FERNANDO MORAIS DE SENA ESTEVES
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

GANGLIOSÍDEOS E GLICOPROTEÍNAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Incorporação e Declínio Biológico de Nuclídeos

PORTO
1973

GANGLIOSÍDEOS E GLICOPROTEÍNAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Incorporação e Declínio Biológico de Nuclídeos

Fernando Morais de Sena Esteves
Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

GANGLIOSÍDEOS E GLICOPROTEÍNAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

Incorporação e Declínio Biológico de Nuclídeos

Dissertação de Candidatura ao Grau de Doutor em Bioquímica na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

PORTO
1973

Grato a Deus, princípio, meio e fim, que apesar de mim aqui me tem, agradeço também a quantos me ajudam no caminho.

Minha Mulher, nossos Pais, Filhos, Irmãos e Tios, estímulo, exemplo e amparo.

Dr. Rui Abrunhosa, Francisco Almeida Fernandes e Padre José Teixeira, amizade grande e a tempo.

Professores Francisco Carvalho Guerra e Robert Main Burton, no lançar de boas sementes, no abrir de novos caminhos, no dar e dar-se sempre mesmo quando nada colhem, pelo muito que me dão.

Professores Joaquim Maia e Amândio Tavares, gentil disponibilidade e paciência no desvendar-me alguns mistérios dos números.

Meus Professores, tudo o que deles tive e muito foi, a todos recordo com estima e alguns já com saudade.

Professor Arnaldo Roseira que me deu o impulso donde me veio o gosto da Bioquímica.

Doutores Armando Melo, Levi Guerra, Pierce Reilly, Lola Reilly e Padre Jerome Wilkerson, dedicação e ajuda preciosa em São Luís.

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Escola Médica da Universidade Washington de São Luís, Fundação Calouste Gulbenkian, Comissão de Investigação para a OTAN, Comissão Cultural Luso-Americana (Programa Fulbright), Instituto de Alta Cultura, pelos meios, apoio e compreensão.

Todos os que na Faculdade de Farmácia me fazem sentir que escolhi o meu caminho.

Os que comigo trabalham, partilhando alegrias e penas, no Centro de Estudos de Bioquímica, pela ajuda constante e total dedicação.

Ao Manel

SUMÁRIO

A N-(^{3}H-acetil)-glucosamina revelou-se um marcador adequado para os gangliosídeos do cérebro e cerebelo do rato, fixando-se a maior parte do trítio na porção dos açúcares.

A incorporação é máxima com injecção por via intracerebral, comparada à intraperitoneal. O trítio de ^{3}H-acetato integra-se de modo não específico tanto nos gangliosídeos como nos lipídeos neutros mais os fosfolipídeos (LNF), mas o trítio da NAG-T é preferido pelos gangliosídeos (75 vezes mais) e mesmo pelos LNF (duas vezes mais).

A incorporação de trítio da NAG-T nos gangliosídeos aumenta desde 1 a 6 horas após injecção e apresenta um máximo entre as 6 e as 12 horas. A incorporação nos LNF é muito mais rápida e não se observa um máximo nítido dentro das 12 horas. Uma fase aquosa obtida por metanólise alcalina dos LNF e que se pressupõe conter precursores lipófilos dos gangliosídeos mostra marcação máxima na 1ª hora, decrescendo depois contínua e exponencialmente através do período de 12 horas, de certo modo compensando o aumento simultâneo da incorporação de trítio nos gangliosídeos. Este aumento é acompanhado pela fracção glicosídica que se obtém por metanólise alcalina: uma fase aquosa que possui a porção de açúcares.

Os estudos de substituição isotópica com NAG-T e 1-^{14}C-glucosamina (GLN-C) mostram declínios exponenciais e paralelos entre o trítio e o carbono-14 para todas as fracções observadas. Mediram-se semi-vidas para os gangliosídeos (15 a 19 dias), LNF (42 a 53 dias), proteínas (28 a 32 dias) e as porções de açúcares das glicoproteínas: 26 a 35 dias para o N-acetilneuraminato (NANA) e 23 dias para as hexosaminas. Não se encontrou trítio nas hexosaminas das glicoproteínas.

Os estudos de substituição isotópica com a 6-^{3}H--glucosamina (GLN-T) levaram a resultados muito menos concludentes, embora sugerindo, por comparação aos outros dois açúcares ensaiados, semi-vidas mais longas para os LNF e NANA das glicoproteínas e declínios semelhantes para os gangliosídeos e hexosaminas.

Com a GLN-T, as proteínas receberam maior proporção de radioactividade do que com GLN-C ou NAG-T, sendo a diferença marcante para a fracção das hexosaminas, com 36 % da proteína total.

Os estudos de declínio são compatíveis com a imagem dos gangliosídeos e glicoproteínas participando em membranas sinápticas, actuando dinamicamente na transmissão dos impulsos nervosos.

SUMMARY

N-(^{3}H-acetyl)-glucosamine is shown to be a suitable marker for rat cerebrum and cerebellum gangliosides where the sugar moiety gets most of the label.

Incorporation is maximal with intracerebral as compared with intraperitoneal injection. ^{3}H-acetate tritium is non-specifically incorporated in gangliosides as well as in neutral plus phospholipids (LNF), but NAG-T tritium is preferred by gangliosides (75-fold) and even by LNF (two-fold).

Incorporation of NAG-T tritium into gangliosides increases from 1 to 6 hours and peaks between 6 and 12 hours. Incorporation into LNF is much faster and no distinct peak is observed within 12 hours. An aquous phase obtained via alkaline methanolysis of LNF supposedly containing lipophylic ganglioside precursors shows maximal label at 1 hour, then decreasing continuously and exponentially throughout the 12-hour period, rather balancing the simultaneous increase of ganglioside incorporation of tritium. Such increase is paralleled by their fraction obtained via alkaline methanolysis: an aquous phase containing the sugar moiety.

Turnover studies with NAG-T and 1-^{14}C-glucosamine (GLN-C) show exponential decays, in which tritium parallels carbon-14 in every fraction observed. Half-lives were measured for gangliosides (15 to 19 days), LNF (42 to 53 days), proteins (28 to 32 days) and sugar moieties of glycoproteins: 26 to 35 days for N-acetyl-neuraminate (NANA) and 23 days for hexosamine. No tritium was found in glycoprotein hexosamines.

Turnover studies with 6-^{3}H-glucosamine (GLN-T) yielded much less conclusive results, although suggesting, as compared with the two other sugars assayed, longer half-lives for LNF and glycoprotein NANA, and similar decays for gangliosides

and hexosamines.

With GLN-T, protein got relatively more label then with GLN-C or NAG-T, the difference being marked with hexosamine fraction with 36 % of total protein tritium.

Turnover studies are compatible with the picture of gangliosides and glycoproteins participating in synaptic membranes dynamically acting in the transmission of nervous impulses.

ABREVIATURAS

Acetato-T	^{3}H-acetato
Água	Bidestilada em sistema de vidro, salvo menção em contrário
AMP, ADP, ATP,	Adenosina mono-, di- e trifosfato
cer	Ceramida ou N-acilesfingosina
CM	Mistura de clorofórmio (2 volumes) com metanol (1 volume)
CMP, CDP, CTP	Citidina mono-, di- e trifosfato
cpm	Cintilações por minuto
dpm	Desintegrações por minuto
gal	Galactose
glc	Glucose
GLN-C	1-^{14}C-glucosamina ou 1-^{14}C-2-amino-2-desoxi--D-glucose
GLN-T	6-^{3}H-glucosamina ou 6-^{3}H-2-amino-2-desoxi-D--glucose
IC, IP	Via intracerebral, intraperitoneal de injecções
LNF	Lipídeos neutros e fosfolipídeos
NAgal	N-acetilgalactosamina ou 2-acetamido-2-desoxi--D-galactose
NA-glucosamina	N-acetilglucosamina ou 2-acetamido-2-desoxi--D-glucose
NAG-T	N-(^{3}H-acetil)-glucosamina ou 2-(^{3}H-acetamido)--2-desoxi-D-glucose
NA-manosamina	N-acetilmanosamina ou 2-acetamido-2-desoxi-D--manose
NANA	N-acetilneuraminato ou ácido N-acetilneuramínico
-1P, -6P	-1-fosfato, -6-fosfato
PEP	Fosfoenolpiruvato
P_i	Fosfato inorgânico
PP_i	Pirofosfato inorgânico
UDP, UTP	Uridina di-e trifosfato

ÍNDICE

INTRODUÇÃO

Estrutura dos lipídeos do tecido nervoso 2
Gangliosídeos 6
Nucleotídeos de açúcares 10
Glicoproteínas 11
Bioquímica dos lipídeos do tecido nervoso 17
Metabolismo dos gangliosídeos 29
Esquema de estudo 35

MATERIAIS E MÉTODOS

Soluções de compostos radioactivos 37
Animais de experiência 39
Experiência 1 39
Injecção de radioisótopos 39
Extracção e homogeneização do tecido 41
Fraccionamento de lipídeos 43
Metanólise 45
Determinação de radioactividade em amostras com trítio 47
Experiência 2 51
Experiência 3 54
Experiência 4 57
Injecção de radioisótopos 57
Determinação de radioactividade em amostras com carbono-14 57
Determinação de radioactividade em amostras com carbono-14 e trítio simultaneamente 59
Medição de radioactividade das proteínas 62
Extracção dos ácidos siálicos ligados às proteínas 62
Doseamento de ácido N-acetilneuramínico 63
Doseamento de hexosaminas 66
Experiência 5 69

ANÁLISE ESTATÍSTICA DE RESULTADOS

Comparação de médias 71
Regressão linear 72
Limites de confiança 81

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Incorporação de trítio 83
Incorporação única de 12 horas 83
Lipídeos neutros e fosfolipídeos comparados aos gangliosídeos 83
Metanólise dos lipídeos 87
Contaminação dos lipídeos totais 90
Incorporação com períodos de 1 a 12 horas 91
Contaminação decrescente dos lipídeos totais 91
Lipídeos neutros e fosfolipídeos comparados aos gangliosídeos 94
Declínio biológico de nuclídeos 96
Estudo com N-(^{3}H-acetil)-glucosamina e 1-^{14}C-glucosamina em marcação simples e dupla 96
Razões de estudo 96
Processamento de dados 97
Declínio exponencial 103
Tempos de semi-vida 104
Redução ao tempo zero 107
Glicoproteínas 109
Estudo com 6-^{3}H-glucosamina 111

BIBLIOGRAFIA 115

I N T R O D U Ç Ã O

As membranas biológicas, fundamento estrutural indispensável à vida, crescem em número e em variedade com a complexidade do ser vivo que as possui. E nos seres superiores, como os mamíferos, o órgão de funções mais complexas, o cérebro, também é o que possui mais tipos de membranas. É que no cérebro existem, tal como nos outros órgãos, as mesmas estruturas membranosas, entre outras, as que formam as mitocôndrias, o núcleo e o retículo endoplasmático, todas intracelulares. Mas possui além desses, outros tipos únicos de membranas necessárias à função específica da transmissão dos impulsos nervosos: são as que constituem a mielina e as sinapses.

A mielina forma uma baínha isolante das fibras nervosas e as sinapses são o ponto de articulação entre neurónios. Tanto a mielinização (93) como o estabelecimento das sinapses (15) são fenómenos que ocorrem activamente nas tenras idades dos mamíferos, no rato, por exemplo, nos primeiros dias de vida pós-parto (31). O conhecimento da estrutura e metabolismo das membranas cerebrais é um dos passos necessários para desvendar com maior profundidade os fenómenos da função nervosa. Ora as membranas são constituídas fundamentalmente por proteínas e lipídeos, e daí a importância de estudar a estrutura e metabolismo destas substâncias.

Os pontos centrais deste estudo são também componentes de membranas do sistema nervoso central: as glicoproteínas e os gangliosídeos, sendo estes lipídeos. Estes dois grupos de substâncias são menos conhecidos que outros participantes de membranas celulares, e raramente são considerados quando se esboçam modelos que pretendem explicar aquelas estruturas.

Tanto as glicoproteínas como os gangliosídeos possuem

na sua estrutura partes de hidratos de carbono, razão pela qual se escolheram o trítio e o carbono-14 incluídos em derivados de açúcares como marcadores para estudos de incorporação e renovação. Como termos de comparação empregaram-se os outros lipídeos cerebrais, em grupo, nos quais se observou também incorporação dos precursores radioactivos escolhidos como marcadores para os gangliosídeos e as glicoproteínas.

ESTRUTURA DOS LIPÍDEOS DO TECIDO NERVOSO

O estudo aprofundado dos lipídeos é fenómeno recente devido às dificuldades peculiares destes compostos. Realmente, os lipídeos constituem um grupo extremamente complexo. Em primeiro lugar, porque os critérios de solubilidade que estão na base da definição de "lipídeos" fazem que como tais se classifiquem compostos das estruturas mais variadas, desde as gorduras aos esteróides. Depois, porque dentro de cada tipo restrito de lipídeo, por exemplo, a fosfatidilcolina, não existe uma substância quimicamente bem definida, mas uma mistura de substâncias, tantas quantas as combinações dos ácidos gordos componentes. No exemplo escolhido, um dos lipídeos mais simples, existem dois hidroxilos do glicerol em que se podem ligar moléculas de ácidos gordos por esterificação. Mesmo restringindo os ácidos gordos aos seis mais abundantes, poderão existir não uma mas 36 fosfatidilcolinas. A existência de diversos ácidos gordos origina portanto classes de compostos de propriedades tão semelhantes que habitualmente se processam e nomeiam como se tratasse de uma espécie molecular definida. Acresce ainda a variedade dos outros elementos componentes dos lipídeos, além dos ácidos gordos.

Desde que, no entanto, se tornou mais fácil dominar a sua química com novas técnicas de estudo, passaram os lipídeos a suscitar o interesse dos bioquímicos. Assim, existem já monografias com técnicas não só sobre lipídeos, como até sobre os lipídeos cerebrais (125,126,127).

No tecido nervoso central existem os lipídeos em grande quantidade, constituindo metade do peso seco do cérebro.

Este mero aspecto quantitativo e global dos lipídeos no cérebro já é suficiente para realçar a sua importância no tecido nervoso, embora o conhecimento da sua função nele seja ainda fragmentário e escasso.

Glicerofosfolipídeos

Indica-se em primeiro lugar a estrutura esquemática do ácido fosfatídico e a de uma fosfatidilcolina, um dos lipídeos mais abundantes, não só no tecido nervoso mas em muitos outros. O próprio ácido fosfatídico também ocorre como tal

GLICEROL-ÁCIDO GORDO 1 $CH_2-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}(CH_2)_{16}CH_3$

GLICEROL-ÁCIDO GORDO 2 $CH-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7CH_3$

GLICEROL-FOSFATO 3 $CH_2-O-\overset{O}{\overset{\|}{P}}-O-CH_2CH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3$ (O^-)

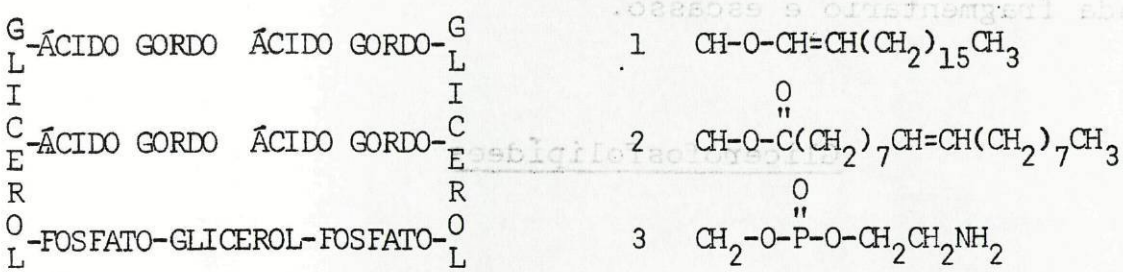
Ácido fosfatídico — Fosfatidilcolina

no tecido nervoso, embora em pequena proporção. A fosfatidilcolina deriva estruturalmente do ácido fosfatídico com esterificação pela colina de segundo hidroxilo do fosfato. Outros álcoois além da colina podem ocupar o seu lugar: etanolamina, serina, glicerol e inositol. Com este último álcool forma-se portanto o fosfatidilinositol, que existe tal qual ou também com mais uma ou duas moléculas de fosfato esterificadas nos hidroxilos ainda livres do inositol, dando, respectivamente, o fosfatidilinositol-fosfato e o fosfatidilinositol-difosfato.

Outros glicerofosfolipídeos são o difosfatidilglicerol e os plasmalogénios.

Os plasmalogénios, um exemplo dos quais é a fosfatidaletanolamina, originam por hidrólise alcalina um aldeído gordo e um ácido gordo, além do glicerol, fosfato e etano-

lamina ou colina, que é o outro álcool que além da etanolamina esterifica o fosfato na maior parte dos plasmalogénios. Na po-

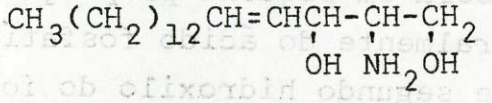


Difosfatidilglicerol Fosfatidaletanolamina

sição 1 correspondente ao glicerol existe uma ligação éter. Por hidrólise, a fosfatidaletanolamina representada originaria aldeído esteárico e ácido oleico.

Esfingolipídeos

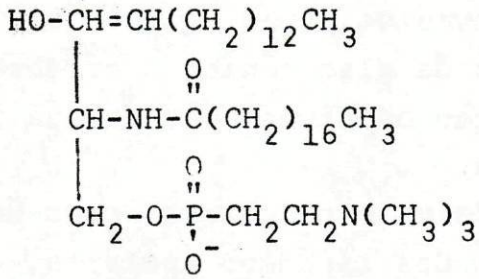
Nestes compostos, em vez de glicerol para apoio dos diversos componentes, encontra-se a esfingosina. Este aminoál-



Esfingosina

cool dá origem à esfingomielina, que é dos esfingolipídeos o único que contém fosfato e se pode assim incluir nos fosfolipídeos, designação que abrange todos os lipídeos que contêm fosfato, independentemente da parte restante da sua estrutura. A esfingomielina contém um ácido gordo unido à esfingosina por ligação amida e fosfato que esterifica por um lado o hidroxilo 1 da esfingosina e por outro o hidroxilo da colina. A estrutura da esfingomielina que se representa está disposta de maneira a evidenciar a

sua semelhança estrutural com a fosfatidilcolina.



Esfingomielina

A esfingomielina pode considerar-se formada por duas partes: a fosforilcolina, que contém o fosfato e a colina, e a ceramida, a parte restante da molécula, e que é composta pela esfingosina com um ácido gordo a si unido pela ligação amida.

Há outros esfingolipídeos que diferem da esfingomielina e dos fosfoglicerídeos pelo facto de não terem fosfato. São os cerebrosídeos, os sulfatos de cerebrosídeos (também chamados sulfatídeos), os ceramido-poli-hexosídeos e os gangliosídeos. Os cerebrosídeos têm uma molécula de galactose ou de glucose unida à ceramida através de ligação glicosídica que se estabelece entre o hidroxilo terminal da ceramida e o hidroxilo 1 do açúcar. Os ácidos gordos dos cerebrosídeos são em geral de cadeia longa e frequentemente são hidroxilados no carbono 2. Os sulfatídeos têm um hidroxilo do açúcar esterificado por uma molécula de sulfato.

Os cerebrosídeos com glucose são constituintes normais de muitos tecidos como o baço, fígado, sangue e rim (98,99, 152,153), mas no cérebro existem sobretudo como galactosil-ceramidas (110,131,155). No cérebro, os cerebrosídeos são típicos da mielina, onde chegam a atingir 20 % do seu peso seco (111).

Outros lipídeos

Notável no cérebro é a virtual ausência de tria-

cilgliceróis, ou gorduras. Estes compostos servem principalmente como reservas de energia. Ora o cérebro depende fundamentalmente da glucose para as suas necessidades energéticas, pelo que não possui reservas de triacilgliceróis. Não tendo sequer reservas apreciáveis de glicogénio, o cérebro é extremamente sensível à interrupção ou diminuição da sua irrigação sanguínea e à hipoglicémia.

Fica assim o colesterol como único representante no tecido nervoso dos lipídeos apolares, e existe no cérebro livre e não esterificado. Apesar disso, o seu único hidroxilo, embora livre, não chega para equilibrar a sua estrutura fortemente hidrófoba ou apolar, que é característica dominante do colesterol.

Outro lipídeo que se encontra no tecido nervoso é o diacilglicosilglicerol, em que o açúcar (por exemplo a glucose) se liga ao hidroxilo 3 do glicerol, enquanto os dois ácidos gordos esterificam os hidroxilo 1 e 2.

Lipídeos neutros e fosfolipídeos

Designam-se por neutros os lipídeos que não possuem cargas eléctricas, caso do colesterol, diacilglicosilgliceróis, cerebrosídeos e gangliosídeos.

Os fosfolipídeos, por seu turno, têm cargas eléctricas livres no fosfato e nos grupos a este ligados, pelo que são lipídeos polares. Os gangliosídeos, embora neutros, não se considerarão neste trabalho incluídos no grupo designado por "lipídeos neutros e fosfolipídeos" (LNF). Estes são os que ficam na fracção O-2 (ver Materiais e Métodos) ao retirar, da solução orgânica com os lipídeos totais, os gangliosídeos com o auxílio de soluções aquosas.

GANGLIOSÍDEOS

Os gangliosídeos foram descobertos por Klenk (80)

que assim os designou por ocorrerem sobretudo na matéria cinzenta do cérebro. Posteriormente revelou-se a presença de gangliosídeos em muitos outros tecidos (5,22,61,107,146,172). A principal característica que distingue os gangliosídeos dos outros glicolipídeos é a presença de ácido N-acetilneuramínico (NANA) em várias proporções, ligado a outros açúcares da molécula, em regra a galactose.

De comum com os outros esfingolipídeos, os gangliosídeos têm a esfingosina (de 18 átomos de carbono e raramente de 20), com um ácido em ligação amida, sendo o esteárico um dos mais frequentemente encontrados. Ao resultado desta combinação, uma ceramida, liga-se então a cadeia glicosídica pelo hidroxilo terminal da ceramida, através de uma ligação glicosídica com o topo redutor, habitualmente a glucose, do oligossacarídeo.

Uma sugestão interessante àcerca dos gangliosídeos (65) é a do estabelecimento de uma ponte de hidrogénio entre o oxigénio carbonílico do ácido e o hidrogénio do hidroxilo livre na ceramida. Tal ligação tenderia a afastar uma da outra as duas cadeias apolares dos gangliosídeos. Isto deixaria as duas cadeias livres para ligações apolares inter-moleculares, situação que se verifica necessariamente nas membranas biológicas. É curioso assinalar que nos modelos de membranas, raramente se procura ter em conta os gangliosídeos. E no entanto, é conhecida a sua participação nessas estruturas.

Característica única entre os lipídeos é a sua solubilidade na água. Isto deve-se à predominância na sua molécula de resíduos de açúcares e seus derivados. A presença desses açúcares na molécula contrabalança a parte apolar sem que por isso impeça que os gangliosídeos possam extrair-se dos tecidos biológicos, entre eles o nervoso, com os solventes mais indicados para os lipídeos. O que acontece é que uma vez feita a extracção com os solventes orgânicos habituais, a água retira destes os gangliosídeos. A Fig. 1 dá conta da estrutura dos principais gangliosídeos designados segundo Burton (31) e apresentados com a notação correntemente seguida para eles. A Fig.2 mostra de modo desenvolvido o gangliosídeo B_3, um dos mais abundantes no cérebro. Um outro sistema de nomenclatura é o de Svennerholm (154). Sendo muito utilizado na bibliografia, é no entanto mais complicado e não possibilita tão facilmente a designação

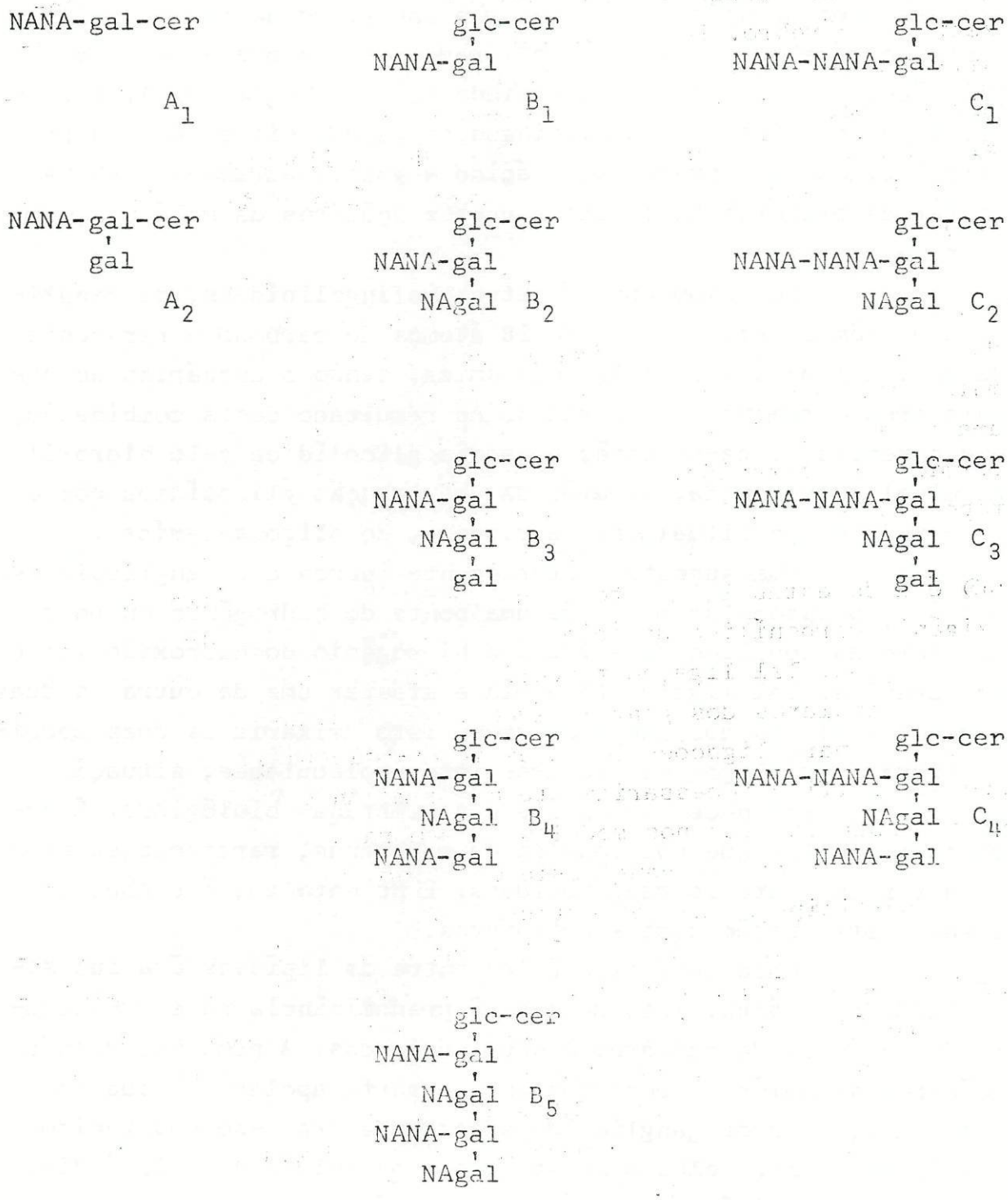


Fig. 1. Estrutura dos principais gangliosídeos segundo a nomenclatura de Burton. Abreviaturas: NANA, ácido N-acetilneuramínico; glc, glucose; gal, galactose; NAgal, N-acetilgalactosamina; cer, ceramida. A atribuição de B_5 ao gangliosídeo inferior faz-se aqui tentativamente.

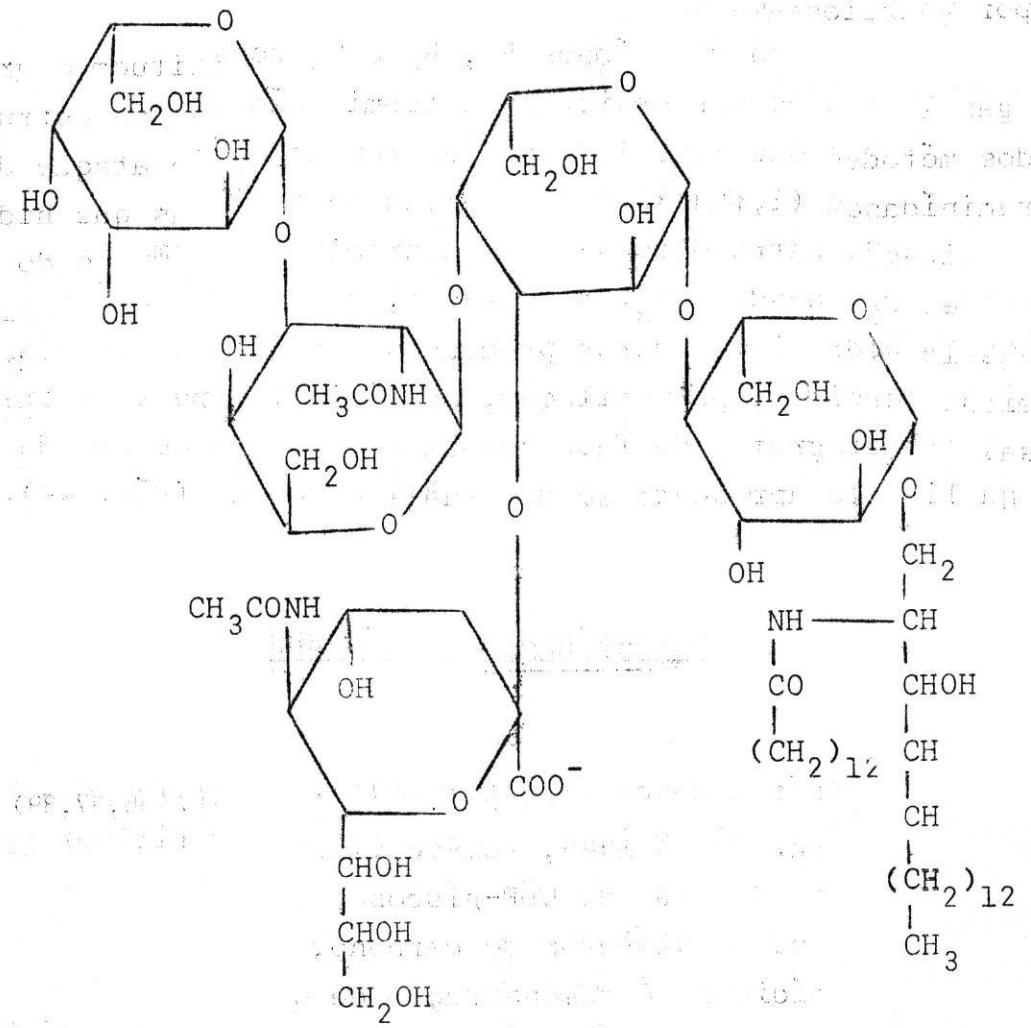


Fig. 2. Estrutura do gangliosídeo B_3, com a seguinte constituição:

gal(1-3)NA-gal(1-3)gal(1-4)glc(1-1)ceramida
(3
↑
2)
NANA

Os números entre parênteses referem-se aos hidroxilos dos açúcares entre os quais se estabelecem as respectivas ligações.

de novos compostos. Assim, por exemplo, um novo gangliosídeo descoberto por Svennerholm (156) pode designar-se imediatamente por gangliosídeo B_5.

