Pasta 126-
3654

UNIVERSIDADE DO PORTO
Faculdade de Farmácia

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA 5'-NUCLEOTÍDASE CITOSÓLICA (IMP/GMP ESPECÍFICA) DE CÉREBRO DE RATO. PAPEL NO METABOLISMO DOS NUCLEÓTIDOS PURÍNICOS E EFEITO DOS DINUCLEÓSIDOS POLIFOSFATOS.

Agostinho Franklim Pinto Marques

Assistente da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Porto, 1997

UNIVERSIDADE DO PORTO
Faculdade de Farmácia

Purificação e caracterização da 5'-nucleotídase citosólica (IMP/GMP específica) de cérebro de rato. Papel no metabolismo dos nucleótidos purínicos e efeito dos dinucleósidos polifosfatos.

FACULDADE DE FARMACIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 97/07/29
Reg. 7/3654
Cota
2006/11/06
Pasta 126
3654

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor apresentada por

Agostinho Franklim Pinto Marques

Assistente da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Porto, 1997

Natércia Aurora Almeida Teixeira, Professora Associada da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Maria Antonia Günther Nonell, Investigadora do Instituto de Investigaciones Biomédicas, do Conselho Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Certificam:

Que o trabalho realizado nesta tese, foi realizado sob nossa orientação pelo Licenciado Agostinho Franklim Pinto Marques, no Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade Autónoma de Madrid, Instituto de Investigaciones Biomédicas do CSIC, Madrid e no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Em nossa opinião, e salvo melhor critério do júri que o há-de julgar, este trabalho reúne as condições científicas exigidas para poder candidatar-se ao grau de Doutor.

Porto, 9 de Maio de 1997

(Prof. Doutora Natércia A.A. Teixeira)

(Doutora M. Antónia Günther Nonell)

À Né
À Kikas
Ao Zémi

Aos meus pais
A minhas irmãs

Agradecimentos

No final de mais uma etapa da minha vida profissional, que significa, necessariamente, o começo de uma outra, não posso deixar de me referir e de prestar a minha sincera homenagem ao Prof. Doutor Francisco Carvalho Guerra, por ter confiado em mim no início da minha carreira e me ter acolhido como mais um membro da sua equipa. A ele lhe devo a minha formação e o meu gosto pela Bioquímica.

À Prof. Doutora Natércia Teixeira, orientadora deste trabalho, quero registar o meu caloroso agradecimento pela amizade, pela ajuda e pela confiança que sempre teve para comigo. O seu apoio e interesse contribuiram decisivamente para a realização deste trabalho.

À Doutora Maria Antónia Günther Sillero quero agradecer o ter aceite ser a co-orientadora deste trabalho. Os dons naturais para a prática da investigação e a permanente disposição para colaborar no trabalho laboratorial, fazem da Doutora Gunther Sillero, um exemplo e uma meta a atingir.

Não posso deixar, igualmente, de prestar o meu reconhecimento ao Prof. Doutor António Sillero. O seu saber científico, a sua ajuda diária e sua postura humana, contribuiram enormemente para o bom andamento deste trabalho.

A ambos, porque de um só se trata, tal a forma em como se completam e complementam, quero registar a imensa dívida de gratidão pela amizade que me dispensam, pela oportunidade que me deram de fazer parte do seu grupo de trabalho e por me terem mostrado uma nova prespectiva de vida profissional. Por eles nutro um carinho muito especial. Bem hajam.

Quero agradecer ao Prof. Doutor Sena Esteves a amizade com que sempre me distinguiu ao longo destes anos. As suas palavras de alento e de encorajamento foram, e são, para mim uma dádiva.

Quero prestar meu apreço ao Doutor João Meireles Ribeiro pela ajuda e agradável companhia que me proporcionou durante a sua curta estadia no Laboratório. Creio ter encontrado nele um novo e bom amigo.

A todo o pessoal do laboratório B-23, da Faculdade de Medicina da Universidade Autónoma de Madrid, quero expressar o meu agradecimento pela forma como me acolheram e pelos momentos de alegre e saudável convivência que me proporcionaram durante o tempo que aí passei. De entre todos, quero realçar a Anabel que, com a sua inestimável colaboração, a sua alegria e sua amizade, contribuiu para que este trabalho chegasse a bom termo. Mas, não posso nem devo, contudo, deixar de agradecer a tantos outros, Rui Fontes, Cláudio Gambaretto, Uschi,

Alexey, Honório, Olga, Raquel, Joaquin, ..., que durante a minha permanência em Madrid me dispensaram o seu apoio, a sua amizade e grata companhia e a quem chamo amigos. Por muito tempo recordarei os bons momentos que com eles passei.

Não posso deixar de recordar com saudade, o Dr. Joaquim Gomes Carneiro, que me fez, provavelmente sem se dar conta, ter a noção da importância relativa das coisas. Para ele, que foi o meu primeiro colega das aulas práticas de Bioquímica, a minha lembrança sentida.

Quero manifestar o meu apreço a todos os meus colegas do laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia do Porto. A todos eles e a cada um em particular quero expressar o meu reconhecimento pela ajuda, solidariedade e convivência durante todos estes anos.

Aos amigos Rui Lapa e Delfim Santos o meu muito obrigado pelos constantes incentivos e apoio durante todo este tempo. Quero recordar ainda com apreço as "longas conversas" que se estabeleceram entre o Porto e Madrid "by Talk", que atenuavam muitas vezes o silêncio do laboratório, durante a noite.

Ao Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade Autonoma de Madrid, nas pessoas dos seus Directores, Prof. Doutores Juan J. Aragón e José. G. Castaño, pelas facilidades concedidas para a realização deste trabalho.

A todos aqueles que, de algum modo, com o seu apoio, a sua bondade e o seu entusiasmo contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

À Fundação Calouste Gulbenkian agradeço os apoios concedidos, sob a forma de Bolsas de Estudo, os quais tornaram mais facilitada a minha permanência em Madrid.

Finalmente, agradeço àqueles que prenchem a minha vida, que são a razão de estar aqui e a quem, pela ausência, roubei alguns dos melhores momentos de suas vidas: Né, Kikas, Zémi. Não posso ainda deixar de prestar a minha homenagem a meus pais e família, o tudo quanto por mim fizeram (e muito foi) para que chegasse até aqui.

Índice geral

pág.

Índice de Figuras viii

Índice de Tabelas xv

Abreviaturas xviii

Resumo xxii

1. Introdução 1
1.1. Metabolismo dos nucleótidos purínicos 2
1.1.a. Conteúdo intracelular 2
1.1.b. Interconversão de nucleótidos purínicos 2
1.1.c. Transfosforilação de nucleótidos 5
1.1.d. Recuperação de bases purínicas 5
1.1.e. Mecanismos de regulação no metabolismo dos nucleótidos purínicos 7
1.2. Actividades 5´-nucleotidásicas 9
1.2.a. Ecto 5'-nucleotídase 10
1.2.b. 5'-Nucleotídases solúveis 13
1.2.b.1. 5'-Nucleotídases de baixa afinidade (alto-K_m) 13
1.2.b.2. 5'-Nucleotídases de alta afinidade 16
1.2.b.3. Origem das nucleotídases solúveis 17
1.2.c. Funções da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica 20
1.2.c.1. Actividade fosfotransferásica 20
1.2.c.2. Papel da 5'-nucleotídase na resistência a drogras 25
1.2.c.3. Papel dos efectores sobre ambos os processos 26
1.2.c.4. Outras enzimas capazes de fosforilar nucleósidos e/ou seus análogos 27
1.3. Estrutura e distribuição e síntese dos dinucleósidos polifosfatos 28
1.3.a. Síntese dos dinucleósidos polifosfatos 28
1.3.a.1. Aminoacil-tRNA sintétases 28
1.3.a.2. Luciférase 30
1.3.a.3. Acetil-CoA sintétase 30
1.3.a.4. Dinucleósido tetrafosfato fosforílase 31
1.3.a.5. Guanililtransférase 31

pág.

1.3.b. Degradação dos dinucleósidos polifosfatos 32
1.3.b.1. Dinucleósido tetrafosfátase assimétrica 32
1.3.b.2. Dinucleósido tetrafosfátase simétrica 32
1.3.b.3. Dinucleósido tetrafosfato fosforílase 33
1.3.b.4. Fosfodiestérases 33
1.3.c. Função de Ap_4A e de outros dinucleósidos polifosfatos 34
1.3.c.1. Influência nos processos de interconversão dos nucleótidos purínicos 34
1.3.c.2. Como análogos do estado de transição de algumas cínases 35
1.3.c.3. Influência sobre a proliferação celular 36
1.3.c.4. Interacção com receptores celulares 37
1.3.c.5. Efeito sobre a função das plaquetas 38
1.3.c.6. Efeito sobre as celulas cromafínicas 39
1.3.c.7. Efeito sobre o sistema vascular 39
1.3.d. Genes codificadores de enzimas intervenientes no metabolismo dos dinucleósidos polifosfatos 40
1.3.d.1. Dinucleósido tetrafosfátase 40
1.3.d.2. Dinucleósido tetrafosfato fosforílase 41
1.3.d.3. Relação entre o metabolismo de dinucleósidos polifosfatos e um possível gene supressor de tumores. 41

2. Objectivos 42

3. Material e Métodos 44
3.1 Material 45
3.1.a. Material biológico 45
3.1.b. Aparelhos 45
3.1.c. Produtos 47
3.1.d. Soluções tampão 48
3.2 . Métodos 48
3.2.a Preparação de homogeneizados tecidulares e obtenção da fracção citosólica 48
3.2.b. Fraccionamento com sulfato amónio 50
3.2.c. Determinação das actividades enzimáticas da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica 50

pág.

3.2.c.1. Actividade 5'-nucleotídasica 50
3.2.c.1.*a*. Quantificação do fósforo inorgânico (P_i) 50
3.2.c.1.*b*. Quantificação dos nucleósidos formados (HPLC, TLC) 51
3.2.c.2. Actividade fosfotransferásica 52
3.2.d. Outras determinações enzimáticas 52
3.2.d.1. Fosfátase alcalina 52
3.2.d.2. Fosfátase ácida 53
3.2.d.3. Catálase 53
3.2.d.4. Adenosina desamínase 53
3.2.d.5. Piruvato cínase 53
3.2.d.6. Lactato desidrogénase 54
3.2.e. Separação de nucleótidos 54
3.2.e.1. Por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) 54
3.2.e.2. Por cromatografia em camada delgada (TLC) 55
3.2.f. Síntese específica e purificação de heterodinucleósidos polifosfatos 56
3.2.g. Separação cromatográfica de polifosfatos, recuperação e quantificação 57
3.2.h. Centrifugação em gradiente de sacarose 59
3.2.i. Métodos de concentração das amostras 60
3.2.i.1. Concentradores de membrana 60
3.2.i.2. Sacarose 61
3.2.i.3. Precipitação com ácido tricloroacético 61
3.2.j. Troca de tampão por cromatografia em coluna de Sephadex G-25 61
3.2.k. Electroforese em gel de poliacrilamida 62
3.2.l. Determinação de proteínas 63
3.2.m. Determinação da concentrações de soluções de nucleótidos 63
3.2.n. Preparação de Cibacron Blue F3G-A Sepharose 4B 63

4. Resultados e Discussão 65
4.1. Purificação e propriedades da 5'-nucleotídase citosólica IMP/GMP específica 66

pág.

4.1.a. Estudos preliminares 66
4.1.a.1. Actividades nucleotidásicas no cérebro de rato. Evidência da existência da enzima 5'-nucleotídase activada por Ap_4A no cérebro de rato. 66
4.1.a.2. Fraccionamento com sulfato de amónio 67
4.1.a.3. Cromatografia em coluna de fosfocelulose 69
4.1.a.4. Cromatografia de afinidade em coluna de Cibacron Blue F3G-A Sepharosa 4B. 77
4.1.a.5. Cromatografía de afinidade em coluna de Dyematrex Green A 77
4.1.b. Purificação da 5´-nucleotídase IMP/GMP específica do tecido cerebral do rato 85
4.1.b.1. Preparação do homogeneizado (etapa 1) 85
4.1.b.2. Fraccionamento proteico por "salting-out" (etapa 2) 85
4.1.b.3 Cromatografía em coluna de Fosfocelulose (etapa 3) 87
4.1.b.4. Cromatografía em coluna de Dyematrex Green A (etapa 4) 87
4.1.b.5. Cromatografia em coluna de Phenyl superose (etapa 5) 89
4.1.b.6. Estudo electroforético da enzima 89
4.1.c. Determinação da massa molecular da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica 94
4.1.c.1. Por filtação em gel 94
4.1.c.2. Por centrifugação em gradiente de sacarose 95
4.1.c.3. Comentários finais. 95
4.1.d. Propriedades da 5'-nucleotídase 99
4.1.d.1. Linearidade da reacção enzimática 99
4.1.d.2. Influência dos valores de pH na velocidade da reacção 99
4.1.d.3. Influência da temperatura na velocidade de reacção 103
4.1.d.4. Efeito de distintas soluções tampão na actividade nucleotidásica 103
4.1.d.5. Estabilidade da 5'-nucleotídase 105

pág.

4.1.d.6. Especificidade de substrato 107
4.1.d.7. Efeito da concentração de substrato na velocidade de reacção enzimática. Determinação dos valores de K_m e V_{max} 107
4.1.d.8. Efectores da 5´-nucleotídase 109
4.1.d.8.*a*. Efeito dos catiões monovalentes 109
4.1.d.8.*b*. Efeito dos catiões divalentes 113
4.1.d.8.*c*. Efeito de nucleótidos, Ap_4A e 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG). 118
4.1.d.8.*d*. Estudo comparativo entre o Ap_4A e o 2,3-DPG como efectores. Determinação das constantes de activação (K_a). 122
4.1.d.8.*e*. Dinucleósidos polifosfatos (Ap_nA). Constantes de activação (K_a) para Ap_4A, Ap_5A e Ap_6A 122
4.1.d.8.*f*. Efeito dos heterodinucleósidos polifosfatos 128
4.1.d.8 *g*. Efeito dos polifosfatos P_5 e P_{15} 129
4.1.e. Análise cromatográfica de polifosfatos comerciais 130
4.1.e.1. Análise do P_5 130
4.1.e.2 Análise do P_{15} 134
4.1.f. Estudo do efeito activador dos distintos polifosfatos sobre a actividade 5´-nucleotídase IMP/GMP específica. Determinação das K_a para o P_{18},P_{19}, P_{20} e P_{35}. 134
4.1.g. Efeito do P_i na actividade da 5'-nucleotídase. 141
4.1.h. Actividade fosfotransferásica da 5´-nucleotídase IMP/GMP específica. 141
4.1.h.1. Perfil cromatográfico da actividade 5´-nucleotidásica e fosfotransferásica em coluna de Dyematrex Green A 143
4.1.h.2. Efectores da actividade fosfotransferásica. $Ap_nA(N)$, 2,3-DPG e P_{15} 144
4.1.i. Níveis de 5'-nucleotídase IMP/GMP específica em distintos tecidos do rato. 148

pág.

