

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Biociências

Departamento de Bioquímica

ANÁLISE DOS GLICOLIPÍDIOS E GLICOPROTEÍNAS  
SINTETIZADOS NO OVÁRIO DO CARRAPATO BOVINO  
Boophilus microplus INJETADOS COM MANOSE  
OU GLICOSE RADIOATIVAS

OSÉ CLÁUDIO DEL PINO

T  
D363 a

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso  
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bio-  
química, para obtenção do Título de Mestre

Orientadora:

ELENA AIDA BERNARD

Porto Alegre

1984

UFRRS  
BIBLIOTECA SETORIAL DE  
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS

À Tere, à Alessandra e ao Rodrigo  
pelas longas horas que me esperaram em vão,  
acreditando sempre num melhor amanhã.

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

À Professora Elena Aida Bernard, por sua dedicação, orientação e amizade, que muito contribuíram para minha formação científica e profissional.

Aos colegas de Turma um abraço amigo.

Aos colegas e professores do Curso de Pós-Graduação e do Departamento de Bioquímica pela colaboração.

Ao Professor J.C. Gonzales e sua equipe da Faculdade de Veterinária pelo fornecimento das teleógenas.

Ao Professor Hélio Mauro Moreira Maia, pelo auxílio na resolução de problemas técnicos no laboratório.

Ao Professor Marcos Luis Santos Perry pelo acompanhamento, sugestões e correções deste trabalho.

Ao PICD/CAPES e à FAPERGS pelas bolsas concedidas e à PROPESP, CNPq, FINEP pelo suporte financeiro à pesquisa.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas -  
Bioquímica e ao Departamento de Bioquímica que permitiram a re  
alização deste trabalho.

À Edila Butori Rivera pela revisão técnica e a Ro-  
sa Maria Mariante pela datilografia deste trabalho.

S U M Á R I O

I - INTRODUÇÃO.....	1
II - MATERIAL E MÉTODOS.....	10
1. Material.....	10
2. Métodos.....	12
2.1. Curva de Incorporação de glicídios radioati - vos por ovário total.....	12
2.2. Obtenção de glicolipídios e glicoproteínas...	12
2.3. Cromatografias.....	14
2.3.1. Cromatografia descendente em papel....	14
2.3.2. Cromatografia em camada delgada.....	14
2.4. Coluna Cromatográfica de DEAE-celulose.....	14
2.5. Cromatografia de gel-filtração em coluna de P-4.....	16
2.6. Cromatografia de Afinidade em Concanavalina A Sephrose.....	16
2.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS..	16
2.8. Hidrólises Ácidas.....	17
2.8.1. Hidrólise Ácida Total do pellet protei co.....	17
2.8.2. Hidrólise Ácida Suave dos compostos li pídicos.....	18

II

2.9. Hidrólises alcalinas.....	19
2.9.1. Hidrólise alcalina dos compostos lipídicos.....	19
2.9.2. Hidrólise alcalina redutora do pellet proteico.....	19
2.9.2.1. Suave.....	19
2.9.2.2. Forte.....	20
2.10. Tratamento com Glicose oxidase.....	20
2.11. Tratamento com Amiloglicosidase.....	21
2.12. Determinação de Proteínas.....	21
2.13. Determinação da Radioatividade.....	21
2.14. Revelação dos glicídios.....	22
2.15. Revelação dos lipídios.....	23
III - RESULTADOS.....	24
1. Incorporação de $[2-^3H]$ manose ao precipitado de TCA proveniente do ovário do carrapato em função do tempo após a injeção.....	24
2. Incorporação de $[2-^3H]$ manose e $[1-^3H]$ glicose a glicolipídios e glicoproteínas.....	26
3. Análise dos compostos lipofílicos.....	28
3.1. Análise dos compostos lipofílicos solúveis em clorofórmio-metanol (2:1).....	28
3.1.1. Cromatografia descendente em papel..	29
3.1.2. Coluna de DEAE-celulose, acetato em metanol 99%.....	29
3.1.3. Análise dos compostos de característica aniônica.....	35
3.1.4. Análise dos compostos de característica não-aniônica.....	35
4. Análise dos compostos lipofílicos solúveis em clorofórmio-metanol-água (1:1:0.3).....	39

5. Análise do Pellet Proteico.....	39
5.1. Hidrólise ácida total.....	39
5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS..	45
5.3. Hidrólises alcalinas redutoras.....	47
IV - DISCUSSÃO.....	54
V - RESUMO E CONCLUSÕES.....	63
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

## I - INTRODUÇÃO

O carrapato bovino Boophilus microplus é um ácaro que parasita preferencialmente os bovinos e secundariamente outras espécies como os ovinos, eqüinos, caninos e até mesmo o próprio homem (GONZALES, 1975).

O carrapato é um ectoparasita hematófago, isto é, se alimenta do sangue do hospedeiro, causando desgastes ao bovino, que muitas vezes são irrecuperáveis. O animal parasitado sofre perda de peso, diminui seu crescimento, produz menos leite, e fica suscetível a outras doenças. Além disso, o carrapato se fixa ao hospedeiro por meio de um órgão duro e quitinoso, o hipostômio, que produz lesões no local, trazendo danificação ao tecido de revestimento (GONZALES, 1975).

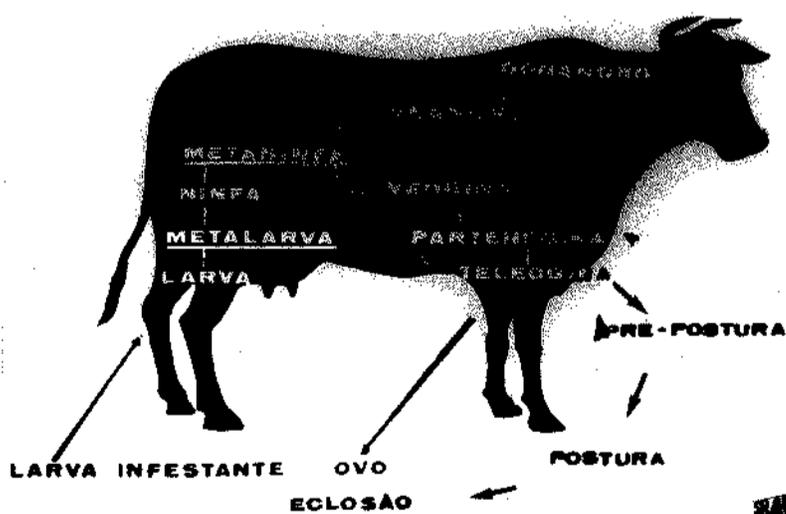
O carrapato Boophilus microplus tem duas fases no seu ciclo de vida. A fase de vida livre, que se realiza no solo, e a fase de vida parasitária, que se realiza no corpo do animal hospedeiro (GONZALES, 1975).

Entre a queda da teleógena no solo e o início da postura, decorre um período denominado pré-postura. Após este período inicia-se o período de postura ou oviposição. Cada fêmea tem capacidade de pôr 3.000 a 4.000 ovos. Após a postura a

fêmea morre (NUÑEZ e colaboradores, 1982).

Num período de 6 a 7 dias após o final da postura, os ovos eclodem produzindo uma pequena larva chamada neolarva, que dentro de 4 a 6 dias já tem condições de parasitar o hospedeiro e por isso é chamada larva infestante. Esta larva, retira alimento do corpo do hospedeiro, aumenta de tamanho, recebendo a denominação de metalarva, e libera do seu interior um novo indivíduo, a ninfa. Esta sofre transformações semelhantes a larva infestante e produz a metaninfa, que desenvolve no seu interior um novo indivíduo sexuado, neandro (macho) ou neôgina (fêmea). Os neandros se queratinizam, adquirindo mobilidade e vão ao encontro das fêmeas (GONZALES, 1975).

As fêmeas fecundadas fixam-se na pele do animal hospedeiro e iniciam o repasto sangüíneo. Ingurgitam-se parcialmente (partenôgena) ou completamente (teleôgena) de sangue e caem ao solo por gravidade, para a postura dos ovos. Este ciclo se completa num intervalo mínimo de 21 dias e máximo de 45 dias (NUÑEZ e colaboradores, 1982).



O CICLO DE VIDA DO CARRAPATO *BOOPHILUS microplus*

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

Na oogênese dos ácaros, a fase de rápido crescimento do oócito, com sua completa maturação, corresponde à vitelogênese (DIEHL, 1970; WYATT e PAN, 1978; ENGELMANN, 1980).

Neste período o oócito tem um crescimento acelerado, acumulando glicídios, lipídios e proteínas de reserva, cuja função será suprir as necessidades metabólicas do embrião em desenvolvimento (CHIPPENDALE, 1978).

Durante a vitelogênese 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 biosintética nesta etapa da oogênese (WYATT, 1980). Entre as moléculas sintetizadas destacam-se as vitelogeninas que são os precursores das vitelinas, as quais constituirão a reserva proteica do ovo em desenvolvimento (PAN e colaboradores, 1969).

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).

As vitelogeninas e as vitelinas dos insetos foram estudadas mais exaustivamente, sendo 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 se conhece que o oligossacarídeo que contém manose está ligado a um resíduo de asparagina (YAMAZAKY, 1974). Na parte lipídica desta glico-lipo-proteína foram encontrados fosfolipídios e diacil-gliceróis em maior quantidade (CHINO e colaboradores, 1976; MUNDALL e LAW, 1979; CHINZEI e colaboradores, 1981).

Nos ácaros a análise dos glicídios livres em ovos, embrião e na hemolinfa do carrapato adulto Dermacentor andersoni, mostrou que a glicose é o glicídio mais abundante na hemolinfa, enquanto que a manose é o principal glicídio livre nos ovos (LEVENBOOK e colaboradores, 1980). Estes glicídios são provavelmente interconvertíveis no carrapato e em outras espécies (DAGLEY e NICHOLSON, 1970). As variações na concentração de manose, glicose e inositol durante a embriogênese sugere a sua interconversão ou a sua liberação de polissacarídeos ou glicoproteínas (LEVENBOOK e colaboradores, 1980).

KAMEL e colaboradores (1983) examinaram as mudanças ocorridas na quantidade de glicogênio, glicídios neutros, lipídios e fosfolipídios durante a embriogênese do Hyalomma dro-

medarii. Análise cromatográfica dos glicídios neutros revela a presença de glicose, manose, frutose, ribose, desoxiribose e inositol. Glicose é o principal glicídio durante a embriogênese. Observaram variações na quantidade dos glicídios neutros sugerindo interconversão entre eles e sua utilização para biossíntese de glicogênio. Os níveis deste polissacarídeo são muito baixos nos ovos recém-postos, aumentando rapidamente após o 12º dia.

O metabolismo dos lipídios também sofre modificação durante a embriogênese, pois verifica-se que os níveis de lipídios e fosfolipídios são altos nos ovos recém postos. Os lipídios totais diminuem significativamente nos seis primeiros dias de embriogênese, enquanto que os fosfolipídios permanecem constantes neste período do desenvolvimento. Estes começam a decrescer a partir do 9º dia.

TATCHELL e SCHUNTNER (1972) estudaram as contribuições do catabolismo da glicose em diferentes estágios do ciclo de vida do carrapato do gado, Boophilus microplus. Verificaram que no estágio de vida livre larval, o ciclo das pentoses contribui em 20% no catabolismo da glicose, e que no estágio de pré-oviposição este nível atinge mais de 50%, retornando ao final do estágio de oviposição a 20%. Estas mudanças são atribuídas as necessidades de produção de energia e aos processos de biossíntese, dependentes do catabolismo da glicose.

Com o mesmo objetivo de elucidar a porção lipídica das lipo-glico-proteínas presentes no carrapato, são utilizados uma série de procedimentos experimentais que serão citados a seguir.

Ácidos graxos em lipídios totais e ácidos graxos livres presentes na hemolinfa das fêmeas do carrapato Hyalomma dromedarii na fase ninfa engorgitada e em oviposição, foram analisadas por cromatografia gás-líquido. A análise qualitativa revelou a presença de vinte ácidos graxos de cadeia longa, com cadeia carbonada entre oito e vinte e quatro carbonos. Ácido palmítico, esteárico, oleico e linoleico constituem 80 a 90% dos ácidos graxos totais (HAJJAR, 1972).

Na hemolinfa, víceras e em outros fluidos de Hyalomma dromedarii e H.(H.) anatolicum excavatum, na fase ninfa e adulta, foi encontrado várias classes de lipídios, como fosfolipídios, colesterol, triglicerídeos, ésteres de esteróides, ácidos graxos livres, junto com pequenas quantidades de mono e diglicerídeos (HAJJAR, 1972).

KAMAL e KAMEL (1977) determinaram variações na quantidade de lipídios totais e fosfolipídios totais durante a oogênese e embriogênese de Argas(Persicargas) arboreus e Derma centor andersoni. Durante a pré-oviposição diminui a quantidade de lipídios totais na hemolinfa do D. andersoni e aumenta na família do A.(P.) arboreus. Lipídios totais e fosfolipídios em ovos, varia com a idade. Lipídios totais atingem a maior concentração no sexto dia de embriogênese. Os fosfolipídios totais varia de 33,19 a 79,05% dos lipídios totais, em ovos de D. andersoni. A mais alta concentração de fosfolipídios totais em ovos de A.(P.) arboreus representa 69,4% dos lipídios totais.

Do mesmo modo que descrevemos a caracterização dos componentes glicídicos e lipídicos das glico-lipo-proteínas presentes no carrapato, passaremos agora a caracterizar a porção proteica.

Cromatografia gás-líquido de aminoácidos livres em fluidos da fêmea de Argas (Persicargas) arboreus, mostrou que ácido glutâmico predomina na hemolinfa (46,3%) e fenilalamina no fluido coxal (60,5%). Ácido glutâmico e valina estão em percentagem elevada no fluido visceral (BOCTOR, 1972).

Durante a embriogênese do carrapato Dermacentor andersoni ocorre variações na concentração de diferentes aminoácidos. A concentração de aminoácidos totais diminui durante a embriogênese. Não há variação na proteína total. Aumenta significativamente a atividade da transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), enquanto que a atividade da transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) permanece constante durante a embriogênese (BOCTOR e KAMEL, 1977).

A concentração de alanina, um produto metabólico da reação da TGO, diminui provavelmente devido a conversão a ácido pirúvico. A utilização deste ácido para a formação de Acetil-CoA é indicado pela alta atividade da piruvato desidrogenase (BASSAL, 1973).

Eletroforese em gel de poliacrilamida numa amostra de sangue total do carrapato bovino Boophilus microplus evidencia a presença de cinco bandas de proteínas carregadas negativamente. Estas bandas foram caracterizadas como glicoproteínas, hemoproteínas, esterases, fosfatases e aminopeptidases (TATCHELL, 1971). Durante a vitelogênese aumenta o nível de proteína total e a quantidade relativa de duas bandas de hemoproteínas da hemolinfa (TATCHELL, 1971).

A descoberta de um lipídio intermediário no processo de glicosilação de proteínas e polissacarídeos em bactéri

as, estimulou estudos similares em células eucarióticas que permitiram a elucidação do mecanismo de síntese de algumas glicoproteínas (PARODI e LELOIR, 1979).

Este lipídio intermediário é o imediato doador da porção glicídica para a proteína nascente no retículo endoplasmático, não somente em mamíferos (PARODI e colaboradores, 1972), mas também em levedura (PARODI, 1979ab), insetos (QUESADA-ALLUE e BELOCOPITOW, 1978; BUTTERS e HUGHES, 1980) e plantas (BRETT e LELOIR, 1977, PONT LEZICA e colaboradores, 1978).

Em função do exposto observa-se que existem poucas referências a estudos realizados em ácaros. Por isso achamos importante realizar um trabalho de investigação em ovários de carrapatos, a fim de caracterizar os compostos de natureza lipofílica e glicoproteica.

Com o objetivo de separar e caracterizar os componentes glicolipídicos e glicoproteicos constituintes do ovário do carrapato bovino Boophilus microplus, procuramos obter estes compostos marcados.

Esta marcação é feita introduzindo glicídios radioativos na estrutura destes compostos presentes no ovário durante seu desenvolvimento.

Os glicídios radioativos são inoculados diretamente na teleógena e após um período de tempo, o ovário é retirado e os seus constituintes glicolipídicos e glicoproteicos são separados e caracterizados.

Para atingir estes objetivos utilizamos como

precursores  $[2-^3\text{H}]$  manose e  $[1-^3\text{H}]$  glicose.