Os gangliosídeos B_3, B_4 e C_3 constituem o grosso dos gangliosídeos cerebrais. Na determinação da sua estrutura um dos métodos que mais informações tem dado é o ataque das neuraminídases (1,30,113,130), enzimas bacterianas que hidrolisam a ligação entre dois N-acetilneuraminatos como os do gangliosídeo C_3, dando o B_3. No entanto, o NANA deste é resistente àquela hidrólise. Outros processos analíticos são hidrólises químicas parciais, permetilação, ozonólise, espectrometria de massa, cromatografia de fase gasosa e de placa em camada delgada. Na Fig. 10 apresenta-se uma análise destas (Pág. 44).

NUCLEOTÍDEOS DE AÇÚCARES

Após a descoberta por Leloir e col.(36,37,39) da UDP-glucose (Fig. 3) em 1949, tem-se vindo a verificar serem os nucleotídeos do tipo da UDP-glucose os precursores para a síntese in vivo de hidratos de carbono, ligados ou não a partes não glucídicas. A demonstração de que estes compostos são realmente os dadores de açúcares fez-se nos glicolipídeos por Burton e col. (35) em 1958 com a síntese de cerebrosídeos a partir da UDP-galactose e para as glicoproteínas nos laboratórios de Roseman(10,41)e Winzler (105,120) em 1964.

A Fig. 4 dá ideia como se formam os nucleotídeos de açúcares a partir dos trifosfatos de nucleosídeo e dos monossacarídeos, com activação de monossacarídeos precursores por fosforilação à custa de ATP (reacções 2, 3 e 10) e sucessivas transformações até às formas prontas para a incorporação enzimática nos glicolipídeos e glicoproteínas. As reacções que se apresentam não passam de uma compilação das vias mais importantes já descobertas e destas, só pequeno número se demonstrou ocorrer no cérebro (reacções 2, 10 e 11). No entanto, como todos os intermediários se têm isolado do cérebro, têm de estar presentes no tecido nervoso todas as enzimas necessárias às transformações resumidas na Fig.4 ou outras que conduzam aos

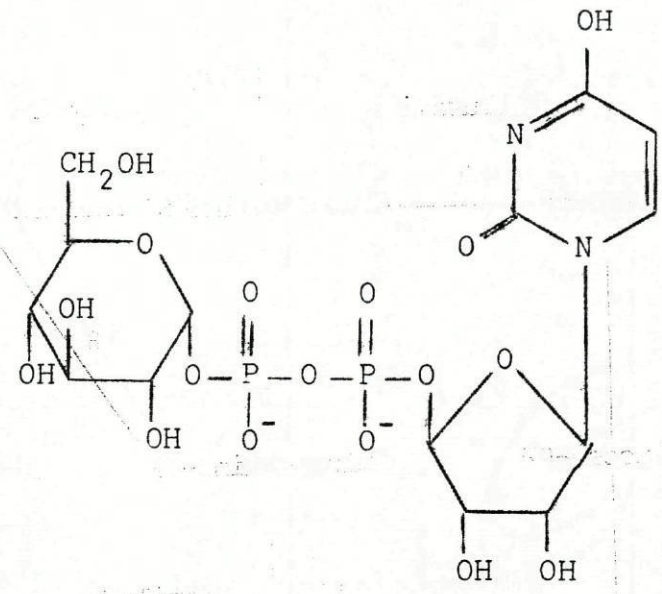


Fig. 3. Estrutura da uridina-difosfato-glucose (UDP-glucose)

mesmos produtos finais. No Quadro 1. indicam-se as enzimas que catalisam as reacções da Fig. 4, bem como onde foram primeiro descobertas. No Quadro 1 empregam-se para as enzimas os nomes aconselhados pela União Internacional de Bioquímica (67) bem como a respectiva numeração sistemática.

GLICOPROTEÍNAS

Tal como os glicolipídeos e os polissacarídeos, as glicoproteínas encontram-se nas membranas plasmáticas das células, participando assim no seu revestimento externo. Embora seja este o aspecto que se pretende aqui evidenciar pois é o mais

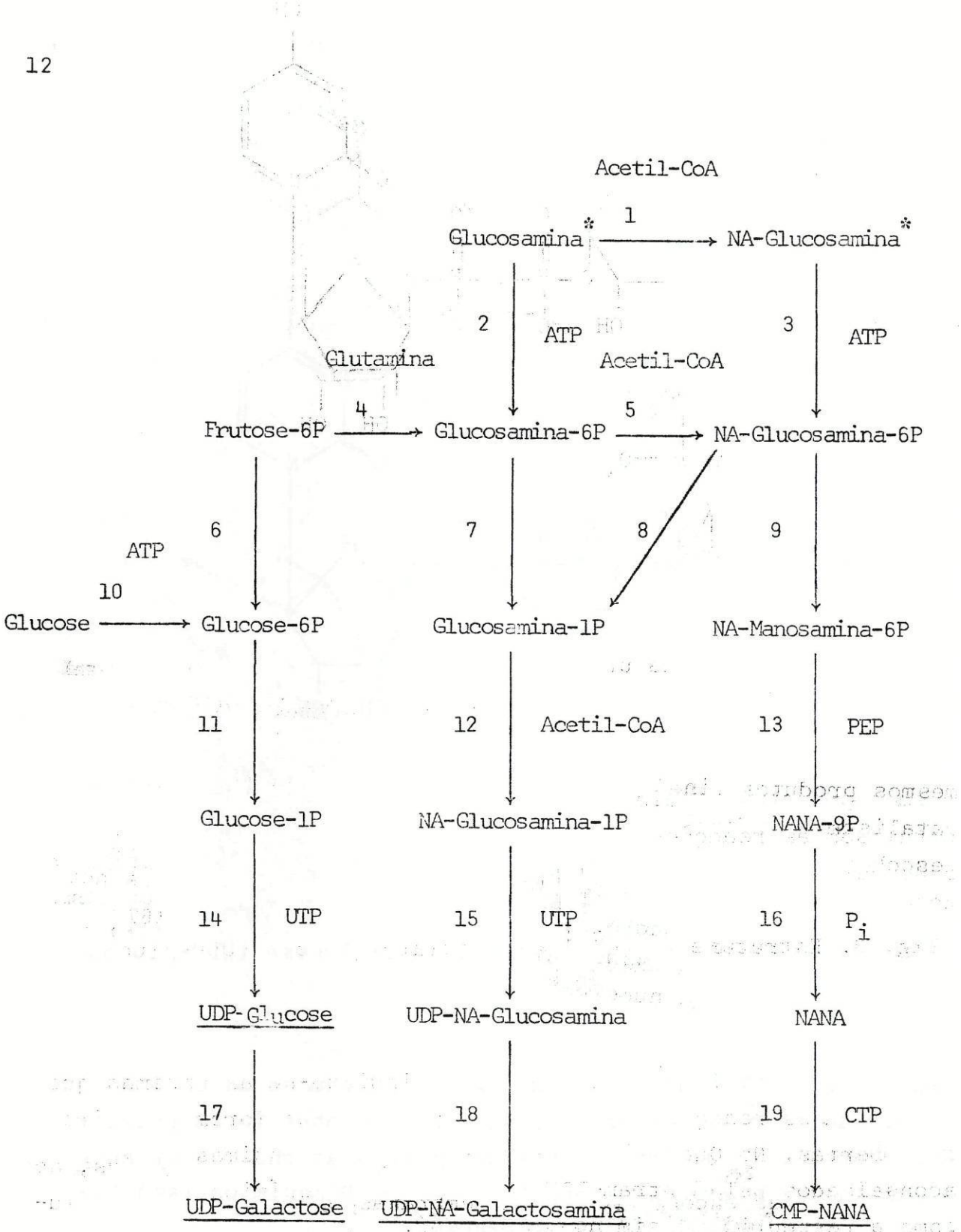


Fig. 4. Principais reacções para a activação dos açúcares e seus derivados, tornando-os aptos à sua incorporação em glicoproteínas, glicolipídeos e mucopolissacarídeos. Estão marcados com asterisco (*) os compostos usados neste estudo e sublinhados os produtos em condições de incorporação, e de ocorrência comum nos gangliosídeos e glicoproteínas. Ver no Quadro 1 a designação das enzimas bem como de onde foram descobertas pela primeira vez.

Quadro 1

Enzimas (67) que catalizam as reacções indicadas na Fig. 4 e origens de onde foram isoladas pela primeira vez.

Reacções	Enzimas		Origem
1	Acetil-CoA:2-amino-2-desoxi-D-glucose N-acetiltransférase	2.3.1.3	Fígado (102)
2	ATP:D-hexose 6-fosfotransférase	2.7.1.1	Cérebro (134)
3	ATP:2-acetamido-2-desoxi-D-glucose 6-fosfotransférase	2.7.1	Fígado (87)
4	L-Glutamina:D-frutose-6-fosfato amino-transférase	2.6.1.16	E. coli (167)
5	Acetil-CoA:2-amino-2-desoxi-D-glucose-6--fosfato N-acetiltransférase	2.3.1.4	Fígado,rim (28,88, músculo 102)
6	D-Glucose-6-fosfato cetolisomérase	5.3.1.9	Músculo (132)
7	2-Amino-2-desoxi-D-glucose-1,6-difosfato: 2-amino-2-desoxi-D-glucose-1-fosfato fosfotransférase	2.7.5	E. coli (167)
8	2-Acetamido-2-desoxi-D-glucose-1,6-di-fosfato:2-acetamido-2-desoxi-D-glucose--1-fosfato fosfotransférase	2.7.5.2	Sub-maxila (40)
9	2-Acetamido-2-desoxi-D-glucose-6-fosfato 2-epimérase	5.1.3	Rim (121)
10	ATP:D-hexose 6-fosfotransférase	2.7.1.1	Cérebro (46)
11	α-D-Glucose-1,6-difosfato:α-D-glucose--1-fosfato fosfotransférase	2.7.5.1	Cérebro (45,91)
12	Acetil-CoA:2-amino-2-desoxi-D-glucose-1--fosfato N-acetiltransférase	2.3.1	E. coli (167)
13	N-Acetilneuraminato-9-fosfato fosfoenol-piruvato-liase	4.1.3	Fígado (164)
14	UTP:α-D-glucose-1-fosfato uridil-transférase	2.7.7.9	Fígado (2)
15	UTP:2-acetamido-2-desoxi-α-D-glucose-1--fosfato uridiltransférase	2.7.7.23	E. coli (167)
16	N-Acetilneuraminato-9-fosfato hidrólase	3.1.3	Rim (121)
17	UDP-glucose 4-epimérase	5.1.3.2	Fígado (86)
18	UDP-2-acetamido-2-desoxi-D-glucose 4-epimérase	5.1.3.7	Fígado (38)
19	CTP:N-acetilneuraminato citidil-transférase	2.7.7	Sub-maxila (122)

relevante para o caso do cérebro, neste estudo, as glicoproteínas desempenham inúmeras funções, estando presentes no plasma, tecido conjuntivo e membranas intracelulares. Algumas são hormonas e outras enzimas, existindo nos mais variados seres vivos, desde os mamíferos às bactérias.

Estrutura

Cada molécula de glicoproteína tem uma ou mais unidades oligossacarídicas ligadas à cadeia peptídica por ligação covalente (glicosídica). Exemplos extremos de glicoproteínas são a hemaglutinina da soja (89) com uma cadeia oligossacarídica e a glicoproteína submaxilar da ovelha (58) com 800. Tal como nos gangliosídeos, participam das unidades oligossacarídicas a glucose, galactose, N-acetilgalactosamina e ácido N-acetilneuramínico, e ainda outros açúcares, como a xilose, manose, fucose e arabinose, estes dois últimos da série L, e ainda derivados do ácido neuramínico diferentes do NANA.

Conforme se estudam glicoproteínas, o que vem sucedendo com intensidade apenas na última década, vai-se dando conta da prodigiosa variedade da sua composição, sobretudo no que respeita à parte glicosídica. Não só o número e composição das cadeias oligossacarídicas varia de composto para composto, como dentro da mesma espécie molecular, com ligeiras diferenças de composição e diversos graus de acabamento daquelas cadeias. Caso típico é o da fetuína (138,139), uma globulina do plasma fetal. Este fenómeno observa-se também nos polissacarídeos, com um número variável de monossacarídeos. As cadeias oligossacarídicas podem ser lineares ou ramificadas e ligam-se tanto a hidroxilos (serina, treonina, hidroxilisina e hidroxiprolina) como a aminas (asparagina) dos aminoácidos da cadeia peptídica. Apresentam-se na Fig. 5 as estruturas de algumas cadeias oligossacarídicas de glicoproteínas. É patente a semelhança com a parte glicosídica dos gangliosídeos, embora, repete-se, seja muito maior a variedade dos açúcares componentes nas glicoproteínas. Também diferem os tipos de ligação glicosí

glc-gal-O-lisina-proteína

NANA-NAgal-O-serina-proteína

$(NANA\text{-}gal\text{-}NAglc)_4$-(man,man,man,NAglc)-NAglc-NH-asparagina-proteína

Fig. 5. Estrutura da parte glicosídica das seguintes glicoproteínas, de cima para baixo: membrana basal dos glomérulos renais (140), sub-maxilar da ovelha (58) e fetuína (138,139), apresentando-se sublinhada a parte proteica das moléculas.

dica, pois nos gangliosídeos um hidroxilo da ceramida une-se ao primeiro açúcar por ligação glicosídica, enquanto nas glicoproteínas isso tanto se verifica com um hidroxilo alcoólico de um aminoácido como no 1º e 2º exemplos da Fig. 5 (58,140) ou a uma amina como no 3º exemplo (138,139).

As glicoproteínas podem classificar-se pelos tipos de ligação açúcar-proteína, composição das cadeias oligossacarídicas e peso molecular (141).

Metabolismo das glicoproteínas

Tal como nos gangliosídeos, as cadeias oligossacarídicas formam-se pela anexação, catalisada por transférases, dos açúcares a partir dos seus derivados activados pelo UDP e CPM. Há indicações de que pelo menos em alguns casos (142), as cadeias peptídicas se formam antes e independentemente das cadeias glicosídi

cas. Estas formam-se pela deposição sucessiva dos diversos monossacarídeos, começando pelo elo de ligação à proteína e terminado pelo açúcar mais externo. Encontraram-se já diversas glicosiltransférases na fracção corpuscular de diversos tecidos e existem indicações de que, uma vez formadas as cadeias proteicas, estas migram ao longo das membranas do retículo endoplasmático (42,50,109,165), de onde recebem sucessivas moléculas de açúcar. Isto sugere que a própria disponibilidade dos nucleotídeos de açúcares celulares pode ser um factor de regulação das quantidades de glicoproteínas a formar e eventualmente a excretar pela célula, como no caso das hormonas gonadotrópicas que são glicoproteínas. Um factor de regulação da síntese das glicoproteínas, este comprovado experimentalmente (84), é o da inibição pela UDP-NAglc da enzima (reacção 4 da Fig. 4) que converte a frutose-6P em glucosamina-6P. Este é de resto um caso típico de retro-inibição de um passo comprometido (145,168) que inicia uma sequência metabólica que tem como único fim produzir um composto, o inibidor, quando atinge determinada concentração.

A degradação das glicoproteínas é de tipo hidrolítico (50) e é determinada pelas enzimas dos lisossomas, o que é comum a outros tipos de macromoléculas. As enzimas hidrolíticas têm servido para o esclarecimento da estrutura das glicoproteínas, como por exemplo a neuramídase bacteriana (113).

Glicoproteínas do tecido nervoso

Além do interesse óbvio das glicoproteínas como hormonas e enzimas, estes compostos completam a acção filtrante dos glomérulos renais, servem como defesas (imunoglobulinas), transportadores (transferrina) ou protectores (mucinas).

Para o cérebro, a sua função mais importante é sem dúvida o contacto intercelular. Sabe-se que as glicoproteínas participam nos fenómenos de reconhecimento entre as células, razão pela qual existem no extrerior das membrananas plasmáticas, como no caso do cérebro, nas sinapses. Neste contexto, é fácil de perceber quão decisiva deve ser a contribuição das glicoproteínas do sistema nervoso central nos fenómenos de transmissão

dos impulsos nervosos.

Se o conhecimento das glicoproteínas é limitado, é-o ainda mais no que respeita às glicoproteínas do cérebro, talvez devido à dificuldade da sua dissolução, tanto em solventes orgânicos como nos aquosos. Assim, só recentemente se tem estudado com alguma profundidade as glicoproteínas cerebrais (7,9,16-19,50,51,74,75,100,101,116,162).

BIOQUÍMICA DOS LIPÍDEOS DO TECIDO NERVOSO

A postulação de que os lipídeos cerebrais têm de estar de algum modo associados aos fenómenos intrincadíssimos da actividade cerebral não oferece dificuldades nem grandes receios de desmentido. Já a definição dos meios segundo os quais tal associação decorre implica a superação de obstáculos formidáveis, e relativamente ao esclarecimento já conseguido noutros campos da bioquímica, os êxitos nesta área têm de considerar-se limitados.

Entre muitos, um dos factos que tem dificultado o estudo do metabolismo no sistema nervoso central, é a chamada barreira sanguínea cerebral, um conjunto de factores que impedem o acesso ao interior das células nervosas das substâncias que circulam nos vasos sanguíneos que as alimenta. Entre as substâncias de acesso difícil ao meio intracelular encontram-se as que possuem cargas eléctricas líquidas, como os electrólitos dos fluidos extracelulares, e as moléculas de peso molecular elevado.

Uma das técnicas que se têm empregado com maior êxito nas tentativas de esclarecimento dos processos bioquímicos do sistema nervoso, como de resto em quase todas as áreas da bioquímica, é o dos isótopos radioactivos. O seu emprego tem abrangido técnicas in vitro bem como in vivo.

É oportuna a exposição de alguns aspectos relacionados com o metabolismo dos lipídeos cerebrais, para melhor se compreenderem as razões da escolha e efeitos da administração dos precursores radioactivos utilizados no presente estudo. Têm particular interesse, portanto, as vias metaból i-

cas de síntese in vivo, que se passam a resumir.

Síntese dos ácidos gordos

Esta síntese, como aliás a dos outros lipídeos ou suas partes integrantes no tecido nervoso, não diferem substancialmente da que se verifica noutros órgãos ou tecidos (21).

Formação da acetil CoA

A unidade fundamental para a formação dos ácidos gordos é a acetil-coenzima A (abreviadamente acetil-CoA), forma activa do acetato (118,119). Em condições normais, as principais fontes de acetil-CoA são a glucose e outros materiais glucogénicos e os ácidos gordos. A glucose, pela via glicolítica, origina piruvato, cuja descarboxilação oxidativa produz a acetil-CoA, dentro da mitocôndria. A formação de acetil-CoA a partir dos ácidos gordos também é intramitocondrial. A acetil-CoA intramitocondrial existe num poço comum em que as moléculas são indistinguíveis quanto à origem. A síntese de novo dos ácidos gordos é extramitocondrial, pois dá-se na fracção solúvel do citoplasma. Isto obriga a acetil-CoA a passar para fora da mitocôndria. Tal passagem não é directa, pois a membrana mitocondrial é impermeável à coenzima A. Existem dois mecanismos conhecidos, mediados pela carnitina e pelo citrato.

A carnitina efectua principalmente a importação de ácidos gordos para a mitocôndria, mas pode também exportar dela o acetato. As reacções são as seguintes, respectivamente dentro e fora da mitocôndria:

Dentro Acetil-CoA + carnitina $\xrightarrow{20}$ CoA + acetil-carnitina

Fora Acetil-carnitina + CoA $\xrightarrow{21}$ acetil-CoA + carnitina

Mediação do citrato

A mediação do citrato é todavia mais importante que

a da carnitina na exportação de acetato pela mitocôndria, e funciona segundo o seguinte esquema: inicia-se pela conjugação do oxaloacetato à acetil-CoA para dar citrato, libertando CoA. Esta reacção funciona em pleno quando existe abundância tanto de oxaloacetato como de acetil-CoA; tal é o caso das situações em que é viável a síntese líquida de ácidos gordos, nomeadamente, a abundância de glucose ou de material glucogénico. Além de produzir acetil-CoA por descarboxilação, o piruvato pode ser também carboxilado, igualmente dentro da mitocôndria, dando oxaloacetato à custa de ATP. Nesta situação de abundância, o aumento de citrato é simultâneo à existência de níveis altos de ATP, o qual inibe a desidrogénase do isocitrato, refreando uma das possibilidades de consumo do citrato formado. Fica livre a outra possibilidade que é a passagem para o citoplasma. Aí, sucede a seguinte sequência de reacções (137):

$$\text{Citrato} + \text{ATP} + \text{CoA} \xrightarrow{22} \text{Oxaloacetato} + \text{acetil-CoA} + \text{ADP} + P_i$$

$$\text{Oxaloacetato} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{23} \text{Malato} + NAD^+$$

$$\text{Malato} + NADP^+ \xrightarrow{24} \text{piruvato} + \text{NADPH} + H^+ + CO_2$$

O piruvato que se forma nesta sequência de reacções pode entrar na mitocôndria e reforçar o nível intramitocondrial de acetil-CoA e oxaloacetato. Além de aparecer a acetil-CoA no citoplasma, note-se que nele surgem também, por esta via, o NADPH, tanto um como outro necessários para a síntese dos ácidos gordos.

Utilização de acetato livre

De escassa importância quantitativa na célula em condições normais, mas particularmente relevante neste estudo é a utilização de acetato livre na formação de acetil-CoA. Existe uma enzima, a tiocínase do acetato, que catalisa a seguinte reacção:

$$\text{Acetato} + \text{CoA} + \text{ATP} \xrightarrow{25} \text{Acetil-CoA} + \text{AMP} + PP_i$$

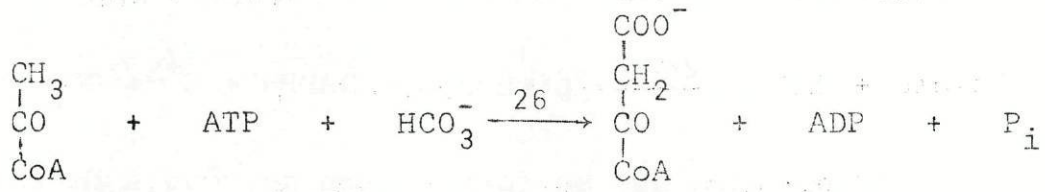
Esta reacção de activação tal como a reacção equi-

valente para qualquer ácido gordo livre (94), consome energia, sob a forma de ATP, hidrolisando-se eventualmente as suas duas ligações pirofosfato, visto que o PP_i se cinde subsquentemente em duas moléculas de fosfato pela acção de pirofosfátase, contribuindo também para deslocar para a direita a reacção 25, tal como vai escrita.

Carboxílase da acetil-CoA

Uma vez presente no citoplasma em concentração suficiente, a acetil-CoA pode converter-se em ácidos gordos, um dos seus vários destinos metabólicos.

A reacção fundamental para a conversão de acetil-CoA em ácidos gordos, nomeadamente o palmítico, é a carboxilação da acetil-CoA (20, 25, 94). Esta reacção é catalisada pela carboxílase da acetil-CoA, enzima que como outras carboxílases usa a biotina como cofactor (reacção 26).



Acetil-CoA Malonil-CoA

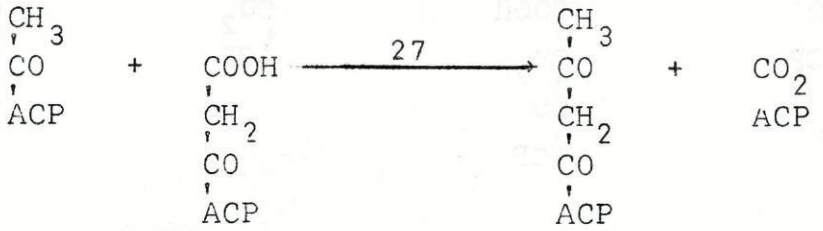
Como se vê pela reacção, a carboxilação gasta energia fornecida pelo ATP. A enzima possui carácter alostérico e tem como modificador positivo o citrato (160), que assim no citoplasma exerce mais um efeito favorável à síntese dos ácidos gordos. Esta reacção, que se destina exclusivamente à síntese de palmitato, é um passo comprometido (142,168) e é passível de inibição alostérica pelo produto terminal da sequência da reacção, o palmitato.

Sistema polienzimático do citoplasma

Ao contrário da oxidação dos ácidos gordos na mitocôndria em que são transportados sempre pela CoA, na síntese citoplasmática, e a partir da carboxilação da acetil-CoA, os

acilos são transferidos para uma proteína transportadora de acilos (ACP) (56,57,96,97,161) e nela permanecem até final da síntese. Assim, a acetil-CoA e a malonil-CoA passam a acetil-ACP.

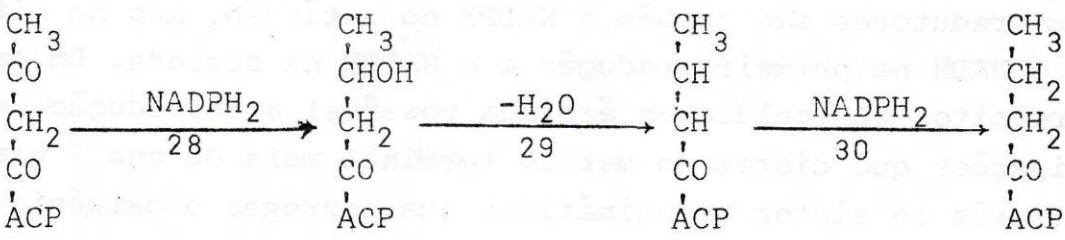
A reacção seguinte (nº 27), bem como as restantes até final, decorrem num sistema polienzimático, cujo arranjo estrutural varia de órgão para órgão, mas em que a função é paralela.



Acetil-ACP Malonil-ACP Acetoacetil-ACP

Verificou-se que a adição de unidades de dois átomos de carbono provenientes da malonil-ACP se faz ao carbonilo da acetil-ACP, cujo carbono do metilo fica sendo mais distante do carbono 1. Isto significa, por outro lado, que a ACP que suportava o malonilo parsa a transportar a cadeia aumentada pela condensação. A libertação de CO_2 nesta reacção fornece o impulso para que todas as reacções sintéticas dos ácidos gordos se desloquem realmente no sentido da síntese, sendo esta reacção (nº 27) virtualmente irreversível.

As três reacções seguintes (28 a 30) efectuam a redução completa do carbonilo em C-3.

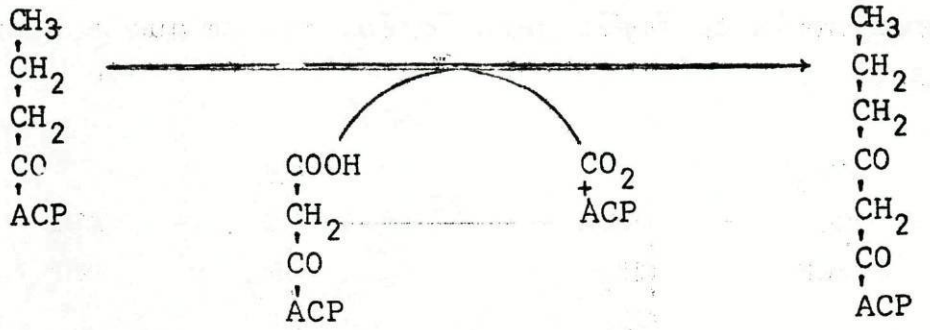


Acetoacetil-ACP Hidroxibutiril-ACP Crotonil-ACP Butiril-ACP

O NADPH que se consome nas reacções 28 a 30 é fornecido pelas reacções 22 a 24, em que o citrato fornece, no ci

toplasma, acetil-CoA. Existem outras vias de formação de NADPH, a principal das quais é a via oxidativa do fosfogluconato.

Dá-se então nova condensação, passando a cadeia carbonada de 4 a 6 átomos de carbono (reacção 31).



Butiril-ACP Malonil-ACP Caproil-ACP

Após a formação do caproil-ACP, sucedem-se alternadamente novas reduções pelo NADPH e adições de unidade de dois carbonos fornecidos pela malonil-ACP, até que finalmente se atinge a palmitil-ACP, que por hidrólise dá o ácido palmítico com 16 átomos de carbono.

Alongamento e insaturação da cadeia

Os restantes ácidos da cadeia superior podem formar-se tanto na mitocôndria como no retículo endoplasmático, pelo alongamento posterior, ainda à custa de adições de unidades com dois carbonos, mas agora fornecidos pela malonil-CoA (retículo) ou pela acetil-CoA (mitocôndria) (13,103,144). Os agentes redutores são também o NADPH no retículo, mas na mitocôndria é o NADH na primeira redução e o NADPH na segunda. Em ambos os organitos sub-celulares é ainda possível a introdução de duplas ligações que distem do metilo terminal mais do que 7 carbonos, através de sistemas enzimáticos que empregam o oxigénio molecular e o NADPH como corredutor.

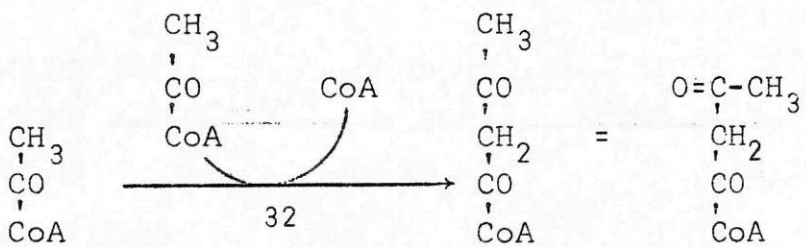
Para a incorporação de ácidos gordos na parte restante das moléculas dos lipídeos tanto podem servir os que vêm como tais na dieta como os que se formam à custa da acetil-CoA. Em condições normais, é a dieta que supre a maioria desses áci-

dos gordos. Aqueles que têm duplas ligações a menos de 7 carbonos do metilo terminal nem podem ser sintetizados pelos mamíferos e, sendo-lhes essenciais, têm de vir na dieta (29). É o caso dos ácidos linoleico e linolénico.

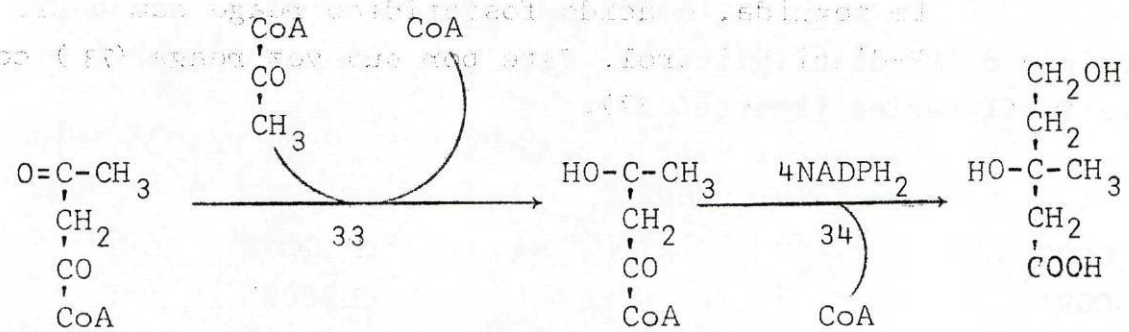
Pode verificar-se pelo exposto que a administração de acetato marcado no metilo com trítio, conduzirá ao aparecimento de ácidos gordos marcados no metilo terminal e, a partir dele, todos os carbonos de numeração par.