4.2. Metabolismo de nucleótidos purínicos em extracto de cérebro 155
4.2.a. Introdução 155
4.2.b. Visão geral do metabolismo dos nucleósidos monofosfato: AMP, IMP, GMP e XMP 156
4.2.c. Determinação e compilação das constantes cinéticas das enzimas implicadas no metabolismo dos nucleótidos purínicos presentes em extracto de cérebro 158
4.2.d. Tratamento matemático geral. Caso do metabolismo de derivados da adenina e hipoxantina. 162
4.2.d.1. Tratamento matemático geral 162
4.2.e. Influência da carga adenílica sobre o metabolismo do AMP (IMP) 174
4.2.f. Caso do metabolismo do GMP e XMP 183
4.2.g. Casos particulares 190
4.3. Comparação entre sequências de nucleótidos codificantes e respectivas sequências de aminoácidos da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica e de outras proteínas. 193
4.3.a. Pesquisa de sequências das 5'-nucleotídases (EC 3.1.3.5) 193
4.3.b Comparação entre sequências de nucleótidos codificantes e respectivas sequências de aminoácidos de distintas 5'-nucleotídases 193
4.3.b.1. 5'-Nucleotídase de membrana (X55740), como termo de comparação 196
4.3.b.2. 5'-Nucleotídase citosólica (D38524), como termo de comparação 196
4.3.c. 5'-Nucleotídase citosólica (D38524): estudo da sua homologia com outras proteínas 201
4.3.c.1. Estudo comparativo entre a 5'-nucleotídase citoplasmática e o receptor da SP-A 203

5. Considerações finais 207

6. Conclusões 216

7. Bibliografia 219

Índice de Figuras

		pág.
Fig. 1.	Esquema geral do metabolismo de nucleótidos purínicos.	4
Fig. 2.	Representação esquemática da estrutura da molécula de glicosil-fosfatidilinositol (GPI).	11
Fig. 3.	Hipótese de mecanismo de acção da enzima 5'-nucleotídase IMP/GMP específica.	22
Fig. 4.	Síntese de Ap_4G, a partir de ATP[γS] e de GTP.	58
Fig. 5.	Actividades nucleotidásicas no cérebro de rato.	68
Fig. 6.	Cromatografia em coluna de fosfocelulose (8 ml).	71
Fig. 7.	Cromatografia em coluna de fosfocelulose (17 ml).	72
Fig. 8.	Efeito da temperatura na estabilidade da enzima.	75
Fig. 9.	Efeito do tempo de aquecimento sobre a actividade da enzima.	76
Fig. 10.	Perfil cromatográfico da actividade 5'-nucleotidásica em coluna de Cibacron Blue F3G-A Sepharose 4B, mediante eluição por gradiente descontínuo de NaCl.	78
Fig. 11.	Perfil cromatográfico da actividade 5'-nucleotidásica em coluna de Cibacron Blue F3G-A Sepharose 4B, utilizando um gradiente contínuo de NaCl em solução tampão de TSE.	79
Fig. 12.	Perfil cromatográfico da 5'-nucleotídase na coluna de Dyematrex Green A eluída com gradiente descontínuo ("pulsos") de NaCl em TSE	81
Fig. 13.	Perfil cromatográfico da 5'-nucleotídase na coluna de Dyematrex Green A eluída com gradiente descontínuo de NaCl na ausência e na presença de antiproteases.	82
Fig. 14.	Recromatografia dos picos I e II em coluna de Dyematrex Green A.	84
Fig. 15.	Cromatografia do pico II da coluna de fosfocelulose em coluna de Dyematrex Green A.	86

pág.

Fig. 16. Cromatografia em coluna de fosfocelulose (etapa 3 de purificação). 88

Fig. 17. Cromatografia em coluna de Dyematrex Green A (etapa 4 de purificação). 90

Fig. 18. Cromatografia em coluna hidrofóbica de Phenyl superose (etapa 5 de purificação). 91

Fig. 19. Electroforese em gel de poliacrilamida a 12% na presença de SDS. 92

Fig. 20. Perfil cromatográfico da actividade da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica em coluna de Sephacryl S-300. Determinação da sua massa molecular. 96

Fig. 21. Determinação da massa molecular da 5'-nucleotídase por gradiente de sacarose. 97

Fig. 22. Determinação da actividade da 5'-nucleotídase. Quantificação do P_i formado. Linearidade com o tempo e com a quantidade de enzima. 100

Fig. 23. Determinação da actividade fosfotransferásica da 5'-nucleotídase. Quantificação do GMP radioactivo. Linearidade com o tempo. 101

Fig. 24. Efeito da variação dos valores de pH na actividade 5'-nucleotidásica. 102

Fig. 25. Influência da temperatura na actividade da enzima. 104

Fig. 26. Representações gráficas do efeito da concentração de distintos substratos na velocidade de reacção catalisada pela 5'-nucleotídase: *v versus* [S] e $1/v$ *versus* $1/[S]$. 111

Fig. 27. Efeito dos catiões monovalentes sobre a actividade da enzima. 114

Fig. 28. Efeito da concentração do catião Mg^{2+} na actividade nucleotidásica. 117

Fig. 29. Comparação entre os efeitos dos catiões Mg^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+} e Mn^{2+} sobre a actividade da enzima. 119

pág.

Fig. 30. Efeito do Ap_4A e do 2,3-DPG sobre a actividade nucleotidásica da 5'-nucleotídase. 123

Fig. 31. Estudo comparativo entre o Ap_4A e o 2,3-DPG como efectores da 5'-nucleotídase. Curvas de activação e determinação dos valores de K_a. 125

Fig. 32. Curvas de activação e determinação dos valores de K_a do Ap_4A, Ap_5A e Ap_6A. 127

Fig. 33. Efeito da concentração de P_{15} na actividade nucleotidásica da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica. 132

Fig. 34. Cromatografia do polifosfato P_5 comercial (Sigma) em coluna de DEAE-celulose. 133

Fig. 35. Cromatografia do polifosfato P_{15} (Sigma) em coluna de DEAE-celulose. 136

Fig. 36. Efeito activador de distintos polifosfatos sobre a 5'-nucleotídase. Determinação das constantes de activação (K_a) para o P_{18} (A), P_{19} (B), P_{20} (C) e P_{35} (D). 139

Fig. 37. Efeito inibidor do P_i na actividade da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica. 142

Fig. 38. Perfis cromatográficos das actividades nucleotidásica e fosfotransferásica da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica em coluna de Dyematrex Green A. 145

Fig. 39. Representação gráfica do efeito de distintos compostos como efectores da actividade fosfotransferásica da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica. 146

Fig. 40. Perfil cromatográfico da actividade da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica e das fosfátases inespecíficas de cérebro de rato numa coluna de Dyematrex Green A. 150

Fig. 41. Perfis cromatográficos da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica de distintos tecidos do rato e de cistos de *Artemia*. 152

Fig. 42. Perfil cromatográfico dos produtos de degradação do AMP em extracto de cérebro. 157

pág.

Fig. 43. Perfil cromatográfico dos produtos de degradação do IMP em extracto de cérebro. 159

Fig. 44. Perfil cromatográfico dos produtos de degradação do GMP em extracto de cérebro. 160

Fig. 45. Perfil cromatográfico dos produtos de degradação do XMP em extracto de cérebro. 161

Fig. 46. Esquema geral do metabolismo dos compostos purínicos derivados da adenina e hipoxantina. 163

Fig. 47. Degradação metabólica do AMP em extracto de cérebro de rato. 172

Fig. 48. Estudo matemático teórico da degradação do AMP (A). Comparação teórica da contribuição das enzimas 5'-nucleotídases solúvel de alta afinidade (B) e IMP/GMP específica (C) para processo. 173

Fig. 49. Representação gráfica da contribuição relativa das enzimas E1 e E2 no metabolismo do AMP, aplicando o método do reservatório metabólico (Ribeiro e col., 1990). 176

Fig. 50. Degradação metabólica do IMP em extracto de cérebro de rato. Comparação entre os resultados experimentais e os teóricos. 177

Fig. 51. Degradação de AMP na presença de um valor de carga de adenílica de 0,8 (C.A.=0,8). 179

Fig. 52. Estudo teórico da degradação de AMP em presença de um valor de CA=0,8. 181

Fig. 53. Degradação metabólica de AMP, pelo extracto de cérebro de rato em presença de um valor de distintos valores de C.A.. Comparação entre os resultados experimentais e teóricos. 185

Fig. 54. Degradação de GMP em extracto cerebral de rato. Comparação entre os resultados experimentais e os teóricos. 186

Fig. 55. Metabolismo de GMP no cérebro de rato. Esquema metabólico de degradação (A). Equações matemáticas gerais (B) e diferenciais (C) do catabolismo de GMP. 187

pág.

Fig. 56. Degradação de XMP em extracto cerebral de rato. Comparação entre os resultados experimentais e os teóricos. 188

Fig. 57. Metabolismo de XMP no cérebro de rato. Esquema metabólico de degradação (A). Equações matemáticas gerais (B) e diferenciais (C) do catabolismo de GMP. 189

Fig. 58. Efeito do P_i sobre o metabolismo dos nucleótidos da adenina e hipoxantina. 191

Fig. 59. Estudo teórico do efeito do P_i sobre o metabolismo dos nucleótidos da adenina e hipoxantina. 192

Fig. 60. Efeito do EDTA sobre o metabolismo do GMP. 194

Fig. 61. Comparação entre as sequência de nucleótidos codificantes para a 5'-nucleotídase de membrana (X55740) e para outras 5'-nucleotídases (D38524, X62278, J05214 e D 14541). Representação gráfica em matriz. 197

Fig. 62. Comparação entre as sequência de aminoácidos da 5'-nucleotídase de membrana (X55740) e de outras 5'-nucleotídases (D38524, X62278, J05214 e D 14541). Representação gráfica em matriz. 198

Fig. 63. Comparação entre as sequência de nucleótidos codificantes para a 5'-nucleotídase citosólica (D38524) e para outras 5'-nucleotídases de origem distinta (X55740, X62278, J05214 e D14541). Representação gráfica em matriz. 199

Fig. 64. Comparação entre as sequências de aminoácidos da 5'-nucleotídase citosólica (D38524) e de outras 5'-nucleotídases de origem distinta (X55740, X62278, J05241 e D14541). Representação gráfica em matriz. 200

Fig. 65. Sequência de aminoácidos da 5'-nucleotídase citosólica de placenta humana (D38524). 201

Fig. 66. Sequência de nucleótidos codificantes para a 5'-nucleotídase citoplasmática de placenta humana (D38524). 202

pág.

Fig. 67. Representação gráfica das matrizes de comparação entre sequências de (A) nucleótidos codificantes para a 5'-nucleotídase citosólica (D38524) e para o receptor da SP-A (L10124) e, (B) de aminoácidos da 5'-nucleotídase citosólica (D38524) e do receptor do SP-A (B48516). 205

Fig. 68. Comparação entre as sequências peptídicas da 5'-nucleotídase citosólica (D38524) e do receptor da proteina A do surfactante pulmonar (SP-A) (B48516). 206

Índice de Tabelas

		pág.
Tabela 1.	Fraccionamento da actividade 5´-nucleotidásica de cérebro de rato, com sulfato de amónio.	69
Tabela 2.	Efeito da temperatura na estabilidade da enzima.	74
Tabela 3.	Estudo comparativo da actividade 5´-nucleotidásica dos picos I e II da coluna de Dyematrex Green A, frente a distintos substratos.	83
Tabela 4.	Purificação da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica de cérebro de rato.	93
Tabela 5.	Actividade relativa da 5'-nucleotídase em função da solução tampão utilizada na mistura de ensaio.	105
Tabela 6.	Estudo da estabilidade da enzima 5'-nucleotídase IMP/GMP específica	106
Tabela 7.	Especificidade da enzima 5'-nucleotídase IMP/GMP específica frente a distintos compostos utilizados como substratos.	108
Tabela 8.	Valores das constantes cinéticas V_{max} e K_m ($S_{0,5}$) da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica.	109
Tabela 9.	Comparação do efeito exercido por distintos catiões divalentes na actividade da enzima 5'-nucleotídase IMP/GMP específica.	116
Tabela 10.	Efeito dos distintos compostos indicados sobre a actividade da enzima 5'-nucleotídase IMP/GMP específica.	121
Tabela 11.	Efeito dos dinucleótidos polifosfatos (Ap_nA) sobre a actividade da 5'-nucleotídase citosólica IMP/GMP específica.	126
Tabela 12.	Valores das constantes de activação aparentes (K_a) do Ap_4A, Ap_5A e Ap_6A sobre a 5´-nucleotídase.	128
Tabela 13.	Efeito dos heterodinucleósidos polifosfatos e do Gp_4G sobre a actividade da 5-nucleotídase.	130
Tabela 14.	Influência dos polifosfatos, P_5 e P_{15}, na actividade da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica.	131

		pág.
Tabela 15.	Efeito dos distintos polifosfatos na actividade da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica.	137
Tabela 16.	Valores de V_{max} e K_a de P_{18}, P_{19}, P_{20} e P_{35}.	140
Tabela 17.	Estudo comparativo entre o 5'-IMP e o 5'-GMP como substratos fosforilantes da guanosina.	143
Tabela 18.	Influência de distintos dinucleósidos polifosfatos, 2,3-DPG e polifosfato P_{15} na actividade fosfotransferásica da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica.	147
Tabela 19.	Distribuição da actividade da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica nos distintos tecidos.	154
Tabela 20.	Valores das constantes cinéticas (K_m e K_i) das enzimas intervenientes no metabolismo purínico cerebral.	164
Tabela 21.	Equações gerais de velocidade das enzimas intervenientes no metabolismo purínico cerebral.	165
Tabela 22.	Equações diferenciais gerais do metabolismo purínico cerebral.	167
Tabela 23.	Tratamento matemático geral do metabolismo de derivados da adenina e hipoxantina.	169
Tabela 24.	Concentrações finais individuais em ATP, ADP e AMP, a diferentes valores de cargas adenílicas	178
Tabela 25.	Família das 5'-nucleotídases (EC 3.1.3.5) sequenciadas existentes no banco de dados "GenBank"	195

Abreviaturas

1. Nucleótidos(ósidos) e análogos

A, Ado	Adenosina
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
AMP-CP	α-ß-metilenoadenosina 5'-difosfato
AMPSP	Adenosina 5'-O-(2-tiodifosfato)
AMP-PCP	ß,γ-metilenoadenosina 5'-trifosfato
AMP-PNP	Imidoadenosina 5'-trifosfato
ASA	Adenilsuccinato
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ATP[αS]	Adenosina 5'-α-tiotrifosfato
ATP[γS]	Adenosina 5'-γ-tiotrifosfato
dATP	Deoxiadenosina 5'-trifosfato
GDP	Guanosina 5'-difosfato
GMP	Guanosina 5'-monofosfato
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
Guo	Guanosina
IBTA	5'-deoxi-5'-isobutiltioadenosina
IBTI	5'-deoxi-5'-isobutiltioinosina
IMP	Inosina 5'-monofosfato
Ino	Inosina
dITP	Deoxiinosina 5'-trifosfato
p_4A	Adenosina 5'-tetrafosfato
p_4G	Guanosina 5'-tetrafosfato
p_5A	Adenosina 5'-pentafosfato
ppN	Nucleósido 5'-difosfato
pppN	Nucleósido 5'-trifosfato
RB	Nucleósido
SpA	Adenosina 5'-fosfosulfato
TDP	Timidina 5'-difosfato
XMP	Xantosina 5'-monofosfato
Xao	Xantosina
ZDP	5-aminoimidazol-4-carboxiamida-1-ß-D-rifuranosil 5'-difosfato

2. Dinucleótidos e análogos

Ap_2A	Diadenosina 5',5'''-P^1,P^2-difostato

Ap_3A	Diadenosina 5',5'''-P^1,P^3-trifostato
Ap_4A	Diadenosina 5',5'''-P^1,P^4-tetrafostato
Ap_5A	Diadenosina 5',5'''-P^1,P^5-pentafostato
Ap_6A	Diadenosina 5',5'''-P^1,P^6-hexafostato
$Ap_4\varepsilon A$	Adenosina 5'-P^1-tetrafosfo-P^4-1, N^6-eteno-adenosina
dAp_4dA	Deoxidiadenosina 5',5'''-P^1,P^4-tetrafosfo
$ddAp_4A$	2',3'-Dideoxiadenosina 5'-P^1-tetrafosfo-P^4-5'''-adenosina
$App[CH_2]ppA$	Diadenosina 5',5'''-P^1,P^4-(P^2,P^3-metileno) tetrafostato
$Ap_4A[\alpha S]$	Diadenosina 5',5'''-P^1,P^4-α-tiotetrafosfato
Ap_4C	Adenosina 5'-P^1-tetrafosfo-P^4-5'''-citosina
Ap_4G	Adenosina 5'-P^1-tetrafosfo-P^4-5'''-guanosina
Ap_4I	Adenosina 5'-P^1-tetrafosfo-P^4-5'''-inosina
Ap_4dI	Adenosina 5'-P^1-tetrafosfo-P^4-5'''-deoxiinosina
Ap_4N	Adenosina 5'-P^1-tetrafosfo-P^4-5'''-nucleósido
Ap_nN	Adenosina 5'-P^1-tetrafosfo-P^n-5'''-nucleósido
Ap_4U	Adenosina 5'-P^1-tetrafosfo-P^4-5'''-uridina
Ap_4X	Adenosina 5'-P^1-tetrafosfo-P^4-5'''-xantosina
Gp_4G	Diguanosina 5',5'''-P^1,P^4-tetrafosfato
Gp_4U	Guanosina 5'-P^1-tetrafosfo-P^4-5'''-uridina
Np_nN	Homonucleósido 5'-5''' -P^1,P^n- (n)fosfato
Np_nN'	Heteronucleósido 5'-5''' -P^1,P^n- (n)fosfato

3. Outras abreviaturas

BSA	Albumina sérica bovina
cpm	Cintilações por minuto
2,3-DPG	2,3-Difosfoglicerato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilenodiaminotetraacético
g	Gravidade
GPI	Glicosil-fosfatidilinositol
Hepes	Acido N-2-hidroxietilpiperazinil-N'-2-etanosulfónico
Mes	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
Mops	Ácido 3-(N-morfolino)propenosulfónico
mU	Miliunidade de actividade enzimática

P_i	Fosfato inorgânico
PP_i	Pirofosfato
P_3	Tripolifosfato
P_4	Tetrapolifosfato
P_5	Pentapolifosfato
P_n	Polifosfato de cadeia variável, com um número de grupos fosfato igual a n
PEI-celulose	Polietileneimina-celulose
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfónico
PRPP	Fosforibosilpirofosfato ou 5-fosfo-α-D-ribose 1-difosfato
Rf	Mobilidade relativa (electroforese)
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SP-A	Proteína A do surfactante do pulmão
TBA	Brometo de tetrabutilamómio
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
Tes	Acido N-tris(hidroximetil)metil-2-amino etanosulfónico
TLC	Cromatografia em camada delgada
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano

4.Enzimas

Adenilato cínase	(EC 2.7.4.3)
Adenosina cínase	(EC 2.7.1.20)
Adenosina desamínase	(EC 3.5.4.4)
AMP desamínase	(EC 3.5.4.6)
Catálase	(EC 1.11.1.6)
Fosfodiestérase	(EC 3.1.4.1)
Fosfátase alcalina	(EC 3.1.3.1)
Guanina desamínase	(EC 3.5.4.3)
Lactato desidrogénase	(EC 1.1.1.27)
Luciférase do pirilampo	(EC 1.13.12.7)
Piruvato cínase	(EC 2.7.1.40)
Nucleósido difosfato cínase	(EC 2.7.4.6)
Nucleósido monofosfato cínase	(EC 2.7.4.4)
5'-Nucleotídase	(EC 3.1.3.5)
Xantina oxídase	(EC 1.1.3.22)

Resumos

Resumo

A 5'-nucleosídase citosólica IMP/GMP específica é uma enzima caracterizada por utilizar como substratos preferênciais o IMP e o GMP. Tem uma distribuição ubiquitária, podendo ser encontrada em leveduras e praticamente todos os tecidos e orgãos de vertebrados. A enzima foi purificada a partir de extracto de cérebro de rato utilizando precipitação pelo sulfato de amónio e três cromatografias consecutivas em colunas de fosfocelulose, Dyematrex Green A e Phenyl superose, com um rendimento final de cerca de 8% e uma actividade específica 2,2 U/mg.