## II - MATERIAL E MÉTODOS

### 1 - MATERIAL

- 1.1 - Glicose Oxidase (Sera-Pak)
- 1.2 - Silica Gel G (Seg.Stahl-Merck)
- 1.3 - DEAE - Celulose (Serva, type SS p.A)
- 1.4 - DOWEX 50W X4(H+) 200-400 mesh (Baker Analyzed Reagent)
- 1.5 - DOWEX 1-X8 (Cl<sup>-</sup>) 40-50 mesh (Baker Analyzed Reagent)
- 1.6 - Acrilamida, Temed, N,N' -metileno-bis-acrilamida, "Amido-black" (Sigma Chemical Company)
- 1.7 - D - [2-<sup>3</sup>H (N)] manose: Atividade específica:  
342 mCi/mmol (New England Nuclear)
- 1.8 - D - [1-<sup>3</sup>H (N)] glicose: Atividade específica:  
15 mCi/mmol (New England Nuclear)

1.9 - Sódio - dodecilsulfato (Sigma Chemical Company)

1.10- Amiloglicosidase (amilo - $\alpha$ -1,6- $\alpha$ -1,4- glicosida -  
se): 14U/mg (Boehringer)

1.11- Aquasol -2 (New England Nuclear)

1.12- Sephadex G-15-120 (Sigma Chemical Company)

1.13- Concanavalina- A Sephadex (Pharmacia Fine Chemicals)

1.14- P-4 (Bio-Rad Laboratory)

1.15- POPOP, PPO (New England Nuclear)

Todos os demais reagentes e solventes foram de pu  
reza "pró-análise" (p.A).

## 2 - MÉTODOS

### 2.1 - Curva de Incorporação de glicídios radioativos por ovário total

Injetou-se com o auxílio de uma micro-seringa Hamilton 10  $\mu$ l de  $[2-^3\text{H}]$  manose contendo 10  $\mu$ Ci do glicídio radioativo diretamente no intestino de teleógenas recém-caídas do hospedeiro e a seguir, em diferentes intervalos de tempo, retirou-se os ovários e homogeneizou-se em ácido tricloroacético a 10% (GARCIA e colaboradores, 1974).

### 2.2 - Obtenção de glicolipídios e glicoproteínas

Injetou-se conforme descrito no parágrafo anterior 10  $\mu$ l de  $[2-^3\text{H}]$  manose ou  $[1-^3\text{H}]$  glicose contendo 15  $\mu$  Ci do glicídio radioativo. Retirou-se os ovários no intervalo de tempo de máxima incorporação e homogeneizou-se em clorofórmio-metanol (2:1) ou em tampão TRIS-HCl 0,1M pH 8.1. Após o material foi submetido a partição de Folch. Seguiu-se o esquema representado na figura (1).

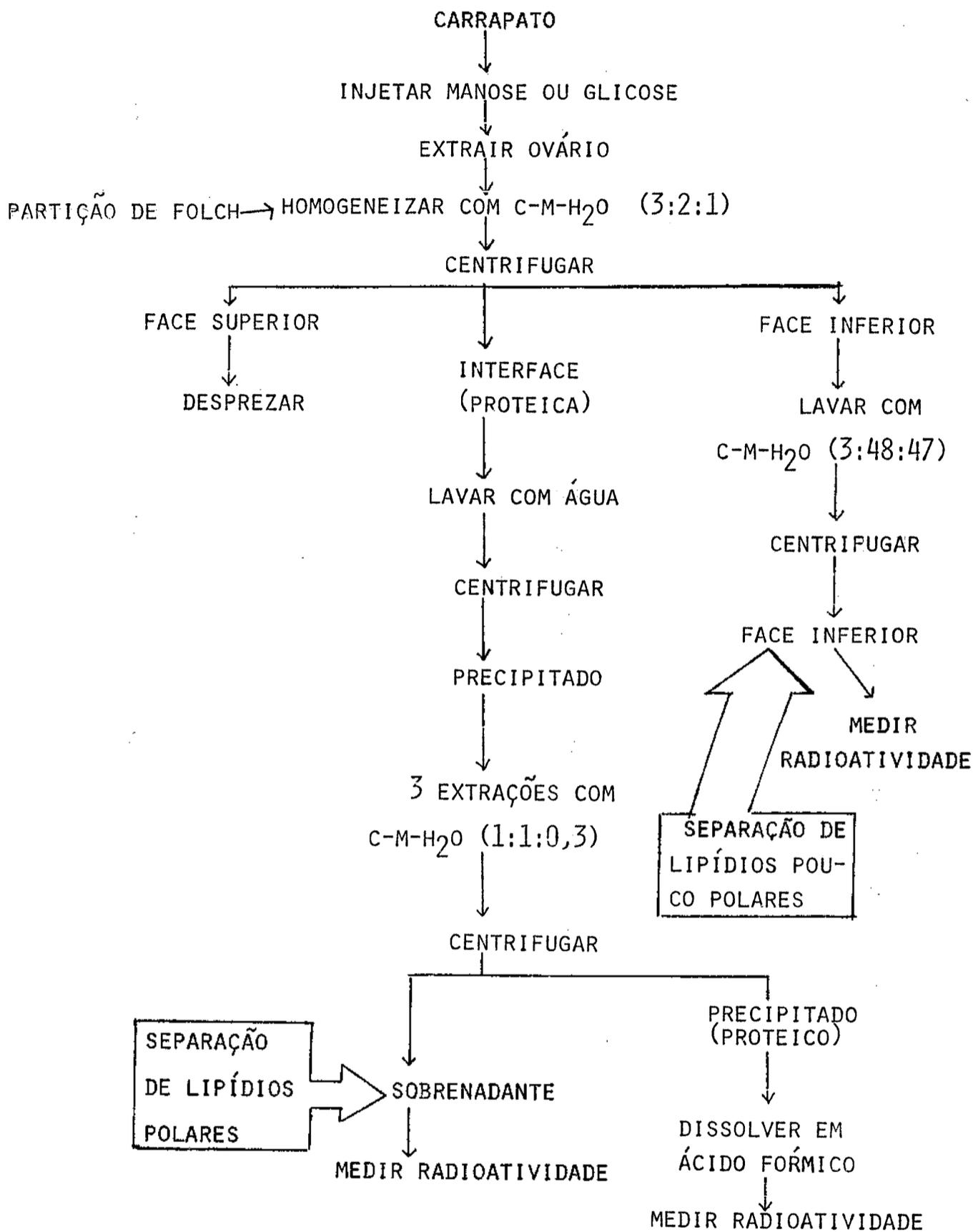


FIG. 1 - PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE INTERMEDIÁRIOS ENVOLVIDOS NA BIOSÍNTESE DE GLICOPROTEÍNAS.

C: CLOROFÓRMIO

M: METANOL

## 2.3 - Cromatografias

### 2.3.1 - Cromatografia descendente em papel.

Foram feitas em papel Whatmann nº 1 nos seguintes eluentes:

Solvente A:  $\eta$ -butanol:piridina:água (6:4:3)

Solvente B:  $\eta$ -butanol:piridina:água (4:3:4)

Solvente C:  $\eta$ -butanol: etanol:água (10:1:2)

### 2.3.2 - Cromatografia em camada delgada.

Utilizou-se placas de alumínio, com sílica gel G (tipo 60), 0,20mm de espessura, sem indicador de fluorescência, com os seguintes sistemas de solvente:

Solvente D: hexano:éter etílico:ácido acético (80:20:1)

Solvente E: butanol: água (90:10)

Solvente F: acetato de etila: piridina:amônia: água (10:5:3:3)-Utilizou-se a fase superior.

## 2.4 - Coluna Cromatográfica de DEAE - celulose.

Preparação de DEAE - celulose - acetato:

Lavava-se a resina de DEAE - celulose várias vezes com água destilada, a fim de retirar impurezas e partículas pequenas. Tratava-se com HCl 1N, e decantava-se por uma hora. Passado este tempo lavava-se com água destilada até que o papel indicador determinasse pH neutro, e reação negativa para cloratos, com nitrato de prata. Tratava-se a resina com NaOH 1N, du

rante uma hora. Lavava-se com água destilada até pH neutro. Retirava-se a água com álcool etílico e depois acetona e levava-se para um dessecador a vácuo por 24 horas. Ressuspendia-se em ácido acético glacial, para a obtenção da forma acetato, e finalmente lavava-se com metanol 99% (DANKERT e colaboradores, 1966).

A coluna DEAE - celulose - acetato foi preparada em coluna de vidro de 22x1.5cm. As amostras aplicadas na coluna de DEAE - celulose - acetato em metanol 99%, foram eluídas utilizando-se os seguintes sistemas de solventes:

Sistema I: a amostra era eluída com 50 ml de clorofórmio-metanol (7:3), 50 ml de metanol 99% e 100 ml de acetato de amônio em metanol 99%, em concentrações de 0.02 M e 0.2M.

Sistema II: a amostra era eluída com 75 ml de clorofórmio-metanol (2:1) e 120ml do gradiente contínuo entre 0 e 0.4M de acetato de amônio em clorofórmio-metanol (2:1).

Sistema III: a amostra era eluída com 25 ml de clorofórmio-metanol (2:1), 25 ml de clorofórmio-metanol-água (1:1:0.3) e 40 ml de formiato de amônio em clorofórmio-metanol-água (1:1:0.3), nas concentrações de 5 mM, 10 mM e 100 mM.

## 2.5 - Cromatografia de gel-filtração em coluna de P-4

A coluna P-4 foi preparada em coluna de vidro de 100 x 1.5 cm. As amostras aplicadas na coluna foram eluídas utilizando tampão acetato de sódio 0.1M pH 6.

A coluna foi previamente calibrada com "Blue dextran" e  $\text{CoCl}_2$  para indicar o volume de exclusão e inclusão, respectivamente.

## 2.6 - Cromatografia de Afinidade em Concanavalina A Sepharose

A coluna de concanavalina A Sepharose foi preparada em coluna de vidro 10 x 1 cm. As amostras aplicadas na coluna foram eluídas inicialmente com tampão acetato de sódio 0.1 M pH 6,0, contendo  $\text{NaCl}$  1.0M,  $\text{MgCl}_2$  0.001M,  $\text{CaCl}_2$  0.001M, e após com  $\alpha$ -metil-glicosídeo em tampão acetato de sódio 0,1M, nas concentrações 5, 20, 200 mM (GOLDSTEIN e colaboradores, 1965).

## 2.7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS

A amostra aplicada foi dissolvida em tampão tris HCl 1M pH 8.8 contendo sódio-dodecilsulfato (SDS) 0.1%. Na cuba de eletroforese colocou-se tampão tris HCl 0.25M - glicina 1.92M contendo SDS 0.1%. Os géis foram preparados com: 18,75 ml de tampão tris HCl 1M pH 8.8, 13.35 ml de acrilamida 30% com bisacrilamida 0.8%, 1,5 ml de persulfato de amônio

15 mg/ml, 1.0 ml de TMED 5%, 0.5 ml de SDS 10g%, 14,90 ml de água (HEDRICK e SMITH, 1968).

Cada amostra foi submetida a 1 mA e 1.5 V durante o tempo de penetração no gel. Após a amperagem passou para 4mA e a voltagem para 6V por amostra.

As proteínas submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS foram coradas utilizando-se o corante amido black 0.5g%.

## 2.8 - Hidrólises Ácidas

### 2.8.1 - Hidrólise Ácida Total do pellet proteico.

O pellet proteico foi submetido a hidrólise em presença de ácido trifluor-acético 2N em ampola fechada com atmosfera inerte, a 120 °C durante 1 hora (GOLD e HAHN, 1976).

O material hidrolisado passava-se em DOWEX 50W-X4 (H+) 200-400 mesh e DOWEX - 1 x 8 (H-COO<sup>-</sup>) 40 a 50 mesh. O material eluído das colunas era constituído de compostos neutros.

Os compostos que ligaram na coluna contendo DOWEX 50W - X4 (H+) 200-400 mesh eram eluídos com ácido clorídrico 2N, sendo constituídos de compostos carregados (SPIRO, 1966).

Os compostos neutros eram analisados em

cromatografia descendente em papel, nos sistemas de solvente A e C, respectivamente.

Os compostos carregados eram analisados em cromatografia de camada delgada nos sistema de solvente F.

#### 2.8.2 - Hidrólise ácida suave dos compostos lipídicos.

Os compostos carregados solúveis em cloro - fôrmio-metanol (2:1) foram submetidos a hidrólise na presença de ácido clorídrico 0.1N em propanol 50%, a 50 °C durante 30 minutos (SPEAKE e WHITE, 1978).

O material hidrolisado era evaporado e res-suspendido em clorofôrmio-metanol-água (3:2:1). Após centrifugação, separava-se a fração superior e lavava-se a fração inferior com clorofôrmio-metanol-água (3:48:47) e novamente centrifugava-se. Separava-se a fração inferior, e a fração superior era adicionada à fração superior anterior. Lavava-se esta fração com clorofôrmio-metanol-água (86:14:1) e centrifugava-se. Separava-se a fração inferior e adicionava-se a fração inferior anterior.

A fração superior, fração aquosa, era aplicada em cromatografia descendente em papel, no sistema de solvente A.

## 2.9 - Hidrólises alcalinas

### 2.9.1 - Hidrólise alcalina dos compostos lipídicos.

Os compostos neutros solúveis em clorofórmio-metanol (2:1) foram submetidos a hidrólise na presença de hidróxido de sódio 0.5M em etanol 90%, a 25°C durante 15 minutos (WHITE e WAECHTER, 1975).

O material hidrolisado era resfriado e neutralizado com ácido acético glacial. O material era evaporado e ressuspendido em clorofórmio-metanol (1:1), para ser aplicado em cromatografia de camada delgada em sílica gel, nos sistemas de solvente D e E, respectivamente.

### 2.9.2 - Hidrólise alcalina redutora do pellet proteico.

#### 2.9.2.1 - Suave

O pellet proteico foi submetido a hidrólise em presença de hidróxido de sódio 0.1 N e borohidreto de sódio 0.1 M, a 45°C durante 24 horas (GOLD e HAHN, 1978).

O material hidrolisado era resfriado e neutralizado com ácido acético glacial. Acrescentava-se ácido tricloro-acético até se obter concentração final entre 5 e 10%. Após centrifugação o precipitado era dissolvido em ácido fórmico e contado no líquido de cintilação. O sobrenada

dante era lavado três vezes com éter sulfúrico saturado com água. Após evaporação era contado no líquido de cintilação.

#### 2.9,2,2 - Forte

O pellet proteico foi submetido a hidrólise em presença de hidróxido de sódio 2 N e borohidreto de sódio 1 M em ampola fechada com atmosfera inerte, a 100°C durante 6 horas (GOLD e HAHN, 1976).

O material hidrolisado era resfriado e neutralizado com ácido acético glacial. Acrescentava-se ácido tricloro-acético até se obter concentração final entre 5 e 10%. Após centrifugação o precipitado era dissolvido em ácido fórmico e contado no líquido de cintilação. O sobrenadante era lavado três vezes com éter sulfúrico saturado com água. Após evaporação era contado no líquido de cintilação.

#### 2.10 - Tratamento com Glicose oxidase.

Após a hidrólise total do pellet proteico uma fração contendo glicose radioativa foi tratada com a enzima Glicose oxidase. A oxidação foi realizada em banho-maria a 37°C durante uma hora. O material hidrolisado foi submetido a cromatografia descendente em papel, no solvente A.

### 2.11 - Tratamento com Amiloglicosidase

Pellets proteicos provenientes de ovários de carapatos injetados com manose radioativa, foram submetidos a hidrólise alcalina forte, e após foram aplicados em cromatografia de gel filtração em P-4.

O material eluído da coluna foi dividido em duas alíquotas, e uma delas foi submetida a tratamento com amiloglicosidase.

A amostra foi dissolvida em tampão acetato de sódio 0.2 M pH 4.8. Utilizou-se 0.7 U de amiloglicosidase (14U/mg ou 1,25 U/ml) e incubou-se a 37°C durante uma hora. A enzima foi inativada em banho-maria fervente a 100°C por 2 minutos.

Após o tratamento enzimático o material foi submetido a cromatografia descendente em papel, no Solvente B.

### 2.12 - Determinação de Proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry e colaboradores (1951), usando soro albumina bovina como padrão.

### 2.13 - Determinação da Radioatividade

As determinações quantitativas da radioatividade foram medidas no aparelho Beckman LS - 100 - Liquid Scintilla-

tion System.

As cromatografias em papel foram cortadas em segmentos de 2 cm de comprimento, e contadas no líquido de cintilação.

As cromatografias de camada delgada foram cortadas de cm/cm e após contadas no líquido de cintilação.

Aliquotas das frações eluídas das colunas de DEAE-celulose, P-4 e Concanavalina A Sepharose foram evaporadas e contadas no líquido de cintilação.