Síntese do colesterol

O colesterol, tal como os ácidos gordos, forma-se exclusivamente a partir da acetil-CoA (118), numa série de reacções que se inicia pelas seguintes:



Acetil-CoA — Acetoacetato



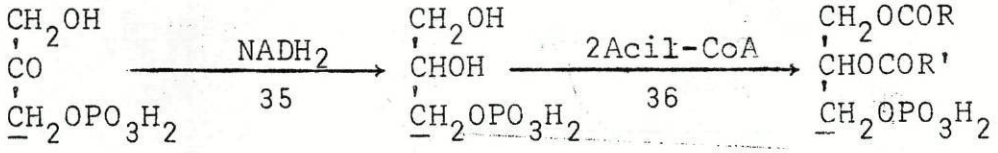
Acetil-CoA

Acetoacetato — Hidroximetil-glutaril-CoA — Ácido mevalónico

A última destas reacções (nº 34), é o passo comprometido (145,168) na síntese do colesterol, pois que o ácido mevalónico não tem nos mamíferos outro destino que a sua transformação em colesterol (157). Esta reacção é susceptível de regulação e é a que condiciona a velocidade global do processo. Dos 27 átomos de carbono do colesterol, 15 provêm do metilo da acetil-CoA: os que têm os números 1, 3, 5, 7, 9, 13, 15, 17, 18, 19, 21, 22, 24, 26 e 27, provindo os restantes doze do carboxilo (90).

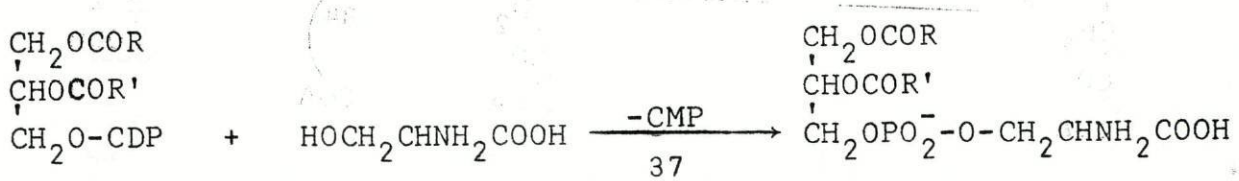
Síntese dos fosfoglicerídeos

O ácido fosfatídico é precursor dos fosfoglicerídeos e pode formar-se segundo as reacções 35 e 36 (114,175).



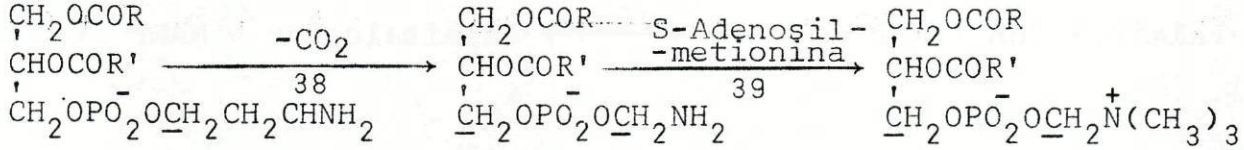
Diidroxiacetona-fosfato — Glicerol-3-fosfato — Ácido fosfatídico

Em seguida, o ácido fosfatídico reage com o CTP para dar o CDP-diacilglicerol. Este por sua vez reage (73) com a fosforil serina (reacção 37).



CDP diacilglicerol — Serina — Fosfatidilserina

A fosfatidilserina dá então origem (reacção 38 e 39) aos outros dois fosfoglicerídeos mais abundantes (27).



Fosfatidilserina — Fosfatidiletanolamina — Fosfatidilcolina

Na degradação da glucose pela glicólise, os seus carbonos 1 e 6 correspondem ao carbono do fosfato de diidroxiacetona que se encontra sublinhado na reacção 35. Como por outro lado, também correspondem ao carbono 3 da serina (sublinhado nas reacções 37 a 39), vê-se como aqueles carbonos da glucose aparecem nos três fosfoglicerídeos das reacções 38 e 39. Os mesmos carbonos 1 e 6 são os que correspondem ao metilo da coenzima A, e por isso também os ácidos gordos têm átomos pares provenientes dos carbonos 1 e 6 da glucose.

Síntese dos esfingolipídeos

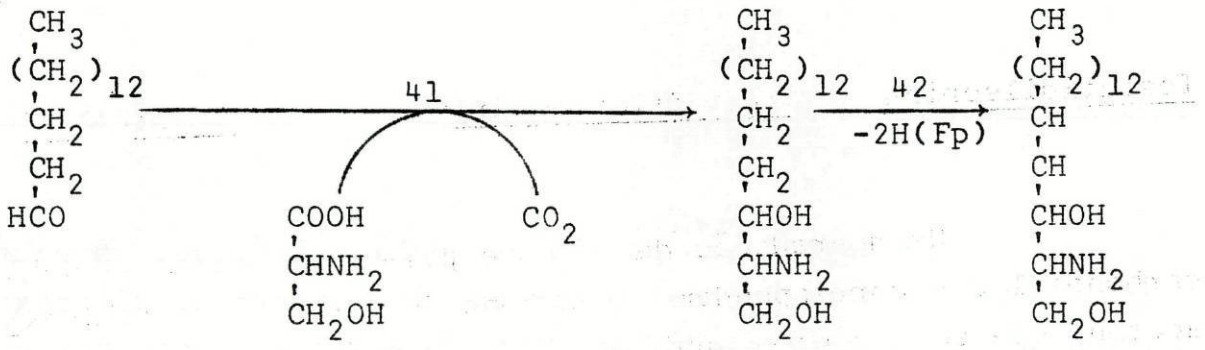
A esfingosina provêm de uma molécula de palmitil-CoA, a qual sofre a série de transformações indicadas nas reacções 40 a 42, em que intervém a flavoproteína (Fp) para reduzir a diidroesfingosina a esfingosina (23,24,33) Existem outras esfingosinas, por exemplo com 20 carbonos, cuja formação é paralela à indicada, mas partindo da estearil-CoA.

A esfingosina pode reagir por dois modos, dando num caso uma ceramida, noutro uma psicosina, conforme se lhe adicione à molécula um acilo gordo ou um açúcar (43), em ligações amida e glicosídica, respectivamente (reacções 43 e 44).

Pode considerar-se a ceramida como ponto de partida para a formação dos diversos esfingolipídeos, pois é a estrutura mais complexa comum a todos eles. Assim, por reacção com

a CDP-colina origina a esfingomielina, e por reacção com UDP--galactose ou UDP-glucose origina um cerebrosídeo (33,143).

$$\text{Palmitil-CoA} + \text{NADPH} + H^+ \xrightarrow{40} \text{Palmitaldeído} + NADP^+ + \text{CoA}$$



Palmitaldeído Serina Diidroesfingosina Esfingosina

$$\text{Ceramida} \xleftarrow[43]{\text{Acil-CoA}} \text{Esfingosina} \xrightarrow[44]{\text{UDP-Galactose}} \text{Psicosina}$$

Degradação dos lipídeos

A degradação dos lipídeos complexos nas suas partes constituintes tem-se verificado ser de natureza hidrolítica. Essas partes, como os ácidos gordos, glicerol, açúcares, etc., integram-se nos respectivos poços metabólicos para seguir os seus destinos, quer catabólicos quer anabólicos, por meio de ressíntese de compostos semelhantes àqueles de onde provinham ou de outros.

Entre as decomposições mais completas, saliente-se as dos ácidos gordos em acetil-CoA, composto que se junta ao de proveniência glicosídica.

Inter-relações glucose-lipídeos

Já se pôs em relevo a possibilidade de se converter glucose em ácidos gordos, através da sua glicólise que origina piruvato, e este em oxaloacetato e acetil-CoA, e como o acetato desta se integra nos ácidos gordos. Ou como a glucose se transforma em em fosfato de glicerol e serina (esta porque provém do ácido 3-fosfoglicérico da glicólise), e bem assim em qualquer dos açúcares dos glicoesfingolipídeos.

Para a conversão em sentido inverso, isto é, dos componentes dos lipídeos em glucose ou material glucogénico, é fácil de ver a sua possibilidade para a serina, glicerol e açúcares simples (glucose e galactose) de cerebrosídeos e gangliosídeos. Os aminoaçúcares já não são tão facilmente reconvertidos em açúcares simples. Impossível, de forma real, é a conversão de ácidos gordos, ou da acetil-CoA resultante, em glucose ou material glucogénico. De facto, nos mamíferos, para que dois carbonos da acetil-CoA se convertam em glucose é necessário que pelo menos outros dois átomos de material glucogénico se percam sob a forma de CO_2. Para que isso aconteça, tem a acetil-CoA de se transformar em oxaloacetato o qual pode dar fosfoenolpiruvato e este glucose pelo reverso da glicólise. Mas neste processo, dissipam-se nada menos de três moléculas de CO_2: duas, num ciclo de Krebs completo e a terceira na descarboxilação de oxaloacetato em fosfoenolpiruvato. No entanto, isto não quer dizer que os átomos do acetato da acetil-CoA não possam integrar-se na estrutura da glucose, pois de facto podem.

Portanto, embora um mamífero, como exemplo, tenha de gastar três carbonos de glucose para incluir dois carbonos de acetato em glucose, o que é certo é que se os átomos do acetato forem radioactivos, é possível obter glucose radioactiva in vivo.

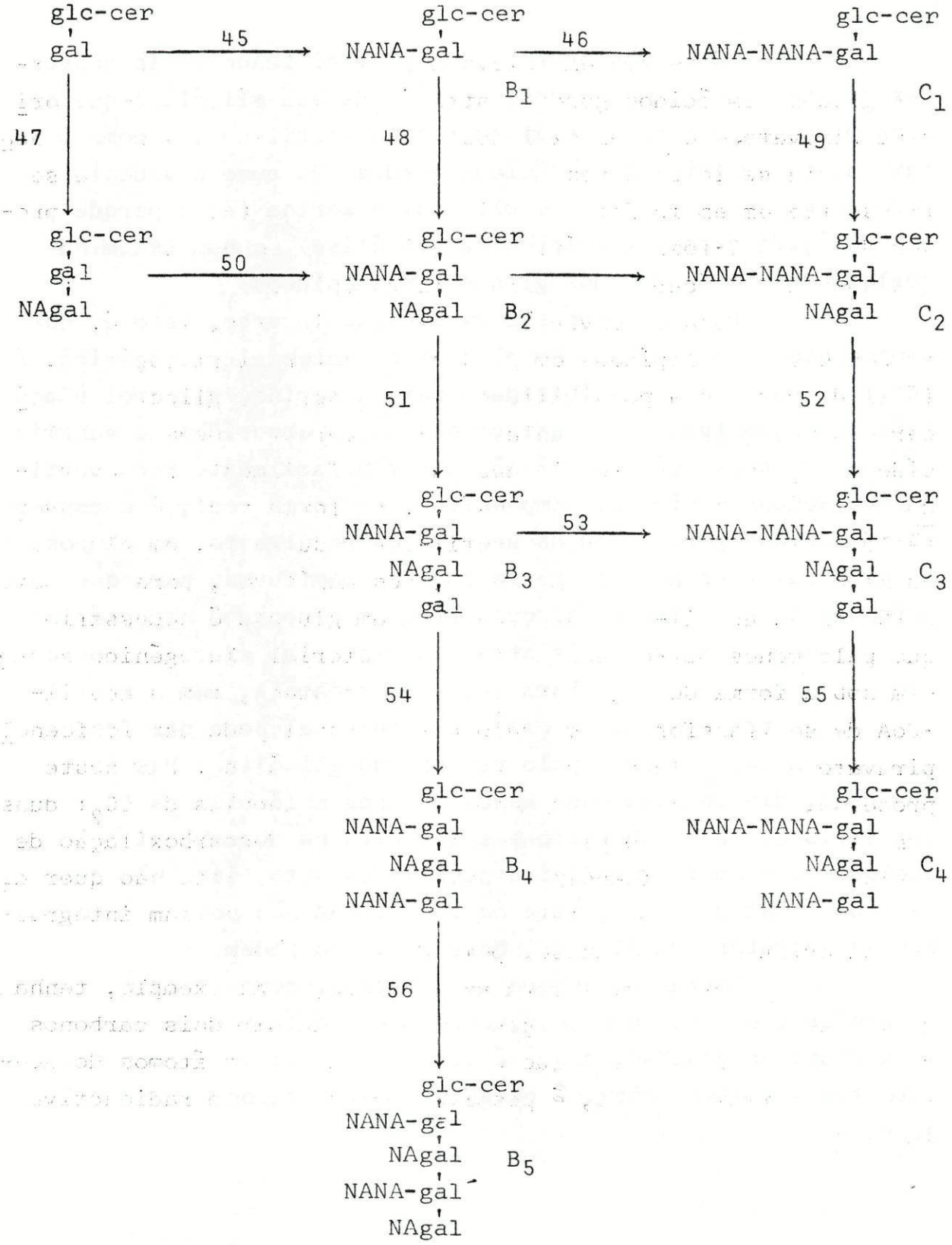


Fig. 6. Biossíntese dos gangliosídeos. Ver também o Quadro 2.

Quadro 2

Nucleotídeo-açúcar: aceitador transférases (enzimas do grupo 2.4) que catalisam as reacções representadas na Fig. 6.

Nucleotídeo	Açúcar	Reacções	Referências
CPM	NANA	45	77,95
		46	77
		50	61
		53	5
		54	77
		55	5
UDP	NA-gal	47	61
		48	77
		49	47,48
		56	158
UDP	gal	51	47,48,77
		52	47,48

METABOLISMO DOS GANGLIOSÍDEOS

Biossíntese

São já numerosos os trabalhos publicados sobre a biossíntese dos gangliosídeos, alguns mesmo fornecendo esquemas gerais das reacções respectivas (5,12,31,47,48,61,71,76, 77,95,123,171). Não existe acordo quanto aos mecanismos sintéticos, sobretudo quanto à sequência de algumas reacções, mas do que não parece haver já dúvidas é que os açúcares da parte glicasídica dos gangliosídeos são acrescentados sucessivamente, e um a um, à parte apolar, ou ceramida, a partir das suas formas activadas, ligadas a nucleotídeos. Estas formas activadas são as que se assinalam sublinhadas na Fig. 5. As enzimas que efectuam as reacções de transferência do açúcar do nucleotídeo

para o aceitador chamam-se transférases e pertencem ao grupo 2.4 das enzimas classificadas pela IUB (67). As reacções de transferência são do seguinte tipo:

Nucleotídeo-açúcar + aceitador → aceitador-açúcar + nucleotídeo

Na Fig. 6 procurou-se resumir as reacções já verificadas na síntese dos gangliosídeos, embora algumas dessas reacções não sejam aceites por alguns investigadores. No entanto, é bem possível que existam vários sistemas biossintéticos e que de facto as diferenças experimentais que parecem incompatíveis se devam a condições também diferentes. Assim, por exemplo, é possível que sistemas diferentes funcionem nos animais novos e nos adultos. No Quadro 2 completam-se as indicações da Fig. 6, com os dadores de açúcares respectivos.

Tendo presentes as reacções que levam à formação dos nucleotídeos de açúcares e as que utilizam estes para formar os gangliosídeos, é fácil de compreender que são diversas as escolhas de precursores para incluir átomos radioactivos nas moléculas dos gangliosídeos e assim possibilitar o seu estudo. Podem escolher-se marcadores inespecíficos que marquem todas as partes da molécula, tanto a hidrófoba como a hidrófila, ou então marcadores mais selectivos que façam incorporar o isótopo radioactivo mais num ponto do que noutro. São inespecíficos a ^{14}C-glucose marcada por diversas formas (33, 62, 146, 149), a ^{14}C-galactose (12, 33, 108), o ^{14}C-acetato (70, 79) e a 3-^{14}C-serina (33). Com a 2-^{14}C- etanolamina (173, 174) conseguiu-se marcar a esfingosina, enquanto outros precursores se destinam à parte glicosídica dos gangliosídeos, que é a mais específica deles. Estão neste caso a 1-^{14}C-glucosamina (33), ^{3}H-glucosamina (95), CMP-^{3}H-NANA, UDP-^{14}C-galactose (5) e a N-acetil-^{3}H-manosamina (83, 163). Nas experiências que se executam, usam-se ensaios in vitro (4, 5, 11, 12, 47, 61, 77, 171, 172) e menos frequentemente in vivo (33, 95, 149).

Já se publicaram alguns trabalhos sobre os gangliosídeos no cérebro do rato em desenvolvimento (33, 68, 104, 115, 124, 136, 148). Dos estudos efectuados, ressalta a convicção de serem os microssomas e as membranas externas dos sinaptossomas (44, 60, 159) os locais onde é mais activa a síntese dos gangliosídeos

cerebrais. Quanto à idade, não há dúvidas de que a velocidade de acumulação de gangliosídeos no cérebro é máxima nas duas primeiras semanas de vida, e por isso se escolhem animais com idades nesse período para os estudos de incorporação em gangliosídeos (5, 72, 83, 95). Nas experiências in vivo, empregam-se sobretudo as vias de administração intraperitoneal e intracerebral (33,72,83). Alguns autores têm investigado a localização intracerebral dos gangliosídeos (8,34,40,60,65,66, 68,92,159,169,170), que embora abundem mais na matéria cinzenta, também ocorrem na mielina (111,135,147,150,151), onde sofrem renovação mais lenta que noutras estruturas cerebrais. Isto aliás é típico da mielina, e está de acordo com a estabilidade que é de esperar numa membrana que tem como principal função o isolamento das fibras nervosas. Os seus cerebrosídeos, por exemplo, possuem tempos de semi-vida no rato adulto superiores a 1 ano (133).

Degradação dos gangliosídeos

Tal como com outras moléculas, a degradação dos lipídeos é de natureza hidrolítica, e têm-se identificado enzimas que promovem tais hidrólises, quer existentes no cérebro de mamíferos, quer pertencentes a outros animais e tecidos (1,26,30,82,83,85,112,128,130,158). O emprego judicioso das enzimas hidrolíticas tem conseguido fazer esclarecer a estrutura de gangliosídeos, de resto uma técnica geral para muitos compostos em bioquímica.

Renovação dos gangliosídeos

A renovação dos gangliosídeos por síntese e degradação é um factor importante a considerar no seu estudo, e há um trabalho muito interessante sobre os poços dos constituintes moleculares dos gangliosídeos (32), tendo-se observado diferentes tempos de semi-vida dos gangliosídeos conforme os precursores, em virtude de estes entrarem após a hidrólise em poços metabólicos solicitados muito diferentemente. Assim, enquanto

a 1-^{14}C-glucosamina origina nos gangliosídeos exclusivamente marcados os açúcares aminados, a 1-^{14}C-galactose é incorporada de modo a ficar carbono-14 em todos os açúcares. Ora o poço da galactose (e o da glucose na qual se converte prontamente) é solicitado para muitos fins, pelo que se perde rapidamente para a reincorporação nos gangliosídeos, mas o poço dos açúcares aminados já é muito menos solicitado, e então a reincorporação é mais extensa, e assim os tempos de semi-vida diferem conforme o precursor usado, sendo mais longo o referente à glucosamina.

Perturbações do metabolismo dos gangliosídeos

São várias as doenças nas quais se observam deficiências do metabolismo dos gangliosídeos (129). Uma das gangliosidoses mais bem estudadas é a de Tay-Sachs, onde a falta hereditária da enzima hidrolítica N-acetilgalactosídase que transforma o gangliosídeo B_2 em B_1 provoca a acumulação do B_2. Foi esta acumulação patológica que levou Klenk à descoberta dos gangliosídeos (80).

ESCOLHA DE PRECURSORES

Este estudo nasceu de uma sugestão do Prof. Robert M. Burton, que desde há anos se vem interessando pela bioquímica do tecido nervoso em desenvolvimento.

Tinha-se como um dos objectivos deste trabalho a marcação dos gangliosídeos in vivo de modo suficientemente intenso, específico e duradoiro para permitir localizá-los em autorradiografias.

O trítio teria, sobre o carbono-14 (o outro nuclídeo mais indicado) a vantagem de originar emissão de partículas beta com muito menor energia. Isto permitiria a definição mais perfeita nas emulsões radiográficas, das moléculas marcadas com trítio que produz grãos de prata mais finos do que os provenien

tes de radiações mais intensas.

Embora não se tendo alcançado aquele objectivo, este estudo conduziu a algumas observações interessantes.

^{3}H-Acetato (acetato-T)

A escolha deste composto tritiado neste estudo destinou-se principalmente a servir de termo de comparação nos ensaios iniciais de incorporação, em virtude de se tratar de um marcador não específico para os gangliosídeos. Na verdade, à sua activação teria de se seguir a incorporação virtualmente em todos os lipídeos, gangliosídeos e todos os outros, visto que se transformam em ácidos gordos e estes estão presentes em quase todos os lipídeos de tecido nervoso. E mais indirectamente, através da incorporação de seus átomos marcados em materiais glucogénicos, a presença de trítio é generalizada a todas as partes de qualquer lipídeo.

N-(^{3}H-Acetil)-glucosamina (NAG-T)

Procurou verificar-se o resultado da incorporação deste composto, o que ainda não fora ensaiado com este objectivo. Por outro lado, esperava-se que a incorporação de trítio proveniente deste composto nos gangliosídeos provocasse uma marcação intensa, específica e duradoira. Entre as razões que levaram a ter tal esperança está o facto de os aminoaçúcares serem muito menos solicitados para o metabolismo geral do que outros compostos como a glucose. Realmente, de entre os lipídeos, os gangliosídeos são os únicos compostos a possuirem aminoaçúcares, e mais particularmente, derivados N-acetilados. Embora os gangliosídeos não possuam propriamente N-acetilglucosamina mas o seu epímero N-acetilgalactosamina, não parecia oferecer qualquer dificuldade a sua conversão in vivo no outro açúcar, seu epímero. Esperava-se ainda que a actividade enzimática no cérebro capaz de libertar o acetato da molécula fosse reduzido, caso con-

trário, o acetato libertado iria incorporar-se, com o seu trítio e de modo inespecífico, em todos os lipídeos, gangliosídeos ou não, e tanto nas partes hidrófilas como hidrófobas.

1-^{14}C-glucosamina (GLN-T)

A escolha deste composto foi em parte devida a tratar-se também de um aminoaçúcar e do qual se esperava uma incorporação mais específica do que com a glucose, tal como foi antes salientado. O seu emprego nos estudos de declínio por substituição de isótopo tinha o interesse de poder estabelecer a comparação de um açúcar tritiado fora do anel glicosídico (NAG-T) com este que era marcado na cadeia carbonada. E sendo carbono-14, permitia, além disso, a sua discriminação relativamente ao trítio em experiências de marcação dupla, devido a serem muito diferentes as energias das emissões do trítio e do carbono-14.

6-^{3}H-glucosamina (GLN-T)

Este açúcar aminado com trítio ligado à cadeia carbonada serviu essencialmente de comparaçã- às outras duas situações: um açúcar com trítio numa cadeia lateral de acetato (NAG-T) e outro com carbono-14 no esqueleto carbonado do açúcar (GLN-C).

ESQUEMA DE ESTUDO

Objectivos

1. Introdução de açúcares na estrutura de gangliosídeos e glicoproteínas.

2. Avaliação da taxa de substituição dos isótopos incorporados.

3. Análise paralela dos lipídeos neutros e fosfolipídeos como termo de comparação.

Instrumentos

1. Hexosaminas com trítio ou carbono-14 como marcadores específicos.

2. Acetato tritiado como termo de comparação.

M A T E R I A I S E M É T O D O S

SOLUÇÕES DE COMPOSTOS RADIOACTIVOS

^{3}H-Acetato de sódio

O acetato, fornecido tal como as restantes substâncias radioactivas pela Tracerlab, continha 25 mc em 32,5 mg, com actividade específica igual a 104,7 c/mole.

Solução A. Concentração: 1 mc/ml. Dissolveu-se 1,3 mg em 1 ml de água.

Solução B. Concentração: 4 mc/ml. Dissolveu-se 1,7 mg em 0,325 ml de água.

N-(^{3}H-Acetil)-D-glucosamina

Solução C. O composto dissolvido em metanol recebeu-se em duas ampolas. Uma, com 0,71 mg/1,47 ml e 5 mc de trítio, ou 3,4 mc/ml. A outra ampola continha 3,55 mg/7,37 ml e 25 mc, ou seja também 3,4 mc/ml. Em ambas as ampolas o composto tinha a mesma actividade específica: 1.560 c/mole.

Solução D. Concentração: 5 mc/ml. Abriu-se a ampola pequena, secou-se em corrente de azoto e dissolveu-se com água o resíduo, transferindo-se a solução aquosa para uma proveta com rolha. Completou-se o volume de 1 ml e guardou-se a -20°.

Solução F. Concentração: 4 mc/ml. Misturou-se 0,3 ml de D com 0,072 ml de água.

Solução G. Concentração: 4 mc/ml. Tomaram-se 2,5 ml da solução metanólica C da ampola grande, transferindo-se o restante para uma proveta com rolha, guardando-se a -20°. Secou-se a alíquota em corrente de azoto e dissolveu-se o resíduo em 2,125 ml de água.

1-^{14}C-Glucosamina

O composto continha 1 mc em 22,4 mg, com actividade específica igual a 9,69 c/mole.

Solução H. Concentração: 0,2 mc/ml. Dissolveu-se o açúcar em 5 ml de água.

Solução I. Concentração: 0,233 mc/ml. Concentrou-se com azoto 1,4 ml de solução H com aquecimento a 37° e completou-se o volume de 1,2 ml de água.

N-(^{3}H-Acetil)-D-glucosamina+1-^{14}C-glucosamina

Solução J. Concentração: 0,225 mc de ^{14}C e 2,83 mc de ^{3}H em 1 ml. Misturou-se 1,4 ml de solução H com 1 ml de solução C. Concentrou-se com corrente de azoto e aquecimento a 37° e completou-se com água o volume de 1,2 ml.

6-^{3}H-glucosamina

Solução L. O composto veio dissolvido em etanol a 30 %, com 5 mc em 0,95 mg/0,5 ml. A actividade específica: 1.150 c/mole.

Solução M. Concentração: 4 mc/ml. Secou-se a solução com azoto e dissolveu-se o resíduo em 1,25 ml de água.

ANIMAIS DE EXPERIÊNCIA

Usaram-se ratos machos de variedade White Sprague-Dawley (Charles River) em ninhadas de 8 por cada mãe. Cerca do 13º dia após o nascimento, injectaram-se com soluções aquosas intraperitoneais (0,2 ml) ou intracerebrais (0,05 ml). Este último tipo de injecção praticou-se com seringa de tuberculina (0,25 ml), com agulhas muito finas (nº 28) e de 0,6 cm de comprimento (Fig. 7).

Conforme o tipo de experiência, decapitaram-se os animais em grupos e a intervalos convenientes. Quase todos os animais sobreviveram normalmente às injecções.

Nos primeiros dias em que ocorreu a eliminação máxima de isótopos por respiração sob a forma de $^{14}CO_2$ e $^{3}H_2O$, os animais conservaram-se em hote com o exaustor permanentemente ligado. Tanto às mães durante o aleitamento como aos próprios animais de experiência após o desmame foi-lhes proporcionada alimentação à vontade.

EXPERIÊNCIA 1. INCORPORAÇÃO DE TRÍTIO DE ^{3}H-ACETATO E N-(^{3}H-ACETIL)-GLUCOSAMINA OBSERVADA AO FIM DE 12 HORAS DE INCUBAÇÃO

Injecção de radioisótopos

As injecções de 0,2 mc fizeram-se em animais com 13 dias, e usaram-se 0,2 ml de soluções A de acetato-T e E de NAG-T para injecções intraperitoneais e 0,05 ml de soluções B e F para injecções intracerebrais. Cada solução aplicou-se a um lote de 4 animais. Passadas 12 horas de injecção, procedeu-se à extracção do tecido (cérebro e cerebelo).

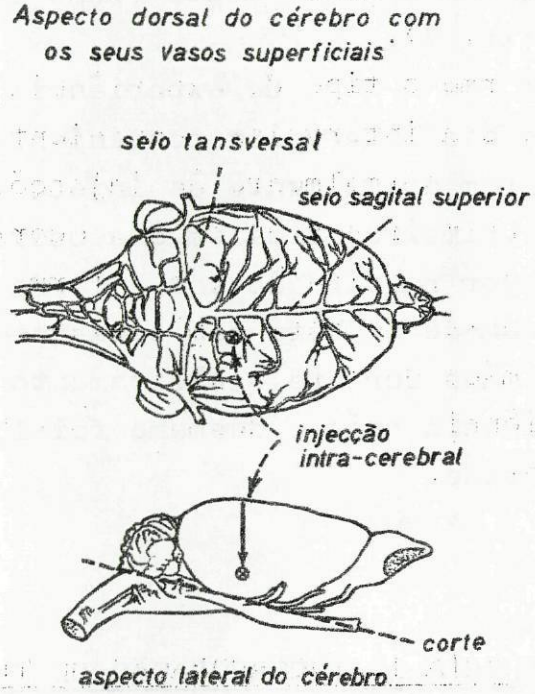


Fig. 7. Local da injecção intracerebral praticada neste estudo sobre o rato. Também se indica onde se efectuou o corte para separar o cérebro e cerebelo da parte restante do encéfalo.

Quadro 3

Experiência 1. Pesos dos animais e de tecido encefálico e vias de administração dos compostos radioactivos.

Animais	Injecção		Pesos (g)	
	Composto	Via*	Corpo	Tecido
1	Acetato-T 0,20 ml Sol. A	IP	30,8	1,3
2			31,0	1,3
3			26,2	1,2
4			33,2	1,4
5	NAG-T 0,20 ml Sol. E	IP	26,6	1,3
6			31,2	1,3
7			28,3	1,3
8			28,2	1,3
9	Acetato-T 0,05 ml Sol. B	IC	35,5	1,3
10			26,5	1,2
11			28,9	1,3
12			28,2	1,2
13	NAG-T 0,05 ml Sol. F	IC	28,6	1,3
14			25,9	1,3
15			27,0	1,1
16			27,4	1,2

*IP, intraperitoneal; IC, intracerebral

Extracção e homogeneização do tecido

Técnica

O esquema do fraccionamento encontra-se na Fig. 8.

Pesaram-se os ratos e decapitaram-se com tesoura. Removeu-se o cérebro e cerebelo (Fig. 7), pesando-se o tecido em papel-cebola. Desintegrou-se o tecido de cada rato com 50 ml de clorofórmio-metanol 2:1 (v/v) (CM) em homogeneizador de lâminas (Waring Blendor) de aço inoxidável (32,54).