A actividade da enzima purificada é absolutamente dependente da presença dos iões Mg^{2+}, podendo, contudo, serem substituídos com cerca de 45% de eficiência pelo Co^{2+}. O intervalo de valores de pH e temperatura óptima da reacção enzimática é de 6,5-7,0 e 35-42°C, respectivamente. Os valores de K_m na ausência (e presença de) de Ap_4A para os seguintes substratos, foram: IMP, 0,6 (0,3); GMP, 4,6 (0,7); XMP, 11 (4,7); AMP 15 (7) mM.

A enzima é activada pelos diadenosina polifosfatos, com um número de fosfatos internos ≥ a 4, apresentando valores de K_a da ordem de μM, que diminuem à medida que aumenta o número de fosfatos da cadeia interna: 83 (Ap_4A), 76 (Ap_5A) e 56 μM (Ap_6A). Os heterodinucleósidos tetrafosfatos do tipo Ap_4N (N uma purina), são também activadores da enzima, embora em, menor grau que os anteriores. A presença de uma base pirimidínica, como constituinte destes heterdinucleótidos, diminui significativamente a sua eficácia efectora. Os polifosfatos são, do mesmo modo, activadores da enzima desde que o seu número de resíduos de fosfato seja superior a 5. Quanto maior for esse número, maior é o grau de activação. Os valores de K_a determinados para o P_{18}, P_{19} e P_{20}, foram de, 3,5, 0,9 e 0,6 μM, respectivamente.

A enzima intervem, igualmente, em reacções de fosfotranferência - actividade fosfotransferásica. Utilizando o IMP e a guanosina, como dador e receptor do grupo fosfato, respectivamente, esta actividade enzimática foi estimulada pelos mesmos efectores da actividade nucleotidásica, praticamente com a mesma eficácia. Ambas as actividades foram estimuladas pelo 2,3-DPG, mas em concentrações superiores aos dos outros efectores referidos.

O estudo do metabolismo purínico cerebral foi efectuado mediante incubação da fracção citosólica (sobrenadante de 150 000 x *g*) na presença de nucleótidos, nucleósidos e respectivas bases. Os resultados obtidos

mostraram, principalmente, que: (i) na ausência de ATP, a enzima preferencialmente envolvida no metabolismo do AMP é a 5'-nucleotídase solúvel de alta afinidade, sendo este nucleótido degradado via adenosina a inosina e hipoxantina; (ii) na presença de ATP e ADP, o AMP é degradado preferencialmente via IMP a inosina e hipoxantina, o que pode ser explicado pela activação da AMP desamínase e pela inibição da 5'-nucleotídase solúvel de alta afinidade pelo ATP.

Este estudo experimental foi acompanhado e complementado por um estudo teórico, mediante resolução matemática de um sistema de equações gerais diferenciais das reacções de velocidade das enzimas envolvidas nesse processo metabólico. Os resultados obtidos foram muito semelhantes aos obtidos experimentalmente, permitindo prever ou simular situações difíceis de realizar experimentalmente.

Realizou-se, igualmente, um estudo sumário comparativo entre as sequências de nucleótidos codificantes para as 5'-nucleotídases, já descritas, e as correspondentes sequências de aminoácidos, mediante pesquisa em banco de dados: "GenBank". Os resultados demonstraram a inexistência de quaisquer homologias entre as sequências codificantes e respectivas sequências de aminoácidos entre a 5'-nucleotídase citosólica de placenta humana e as restantes 5'-nucleotídases (membranares ou de origem membranar). No entanto, e surpreendentemente, observou-se uma significativa homologia entre as sequências de nucleótidos codificantes e correspondentes sequências peptídicas entre a 5'-nucleotídase e o receptor da proteína A do surfactante pulmonar (receptor do SP-A) que se traduzia na identidade de 132 aminoácidos C-terminal da 5'-nucleotídase citosólica e os correspondentes aminoácidos N-terminal, do receptor do SP-A. A razão para esta tão grande identidade, parece ser, até ao momento, inexplicada

Abstract

The cytosolic 5'-nucleotidase IMP/GMP specific is an enzyme that uses as main substrates IMP and GMP. It has been found in yeast and in most of organs and tissues, from vertebrates. The enzyme was purified from rat brain extracts using amonium sulfate precipitation and three chromatographic steps, phosphocellulose, Dyematrex Green A and Phenyl superose, with a final recovery of aproximatly 8% and a specific activity of 2,2 U/mg protein.

The activity of the purified enzyme is dependent on the presence of Mg^{2+}, and it can be replaced by Co^{2+} with 45% of efficiency. The optimal pH and temperature range of the enzyme reaction was 6.5-7.0 and 35-42°C, respectively. The K_m values in the absence (and in the presence) of Ap_4A for the following substrates were: IMP, 0,6 (0,3); GMP, 4,6 (0,7); XMP, 11 (4,7); AMP 15 (7) mM.

The enzyme is activated by diadenosine polyphosphates (Ap_4A), with a number of internal phosphates ≥ 4, with K_a values in the μM range, which decrease with the increasing number of the phosphate chain: 83 (Ap_4A), 76 (Ap_5A) e 56 μM (Ap_6A). The heterodinucleosides tetraphosphates, of the Ap_4N type (N being a purine), are also enzyme activators, although in a lower degree. The presence of a pyrimidine base in an heterodinucleotide decreases significantly its effectiveness. The polyphosphates are also enzyme activators, as far as the number of phosphate residues are higher than 5. The activation is directly related to the number of phosphates. The K_a obtained for P_{18}, P_{19} and P_{20}, were of, 3,5, 0,9 e 0,6 μM, respectively.

The enzyme is also involved in phospho-transferring rections. Using IMP and guanosine, as donor and as receptor of the phosphate group, respectively, this enzyme activity was stimulated by the same activators as the nucleotidase activity, and with similar effectiveness. Both activities, hydrolase and phosphotransferase, were also stimulated by 2,3-DPG, though at higher concentration than the others effectores referred above.

The brain purine metabolism study was carried out by incubating the cytosolic fraction (150 000 x *g* supernatant) in the presence of nucleotides, nucleosides and nitrogen bases. The results obtained showed that: (i) in the absence of ATP, the enzyme preferentially involved in the AMP metabolism was the soluble 5'-nucleotidase of high affinity, being this nucleotide degraded via adenosine to inosine and hipoxanthine; (ii) in the presence of ATP and ADP, the AMP is degradated, via IMP to inosine and

hypoxanthine. This can be explained by the ATP activation of AMP desaminase and the inhibition of the high affinity 5´-nucleotidase by ATP.

This aproach was complemented with a theoretical study, through mathematic resolution of a velocity equations system of the enzymes involved, yielding similar results to those obtained experimentally. With this method different situations, difficult to perform experimentally, can be explored.

A comparative study between the sequence of nucleotides encoding the 5'-nucleotidases already described, as well as the aminoacids sequences, was done in a data base: "GenBank". The results showed that there was no DNA or protein homology between the cytosolic 5'-nucleotidase from human placenta and other membrane 5'-nucleotidases. Nevertheless, it was observed a high homology between the nucleotides sequences encoding the cytosolic 5'-nucleotidase and respective peptide sequences, and the corresponding sequences of the pulmonary surfactant protein A receptor (SP-A receptor), which presented an identity in 132 C-terminal aminoacids of cytosolic 5'-nucleotidase and the correspondent N-terminal aminoacids of SP-A receptor. The homology observed between these two proteins had not been previous reported and its physiological meaning was not yet clarified.

Résumée

La 5'-nucléosidase cytosolic IMP/GMP spécifique est une enzyme caractérisée par la utilisation préférenciel de l' IMP e GMP comme substrats. Sa distribution est ubiquitaire et on peut la trouvée dans les levures e dans tous les tissues et organes des vertèbres. L' enzyme a été purifiée a partir des extraits de cerveau de rat en utilisant la précipitation au sulfate ammonium et trois chromatographies successives en colonnes de phosphocellulose, "Dyematrex Green A" et "Phenyl superose", avec un rendemènt final de 8% et une activité spécifique de 2,2 U/mg.

L´ activité de l' enzyme purifiée est absolument dépendent de la présence des ions Mg^{2+}, qui peuvent être remplacés par les ions Co^{2+}, avec 45% de efficace comparée. L' intervalle de valeurs de pH et température optimal de la reaccion enzymatic, est de 6,5-7,0 e 35-42°C, respectivement. Les valeurs de K_m sans (et avec) Ap_4A pour les substrats suivants ont été: IMP, 4,6 (0,7); XMP, 11 (4,7); AMP 15 (7) mM.

L' enzyme est activée par les diadénosine polyphosphates (Ap_4A), avec un numéro de phosphates internes ≥ 4, et valeurs de K_a dans la ordre de μM, qui diminuent en fonction de l' augmentation du numéro de phosphates internes: 83 (Ap_4A), 76 (Ap_5A) e 56 μM (Ap_6A).

Les hétérodinucléosides tetraphosphates du type Ap_4N (N est une purine), sont aussi activateurs de l' enzyme, mais dans un niveau plus bas. La présence d' une pyrimidine, comme constituent de ces heterodinucléotides, diminue significativement sa efficace effecteur. Les polyphosphates sont aussi activateurs de l' enzyme, a partir d' un numéro de phosphates supérieur a 5. Le niveau de l' activation enzymatique est directement dépendent du numéro de ces résidues. Les valeurs de K_a déterminés pour le P_{18}, P_{19} e P_{20}, ont été, 3,5, 0,9 e 0,6 μM, respectivement.

L' enzyme participe aussi dans les réactions de transfert de phosphates - activité phosphotransférase. En utilisant l' IMP e la guanosine, comme donneur e récepteur du groupe phosphate, respectivement, cette activité enzymatique a été stimulé avec la même efficace, par les mêmes effecteurs de l' activité nucléotidase. Les deux activités ont été, aussi, stimulées pour le 2,3-DPG, mais, en concentrations supérieures.

L' étude du métabolisme des purines cérébrale, a été effectué par l' incubation de la fraction cytosolic dans la présence de nucléotides, nucléosides et ses bases. Les résultats obtenues ont montré que (i) dans la

absence d' ATP l' enzyme que participe préférentiellement dans le métabolisme du AMP est la 5'-nucléotidase soluble d' haut affinitée et que ce nucléotide est dégradé, vie adénosine a inosine et hipoxantine; (ii) dans la présence d' ATP et ADP, l' AMP est dégradé, préférentiellement, vie IMP a inosina et hipoxantine, que peut être expliqué par l' activation de l' AMP desaminase et pour l' inhibition de la 5'-nucléotidase par l' ATP.

Cet étude expérimental a été accompagné et complèmenté pour un étude théorique, par résolution mathématique d' un système de équations différentiels générales des réactions de la vélocitée des enzymes impliquées dans ce procès métabolique. Les résultats obtenues ont été très reprochés aux résultats expérimentaux, ce que permettre prévenir ou simuler des situations difficiles à réaliser expérimentalement.

On a réalisé, également, l' étude sommaire comparative entre les séquences nucléotidiques codifiantes pour les différents 5'-nucléotidases décrites et les séquences peptidiques correspondants, par recherche dans le "GenBank". Les résultats ont démontré aucune homologie entre les séquences codifiées et les respectives séquences aminoacidique entre la 5'-nucléotidase cytosolic de la placenta humaine et les autres 5'-nucléotidases (membraneuse ou de origine membraneuse). Par contraire, a été observé une homologie significative entre les séquences des nucléotides codifiantes e respectives séquences peptidiques, de la 5'-nucléotidase e le récepteur de la protéine A du surfactant pulmonaire (récepteur du SP-A), qui se traduit par l' identité de 132 aminoacides C-terminal de la 5'-nucléotidase cytosolic et respectives aminoacides N-terminal du récepteur du SP-A. La justification pour cet identité n'est pas connue jusqu'à ce moment.

1. Introdução

1.1. Metabolismo dos nucleótidos purínicos

1.1.a. Conteúdo intracelular

Os nucleótidos purínicos mais abundantes na célula são os derivados da adenina (AMP, ADP, ATP) e da guanina (GMP, GDP, GTP). Em menor proporção encontram-se outros nucleótidos derivados da xantina e hipoxantina. Tomando o fígado como orgão de referência, as concentrações descritas para estes nucleótidos, em termos de μmol/g de tecido húmido são os seguintes: ATP, 18; ADP, 0,6; AMP, 0,3; GTP, 0,2; GDP, 0,06 e GMP 0,05 (Williamson e Brosnan, 1974; Parrilla e col., 1976; Kleineke e col., 1979; Siess e Wieland, 1979 a,b).

As relações ATP/ADP e GTP/GDP são de cerca de 3 e de 3,3, respectivamente. A percentagem de distribuição entre as porções citosólica e mitocondrial são, respectivamente: ATP (75, 25); ADP (55, 45); GTP (80, 20); GDP (55, 45) e GDP (55, 45). As relações ATP/ADP e GTP/GDP são diferentes no citosol (4,0 e 4,8) e na mitocôndria (1,7 e 1,5).

