogenins In: LOCKE, M. & SMITH, A. S. eds. Insect biology in the future. London, Academic Press, 1980. p. 207-214.

YAMAZAKI, K. Yolk protein from eggs of Locusta migratoria and glycopeptides from the protein. Insect Biochemistry, 4 : 411-422, 1974.