Verteu-se o homogeneizado em discos afunilados de papel de filtro com 12,5 cm de diâmetro (Whatman nº 1). Lavou-

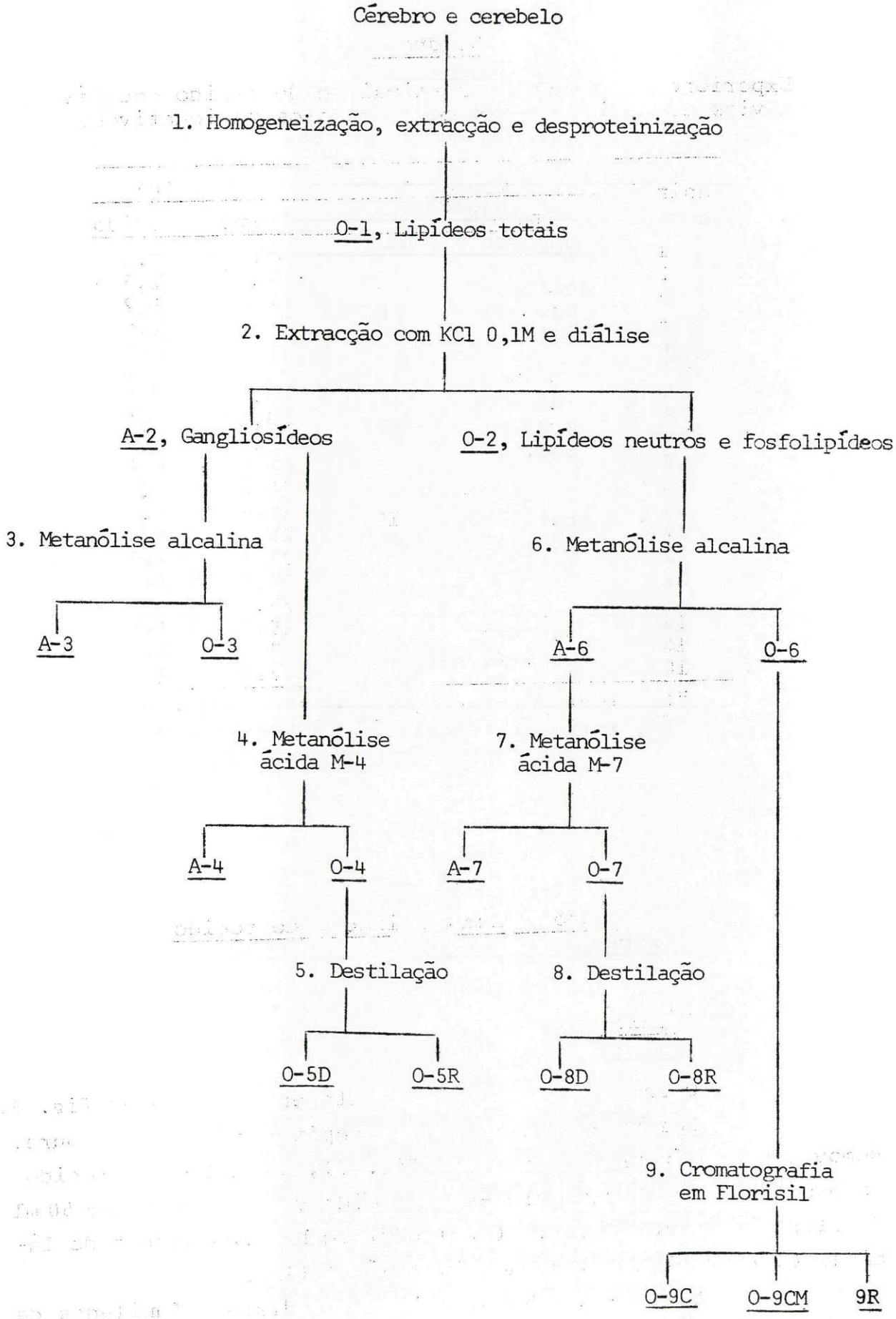


Fig. 8. Experiência 1. Esquema do fraccionamento.

-se o homogenizador com outros 50 ml da mistura solvente e fez-se passar também pelo filtro. Este lavou-se com mais 10 ml de solvente.

O registo encontra-se no Quadro 3.

Fraccionamento de lipídeos

Técnica

O filtrado do homogeneizado em mistura clorofórmio-metanol deixou-se em corrente de ar que fez evaporar o solvente.

O resíduo lipoproteico transferiu-se com CM do corpo para um tubo de centrífuga (17x100 mm) com CM (1+1+2 ml) e a ajuda de uma espátula. Centrifugou-se a 5.000 rpm durante 10 minutos e decantou-se o sobrenadante para outro tubo, com rejeição do resíduo. Removeu-se o solvente com corrente de azoto e suspendeu-se em 2 ml de CM. Centrifugou-se como antes e passou-se o sobrenadante para outro tubo rejeitando-se o resíduo. Secou-se o sobrenadante e dissolveu-se em 2 ml de CM, originando a solução O-1. Depois de retirada uma alíquota de 0,05 ml para contagem de radioactividade, a solução foi agitada com 0,2 ml de KCl 0,1 M. Centrifugou-se a 5.000 rpm por 5 minutos em centrífuga de cabeça angular com tampa. Recolheu-se por aspiração a fase aquosa que se lançou em sacos de diálise de acetato de celulose (Dow Chem. Co.), humedecidos com água corrente e atados numa ponta com dois nós. Procedeu-se de igual modo mais duas vezes, reunindo-se nos sacos de diálise as fases aquosas. Fechou-se com nós o extremo aberto dos tubos, os quais se mergulharam em água fria corrente durante 12 horas e mais 24 horas em 3 l de água destilada a 4^{o}, renovada três vezes. Após diálise, cortou-se uma ponta dos sacos e lançou-se o conteúdo em tubos de centrífuga de polietileno (25x90 mm). Lavou-se o interior dos tubos de diálise com água que se juntou ao dialisado. Depois de congelados em acetona arrefecida por neve carbónica secaram-se os tubos de centrífuga por liofilização. Os resíduos constituídos por gangliosídeos dissolveram-se em 0,5 ml de água para originar a solução A-2.

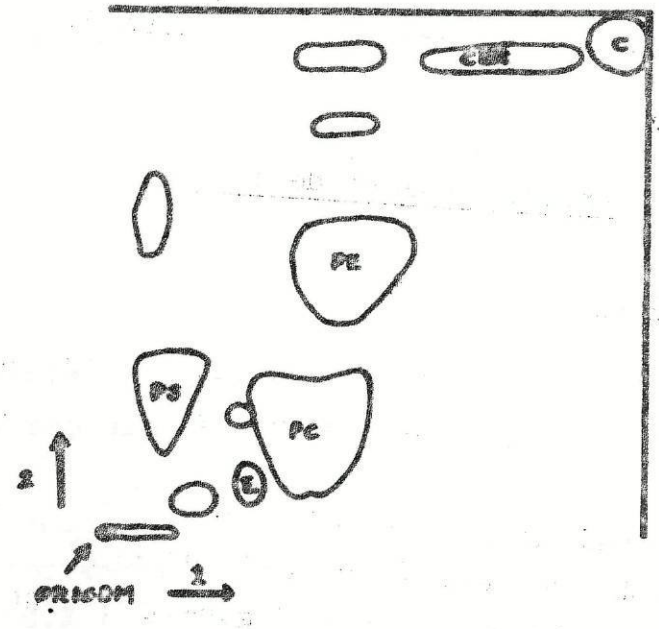


Fig. 9. Cromatografia dos lipídeos neutros e fosfolipídeos em papel impregnado de gel de sílica. Sistema 1: clorofórmio-metanol-ácido acético glacial-água (100:30:8:1,6). Sistema 2: clorofórmio-metanol-amónia (13:5:1). Revelador: nitrato de uranilo, vermelho de Ponceau e verde brilhante em meio acético. PS, fosfatidilserina. PC, fosfatidilcolina. PE, fosfatidiletanolsmina.CER, cerebrosídeos. C, colesterol. E, Esfingosina. Linhas, frentes dos solventes.

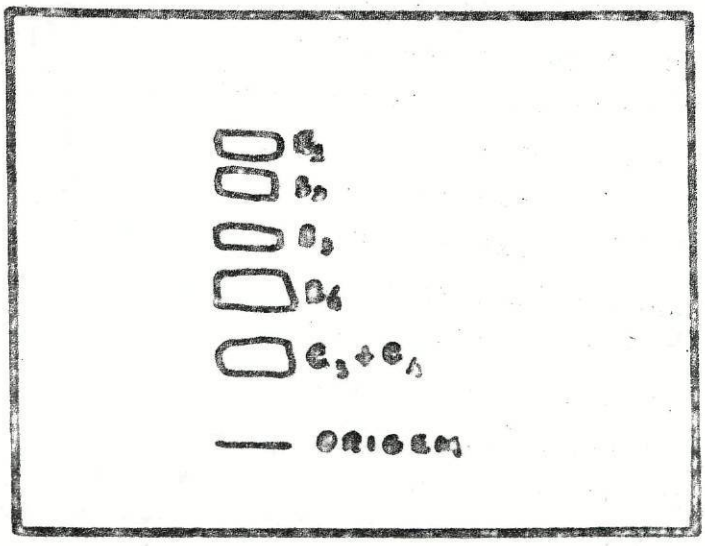


Fig. 10. Cromatografia de gangliosídeos em placa delgada de gel de sílica, desenvolvida com clorofórmio-metanol-amónia 2,5 N (60:35:8), com revelação das manchas por vapores de iodo.

Secou-se em corrente de azoto a solução orgânica que continha os lipídeos neutros e os fosfolipídeos, e os resíduos dissolveram-se em CM, originando a solução O-2.

A análise das fracções O-2 e A-2 por cromatografia de papel e placa delgada representa-se nas Fig. 9 e 10.

Metanólise alcalina

Reagentes

Reagente alcalino

Clorofórmio	160 ml
Hidróxido de sódio 0,2 M em metanol	80 ml

Ácido acético a 2 % (v/v).
Papel indicador de pH 2-10

Técnica

Para cada tubo de ensaio de 12 ml (17x90 mm) mediu-se a amostra a tratar em volume que oscilou conforme os casos entre 0,1 e 0,3 ml. Acrescentou-se 1,5 ml do reagente alcalino e incubou-se à temperatura ambiente durante 1 hora. Juntou-se ácido até neutralização verificada com papel indicador. Centrifugou-se e removeu-se a fase orgânica, que se lavou com 3 ml de água. Reuniram-se as fases aquosas, secaram-se em corrente de azoto tanto a fase aquosa como a orgânica e redissolveram-se em volumes convenientes de solvente orgânico ou de água (166).

Metanólise ácida

Reagentes

Reagente ácido: ácido clorídrico em metanol a 5 % (p/v). O ácido proveniente do ácido sulfúrico gotejando sobre o cloreto de sódio, fez-se borbulhar em 1 litro de metanol, até que o peso deste aumentou 50 g.

Éter de petróleo (p.e. 40-60°)

Técnica

Para cada tubo de ensaio mediu-se cerca de 0,1 ml de amostra a tratar e 2 ml de reagente ácido. Fecharam-se os tubos à chama e aqueceram-se a 80° durante 24 horas. Deixou-se arrefecer, abriram-se os tubos e extraiu-se-lhes o conteúdo com 3x2 ml de éter. Separaram-se e mediram-se as fases orgânica e aquosa (166).

A destilação das fases orgânicas realizou-se em conjuntos normalizados de vidro para análise em semi-micro escala. Destilaram-se cerca de 10 ml, até à obtenção de duas partes de destilado e uma de resíduo.

Para pipetas Pasteur afiladas na ponta e tapadas no estreitamento com lã de vidro Pirex , mediu-se Florisil (Floridin Co.) (117) em suspensão de clorofórmio, suficiente para formar, após a sedimentação, uma coluna com 1 cm 1,5 cm de altura. Deixou-se escoar quase totalmente o clorofórmio da suspensão e juntou-se o resíduo da secagem da fracção orgânica da metanólise alcalina, suspenso em clorofórmio. Deixou-se novamente escoar o solvente, desta vez recolhendo o eluído em tubo de vidro de 10 ml, após o que se eluiu a coluna com mais 2 ml (fracção O-9C). Depois recolheu-se o eluído resultante da adição à coluna de 2 ml de CM (fracção O-9CM). As duas fracções secaram-se em corrente de azoto e dissolveram-se em 1 ml respectivamente de clorofórmio e da mistura de solventes.

Produtos das metanólises

A metanólise alcalina dos LNF, com partilha de solventes, dá a fase aquosa A-6 que contém o glicerol e os açúcares de glicosilceramidas incluindo os de cerebrosídeos e psicosinas. A metanólise ácida da fracção A-6 seguida de partilha em solventes dará os açúcares e glicerol na fase A-7 e a esfingosina com acetato (eventualmente hidrolisado dos acetilaminoaçúcares) na fase O-7. A destilação desta daria o acetato no destilado O-8D e a esfingosina no resíduo O-8R. A fase O-6 contém colesterol e ácidos gordos metilados que saiem da coluna de Florisil com

clorofórmio (fracção 0-9C) e fosfolipídeos não hidrolisados que saiem no eluído mais polar com metanol.

Analisou-se a fracção 0-9C como segue: aplicaram-se alíquotas em placas de gel de sílica com 0,25x50x200 mm e desenvolveram-se com solvente apropriado para separar lipídeos neutros (ver composição na legenda da Fig. 11) Com vapores de iodo revelaram-se duas manchas com rf iguais a padrões de colesterol e de ácidos gordos metilados. Mediu-se a radioactividade das placas com um detector Vanguard 880. Os máximos de radioactividade corresponderam às manchas do colesterol e ésteres metílicos de ácidos gordos.

A metanólise alcalina sobre os gangliosídeos da fracção A-2 liberta os açúcares que passam à função A-3 ficando na fracção 0-3 os ácidos gordos e ceramidas.

A metanólise ácida dos gangliosídeos liberta igualmente os açúcares, mas quebra as ligações das ceramidas que se resolvem em esfingosina e ácidos gordos.

Determinação de radioactividade em amostras com trítio

Reagentes

Cintilador em tolueno

2,5-Difeniloxazol	4,0 g
1,4-bis-2-(5-Feniloxazolil)-benzeno	0,1 g
Tolueno	1 litro

Cintilador em dioxano

Naftaleno	50 g
2,5-Difeniloxazol	7 g
1,4-bis-2-(5-Feniloxazolil)-benzeno	50
Dioxano	1 litro

Na ocasião do emprego, misturaram-se 8,5 ml do cintilador em dioxano com 1,5 ml do cintilador em tolueno. Reagentes Packard.

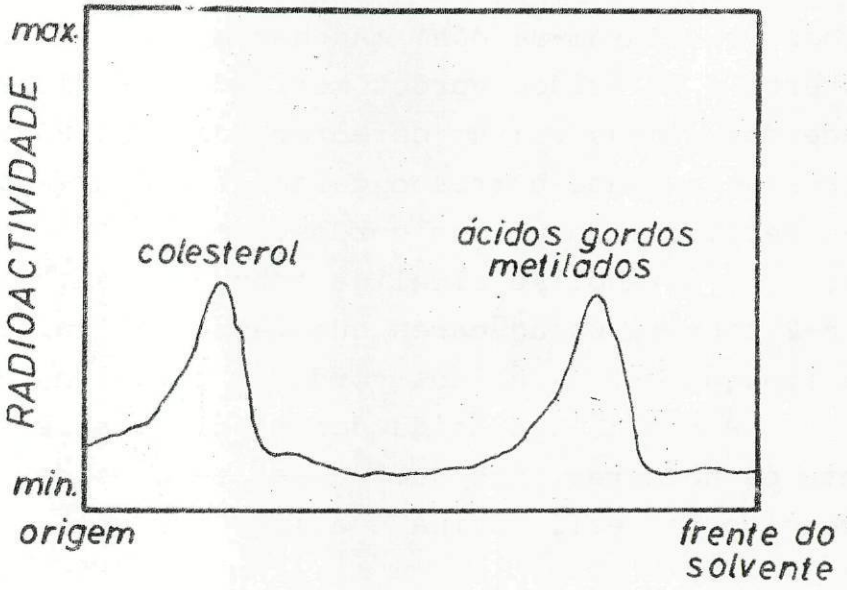


Fig. 11. Radiocromatografia dos componentes hidrófobos resultantes da metanólise dos lipídeos neutros e dos fosfolipídeos (fracção 0-2). Placa de gel de sílica desenvolvida com n-heptano-éter etílico-ácido acético glacial 75:23:2 (v/v) e medida com um Vanguard 880 de fluxo gasoso. Os picos identificaram-se pela migração simultânea de padrões revelados com vapores de iodo.

Técnica

Usou-se o espectrómetro de cintilação de líquidos Tri-Carb (Packard) e frascos de vidro de 15 ml de capacidade da mesma proveniência.

Para medir a radioactividade de soluções orgânicas usou-se o cintilador em tolueno e para soluções aquosas o cintilador em dioxano (81). O volume de amostra foi em regra 0,1 ml ou inferior, e o volume de cintilador sempre 10 ml. No caso da fracção 9R , deitou-se o próprio pó da coluna cromatagráfica no frasco de contagem, usando-se 10 ml de cintilador em tolueno. A presença de materiais suspensos ou dissolvidos no veículo do cintilador causa a absorção de parte de radiações luminosas originadas pelo impacto das partículas β sobre o cintilador. É necessário medir tal absorção interna para compensá-la por cálculo. Praticou-se essa determinação pela junção às amostras, depois de uma leitura inicial, de tolueno tritiado que não causa, por si, qualquer aumento de absorção interna. Dá-se um exemplo dessa determinação no Quadro 4.

O número de cpm entende-se sempre depois de deduzido da leitura inicial o valor do ensaio em branco.

As contagens decorreram a 4°, incluindo sempre um padrão e de um ensaio em branco. A leitura do branco considera-se como o total do "ruído de fundo". Este ruído é constituído pelos sinais electrónicos do aparelho e pelas cintilações devidas a radiações naturais. As contagens fizeram-se em regra durante um período de 10 a 100 minutos cada amostra, conforme a actividade observada em leitura prévia.

Para converter contagens por minuto (cpm) em decomposições por minuto (dpm), teve de multiplicar-se o número de cpm por factor adequado, o qual se encontrou dividindo o número de dpm de um padrão de trítio pelo respectivo número observado de cpm (Quadro 5).

Ajustou-se o aparelho para um máximo "número de mérito", dado pela expressão $E^2:R$ sendo E a eficiência em percentagem (ver Quadro 3) e R o ruído de fundo. Assim, a situação de 24 % de eficiência e 30 cpm de ruído de fundo é menos favorável que os valores de 22 % e 20 cpm, pois os números de mérito respectivos são 19,2 e 24,2.

Quadro 4

Determinação do factor de correcção para a absorção interna de cintilação de líquidos em amostras com trítio.

Observações e cálculos			Meio de cintilação	
			Sem amostra	Com amostra
Leitura	Inicial	A	0 cpm	7.800 cpm
	Após adição de mesma quantidade de trítio a ambos os frascos	B	80.000 cpm	71.800 cpm
Aumento	Verificado (B-A)	C		64.000 cpm
	Previsto	D		80.000 cpm
Factor de correcção (D:C)		E		1,25
Leitura corrigida (AxE)		F		9.750 cpm

Quadro 5

Determinação do factor de conversão de cpm em dpm para amostras com trítio.

Dpm do padrão	Original	A	82.000
	Actual*	B	61.900
Cpm		C	11.800
Eficiência (C:Bx100)		D	19,0 %
Factor de correcção (B:C)		E	5,25

*Este número, n, calculou-se a partir das dpm originais, n_o, pela expressão, válida para o trítio, em que t é o número de anos decorridos desde a preparação do padrão:

$$n=n_o x e^{-(0,056t)}$$

Quadro 6

Experiência 1. Esquema para o cálculo de dpm/g de tecido da fracção 0-2 após injecção IC de acetato, a partir das cpm medidas.

Fracção 0-2	
Volume total	2,00 ml
Tecido correspondente*	97,5 %
Alíquota para contagem	0,05 ml
Factores de	
Correcção da absorção interna	1,25
Conversão de cpm em dpm	5,25

Tecido			Ratos			
			9	10	11	12
Peso original		A	1,3 g	1,2 g	1,3 g	1,2 g
Corresp. a 0-2 (Ax0,975)		B	1,268 g	1,170 g	1,268 g	1,170 g
Concentração (B:2 ml)		C	0,634 g/ml	0,585 g/ml	0,634 g/ml	0,585 g/ml
Cpm	Directas	D	11.061	11.099	13.960	9.895
	Corrigidas (Dx1,25)	E	13.827	13.873	17.450	12.369
Dpm	Por alíquota (Ex5.25)	F	72.593	72.832	91.613	64.935
	Em 1 ml (F:0,05)	G	1.452.000	1.456.000	1.832.000	1.298.700
	Em 1 g de tecido (G:C)	H	2.290.000	2.490.000	2.890.000	2.220.000

*Em relação à quantidade original, pois se consumiram 2,5 % da fracção 0-1 para medição de radioactividade.

Na prática, os valores H podem calcular-se por uma fórmula que condense todos os factores fixos, por exemplo no caso escolhido:

$$H=(Dx1,25x5,25x2):(Ax0,05x0,975)=D:Ax269$$

No Quadro 6 dá-se um exemplo do cálculo para converter cpm em dpm/g de tecido.

EXPERIÊNCIA 2. INCORPORAÇÃO DE TRÍTIO DE N-(^{3}H-ACETIL)-GLUCOSAMINA OBSERVADA A INTERVALOS DE 1 A 12 HORAS DE INCUBAÇÃO

As injecções fizeram-se em animais com 14 dias de idade e usaram-se 0,05 ml da solução G de NAG-T (0,2 mc) por via intracerebral. Empregou-se um lote de 3 animais para cada

Quadro 7

Experiência 2. Peso dos animais e do tecido encefálico e tempos de injecção e decapitação.

Ratos	Hora de injecção	Peso (g)		Hora de decapitação	Tempos de incubação (horas)
		Corpo	Tecido		
1		29,4	1,3		
2	19.20	29,3	1,2	20,20	1
3		32,6	1,3		
4		32,6	1,4		
5	18,30	32,5	1,2	20,30	2
6		30,7	1,3		
7		31,2	1,3		
8	17,40	31,4	1,3	20,40	3
9		30,6	1,4		
10		29,9	1,3		
11	16,50	30,0	1,4	20,50	4
12		31,3	1,3		
13		32,9	1,3		
14	15,10	29,3	1,3	21,10	6
15		33,7	1,3		
16		34,2	1,3		
17	9.00	27,3	1,2	21.00	12
18		25,3	1,2		

período de incubação.

Após períodos de 1 a 12 horas de incubação, procedeu-se à decapitação e extracção do tecido encefálico (cérebro e cerebelo).

O registo encontra-se no Quadro 7 e o esquema do fraccionamento na Fig. 12. As técnicas foram as descritas para a Experiência 1.

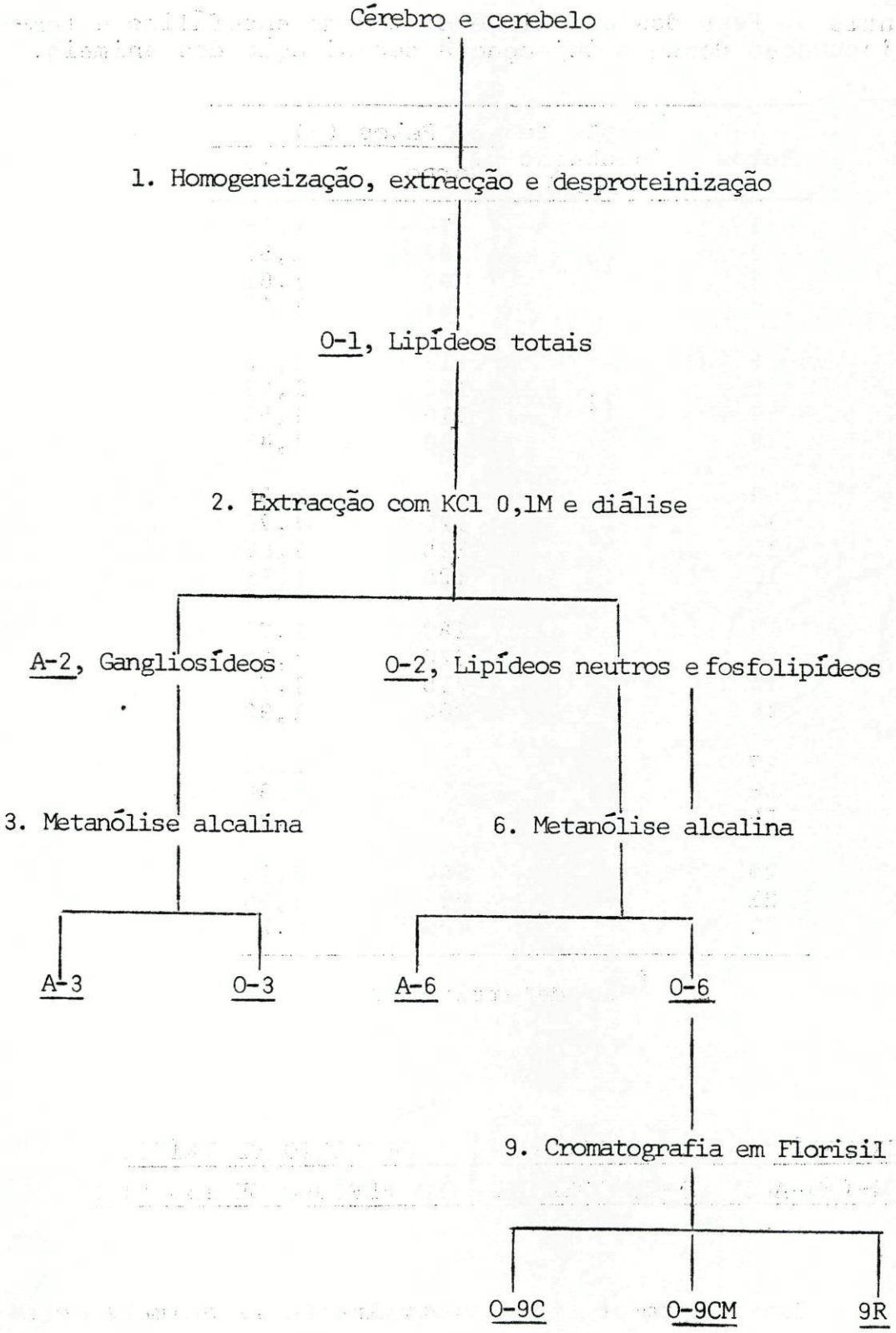


Fig. 12. Experiência 2. Esquema do fraccionamento.

Quadro 8

Experiência 3. Peso dos animais e do tecido encefálico e tempos de incubação desde a injecção à decapitação dos animais.

Ratos	Tempos de incubação (dias)	Pesos (g)	
		Corpo	Tecido
1	14	76	1,56
2		82	1,52
3		90	1,61
4		91	1,52
5	21	110	1,50
6		100	1,50
7		110	1,55
8		90	1,45
9	28	120	1,55
10		120	1,70
11		120	1,65
12		120	1,65
13	56	280	1,75
14		320	1,85
15		210	1,70
16		300	1,90
17	83	*	2,02
18			1,96
19			1,90
20	126	560	2,35
21		495	2,00
22		480	2,20

*Não determinados

EXPERIÊNCIA 3. INCORPORAÇÃO E DECLÍNIO DE TRÍTIO DE N-(^{3}H-ACETIL)-GLUCOSAMINA NUM PERÍODO DE 136 DIAS

Injectaram-se intracerebralmente 22 animais de 14 dias de idade com 0,05 ml de solução G de NAG-T (0,2 mc) e decapitaram-se grupos de 4 animais ao fim de 14, 21, 28 e 56 dias e grupos de 3 ao fim de 83 e de 136 dias. Estes dias são contados depois da injecção. O procedimento para a obtenção das diversas fracções é o descrito para a Experiência 1. O registo encontra-se no Quadro 8 e o esquema do fraccionamento na Fig. 13.

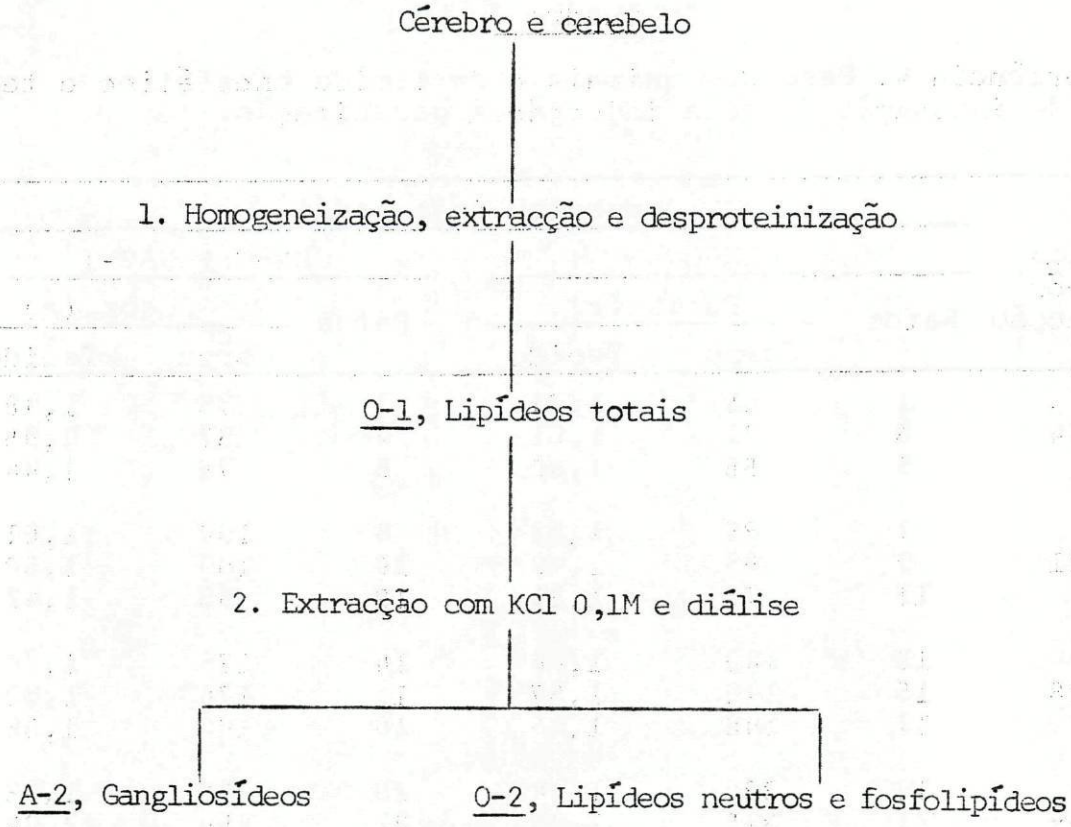


Fig. 13. Experiência 3. Esquema do fraccionamento

Quadro 9

Experiência 4. Peso dos animais e do tecido encefálico e tempos de incubação desde a injecção à decapitação.