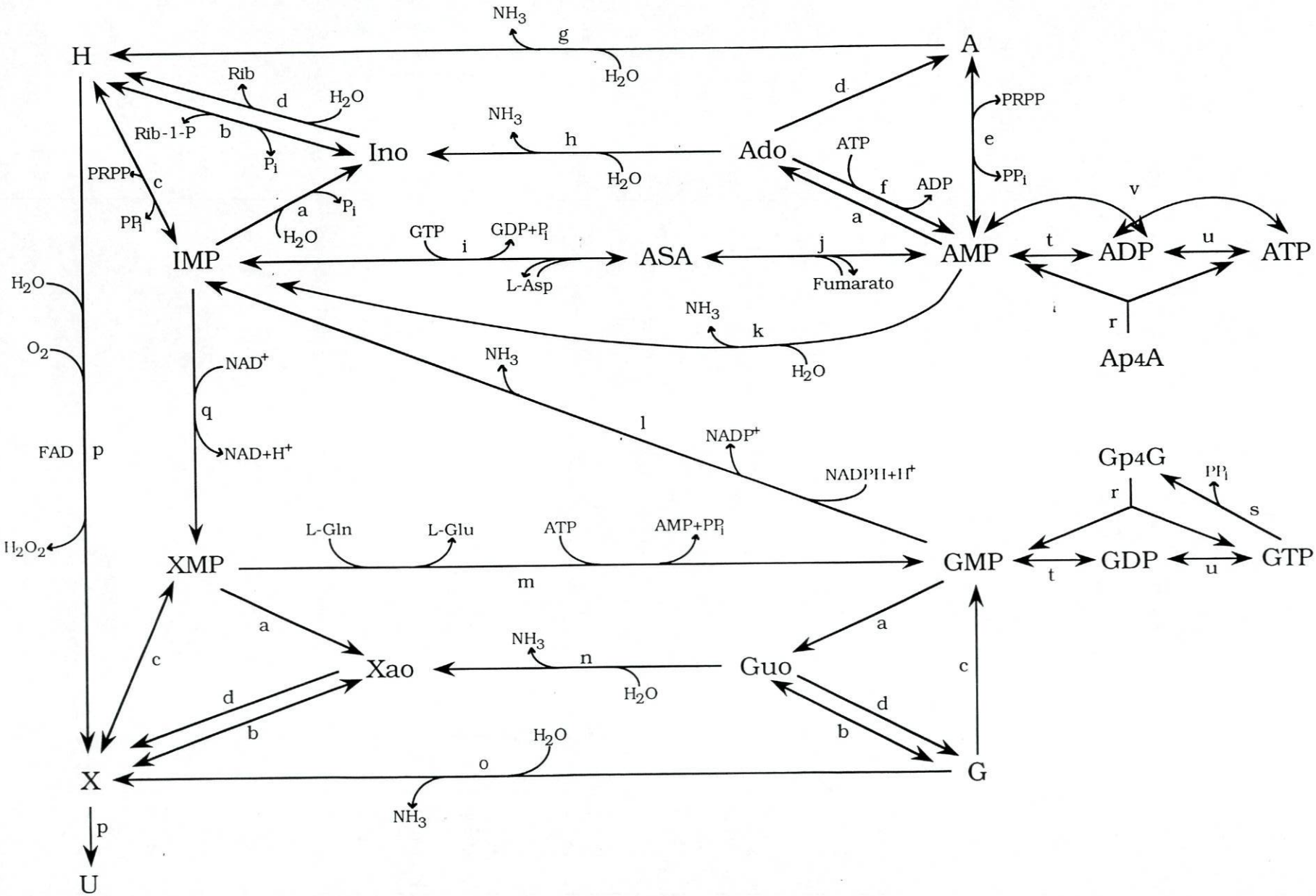
1.1.b. Interconversão de nucleótidos purínicos

O IMP é o primeiro nucleótido purínico produzido na célula mediante a via de síntese *de novo*. Nesta sequência metabólica intervêm 11 enzimas e os seguintes substratos: 1 ribose-5-P, 5 ATP, 4 aminoácidos (2 glutaminas, 1 glicina e 1 aspartato), 2 derivados do tetrahidrofolato (o metenil e o formil-derivados), HCO_3^- e 3 moléculas de água.

A partir do IMP, sintetizado pela via de síntese *de novo* de purinas, produz-se adenilsuccinato (ASA) e AMP pela acção em sequência de duas enzimas: a ASA sintétase (EC 6.3.4.4) e a ASA liase (EC 4.3.2.2). Por outro lado, o IMP pode dar origem a XMP e GMP mediante reacções catalisadas pela IMP desidrogénase (EC 1.6.6.205) e pela GMP sintétase (EC 6.3.5.2). A interconversão entre nucleótidos purínicos completa-se mediante as acções das enzimas AMP desamínase (EC 3.5.4.6) e GMP redúctase (EC 1.6.6.8), que transformam o AMP e o GMP em IMP. Os cofactores necessários para cada uma destas enzimas encontram-se especificados na *Fig. 1*.

Fig. 1. Esquema geral do metabolismo de nucleótidos purínicos (adaptado de Sillero e Sillero, 1987).

a, 5'-nucleotídase (EC 3.1.3.5); b , purinonucleósido fosforílase (PNP) (EC 2.4.2.1); c, hipoxantina-guanina fosforibosiltransférase (HGPRT) (EC 2.4.2.8); d, nucleosídase (EC 3.2.2.1); e, adenina fosforibosiltransférase (APRT) (EC 2.4.2.7); f, adenosina cínase (EC 2.7.1.20); g, adenina desamínase (EC 3.5.4.2); h, adenosina desamínase (EC 3.5.4.4); i, adenilsuccinato sintétase (EC 6.3.3.4); j, adenilsuccinato líase (EC 4.3.2.2); k, AMP desamínase (EC 3.5.4.6), l, GMP redúctase (EC 1.6.6.8); m, GMP sintétase (EC 6.3.4.1); n, guanosina desamínase (EC 3.5.4.15); o, guanina desamínase (EC 3.5.4.3); p, xantina oxídase (EC 1.2.3.2); q, IMP desidrogénase (EC 1.2.1.14); r, diguanosina tetrafosfátase (EC 3.6.1.17); s, guanosinatrifosfato guanililtransférase (EC 2.7.7.45); t, nucleósido monofosfato cínase (EC 2.7.4.4); u, nucleósido difosfato cínase (EC 2.7.4.6), v, adenilato cínase (2.7.4.3).


H
A
Ino
Ado
IMP
ASA
AMP
ADP
ATP
Ap4A
XMP
GMP
GDP
GTP
Gp4G
Xao
Guo
X
G
U
NH3
H2O
Rib
Rib-1-P
Pi
PRPP
PPi
ATP
ADP
GTP
GDP+Pi
L-Asp
Fumarato
NAD+
NAD+H+
NADP+
NADPH+H+
L-Gln
L-Glu
AMP+PPi
O2
FAD
H2O2
a
b
c
d
e
f
g
h
i
j
k
l
m
n
o
p
q
r
s
t
u
v

1.1.c. Transfosforilação de nucleótidos

Mediante a transfosforilação interconvertem-se grupos fosfato entre nucleósidos, mono, di e trifosfatos, gerando-se ADP e ATP a partir de AMP, GDP e GTP a partir de GMP.

As reacções de transfosforilação são catalisadas por enzimas que em geral são bastante inespecíficas: a nucleósido monofosfato cínase, a nucleósido difosfato cínase e a adenilato cínase. Estas enzimas apresentam, normalmente, altas velocidades máximas na célula, catalisam reacções reversíveis que tendem ao equilibrio, e nas quais se interconvertem nucleótidos com distintos níveis de fosforilação. Nestes processos intervêm os nucleótidos purínicos e pirimidínicos, tanto ribo como deoxiriboderivados. Existem, igualmente, fosfátases inespecíficas que desfosforilam os nucleósidos mono, di e trifosfatos. Completando o quadro de interconversão de nucleótidos purínicos, ainda que a outro nível, há que situar a fosforilação oxidativa, processo que tem lugar nas mitocôndrias e mediante o qual se sintetiza ATP a partir de ADP e P_i. Neste caso, não se trata de uma transfosforilação, na qual apenas se interconvertem fosfatos entre compostos mais ou menos ricos em energia, mas sim, de um processo no qual se produz um ganho de energia química a partir da oxidação de compostos hidrogenados.

1.1.d. Recuperação de bases purínicas

Os nucleósidos trifosfato purínicos e pirimidínicos participam em inúmeras reacções químicas nas quais se transfere parte das suas moléculas: P_i, PP_i, um nucleósido monofosfato ou um nucleósido. Os nucleótidos incorporam-se também nos ácidos nucleicos de tipo DNA ou RNA. Tanto os nucleótidos como os ácidos nucleicos estão também submetidos a reposições metabólicas no qual participam uma variedade de fosfátases, exo e endonucleases e outras hidrólases. O conjunto de todos esses processos metabólicos faz com que a partir de nucleótidos se gerem nucleósidos e bases purínicas que a célula trata de recuperar, como nucleósidos monofosfato, mediante uma série de reacções nas quais participam as seguintes enzimas:

i) Fosfátases inespecíficas (alcalinas (EC 3.1.3.1) e ácidas (EC 3.1.3.2))

Constituem uma família de enzimas, cujo número e função não estão ainda bem determinados, que catalisam a desfosforilação hidrolítica dos nucleósidos mono, di e trifosfatos a nucleósidos com libertação de fosfato.

ii) Nucleotídases específicas

Estão descritas 5'-nucleotídases, 3'-nucleotídases e 2'-nucleotídases específicas que catalisam a hidrólise de todos estes nucleótidos a nucleósidos e fosfato inorgânico. Uma vez que a maioria dos nucleótidos são derivados 5'-fosfato, as 5'-nucleotídases têm sido as mais estudadas.

Dado o interesse deste trabalho nestas enzimas, as 5'-nucleotídases serão tratadas com maior pormenor no ponto 1.2 deste capítulo.

(iii) Nucleosídases (EC 3.2.2.1)

Catalisam a hidrólise de nucleósidos a bases nitrogenadas e ribose.

(iv) Nucleósido fosforílase (Purinonucleósido fosforílase (EC 2.4.2.1))

Utilizam o P_i como cosubstrato, gerando ribose-1-P e a base nitrogenada correspondente. A reacção catalisada por este tipo de enzimas é reversível, ao contrário das nucleosídases tratadas anteriormente.

(v) Fosforibosil transférases

Catalisam a reacção

$$BRP + PP_i \rightleftharpoons B + PRPP$$

B, base; PRPP, fosforibosilpirofosfato ou 5-fosfo-α-D-ribose 1-difosfato.

Conhecem-se várias destas enzimas capazes de transferir o fosforibosilfosfato. No que respeita ao metabolismo das purinas conhecem-se a hipoxantina-guanina fosforibosil transférase (HGPRT) (EC 2.4.2.8) e a adenina fosforibosil transférase (APRT) (EC 2.4.2.7). Estas enzimas podem ser também englobadas sob o nome genérico de nucleótido pirofosforílases, refletindo melhor o sentido em que actuam a nível celular. A direcção de toda esta via de recuperação de purinas é

$$B \longrightarrow BR \longrightarrow BRP$$

BR, nucleósido; BRP, nucleósido monofosfato.

1.1.e. Mecanismos de regulação no metabolismo dos nucleótidos purínicos

Em relação ao metabolismo dos nucleótidos, como ocorre, aliás, no caso de outras vias metabólicas, apenas se tem uma visão qualitativa da sua regulação, sendo os pontos de maior interesse os seguintes:

No que respeita à via de síntese *de novo* de purinas considera-se que as duas primeiras reacções (1) e (2), catalisadas pela ribose-fosfato pirofosfocínase (PRPP sintétase) (EC 2.7.6.1) e pela amido fosforibosiltransférase (PRPP amidotransférase) (EC 2.4.2.14), marcam a velocidade de síntese de IMP.

$$\text{Ribose-5-P} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{(1)} \text{PRPP} + \text{AMP}$$

$$\text{PRPP} + \text{Glutamina} + H_2O \xrightarrow{(2)} \text{Fosforibosilamina} + \text{Glutamato} + PP_i$$

A primeira enzima é inibida por quase todos os nucleótidos purínicos, independentemente da natureza da base e do seu grau de fosforilação. Todos estes nucleótidos, além do IMP, podem considerar-se como produtos finais e, daí, o sentido fisiológico que pode ter esta inibição.

O fosforibosilpirofosfato, que se sintetiza por acção catalítica da primeira enzima, serve para a síntese não só de purinas, mas também de outros metabolitos (histidina, nucleótidos pirimidínicos). Pelo contrário, o segundo metabolito da via de síntese *de novo*, a fosforibosilamina, apenas tem um destino metabólico conhecido que é a síntese de IMP. Daí que, a PRPP amidotransférase possa considerar-se mais estrictamente como a primeira enzima da via de síntese *de novo* das purinas. Esta enzima é também inibida por nucleótidos purínicos, principalmente AMP e GMP. Por outro lado, o K_m da enzima para o fosforibosilpirofosfato é de cerca de 0,2 mM, zona na qual podem ocorrer alterações nos níveis de PRPP. Por isso, aumentos nas concentrações deste metabolito induzem aumentos na velocidade da transférase.

No que respeita à regulação da interconversão dos nucleótidos purínicos podem destacar-se as seguintes características:

A síntese de AMP requer GTP (enzima i, *Fig.1*) e a síntese de GMP requer ATP (enzima m, *Fig.1*). Todas as enzimas que intervêm nesta via metabólica são inibidas em maior ou menor grau pelos restantes

nucleótidos purínicos. A razão provável deste fenómeno é que todos estes nucleótidos têm uma grande analogia estrutural: têm o mesmo resíduo de ribose-fosfato e ligeiras modificações no anel purínico.

Fenómenos de regulação mais específicos foram descritos para a GMP redúctase e para a AMP desamínase. A GMP redúctase é activada pela diguanosina tetrafosfato (Gp_4G) e pelo GTP com constantes de activação da ordem de nanomolar e micromolar, respectivamente. Por sua vez, a xantosina monofosfato (XMP) é um inibidor muito potente da redúctase com uma constante de inibição de cerca de 10 nM. A actividade da enzima *in vivo* depende da concentração intracelular de XMP e de Gp_4G (ou GTP). A AMP desamínase é activada pelo ATP e pela diadenosina tetrafosfato (Ap_4A), com constantes de activação da ordem de milimolar e micromolar, respectivamente. Observe-se que, tanto o Gp_4G como o Ap_4A são activadores mais potentes da GMP redúctase e da AMP desamínase que os correspondentes nucleósidos trifosfatos, GTP e ATP, respectivamente. A GMP redúctase e a AMP desamínase ocupam posições chave no metabolismo dos nucleótidos purínicos, dado que são as enzimas que catalisam a transformação de GMP e de AMP em IMP e, portanto, a interconversão dos nucleótidos da adenina e da guanina. Neste sentido, o excesso de GTP (e/ou de Gp_4G) actuaria como sinal para transformar a base guanina em adenina, e inversamente, o excesso de ATP (e/ou de Ap_4A) poderia ser um sinal positivo para transformar a base adenina em guanina.

A diadenosina tetrafosfato e o ATP são também activadores da 5'-nucleotídase citosólica que degrada preferentemente o IMP, o GMP e o XMP aos correspondentes nucleósidos.

Apesar de a síntese do anel purínico resultar metabolicamente custosa (requer pelo menos a hidrólise de cinco moles de ATP por mole de IMP sintetizado), os organismos não recuperam todas as bases que sintetizam, e degradam parte delas, de maneira diferente segundo as espécies. Os humanos eliminam-as como ácido úrico, que se forma por acção da xantina oxídase (EC 1.1.3.25). Trata-se de uma flavoproteína que catalisa a oxidação da hipoxantina em xantina e a oxidação da xantina em ácido úrico.

A possibilidade do ácido úrico (ou xantina) poder constituir o produto final do metabolismo purínico no cérebro é real, embora questionável pela falta de consenso em relação aos níveis de actividade da xantina oxídase neste orgão. Na realidade, embora alguns estudos evidenciam directamente a presença desta enzima em níveis variados (Betz, 1985; Mueller e col.,

1985; Wajner e Harkness, 1989; Moriwaki e col., 1993) ou indirectamente através do seu produto ácido úrico (Kanemitsu e col., 1988), outros, simplesmente, não descrevem a existência dessa actividade no tecido cerebral (Schultz e Lowenstein, 1976; Brosh e col., 1990; Sarnesto e col., 1996).

Para além destas, outras enzimas podem participar tanto na recuperação como na eliminação de bases. Estas enzimas são a adenosina desamínase (EC 3.5.4.4) (catalisa a degradação da adenosina em inosina), a guanina desamínase (EC 3.5.4.3) (catalisa a conversão da guanina em xantina) e a adenina desamínase (EC 3.5.4.2) (catalisa a conversão de adenina em hipoxantina).

No rato adulto a produção e o fornecimento de compostos purínicos no cérebro parece estar mais dependente da via de recuperação das purinas, uma vez que este orgão possui uma capacidade limitada de síntese *de novo* de purinas. Estes dados são corroborados pelos resultados de Allsop e Watts (1983), que observaram uma mudança brusca de produção dos compostos purínicos a partir da via de síntese *de novo* para a via de recuperação, quando o rato atingia o estado adulto.

Recentemente, porém, Chagoya de Sánchez e col. (1993) observaram, no cortex de rato, um aumento e uma diminuição significativas da produção de nucleótidos de adenina durante a noite e o dia, respectivamente. Com base nos resultados obtidos sugeriram que o suplemento dos compostos purínicos poderia ser efectuado pela via de síntese *de novo* e pela via de recuperação durante a noite e o dia, respectivamente, dando novamente um impulso na importância daquela via de síntese nos processos anabólicos celulares de purinas.

1.2. Actividades 5'-nucleotidásicas

Existem três grandes grupos de actividades 5'-nucleotidásicas responsáveis pela hidrólise irreversível dos nucleósidos 5'-monofosfato aos correspondentes nucleósidos e a fósforo inorgânico (P_i), isto é, responsáveis pela etapa limitante do catabolismo dos nucleóticos: (i) a ecto-5'-nucleotídase; (ii) as enzimas 5'-nucleotídase solúveis; e, (iii) fosfátases inespecíficas.