Os géis de poliacrilamida foram cortados em segmentos de 0.5 cm de comprimento e colocados em vial com 0.5 ml de peróxido de hidrogênio a 30%. Em seguida eram submetidos a uma temperatura de 55°C em banho-maria, por 12 horas. Após a dissolução os géis eram contados no líquido de cintilação (HOLLINGER e colaboradores, 1972).

As amostras que foram evaporadas eram contadas no líquido de cintilação que apresenta a seguinte composição: POP - 50 mg; PPO - 4g; tolueno - 1 litro. As amostras contidas em solução aquosa eram contadas no líquido de cintilação Agua-sol-2.

#### 2.14 = Revelação dos glicídios

Os padrões de glicídios e poliálcoois usados nas cromatografias em papel foram revelados com o reagente nitrato

de prata (TREVELYAN e colaboradores, 1950)

O processo de revelação consiste nas seguintes etapas:

1ª Etapa - Imersão do papel em nitrato de prata saturada 1:200 em acetona, seguido de secagem a temperatura ambiente.

2ª Etapa - Imersão do papel em solução metanólica de NaOH 0.5 M.

3ª Etapa - Imersão do papel em tiosulfato de sódio a 2,5%.

4ª Etapa - Lavagem do papel em água destilada, seguida de secagem.

#### 2.15 - Revelação de lipídios

Sistema I; a placa foi colocada numa cuba de vidro saturada com iodo sublimado.

Sistema II: a placa foi burrifada com uma solução contendo dicromato de potássio em ácido sulfúrico a 40%. Após a placa era colocada numa estufa a 150°C.

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

#### 1. INCORPORAÇÃO DE $[2-^3\text{H}]$ MANOSE AO OVÁRIO DO CARRAPATO EM FUNÇÃO DO TEMPO APÓS A INJEÇÃO.

Após a injeção de manose radioativa no intestino do carrapato, os ovários foram retirados em diferentes intervalos de tempo, e mediu-se a incorporação de manose radioativa no precipitado obtido pela adição de ácido tricloro-acético. Este precipitado contém compostos lipídicos e proteicos.

A curva de tempo mostra que o tempo de máxima incorporação de manose radioativa ocorre seis horas após a injeção. Nos tempos seguintes a incorporação se mantém constante (FIGURA 2).

CURVA DE TEMPO DA INCORPORAÇÃO DE  
[2-<sup>3</sup>H] MANOSE NO OVÁRIO DO CARRAPATO

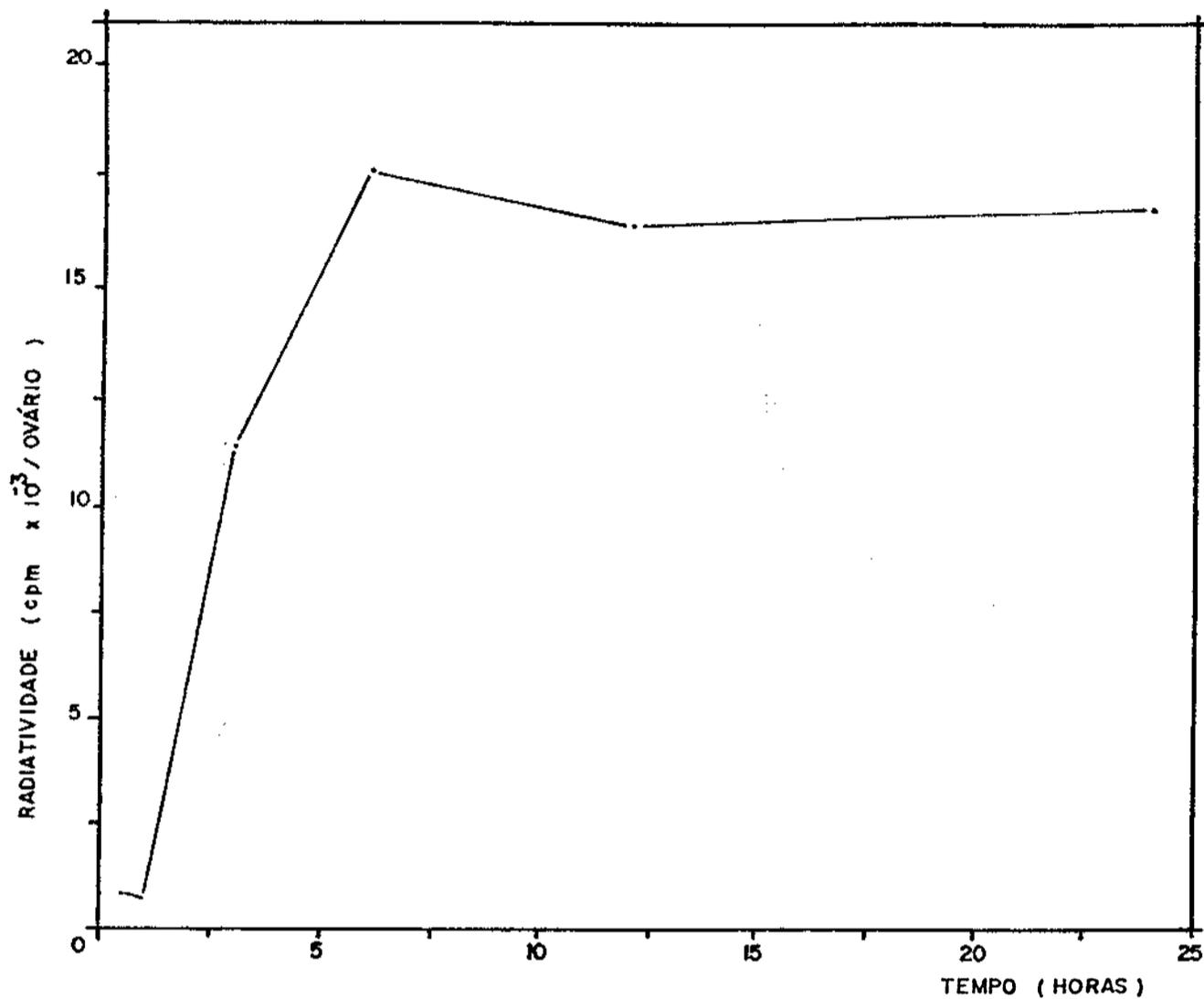


FIG. 2 - AS FÊMEAS CAÍDAS DO BOI DURANTE A NOITE FORAM RECOLHIDAS PELA MANHÃ E INJETADAS COM 10  $\mu$ CI DE [2-<sup>3</sup>H] MANOSE. NOS TEMPOS INDICADOS APÓS A INJEÇÃO FORAM EXTRAÍDOS OS OVÁRIOS E HOMOGENEIZADOS COM TCA 5%.  
NÚMERO DE EXPERIMENTOS EM CADA PONTO: 03

2. INCORPORAÇÃO DE  $[2-^3\text{H}]$  MANOSE E  $[1-^3\text{H}]$  GLICOSE  
A GLICOLIPÍDIOS E GLICOPROTEÍNAS.

Levando em conta os resultados expressos na figura (2), injetamos  $[2-^3\text{H}]$  manose ou  $[1-^3\text{H}]$  glicose em teleóge nas recém-caídas do hospedeiro e após oito horas separamos os compostos lipofílicos e glicoproteicos, conforme técnica descrita em material e métodos. Observa-se a incorporação de oses radioativas aos compostos lipossolúveis e glicoproteicos, como se pode observar na tabela I.

Verifica-se maior incorporação de manose radioativa a compostos solúveis em clorofórmio - metanol - água (1:1:0.3) e ao pellet proteico. Há maior incorporação de glicose radioativa aos compostos solúveis em clorofórmio - metanol (2:1) e pellet proteico.

INCORPORAÇÃO DE HEXOSES EM DIFERENTES  
FRAÇÕES DO OVÁRIO DO CARRAPATO

FRAÇÃO	RADIOATIVIDADE TOTAL/OVÁRIO (CPM)	
	[1- <sup>3</sup> H] GLICOSE	[2- <sup>3</sup> H] MANOSE
C - M (2:1)	3 9 1 1	8 2 6
C - M - H <sub>2</sub> O (10:10:3)	6 4 3	2 3 4 9
PELLET	6 1 7 6	4 1 5 0 9

TABELA I - AS FÊMEAS FORAM RECOLHIDAS DUAS HORAS APÓS A QUEDA E INJETADAS COM 10  $\mu$ CI DE [2-<sup>3</sup>H] - MANOSE OU 10  $\mu$ CI DE [1-<sup>3</sup>H] GLICOSE, OITO HORAS APÓS A INJEÇÃO FORAM EXTRAÍDOS OS OVÁRIOS E PROCESSADOS COMO INDICADO EM MATERIAL E MÉTODOS, MEDIU-SE A RADIOATIVIDADE EM TODAS AS FRAÇÕES OBTIDAS.

### 3. ANÁLISE DOS COMPOSTOS LIPOFÍLICOS.

Para realizar este estudo injetamos glicídios radioativos num grupo de quarenta teleógenas recém-caídas do hospedeiro. Dividimos os animais em dois grupos contendo vinte teleógenas cada um. Um grupo recebeu 10  $\mu$ Ci de  $[2-^3\text{H}]$  manose e o outro mesma quantidade de  $[1-^3\text{H}]$  glicose, conforme foi descrito em material e métodos.

Os ovários foram retirados das teleógenas e submetidos a partição de Folch. Separou-se as frações contendo os compostos lipossolúveis e o pellet proteico.

#### 3.1 - ANÁLISE DOS COMPOSTOS LIPOFÍLICOS SOLÚVEIS EM CLORO - FÓRMIO-METANOL (2:1)

Os experimentos realizados tem o objetivo de caracterizar os compostos lipossolúveis presentes nesta fração.

### 3.1.1 - Cromatografia descendente em papel

O material solúvel em clorofórmio - metanol (2:1) extraído dos ovários de carrapatos injetados com  $[2-^3\text{H}]$  manose ou  $[1-^3\text{H}]$  glicose, foi aplicado em cromatografia descendente em papel, no solvente B. Observa-se na figura (3 e 4) que os compostos radioativos se deslocam num só pico próximo da frente de corrida evidenciando que este composto move-se como uma substância lipofílica. Isto se verifica para os compostos marcados com manose radioativa ou glicose radioativa.

### 3.1.2 - Coluna de DEAE - celulose, acetato em metanol 99%

Esta coluna foi utilizada com a finalidade de determinar a natureza dos compostos lipofílicos. Pretende-se indicar se estes compostos são carregados negativamente, ou seja, se apresentam natureza aniônica.

A natureza aniônica pode indicar a presença de poliprenóis-fosfato ou poliprenóis-pirofosfato, que estão envolvidos nos processos de biossíntese de glicoproteínas. Estes compostos formam intermediários do tipo poliprenol-fosfato - açúcar ou poliprenol - pirofosfato - açúcar.

Amostras provenientes de ovários de carrapatos injetados com  $[1-^3\text{H}]$  glicose foram aplicadas simultaneamente em duas colunas de vidro contendo a resina DEA -celulose e eluídas nos sistemas de solvente I e II. Verifica-se que a

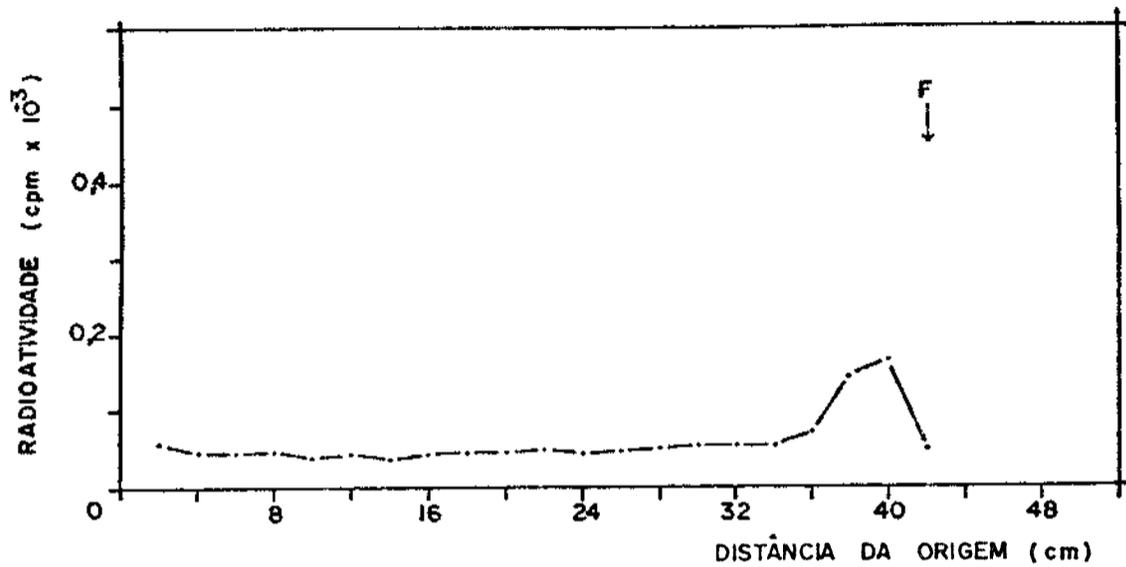


FIG. 3 - CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL DOS COMPOSTOS LIPOSSOLÚVEIS EM CLOROFÓRMIO-METANOL (2:1), EXTRAÍDOS DE OVÁRIOS DE CARRAPATOS INJETADOS COM  $[1-^3\text{H}]$  GLICOSE.

ELUENTE: n-BUTANOL - PIRIDINA - ÁGUA (4:3:4)

F: FRENTE DE CORRIDA

UFPA  
BIBLIOTECA SETORIAL DE  
INSTITUTO DE BIOLÓGICAS

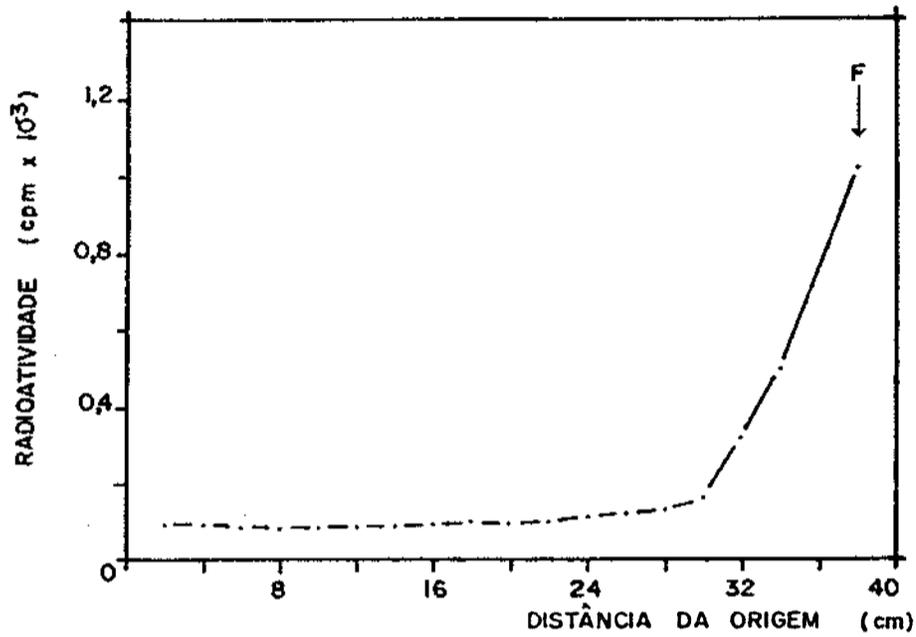


FIG. 4 - CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL DOS COMPOSTOS LIPOSSOLÚVEIS EM CLOROFÓRMIO-METANOL (2:1), EXTRAÍDOS DE OVÁRIOS DE CARRAPATOS INJETADOS COM  $[2-^3\text{H}]$  MANOSE.

ELUENTE: n-BUTANOL - PIRIDINA - ÁGUA (4:3:4)

F: FRENTE DE CORRIDA

amostra é eluída, quase na sua totalidade, em clorofórmio-metanol (7:3) ou (2:1) respectivamente, evidenciando a presença de um composto cuja estrutura não apresenta radicais aniônicos (FIGURA 5).

Este composto recromatografado no sistema de solvente III, se comportou novamente como um composto de característica não-aniônica.

Os compostos aniônicos que foram eluídos com acetato de amônio 0.2M sofreram hidrólise ácida suave conforme descrito em material e métodos. Obteve-se 70% de hidrólise. O material hidrolisado foi submetido diretamente a cromatografia descendente em papel no solvente A, sem a prévia separação de compostos lipídicos, identificando-se, entre outros compostos, um composto que se desloca como manose (FIGURA 6).

A amostra proveniente de ovários de carrapatos injetados com  $[2-^3\text{H}]$  manose foi aplicada numa coluna de vidro contendo a resina DEAE - celulose e eluída no sistema de solvente II. Verificou-se que uma fração da amostra foi eluída em clorofórmio - metanol (2:1), comportando-se como um composto de características não aniônicas. A outra fração foi eluída em acetato de amônio 0,4M, comportando-se como um composto aniônico (FIGURA 7).