Dias após injecção	Compostos injectados					
	GLN-C			GLN-C + NAG-T		
	Ratos	Pesos (g)		Ratos	Pesos (g)	
		Corpo	Tecido		Corpo	Tecido
14	1	65	1,71	2	75	1,48
	3	71	1,61	4	37	0,95
	5	58	1,30	6	75	1,44
21	7	85	1,53	8	100	1,61
	9	95	1,49	10	100	1,50
	11	70	1,35	12	95	1,42
28	13	140	1,66	14	175	1,70
	15	140	1,57	16	170	1,63
	17	140	1,65	18	160	1,56
56	19	330	1,94	20	355	1,98
	21	325	1,96	22	350	2,04
	23	315	1,86	24	320	1,89
84	25	390	2,03	26	470	1,89
	27	380	1,93	28	410	2,15
	29	440	2,03	30	350	2,15
112	31	445	2,05	32	420	2,05
	33	465	2,20	34	445	2,12
	35	525	2,05	36	430	2,00
161	37	440	2,00			
	39	440	1,90			

EXPERIÊNCIA 4. INCORPORAÇÃO E DECLÍNIO DE TRÍTIO DE N-(^{3}H-ACETIL)-GLUCOSAMINA E DE CARBONO-14 DE 1-^{14}C-GLUCOSAMINA NUM PERÍODO DE 161 DIAS

Injecção dos radioisótopos

As injecções fizeram-se intracerebralmente em animais com 13 dias de idade. Um lote de 20 ratos recebeu 0,05 ml da solução I de GLN-C que continha 11,7 µc. Os animais deste lote referem-se com números ímpares e foram decapitados em grupos de três ao fim de 14, 21, 28,56, 84 e 112 dias e um par ao fim de 161 dias, após a injecção. Outro lote, este de 18 animais designados por números pares, receberam 0,05 ml da solução J que continha 11,7 µc de GLN-C e 142 µc de NAG-T. Os ratos foram decapitados em grupos de três aos 14, 21, 28, 56, 84 e 112 dias após a injecção.

O registo encontra-se no Quadro 9 e o esquema de fraccionamento na Fig. 14.

Determinação da radioactividade em amostras com carbono-14

Procedeu-se como para o trítio (Experiência 1), alterando apenas o ajustamento do espectrómetro. A conversão de cpm em dpm efectuou-se de acordo com o registo do Quadro 10.

As leituras de cpm foram corrigidas por factor de correcção da absorção interna, tal como se procedeu para leituras de trítio. Neste caso usou-se tolueno-^{14}C.

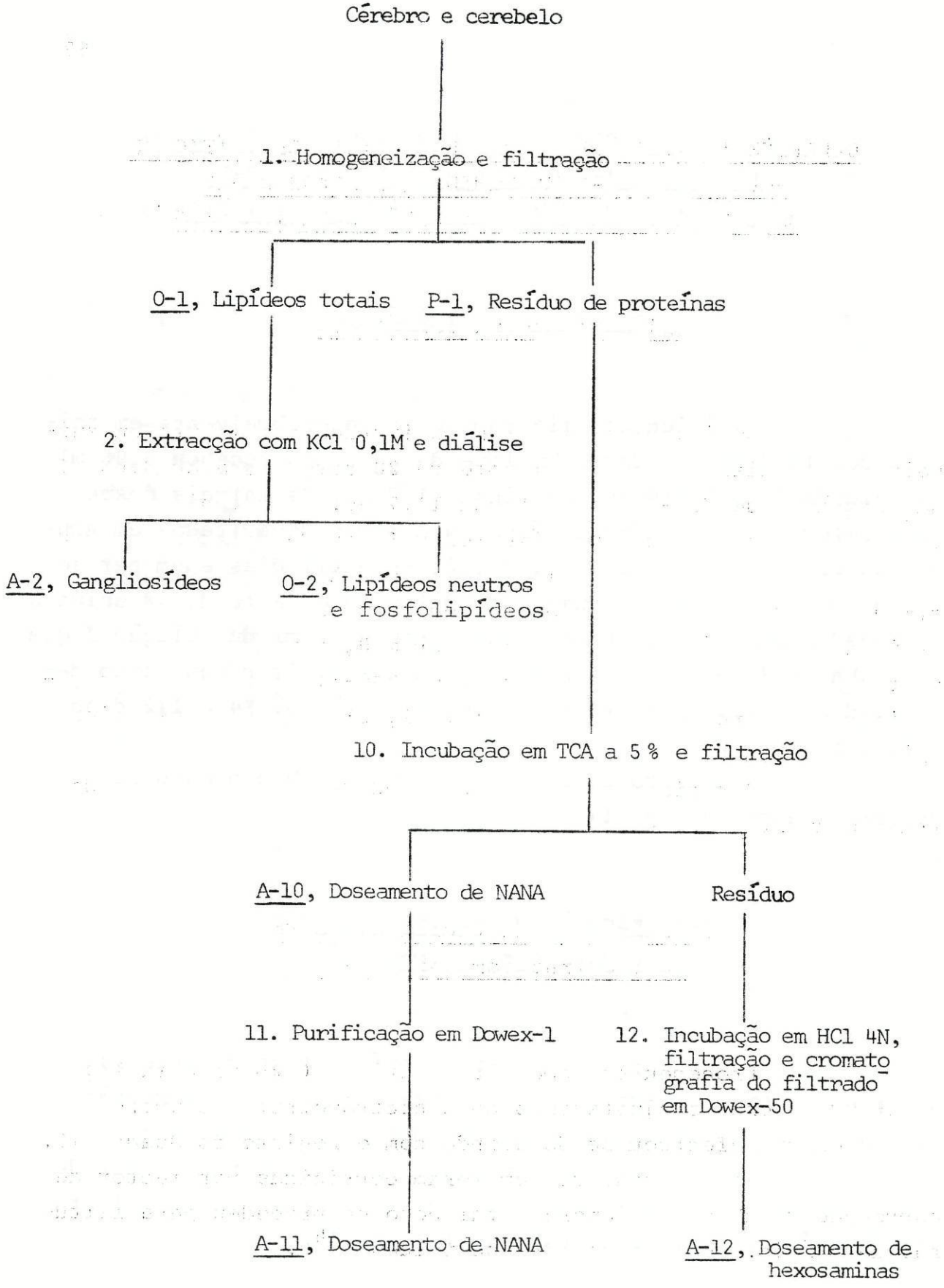


Fig. 14. Experiências 4 e 5. Esquema do fraccionamento.

Determinação da radioactividade em amostras com carbono-14 e trítio simultaneamente

Além dos cálculos efectuados a partir das leituras directas já exemplificados na Experiência 1 só com o trítio, neste caso em que se usou o trítio com carbono-14 nas mesmas fracções, e portanto nos mesmos frascos de cintilação, foram necessários cálculos adicionais.

O espectrómetro de cintilação de líquidos empregado possui canais independentes para medir cintilações, o que permite discriminar as que resultam de um e de outro isótopo por terem energias muito dispares.

A necessidade dos cálculos resultou de haver uma certa sobreposição dos espectros de cintilação, mesmo medidos em canais independentes.

Tendo-se regulado os canais R e S (R para trítio e S para carbono-14), verificou-se que o trítio sozinho originou um certo número T de cpm no canal R, mas também uma fracção deste número, xT, no canal S. Correspondentemente, o carbono-14, mesmo isoladamente, originou um número C de cpm no canal S, mas também uma fracção desse número, xC, no canal R, como se exemplifica no Quadro 11.

Num caso em que estes isótopos estivessem então na mesma amostra, os canais R e S acusariam respectivamente 4.749 e 2.610 cpm, pois:

$$R = T+yC = 3.720+(0,415x2.480) = 4.749$$
$$S = C+xT = 2.480+(0,035x3.720) = 2.610$$

Assim, das expressões gerais

$$R = T+yC \qquad S = C+xT$$

podem calcular-se quantas cpm lidas nos dois canais (R e S) derivam do trítio (T) e do carbono-14 (C).

$$T = (R-yC):(1-xy) \qquad C = (S-xR):(1-xy$$

Nas condições existentes, as expressões eram:

$$T = 1,015R-0,421S \qquad C = 1,015S-0,035R$$

No Quadro 12 dá-se um exemplo de conversão de cpm em dpm/g de tecido.

Quadro 10

Determinação do factor de conversão de cpm em dpm para amostras com carbono-14. Como o período de semi-vida do carbono-14 é de 5.760 anos, não se efectuou correcção das dpm actuais para originais, como para o trítio.

Dpm do padrão	A	35.600
Cpm	B	22.900
Eficiência (B:Ax100)	C	64,5 %
Factor de conversão (B:A)	D	1,55

Quadro 11

Determinação dos factores de discriminação x e y de cpm de trítio e de carbono-14 para amostras com os dois isótopos.

Canais	Cpm dos isótopos isolados	
	trítio	carbono-14
R	3.720 (T)	1.029 (yC)
S	130 (xT)	2.480 (C)

Cálculo dos coeficientes x e y

x=130:3.720=0,0350

y=1.029:2.480=0,415

Quadro 12

Experiência 4. Esquema para o cálculo de dpm/g de tecido da fracção A-2 a partir das cpm medidas em dois canais independentes.

Fracção A-2, rato nº 16			
Volume total			0,5 ml
Tecido correspondente			97,5 %*
Alíquota para contagem			0,09783 ml
Tecido	Peso original	A	1,89 g
	Corresp. a A-2 (Ax0,975)	B	1,268 g
	Concentração (B:0x5 ml)	C	3,68 g/ml

Factores de	Trítio	Carbono-14
Correcção da absorção interna	1,39	1,10
Conversão de cpm em dpm	5,25	1,55
Discriminação	1,015R-0,421S	1,015S-0,0355R

Cpm

			Canal R	Canal S
Número directo		D	567	
		E		365
Discriminação	Dx1,015	F	576	
	Bx0,421	G		154
	Ex1,015	H		370
	Dx0,0355	I	20	
	^{3}H (F-G)	J	422	
	^{14}C (H-I)	K		350
Correcção da absorção interna	^{3}H (Jx1,39)	L	587	
	^{14}C (Kx1,1)	M		386

Dpm

			Trítio	Carbono-14
Conversão de cpm em dpm	(Lx5,25)	N	3.081	
	(Mx1,55)	N		598
Em 1 ml da solução (N:0,09783)		P	31.490	6.109
Em 1 g de tecido (P:C)		Q	8.557	1.660

* Em relação à quantidade original, pois se consumiram 2,5 % da fracção 0-1 para medição de radioactividade.

É possível simplificar os cálculos, de modo a que os valores de Q sejam dados directamente pelas expressões seguintes ou outras semelhantes:

Para o ^{3}H: $Q=\{(1,015R-0,421S)x0,5x1,39x5,25 : (Ax0,975x0,09783)\}$

ou $Q=(38,8R-16,1S):A$

Para o ^{14}C: $Q=\{(1,015S-0,0356R)x0,5x1,1x1,55) : (Ax0,975x0,09783)\}$

ou $Q=(9,07S-0,318R):A$

Medição de radioactividade das proteínas

Técnica

O resíduo de proteínas transferiu-se para placas de Petri taradas e após evaporação do solvente pesou-se o conjunto e determinou-se o peso do resíduo.

Pulverizou-se o resíduo em almofariz de vidro.

Usaram-se alíquotas com cerca de 2 mg de pó finamente dividido e tamisado para medição de radioactividade. Colocou-se o pó em frascos de cintilação com 1 ml de hiamina, digerindo-se em banho de água a 45° até completa solubilização, procedendo-se à contagem com 9 ml de cintilador de tolueno, com posterior correcção de absorção interna como já se descreveu para as fracções lipídicas.

Extracção de ácidos siálicos ligados às proteínas

Reagentes

Ácido tricloroacético a 5 % (p/v)

Técnica

Outra alíquota de proteínas incubou-se em 5 ml de ácido durante 1 hora a 80° em matrases de 25 ml com agitação mecânica em banho de água (106). Arrefeceram-se os matrases em gelo durante 20 minutos e filtrou-se a suspensão por funis de papel de filtro Whatman nº 1 de 7 cm de diâmetro, lavando-se o resíduo com mais 2,5 ml de ácido. Recolheram-se os filtrados e lavagens em tubos de centrífuga graduados e após homogeneização (fracção A-10) retiraram-se alíquotas para contagem de radioactividade em cintilador de dioxano e doseamento de NANA.

Doseamento de ácido N-acetilneuramínico

Reagentes

Periodato de sódio 0,2 M em ácido fosfórico 9M. Dissolveram-se 1,88 g em 44 ml de ácido (27 ml de ácido a 85 % + 17 ml de água).

Arsenito de sódio a 10 % numa solução de sulfato de sódio 0,5 M em ácido sulfúrico 0,05 M. Dissolveram-se 10 g do arsenito ($NaAsO_2$) e 7,1 g de sulfato em 100 ml de ácido.

Ácido tiobarbitúrico a 0,6 % em sulfato de sódio 0,5 M. Pesaram-se 1,8 g do ácido e 21,3 g do sulfato e dissolveram-se em 300 ml de água.

Ciclo-hexanona depois de tratada com carvão activado e filtrada por papel de filtro Whatman nº 1 em funis Buchner.

Padrão de ácido N-acetilneuramínico 1,726 mM. Dissolveram-se 1,6 mg em 3 ml de água. Conservou-se a solução no congelador até ao momento de emprego.

Registo e técnica

Ver Quadro 13. Leu-se a absorvância em 549 nm que corresponde ao máximo de absorção do NANA e também 532 nm que corresponde ao máximo de absorção da 2-desoxirribose, a qual também absorve em 549 nm.

Para anular a influência da 2-desoxirribose eventualmente presente no filtrado, empregou-se a equação que dá a quantidade de NANA em solução:

$$0,0911A_{549} - 0,0334A_{532}$$

Esta expressão, onde A é a absorvância lida, deduz-se de uma outra em que se procede à correcção da interferência com os coeficientes de extinção molar dos dois açúcares nos dois comprimentos de onda (163).

Quadro 13

Experiência 4. Determinação do ácido N-acetilneuramínico ligado a proteínas (rato nº1).

Peso de tecido		A	1,71 g
Proteína	Peso total	B	0,1786 g
	Alíquota	C	0,0220 g
	Filtrado após incubação em TCA*	D	6,0 ml
Padrão de NANA	Concentração		17,3 µM
	Em 0,2455 ml	E	0,0424 µmoles

Para tubos de 12 ml (16x100 ml) mediu:se

Reagentes	Ensaio	Padrão	Branco
Alíquota do filtrado D F	0,2622 ml		
Padrão		0,02456 ml	
Água		0,23764 ml	0,2622 ml
Periodato		0,1 ml	0,1 ml

Misturou-se e deixou-se à temperatura ambiente durante 20 minutos

Arsenito	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

Agitou-se até desaparecer a cor acastanhada que se forma inicialmente ao misturar o arsenito.

Ácido tiobarbitúrico	3,0 ml	3,0 ml	3,0 ml

Misturou-se e ferveu-se em banho de água durante 15 minutos com os tubos tapados com esferas de vidro. Arrefeceram-se os tubos em água corrente durante 5 minutos. A turvação que se observa nesta fase não interfere com a leitura inicial.

Ciclo-hexanona	4,3 ml	4,3 ml	4,3 ml

Misturou-se energicamente e centrifugou-se a 3.000 rpm durante 5 minutos. Leu-se a absorvância da camada superior orgânica em 549 nm e em 532 nm.

Absorvância em 549 nm	G	0,245	I	0,563	0
Absorvância em 532 nm	H	0,178	J	0,223	0

Concentração de NANA:

(0,0911G-0,0334H):(0,0911I-0,0334J)xE:FxD:CxB:A =
= 1,72 µmoles/g de tecido

*TCA, ácido tricloroacético a 5 % (p/v).

Cromatografia em Dowex-1

Reagentes

Éter dietílico
Dowex-1 (Dow Chem. Co.)
Ácido clorídrico 0,2 N

Técnica

O filtrado A-10 extraiu-se 3 vezes com 2 ml de éter para extrair o ácido tricloroacético. Passou-se a solução aquosa através de uma coluna de resina com 1,2x6 cm que se lavou depois com 2 ml de água. Fez-se sair o ácido siálico com 10 ml do ClH.

Do eluído (solução A-11) tiraram-se alíquotas para contagem de radioactividade e determinação de NANA pela técnica já exposta.

Cromatografia em Dowex-50

O resíduo de proteína que se não solubilizou em ácido tricloroacético incubou-se em 0,5 ml de ClH 3N a 100° durante 5 horas em tubos de 5 ml fechados à chama. Abertos os tubos, procedeu-se à sua cromatografia (14).

Reagentes

Hidróxido de sódio 2N
Ácido clorídrico 2N
Dowex-50 - Preparou-se lavando várias vezes a resina em funil Buchner com a soda e depois com o ácido e finalmente com água destilada. Suspendeu-se a resina em água e mediram-se para colunas de vidro cerca de 5 ml de suspensão. Depois de coberta a resina com disco de papel de filtro, a coluna ficou pronta para usar.

Técnica

Fez-se passar o conteúdo dos tubos após digestão, bem como a água de lavagem, através da coluna. Rejeitaram-se o eluído e as águas de lavagem e extrairam-se as hexosaminas com ácido 2N, de cujo eluído (fracção A-12) se retiraram alíquotas para medição de radioactvidade em cintilador de dioxano e doseamento de hexosaminas.

Doseamento de hexosaminas

Reagentes

Padrão de glucosamina-ClH. Pesaram-se 0,175 g e dissolveram-se em 25 ml de água. Mediram-se 0,103 ml para um balão aferido de 100 ml que se completou com água até à marca. 3 ml desta solução continha 0,100332 µmoles.

Soluto de padrão alcoólico de fenolftaleína a 0,5 % (p/v)

Hidróxido de sódio 4N

Ácido clorídrico 0,5N

Cloreto de sódio 4N

Acetilacetona a 2 % (v/v) em carbonato de sódio N

Etanol

Reagente de Erlich. Solução de p-dimetilaminobenzaldeído a 2,67 % (p/v) num sistema 1:1 de etanol e ácido clorídrico concentrado.

Cloreto de sódio 4N

Técnica

Preparam-se conta gotas para a soda e para o cloreto de sódio de maneira que as gotas de ambos os reagentes tivessem o mesmo volume. Recolheram-se alíquotas de 3 ml em provetas de 10 ml com rolha e adicionou-se-lhes soda gota a gota na presença de uma gota de fenolftaleína até viragem, e depois o ácido até desaparecimento de côr. Noutras duas provetas lançaram-se respectivamente 3 ml de padrão e 3 ml de água para ensaio em branco. A ambos se adicionou cloreto de sódio, tantas

Quadro 14

Experiência 4. Determinação de hexosaminas ligadas a proteínas (rato nº 2)

Peso de tecido			A	1,71 g
Proteína	Peso		B	0,1786 g
	Alíquota		C	0,0220 g
	Volume de eluído		D	4,9 ml
	Alíquota		E	3,0 ml
Padrão de cloreto de glucosamina		Concentração Em 3 ml	F	33,5 µM 0,1005 µmoles

Às provetas contendo o eluído, padrão, a água (branco) e as quantidades de soda e cloreto de sódio indicadas na técnica (ver o texto) juntaram-se os reagentes:

Reagentes	Ensaio	Padrão	Branco
Acetilacetona	1 ml	1 ml	1 ml

Rolharam-se as provetas e aqueceram-se em banho de água a 90° durante 45 minutos. Arrefeceu-se em banho de água fria até à temperatura ambiente.

Etanol	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml

Misturou-se o conteúdo das provetas.

Reagente de Erlich	1 ml	1 ml	1 ml

Misturou-se agitando com precaução as provetas rolhadas e completou-se o volume de 10 ml com etanol Passados 90 minutos leu-se a absorvância em 530 nm.

Absorvância	G	0,210	H 0,125	0

Quantidade de hexosamina por grama de tecido:

G:HxF:ExD:CxB:A=1,31 µmoles/g de tecido

Quadro 15

Experiência 5. Peso dos animais e do tecido encefálico e tempos desde a injecção à decapitação.

Ratos	Dias após injecção	Pesos (g)	
		Corpo	Tecido
1		82	1,48
2	14	82	1,39
3		81	1,40
4		120	1,69
5	21	132	1,45
6		130	1,76
7		194	1,77
8	28	170	1,64
9		192	1,72
10		310	1,88
11	42	262	1,90
12		285	1,91
13		322	1,99
14	57	422	1,99
15		372	1,83
16		393	1,88
17	70	445	1,80
18		370	1,91

gotas quantas as gastas de soda para os ensaios (14).
Ver Quadro 14.

EXPERIÊNCIA 5. INCORPORAÇÃO DE TRÍTIO DE 6-^{3}H-GLUCOSAMINA E DECLÍNIO NUM PERÍODO DE 70 DIAS

As injecções fizeram-se intracerebralmente em animais de 14 dias de idade. Cada rato de um lote de 18 recebeu 0,05 ml com 0,2 mc da solução M de GLN-T. Decapitaram-se os ratos em grupos de três aos 14,21,28,42,57 e 70 dias após injecção. O processo de fraccionamento e as determinações efectuadas são as mesmas das descritas na Experiência anterior. O registo está no Quadro 15 e o esquema do fraccionamento na Fig. 14.

ANÁLISE ESTATÍSTICA DE RESULTADOS

COMPARAÇÃO DE MÉDIAS

Para a comparação de médias da Experiência 1 usou-se a prova do t. O valor de t encontrou-se pela expressão

$$t = \frac{|\bar{x} - \bar{x}'|}{\sqrt{\left\{\frac{\Sigma(x - \bar{x})^2 + \Sigma(\bar{x}' - \bar{x}')^2}{n + n' - 2} \left(\frac{1}{n} + \frac{1}{n'}\right)\right\}}}$$

Para encontrar o valor de $\Sigma(x - \bar{x})^2$ recorreu-se a outra expressão com o mesmo valor, mas mais conveniente por eliminar erros de aproximação e ser mais fácil de calcular:

$$\Sigma(x-\bar{x})^2 \equiv \Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}$$

Para valores grandes de t, é grande a probabilidade de a diferença entre as médias ser significativa. O recurso a tabelas (52) permitiu achar para n+n'-2 graus de liberdade, o limiar de probabilidade correspondente para a diferença entre as duas médias: altamente significativa (P>99 % ou p<0,01), significativa (P>95 % ou p<0,05) ou não significativa (P<95 % ou p>0,05).

REGRESSÃO LINEAR

Estabelecimento

Para a regressão linear determinaram-se os parâmetros a e b da recta $y = a + bx$ pelas seguintes expressões:

$$b = \frac{\Sigma(x-\bar{x})(y-\bar{y})}{\Sigma(x-\bar{x})^2}$$

Por comodidade de cálculo, o numerador desta fracção obtém-se pelo modo indicado na identidade

$$\Sigma(x-\bar{x})(y-\bar{y}) \equiv \Sigma(xy) - \frac{\Sigma x \Sigma y}{n}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

Os valores de y foram, conforme os casos, ou os números absolutos das dpm por grama de tecido ou os respectivos logaritmos naturais. Os valores de x foram as horas ou dias após injecção dos precursores.

A legitimidade da regressão linear avaliou-se pela determinação de razões de variância (53).

Razão de variâncias entre "regressão" e "resto"

O valor desta razão, ou o factor F, permite esclarecer se as variações de x determinam variações de y significativas.

Na recta da Fig. 15, e na ausência de outros dados, o coeficiente b deverá ser mais afastado de zero do que na recta da Fig. 16.

Para cada valor individual de y (v_i), pode calcular-se o seu desvio relativamente à média $\bar{y}$ dos valores de y.

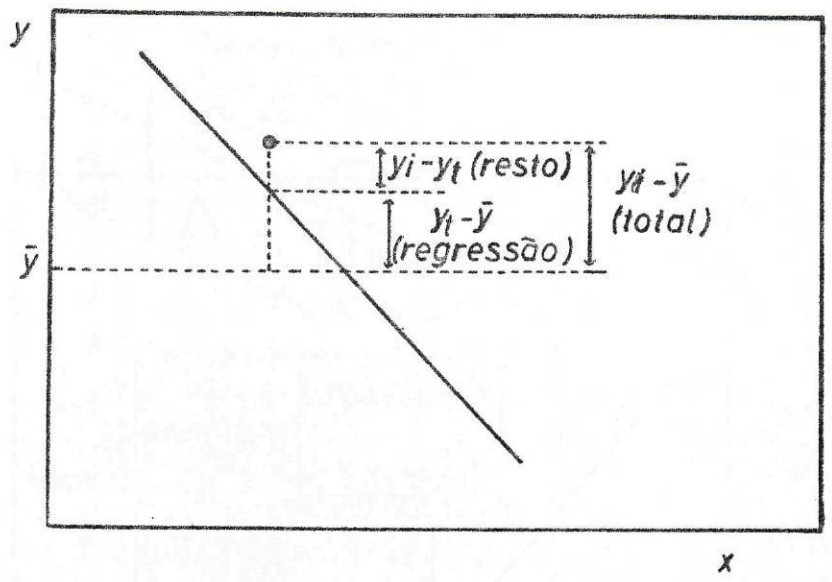


Fig. 15. O desvio devido à regressão contribui mais para o desvio total do que o resto. Se tal for o caso para a generalidade dos valores de y, pode concluir-se que existe variação significativa de y quando varia x e no caso de ser legítima a regressão linear, b será diferente de zero, ou pelo menos mais afastado de zero do que no caso da Fig. 16.

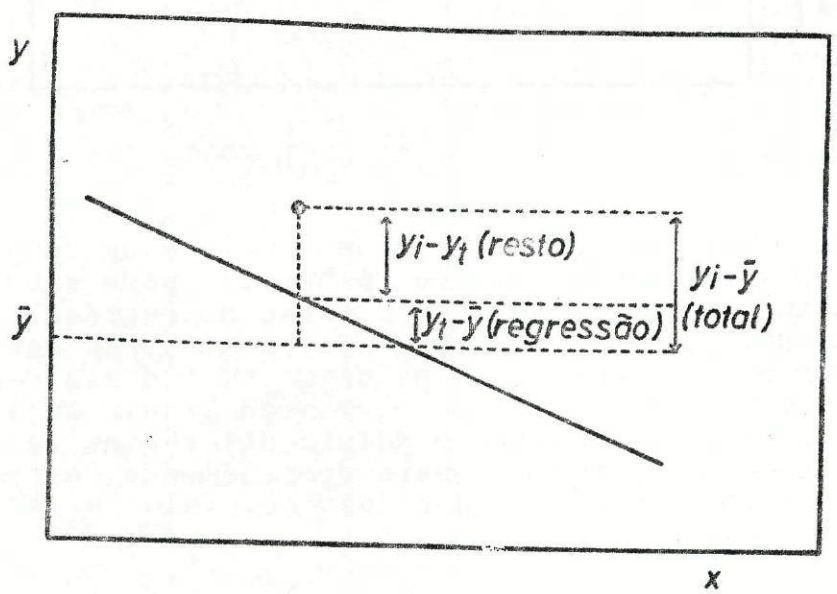


Fig. 16. Ao contrário do caso da Fig. 15, aqui o desvio total deve-se mais à dispersão de y_i em torno da regressão do que ao desvio devido à regressão pelo que, em relação ao caso da Fig. 15, é mais fraca a probabilidade de y ser uma variável dependente de x, sendo o coeficiente b mais próximo de zero.

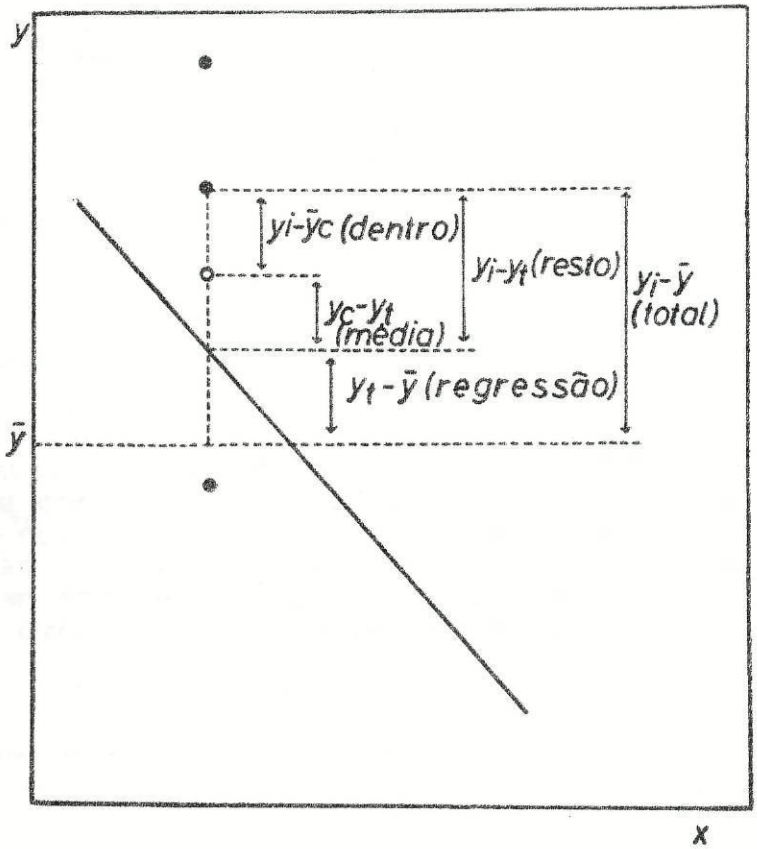


Fig. 17. Quando por cada valor de x existe um conjunto de valores de y, o desvio devido ao "resto" pode subdividir-se em dois tipos de desvios: em torno da regressão linear (o desvio das médias dos conjuntos) e em torno das médias dos conjuntos (o desvio dos valores individuais dentro de cada conjunto). Para que uma regressão linear seja válida, não deve ser significativo o desvio das médias relativamente ao desvio dentro ou, mais propriamente, entre os respectivos quadrados médios dos desvios. Valores individuais yi (•) e média de um conjunto (o).

Quadro 16

Cálculo da razão de variâncias F_1 para determinar a significância da dependência y=f(x).

Desvio	Σ	GL	$\bar{q}$	F
Regressão	A	1	$\bar{q}_1$	F_1
Resto	D	n-2	$\bar{q}_2$	
Total	E	n-1		

$\bar{q}_1$=A:1 A+D=E $F_1=\bar{q}_1:\bar{q}_2$

$\bar{q}_2$=D:(n-2) n=número de pares y_i, x_i

Este desvio ou desvio "total", é igual à soma de outros dois desvios, ambos relativos ao valor teórico y_t correspondente na recta. Assim, o desvio devido à regressão é dado por $y_t-\bar{y}$ e o "resto" é dado por y_i-y_t (Figs. 15 e 16). Dividindo o somatório dos quadrados desses desvios (Σq) pelo respectivo número de graus de liberdade (GL) obtêm-se os quadrados médios ($\bar{q}$) para cada tipo de desvio. A razão desses quadrados médios é a razão das variâncias, ou factor F (Quadro 16).

Os diversos parâmetros calcularam-se segundo as seguintes expressões:

$$\Sigma q \text{ (regressão)} = \frac{\{\Sigma(x-\bar{x})(y-\bar{y})\}^2}{\Sigma(x-\bar{x})^2}$$

$$\Sigma q \text{ (total)} = \Sigma(y-\bar{y})^2$$

$$\Sigma q \text{ (resto)} = \Sigma q \text{ (total)} - \Sigma q \text{ (regressão)}$$

Para altos valores de F_1, é alta a probabilidade de y variar quando varia x, e portanto de b ser diferente de zero nos casos em que y é a função linear de x. Os valores de F podem ser altamente significativos (P>95 % ou p<0,01), significativos (P>95 % ou p<0,05) ou não significativos (P<95 % ou p>0,05). Para maior clareza nalguns quadros, representam-se es-

Quadro 17

Cálculo das razões de variância F para determinar a significância da dependência y=f(x) e da linearidade em equações do 1º grau.