Os dois primeiros grupos de actividades caracterizam-se por uma maior especificidade para esses substratos, merecendo por isso uma abordagem sucinta e diferencial.

1.2.a. Ecto-5'-nucleotídase

A ecto-5'-nucleotídase (E.C. 3.1.3.5.), é uma enzima membranar responsável pela hidrólise de nucleósidos 5'-monofosfatos extracelulares e, menos efectivamente, dos seus deoxi-derivados. O seu local activo encontra-se voltado para o exterior da célula (Newby e col., 1975; Baron e col., 1986), não exercendo, em consequência, qualquer efeito sobre os nucleósidos monofosfatos intracelulares. A enzima pode ser, no entanto, encontrada intracelularmente integrada nas membranas vesiculares (Stanley e col., 1980).

Através da clonagem e sequenciação de cDNA, codificante da ecto 5'-nucleotídase de placenta humana (Misumi e col., 1990b), de fígado de rato (Misumi e col., 1990a) e de cérebro de raia electrica (Volknandt e col., 1991), foi possível deduzir a estrutura primária desta enzima.

Estes distintos cDNA codificam proteínas (pró-enzimas) com um número de aminoácidos ligeiramente diferente entre si, 576, 574 e 577, respectivamente, para a placenta humana, o fígado de rato e a raia eléctrica. Posteriormente, estas pró-enzimas são processadas, em duas fases, até ao correspondente estado de maduras:

(i) Na primeira originam-se, nos três casos, proteínas com um número de aminoácidos idênticos (548), caracterizadas por possuirem nas suas extremidades -COOH, uma sequência de aminoácidos sem carga e hidrofóbicos.

(ii) Na segunda fase, pós-tradução e comum aos três casos, ocorre a eliminação, por ruptura proteolítica, deste domínio hidrofóbico, dando origem a uma proteína de 523 aminoácidos. A enzima madura é constituída por esta sequência de aminoácidos, ao último dos quais (resíduo de serina) se liga o grupo glicosil-fosfatidilinositol (GPI), que funciona como ancora de ligação à membrana.

O GPI (*Fig. 2*) é constituído por uma molécula de fosfatidilinositol, integrada na membrana através da sua porção 1,2-diacilglicerol e ligada a um resíduo de glucosamina, mediante uma ligação glicosídica, através da sua porção inositol. Esta molécula de glucosamina encontra-se ligada, por sua vez, ao core sacarídeo (glicano) constituído por três moléculas de manose. Ao hidroxílo em posição C6 do último resíduo destas moléculas de manose, liga-se, através de uma ligação fosfodiester, uma molécula de etanolamina, a qual se encontra unida à parte proteica da enzima, mediante uma ligação amida com o grupo α-carboxílico do seu aminoácido

terminal Ser-523. Possui ainda outra molécula de etanolamina ligada, igualmente através de uma ligação fosfodiester, a um outro resíduo de manose do core sacarídeo. As 2 moléculas de ácidos gordos, constituintes do fosfatidilinositol, podem ser o palmítico, o esteárico ou o mirístico (Ogata e col., 1990; Thomas e col., 1990; Zimmermann, 1992 e referências nele contido).

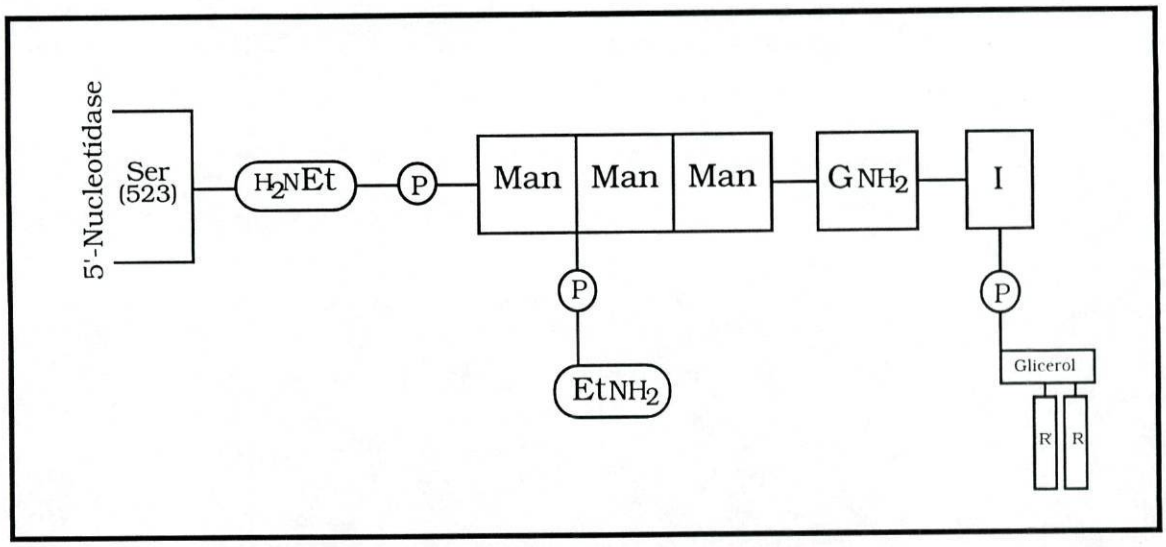


Fig. 2. Representação esquemática da estrutura da molécula de glicosil-fosfatidilinositol (GPI).

($EtNH_2$, etanolamina; GNH_2, glucosamina; I, inositol; Man, manose; P, fosfato; R e R', ácidos gordos; Ser, serina)

A enzima possui 4 (placenta humana e raia eléctrica) ou 5 (fígado de rato) locais potenciais de ligações N-glicosídicas, as quais podem contribuir e justificar os diferentes valores de massa molecular obtidos entre as diferentes espécies (71, 62 e 73 kDa, respectivamente) (Misumi, 1990a,b; Volknandt e col., 1991).

A sequenciação de aminoácidos mostrou a existência de uma homologia de 61% entre a enzima purificada da raia eléctrica e as enzimas do fígado de rato e da placenta humana (Volknandt e col., 1991), sendo esses valores superiores (90%) quando se comparam estre si as duas últimas (Misumi e col., 1990b). Volknandt e col. (1991), demonstraram que

iões P_i, quando em condições fisiológicas, não são inibidores. Ao contrário das enzimas de origem citoplasmática não necessita do ião Mg^{2+} para exercer o seu efeito catalítico, se bem que, a actividade aumenta com concentrações milimolares destes catiões (Zimmermann, 1992). No entanto, é uma enzima que possui ou é dependente dos iões zinco (Fini e col., 1990; Meftah e col., 1991), podendo mesmo ser utilizada como indicador da deficiência deste metal no homem (Meftah e col., 1991). A zona de pH correspondente à máxima actividade enzimática situa-se entre 7,5 e 9,0 (Cammer e col., 1980).

1.2.b. 5'-Nucleotídases solúveis

Na designação geral de enzimas 5'-nucleotídase solúveis (com a mesma classificação na "Enzyme Comission" que a ectoenzima) podem ser englobadas duas actividades enzimáticas perfeitamente diferenciáveis entre si, quanto às suas propriedades e de acordo com os respectivos valores de K_m para o AMP, designadas por (i) baixa afinidade (Alto-K_m), compreendendo a IMP/GMP e a AMP específica e (ii) alta afinidade (Baixo-K_m).

1.2.b.1. 5'-Nucleotídase de baixa afinidade (Alto-K_m)

IMP/GMP específica

Em 1967, Itoh e col. descreveram pela primeira vez a existência de uma 5'-nucleotídase obtida a partir da fracção citosólica do fígado da galinha e diferente de todas as outras anteriormente descritas. Esta enzima apresenta como característica fundamental o facto de ter como substratos preferenciais os nucleósidos monofosfatos com um grupo oxo ou ceto em posição 6 do núcleo purínico, isto é, o IMP, GMP e respectivos deoxiderivados, não exercendo praticamente qualquer acção sobre o AMP quando presente em concentrações fisiológicas.

Na sequência destes primeiros estudos, cedo se verificou que esta enzima não era específica de determinado tecido (fígado de galinha), encontrando-se disseminada por praticamente todos os outros orgãos e tecidos dos vertebrados e em variadas concentrações. Deste modo, a enzima pode ser encontrada no fígado de galinha (Itoh e col.,1967), de rato

(Fritzson, 1969; Itoh, 1981) e de porco (Itoh e Yamada, 1991); no coração de galinha (Itoh e Oka, 1985), de rato (Itoh e col., 1986; Truong e col., 1988; Skladanowski e col., 1989) e de porco (Itoh e Yamada, 1991); no pulmão de porco, (Itoh e Yamada, 1990) e de rato (Itoh e Yamada, 1991); nos rins do rato (Le Hir, 1991; Itoh e Yamada, 1991) e de porco (Itoh e Yamada, 1991); na placenta humana (Spychala e col., 1988; Oka e col. 1994); em células tumorais do colon humano (Tozzi e col., 1991), em linfócitos e linfoblastos (Carson e Wasson, 1982; Bontemps e col., 1989a; Madrid-Marina 1990); em leucócitos polimorfonucleares do rato (Worku e Newby, 1983) e eritrócitos humanos (Bontemps e col., 1986,1988), e na tiróide (Niedzwiecka e Jaroszewicz, 1996).

Em 1986 foi pela primeira vez descrita a presença da enzima em animais invertebrados (Pinto e col., 1986), tendo sido purificada, com um bom rendimento, a partir dos embriões da *Artemia* (Pinto e col., 1987). Mais recentemente, Itoh (1994) descreveu a sua presença em leveduras (*Sacaromyces cerevisiae*), o que demonstra assim a sua ubiquidade.

No entanto, a actividade da enzima, não é igual em todos os tecidos, sendo mais elevada naqueles com alta taxa de síntese ou "turnover" de ácidos nucleicos e de seus precursores (testículos, baço, linfoblastos) do que naqueles com uma população celular mais ou menos fixa (cérebro, coração, musculo esquelético, eritrócitos) (Carson e col., 1991; Itoh e Yamada, 1991; Itoh e col., 1992).

Na sua forma nativa, e de acordo com a sua origem e métodos de determinação, a enzima possui um valor de massa molecular que varia entre os 205 (Naito e Tsushima, 1976) e os 265 kDa (Itoh e Yamada, 1990). Porém, o valor da massa molecular para a enzima proveniente da *Artemia* é de 165 kDa (Pinto e col., 1987). É uma enzima tetramérica, cujas subunidades possuem valores de massa molécular compreendidos entre 51 (Naito e Tsushima, 1976) e 70 kDa (Oka e col., 1988). As sub-unidades da enzima proveniente da *Artemia* possuem um valor de massa molecular aparente de 42 kDa (Pinto e col. 1987).

Clones de cDNA, codificantes da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica, foram isolados a partir de bibliotecas de cDNA de fígado de galinha e de placenta humana (Oka e col., 1994). No primeiro caso (fígado de galinha), encontraram-se dois cDNA distintos, correspondentes a 2 genes diferentes, codificantes de duas sequências de aminoácidos, A e B, com uma identidade de 79% nos 472 resíduos internos, não apresentando homologia nas suas extremidades. No segundo caso (placenta humana), o cDNA codificava uma sequência de 561 aminoácidos, com uma identidade de 95

% com a sequência B do fígado de galinha, correspondendo a um valor de massa molecular de 64.966 Da.

É uma enzima alostérica com uma cinética hiperbólica, ou ligeiramente sigmoidal com os derivados oxo em posição 6 do anel purínico e sigmoidal com o AMP. Os valores de K_m para o IMP e o AMP são de aproximadamente 0,3 e de 5 mM, respectivamente (Itoh e col., 1993 e ref. nele contido). É estimulada pelo ATP, GTP e ADP em concentrações habituais na célula (Van den Berghe e col., 1977; Itoh e col., 1978). Pinto e col. (1986) descreveram o efeito estimulador do Ap_4A sobre a enzima, com valores de K_a com uma ordem de grandeza duas vezes inferior às dos nucleósidos di e trifosfatos referidos. Mais tarde, este efeito, bem como de Ap_3A e Ap_5A, foi comprovado em enzimas de outras origens (Itoh e Yamada, 1990; Itoh, 1994). O 2,3-DPG comporta-se igualmente como um bom activador da enzima (Bontemps e col., 1988, 1989a,b). A acção destes activadores sobre a actividade da enzima traduz-se na diminuição dos seus valores de K_m para o substrato. Mais ainda, a sua presença transforma cinéticas do tipo sigmoidal em cinéticas hiperbólicas, como ocorre no caso do AMP como substrato.

É uma actividade inibida competitivamente pela presença em concentrações fisiológicas dos iões P_i (1 a 4 mM) (Van den Berghe e col., 1977; Itoh, 1981; Itoh e col., 1978; Spychala e col, 1988), apresentando um valor de I_{50} de 1,5 mM, na presença de 0,5 mM de IMP como substrato (Itoh, 1993). Tem ainda como característica fundamental, a necessidade da presença de Mg^{2+} para actuar, sendo inactiva na ausência desse catião divalente (Itoh e col., 1967; Fritzson, 1969; Carson e Wasson, 1982). A zona de pH correspondente à capacidade máxima, *in vitro*, de actuação da enzima situa-se entre 6,3 e 7,0, com um valor de pH óptimo de 6,5 (Itoh e col., 1967; Fritzson, 1969; Tjernshaugen e Fritzson, 1984; Van den Berghe e col., 1977; Spychala e col. 1988).

AMP específica

Esta actividade 5'-monofosfatásica designada por AMP-específica, descrita em 1987 pelo grupo de Lowenstein (Truong e col, 1988), caracteriza-se, essencialmente, por utilizar preferencialmente o AMP sobre o IMP como substrato.

A sua distribuição tecidual, até ao momento, parece confinar-se apenas ao tecido cardíaco, tendo sido descrita no coelho (Yamazaki e col. 1989, 1991), no rato (Newby, 1988; Truong e col., 1988), no pombo (Newby,

1988, Skladanowski e Newby, 1990), no cão (Darvish e Metting, 1993; Darvish e col., 1993) e no homem (Skladanowski e col., 1996).

A massa molecular da enzima nativa é de cerca de 150-166 kDa, sendo constituida por 4 subunidades de 40-43 kDa (Skladanowski e Newby, 1990; Yamazaki e col., 1991; Darvish e Metting, 1993).

Utilizando o AMP como substrato, a enzima possui uma cinética de saturação do tipo sigmoidal que se transforma em hiperbólica na presença de activadores. A enzima é estimulada pelo ADP, a concentrações fisiológicas de AMP, bem como por todos os nucleósidos difosfato, particularmente a timidina 5'-difosfato (TDP) e o tioderivado do ADP, a adenosina 5'-O(2-tiodifosfato) (AMPSP). Difere da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica por ser inibida pelo ATP quando em condições fisiológicas. A inibição pelo P_i (inferior a 10% com 5 mM de P_i) é significativamente menor que a que ocorre com a 5'-nucleotídase IMP/GMP específica. É inibida pelos derivados 5'-deoxi-5'-isobutiltio da inosina e da adenosina, embora neste último caso em menor grau que a 5'-nucleotídase IMP/GMP específica. A actividade da enzima é ligeiramente influenciada pelo α,β-metilenoadenosina-5'-difosfato (AMP-CP), ao contrário do que ocorre com a ecto-5'-nucleotídase, não sendo significativo o efeito do Ap_4A sobre ela.

Quer na presença quer na ausência de activador a enzima é dependente dos iões Mg^{2+}, sendo porém inibida por estes quando em concentrações elevadas. A zona óptima de pH correspondente à sua máxima actividade situa-se em valores cerca da neutralidade ou ligeiramente alcalinos (6,5 a 7,8) (Newby, 1988; Truong e col., 1988; Yamazaki e col., 1989, 1991; Skladanowski e Newby, 1990; Skladanowski e col, 1991; Darvish e Metting, 1993).

1.2.b.2. 5'-Nucleotídases de alta afinidade

Este grupo de actividades 5'-nucleotidásicas foi primeiramente descrito por Ipata (1968) no cérebro de carneiro.