Este composto não-iônico recromatografado no sistema de solvente III, se comportou novamente da mesma maneira.

CROMATOGRAFIA EM DEAE - CELULOSE DO  
LIPÍDIO-GLICOSE SOLÚVEL EM CLOROFÓRMIO - METANOL (2:1)

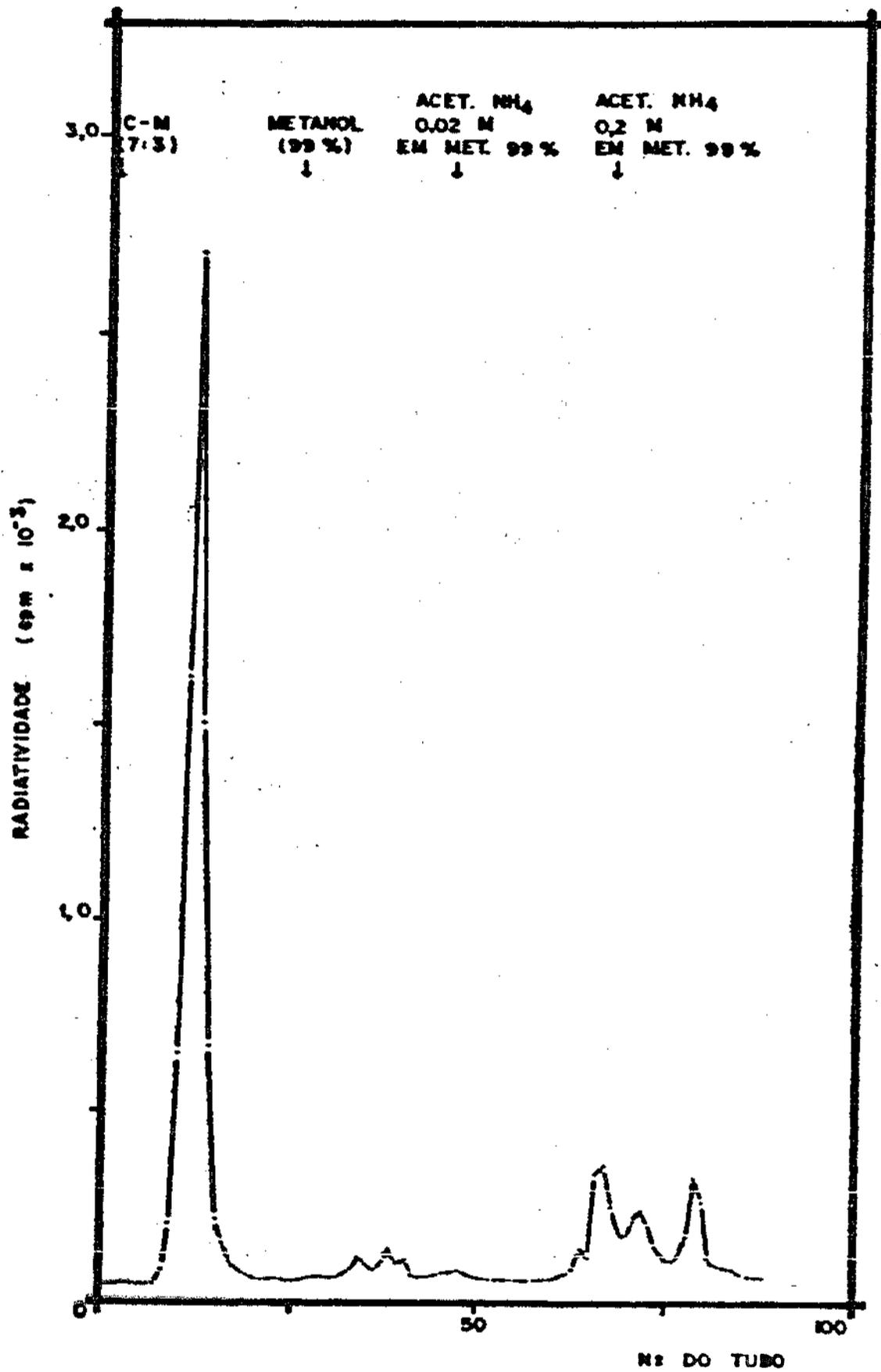


FIG. 5 - A COLUNA FOI ELUÍDA COM CLOROFÓRMIO-METANOL (7:3), METANOL 99% E SOLUÇÕES DE ACETATO DE AMÔNIO 0.02M E 0.2M EM METANOL 99%.

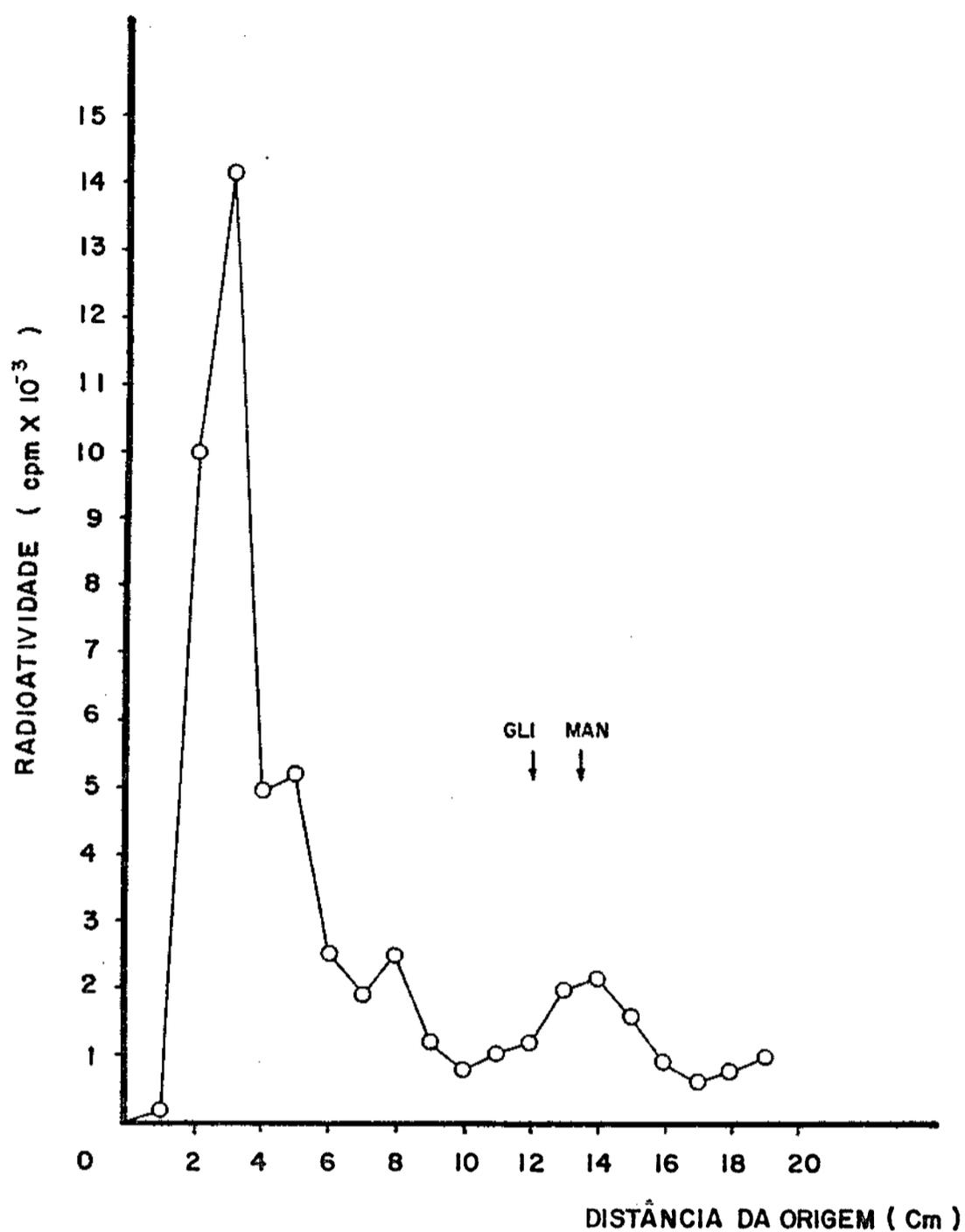


FIG. 6 - CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL DOS COMPOSTOS ANIÔNICOS SOLÚVEIS EM CLOROFÓRMIO - METANOL (2:1) OBTIDOS DA HIDRÓLISE ÁCIDA SUAVE, PROVENIENTE DE OVÁRIOS DE CARRAPATOS INJETADOS COM  $[1-^3\text{H}]$  GLICOSE.

ELUENTE: n-BUTANOL - PIRIDINA - ÁGUA (6:4:3)

GLI - GLICOSE

MAN - MANOSE

### 3.1.3 - Análise dos compostos de característica aniônica

Os compostos carregados negativamente, marcaram com  $[2-^3\text{H}]$  manose, que foram eluídos com acetato de amônio, após estarem livres de acetato de amônio, foram submetidos a hidrólise ácida suave com HCl 0.1M em propanol 50% a  $50^\circ\text{C}$  por 30 minutos, conforme foi descrito em material e métodos. Obteve-se 30% de hidrólise.

A fração hidrolisada, solúvel em água foi aplicada em cromatografia descendente em papel, no solvente A. Identificou-se um composto que se desloca como manose.

### 3.1.4 - Análise dos compostos de característica não aniônica

Os compostos lipofílicos que não ligaram na coluna, marcados com  $[2-^3\text{H}]$  manose ou  $[1-^3\text{H}]$  glicose foram submetidos a hidrólise alcalina suave com NaOH 0.5M em etanol 90% a  $25^\circ\text{C}$  por 15 minutos de acordo com material e métodos. Nestas condições ocorre a hidrólise de triglicerídios.

O material hidrolisado, solúvel em clorofórmio - metanol (1:1), foi aplicado em cromatografia de camada delgada, no sistema de solvente D e E conforme material e métodos.

CROMATOGRAFIA EM DEAE - CELULOSE DO  
LIPIDÍO-MANOSE SOLÚVEL EM CLOROFÓRMIO-METANOL (2:1)

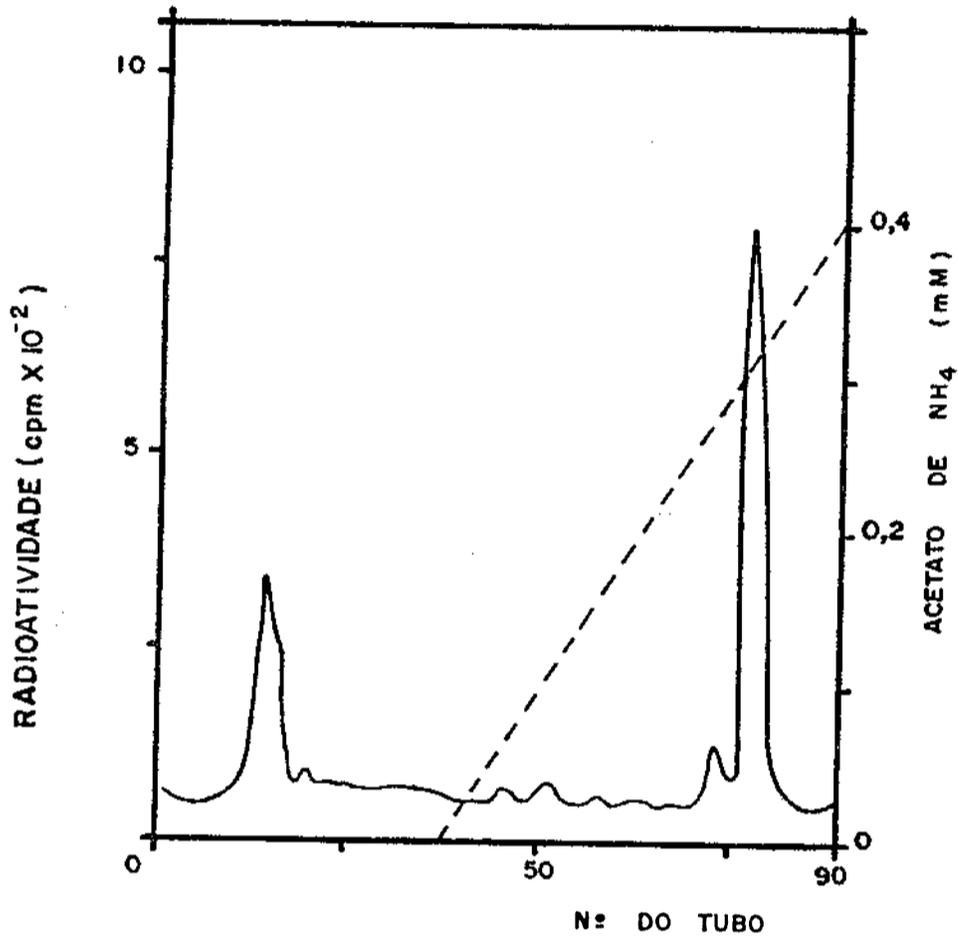


FIG. 7 - A COLUNA FOI ELUÍDA COM CLOROFÓRMIO-METANOL (2:1).  
E COM UM GRADIENTE LINEAR DE ACETATO DE AMÔNIO EN-  
TRE 0 E 0,4M NO MESMO SOLVENTE.

Na figura (8) observa-se que as amostras lipofílicas são constituídas de componentes que se deslocam neste sistema cromatográfico com o mesmo Rf dos padrões utilizados: triglicerídios e ácidos graxos. Observa-se ainda que a amostra que foi marcada com  $[1-^3\text{H}]$  glicose apresenta uma constituição diferente antes e depois da hidrólise. A amostra não-hidrolisada apresenta, entre outros constituintes um predomínio de compostos que se deslocam com o mesmo Rf de triglicerídios. Após a hidrólise os compostos formados se deslocam com um Rf que coincide com os Rf de ácidos graxos. Não se constatou a presença de glicerol radioativo. A amostra que foi marcada com  $[2-^3\text{H}]$  manose praticamente não apresenta maiores variações na sua constituição, antes e depois da hidrólise. Os picos de radioatividade não coincidem com os padrões empregados.

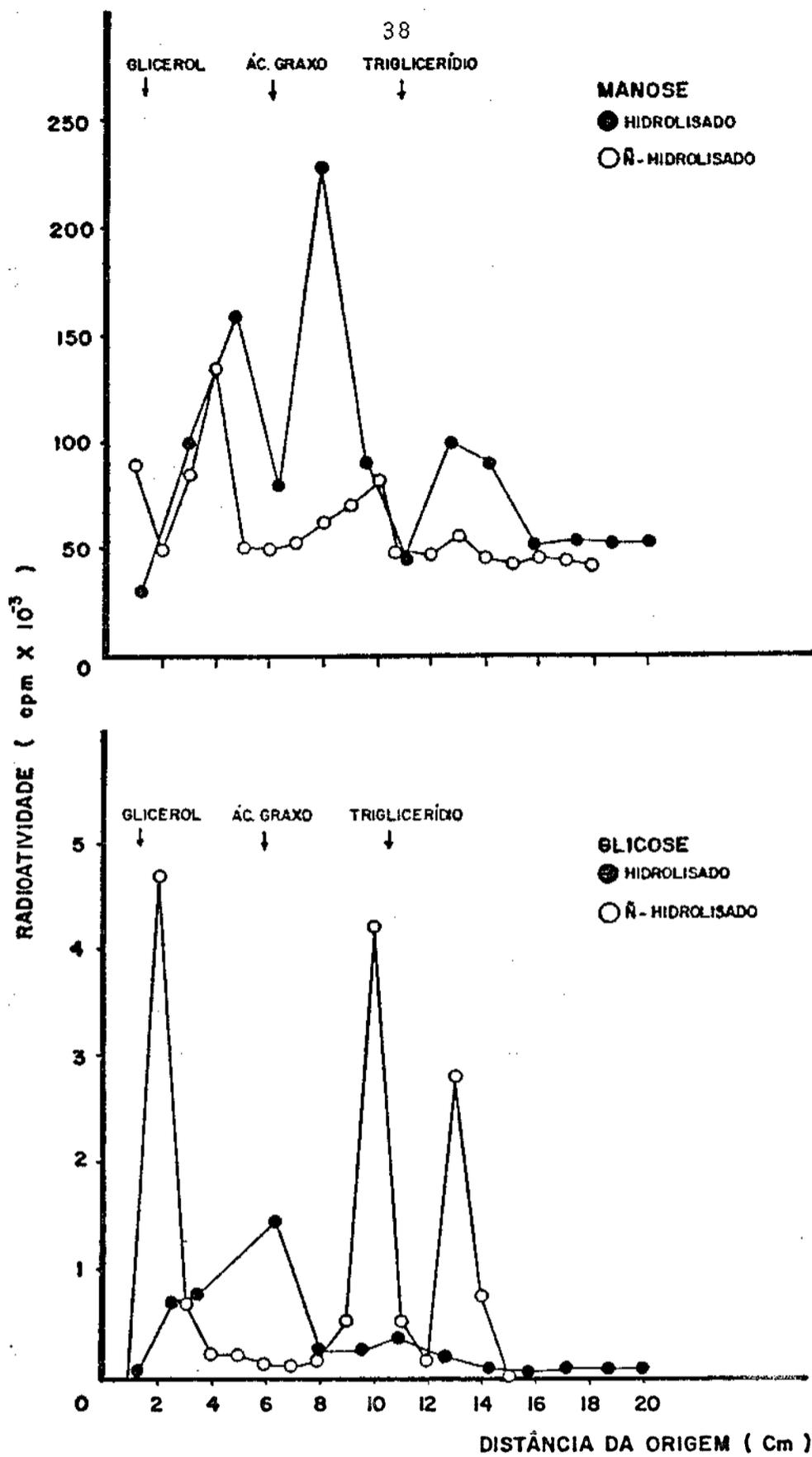


FIG. 8 - CROMATOGRAFIA EM TLC DOS GLICOLIPÍDIOS SOLÚVEIS EM CLOROFÓRMIO-METANOL (2:1), QUE NÃO LIGARAM NA COLUNA DE DEAE-CELULOSE. ESTES FORAM HIDROLISADOS COM NaOH 0,5 M EM ETANOL 90% A 25°C POR 15 MINUTOS. O HIDROLISADO FOI EVAPORADO E RESSUSPENDIDO EM CLOROFÓRMIO-METANOL (1:1) E APLICADO NA PLACA CROMATOGRÁFICA. UTILIZOU-SE COMO SOLVENTE DE CORRIDA HEXANO-ÉTER ETÍLICO - ÁCIDO ACÉTICO (80:20:1).