Desvio	Σq	GL	$\bar{q}$	F
Regressão	A	1	$\bar{q}_1$	F_1
Média	B	k-2	$\bar{q}_2$	F_2
Dentro	C	n-k	$\bar{q}_3$	F_3
Resto	D	n-2	$\bar{q}_4$	
Total	E	n-1		

$\bar{q}_1$=A:1 A+D=E $F_1=\bar{q}_1:\bar{q}_4$

$\bar{q}_2$=B:(k-2) B+C=D $F_2=\bar{q}_1:\bar{q}_3$

$\bar{q}_3$=C:(n-k) $F_3=\bar{q}_2:\bar{q}_3$

$\bar{q}_4$=D:(n-2) k-número de conjuntos

n-número total de pares x_i, y_i

tes níveis de probabilidade, respectivamente, pelas letras A, S e N. Recorrendo a tabelas (6) encontram-se, para 1 grau de liberdade no numerador e n-2 graus de liberdade no denominador, os valores acima dos quais são significativos os que se acham por cálculo.

Razões de variância entre "regressão" e "dentro" e entre "médias" e "dentro"

Com estas determinações pretendeu-se verificar, não só, como no caso anterior, se y varia significativamente ao variar x, mas também se tal variação é realmente linear. Para esta avaliação recorreu-se ao facto de, para cada valor de x, existir um conjunto de valores de y.

Nesta situação, os desvios do "resto" podem subdividir-se em dois tipos de desvios, tal como se esquematiza

na Fig. 17: um, é o desvio entre y_i e a média $\bar{y}_c$ dos valores de y do conjunto e o outro é o desvio entre a média $\bar{y}_c$ do conjunto e o valor teórico de y_t pertencente à recta.

Como anteriormente, dividindo os Σq pelos números de graus de liberdade respectivos, obtêm-se outros tantos $\bar{q}$, entre os quais se acham as razões F (Quadro 17).

O Quadro 17, ampliação do Quadro 16, inclui mais os seguintes parâmetros que se calcularam como segue:

$$\Sigma q \text{ (dentro)} = \Sigma y^2 - \Sigma \frac{\Sigma^2 y_c}{n_c}$$

Onde Σy_c é o somatório dos valores de y dentro de cada conjunto e n_c o número desses valores de y dentro do conjunto.

$$\Sigma q \text{ (médias)} = \Sigma q \text{ (resto)} - \Sigma q \text{ (dentro)}$$

Quando y varia significativamente ao variar x, F_1 tem valor elevado como já se viu, e F_2 tem valor igual a F_1 quando $F_3=1$. Para $F_3<1$, vem $F_2<F_1$. Para $F_3>1$, vem $F_2>F_1$. Ou seja, quanto mais importante for o desvio das médias em relação ao desvio "dentro", maior será o valor de F_2, afastando-se de F_1, enquanta cresce F_3. Assim, valores altos de F_1 e F_2 e baixos de F_3 são características dessas razões quando uma equação do 1º grau tem alta probabilidade de representar a função y=f(x), Ou, segundo a notação N-S-A para simbolizar os limiares de probabilidade crescente, aos valores de F_1 e F_2 deverão corresponder S ou A e ao valor de F_3 o símbolo N. Os níveis de probabilidade com que se podem considerar significativos os valores de F constam igualmente das tabelas já referidas (6). Se a F_3 corresponder o símbolo S ou A, isso quer dizer que é significativo o desvio das médias em torno da regressão e que portanto é alta a probabilidade de a função y=f(x) não ser linear.

Para exemplificar as análises de F, seguem-se dois tratamentos diferentes para os resultados da radioactividade da fracção O-1 na Experiência 2. A Fig. 18 representa graficamente o declínio das dpm/g de tecido e a Fig. 19 a mesma situação, mas com os logaritmos naturais em vez dos próprios valores de dpm. Às regressões lineares respectivas correspondem as duas análises de variâncias dos Quadros 18 e 19.

Quadro 18

Experiência 2. Análise estatística da regressão linear da incorporação de trítio de NAG-T nos lipídeos totais (fracção 0-1) usando dpm/g de tecido como valores de y. Os valores de F são altamente significativos (A).

Desvio	Σq	GL	$\bar{q}$	F		Sig.
Regressão	923,60	1	923,60	F_1	38,25	A
				F_2	129,5	A
Médias	300,74	4	75,19	F_3	10,54	A
Dentro	85,60	12	7,13			
Resto	386,34	16	24,15			
Total	1.309,94	17				

Quadro 19

Experiência 2. Análise estatística da regressão linear da incorporação de trítio de NAG-T nos lipídeos totais (fracção 0-1) usando os logaritmos naturais de dpm/g de tecido como valores de y. Os valores de F são altamente significativos (A) ou não significativos (N).

Desvio	Σq	GL	$\bar{q}$	F		Sig.
Regressão	8,5740	1	8,5740	F_1	106,3	A
				F_2	113,8	A
Médias	0,3868	4	0,0967	F_3	1,283	N
Dentro	0,9039	12	0,0753			
Resto	1,2907	16	0,0807			
Total	9,8647	17				

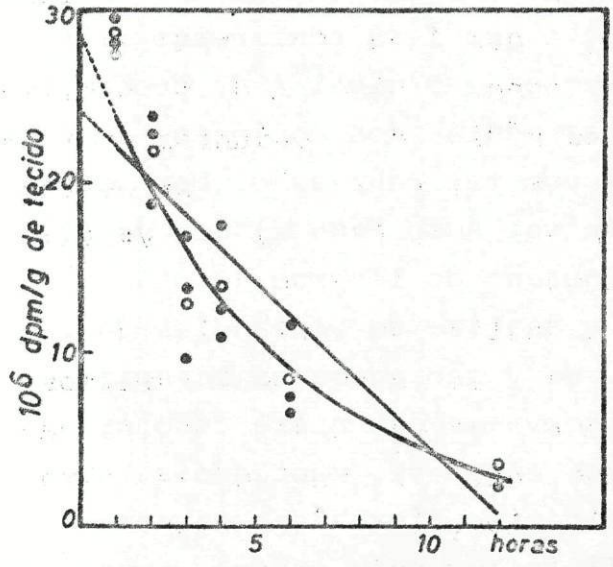


Fig. 18. Experiência 2. Radioactividade dos lipídeos totais (fracção 0-1). Estão representados os valores encontrados (·) e a média de cada um dos seis conjuntos de valores (o). A representação gráfica rectilínea não é satisfatória, pois a análise estatística da regressão linear $y = 24{,}1 - 1{,}970x$ mostra que, embora x e y estejam correlacionados (valores altamente significativos para F_1 e F_2 do Quadro 18), a relação não é linear (valor altamente significativo de F_3 no Quadro 18). A curva exponencial da figura traduz satisfatoriamente a correlação de y e x, pois é a transposição para dpm/g de tecido da função comprovadamente linear em que os valores de y são os logaritmos naturais das dpm/g de tecido, e que está representada pela recta da Fig. 19.

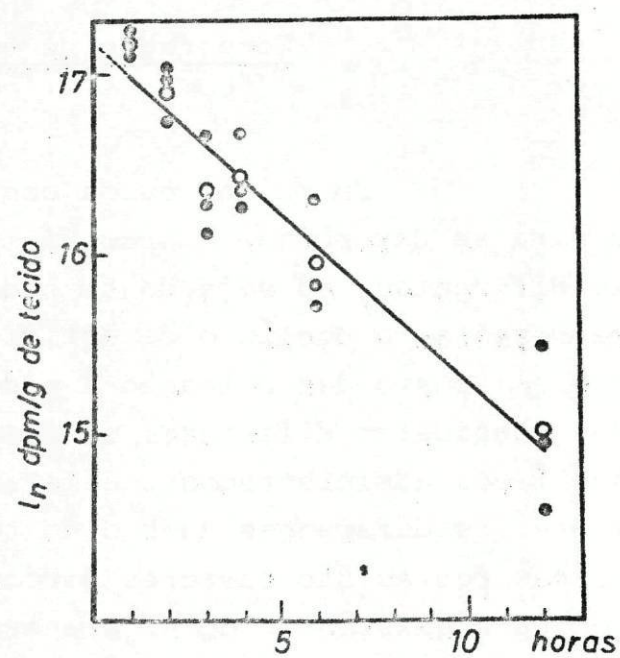


Fig. 19. Experiência 2. Radioactividade dos lipídeos totais (fracção 0-1). Estão representados os logaritmos naturais (·) e a média de cada um dos seis conjuntos de valores (o). A representação gráfica rectilínea é adequada, pois a análise estatística da regressão linear $y = 17{,}18 - 0{,}19x$ mostra que não só y e x estão correlacionados (valores altamente significativos para F_1 e F_2 do Quadro 19), mas que a função $y = f(x)$ é de facto linear (valor não significativo para F_3 no Quadro 19). Fez-se a transposição dos valores teóricos desta recta para os respectivos valores de dpm/g de tecido na Fig. 18, o que originou nesta uma curva exponencial.

No Quadro 18 verifica-se que de facto é altamente provável (nível A ou P>99 % para F_1=38,25) que y varie significativamente quando x varia. No entanto, a grande subida de F_2 em relação a F_1 já sugere que é importante o desvio das médias relativamente à regressão linear, o que fica confirmado pelo valor de F_3 (10,54) ao qual corresponde o nível A de probabilidade (P>99 %) de o afastamento das médias dos conjuntos em torno da regressão ser incompatível com tal regressão. Por outras palavras, é altamente provável (nível A ou P>99 %) que y=f(x) não possa ser definida por uma equação do 1º grau.

O Quadro 19 contém a análise de variâncias da regressão linear em que os valores de y são agora os logaritmos naturais das dpm/g de tecido. Observa-se que neste caso os valores de F_1 e F_2 são mais próximos entre si, mantendo-se altos, enquanto F_3 deixou de ser significativo, isto é, a equação do 1º grau já é apropriada para definir a função y=f(x). Agora, repete-se, y representa logaritmos naturais das dpm/g de tecido. À recta da Fig. 19 corresponde a curva na Fig. 18. Esta curva obteve-se pela conversão dos logaritmos pertencentes à recta da Fig. 19 nos valores absolutos teóricos de dpm/g de tecido.

Comparação de coeficientes b

Em muitos casos compararam-se pares de valores de b para se determinar a probabilidade de serem significativamente diferentes, ou seja de se poderem considerar as rectas que representam o declínio de actividade como não paralelas. O interesse desta determinação é poder avaliar até que ponto se podem considerar diferentes os tempos de semi-vida biológica de nuclídeos administrados e existentes nas diversas fracções isoladas. As diferenças de b e do tempo de semi-vida e o paralelismo das rectas são factores directamente inter-relacionados, pelo que a existência de diferenças significativas entre dois coeficientes de b é equivalente a diferenças significativas entre os respectivos tempos de semi-vida e à falta de paralelismo das rectas. As diferenças entre os coeficientes b anali-

saram-se com provas de t, segundo a expressão:

$$t = \frac{|b - b'|}{\sqrt{\left\{\frac{\Sigma(y - y_t)^2 + \Sigma(y' - y'_t)^2}{n + n' - 4}\left(\frac{1}{\Sigma(x - \bar{x})^2} + \frac{1}{\Sigma(x' - \bar{x}')^2}\right)\right\}}}$$

A expressão $\Sigma(y-y_t)^2$ é o Σq (resto), que se calcula como atrás se viu pela diferença Σq (total) - Σq (regressão).

Para valores grandes de t é grande a probabilidade de b ser significativamente diferente de b' e portanto de as rectas não serem paralelas ou ainda de os tempos de semi-vida serem diferentes.

Os limiares de probabilidade procuraram-se em tabelas (52) o tempo de semi-vida para os declínios exponenciais calculou-se pela expressão

$$0,69315 : |\, b \,|$$

em que 0,69315 é o logaritmo natural de 2 e b o coeficiente de regressão linear

LIMITES DE CONFIANÇA

Calcularam-se limites de confiança para P>95 % em torno de média $\bar{x}$ com o valor de t correspondente a n-1 graus de liberdade, sendo n o número de resultados.

$$\bar{x} \pm t \sqrt{\frac{\Sigma x^2 - \frac{\Sigma^2 x}{n}}{n(n-1)}}$$

R E S U L T A D O S E D I S C U S S Ã O

INCORPORAÇÃO DE TRÍTIO

Incorporação única de 12 horas

Lipídeos neutros e fosfolipídeos comparados aos gangliosídeos

Os resultados da incorporação de trítio ao cabo de 12 horas de incubação (Experiência 1) apresentam-se nos Quadros 20 e 21.

A fracção 0-2 inclui os lipídeos neutros com excepção dos gangliosídeos, e os fosfolipídeos. Esta fracção 0-2 inclui igualmente os precursores dos gangliosídeos em que a parte glicosídica ainda não é suficiente para serem extraídos com os gangliosídeos pelo KCl. Assim, os tri-hexosídeos de ceramida e mais ainda os di-hexosídeos de ceramida são demasiado apolares, por efeito das caudas de ácido gordo e esfingosina, e permanecem substancialmente neste grupo de lipídeos mais hidrófobos. Os mono-hexosídeos de ceramida são os cerebrosídeos que permanecem, por maioria de razão, na fracção 0-2. Adoptou-se neste trabalho a sigla LNF para designar os lipídeos neutros e fosfolipídeos da fracção 0-2.

A fracção A-2 contém os gangliosídeos em que a porção de açúcar na molécula tem proeminência bastante para lhes conferir hidrossolubilidade.

Pelo que se refere aos LNF, pode verificar-se que na injecção intraperitoneal (IP) a incorporação de trítio é maior a partir do acetato-T do que da NAG-T. A incorporação do acetato nos LNF faz-se necessariamente pela activação deste em

Quadro 20

Experiência 1. Incorporação de trítio 12 horas depois da injecção dos precursores. Dentro de cada fracção, verificou-se pela prova do t que as diferenças entre as médias eram altamente significativas (A), excepto nos casos assinalados, em que tais diferenças se revelaram apenas significativas (S) ou não significativas (N). Os números representam dpm/g de tecido.

Fracções	Precursores tritiados e vias de injecção					
	Acetato IP		NAG IP	Acetato IC		NAG IC
O-1	553.000		288.000	2.411.000		7.561.000
O-2	525.000	S	301.000	2.472.000	S	4.727.000
A-2	4.318	N	4.197	16.000		1.174.000
A-6	13.275		6.750	27.400		615.000
O-9C	333.000	S	163.000	1.568.000	N	2.200.000
O-9CM	20.000	S	12.800	117.000	N	191.000
O-R	2.800	N	2.300	12.000		46.400
A-3	1.260	N	2.960	N 3.320		368.000
O-3	2.480	N	1.265	7.200		47.800

acetil-CoA, primeiro passo para qualquer utilização metabólica da acetato. A partir daí, ocorrerá a sua incorporação no colesterol e ácidos gordos, e a partir destes (palmitil-CoA), também na esfingosina da esfingomielina e dos cerebrosídeos. Embora menos directa, é igualmente viável a incorporação de acetato noutras partes destes lipídeos, nomeadamente o glicerol, a colina, serina e etanolamina, e os açúcares, quer dos cerebrosídeos quer precursores dos gangliosídeos, a saber, os di- e tri-hexosídeos de ceramida.

A incorporação nos LNF de trítio a partir da NAG-T é fundamentalmente condicionada pela hidrólise prévia do acetato, visto que a incorporação mais directa sem hidrólise só é viável na adição do terceiro açúcar nos tri-hexosídeos de ceramida sob a forma de N-acetilgalactosamina. Ora no grosso dos LNF, estes precursores de gangliosídeos têm participação quantitativa muito baixa. Segundo Maccioni e col. (95), tais intermediários existem em muito pequena quantidade, propondo a existência de sistemas polienzimáticos que efectuam as sínteses com-

pletas, não libertando tais intermediários.

Pelo exposto, não é difícil compreender que o acetato já livre, seja incorporado em maior escala ao fim de 12 horas, do que o acetato que ainda tem de se desprender do amino-açúcar a que está ligado na NAG (médias de 525.000 dpm para o acetato IP contra 301.000 dpm para a NAG-T IP). Já é menos clara a situação que resulta das injecções intracerebrais (IC) dos dois compostos tritiados. Os números mostram que para o acetato--T, a injecção ao passar de IP para IC provoca um aumento de quase 5 vezes na incorporação. Este aumento poderá explicar-se pelo simples valor de concentração, necessariamente maior em injecção IC. Ora com a NAG-T, a passagem da injecção de IP para IC provoca um aumento de mais de 15 vezes, ou seja o triplo do caso do acetato-T. Perante este resultado tem de se admitir que a chamada barreira cerebral sanguínea favorece nitidamente a importação pelas células do cérebro dos acetilaminoaçúcares sobre a do acetato. Aliás, esta observação é compatível com o facto conhecido de que aquela barreira é sobretudo eficaz para impedir a captação pelo cérebro de compostos que possuem cargas eléctricas, como é o caso do acetato. Ora a carga eléctrica do acetato perde-se com a ligação do carboxilo ao NH_2 da glucosamina. Este resultado parece também indicar que nas injecções IP o acetilo da NAG é hidrolisado, porventura no fígado, antes de o açúcar atingir em grande quantidade a circulação sanguínea cerebral. A ampla incorporação de trítio nos LNF a partir de NAG-T IC, comparada à do acetato pela mesma via IC, sugere ainda que o cérebro possui elevada capacidade para a desacetilação da NAG.

A incorporação de trítio nos gangliosídeos (A-2) é em valor absoluto menor do que nos LNF, o que é de esperar em virtude de os gangliosídeos representarem pequena porção dos lipídeos totais. Isto é sobretudo verdade para o acetato-T como precursor. Com efeito, para 7 g de fosfolipídeos e colesterol por 100 g de tecido fresco, não existem mais de 0,25 g de gangliosídeos, segundo cálculos com base em dados de Burton e col. (33) e de Suzuki e col. (151), em ratos com idades próximas das utilizadas neste estudo.

Na idade próxima dos 13 dias verifica-se rápido incremento dos gangliosídeos noc érebro do rato, sendo o seu valor próximo nessa altura de metade do máximo que se atinge cerca dos

20 dias de idade (33). Exactamente por este motivo é que se escolheram ratos com 13 ou 14 dias de idade para a altura da injecção.

A incorporação de trítio do acetato-T nos gangliosídeos é generalizada às diversas partes constituintes, a saber, o ácido gordo, a esfingosina e os açúcares, iniciando-se o processo também pela activação do acetato. Ora a proximidade da incorporação proveniente do acetato-T IP (4.318 dpm) e a da NAG-T IP (4.197 dpm) sugere que o acetilaminoaçúcar é desacetilado e o acetato livre posteriormente utilizado. Comparando estes valores com os dos LNF, vê-se que a actividade de trítio incorporada nestes é muitissimo superior à incorporada nos gangliosídeos (cerca de 120 vezes para o acetato-T IP e 80 vezes para a NAG-T IP). A incorporação nos gangliosídeos de trítio proveniente do acetato-T IC, sofre um aumento de 4 vezes relativamente ao acetato-T IP, valor próximo das 5 vezes observadas para os LNF ao passar o acetato-T de IP a IC. Comparando novamente os LNF com os gangliosídeos agora para o acetato-T, ambos na via IC, vê-se que a incorporação nos LNF é cerca de 155 vezes superior à dos gangliosídeos, valor maior, mas da mesma ordem de grandeza das razões de 120 e 80 observadas entre os LNF e os gangliosídeos com os precursores via IP.

O que se passa com a incorporação de trítio nos gangliosídeos proveniente da NAG-T é inteiramente diferente, pois que é 280 vezes maior do que do mesmo composto por via IP, e apenas 4 vezes menor do que a incorporação correspondente dos LNF. Isto significa que a especificidade de incorporação de trítio nos gangliosídeos com NAG-T IC é muito superior à que se obtém para os LNF nas mesmas circunstâncias. Realmente, atendendo às respectivas concentrações no cérebro, e de acordo com os valores acima mencionados de 7 g de LNF e 0,25 g de gangliosídeos por 100 g de tecido fresco, a marcação específica conseguida com NAG-T é para os gangliosídeos quase 6 vezes maior do que para os LNF, com base nas dpm por peso de compostos em 100 g de tecido fresco:

LNF - 4.727.000:7 = 880.000 Gangl. - 1.174.000:0,25 = 5.100.000

5.100.000:880.000 = 5,8

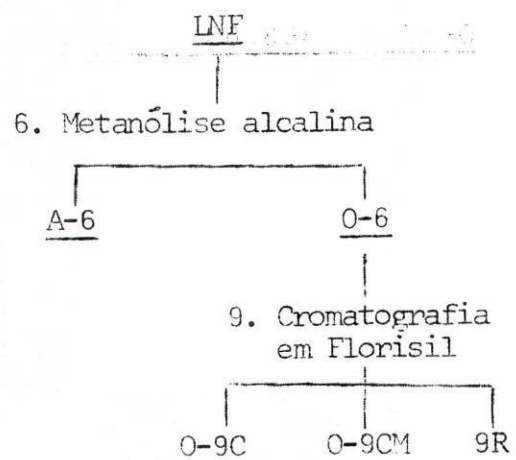
Cálculo paralelo para o acetato-T IC dá incorporação 2,6 vezes maior nos LNF do que nos gangliosídeos, o que é de esperar para lipídeos que incorporam maior quantidade de acetato por molécula que os gangliosídeos.

A NAG-T parece assim constituir um bom marcador de gangliosídeos quando administrada por via IC. Esta incorporção elevada mostra que a NAG é acrescentada à molécula dos gangliosídeos sem desacetilação prévia, pois que se o acetato fosse substancialmente separado e só depois incorporado nos gangliosídeos, não se vê motivo para a sua incorporação fosse 280 vezes maior do que por via IP. A dar-se a desacetilação prévia na NAG-T IC, o acetato seria distribuído pelas diversas partes da molécula como no caso dos LNF. Ora nestes houve apenas um incremento de 16 vezes ao passar da via IP à IC .

Isto não significa que o trítio proveniente do acetato hidrolisado da NAG-T não possa incorporar-se simultaneamente e de maneira inespecífica às outras partes dos gangliosídeos como acontece nos LNF. Os ensaios de metanólise sugerem, no entanto, que a marcação nos gangliosídeos fica sobretudo no acetilaminoaçúcar. A via IC é também empregada por alguns investigadores, quer para estudos com acetato como para precursores específicos dos gangliosídeos, ambos marcados com nuclídeos (32, 64,72,83).

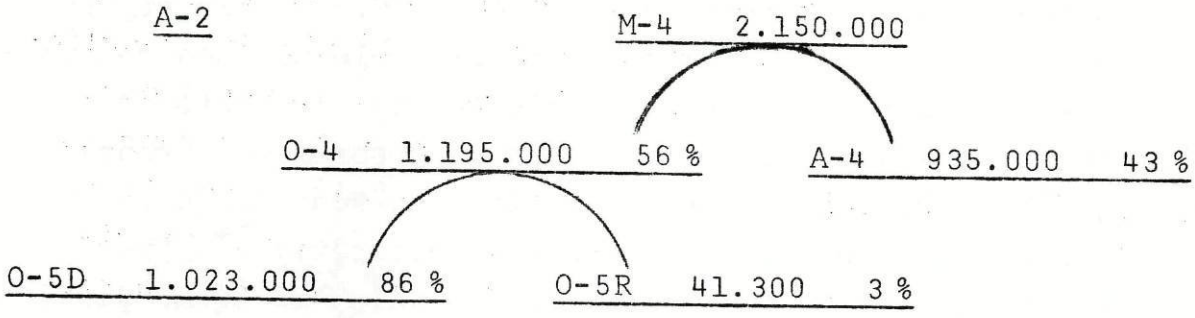
Metanólise dos lipídeos

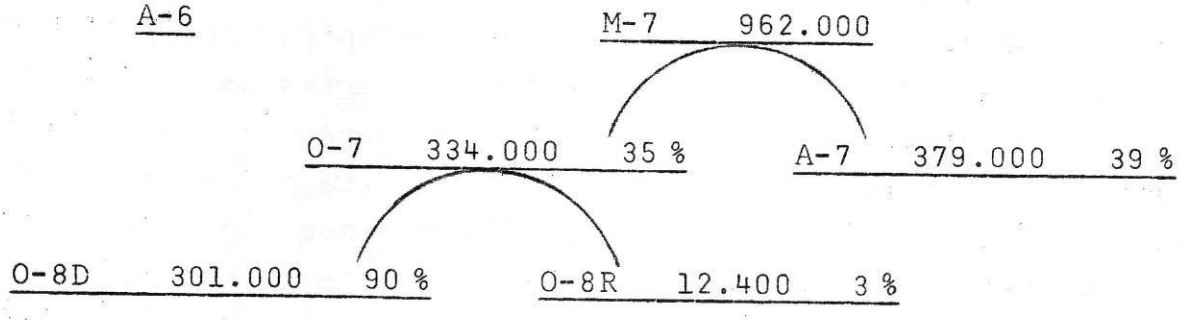
A distribuição da radioactividade pelas fracções resultantes da metanólise alcalina dos LNF encontra-se igualmente no Quadro 20 . Desde logo se pode verificar que a fase orgânica com que se extrai o meio de incubação leva a maior parte do trítio, principalmente nos compostos mais apolares da fracção O-9C. Esta é a que contém os ácidos gordos metilados e colesterol. Com uma única excepção, todas as outras fracções (A-6, O-9CM e 9R) apresentam pequena quantidade de trítio seja

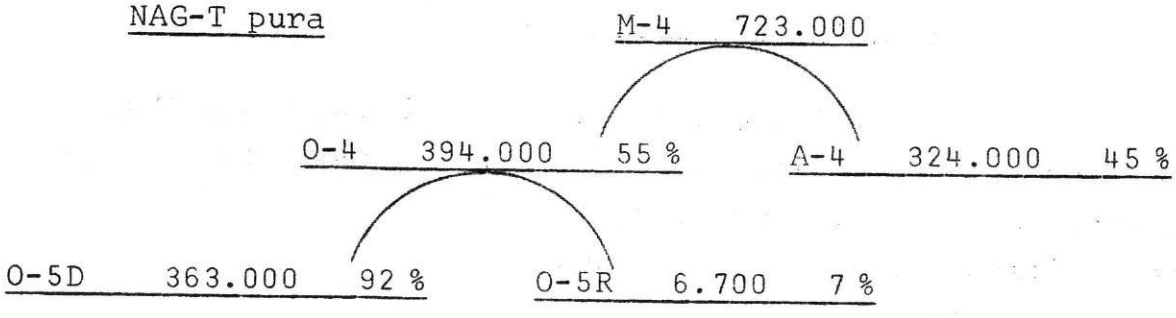


Quadro 21

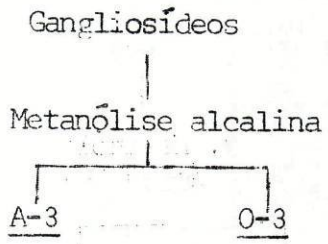
Experiência 1. Metanólise ácida das fracções A-2 e A-6 resultantes da injecção IC de NAG-T e a deste composto puro. Valores de dpm/g de tecido e percentagens referidas à fracção anterior.





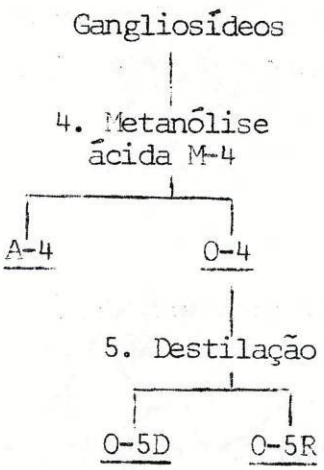


qual for o composto precursor ou a via de administração.



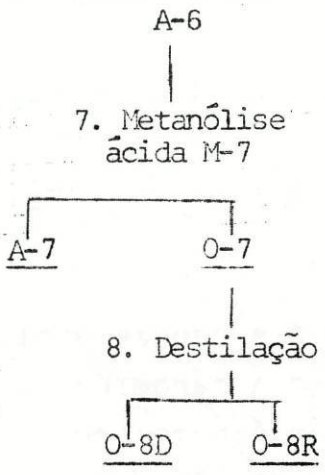
A excepção é a fracção A-6 no caso da NAG-T IC, em que a quantidade de trítio presente é substancial. Esta observação é compatível com a presença na fracção A-6 da parte glicosídica dos precursores dos gangliosídeos após a libertação das caudas apolares do ácido gordo e a esfingosina que constituem a ceramida. A incorporação específica de NAG-T IC nesta fracção A-6 mostra o paralelismo com a incorporação do trítio, também de NAG-T e também por via IC, nos gangliosídeos da fracção A-2.

Na metanólise alcalina dos gangliosídeos verifica-se que a quantidade de trítio na fase orgânica O-3, extrato do meio de incubação, é importante ou mesmo predominante nos casos do acetato-T IP ou IC e na NAG-T IP onde, como atrás se sugeriu, haverá hidrólise prévia do acetato e sua incorporação generalizada nos gangliosídeos. Mas no caso da NAG-T IC, predomina claramente a quantidade de trítio na fase aquosa A-3 (onde existirão os açúcares dos gangliosídeos) sobre o trítio da fase orgânica O-3, onde ficam as partes hidrófobas da molécula.



Os resultados da metanólise ácida das fracções A-6 e A-2 (gangliosídeos), mas apenas as que provêm da NAG-T IC (Quadro 21) parecem confirmar o paralelismo da incorporação do acetilaminoaçúcar tanto nos gangliosídeos como nos seus precursores da fracção A-6. Realmente, e nas condições experimentais que se seguiram, parte apreciável do trítio ficou nas fases aquosas A-4 e A-7 após extracção por solvente orgânico dos meios de incubação. Essas fases aquosas contêm esfingosina livre, mas sobretudo metilglicosídeos. Note-se que a partilha observada com NAG-T pura submetida ao mesmo tratamento se encontra em proporção semelhante na fase A-4.

A quantidade de trítio nas fases orgânicas O-4 e O-7 deverá pertencer sobretudo ao acetato de metilo proveniente dos acetilaminoaçúcares dos gangliosídeos, uma vez que não é



de esperar a existência apreciável de trítio nos ácidos gordos, como atrás se justificou para a incorporação nos gangliosídeos e seus precursores, de trítio da NAG-T IC. Os ésteres metílicos dos ácidos gordos estão também, ainda que com pequena radioactividade, nas fracções orgânicas O-4 e O-7. Também aqui o paralelismo na distribuição de trítio proveniente da NAG-T pura na fracção O-4 após metanólise parece apoiar a mesma hipótese de ser o acetato de metilo o principal componente. Nesse caso a sua destilação deveria conduzir ao aparecimento no destilado da maior parte do trítio das fracções orgânicas. Isso é exactamente o que se observa, pois da fracção O-4 passam ao destilado O-5D cerca de 90 % do trítio, tanto dos gangliosídeos como da NAG-T pura. Paralelamente, 90 % da fase O-7 com os precursores dos gangliosídeos, passam ao destilado O-8D.

Deste estudo de incorporação de trítio em 12 horas de incubação, e em resumo, resulta a conclusão que a NAG-T é um precursor adequado para a marcação isotópica de gangliosídeos e que, além disso, as células cerebrais são capazes de importar facilmente acetilaminoaçúcar do sangue circulante e de rapidamente o desacetilar.