Desde então, a presença deste tipo de actividade enzimática foi descrita no cérebro de boi (Montero e Fes, 1982; Mallol e Bozal, 1983), de rato (Orford e col., 1991), no rim (Le Hir e Dubach, 1988; Piec e Le Hir, 1991), no fígado de rato (Fritzson e col., 1986) e de boi (Madrid-Marina e Fox 1986), no coração do cobaio (Schütz e col., 1981), na placenta humana (Madrid-Marina e Fox, 1986; Klemens e col., 1990),

A massa molecular da enzima na sua forma nativa varia entre 120 e 150 kDa. É uma enzima dimérica cujo valor de massa molecular das suas sub-unidades está compreendido entre 70 e 74 kDa, determinado por electroforese em poliacrilamida, na presença de SDS (Montero e Fes, 1982; Madrid-Marina e Fox, 1986; Klemens e col., 1990) ou entre 60 e 62 kDa (Volknandt e col., 1991; Vogel e col., 1992) e um pouco inferior, 54 kDa (Orford e Saggerson, 1996) por técnicas de "immunoblotting", isto é, similar aos valores correspondentes para a ecto-nucleotídase. No entanto, considerando a massa molecular das suas subunidades, no fígado e no rim do rato esta enzima parece existir igualmente na forma tetramérica, uma vez que, o valor de massa molecular da sua forma nativa, determinado na presença de Triton X-100 e por filtração por gel, está compreendido entre 280 e 310 kDa (Fritzson e col., 1986; Piec e Le Hir, 1991).

A enzima tem como substratos preferenciais AMP, CMP e UMP, apresentando valores de K_m para estes substratos da ordem de μM. São inibidas quer pelo ATP quer pelo ADP (este em maior grau) em concentrações da ordem dos μM, à semelhança da ecto-5'-nucleotídase. Do mesmo modo, o comportamento inibitório não competitivo dos iões P_i, apenas se verifica para altos valores de concentração (não fisiológicos). São inibidas pelas metilxantinas e pelo EDTA. Ao contrário das 5'-nucleotídases solúveis anteriormente descritas, a enzima não depende dos iões Mg^{2+} para actuar, possuindo uma zona de pH óptimo para esta actividade situada em zonas alcalinas, compreendida entre 7,4 e 9,0 (Montero e Fes, 1982; Fredholm e Lindgren, 1983; Mallol e Bozal, 1983; Madrid-Marina e Fox, 1986; Spychala e col., 1988; Spychala e col., 1989; Orford e col., 1991).

1.2.b.3. Origem das 5'-nucleotídases solúveis

Enquanto que as actividades 5'-nucleotidásicas IMP/GMP específica e AMP-específica, parecem ter uma origem citoplasmática, as actividades enzimáticas de baixo K_m (1.2.b.2) parecem ser resultantes da solubilização da enzima membranar. São variadas as evidências que sugerem e comprovam a natureza estrictamente citoplasmática das duas primeira enzimas.

Fritzson (1969) estabeleceu, pela primeira vez a origem citoplasmática da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica, baseado em que, durante o processo de homogeneização a enzima aparecia rapidamente na fracção

não sedimentável, apresentando propriedades diferentes das de origem membranar e não se terem verificado rupturas significativas dos lisossomas, durante todo esse processo.

Newby (1980) ao comparar a acção de diferentes enzimas intervenientes no metabolismo do AMP induzido por cianeto em leucócitos de rato, demonstraram a impossibilidade da ecto 5'-nucleotídase e da adenosina desamínase, poderem intervir na degradação intracelular desse nucleótido. Nesse mesmo trabalho e em conclusão, sugeriram a hipótese do AMP ser degradado preferencialmente via IMP em vez de originar adenosina, justificando o aumento de hipoxantina verificado, pela presença de uma IMP-ase intracelular. Em trabalhos posteriores (Newby e Holmquist, 1981; Worku e Newby, 1983), estudaram a produção intracelular de adenosina a partir do catabolismo de ATP induzido pela 2-deoxiglucose e inibindo as enzimas intervenientes no metabolismo da adenosina (adenosina desamínase e adenosina cínase). Os resultados obtidos corroboraram a hipótese anterior, ao se verificar, nessas condições, um aumento significativo da produção de inosina e hipoxantina, sem que na sua produção interviesse a ecto 5'-nucleotídase nem fosfatases inespecíficas. Do mesmo modo, concluiram que a produção de adenosina observada não dependia igualmente, de qualquer uma dessas mesmas enzimas.

Num outro tipo de estudos, efectuados em tecido cardíaco, utilizando inibidores dos transportadores de adenosina e da ecto 5'-nucleotídase, verificou-se um aumento da produção de adenosina, como resultado da degradação de ATP intracelular. Esta observação era compatível com a existência de uma enzima 5'-nucleotídase intracelular responsável pela hidrólise do AMP formado (Schütz e col., 1981; Meghji e col., 1985, 1988a,b). Conclusões semelhantes foram obtidas por Meghji e col. (1988a) ao compararem a produção de adenosina nos tecidos cardíaco do rato e do pombo durante isquémia.

A localização exclusiva na matrix citoplasmática, da enzima 5'-nucleotídase IMP/GMP específica foi observada por Oka e col. (1989), mediante a utilização de técnicas imunocitoquímicas. Mais recentemente, aplicando técnicas imunohistológicas e usando anticorpos policlonais marcados com ouro anti-5'-nucleotídase AMP específica do coração do cão, esta enzima foi localizada apenas nas fracções citoplasmáticas dos eritrócitos, dos miócitos cardíacos e das células endoteliais (Darvish e col. 1993). Estes anticorpos ao não reagirem com as enzimas membranares ou

intersticiais corroboram a presença exclusivamente citoplasmáticas destas enzimas.

Em relação à enzima 5'-nucleotídase de alta afinidade verifica-se grande semelhança com a ecto-enzima, quer do ponto de vista constituítivo quer do ponto de vista comportamental. Como exemplo é de realçar que ambas as enzimas possuem em comum:

(i) O inositol em porporções aproximadas na sua constituição, o que é típico em proteínas contendo o grupo glicosil-fosfatidilinositol de ligação à membrana. A presença do fosfatidilinositol pode ser comprovado, pela diminuição da hidrofobicidade, com o concomitante aumento a sua solubilidade, após tratamento da enzima ou da membrana com fosfolípase C especifica (Grondal e Zimmerman, 1987; Stochaj e col., 1989; Klemens e col., 1990; Bailyes e col., 1990; Thompson, 1991)

(ii) Um valor de massa molecular quer da sua forma nativa quer das suas subunidades idêntico à da enzima membranar (Klemens e col., 1990; Piec e Le Hir, 1991; Vogel e col., 1992).

(iii) O facto de se ligarem covalentemente com a concanavalina A e serem eluídas com a metil-α-D-manopiranose (Thompson e col., 1987; Stochaj e col., 1989; Klemens e col. 1990; Piec e Le Hir, 1991; Vogel e col., 1992).

(iv) Serem inibidas (reconhecida) pelo anti-soro anti-ecto-5'-nucleotídase (Thompson e col., 1987; Zekri e col., 1988; Stochaj e col, 1989; Piec e Le Hir, 1991; Vogel e col., 1992).

(v) Poderem ser reconhecidas por anticorpos específicos para o inositol 1,2-ciclomonofosfato, formas solúveis resultantes da acção da fosfolipase C sobre a porção glicosil-fosfatidilinositol (Hooper e col, 1991; Vogel e col., 1992).

(vi) Possui, a 5'-nucleotídase solúvel, pelo menos na raia eléctrica (*Torpedo marmorata*), um epítope carbohidratado - HNK-1 - comum ao da ecto-5'-nucleotídase (Vogel e col.,1991).

Estas características, associadas ainda com o facto de serem ambas inibidas pelo AMP-CP sugerem uma origem não citoplasmática mas sim uma proveniência da enzima membranar. Deste modo, a presença desta enzima na fracção solúvel poderá ser atribuída à acção de fosfolípases sobre a enzima membranar provocando a libertação ou a sua parcial solubilização da membrana durante os processos de purificação enzimática ou *in vivo*.

Esta hipótese, é ainda reforçada pelo facto de a presença de fosfolípases C, e D endógenas, capazes de hidrolisar especificamente

distintas proteinas ligadas à membrana pela fracção glicosil-fosfatidilinositol, terem sido descritas no fígado, nas membranas do músculo esquelético e no plasma sanguíneo [Fox e col., 1987; Low e Prasad, 1988; Maguire e Gossner, 1995].

1.2.c. Funções da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica

1.2.c.1. Actividade fosfotransferásica

Como foi referido anteriormente a enzima 5'-nucleotídase citosólica IMP/GMP específica está fortemente implicada nos processos catabólicos do metabolismo celular, contribuindo para a degradação dos nucleótidos purínicos intracelularmente.

O seu modo de actuação, nestes processos, é caracterizado pela capacidade que possui em catalisar a hidrólise irreversível dos nucleósidos monofosfato dando origem aos seus respectivos nucleósidos e a P_i, com particular incidência nos casos de degradação do IMP e do GMP e seus respectivos deoxiderivados.

Ultimamente, porém, esta enzima tem sido alvo de novos interesses relacionados com uma outra função a ela atribuída. Esta função é caracterizada pela capacidade adicional de catalisar a transferência do grupo P_i dos nucleósidos monofosfatos para outras moléculas capazes de o aceitarem, isto é, actividade fosfotransferásica. Por conseguinte, o papel interventivo desta enzima no metabolismo parece, não se confinar apenas aos processos catabólicos, mas estender-se do mesmo modo aos processos anabólicos celulares, isto é, aos processos biossintéticos de alguns compostos com acção fisiológica ou mesmo terapêutica.

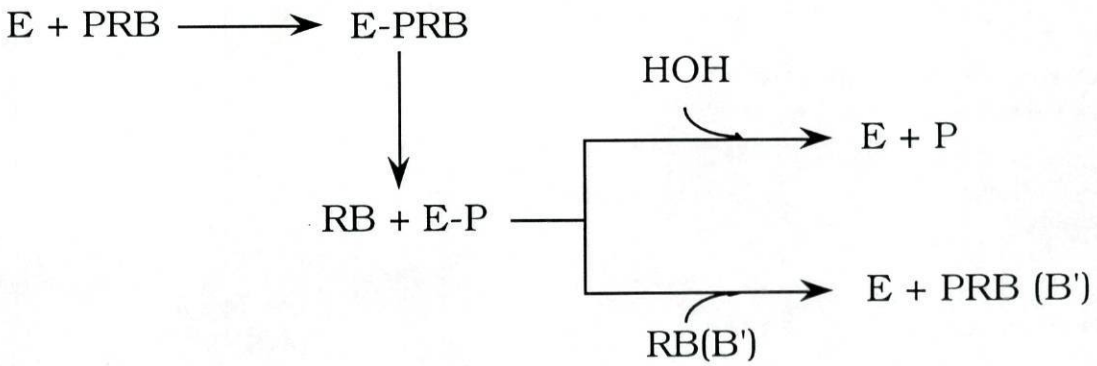
Esta intervenção no anabolismo celular é apoiada pelo facto de a actividade enzimática se encontrar elevada (i) no carcinoma do colon humano (Tozzi e col., 1991), (ii) na regeneração hepática, onde se verifica elevada replicação de DNA (Tjernshaugen e Fritzson, 1984; Itoh e col., 1992) e (iii) nas células e orgãos de elevada taxa de multiplicação e/ou "turnover" de ácidos nucleicos, como o baço ou os testiculos (Itoh e Yamada, 1991).

Embora, não esteja completamente esclarecido até que ponto esta enzima possa actuar anabólicamente, os seguintes conhecimentos podem ajudar a compreender esta função.

Se atendermos ao esquema da reacção proposto para explicar a acção da enzima (Worku e Newby, 1982; Baiocchi e col., 1996) (*Fig. 3*), pode

verificar-se que, à semelhança do que sucede em reacções catalisadas por outras fosfomonoesterases (Müller e col., 1991; Guan e Dixon, 1991; Cirri e col., 1993), ocorre primeiramente a formação de um composto intermediário. Este é constituído pela própria enzima e pelo substrato sobre o qual é actuante (E-PRB), através da formação de uma ligação de hidrogénio entre um -OH da ribose e o grupo -SH de um resíduo de serina, do local activo: complexo de Michaelis. Uma vez formado este complexo ocorre a ruptura ácida do seu resíduo nucleósido (RB) e o estabelecimento de uma ligação entre o resíduo de fosfato e uma molécula de histidina do local activo, dando origem a um complexo enzima-fosfato (E-P). A regeneração da enzima, ocorre numa etapa posterior, em que este complexo E-P cede o seu grupo fosfato à água ou a um outro substrato aceitador, nucleósido ou análogo de nucleósido

Deste modo, a enzima pode actuar como catalisador quer de reacções de hidrólise - actividade nucleotidásica - quer de reacções de transferência de grupos fosfato - actividade fosfotransferásica, segundo,



representando, E, a enzima, PRB, um nucleósido 5'-monofosfato; RB, nucleósido, B e B', bases e P, fosfato.

Worku e Newby, em 1982, descreveram, pela primeira vez, a possibilidade da transferência de um grupo P_i do IMP para a inosina, na tentativa de justificar a inibição enzimática (determinada pela quantidade de P_i livre formado) causada por este nucleósido na reacção catalisada pela 5'-nucleotídase. Nesse estudo, observaram ainda, que usando 3 mM de IMP como substrato, uma concentração de 3 mM de guanosina podia exercer, igualmente, um efeito inibidor sobre a enzima (8%), inferior à provocada por 3 mM de inosina (32%).

Nas mesmas condições de IMP, a adenosina, a citosina, a timidina e a uridina exercem efeitos inibidores residuais (inferiores a 0,2%). Estes efeitos inibitórios da inosina e guanosina sobre a enzima, podiam ser

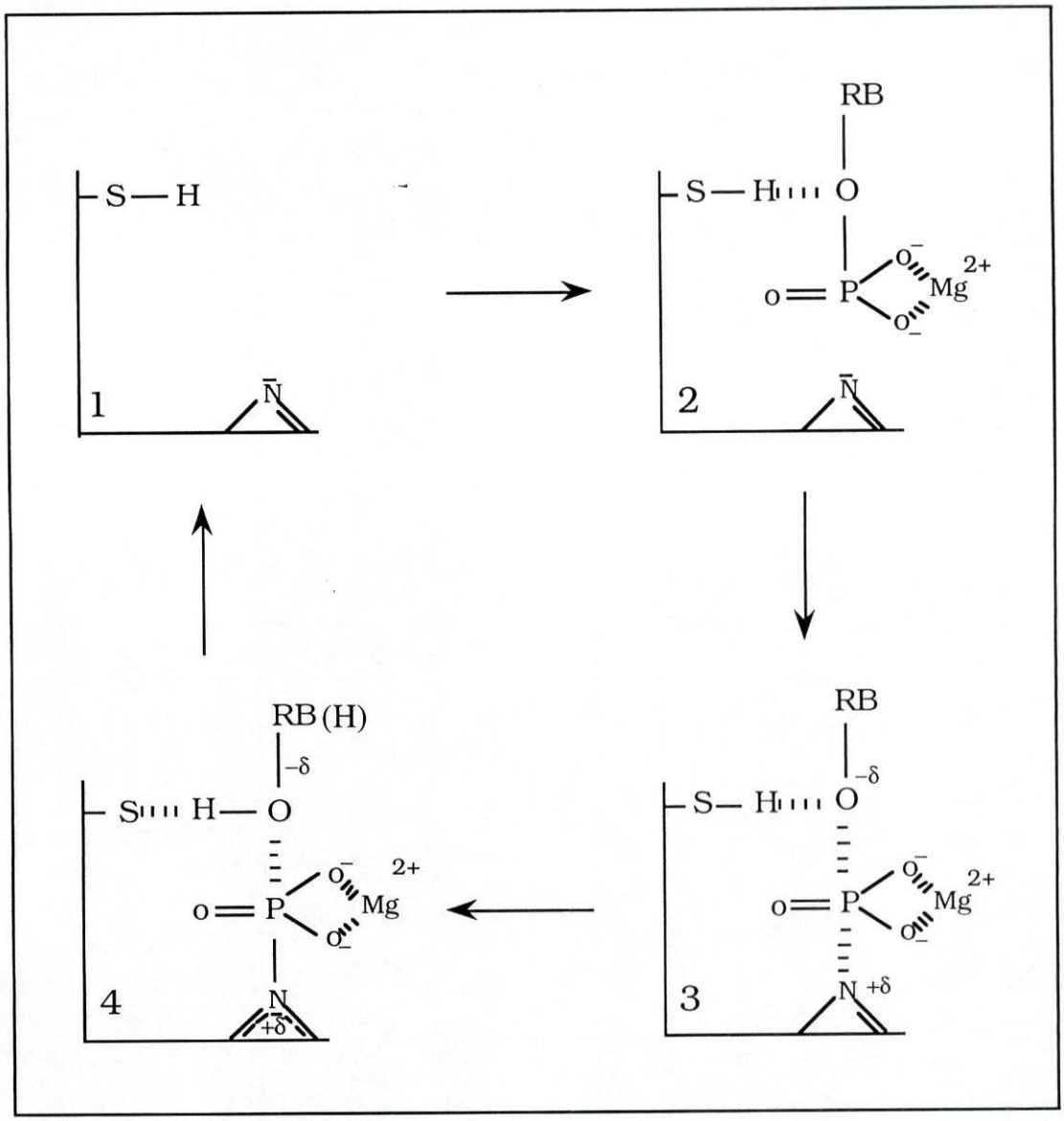


Fig. 3. Hipótese de mecanismo de acção da enzima 5'-nucleotídase IMP/GMP específica (adaptado de Worku e col., 1984).