#### 4. ANÁLISE DOS COMPOSTOS LIPOFÍLICOS SOLÚVEIS EM CLOROFÓRMIO - METANOL - ÁGUA (1:1:0.3)

Os compostos solúveis nesta fração, marcados com  $[2-^3\text{H}]$  manose, foram submetidos a cromatografia descendente em papel no solvente B. Identificou-se a presença de dois compostos. Aproximadamente 90% da radioatividade aparece no composto manose (FIGURA 9). Este resultado indica a presença de gecorinas, que são compostos caracterizados como aglomerados de lipídios e glicídios (DANKERT, comunicação pessoal).

#### 5. ANÁLISE DO PELLET PROTEICO

##### 5.1 - Hidrólise ácida total

Com a finalidade de se conhecer quais os glicídios que fazem parte da estrutura da glicoproteína realizou-se hidrólise ácida total com ácido trifluor-acético nas condições descritas em material e métodos.

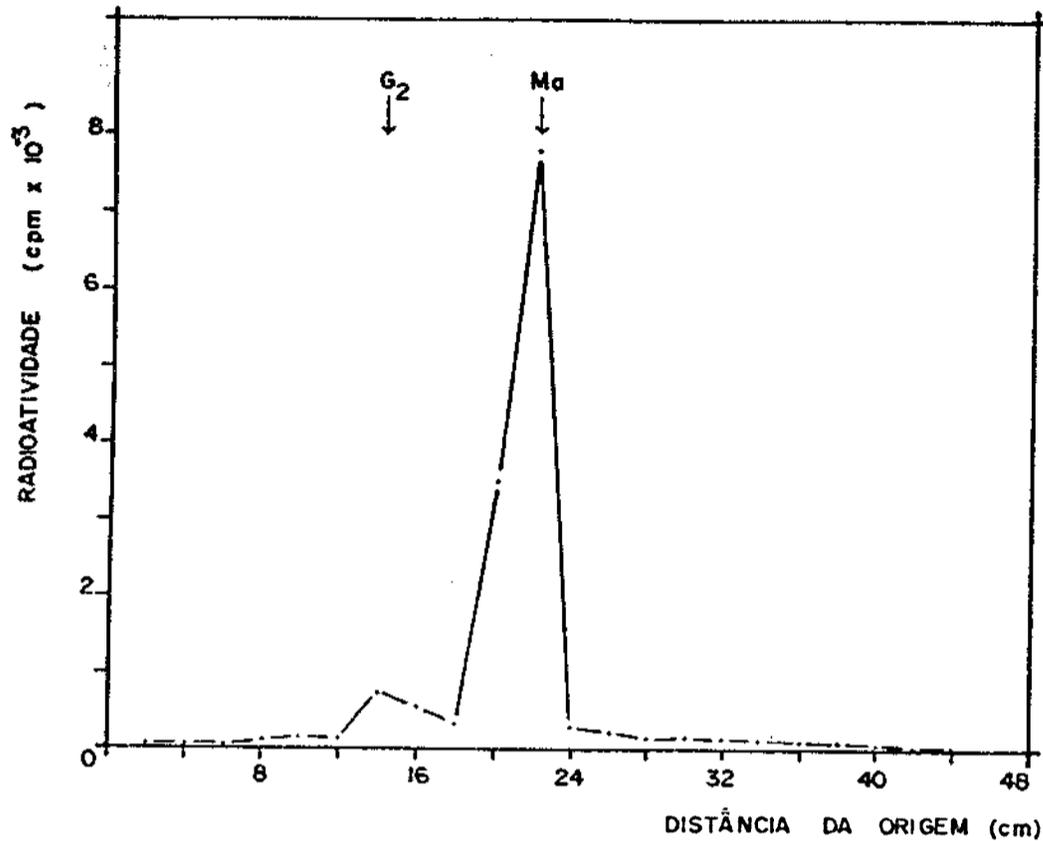


FIG. 9 - CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL DOS GLICOLIPÍDIOS SOLÚVEIS EM CLOROFÓRMIO-METANOL-ÁGUA (1:1:0.3), EXTRAÍDOS DE OVÁRIOS DE CARRAPATOS INJETADOS COM  $[2-^3\text{H}]$  MANOSE.

ELUENTE: n-BUTANOL - PIRIDINA - ÁGUA (4:3:4)

MA - MANOSE

G<sub>2</sub> - DISSACARIDEO

Neste experimento utilizou-se os pellets proteicos contendo glicoproteínas marcadas com  $[1-^3\text{H}]$  glicose e obteve-se 95% de hidrólise.

Utilizando-se colunas de troca iônica separou-se no hidrolisado os glicídios neutros e carregados.

Os glicídios neutros submetidos a cromatografia descendente em papel, no solvente A e C, revelou a presença de glicose e manose (FIGURA 10).

Os glicídios neutros foram eluídos separadamente do papel. A fração contendo glicose foi submetida a oxidação com glicose oxidase, nas condições descritas em material e métodos. O produto da oxidação foi submetido a cromatografia descendente em papel, no solvente A.

Na figura (11) observa-se a transformação da glicose a ácido glicônico, confirmando a presença de glicose na amostra.

Os glicídios carregados foram submetidos a cromatografia em camada delgada, no solvente F, e o resultado revelou a presença de glicosamina (FIGURA 12).

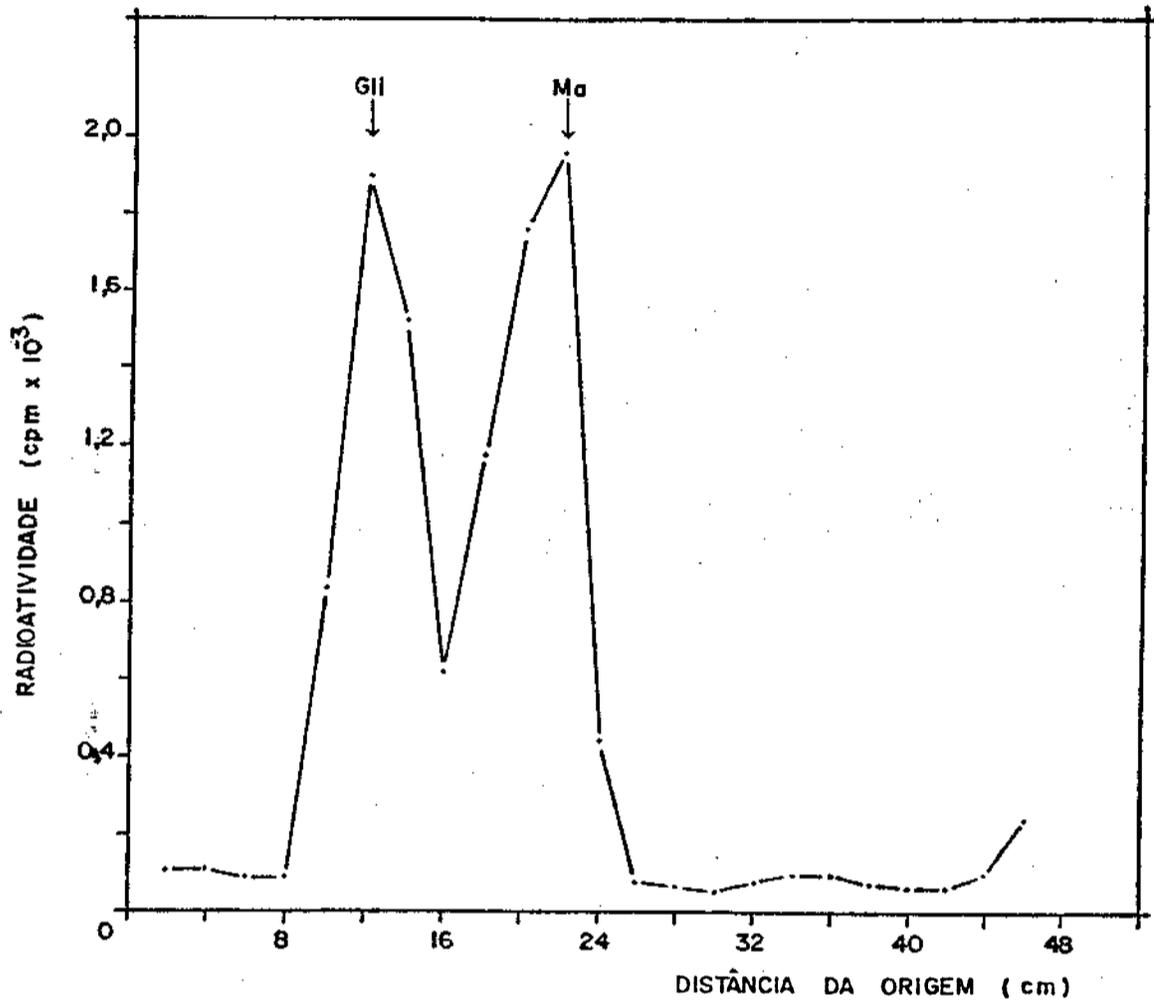


FIG. 10 - CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL DOS GLICÍDIOS NEUTROS RESULTANTES DA HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO PELLET PROTEICO, PROVENIENTE DE OVÁRIOS DE CARRA PATOS INJETADOS COM  $[1-^3\text{H}]$  GLICOSE.

ELUENTE: n-BUTANOL - ETANOL - ÁGUA (10:1:2)

MA - MANOSE

GLI - GLICOSE

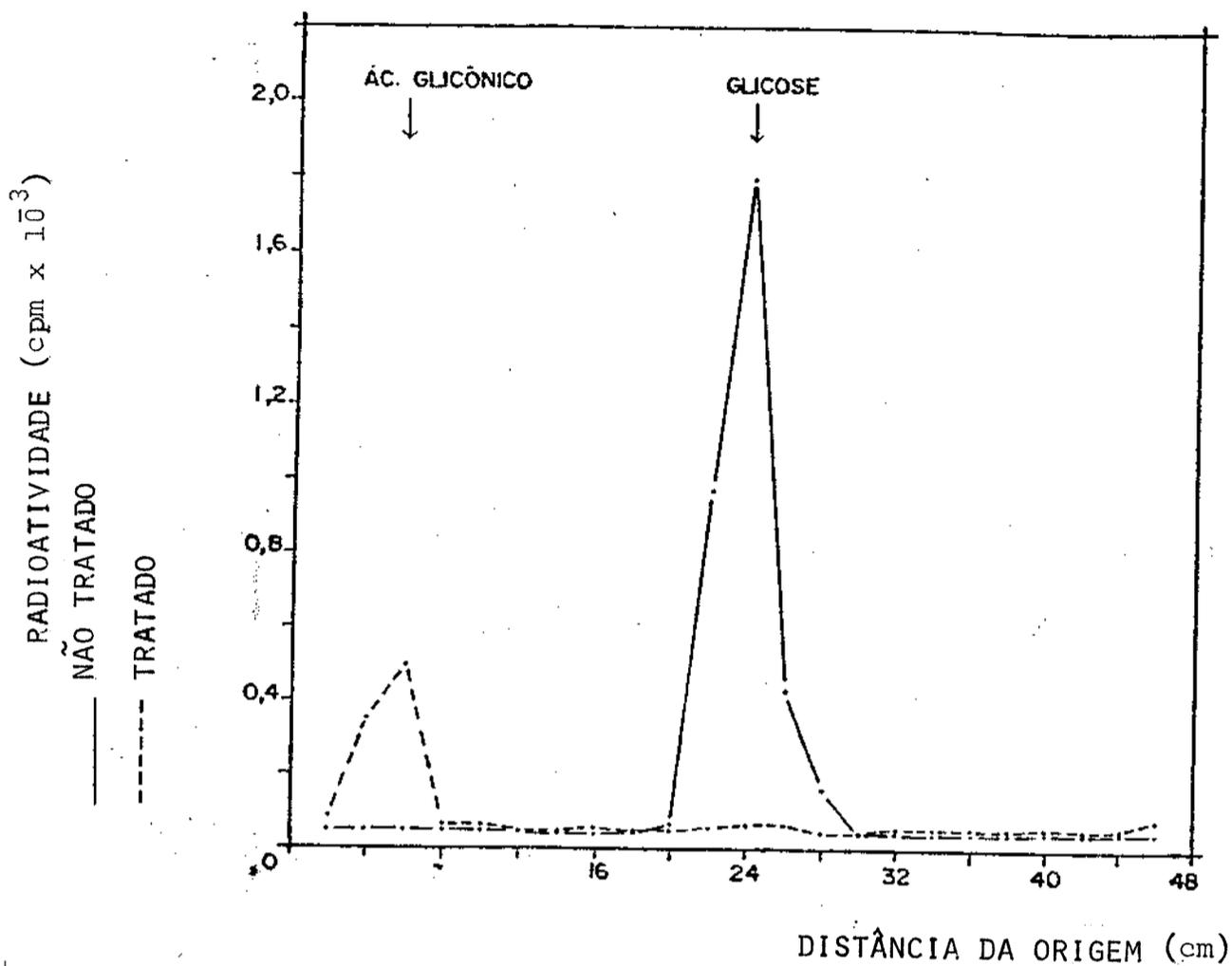


FIG. 11 - CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL DO PRODUTO DA REAÇÃO COM GLICOSE OXIDASE. O COMPOSTO ISOLADO COMO GLICOSE (FIGURA 10) FOI ELUÍDO, TRATADO COM A ENZIMA E RECROMATOGRAFADO NO SISTEMA DE SOLVENTES; n-BUTANOL - PIRIDINA - ÁGUA (6:4:3).