Contaminação dos lipídeos totais

Há um facto interessante que se observa nos lipídeos totais (fracção O-1) quando se extraem pelo KCl. Verifica-se no Quadro 20 que com o acetato-T, tanto IP como IC, o trítio das fracções A-2 e O-2 somadas totaliza virtualmente o da fracção O-1 corrrespondente. Mas no caso da NAG-T IC, isso está longe de acontecer, porquanto o trítio das duas fracções A-2 e O-2 em conjunto (4.727.000 + 1.174.000 dpm) constitui menos de 80 % dos 7.561.000 dpm da fracção O-1.

Um dos factores que pode explicar o fenómeno é a NAG-T IC sofrer extensa desacetilação, ficando acetato-T livre. Outra explicação é a passagem de NAG a UDP-NAG, o qual se acumularia sem haver tempo de ser integralmente utilizada. Tanto

o acetato como a UDP-NAG poderia ser extraído pelo solvente orgânico de extracção dos lipídeos e passar depois à fase aquosa e perderem-se na diálise em que se obtêm os gangliosídeos. Nenhum dos casos impediria, claro, substancial incorporação de NAG intacta nos gangliosídeos. O que se passa com o estudo da incorporação, também com a duração de 12 horas no máximo, mas com observações em tempos menores, apoia esta ideia de que a fracção 0-1 contém material não lipídico, acetato, ou mais provavelmente UDP-NAG.

Uma vez estabelecida a relativa especificidade da incorporação de NAG-T IC nos gangliosídeos, sobretudo quando comparada à que proveio do acetato-T, pareceu de interesse tentar verificar ao fim de quanto tempo se atingiria a incorporação máxima, além de observar o comportamento das diversas fracções anteriormente estudadas a diversos tempos até 12 horas (Experiência 2).

Incorporação com períodos de 1 a 12 horas

Contaminação decrescente dos lipídeos totais

É interessante notar, antes de mais, o sensível declínio da radioactividade dos lipídeos totais (Fig. 19), ou talvez com mais propriedade, da fracção que os contém. Esta distinção tem aqui cabimento, pois conforme se sugeriu na discussão da Experiência 1, os lipídeos totais parecem vir acompanhados de substâncias não lipídicas, de afinidade para a água, e que bem pode ser acetato hidrolisado da molécula de NAG-T ou UDP-NAG sem ter havido tempo para incorporá-los. Comparando a radioactividade das fracções 0-2 e A-2 com a da 0-1 ao fim de 12 horas de incubação, pode ver-se que na Experiência 1, os seus valores (Quadro 20, NAG-T IC) são respectivamente 62,5 % e 15,5 %, o que está próximo dos valores respectivos de 61,5 % e 13,7 % na Experiência 2, em média (Figs. 20 e 21), ao fim de 12 horas de incubação. A situação à primeira hora é muito diversa, pois aquelas duas fracções representam apenas 8,5 % e 0,27 % da fracção 0-1, respectivamente, crescendo depois esses valores desde a primeira à 12ª hora. Parece poder excluir-

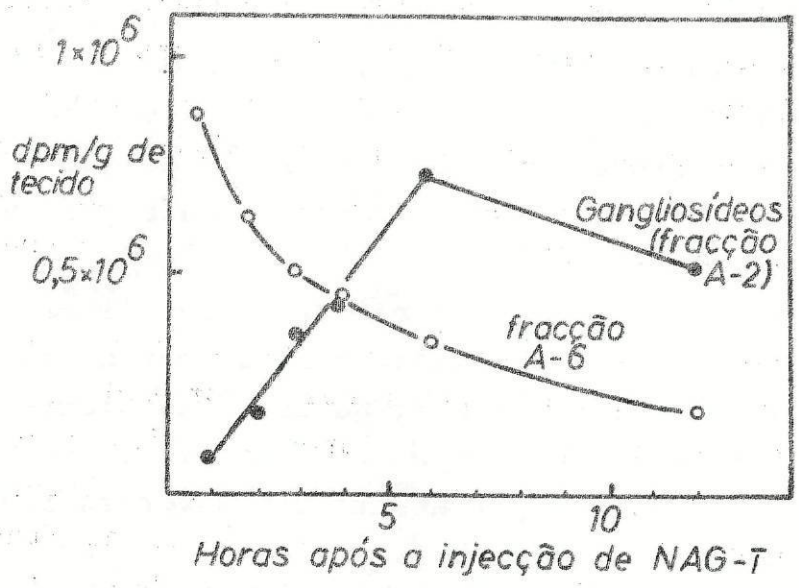


Fig. 20. Experiência 2. Radioactividade média dos gangliosídeos e da fracção A-6 que contêm os precursores dos gangliosídeos em que a parte de açúcares é ainda superada pela parte hidrófoba da ceramida, o que os faz permanecer com os lipídeos neutros e fosfolipídeos. A metanólise destes libertas os açúcares, os quais ficam na fase aquosa A-6. Nota-se uma certa compensação entre o declínio na fracção A-6 e o incremento na A-2. Injecção intracerebral de N-(^{3}H-acetil)-glucosamina (NAG-T).

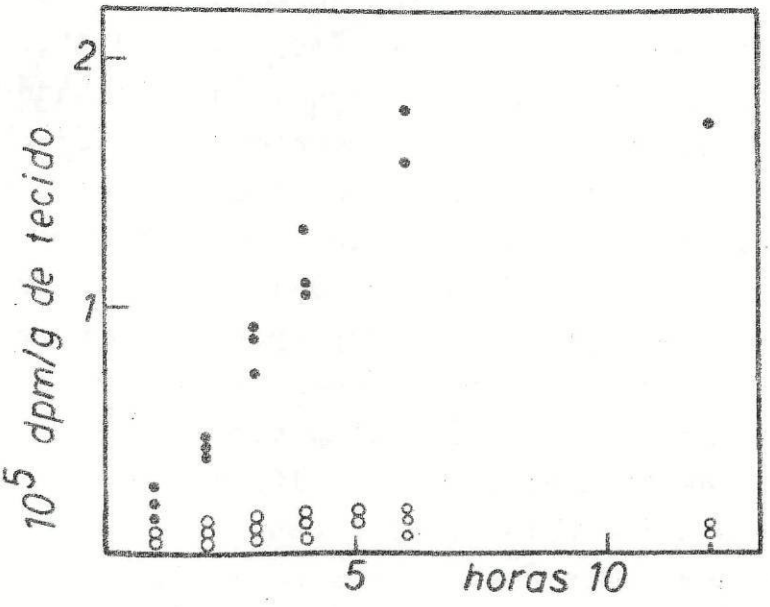


Fig. 22. Experiência 2. Radioactividade das fracções polar (.) e apolar (o), respectivamente A-3 e O-3, resultantes da metanólise alcalina dos gangliosídeos. A fracção A-3 continha a maior parte da radioactividade recuperada após a metanólise e além disso o perfil de incorporação é paralelo ao dos gangliosídeos da Fig. 20.

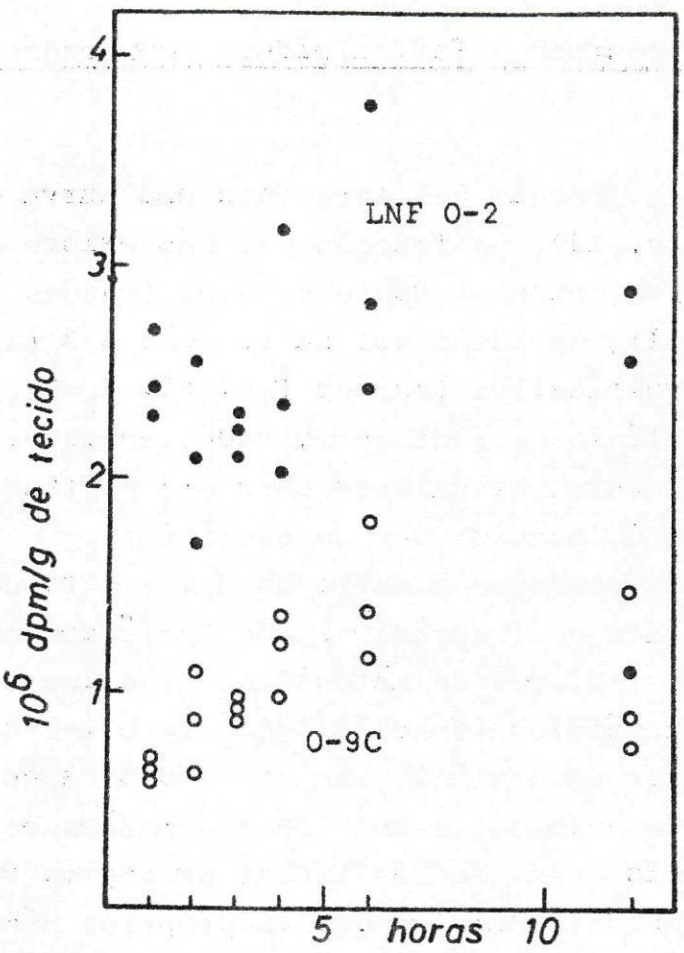


Fig. 21. Radioactividade dos lipídeos neutros e fosfolipídeos (LNF) da fracção O-2 na Experiência 2. Após metanólise alcalina, o extracto orgânico do meio de incubação da metanólise extraiu-se com solvente orgânico apolar, o qual se fez passar por coluna de Florisil. O primeiro eluído continha a maior parte da radioactividade (O-9C), a qual existia fundamentalmente no colesterol e ácidos gordos (ver Fig. 11 na pg. 40). O perfil da incorporação parece o mesmo nas duas fracções desta figura 21. Injecção intracerebral de N-(^{3}H-acetil)-glucosamina.

-se a hipótese de o declínio da radioactividade na fracção 0-1 ser devida a material lipídico. A observação dos resultados para as dpm nas fracções 0-2 e A-2 apoiam esta ideia.

Lipídeos neutros e fosfolipídeos comparados aos gangliosídeos

Enquanto a fracção 0-1 apresenta uma curva de declínio exponencial (Fig. 19), na fracção 0-2 não existe sequer correlação significativa entre as dpm e o tempo (razões $F_1=0$, $F_2=0$ e $F_3=11,27$, Fig. 21), ao passo que na fracção A-2 tal correcção é altamente significativa (razões $F_1=7,55$, $F_2=17,28$ e $F_3=6,153$), mas sem declínio de radioactividade, antes pelo contrário (Fig. 20). Realmente, os valores para A-2 mostram haver um aumento até à 6ª hora, seguido por um declínio.

A falta de correlação entre as dpm e o tempo de incubação que se verifica na fracção 0-2 dos LNF é compartilhada pelos seus produtos apolares de metanólise alcalina (Fig. 21). Já os seus produtos hidrófilos (fracção A-6), di- e tri-hexosídeos de ceramida, acusam um declínio, em que o seu carácter exponencial predomina. Na verdade, a análise das razões de variâncias são mais favoráveis a uma função linear em que os valores de y sejam os logaritmos naturais do que os próprios números de dpm/g de tecido (Quadro 22, Fig. 20).

Há uma prova indirecta de que devem ser de facto os precursores dos gangliosídeos os produtos presentes na fracção A-6, e que é o facto de a subida da radioactividade nos gangliosídeos da fracção A-2 ser acompanhada de uma descida até certo ponto balanceada quantitativamente, da radioactividade da fracção A-6, como pode ver-se na Fig. 20. Nesta figura, a representação gráfica correspondente aos gangliosídeos da 6ª à 12ª hora deveria ser talvez uma linha encurvada com um máximo intermédio. No entanto, como não se efectuaram amostragens intermédias não se indica tal máximo que provavelmente ocorreria cerca das 8 horas.

Este é um dos pontos que aguardam futuro esclarecimento, bem como a identificação positiva dos compostos responsáveis pelo declínio das fracções 0-1 e A-6.

Têm-se encontrado diveros tempos de incorporação máxima em gangliosídeos, com 20 a 30 horas com 1-^{14}C-galactose e 3-^{14}C-serina (33) em ratos de 13 dias, 8 a 24 horas com N-acetil-^{3}H-manosamina (72) em ratos de 15 dias, 3 a 6 horas com 6-^{3}H- glucosamina em ratos de 8 dias (95) e com o mesmo composto 48-72 horas com ratos de 18 dias (95). Svennerholm (64) encontrou para a 1-^{14}C-glucosamina perfis de incorporação semelhantes aos deste estudo. Com o gangliosídeo C_4 regista um perfil de incorporação com inflexão às 6 horas como aqui se observou (Fig.20)

A metanólise alcalina dos gangliosídeos (Fig. 22) mostra que os seus componentes hidrófilos (fracção A-3) acompanham as características de incorporação da fracção original A-2, enquanto os componentes apolares (fracção O-3) se assemelham às das equivalentes fracções da metanólise dos LNF. Quer dizer, a incorporação de trítio na parte apolar dos gangliosídeos e na dos LNF faz-se de modo semelhante, via acetato após hidrólise prévia.

Também aqui, a incorporação de trítio predomina na parte apolar dos LNF e na polar dos gangliosídeos.

Quadro 22

Experiência 2. Análise estatística da regressão linear dos resultados expressos em dpm/g de tecido ou nos seus logaritmos naturais. Com excepção dos casos abaixo assinalados, esta análise mostrou não ser possível o estabelecimento de regressão linear significativa. Para os casos em que o foi, mostram-se os respectivos parâmetros. Em (*) o tratamento incidiu sobre os logaritmos naturais de dpm/g de tecido. — No caso da fracção A-6, a regressão linear revelou-se mais adequada com o tratamento exponencial, pois o F_3 passou de 1,803 para 0,196, para valores equiparáveis de F_1 e F_2.

Fracções	Coeficientes de regressão		Tempos de semi-vida
	a	b	
O-1*	17,18	-0,190	3,7 h
A-6	723.000 dpm	-55,31	6,5 h
A-6*	13,64	-0,159	4,4 h

DECLÍNIO BIOLÓGICO DE NUCLÍDEOS

Estudo com N-(^{3}H-acetil)-glucosamina e 1-^{14}C-glucosamina em marcação simples e dupla

Razões do estudo

Embora a radioactividade ao fim de 12 horas fosse muito maior nos LNF que nos gangliosídeos, havia a possibilidade de o declínio nestes ser menor e que se atingisse um ponto em que fosse possível a autorradiografia dos gangliosídeos. Procedeu-se então a um estudo em que se observaram os valores de radioactividade no decurso de algumas semanas após a injecção intracerebral de NAG-T.

Desde logo se verificou a inviabilidade de marcar selectivamente os gangliosídeos por este processo, pois que a marcação dos LNF não só era mais intensa, como a diferença se acentuava com o correr do tempo. Entretanto, expandiu-se esta

Quadro 23

Experiências 3 e 4. Análise dos resultados das fracções individuais com o estabelecimento da regressão linear, sendo y o logaritmo natural das dpm/g de tecido, x o número de dias após injecção e n o número de pares x,y. Discriminação dos valores de radioactividade: T, trítio; C, carbono-14; S, marcação simples; D, marcação dupla.

Fracções	Parâmetros de regressão linear		
	n	Coeficientes	
		b	a
O-1.TS	22	-0,0143	15,02
O-1.TD	17	-0,0151	14,96
O-1.CS	18	-0,0178	12,50
O-1.CD	17	-0,0173	12,67
O-2.TS	22	-0,0127	14,86
O-2.TD	17	-0,0145	14,93
O-2.CS	18	-0,0166	12,48
O-2.CD	17	-0,0164	12,55
A-2.TS	21	-0,0337	12,98
A-2.TD	16	-0,0389	12,44
A-2.CS	18	-0,0350	10,22
A-2.CD	16	-0,0402	10,81

primeira experiência de declínio da radioactividade (Experiên cia 3) com outra (Experiência 4). Na Experiência 4 usaram-se dois grupos de animais com a mesma idade: injectou-se num deles NAG-T acompanhada de 1-^{14}C-glucosamina (GLN-C) e noutro grupo a mesma quantidade de GLN-C mos sozinha. Pretendia-se assim, não só confirmar se possível as velocidades de declínio antes verificadas, mas ainda compará-las com as de um composto marcado na própria cadeia carbonada. A inclusão dos dois compostos no mesmo veículo injectado eliminaria os efeitos devido a perdas do injectado por refluxo. Embora sempre de pequeno valor, e raramente verificados, tais refluxos somam-se às variações próprias das características individuais dos animais para explicarem as oscilações de radioactividade observadas dentro dos componentes de cada grupo de ratos nas mesmas condições. Mesmo assim, os valores encontrados, tanto nas experiências de incorporação como nas de declínio, evidenciam significado estatístico de onde é possível tirar conclusões. Pretendeu-se por outro lado, verificar o comportamento dos componentes glicosídicos das glicoproteínas.

Processamento de dados

Devido às semelhantes condições das Experiências 3 e 4, os resultados referentes às fracções lipídicas O-1, O-2 e A-2 foram analisados em conjunto, como adiante se exporá. Evidentemente que, não tendo sido feito um estudo das glicoproteínas na Experiência 3, tudo o que se refira a estes compostos diz respeito a uma só experiência, ao contrário dos lipídeos, que se tudaram em ambas.

Nos Quadros 23 e 24 apresentam-se os dados relativos à regressão linear dos logaritmos naturais das dpm/g de tecido em função dos dias decorridos após injecção dos precursores radioactivos. A letra T refere-se ao trítio e C ao carbono-14, em marcação simples (S) ou dupla (D). Os dados relativos à marcação dupla entendem-se sempre depois de feita a respectiva discriminação.

Os Quadros 25 e 26 dão conta da significância das razões de variâncias aplicadas às regressões lineares dos dois quadros anteriores.

Para cada par de fracções homólogas (por exemplo

Quadro 24

Experiências 3 e 4. Análise dos resultados das fracções individuais com o estabelecimento da regressão linear, sendo y o logaritmo natural das dpm/g de tecido, x o número de dias após injecção e n o número de pares x,y. Discriminação dos valores de radioactividade: T, trítio; C, carbono-14; S, marcação simples; D, marcação dupla.

Fracções	Parâmetros da regressão linear		
	n	Coeficientes	
		b	a
P-1.TD	14	-0,0251	15,12
P-1.CS	20	-0,0222	13,19
P-1.CD	14	-0,0208	13,30
A-10.TD	11	-0,0266	14,79
A-10.CS	18	-0,0197	12,61
A-10.CD	11	-0,0204	12,68
A-11.TD	11	-0,0257	14,25
A-11.CS	17	-0,0190	12,03
A-11.CD	11	-0,0241	12,36
A-12.CS	18	-0,0302	11,76
A-12.CD	11	-0,0301	11,90

O-LTS e O-1.TD) em que a regressão linear se revelou satisfatória para definir a variação dos logaritmos naturais das dpm/g de tecido em função do tempo (Quadros 25 e 26), verificou-se se os respectivos coeficientes de regressão b eram significativamente diferentes (Quadro 27). Nos casos em que se verificou (e foram todos) que a diferença entre coeficientes b não era significativa, estabeleceram-se novos parâmetros de regressão linear, agora com as diversas fracções agrupadas, isto é, manipularam-se conjuntamente os dados obtidos em marcação simples e os obtidos em marcação dupla após discriminação, do que dá conta o Quadro 28. Para contraprova da liceidade de tal combinação, estão os dados da análise estatística da regressão "combinada" (Quadro 29). O Quadro 30 dá conta da significância das diferenças entre coeficientes de regressão b, mas agora, para

Quadro 25

Experiências 3 e 4. Análise estatística da regressão linear do Quadro 23. Os valores de F são altamente significativos (A) ou não significativos (N). Discriminação dos valores de radioactividade: T, trítio; C, carbono-14; S, marcação simples; D, marcação dupla.

Discrim.		Razões de variâncias e significância					
		0-1		0-2		A-2	
TS	F_1	59,69	A	50,64	A	277,8	A
	F_2	74,72	A	61,27	A	366,5	A
	F_3	2,230	N	2,040	N	2,517	N
TD	F_1	25,06	A	25,07	A	78,71	A
	F_2	28,07	A	27,50	A	125,6	A
	F_3	1,429	N	1,365	N	3,083	N
CS	F_1	130,7	A	180,8	A	198,4	A
	F_2	107,7	A	88,47	A	160,3	A
	F_3	0,302	N	0,116	N	0,232	N
CD	F_1	70,58	A	68,52	A	197,5	A
	F_2	98,86	A	78,07	A	188,5	A
	F_3	2,524	N	1,522	N	0,841	N

cada fracção, entre o trítio e o carbono-14 (ou entre as respectivas semi-vidas), usando-se para cada nuclídeo os valores combinados que constam do Quadro 28.

Quadro 26

Experiências 3 e 4. Análise estatística da regressão linear do Quadro 24. Os valores de F são altamente significativos (A) ou não significativos (N). Discriminação dos valores de radioactividade: T, trítio; C, carbono-14; S, marcação simples; D, marcação dupla.

Discrim.		Razões de variâncias e significância							
		P-1		A-10		A-11		A-12	
TS	F_1	46,21	A	78,46	A	57,67	A		
	F_2	46,21	A	73,59	A	57,03	A		
	F_3	1,001	N	0,861	N	0,975	N		
CS	F_1	153,9	A	91,45	A	84,15	A	104,6	A
	F_2	137,9	A	75,51	A	76,61	A	170,1	A
	F_3	0,625	N	0,436	N	0,731	N	1,669	N
CD	F_1	94,30	A	86,19	A	114,6	A	48,36	A
	F_2	104,6	A	178,6	A	145,3	A	63,73	A
	F_3	1,479	N	3,413	N	1,601	N	1,715	N

Quadro 27

Experiências 3 e 4. As diferenças entre coeficientes b pela análise do factor t entre as fracções S e D, revelaram-se não significativas em todos os casos.

Fracções		t
O-1	TS-TD	0,263
O-1	CS-CD	0,185
O-2	TS-TD	0,538
O-2	CS-CD	0,060
A-2	TS-TD	1,194
A-2	CS-CD	1,381
P-1	CS-CD	0,465
A-10	CS-CD	0,179
A-11	CS-CD	1,398
A-12	CS-CD	0,021

Quadro 28

Experiências 3 e 4. Análise dos resultados das fracções agrupadas (TS+TD=T e CS+CD=C), com o estabelecimento da regressão linear, sendo y o logaritmo natural das dpm/g de tecido, x o número de dias após injecção e n o número de pares x,y.

Fracções	Parâmetros da regressão linear			
		Coeficientes		
			a	
	n	b	log.	dpm/g tecido
O-1.T	39	-0,0145	14,79	2.650.000
O-1.C	35	-0,0175	12,51	271.000
O-2.T	39	-0,0132	14,68	2.370.000
O-2.C	35	-0,0165	12,51	271.000
A-2.T	37	-0,0359	12,24	280.000
A-2.C	34	-0,0371	10,47	35.100
P-1.T	14	-0,0251	15,12	3.680.000
P-1.C	34	-0,0220	13,28	571.000
A-10.T	11	-0,0266	14,79	2.650.000
A-10.C	29	-0,0200	12,64	309.000
A-11.T	11	-0,0257	14,25	1.550.000
A-11.C	28	-0,0206	12,17	193.000
A-12.C	29	-0,0307	11,84	138.000

Quadro 29

Experiências 3 e 4. Análise estatística da regressão linear do Quadro 28. Os valores de F são altamente significativos (A) ou não significativos (N). Discriminação dos valores de radioactividade: T, trítio; C, carbono-14; S, marcação simples; D, marcação dupla.

Precursor		Razão de variâncias e significância					
		O-1		O-2		A-2	
NAG-T	F_1	75,22	A	61,41	A	233,8	A
	F_2	76,89	A	60,55	A	274,6	A
	F_3	1,136	N	0,914	N	2,019	N
GLN-C	F_1	186,2	A	177,6	A	339,5	A
	F_2	189,2	A	165,8	A	362,7	A
	F_3	1,303	N	0,449	N	1,546	N

		P-1		A-10		A-11		A-12	
GLN-C	F_1	248,1	A	186,2	A	182,8	A	222,9	A
	F_2	240,8	A	197,6	A	223,4	A	252,8	A
	F_3	0,815	N	1,329	N	2,156	N	1,723	N

Quadro 30

Experiências 3 e 4. As diferenças entre coeficientes b pela análise do factor t entre as fracções agrupadas T e C revelaram-se não significativas em todos os casos. Assim, podem considerar-se paralelas as rectas que, para a mesma fracção definem os declínios exponenciais de trítio e os do carbono-14.

Fracções		t
O-1	T-C	1,328
O-2	T-C	1,503
A-2	T-C	0,393
P-1	T-C	0,951
A-10	T-C	1,998
A-11	T-C	1,405

Quadro 31

Experiências 3 e 4. Tempos de semi-vida, em dias.

Fracções		Nuclídeo T	Nuclídeo C
Lipídeos totais	O-1	48	40
Lip. neut. e fosfolip.	O-2	53	42
Gangliosídeos	A-2	19	19
Proteínas	P-1	28	32
NANA proteico	A-10	26	35
Idem, purificado	A-11	27	34
Hexosamina proteica	A-12	-	23

Declínio exponencial

A primeira observação que ressalta das Experiências 3 e 4 é o declínio da radioactividade, tanto do trítio como do carbono-14, segundo curvas exponenciais. Que isto é assim prova-o a análise pelas razões de variâncias F. A segunda observação é a da coincidência verificada entre o declínio de um nuclídeo injectado isoladamente e o declínio do mesmo nuclídeo injectado acompanhado de outro, depois de feita a discriminação das contagens. Isto evidencia a correcção do processo discriminador e permite ao mesmo tempo o tratamento conjunto das duas séries de valores para o estabelecimento dos tempos de semi-vida. É interessante também a falta de diferenças significativas que se nota em todas as fracções estudadas entre o trítio e o carbono-14. A falta de diferenças significativas entre coeficientes de regressão b foi verificada pela aplicação da prova do t e consta do Quadro 30. Embora tanto com os LNF como nos gangliosídeos se tenha verificado falta de diferenças significativas entre os declínios do trítio e do carbono-14, o valor do t encontrado para os LNF (fracção O-2) é muito maior (1,503)do que para os gangliosídeos da fracção A-2 (0,393). Isto, e o facto de os gangliosídeos constituirem um conjunto de compostos muito mais homogéneo que os LNF, empresta maior relevância à coincidência entre aqueles declínios para os ganliosídeos. Assim, enquanto para os LNF os factos obser

Quadro 32

Experiências 3 e 4. Significâncias das diferenças entre tempos de semi-vida, pela prova do t entre os coeficientes de regressão b. Diferenças altamente significativas (A), significativas (S) ou não significativas (N).

NAG-T

Fracções		A-12	A-10	P-1	A-2
Lipídeos neut. e fosfolip.	O-2	-	A	A	A
Gangliosídeos	A-2	-	A	S	
Proteínas	P-1	-	N		
NANA proteico	A-10	-			
Hexosamina proteica	A-12	-			

GLN-C

Fracções		A-12	A-10	P-1	A-2
Lipídeos neut. e fosfolip.	O-2	A	A	A	A
Gangliosídeos	A-2	S	A	A	
Proteínas	P-1	A	N		
NANA proteico	A-10	A			
Hexosamina proteica	A-12				

vados não permitem mais especulação, sobre os gangliosídeos parece legítima a conclusão de que os açúcares dos gangliosídeos, nomeadamente a N-acetilgalactosamina, uma vez incorporada na molécula, é dela hidrolisada em bloco, isto é, não perde o acetato antes de se separar totalmente da parte restante da estrutura gangliosídica.

Tempos de semi-vida

Os tempos de semi-vida das diversas fracções analisadas encontram-se no Quadro 31, enquanto no Quadro 32 se pode verificar a significância das diferenças entre os tempos

de semi-vida das várias fracções, dentro de cada nuclídeo.

É realmente notável a diferença entre os tempos de semi-vida dos LNF (40 a 50 dias) e o dos gangliosídeos (19 dias). Estes resultados confirmam plenamente a impossibilidade de empregar qualquer dos marcadores para a localização radiográfica dos gangliosídeos. Por outro lado, tal facto não é de todo surpreendente, por já se saber que pelo menos os lipídeos da mielina têm renovação muito lenta (59), o que se ajusta à função isolante daquela membrana.

No entanto, os fosfolipídeos da mielina parecem poder renovar-se com certa rapidez sobretudo numas partes da membrana, sem prejuízo de haver renovação muito mais lenta noutras partes (69). Entretanto, das estruturas mais ricas em fosfolipídeos, as mitocôndrias, têm-se observado tempos de semi-vida variados desde os 11 aos 73 dias (49). Estudos com mielina revelaram períodos bem mais variados para lipídeos, desde 18 dias até superiores a um ano (133).

A renovação mais rápida dos gangliosídeos parece compatível com a presença destes compostos nas sinapses, pois embora lá existam os gangliosídeos em sistemas de membranas, tais membranas têm atribuições certamente muito mais dinâmicas do que as da mielina.

Dos estudos sobre renovação dos gangliosídeos, já publicados, os que mais directamente se podem comparar com o que aqui se apresenta, é o de Burton (32) com 1-^{14}C-glucosamina e 1-^{14}C-galactose e o de Holm e Svennerholm (64) com 1-^{14}C--glucosamina. Burton encontrou 24 dias de semi-vida para o primeiro e 10 dias para o segundo composto. A diferença reside no facto de a marcação ser mais específica com a GLN-C do que com a galactose. Holm e Svennerholm registam 13 dias no seu trabalho, também com ratos. O tempo de 19 dias que se encontrou neste estudo para os gangliosídeos pode não corresponder à verdadeira situação. Realmente, os valores de F_3 no Quadro 29, para os gangliosídeos (2,019 para a NAG-T e 1,546 para a GLN-C), embora compatíveis com a regressão linear estabelecida, são bastante elevados. Na Fig. 23 assinalam-se a cheio as rectas calculadas tendo em conta as observações todas ao longo dos 114 dias. Verifica-se que os últimos resultados, sobretudo aos 114 dias, ficam inteiramente acima da regressão,

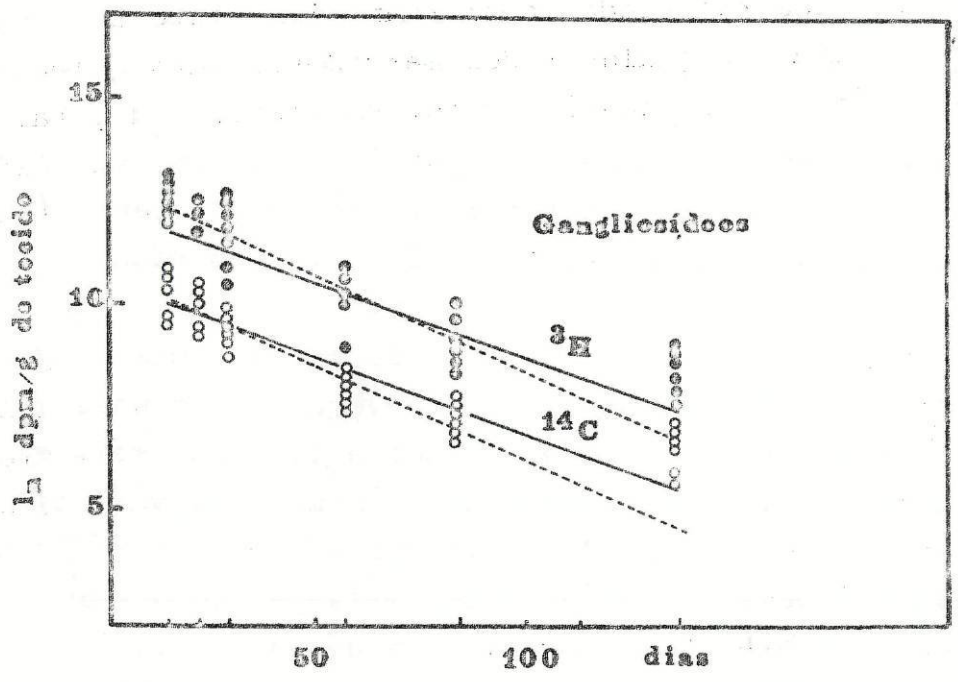


Fig. 23. Declínio da radioactividade da fracção A-1 após injecção de NAG-T (•) e de GLN-C (o) considerando todos os dias das Experiências 3 e 4 (linhas a cheio) ou apenas os primeiros 56 dias (linhas tracejadas).