1. Enzima livre; 2. Formação do complexo nucleósido 5'-monofosfato (PRB) com a enzima, com intervenção do resíduo de serina (-S-H); 3. Hidrólise ácida da ligação fosfato-nucleósido com simultânea ligação com a histidina, através de um N do seu núcleo imidazólico; 4. Ruptura do grupo fosfato da enzima fosforilada e concomitante cedência à água ou a um nucleósido com a consequente regeneração da enzima.

explicados pela capacidade destes produtos de reacção actuarem como substratos receptores do grupo fosfato, resultante da conversão do IMP inicial em inosina, dando origem, novamente, a IMP.

Este tipo de reacção fosfotransferásica tem a particularidade de ser muito selectiva em relação aos compostos que poderão actuar como substratos aceitadores de fosfato. Assim, verifica-se que depois da inosina, o seu derivado deoxi é aquele que melhor capacidade receptora possui, apresentando ambos valores de K_m semelhantes de cerca de 0,8 mM. A guanosina e o seu deoxiderivado possuem uma capacidade receptora de fosfato inferior à da inosina e seu deoxiderivado. Outros nucleósidos, como a adenosina e respectivos deoxiderivados, praticamente não actuam como substratos receptores de grupos fosfato. Além do IMP, GMP e seus derivados deoxi, outros nucleósidos 5'-monofosfatos, como o AMP, o CMP e respectivos derivados deoxi e o UMP, possuem todos baixa capacidade de actuar como substratos de grupos fosfato. Do mesmo modo, os nucleósidos 3'-monofosfatos, como o 3'-IMP e o 3'-GMP, praticamente não têm capacidade de actuar como substrato nestas reacções (Keller e col., 1985; Tozzi e col., 1991; Pesi e col., 1994; Turriani e col., 1994).

Os nucleósidos e análogos de nucleósidos purínicos, utilizados como antivirais, possuem a capacidade de actuarem como substratos receptores de grupos fosfato da enzima, como a tiazofurina, o aciclovir (ACV) (Keller e col., 1985; Fridland e col.,1986), o ddIno, a ddGuo, o carbovir (Johnson e Fridland, 1989; Miller e col.,1992), o ganciclovir (GCV) (Agbaria e col., 1994) e a 8-azaguanosina (Tozzi e col., 1989; Turriani e col., 1994). Esta capacidade de actuar como substratos aceitadores de fosfato é, apesar de tudo, muito baixa. Comparando as diferentes taxas de fosforilação entre a inosina, o substrato aceitador natural de fosfato para este tipo de reacções, e alguns derivados ou análogos de nucleósidos (ddIno, ddGuo e carbovir), Johnson e Fridland (1989) verificaram que os valores correspondentes a estes últimos compostos não ultrapassavam os 2% (respectivamente, 2,0, 1,3 e 1,0) da taxa de fosforilação da inosina. Valores semelhantes nas taxas de fosforilação ocorrem com os derivados análogos da guanosina, o aciclovir e o ganciclovir (Agbaria e col., 1994). Embora pequenas, parece que estas quantidades de nucleósido monofosfato formadas, são suficientes para, uma vez convertidos na sua forma 5'-trifosfatada (via nucleótido cínases), exercerem os seus efeitos antimetabólicos ou inibidores nas células (Johnson e Fridland, 1989).

A utilização de inibidores da IMP desidrogénase (enzima q, *Fig. 1*) pode, de uma maneira indirecta, favorecer a actividade fosfotransferásica

da enzima, uma vez que é o melhor substrato dador de grupos fosfato. De facto, ao impedirem a conversão do IMP em XMP e GMP, estes compostos provocam um aumento da concentração de IMP intracelularmente.

Este dado é corroborado pelo facto de a tiazofurina, a ribavirina e o ácido micofenólico (inibidores da IMP desidrogénase) provocarem um aumento da fosforilação da ddIno (Balzarini e col., 1991; Johns e col., 1993) e da formação dos derivados mono, di e tri fosfatos do ganciclovir em células MOLT-4 (Agbaria e col., 1994). Por outro lado, ocorre um significativo aumento (superior a 20 vezes) da conversão da 2',3'-dideoxiguanosina em 2',3'-dideoxi-GDP (Ahluwalia e col., 1990), aumentando, em consequência, a efectividade terapêutica destes compostos.

Que importância tem a fosforilação de nucleósidos e análogos de nucleósidos purínicos?

Os nucleósidos e análogos de nucleósidos purínicos (ddN), apenas apresentam interesse, sob o ponto de vista terapêutico, se forem transformados nos seus correspondentes derivados di- (ddNDP) e trifosfatos (ddNTP), mediante a acção das nucleósido monofosfato e difosfato cínases celulares (Miller e Miller, 1980; Yarchoan e col., 1989; Miller e col., 1992). É sob a forma de derivado trifosfato, forma activa dos ddN, que estes compostos, mediante a inibição da transcriptase reversa dos retrovirus (Connolly e Hammer, 1992; Orr e col., 1992; White e col., 1993) e da DNA polimerase γ e em menor grau a DNA polimerase β e α, nos eucarióticos (Mitsuya e Broder, 1987; Mitsuya e col., 1987; Starnes e Cheng, 1987; Izuta e col., 1991), exercem as suas acções como antivirais e antimetabólicos.

Estas acções podem ser explicadas por dois mecanismos de actuação diferentes, que podem ocorrer de uma forma isolada e/ou simultaneamente: o primeiro é mediado pelo efeito competitivo destes compostos, com os NTP naturais para a ligação à enzima, e o segundo, pela sua integração na cadeia de DNA em formação, sendo responsáveis pelo fim do seu elongamento e, concomitantemente, da síntese de DNA (viral ou eucariótico).

A enzima 5'-nucleotídase, através da sua actividade fosfotransferásica, parece intervir de uma maneira significativa nestes processos de activação, particularmente, por ser a responsável pela primeira fosforilação dos compostos análogos de nucleósidos, convertendo-os nos respectivos derivados monofosfatos (Worku e Newby, 1982; Keller e col., 1985). Este papel da enzima é ainda reforçado pelo facto de ser a única enzima

intracelular, com a excepção da deoxiguanosina cínase mitocondrial (Wang e col., 1993), capaz de fosforilar análogos de inosina (Pesi e col., 1994).

1.2.c.2. Papel da 5'-nucleotídase na resistência a drogas

A 5'-nucleotídase comporta-se, fisiológicamente, como uma arma de dois gumes:

(i) por um lado, intervindo, anabolicamente, através da sua actividade fosfotransferásica, na primeira fosforilação de compostos análogos de nucleósidos - primeiro passo de um processo de activação destes compostos (pró-drogas);

(ii) por outro, através da sua actividade 5'-nucleotidásica, pode exercer um efeito contrário, sendo responsável, pelo menos parcialmente, pelos mecanismos de resistência a certas drogas, nomeadamente, as utilizadas na terapêutica em leucemias linfocíticas agudas (LLA) e de células em cabeleira ("Hair cells) (Pieters e col., 1987, 1992; Pieters e Veerman, 1988; Kawasaki e col., 1993).

A 6-mercaptopurina (6-MP) e a 6-tioguanina (6-TG), derivados da hipoxantina e da guanina respectivamente, são utilizados na terapêutica em crianças com leucemia linfocítica aguda (LLA). Para que estes compostos exerçam os seus efeitos citotóxicos e possam ser incorporados no DNA e/ou RNA, precisam de ser convertidos nos seus derivados fosfatos, mediante a actuação de enzimas celulares. No entanto, uma vez convertidas na sua forma de nucleósido monofosfato, estes compostos ficam por sua vez sujeitos à acção de enzimas celulares com acção fosfatásica, que podem reverter todo o processo, particularmente, através da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica.

O facto de se ter verificado uma menor probabilidade de remissão completa em crianças com LLA, cujas células possuiam níveis mais elevados de actividade 5'-nucleotidásica intracelular que naquelas com menores níveis (Pieters e col., 1987), parecia reforçar a ideia de uma possível responsabilidade da 5'-nucleotídase citosólica nessas acções desfosforilantes.

Posteriormente, Pieters e col. (1992), num outro estudo efectuado em crianças com LLA, concluiram que, certos casos de resistência ao tratamento com derivados 6-tiopurinas estavam relacionados com as altas actividades hidrolíticas da 5'-nucleotídase citosólica verificadas nas células desses doentes. Embora a acção hidrolítica da ecto-5'-nucleotídase sobre

estes compostos não possa ser totalmente descorada (Pieters e Veerman, 1988), nesse mesmo estudo, os resultados obtidos apontaram para a baixa correlação entre os níveis desta enzima, e a resistência das células a estas drogas. No seu conjunto, estes dados parecem corroborar o papel interventivo da enzima citosólica nestes processos, atribuíndo um papel secundário à enzima de origem membranar.

Igualmente, na resistência à terapia com a 2-clorodeoxiadenosina (2-CdA) em casos de leucemias de células em cabeleira e também em LLA refratárias (Kawasaki e col., 1993), a 5'-nucleotídase citosólica parece desempenhar um importante papel. Segundo estes estudos, o sucesso da terapia com esta droga dependerá da razão entre os níveis intracelulares da deoxicitidina cínase e da 5'-nucleotídase citosólica, responsáveis, respectivamente, pela primeira fosforilação da 2-CdA durante o processo de transformação na sua forma activa e pela hidrólise deste mesmo derivado monofosfato formado.

1.2.c.3. Papel dos efectores sobre ambos os processos

A partir dos dados obtidos na literatura pode-se concluir que diferentes compostos (nucleótidos, dinucleósidos polifosfatos,etc) que actuam como efectores da actividade nucleotidásica da 5'-nucleotídase citosólica IMP/GMP específica são capazes de se comportarem, de um modo semelhante, como efectores da actividade fosfotransferásica da enzima. São exemplos destes reguladores enzimáticos, o ATP e compostos análogos (ß-γ-metilenoadenosina 5'-trifosfato (AMP-PCP), imidoadenosina 5'-trifosfato (AMP-PNP), dATP), o GTP e o ADP, o Ap_4A e o 2,3-DPG. Qualquer um destes compostos são possuidores de grande efectividade, aumentando entre 5 a 8 vezes a actividade fosfotransferásica da enzima (Keller e col., 1985; Johnson e Fridland, 1989; Tozzi e col., 1991; Pesi e col., 1994, 1996; Turriani e col., 1994).

Os iões P_i, isoladamente e em concentrações fisiológicas actuam como inibidores desta actividade (Worku e Newby, 1982; Johnson e Fridland, 1989; Pesi e col., 1994).

Há evidências que apontam para o facto de a predominância ou a preferência da enzima por uma das suas actividades depender da presença ou ausência dos efectores enzimáticos. Tozzi e col. (1991) demonstraram que a enzima, utilizando 2 mM de IMP como substrato e na presença de 2,3-DPG como efector, actuava preferencialmente como fosfotransférase.

Estudos posteriores, vieram a reforçar esta ideia ao comprovar-se o aumento preferencial da actividade fosfotransferásica da enzima sobre a actividade nucleotidásica quando a reacção enzimática ocorre em condições fisiológicas e na presença de um nucleósido aceitador de grupo fosfato (Pesi e col., 1994, 1996).

Nesses mesmos estudos, foram ainda demonstrados os efeitos sinergisticos entre o ADP e o 2,3-DPG como efectores em relação à actividade fosfotransferásica da enzima.

Na realidade, utilizando a inosina e o IMP como substratos, receptor e dador de grupos fosfato, respectivamente, verificaram que esses efeitos se exerciam mediante:

(i) O aumento, para o dobro da V_{max}, quando esta foi determinada na presença de 0,5 mM e 0,2 mM, de ADP e 2,3-DPG, respectivamnte e comparado com os correspondentes valores obtidos isoladamente, nas mesmas condições.

(ii) Na diminuição dos valores de $A_{0,5}$ (concentração de efector necessária para que se atinja metade da V_{max}) de 3,8 para 0,7 mM, para o ADP e de 1,1 para 0,25 mM para o 2,3-DPG, quando determinados na presença de 0,2 mM de 2,3-DPG e de 4 mM de ADP, respectivamente.

A diminuição destes valores permitiu sugerir a hipótese de o 2,3-DPG poder actuar como activador fisiológico desta actividade, além dos eritrócitos, também em outros tecidos, onde se encontra em concentrações da ordem de micromolar, inferiores às presentes nas referidas células sanguíneas (Carreras e col.,1986).

1.2.c.4. Outras enzimas capazes de fosforilar nucleósidos e/ou seus análogos.

Dependendo da natureza dos ddN, distintas enzimas celulares, à semelhança do que ocorre com a 5'-nucleotídase citosólica, são capazes de catalisar o primeiro passo do processo de activação destes compostos (pró-drogas): conversão em nucleósido ou análogo de nucleósido monofosfato (ddNMP). São exemplos destas enzimas a timidina cínase (EC 2.7.1.21), a deoxicitidina cínase (EC 2.7.1.74) e a adenosina cínase (EC 2.7.1.20). A timidina cínase é a responsável pela fosforilação dos derivados e/ou análogos da timidina como o 3-deoxi-3'-azidotimidina (AZT ou Ziduvina) (Connolly e Hammer, 1992). A deoxicitidina cínase intervem particularmente nos processos metabólicos dos derivados da citosina (ddC

e arabinofuranosilcitidina), da guanosina (ddGuo) e da adenosina (ddA, 9-ß-D-arabinofuranosil adenosina (ARA-A)). A adenosina cínase catalisa, igualmente, a fosforilação dos derivados da adenosina, mas com uma eficiência menor que a deoxicitidina cínase (Hurley e col., 1983; Saunders e Lai, 1983; Yamada e col., 1983; Cooney e col., 1987; Sarup e Fridland, 1987; Carson e col., 1988; Johnson e col., 1988; Bondoc e col., 1992).

1.3. Estrutura, distribuição e síntese dos dinucleósidos polifosfatos.

Designam-se por dinucleósidos polifosfatos (Np_nN') os compostos constituídos por dois nucleósidos idênticos (N=N) ou distintos (N≠N'), unidos por uma cadeia interna de fosfatos de número variável (p_n), através do hidroxilo em posição 5' da ose (Sillero e col., 1986). A estes compostos atribuem-se ainda as designações de homo ou heterodinucleótidos se estruturalmente os seus nucleósidos forem, respectivamente, iguais ou diferentes entre si. Exemplos destes compostos são o Ap_4A, Ap_3A, Gp_4G, Gp_3G, etc.

O Ap_4A é de todos os dinucleósidos polifosfatos o mais relevante no contexto deste trabalho de tese e, como tal, desenvolver-se-á este capítulo essencialmente em torno deste dinucleótido. Encontra-se presente em inúmeros tecidos e fontes biológicas, em concentrações da ordem de submicromolar (Weinmann-Dorsh e col., 1984; Sillero e col., 1986; Garrison e Barnes, 1992), como resultado da razão entre as respectivas taxas de síntese e degradação.

1.3.a. Síntese dos dinucleósidos polifosfatos

1.3.a.1. Aminoacil-tRNA sintétases

As aminoacil-tRNA sintétases, consideradas durante muito tempo como as únicas enzimas responsáveis pela síntese *in vivo* de Ap_4A, catalisam a reacção de esterificação entre um aminoácido e o tRNA, isto é, entre o grupo COOH de um aminoácido e o grupo OH em posição 2' ou 3' da ribose em posição 3' terminal do tRNA, usando o ATP como co-substrato. A reacção decorre em duas etapas distintas e sequenciais (Zamecnik e col., 1966; Goerlich e col., 1982) ocorrendo, na primeira,

reversível, a formação de um complexo intermediário enzima-aminoácido-AMP (eq.1); e, (ii) na segunda, o aminoacil-tRNA (eq.2)

$$E + aa + ATP \rightleftharpoons E\text{-}aa\text{-}AMP + PP_i \qquad (1)$$

$$E\text{-}aa\text{-}AMP \rightleftharpoons E + aa\text{-}tRNA + AMP \qquad (2)$$

Globalmente a reacção pode ser esquematizada por

$$aa + ATP + tRNA \rightleftharpoons aa\text{-}tRNA + AMP + PP_i \qquad (3)$$

Zamecnick e col. (1966) verificaram que estas enzimas eram igualmente capazes de sintetizar Ap_4A *in vitro*. Este processo de síntese ocorreria na ausência de tRNA sendo activado pela presença de pirofosfatase. Deste modo, o complexo E-aa-AMP (eq.1) cederia o AMP ao ATP formando-se o Ap_4A segundo,

$$E + aa + ATP \rightleftharpoons E\text{-}aa\text{-}AMP + PP_i \qquad (1)$$

$$PP_i \longrightarrow 2\ P_i \qquad (4)$$

$$E\text{-}aa\text{-}AMP + ATP \rightleftharpoons E + aa + Ap_4A \qquad (5)$$

Nesta situação uma nova molécula de ATP ocuparia o lugar do PP_i (eq.1), sendo o AMP cedido a essa molécula segundo uma reacção reversível (eq.5). A função da pirofosfátase consistiria na eliminação do PP_i formado, possível competidor do ATP, como aceitador do grupo AMP.