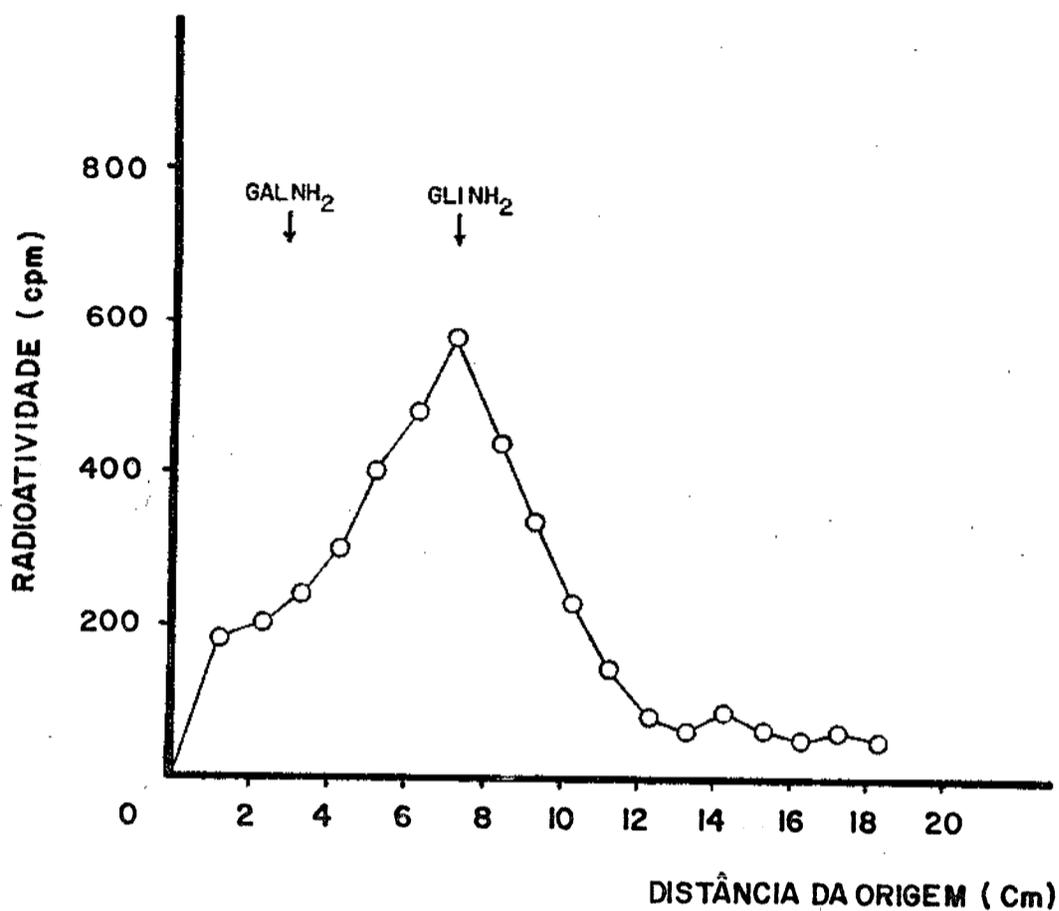


FIG. 12 - CROMATOGRAFIA EM TLC DOS GLICÍDIOS CARREGADOS RESULTANTES DA HIDRÓLISE ÁCIDA TOTAL DO PELLET PROTEICO PROVENIENTE DE OVÁRIOS DE CARRAPATOS INJETADOS COM  $[1-^3\text{H}]$  GLICOSE.

ELUENTE: ACETATO DE ETILA - PIRIDINA - AMÔNIA -  
 ÁGUA (10:5:3:3) - UTILIZOU-SE A FACE  
 SUPERIOR.

GALNH<sub>2</sub> - GALACTOSAMINA      GLINH<sub>2</sub> - GLICOSAMINA

## 5.2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS

Após a extração dos compostos solúveis em clorofórmio - metanol(2:1) e clorofórmio - metanol - água (1:1:0:3), obteve-se uma fração insolúvel que contém glicoproteínas marcadas na fração glicídica com  $[2-^3\text{H}]$  manose ou  $[1-^3\text{H}]$  glicose.

Na figura (13) mostra-se os resultados da eletroforese do pellet glicoproteico obtido de ovários de carrapatos injetados com manose radioativa. O pellet proteico foi dissolvido em sódio-dodecilsulfato (SDS).

Como se pode observar aparecem várias glicoproteínas marcadas com o glicídio radioativo.

A eletroforese das glicoproteínas obtidas de ovários de carrapatos injetados com glicose radioativo levou a resultado semelhante ao obtido com a injeção de manose radioativa.

DISTRIBUIÇÃO DA RADIOATIVIDADE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE DODECIL SULFATO DE SÓDIO DA PROTEÍNA DO OVÁRIO, MARCADA COM  $[2-^3\text{H}]$  - MANOSE.

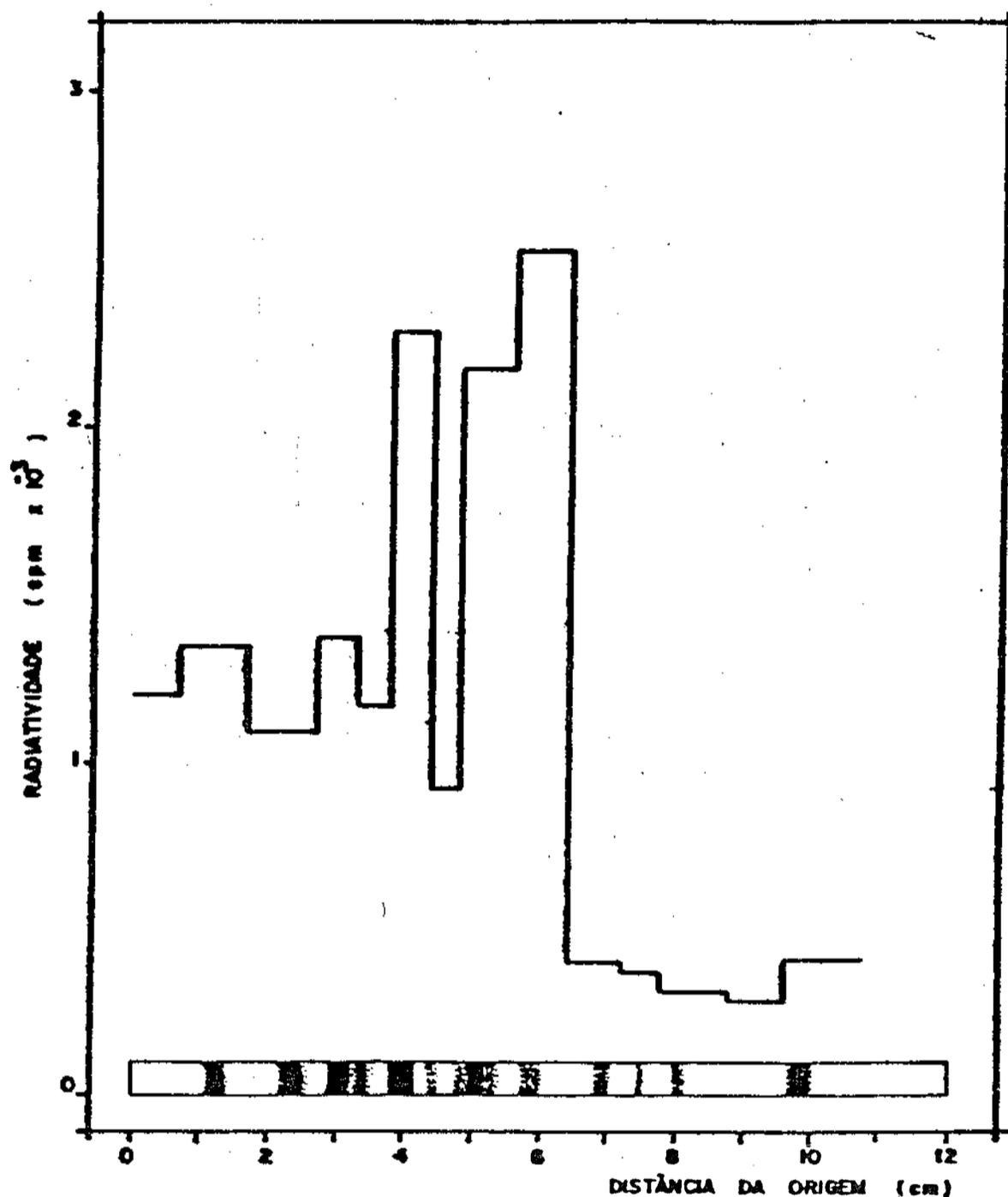


FIG. 13 - A FRAÇÃO PROTEICA DO OVÁRIO DO CARRAPATO INJETADO COM  $[2-^3\text{H}]$  - MANOSE FOI SOLUBILIZADA EM SDS E ANALISADA EM GÉIS DE ACRILAMIDA 8% CONTENDO SDS. OS GÉIS FORAM CORTADOS EM SEGMENTOS DE 0,5 CM E DETERMINADA A RADIOATIVIDADE EM CADA FRAÇÃO. OS GÉIS FORAM CORADOS COM AMIDO BLACK 0.5 g%.

### 5.3 - Hidrólises alcalinas redutoras

Os glicídios podem ligar-se à proteína na estrutura de uma glicoproteína, por meio de ligações N-glicosídicas ou O-glicosídicas, através dos respectivos aminoácidos: asparagina e serina ou treonina.

O tipo de ligação O-glicosídica (via serina ou treonina) é lábil em condições alcalinas suaves entretanto a ligação N-glicosídica (via asparagina) é resistente nestas condições.

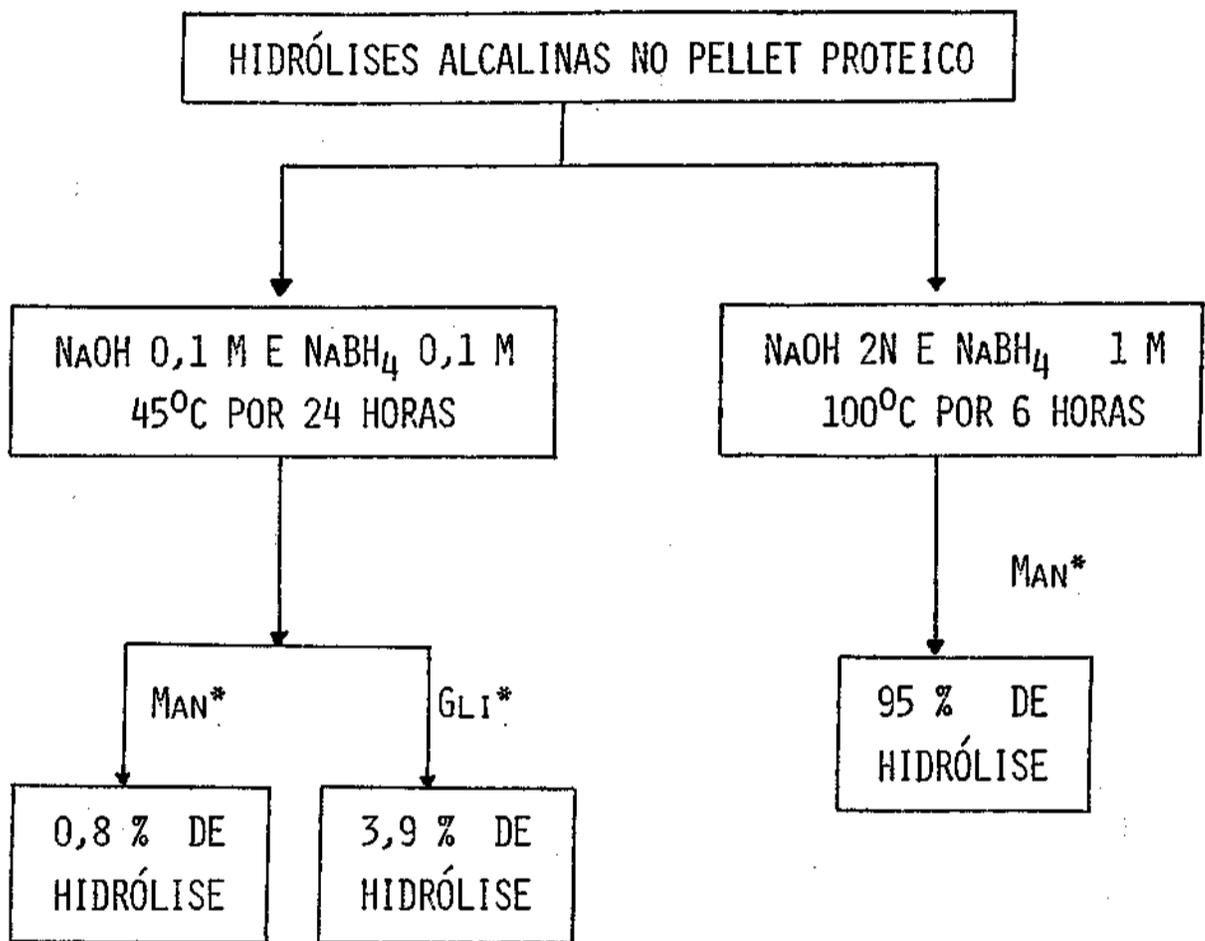
Para elucidar os tipos de ligações que ocorrem nas glicoproteínas marcadas, presente no pellet proteico, realizou-se hidrólise alcalina suave redutora (0.1N NaOH e 0.1M NaBH<sub>4</sub> - 24 horas a temperatura ambiente), segundo a técnica descrita em material e métodos.

Nestas condições não se obteve hidrólise das glicoproteínas provenientes dos ovários de carrapatos injetados com manose radioativa ou glicose radioativa.

Este resultado sugere que a ligação glicídio - proteína seja do tipo N-glicosídica.

A partir do resultado anterior, fez-se hidrólise alcalina forte redutora (2N NaOH, 1M NaBH<sub>4</sub> - 6 horas a temperatura de 100°C), segundo a técnica descrita em material e métodos. Obteve-se 95% de hidrólise.

## HIDRÓLISES ALCALINAS NO PELLET PROTEICO



MAN\* :  $[2-^3H]$  MANOSE

GLI\* :  $[1-^3H]$  GLICOSE

O material hidrolisado foi submetido a cromatografia de gel-filtração em P-4 conforme descrito em material e métodos.

Observa-se na figura (14) que o oligossacarídeo resultante da hidrólise move-se como um composto de peso molecular elevado.

Uma alíquota do material proveniente da cromatografia de gel-filtração em P-4, foi submetido a cromatografia de afinidade em concanavalina A sepharose, conforme descrito em material e métodos.

Verifica-se que o material é constituído de oligossacarídeos que apresentam nas suas extremidades livres moléculas de glicose ou manose. Observa-se ainda que a maior parte do material foi eluído na concentração de 200 mM do  $\alpha$ -metil-glicosídeo, evidenciando que nesta fração há um maior número de compostos com afinidade pela concanavalina A sepharose (FIGURA 15).

Uma alíquota do material proveniente da cromatografia de gel-filtração em P-4 sofreu tratamento com amiloglicosidase, e após foi submetido à cromatografia descendente em papel no sistema de solvente B, conforme descrito em material e métodos.

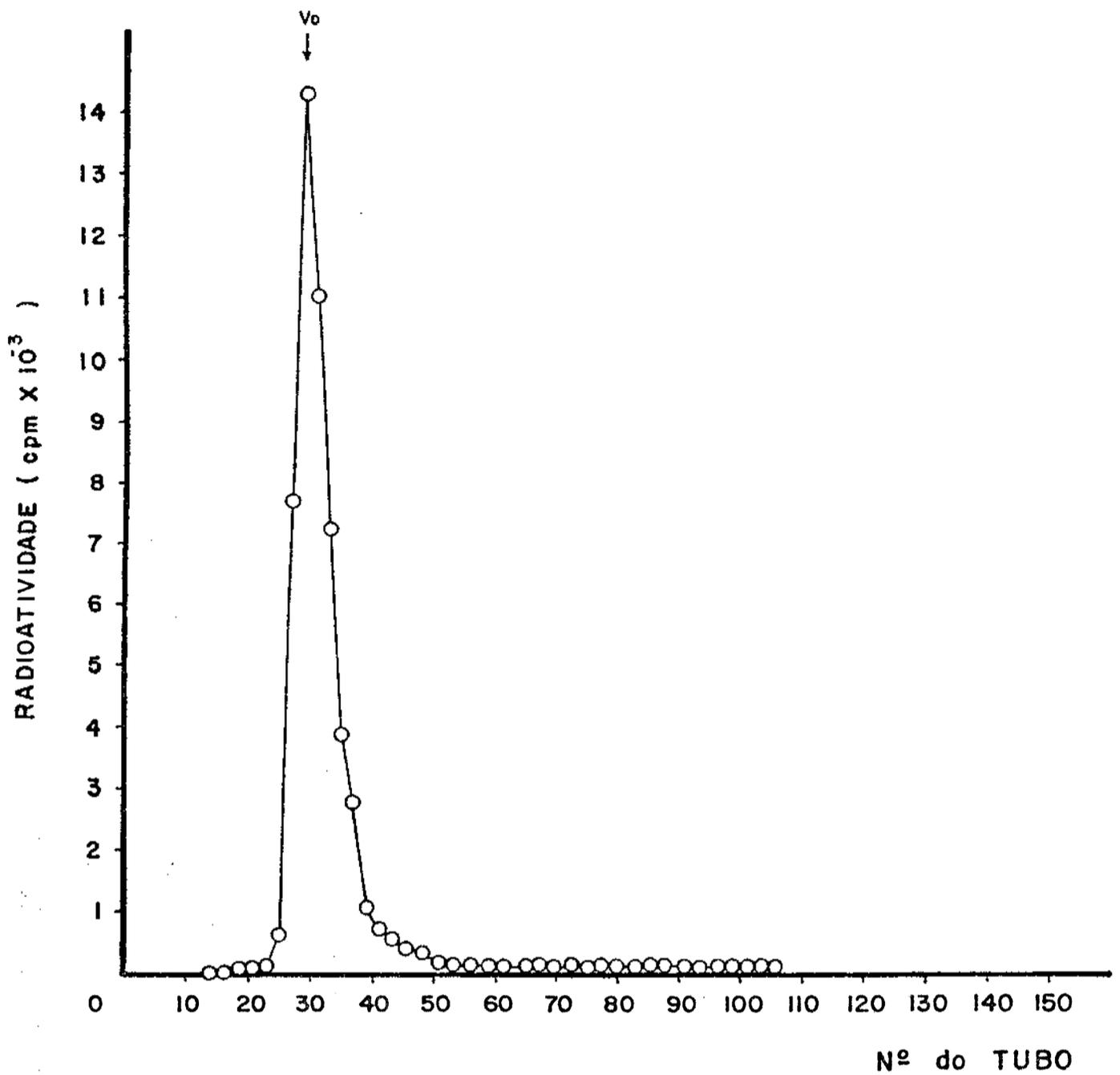


FIG. 14 - CROMATOGRAFIA DE GEL-FILTRAÇÃO EM P-4 DO OLIGOSACARÍDEO RESULTANTE DA HIDRÓLISE ALCALINA REDUTORA FORTE DO PELLET PROTEICO PROVENIENTE DE OVÁRIOS DE CARRAPATOS INJETADOS COM  $[2-^3\text{H}]$  MANOSE. ELUENTE: TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO 0.1M pH 6.0

CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM CONCAVALINA A SEPHAROSE DO OLIGOSSACARÍDEO ELUÍDO DA COLUNA DE GEL-FILTRAÇÃO EM P-4

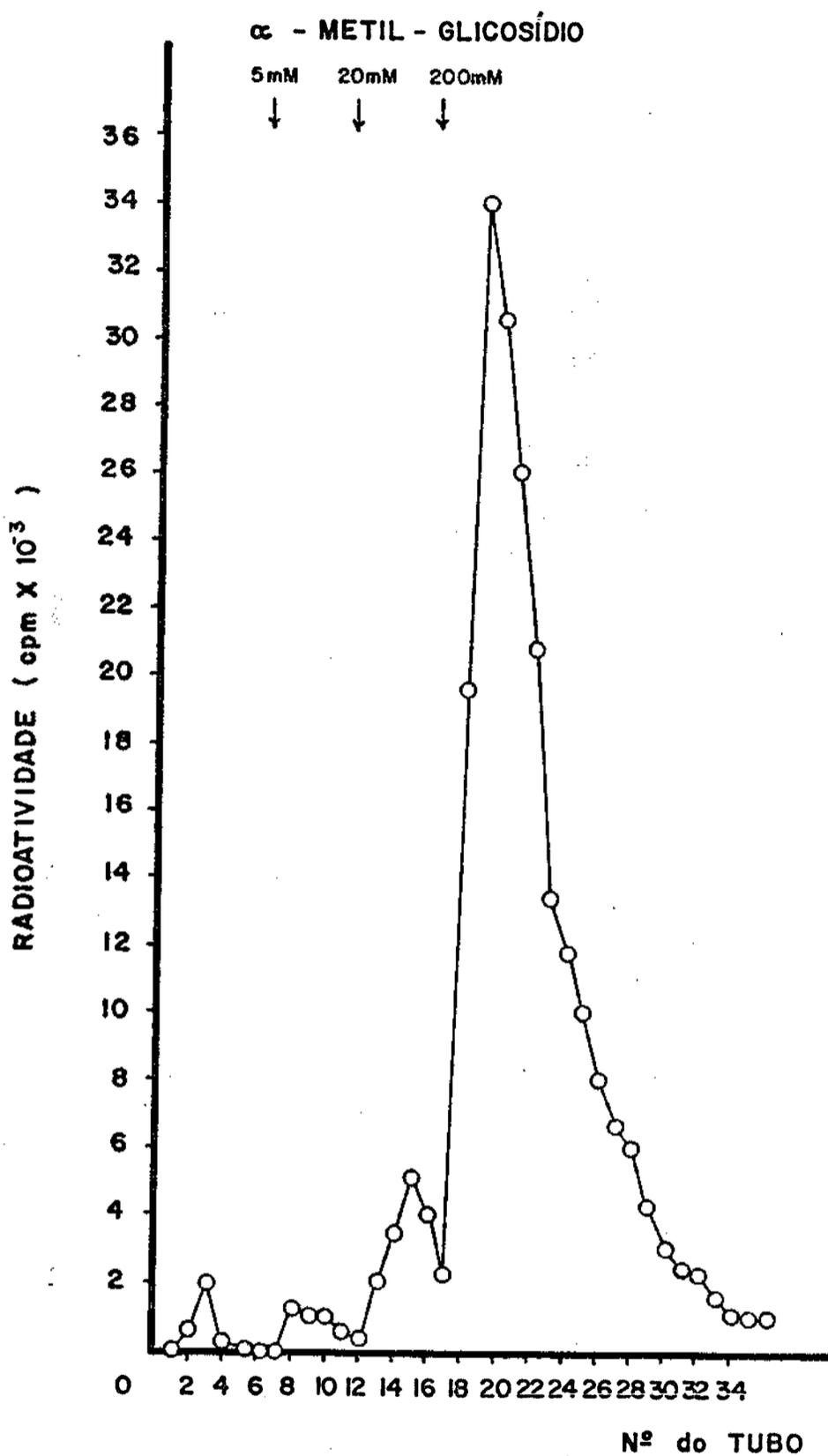


FIG. 15 - A COLUNA FOI ELUÍDA COM TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO 0,1 M PH 6,0, CONTENDO NaCl 1,0 M, MgCl<sub>2</sub> 0,001 M, CaCl<sub>2</sub> 0,001 M E  $\alpha$ -METIL - GLICOSÍDIO EM TAMPÃO ACETATO DE SÓDIO 0,1 M NAS CONCENTRAÇÕES 5; 20 E 200 mM.

Observa-se na figura (16) que o material hidrolisado é constituído de um oligossacarídeo de peso molecular elevado que encerra em torno de quatorze moléculas de hexoses.

Verifica-se que o material após a hidrólise sofreu uma redução no tamanho do oligossacarídeo. Os dois picos que aparecem no cromatograma, antes da hidrólise, se transformam num único pico, após a hidrólise, evidenciando que o oligossacarídeo de maior peso molecular sofreu efetivamente a ação enzimática transformando-se num oligossacarídeo de peso molecular menor semelhante ao oligossacarídeo relativo ao segundo pico no cromatograma do material não hidrolisado.

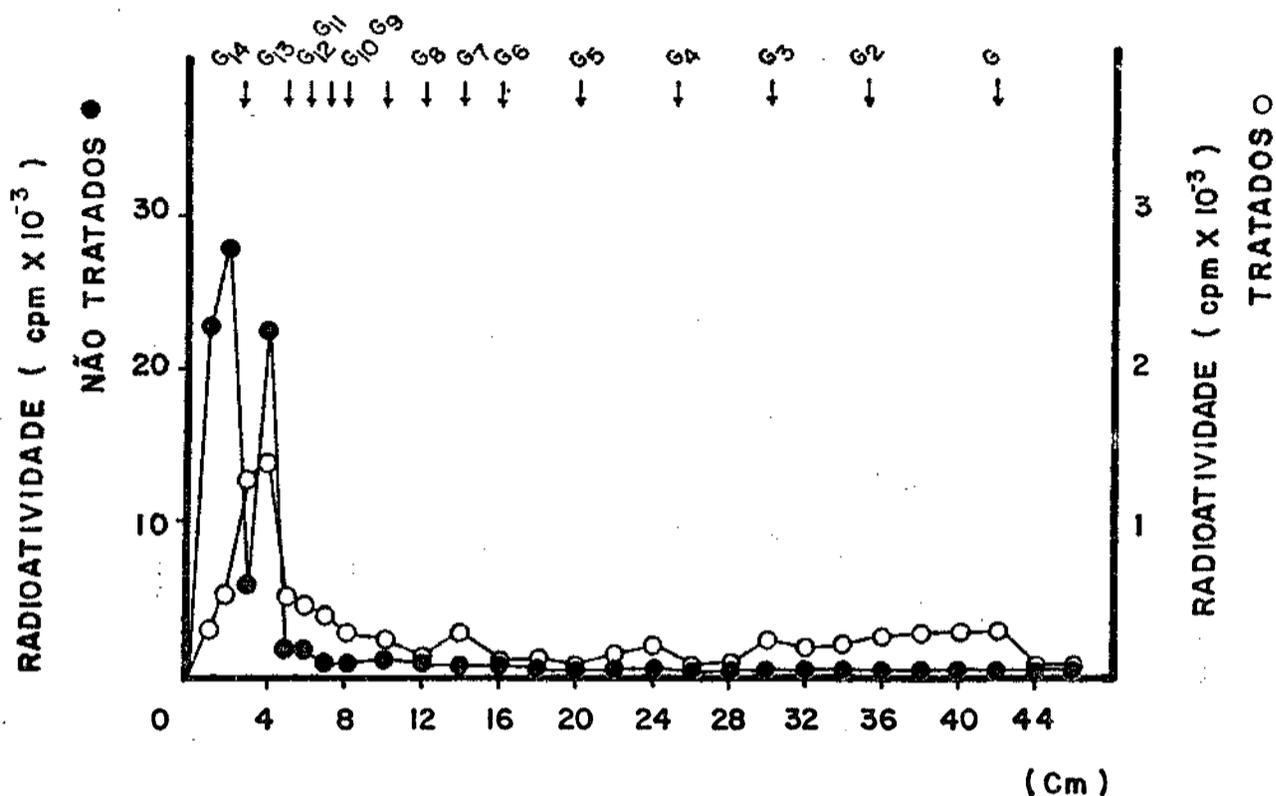


FIG. 16 - CROMATOGRAFIA DESCENDENTE EM PAPEL, DO PRODUTO OBTIDO NA COLUNA DE GEL-FILTRAÇÃO EM P-4 DESCRITO NA FIGURA 14. UMA ALÍQUOTA DESTE MATERIAL FOI SUBMETIDO A TRATAMENTO COM AMILOGLICOSIDASE, CONFORME DESCRITO EM MATERIAL E MÉTODOS.

ELUENTE: *n*-BUTANOL - PIRIDINA - ÁGUA (4:3:4)

OS OLIGOSSACARÍDEOS DE GLICOSE COM UM OU MAIS RESÍDUOS DE GLICOSE ESTÃO REPRESENTADOS COMO G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, ETC. ESTES FORAM OBTIDOS UTILIZANDO UM HIDROLISADO DE AMILOSE.

#### IV - D I S C U S S Ã O

No carrapato Boophilus microplus a vitelogenese corresponde a uma fase de rápido crescimento e maturação do oócito (DIEHL, 1970; WYATT e PAN, 1978; ENGELMANN, 1980). Nesta fase estão ativados os processos de biossíntese de glicídios, lipídios e proteínas de reserva, que serão acumuladas para suprir as necessidades metabólicas do embrião em desenvolvimento (CHIPPENDALE, 1978; WYATT, 1980).

As vitelogeninas são constituídas de glico-lipoproteínas que contém 1 a 14% de glicídios e 6 a 12% de lipídios (DEJMAL & BROOKES, 1972; CHEN e colaboradores, 1978; KUNKEL e colaboradores, 1978 e 1980).

Durante a vitelogenese ocorre um rápido aumento na massa do ovário, devido a incorporação de vitelogeninas aos oócitos em desenvolvimento, captados da hemolinfa, e a processos biossintéticos intra-ovarianos. Isto ocorre nas primeiras horas do período de pré-postura (DEL PINO e colaboradores, 1982).

Neste período de pré-postura, injetou-se glicídios radioativos diretamente no intestino de teleógenas. Verificou-se que após a injeção de manose radioativa, atingiu-se um

máximo de incorporação deste glicídio ao precipitado lipo-proteico obtido pela adição de ácido tricloro-acético, seis horas após a injeção. Nos tempos seguintes a incorporação se mantém constante.

Estudos da incorporação de diferentes glicídios a compostos lipofílicos e glicoproteicos, revelaram que ocorre maior incorporação de glicose radioativa a compostos lipofílicos pouco polares e ao pellet proteico. A manose radioativa foi incorporada preferencialmente a compostos lipofílicos mais polares e ao pellet proteico.

A transferência de resíduos glicídicos a glicoproteínas, envolve compostos de natureza lipídica. Estes compostos podem ser classificados como poliprenóis - fosfato e poliprenóis - pirofosfato que ao ligarem no glicídio formam compostos do tipo poliprenol - fosfato - glicídio ou poliprenol - pirofosfato - glicídio (PARODI e LELOIR, 1979).

Para comprovar a natureza lipídica dos compostos solúveis em clorofórmio - metanol (2:1), extraídos de ovários de carrapatos injetados com glicose radioativa ou manose radioativa, submeteu-se estes compostos a cromatografia descendente em papel. Observa-se nas figuras 3 e 4 que o composto radioativo se deslocou num só pico próximo da linha de frente, movendo-se como se pode esperar de uma substância lipofílica.

Com o objetivo de elucidar a natureza destes lipídios (aniônicos ou não-aniônicos), submeteu-se a cromatografia de troca iônica em DEAE - celulose.

Observa-se nas figuras 5 e 7 que esta fração é

constituída de compostos lipídicos aniônicos e não-aniônicos.

Os lipídios provenientes de ovários de carrapatos injetados com manose radioativa apresentaram maior percentagem de lipídios aniônicos em relação aos não aniônicos. Nos lipídios provenientes de ovários de carrapatos injetados com glicose esta proporção se inverte.

Os compostos aniônicos, aqueles que ligaram na coluna, foram submetidos a hidrólise ácida suave. A ocorrência de hidrólise do material evidencia a labilidade ácida do glicolipídio, confirmando a presença de um lipídio-monofosfato-monossacarídeo.

Os glicolipídios aniônicos provenientes de ovários de carrapatos injetados com glicose radioativa apresentaram 70% de hidrólise. O hidrolisado total submetido a cromatografia descendente em papel revelou a presença de manose como único monossacarídeo entre outros compostos (Figura 6).

Os glicolipídios provenientes de ovários de carrapatos injetados com manose radioativa apresentaram 30% de hidrólise. A fração hidrossolúvel do hidrolisado, submetida a cromatografia descendente em papel, revelou a presença de um único constituinte glicídico, que é a manose. Estes resultados demonstram que com ambos precursores glicídicos, o ovário sintetiza um composto com as propriedades de um poliprenol - fosfato - manose.

A fim de elucidar a composição dos compostos lipídicos não-aniônicos, submeteu-se a hidrólise alcalina suave.

A análise dos compostos lipofílicos por cromatografia em camada delgada revelou a presença de compostos que se deslocam com o mesmo Rf de triglicerídios (Figura 8). Estes compostos apresentaram radioatividade oriunda provavelmente da glicose radioativa injetada diretamente no intestino das teleôgenas.

A glicose é metabolizada nos tecidos de mamíferos e em insetos, inclusive em ácaros, essencialmente por duas vias: a via glicolítica de Embden - Meyerhof e o ciclo das pentoses. A via glicolítica está mais relacionada com o catabolismo da glicose e os processos de produção de energia.

Uma porção da glicose metabolizada no ciclo das pentoses é utilizada para a biossíntese de NADPH e de ribose-5-fosfato (PONTREMOLI e GRAZI, 1969).

Tem se estudado em diferentes espécies de insetos, a contribuição destas vias no catabolismo da glicose, e a influência de inseticidas, inibidores metabólicos, coenzimas, hormônios no ciclo das pentoses e nas vias de síntese de ácidos graxos no tecido adiposo (AGOSIN e colaboradores, 1963, 1966; KOBAYASHI e KIMURA, 1967; HORIE e colaboradores, 1968; ELA e colaboradores, 1970).

Observa-se ainda na figura 8 que a amostra marcada com glicose radioativa apresenta uma constituição diferente antes e depois da hidrólise. A amostra não hidrolisada apresenta compostos que se movem com o mesmo Rf de triglicerídios. Após a hidrólise ocorre uma mudança no valor de Rf, coincidindo este com o Rf de ácidos graxos.

A amostra que foi marcada com manose radioativa praticamente não apresenta variação em sua constituição antes e depois da hidrólise, e a radioatividade presente nesta amostra não corresponde aos padrões empregados.