Quadro 33

Experiências 3 e 4. Análise dos resultados da fracção A-1 (gangliosídeos) com o estabelecimento da regressão linear, sendo y o logaritmo natural das dpm/g de tecido, x o número de dias após a injecção e n o número de pares x,y, considerando apenas os primeiros 56 dias.

Precursores	n	Coeficientes de regressão linear		F_1 F_2 F_3	Tempos de semi-vida
		a	b		
NAG-T	25	-0,0465	12,89	52,62 49,18 0,248	15 dias
GLN-C	22	-0,0462	10,71	57,66 54,05 0,375	15 dias

sugerindo a possibilidade de duas fases no mecanismo de renovação dos gangliosídeos, uma nas primeiras semanas, mais rápida, e outra mais tarde e menos rápida. Efectuando novo cálculo estatístico, desta vez tendo em conta apenas os primeiros 56 dias de experiências, verifica-se um período de semi-vida mais curto (15 dias), mas sobretudo maior probabilidade de a regressão ser linear (linhas tracejadas na Fig. 23 e F_3 igual a 0,248 e 0,375 no Quadro 33). É possível que noutros casos possa haver também comportamento bifásico na renovação, como por exemplo na fracção que contém o NANA proteico purificado, A-11.

Redução ao tempo zero

O coeficiente de regressão a do Quadro 28 corresponde a uma extrapolação de carácter teórico para o tempo zero (para x = 0), e passando do seu valor de logaritmos naturais para as dpm/g de tecido correspondentes, encontram-se valores de radioactividade que podem comparar-se antes de afectados pelo diferente declínio de cada fracção. Podem tomar-se, sem erro excessivo, como máximos teóricos de incorporação para

Quadro 34

Experiências 3, 4 e 5. Percentagens de dpm/g de tecido no tempo zero (correspondente ao coeficiente de regressão a dos Quadros 28 e 35) das fracções da segunda coluna, tomando como 100 os valores das fracções da primeira coluna.

Fracção igual a 100	Fracções	Precursor		
		NAG-T	GLN-C	GLN-T
O-1	O-2	89	100	65
	A-3	11	13	18
O-1+P-1	O-1	42	32	29
	P-1	58	68	71
P-1	A-10	72	54	47
	A-12	0	24	36

cada fracção. Assim, por exemplo, os lipídeos totais (O-1) teriam de trítio no tempo zero 2.650.000 dpm/g de tecido (correspondente ao logaritmo natural 14,79 para a) no Quadro 28. Aquele valor considerou-se igual a 100 % dos lipídeos (primeira coluna do Quadro 34 em O-1), pelo que os LNF com 2.370.000 dpm/g de tecido no tempo zero corresponderiam aos 89 % indicados no Quadro 34.

Continuando a apreciação do Quadro 34, pode verificar-se que a distribuição dos lipídeos totais em LNF e gangliosídeos não difere grandemente da NAG-T para a GLN-C. Note-se como em ambos os casos ficam eliminados da fracção O-1 quaisquer materiais não lipídicos, seja acetato seja UDP-NAG não metabolizados. Correspondendo estes valores a tempos zero teóricos, pode parecer à primeira vista existir contradição com os factos observados na Experiência 2, em que nos primeiros tempos a fracção O-1 se mostrava contaminada com grande parte de material não lipídico. Todavia, no caso das Experiências 3 e 4, deve compreender-se que os valores teóricos correspondentes ao tempo zero se obtêm à custa dos declínios observados em alturas em que tal inquinação já não podia existir, isto é, para além de 14 dias após injecção. Assim, o valor teórico de 2.650.000 dpm/g de tecido do Quadro 28

para a fracção 0-1 estaria apropriado para lipídeos totais não inquinados com acetato ou nucleotídeo de açúcar na primeira hora da Experiência 2 (Fig. 19). Isto constitui uma indicação mais da validade do tratamento dos valores de trítio nas Experiências 3 e 4 em conjunto e do significado da extrapolação teórica para o tempo zero.

Na distribuição da radioactividade total que se observou entre lipídeos totais (0-1) e proteínas (P-1) existe diferença entre a incorporação de NAG-T e GLN-C, pois são muito mais próximos os valores percentuais de radioactividade para o trítio com 42 % e 58 % do que para o carbono-14 com 32 % e 68 %, respectivamente para os lipídeos e as proteínas.

Glicoproteínas

A análise da radioactividade nas diversas fracções proteicas também revela factos muito curiosos. Com tempos de semi-vida cerca dos 30 dias, as proteínas ocupam lugar intermédio relativamente aos LNF e gangliosídeos. Smith (133) encontrou um valor de 35 dias como tempo de semi-vida para proteínas da mielina.

A observação entre todas mais relevante e até surpreendente é a ausência de trítio da fracção em que se isolou hexosamina proteica. Em contraste, a incorporação é nítida com a GLN-C como precursor, pois se vê no Quadro 34 que a fracção A-12 com as hexosaminas contém na Experiência 4 cerca de 24 % do total das proteínas. Evidentemente que se não pode afirmar que toda a radioactividade da fracção A-12 é devida à presença de hexosaminas, pois para isso teriam de isolar-se as hexosaminas e medir-lhes a radioactividade específica. No entanto, dada a técnica da sua purificação, não parece descabido atribuir às hexosaminas ao menos parte importante da radioactividade da fracção A-12. A afirmação correspondente de que nenhuma radioactividade se mediu nas hexosaminas a partir da NAG-T é que não oferece dúvidas. O surpreendente nesta ausência é a aparente incapacidade das células nervosas para incluir trítio da NAG-T nas hexosaminas proteicas, pelo menos o do acetato libertado por desacetilação. É certo que a inclusão de acetato é mais directa nos lipídeos, especialmente no colesterol

Quadro 35

Experiências 4 e 5. Valores de concentração de hexosamina e NANA proteicos. Para a fracção A-10 notou-se ligeiro incremento da concentração de NANA com o tempo, sendo a regressão linear significativa. Nas outras determinações não se observou variação significativa com o tempo, pelo que se calcularam as médias.

Compostos	Fracções	Micromoles por grama de tecido	Coeficientes de regressão	
			a	b
Hexosaminas	A-10	2,12 *	2,12	0,00327
	A-11	1,68 ± 0,10 *		
NANA	A-12	1,83 ± 0,30		

*limites de confiança para P>95 %

e ácidos gordos, e muito mais intensa, mas seria razoável esperar a inclusão de trítio também nas hexosaminas, tal como parece acontecer em materiais glucogénicos (serina, açúcares, glicerol, etc.) dos lipídeos e no NANA das próprias glicoproteínas. A única alternativa para explicar a falta de trítio na fracção A-12 é talvez o de fraca incorporação seguida de declínio tão acelerado que aos 14 dias, altura da primeira observação, se tornou impossível a detecção de trítio nas amostras.

Muito diferente é o que se observa com a fracção A-10 que contém o NANA das proteínas e nada menos de 72 % do trítio proteico, contrastando com apenas metade do carbono-14 (Quadro 34). Também aqui não é lícito assumir que toda a radioactividade da fracção A-10 ou A-11 se deve ao NANA. Também é de realçar que os declínios da fracção A-10 são indistinguíveis dos das proteínas, enquanto o declínio da fracção A-12 das hexosaminas, com 23 dias de semi-vida, é mais rápido que o das proteínas e mais lento que o dos gangliosídeos diferindo de ambos significativamente (Quadro 32). Vê-se, por outro lado, que o tempo de semi-vida das hexosaminas e em menor grau o do NANA proteico está mais próximo do valor encontrado para os gangliosídeos do que para os LNF. Esta observação encaixa nas funções que se atribuem aos gangliosídeos e glicoproteínas,

embora hipoteticamente, a saber, as relações intercelulares da transmissão sináptica nos impulsos nervosos.

No Quadro 35 apresentam-se os valores d s determinações químicas do NANA nas fracções A-10 e A-11 e de hexosaminas na fracção A-12. Verifica-se que no processo de purificação da passagem de A-10 para A-11 existem perdas de radioactividade, pois a última fracção contém apenas 59 % trítio e 63 % do carbono-14 da fracção A-10. No processo houve também uma perda de NANA: a fracção A-11 contém 80 % do NANA da fracção A-11. Mas aqui, o mais curioso, e aliás de interpretação difícil, é a perda da variação linear que existia para a concentração de NANA em função do tempo na fracção A-10 e que não se verifica na fracção A-11. A concentração de hexosamina não evidencia variação definida com o tempo e o seu valor médio é igual a 1,83 μmoles/g de tecido.

Estudo com 6-^{3}H-glucosamina

Na Experiência 5 empregou-se para ensaios de declínio radioactivo a GLN-T, para comparar os seus efeitos com os da NAG-T e GLN-C. Os resultados foram tratados como para as Experiências 3 e 4 e encontram-se nos Quadros 36 e 37. Contrariamente ao que sucedeu com as Experiências 3 e 4, nesta a radioactividade declinou segundo curvas exponenciais apenas com os gangliosídeos, proteínas e fracção A-12 que contém hexosaminas proteicas. E mesmo nestas, as razões F estiveram muito mais perto dos valores limite para haver linearidade nas condições já expostas. Com as restantes fracções não houve correlação significativa.

Embora de confiança limitada, calcularam-se os tempos de semi-vida para estas fracções da Experiência 5. Por tempos de semi-vida "aparentes" significam-se os que se obtiveram apesar de não existir declínio exponencial estatisticamente significativo. E isto porque os valores assim achados, se não servem para a partir deles se tirarem conclusões de vulto, mostram ao menos, e com segurança suficiente, que o declínio de trítio de GLN-T nos LNF é muito maior do que com NAG-T ou GLN-C. O mes-

Quadro 36

Experiência 5. Análise dos resultados com o estabelecimento da regressão linear, sendo y o logaritmo natural das dpm/g de tecido, x o número de dias após injecção e n o número de pares x,y.

Fracções	Parâmetros da regressão linear				Tempos de semi-vida
	n	Coeficientes			
		b	a		
			Valor	dpm/g de tecido	
O-1	17	-0,0100	14,38	1.760.000	69*
O-2	17	-0,00593	14,04	1.150.000	117*
A-2	16	-0,02934	12,64	310.000	24
P-1	17	-0,0181	15,26	4.250.000	38
A-10	17	-0,00954	14,50	1.990.000	73*
A-11	17	-0,0103	13,83	1.010.000	67*
A-12	17	-0,02164	14,24	1.525.000	32

*Tempos aparentes

Quadro 37

Experiência 5. Análise estatística da regressão linear do Quadro 25. Os valores de F são altamente significativos (A), significativos (S) ou não significativos (N).

	Razões de variância e significância							
	O-1		O-2		A-2			
F_1	1,310	N	0,508	N	7,740	S		
F_2	1,541	N	0,498	N	10,83	A		
F_3	1,661	N	0,928	N	2,397	N		
	P-1		A-10		A-11		A-12	
F_1	3,200	N	0,82	N	0,72	N	4,368	N
F_2	5,025	S	1,002	N	0,958	N	5,460	S
F_3	3,130	N	1,805	N	2,224	N	1,938	N

mo se pode afirmar para as fracções A-10 e A-11 àcerca das quais parece também seguro afirmar terem tempos de semi-vida maiores do que as proteínas de onde provieram.

Quanto às fracções A-2, P-1 e A-12, verificou-se que os seus tempos de semi-vida não diferem significativamente dos valores correspondentes das Experiências 3 e 4, tanto para a NAG-T como para a GLN-C.

Finalmente, pode observar-se no Quadro 34 que para a GLN-T, e em relação aos dois outros precursores radioactivos, houve maior incorporação para as proteínas, gangliosídeos e hexosaminas proteicas.

B I B L I O G R A F I A

1. Ada,G.L., French,E.L. e Lind,P.E., J. Gen. Microbiol., 24, 409, 1961.
2. Albrecht,G.J., Bass,S.T., Seifert,L.L. e Hansen, J. Biol. Chem., 241, 2968, 1966.
3. Amerongen,A.N., Eijnden,D.H., Heijlman,J. e Roukema,P.A. J. Neurochem., 19, 2195, 1972.
4. Arce,A., Maccioni,H.F. e Caputto,R., Arch. Biochem. Biophys., 116, 52, 1966.
5. Arce,A., Maccioni,H.J. e Caputto,R., Biochem. J., 121, 483, 1971.
6. Armitage,P., "Statistical Methods in Medical Research", Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford e Edimburgo, cap.5 e 9, 1971.
7. Autilio,L.A., Appel,A.H., Pettis,P. e Gambetti,P.L., Biochemistry, 7, 2615, 1968.
8. Avrova,N.F., Chenykaeva,E.Y. e Obukhova, J. Neurochem., 20, 997, 1973.
9. Barondes,S.H., J. Neurochem., 15, 343, 1968.
10. Bartholomew,B., Jourdian,G.W. e Roseman,S., Abstr. 6th Intern. Congr. Biochem., 6, 503, 1964. N.Y.
11. Basu,S., Kaufman,B. e Roseman,S., J. Biol. Chem., 240, PC4115, 1965.
12. Basu,S., Kaufman,B. e Roseman,S., J. Biol. Chem., 243, 5802 1968.
13. Bloomfield,D.K., e Bloch,K., Biochim. Biophys. Acta, 30, 220, 1958.
14. Boas, N.F., J. Biol. Chem., 204, 553, 1953.
15. Bodian,D., Bull. J. Hopkins Hosp., 119, 129, 1966.
16. Bogoch,S., Nature, 190, 153, 1961.
17. Bogoch,S. e Korsh,G., Nature, 212, 509, 1966.
18. Bosmann,H.B., J. Neurochem., 19, 763, 1972.
19. Bosmann,H.B., J. Neurochem., 20, 1037, 1973.
20. Brady,R.O., Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash), 44, 993, 1958.
21. Brady,R.O., J.Biol. Chem., 235, 3099, 1960.
22. Brady,R.O., Borek,C. e Bradley,R.M., J. Biol. Chem., 244, 6552, 1969.

23. Brady,R.O., Formica,J.F. e Koval,G.J., J. Biol. Chem., 233, 1072, 1958.
24. Brady,R.O. e Koval,G.J., J. Am. Chem. Soc., 79, 2648, 1957.
25. Brady,R.O., Mamoon,A.M. e Stadtman,E.R., J. Biol. Chem., 222, 795, 1956.
26. Brady,R.O., O'Brien,J.S., Bradley,R.M. e Gal,A.E., Biochim. Biophys. Acta, 210, 193, 1970.
27. Bremer,J. e Greenberg,D.M., Biochim. Biophys. Acta, 46, 205 1961.
28. Brown,D.M., Biochim. Biophys. Acta, 16, 429, 1955.
29. Burr,G.O. e Burr,M.M., J. Biol. Chem., 82, 345, 1929.
30. Burton,R.M., J. Neurochem., 10, 503, 1963.
31. Burton,R.M., "Biochemistry of Sphingosine Containing Lipids" em "Lipids and Lipidoses" (Ed. Schettler,G.), Springer-Verlag, N.Y., 122, 1967.
32. Burton,R.M., Lipids, 5, 475, 1969.
33. Burton,R.M., Garcia-Bunuel,L., Golden,M. e Balfour,Y.M., Biochemistry, 2, 580, 1963.
34. Burton,R.M. e Howard,R.E., Annals New York Academy of Sciences, 144, 411, 1967.
35. Burton,R.M., Sodd,M.A. e Brady,R.O., J. Biol. Chem., 233, 1053, 1958.
36. Caputto,R., Leloir,L.F., Cardini,C.E. e Paladini,A.C., J. Biol. Chem.,184, 333, 1950.
37. Caputto,R., Leloir,L.F., Trucco,R.E., Cardini,C.E. e Paladini,A.C., J.Biol. Chem., 179, 497, 1949.
38. Cardini,C.E. e Leloir,L.F., J. Biol. Chem., 225, 317, 1957.
39. Cardini,C.A., Paladini,A.C., Caputto,R. e Leloir,L.F., Nature, 165, 191, 1950.
40. Carlson,D.M., Methods in Enzymology, 8, 179, 1966.
41. Carlson,D.M., McGuire,E.J., Jourdian,G.W. e Roseman,S., Fed. Proc., 23, 380, 1964.
42. Caro,L.G. e Palade,G.E., J. Cell Biol., 20, 473, 1964.
43. Cleland,W.W. e Kennedy,E.P., J. Biol. Chem., 235, 45, 1960.
44. Constantino-Ceccarini,E. e Morell,P., Lipids, 7, 656, 1972.
45. Cori, G.T., Colowick,S.P. e Cori,C.F., J. Biol. Chem., 123, 375, 1938.
46. Crane,R.K. e Sols,A., J. Biol. Chem., 203, 273, 1953.

47. Cumar,F.A., Fishman,P.H. e Brady,R.O., J. Biol. Chem., 246, 5075, 1971.
48. Cumar,F.A., Tallman,J.F. e Brady,R.O., J. Biol. Chem., 247, 2322, 1972.
49. Cuzner,M.L., Davison,A.N. e Gregson,N.A., Biochem. J., 101, 618, 1966.
50. Den,H., Kaufman,B. e Roseman,S., J. Biol. Chem., 245, 6607, 1970.
51. Di Benedetta,C., Brunngraber,E.G., Whitney,G., Brown,B.D. e Aro,A., Archs. Biochem. Biophys., 131, 404, 1969.
52. Farmacopeia Portuguesa, suplemento à 4ª. Edição, Elementos de Estatística, Secção E., 1961.
53. Fisher,R.A. e Yates,F., "Statistical Tables" Ed. Oliver and Boyd, Londres, 1965.
54. Folch,J., Lees,M. e Stanley,G.H.S., J. Biol. Chem., 226, 497, 1957.
55. Gatt,S., Biochim. Biophys. Acta, 137, 192, 1967.
56. Goldman,P., J. Biol. Chem., 239, 3663, 1964.
57. Goldman,P., Alberts,A.W. e Vagelos,P.R., J. Biol. Chem., 238 3579, 1963.
58. Graham,E.R.B., Gottschalk,A., Biochim. Biophys. Acta, 38, 513, 1960.
59. Hajra,A.K. e Radin,N.S., J. Lipid Research, 4, 270, 1963.
60. Hamberger,A. e Svennerholm,L., J. Neurochem., 18, 1821, 1971.
61. Handa,S. e Burton,R.M., Lipids, 4, 589, 1969.
62. Harzer,K. Jatzkewitz,H. e Sandhoff,K., J. Neurochem., 16, 1279, 1969.
63. Heijlman,J. e Roukema,P.A., J. Neurochem., 19, 2567, 1972.
64. Holm,M. e Svennerholm,L., J. Neurochem., 19, 609, 1972.
65. Howard,R.E. e Burton,R.M., Biochim. Biophys. Acta, 84, 435, 1964.
66. Howard,R.E. e Burton,R.M., Biochemical Pharmacology, 13, 1677, 1964.
67. International Union of Biochemistry,Enzyme Nomenclature, Elsevier Co. New York 1965.
68. James,F. e Fotherby,K., J. Neurochem., 10, 587, 1963.
69. Jungalwala,F.B. e Dawson,R.M.C., Biochem. J., 123, 683, 1971.

70. Kanazawa,I., Veta,N. e Yamakawa,T., J. Neurochem., 19, 1483, 1972.
71. Kanfer,J., Blacklow,R.S.,Warren,L. e Brady,R.O., Biochem. Biophys. Res. Commun., 14, 287, 1964.
72. Kanfer,J.N. e Ellis,D.A., Lipids, 6, 959, 1971.
73. Kanfer,J. e Kennedy,E.P., J. Biol. Chem., 239, 1720, 1964.
74. Katzman,R.L., Biochim. Biophys. Acta, 266, 269, 1972.
75. Katzman,R.L., J. Biol. Chem., 247, 3744, 1972.
76. Kaufman,B., Basu,S. e Roseman,S., Proc. 3rd int. Symp. Cerebral Sphingolipidosis, (Ed. Aronson,S.M. & Volk.,B.N.) New York Press Inc., 193, 1966.
77. Kaufman,B., Basu,S. e Roseman,S., J.Biol. Chem., 243, 5804, 1968.
78. Kishimoto,Y., Agranoff,B.W., Radin,N.S. e Burton,R.M., J. Neurochem., 16, 397, 1969.
79. Kishimoto,Y. e Radin,N.S., Lipids, 1, 47, 1966.
80. Klenk,E., Z. Physiol. Chem., 262, 128, 1939.
81. Kobayashi,Y., Anal. Chemistry, 38, 1240, 1966.
82. Kolodny,E.H., Brady,R.O., Quirk,J.M. e Kanfer,J.N., Fed. Proc., 28, 596, 1969.
83. Kolodny,E.H., Brady,R.O., Quirk,J.M. e Kanfer,J.N., J. Lip. Res., 11, 144, 1970.
84. Kornfeld,S., Kornfeld,R., Neufeld,E.F. e O'Brien,P.J., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 52, 371, 1964.
85. Leibovitz,Z. e Gatt,S., Biochim. Biophys. Acta, 152, 136, 1968.
86. Leloir, L.F., Arch. Biochem. Biophys., 33, 186, 1951.
87. Leloir, L.F., Arch. Biochem. Biophys., 74, 84, 1958.
88. Leloir, L.F. e Cardini,C.E., Biochim. Biophys. Acta, 12, 15, 1953.
89. Lis,H., Sharon,N., Katchalski,E., J. Biol. Chem., 241, 684, 1966.
90. Little,H.N. e Bloch,K., J. Biol. Chem., 183, 33, 1950.
91. Lohmann,K., Biochem. Z., 262, 137, 1933.
92. Lowden,J.A. e Wolfe,L.S., Can. J. Biochem., 42, 1587, 1964.
93. Luse,S.A., J. Biophys. Biochem. Cytol., 2, 777, 1956.
94. Lynen,F., J. Cell Comp. Physiol., 54, 33, 1959.
95. Maccioni,H.J., Arce,A. e Caputto,R., Biochem. J., 125, 1131, 1971.

96. Majerus,P.W., Alberts,A.W. e Vargelos,P.R., Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 1231, 1964.
97. Majerus,P.W., Alberts,A.W. e Vagelos,P.R., J. Biol. Chem., 240, 618, 1965.
98. Makita,A., J. Biochem. (Tóquio), 55, 269, 1964.
99. Makita,A. e Yamakawa,T., J. Biochem. (Tóquio), 51, 124, 1962.
100. Margolis,R.K. e Margolis,R.U., Biochemistry, 9, 4389, 1970.
101. Margolis,R.K. e Margolis,R.U., J. Neurochem., 20, 1285, 1973.
102. McGarrahan,J.F. e Maley,F., J. Biol. Chem., 237, 2458, 1962.
103. Mead,J.F., J. Biol. Chem., 227, 1025, 1957.
104. Merat,A. e Dickerson,J.W.T., J. Neurochem., 20, 873, 1973.
105. Molnar,J., Robinson,G.B. e Winzler,R.J., J. Biol. Chem., 239, 3157, 1964.
106. Molnar,J., Robinson,G.B. e Winzler,R.J., J. Biol. Chem., 240, 1882, 1965.
107. Morell,P., Ceccarini,E.C. e Radin,N.S., Arch. Biochem. Biophys., 141, 738, 1970.
108. Moser,H.W. e Karnovsky,M.L., J. Biol. Chem., 234, 1990, 1959.
109. Nadler,N.J., Young,B.A., Leblond,C.P. e Mitmaker,B., Endocrinology, 74, 333, 1964.
110. Nishimura,K. e Yamakawa,T., Lipids, 3, 262, 1968.
111. Norton,W.T. e Autilio,L.A., J. Neurochem., 13, 213, 1966.
112. Ohman,R., Rosenberg,A. e Svennerholm,L., Biochemistry, 9, 3774, 1970.
113. Popenoe,E.A. e Drew,R.M., J. Biol. Chem., 228, 673, 1957.
114. Popják,G. e Muir,H., Biochem. J., 46, 103, 1957.
115. Pritchard,E.T. e Cantin,P.L., Nature, 193, 580, 1962.
116. Quarles,R.H., Everly,J.L. e Brady,R.O., Biochem. Biophys, Res. Commun., 47, 491, 1972.
117. Radin,N.S., Methods Enzymol., 14, 268, 1969.
118. Rittenberg.D. e Bloch,K., J. Biol. Chem., 154, 311, 1944.
119. Rittenberg.D. e Bloch,K., J. Biol. Chem., 160, 417, 1945.

120. Robinson,G.B., Molnar,J. e Winzler,R.J., J. Biol. Chem., 239, 1134, 1964.
121. Roseman,S., Federation. Proc., 21, 1075, 1962.
122. Roseman,S., Proc. Natl. Acad. Sci., 48, 437, 1962.
123. Roseman,S., Chem. Phys. Lipids, 5, 270, 1970.
124. Rosenberg,A. e Stern,N., Fed. Proc., 24, 360, 1965.
125. Rouser,G.,Kritchevsky,G., Siakotos,A.M. e Yamamoto,A., "Neuropathology: Methods and Diagnosis" (C.G.Tedeschi, ed.), Little,Brown and Co. Inc., São Luís, 691, 1970.
126. Rouser,G., Kritchevsky e Yamamoto,A., "Lipid Chromatographic Analysis" (G.V. Marinetti,editor) Marcel Dekker Inc. New York) 1, 99, 1967.
127. Rouser,G., Kritchevsky,G., Yamamoto,A., Simon,G., Galli, C. e Bauman,A.J., "Methods in Enzymology", Academic Press (J.M.Lowenstein,editor), 14, 272, 1969.
128. Sandhoff,K. e Jatzkewitz,H., Biochim. Biophys. Acta, 141, 442, 1967.
129. Schettler,G. e Kahlke,W., "Gangliosidoses" em "Lipids and Lipidoses" (ed. Schettler,G.) Springer-Verlag, N.Y., 213, 1967.
130. Schramm,G. e Mohr,E., Nature, 183, 1677, 1959.
131. Schwartz,H.P., Dreisbach,L., Barrionuevo,M., Kleschick, A. e Kostyk,I., J. Lipid Res., 2, 208, 1961.
132. Slein,M.W., Methodsin Enzymology, 1, 299, 1955.
133. Smith,M.E., Biochim. Biophys. Acta, 164, 285, 1968.
134. Sols,A. e Crane,R.K., J. Biol. Chem., 210, 581, 1954.
135. Soto,E.F., Bohner,L.S. e Calvino M. D. J. Neurochem. 13, 989, 1966.
136. Spence,M.W. e Wolfe, L.S., Can. J. Biochem. Physiol., 45, 671, 1967.
137. Spencer,A.F. e Lowenstein,J.M., J. Biol. Chem., 237, 3640, 1962.
138. Spiro,R.G., J. Biol. Chem., 237, 646, 1962.
139. Spiro,R.G., J. Biol. Chem., 239, 567, 1964.
140. Spiro,R.G., J. Biol. Chem., 242, 4813, 1967.
141. Spiro,R.G., Ann. Rev. Biochem., 39, 599, 1970.
142. Spiro,R.G., Spiro,M.J., J. Biol. Chem., 241, 1271, 1966.
143. Sribney,M. e Kennedy,E.P., J. Biol. Chem., 233, 1315, 1958.

144. Stoffel,W., Biochem. Biophys. Res. Commun., 6, 270, 1961.
145. Strauss,B.S., Arch. Biochem. Biophys., 55, 77, 1955.
146. Suzuki,K., J. Neurochem., 14, 917, 1967.
147. Suzuki,K., J. Neurochem., 17, 209, 1970.
148. Suzuki,K., J. Neurochem., 12, 969, 1965.
149. Suzuki,K. e Korey,S.R., J. Neurochem., 11, 647, 1964.
150. Suzuki,K.,Poduslo,P.F. e Poduslo,S.E., Biochim. Biophys. Acta, 152, 445, 1968.
151. Suzuki,K., Poduslo,S.E. e Norton,W.I., Biochim. Biophys. Acta, 144, 366, 1967.
152. Svennerholm,E. e Svennerholm,L., Biochim. Biophys. Acta, 70, 432, 1963.
153. Svennerholm,E. e Svennerholm,L., Nature, 198, 688, 1963.
154. Svennerholm,L., J. Lipid Res., 5, 145, 1964.
155. Svennerholm,L., J. Neurochem., 11, 839, 1964.
156. Svennerholm,L., Mansson,J.E. e Li,Y.I., J. Biol. Chem., 248, 740, 1973.
157. Tavormina,P.A., Gibbs,M.H. e Huff,J.W., J. Amer. Chem. Soc., 78, 4498, 1956.
158. Tettamanti,G. e Zambotti,V., Enzymologia, 35, 61, 1968.
159. Trotter,J.L. e Burton,R.M., J. Neurochem., 16, 805, 1969.
160. Vagelos,P.R., Alberts,A.W. e Martin,D.B., J. Biol. Chem., 238, 533, 1963.
161. Wakil,S.J., Biochim. Biophys. Acta, 19, 497, 1956.
162. Warecka,K., Moller,H.J., Vogel,H.M. e Tripatzis,I., J. Neurochem., 19, 719, 1972.
163. Warren,L., J. Biol. Chem., 234, 1971, 1959.
164. Warren,L. e Felsenfeld,H,Biochem. Biophys. Res. Commun, 4, 232, 1961.
165. Warshawsky,H., Leblond,C.P. e Droz,B., J. Cell Biol., 16, 1, 1963.
166. Wells,M.A. e Dittmer,J.C., Biochemistry, 5, 3405, 1966.
167. White,R.J., Biochem. J., 106, 847, 1968.
168. White,A., Handler,P. e Smith,E.L., "Principles of Biochemistry", 4ª ed., McGraw-Hill Book Company, Nova Iorque, 277, 1968.
169. Wiegandt,H., J. Neurochem., 14, 671, 1967.
170. Wittaker,V.P., Biochem. J., 96, 914, 1965.

171. Yip,M.C.M. e Dain,J.A., Lipids, 4, 270, 1969.
172. Yip,G.B. e Dain,J.A., Biochim. Biophys. Acta, 206, 252, 1970.
173. Zabin,I. e Mead,J.F., J. Biol. Chem., 205, 271, 1953.
174. Zabin,I. e Mead,J.F., J. Biol. Chem., 211, 87, 1954.
175. Zilversmit,D.B., Entenman,C. e Chaikoff,I.L., J. Biol. Chem., 176, 193, 1948.