Os compostos glicolipídicos solúveis em clorofórmio - metanol - água (1:1:0.3), extraídos de ovários de carrapatos injetados com manose radioativa, foram submetidos diretamente a cromatografia descendente em papel, para comprovar-se a natureza do glicolipídio, no lugar disto encontrou-se dois compostos. Aproximadamente 90% da radioatividade aparece num deles que se desloca como manose. Este resultado evidencia que o composto solúvel nesta fração se caracteriza como um aglomerado onde estão associados lipídios e glicídios. Estes aglomerados são denominados gecorinas.

Os compostos lipídicos de características aniônicas podem corresponder aos compostos intermediários na biossíntese de glicoproteínas.

Estes lipídios transportam resíduos glicídicos provenientes de nucleotídios - açúcares até aceptores proteicos, para a formação da glicoproteína (PARODI e LELOIR, 1979).

Este processo de síntese de glicoproteínas se verifica em mamíferos (PARODI e colaboradores, 1972), em leveduras (PARODI, 1979 ab), em insetos (QUESADAS - ALLUE e BELOCOPI-TOW, 1978; BUTTERS e HUGHENS, 1980) e em plantas (BRETT e LELOIR, 1977; PONT LEZICA e colaboradores, 1978).

As vitelogeninas e vitelinas, reservas proteicas do ovo em desenvolvimento (PAN e colaboradores, 1969), são ca-

racterizados 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).

Nos ácaros a análise de glicídios livres em ovos, embrião e na hemolinfa do carrapato adulto Dermacentor andersoni, mostrou que a glicose é o glicídio mais abundante na hemolinfa, enquanto que a manose é o principal glicídio livre nos ovos (LEVENBOOK e colaboradores, 1980). Estes glicídios são provavelmente interconvertíveis no carrapato e em outras espécies (DAGLEY e NICHOLSON, 1970).

Pela hidrólise ácida total do pellet glicoproteico obtido de ovários de carrapatos injetados com glicose radioativa, obteve-se 95% de hidrólise.

Cromatografia descendente em papel dos glicídios neutros, revelou a presença de glicose e manose (Figura 10). Para confirmar a presença de glicose, eluiu-se este glicídio do papel cromatográfico e submeteu-se a oxidação com glicose oxidase. O produto da oxidação foi aplicado em cromatografia descendente em papel, movendo-se como ácido glicônico, confirmando a presença de glicose na glicoproteína.

Os glicídios carregados positivamente aplicados em cromatografia de camada delgada, revelou a presença de um único glicídio que se move como glicosamina (Figura 12).

A eletroforese do pellet proteico proveniente de ovários de carrapatos injetados com manose ou glicose radioati

vas mostra a mesma distribuição da radioatividade. Verifica-se que o pellet proteico é constituído de várias proteínas glicosiladas (Figura 13).

As glicoproteínas podem apresentar o oligossacarídeo ligado a proteína por dois tipos de ligação glicídio-proteína: a ligação O-glicosídica, via serina ou treonina, que é lábil em condições de hidrólise alcalina suave, e a ligação N-glicosídica, via asparagina, que é resistente nestas condições.

As glicoproteínas isoladas do ovário do carrapato Boophilus microplus, injetados com manose radioativa, mostram-se resistentes as condições de hidrólise alcalina suave, porém em condições de hidrólise alcalina forte redutora, obteve-se 95% de hidrólise do pellet proteico, evidenciando que o oligossacarídeo está ligado a proteína por uma ligação N-glicosídica.

Na vitelina da Locusta migratoria se conhece que o oligossacarídeo que contém manose está ligado a um resíduo de asparagina da proteína (YAMAZAKY, 1974).

A presença de proteínas N-glicosiladas, marcadas a partir dos glicídios radioativos evidencia a utilização de processos de biossíntese de glicoproteínas que utilizam intermediários lipídicos (BEHRENS, 1974).

Neste trabalho comprova-se a presença de compostos lipídicos que estavam associados a compostos glicídicos, e estes podem estar relacionados com processos de biossíntese de glicoproteínas, apesar de que não encontramos intermediários do

tipo poliprenol-pirofosfato-oligossacarídeo. A presença de glicoproteínas marcadas, em diferentes fases do desenvolvimento do carrapato, tem sido amplamente divulgada (MAIA e colaboradores, em preparação; KAMEL e colaboradores, 1982).

O oligossacarídeo resultante da hidrólise alcalina redutora forte do pellet glicoproteico, submetido a cromatografia de gel-filtração em P-4, foi eluído na fração relativa ao volume de exclusão da coluna (Figura 14). Isto indica que o oligossacarídeo é constituído de várias moléculas de monossacarídeos, apresentando peso molecular elevado.

Cromatografia descendente em papel do hidrolisado, revela a presença de dois oligossacarídeos que apresentam em torno de quatorze moléculas de hexose (Figura 16).

Tratamento enzimático do oligossacarídeo marcado na manose em presença de amiloglicosidase, mostrou que o oligossacarídeo foi sensível a ação da enzima. Observa-se na figura 16 que ocorre uma diminuição no tamanho do oligossacarídeo. O oligossacarídeo de peso molecular mais elevado sofreu efetivamente a ação enzimática, reduzindo seu peso molecular e transformando-se num oligossacarídeo de peso molecular semelhante ao oligossacarídeo relativo ao segundo pico do cromatograma do material não hidrolisado, o que parece confirmar que a glicose está no oligossacarídeo unido a proteína.

O oligossacarídeo foi submetido a cromatografia de afinidade em concanavalina A sepharose, comprovando-se que o oligossacarídeo apresenta nas suas extremidades livres resíduos de glicose ou manose. Observa-se ainda que a maior parte dos oligossacarídeos presentes na amostra foram eluídos com

uma concentração 200 mM de  $\alpha$ - metil - glicosídeo, evidenciando que nesta fração está maior a quantidade de compostos com afinidade pela concanavalina A sepharose (Figura 15). Os resultados destas análises revelam que apesar da quantidade de glicoproteínas que aparecem na eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS, todas elas são do tipo N - asparagina e os oligosacarídeos liberados na hidrólise alcalina forte redutora se comportaram de maneira homogênea.

## V - R E S U M O E C O N C L U S Õ E S

Durante a vitelogênese do carrapato bovino Boophilus microplus, o ovário e os oócitos tem um crescimento acelerado, acumulando glicídios, lipídios e proteínas de reserva para suprir as necessidades metabólicas do embrião em desenvolvimento. A injeção de glicídios radioativos no intestino da fêmea, neste período, permite a obtenção destes compostos marcados.

Este trabalho tem o objetivo de caracterizar compostos lipídicos e proteicos sintetizados no ovário do carrapato bovino durante o período de vitelogênese.

Foi injetado glicose ou manose radioativa diretamente no intestino das teleógenas recém-caídas do hospedeiro, e verificou-se um máximo de incorporação, seis horas após a aplicação da dose de glicídios radioativos. Este valor máximo permanece constante após este intervalo de tempo. Neste período de máxima incorporação foram extraídos do ovário, compostos de natureza lipídica e proteica.

Dois grupos de diferentes compostos lipofílicos foram separados do ovário, sendo um deles constituído de

compostos pouco polares e o outro de compostos mais polares.

Os compostos lipofílicos pouco polares, extraídos de ovário de carrapatos injetados com manose ou glicose radioativas, submetidos a cromatografia de troca iônica em DEAE - celulose, evidenciaram a presença de compostos aniônicos e não-aniônicos. Os compostos aniônicos foram submetidos a hidrólise ácida suave, e o hidrolisado foi colocado em cromatografia descendente em papel, identificando-se um composto radioativo que se desloca como manose. Os compostos não-aniônicos foram submetidos a hidrólise alcalina suave, e o hidrolisado foi colocado em cromatografia de camada delgada, identificando-se compostos radioativos que se deslocaram com o mesmo Rf de triglicerídios e ácidos graxos. Observa-se ainda que a amostra que foi marcada com glicose apresenta uma distribuição de radioatividade diferente antes e após a hidrólise. Antes da hidrólise há um predomínio de compostos que se deslocam com o mesmo Rf de triglicerídeos. Após a hidrólise há um predomínio de compostos que se deslocam com um Rf que coincide com o Rf de ácidos graxos. A amostra que foi marcada com manose praticamente não apresenta variação em sua distribuição de radioatividade antes e depois da hidrólise.

Os compostos lipofílicos mais polares provenientes de ovários de carrapatos injetados com manose radioativa, submetidos a cromatografia descendente em papel, apresentam 90% de sua radioatividade num composto que se desloca como manose. Este resultado indica a presença de gecorinas, que são aglomerados de lipídios e glicídios.

As proteínas extraídas do ovário de carrapato injetados com manose ou glicose radioativas, colocadas sob ele-

troforese em gel de poliacrilamida-SDS, se comportam de maneira análoga. Observou-se a presença de várias proteínas glicosiladas marcadas com o glicídio radioativo.

As glicoproteínas submetidas a hidrólise alcalina redutora mostraram que o glicídio está ligado a proteína, por uma ligação N-glicosídica (via asparagina).

A porção glicídica da glicoproteína é constituída de um oligossacarídeo de peso molecular elevado, que apresenta nas suas extremidades livres glicose ou manose, conforme resultados obtidos por cromatografia de afinidade em concanavalina A sepharose. Este oligossacarídeo submetido a hidrólise ácida total evidenciou a presença de glicose, manose e glicosamina.

- BOCTOR, F.N. Biochemical and Physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Free amino acids in female "Argas (Persicargas) arboreus Kaiser", "Hoogstraal & Kohls (Argasidae)" analyzed by gas-liquid chromatography. Journal of Medical Entomology, 9 (3): 201-204, 1972.
- BOCTOR, F.N. & KAMEL, M. Purification and characterization of two lipovitellins from eggs of the tick, "Dermacentor andersoni". Insect Biochemistry, 6 : 233-240, 1976.
- BRETT, C.T.; LELOIR, L.F. Dolichyl monophosphate and its sugar derivatives in plants. Biochem. J. 161 : 93-101, 1977.
- BUTTERS, T.D.; HUGHES, R.C. Isolation and characterization of mosquito cell membrane glycoproteins. Biochem. Biophys. Acta. 640 : 655-671, 1980.
- CHEN, T.T.; STRAHLENDORF, P.W.; WYATT, G. Vitellin and vitellogenin from "Locustus (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" (Canestrini). 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.
- DAGLEY, S. & NICHOLSON, D.E. An Introduction to metabolic pathways. New York, Wiley, 1970 p.343.
- DANKERT, M.; WRIGHT, A.; KELLY, W.S.; ROBBINS, P.W. Isolation, purification and properties of the lipid-linked intermediates of O-antigen biosynthesis. Arch. Biochem. Biophys. 116 : 425-435, 1966.
- 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.
- DEL PINO, J.C.; GUMA, F.C.R.; DEWES, H.; BERNARD, E.A. Biossíntese de Glicoproteínas no ovário do carrapato bovino "Boophilus microplus". (Em preparação)
- DIEHL, P.A. Zur Oogenese bei "Ornithidirus moubata" Murray (Ixodoidea:Argasidae) unter besonderer Berücksichtigung der Vitellogenese. Acta Tropica, 27 (4) : 301-355, 1970.

- ELA, R.; CHEFURKA, W.; ROBINSON, J.R. In vivo glucose metabolism in the normal and poisoned cockroach. "Periplaneta americana". J. Insect Physiol., 16 : 2137-2156, 1970.
- ENGELMANN, F. Endocrine control of vitellogenin synthesis. In: LOCKE, M. & SMITH, D.S., eds. Insect Biology in the Future. London, Academic Press, 1980. p.311-324.
- 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.
- GELLISSEN, G.; WAJC, E.; COHEN, E.; EMMERICH, H.; APPLEBAUM, W. S.; FLOSSDORF, J. Purification and Properties of oocyte vitellin from "Migratoria locusta". Journal of Comparative Physiology, B, 108 : 287-301, 1976.
- GOLD, M.H.; HAHN, H.J. Role of a mannosyl lipid intermediate in the synthesis of "Neurospora crassa" glycoproteins. Biochemistry, 15 : 1808-1814, 1976.
- GOLD, M.H.; HAHN, H.J. Effect of divalent metal ions on the synthesis of oligosaccharide side chains of "Neurospora crassa" glycoproteins. Phytochemistry, 18 : 1269-1272, 1978.
- GOLDSTEIN, I.J.; HOLBERMAN, C.E.; MERRICK, J.M. Protein-carbohydrate interaction. I. The interaction of polysaccharides with concanavalina A. Biochim. Biophys. Acta, 97 : 68-76. 1965.

- GONZALES, J.C. O controle do carrapato dos bovinos. Porto Alegre, Ed.Sulina, 1975.
- HAIJAR, N.P. Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Fatty acid composition of lipids and free fatty acid fractions of hemolymph and gut and molting fluids of nymphal and female "Hyalomma (H.) Dromedarii Koch" and "H. (H.) anatolicum excavatum koch (Ixodidae)". Journal of Medical Entomology, 9 (6) : 551-557, 1972.
- 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.
- HORIE, Y.; NAKASONG, S.; ITO, T. The conversion of  $^{14}\text{C}$ -carbohydrates into  $\text{CO}_2$  and lipid by the silk worm "Bombyx mori". J. Insect Physiology, 14 : 971-981, 1968.
- JENNI, L. Synthesis and uptake of proteins during vitellogenesis in ovocytes of "Ornithodoros moubata", Murray (Ixodoidea: Argasidae). Acta Tropica, 28 (2) : 105-163, 1971.
- KAMAL, K.A.; KAMEL, M.Y. Biochemical and Physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Total lipids and phospholipids during oogenesis and embryogenesis of "Dermacentor andersoni" (Ixodidae) and "Argas (Persicargas) arboreus (Argasidae)". Journal of Medical Entomology, 14 (2): 204-207, 1977.

- 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.
- KAMEL, M.Y.; SHALABY, F.Y.; GHAZY, A.E.M.; FARID, N.M. Variations in the amounts of glycogen, free sugars, lipids and phospholipids during embryonic development of "Hyalomma dromedarii" (Acarina: Ixodidae). Insect Biochem. 13 (2):115-121, 1983.
- KOBAYASHI, N.; KIUMURA, S. Action of ecdysone on the conversion of  $^{14}\text{C}$ -glucose in daver pupa of the Sipkorm, "Bombyx mori". J.Insect Physiology, 13 : 545-552, 1967.
- 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 vitellin". 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 "Blatella germanica" vitellin. Insect Biochemistry, 10: 703-714, 1980.

- PARODI, A.J. Biosynthesis of yeast mannoproteins; synthesis of mannan outer chain and of dolichol derivatives, J.Biol.Chem. 254 : 8343-8352, 1979b.
- PARODI, A.J.; BEHRENS, N.H.; LELOIR, L.F.; CARMINATTI, H. The role of polyprenol-bound saccharides as intermediates in glycoprotein synthesis in liver. Proc.Nat.Acad. Sci. (USA) 69 (11) : 3268-3272, 1972.
- PARODI, A.J.; LELOIR, L.F. The role of lipid intermediates in the glycosylation of proteins in the eucaryotic cell. Biochem. Biophys. Acta. 559 : 1-37, 1979.
- PONT LEZICA, R.; ROMERO, P.M.; HOPP, H.E. Glucosylation of membrane-bound proteins by lipid-linked glucose. Planta, 140: 177-183, 1978.
- PONTREMOLI, S. & GRAZI, E. Hexose-monophosphate oxidation. In: Comprehensive Biochemistry, edited by M. Florkin and E.M. Stotz. 17 : 168-189, 1969.
- QUESADA-ALLUÉ, L.A.; BELOCOPITOW, S. Lipid bound oligosaccharides in insects. Eur. J. Biochem. 88 : 529-541, 1978.
- ROTH, T.F. & PORTER, K.R. Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito "Aedes Aegyptu" L. The Journal of Cell Biology, 20 : 313-332, 1964.

- SPEAKE, B.K.; WHITE, D.A. The formation of lipid-linked sugars as intermediates in glycoprotein synthesis in Rabbit mammary gland. Biochem. J. 170 : 273-283, 1978.
- 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". J. Insect Physiol. 18: 283-288, 1972.
- TREVELYAN, W.E.; PROCTER, D.P.; HARRISON, J.S. Detection of Sugars on paper chromatograms. Nature, 166: 444-445, 1950.
- YAMAZAKI, K. Yolk protein from eggs of "Locusta migratoria" and glicopeptides from the protein. Insect Biochemistry, 4: 411-422, 1974.
- WHITE, D.A. & WAECHTER, C.J. A manosyl-carrier lipid of bovine adrenal medulla and rat parotid. Biochem. J. 146 : 645-651,
- WYATT, G.R. Vitellogenins In: LOCKE, M. & SMITH, A.S. eds. Insect biology in the future. London, Academic Press, 1980. p. 207-214.
- WYATT, G.R. & PAN, M.L. Insect Plasma Proteins. Annual Review of Biochemistry, 47 : 779-817, 1978.