Plateau e Blanquet (1992) verificaram que o AMP constituínte do complexo E-aa-AMP podia ser cedido a outros compostos que não o ATP (eq.5), dando origem a compostos distintos de acordo com o substrato aceitador. Assim por exemplo, se em vez de ATP se tiver (i) outros nucleósidos-5'-trifosfatos, como por exemplo o GTP, CTP, UTP, etc. obter-se-íam, Ap_4G, Ap_4C, Ap_4U, etc, respectivamente, (ii) outros nucleósidos 5'-difosfatos, como por exemplo o GDP, ADP, CDP, obter-se-íam Ap_3G, Ap_3A, Ap_3C, respectivamente e, (iii) outros compostos como o P_3 ou p_4A, obter-se-íam o p_4A e o Ap_5A, respectivamente.

1.3.a.2. Luciférase (EC 1.13.12.7)

A luciférase do pirilampo também catalisa a reacção de síntese de Ap_4A mediante a formação de um complexo intermediário constituido pela enzima, pela luciferina (LH_2) e pelo AMP, com libertação de PP_i (eq. 6), numa primeira fase, seguido da cedência do AMP para o ATP (eq. 7) (Guranowski e col., 1990; Sillero e col., 1991; Ortiz e col., 1993). Esta reacção de síntese, esquematizada por

$$E + ATP + LH_2 \longrightarrow E\text{-}LH_2\text{-}AMP + PP_i \qquad (6)$$

$$E\text{-}LH_2\text{-}AMP + PP_i \longrightarrow E + LH + Ap_4A \qquad (7)$$

é estimulada na presença da pirofosfátase e depende da presença de luciferina ou análogos (dehidroluciferina e 6'-etil-luciferina) no meio de reacção, para que ocorra este processo de síntese (Ortiz e col., 1995).

A enzima é igualmente capaz de sintetisar outros dinucleósidos polifosfatos, como se pode observar com os seguintes exemplos:

(i) A substituição do ATP por GTP, p_4A ou dATP permite a síntese de Gp_4G, Ap_5A e dAp_4dA, respectivamente (Sillero e col., 1991).

(ii) Na adição conjunta de ATP e $Ap[CH_2]pp$ ou ATP[αS], ocorre a síntese de Ap_4A e $App[CH_2]ppA$ ou Ap_4A[αS] (Sillero e col., 1991).

(iii) A adição conjunta de ATP[γS] e variados nucleósidos tri ou tetrafosfatos (GTP, p_4G, CTP, XTP, ITP e dITP) dá origem à sintese de heteronucleósidos tetra e pentafosfatos (respectivamente, Ap_4G, Ap_5G, Ap_4C, Ap_4X, Ap_4I e Ap_4dI) (Ortiz e col., 1993).

1.3.a.3. Acetil-CoA sintétase (EC 6.2.1.1)

A acetil-CoA sintétase é igualmente capaz de catalisar a síntese de mononucleósidos polifosfatos (p_4A e p_5A), utilizando como substratos dadores do grupo AMP, o ATP, mas também o acetil-AMP, e como substratos aceitadores o P_3 ou P_4, respectivamente (Guranowski e col., 1994).

1.3.a.4. Dinucleósido tetrafosfato fosforílase (EC 2.7.7.53).

Como se discutirá no ponto 1.3.b.3. esta enzima é capaz de, *in vitro*, catalisar a síntese de Ap_4A a partir de ADP e de ATP (eq. 8) ou de SpA e de ATP (eq. 9) (Brevet e col., 1987), segundo

$$ADP + ATP \rightleftharpoons Ap_4A + P_i \qquad (8)$$

$$SpA + ATP \rightleftharpoons Ap_4A + \text{sulfato} \qquad (9)$$

Fisiologicamente, no entanto, esta enzima parece participar nos processos degradativos do Ap_4A e não na sua síntese, uma vez que, em estirpes mutantes de leveduras, não contendo os genes *APA1* e/ou *APA2* (genes codificantes destas enzimas) se verificou uma diminuição da degradação deste dinucleótido *in vivo* (Plateau e col., 1989, 1990).

1.3.a.5. Guanililtransférase (EC 2.7.7.45).

Descrita pela primeira vez na *Artemia* (Warner e col., 1974) a guanililtranférase é uma enzima que catalisa a síntese de Gp4G utilizando o GTP como substrato e requerendo o ião Mg^{2+} (eq. 10) segundo

$$2\ GTP \rightleftharpoons Gp_4G + PPi \qquad (10)$$

A enzima pode, igualmente, catalisar a síntese de Gp_3G e de GTP a partir de GDP e Gp_4G (eq. 11), segundo

$$GDP + Gp_4G \rightleftharpoons Gp_3G + GTP \qquad (11)$$

embora a uma velocidade inferior à velocidade de síntese de Gp_4G (8%). O mecanismo de reacção provavelmente envolverá, numa primeira fase, a formação de um complexo intermediário E-GMP, o qual cederia o GMP, numa segunda fase, a outros nucleósidos polifosfatos (Plateau e Blanquet, 1994).

1.3.b. Degradação dos dinucleósidos polifosfatos.

1.3.b.1. Dinucleósido tetrafosfátase assimétrica (EC 3.6.1.17).

Presente em variado material biológico como *Artemia salina* (Warner e Finamore, 1965; Vallejo e col., 1974), no fígado de rato (Lobaton e col., 1975; Cameselle e col., 1982, 1984), em células tumorais (Ogilvie e Antl, 1983), em extractos de células sanguíneas (Pinto e col., 1991), etc., a enzima catalisa a hidrólise preferencial de dinucleósidos tetrafosfatos (eq.12), apresentando valores de K_m da ordem de μM, a nucleósidos tri- e monofosfatos, de acordo com

$$Ap_4A \longrightarrow AMP + ATP \qquad (12)$$

A enzima é activa do mesmo modo sobre os dinucleósidos penta e hexafosfato (Np_5N' ou Np_6N') embora com menor eficácia, dando origem a um nucleósido-5'-trifosfato, sendo o outro um ppN ou pppN, respectivamente; dinucleósidos tri ou difosfatos, NAD, NADP, ATP, etc, não são substratos da enzima. É uma enzima citoplasmática, embora cerca de 10% da sua actividade se localize na fracção mitocondrial (Guranowski e Sillero, 1992).

1.3.b.2. Dinucleósido tetrafosfátase simétrica (EC 3.6.1.41).

Ao contrário da enzima anterior, esta enzima tem uma distribuição mais restrita, tendo sido descrita pela primeira vez em *Physarum polycephalum* (Barnes e Culver, 1982) e em algumas bacterias como na *E. coli* e na *Pyrodictum occultum* (Guranowski e col., 1983; Plateau e col, 1985). É uma enzima que catalisa a hidrólise de Ap_4A a duas moléculas de ADP (eq.13), de acordo com

$$Ap_4A \longrightarrow 2\ ADP \qquad (13)$$

A enzima é activa igualmente sobre compostos do tipo Np_nN' em que n é igual ou superior a 3, como seja o Ap_3A, Ap_5A, Ap_6A, Ap_4G, Gp_3G, Gp_4G, etc, dando invariavelmente origem a um dinucleósido difosfato.

1.3.b.3. Dinucleósido tetrafosfato fosforílase (EC2.7.7.53).

Descrita em leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e em alguns protozoários (*Acanthamoeba castellanii e E. gracilis*) (Guranowski e Blanquet, 1985; Guranowski e col., 1988), a dinucleósido tetrafosfato fosforílase catalisa a degradação fosforolítica do Ap_4A em ATP e ADP (eq.14), segundo

$$Ap_4A + P_i \rightleftharpoons ATP + ADP \qquad (14)$$

É uma reacção reversível permitindo, assim, a síntese de Ap_4A a partir do ATP e do ADP (Brevet e col., 1987). São igualmente substratos da enzima o Ap_5A e o Gp_4G, bem como, o Ap_4C, Ap_4G, Ap_4U e o Gp_4U, dando origem sempre a um nucleósido difosfato como um dos produtos de reacção. O ATP, ADP, NAD, p_4A entre outros não são substratos da enzima.

A síntese de Ap_4A pode ser igualmente catalisada por esta enzima, a partir do ATP e da adenosina 5'-fosfosulfato (SpA) (Guranowski e col., 1988), mediante uma reacção irreversível (eq.15), segundo

$$SpA + ATP \longrightarrow Ap_4A + \text{sulfato} \qquad (15)$$

A enzima pode ainda catalisar a síntese de ADP a partir do SpA e de P_i (eq.16), bem como a hidrólise do seu grupo sulfato, mediante uma reacção reversível, segundo

$$SpA + P_i \rightleftharpoons ADP + \text{sulfato} \qquad (16)$$

Um mecanismo possível para as reacções reversíveis consistirá na formação de um complexo intermediário E-AMP a partir do Ap_4A, SpA e ADP. Este AMP seria cedido, numa segunda fase ao P_i, ao ATP e ao sulfato, dando respectivamente origem a ADP, Ap_4A e SpA (Guranowski e Sillero, 1992).

1.3.b.4. Fosfodiestérases.

Estas enzimas, que catalisam a hidrólise inespecífica de Np_nN', são caracterizadas pelo grande desconhecimento em relação com a sua

especificidade de substratos e funções. Tendo como base a escolha de determinados compostos como substratos e das funções a elas atribuídas, estas enzimas foram classificadas em três grupos distintos pela Comissão de Enzimas, embora possivelmente correspondam à mesma actividade: Fosfodiestérase I (EC 3.1.4.1.), oligonucleotídase (EC 3.1.13.3.) e nucleótido pirofosfátase (EC 3.6.1.19) (Khorana, 1961; Razzell, 1963; Cameselle e col., 1984; Guranowski e Sillero, 1992).

Utilizam como substratos nucleósidos 5'-fosfato com um grupo 3' hidroxilo da pentose livre, sendo igualmente activa sobre as ligações fosfodiester 5'-5''' (como sejam Ap_3A, Ap_4A, Gp_4G), o NAD, o FAD e o ADP-ribose, entre outros, obtendo-se como produtos finais da hidrólise, o nucleósido-5'-fosfato e o resíduo previamente ligado ao grupo fosfato (eq.17).

$$\text{N-5'-P-N'} \longrightarrow \text{N-5'-P} + \text{N'} \qquad (17)$$

Da acção da enzima sobre o Ap_3A, Ap_4A e Ap_5A, resulta o AMP e o ADP, ATP e p_4A, respectivamente. Como estes produtos são igualmente substratos podem sofrer a acção da enzima dando origem ao AMP como produto final comum. A enzima purificada de fígado de rato apresenta valores de K_m para o Ap_4A de cerca de 10 μM (Cameselle e col., 1984).

Presente no fígado de rato (Muilerman e col., 1984; Cameselle e col., 1984), nas células endoteliais (Ogilvie e col., 1989) e cromafínicas (Miras-Portugal e col., 1990) e no cérebro (García-Agúndez e col., 1991), a fosfodiestérase I localiza-se na face externa da membrana plasmática.

1.3.c. Função do Ap_4A e outros dinucleósidos polifosfatos.

1.3.c.1. Influência nos processos de interconversão dos nucleótidos purínicos.

Algumas reacções de interconversão entre os distintos nucleótidos purínicos (*Fig. 1*) podem ser influênciadas pela presença de dinucleósidos polifosfatos, mediante a acção que estes compostos podem exercer sobre a actividade das enzimas nelas intervenientes. Até ao momento descreveram-se o efeito destes compostos sobre 5 enzimas que catalisam outras tantas reacções do metabolismo purínico:

(i) AMP desamínase - A sua actividade é fortemente activada pelo Ap_4A, apresentando valores de K_a da ordem de μM, e inibida pelo Gp_4G de maneira similar à do ATP e GTP. Outros dinucleótidos, como o Ap_3A e o Gp_3G não exercem qualquer efeito sobre a enzima (Fernández e col., 1984).

(ii) 5'-Nucleotídase citosólica - É fortemente activada pelo Ap_4A, bem como por outros dinucleósidos polifosfatos, como o Ap_3A e Ap_5A (Pinto e col., 1986; Itoh e Yamada, 1990).

(iii) Adenilsuccinato sintétase - O Gp_4G, bem como o GDP e o GMP, influenciam negativamente a actividade enzimática, inibindo competitivamente a ligação do GTP à enzima (Faraldo e col., 1983).

(iv) GMP redúctase - É fortemente activada pelo Gp_4G em concentrações da ordem de nM. É, por outro lado, inibida pelo XMP apresentando valores de K_i da mesma ordem de grandeza que os anteriores (Renart e col., 1976).

(v) IMP desidrogénase - É inibida por Gp_4G, mas também por outros nucleótidos, como o GMP, GTP e XMP (Canales e col., 1985).

O efeito estimulador sobre as actividades da AMP desamínase e da GMP redúctase pelo Ap_4A e Gp_4G, respectivamente, permitiu sugerir a hipótese destes dois dinucleótidos contribuirem para a manutenção do equilibrio (ou balanço) entre os níveis dos nucleótidos de adenina e da guanina e, em sentido mais lato, entre os nucleótios purínicos (Sillero e Günther-Sillero, 1989).

1.3.c.2. Como análogos de estado de transição de algumas cínases.

As cínases são enzimas que catalisam a transferência de um P_i entre nucleósidos trifosfatos e um nucleósido, um nucleósido monofosfato ou um nucleósido difosfato, possuem locais onde se ligam simultaneamente os substratos dador e receptor de P_i, podendo parecer, quando estão unidos na posição adequada, um dinucleósido polifosfato. Os dinucleósidos polifosfatos actuam como compostos análogos bi-substrato, ou como análogos do estado de transição, das seguintes cínases: adenilato, adenosina, timidilato, timidina, deoxinucleósido, etc. (Sillero e Cameselle, 1992).

1.3.c.3. Influência sobre a proliferação celular

Os dados bibliográficos existentes são contraditórios em relação à possivel influência que os dinucleósidos polifosfatos, e particularmente o Ap_4A, possam exercer sobre a divisão celular e a síntese de DNA. Rapaport e Zamecnik (1976) comparando diferentes estádios de crescimento celular, observaram, nas culturas celulares de crescimento mais rápido, uma concentração de Ap_4A de cerca de 50 vezes superior àquelas de menor taxa de crescimento, diminuindo fortemente quando esse crescimento cessava. Posteriormente, em outro trabalho, Grummt (1978), estudando o efeito do Ap_4A exógeno sobre uma cultura celular de rim de hamster, observou um aumento da síntese de DNA, durante a fase G1 do ciclo celular, dependente da concentração de Ap_4A. Em contrapartida, na fase de multiplicação exponencial o Ap_4A não exercia efeito sobre esse processo de síntese. Estes resultados foram mais tarde corroborados por outros trabalhos em diferentes tipo de células, através da quantificação dos valores de Ap_4A ou do efeito deste dinucleótido exógeno sobre a síntese de DNA.

Este efeito estimulador da síntese de DNA pelo Ap_4A, não parece ser específico deste composto, uma vez que outros dinucleósidos polifosfatos como o Ap_3A, o Ap_4G, bem como o p_4G ou o ATP, são capazes de estimular a actividade da DNA polimerase α. Contudo, o mecanismo de actuação do Ap_4A parece ser específico para esse processo. Na realidade, os estudos efectuados por Grummt e col. (1979) em timo de vitela, mostraram que o Ap_4A ligava-se especificamente à sub-unidade de 57 kDa da DNA polimerase α, de uma forma covalente e com significativa afinidade. O ATP não era capaz de exercer um efeito inibitório desta ligação à DNA polimerase α. Mais ainda, esta capacidade de ligação do Ap_4A diminuia paralelamente com a diminução desta actividade enzimática. Estudos posteriores efectuados quer no timo de vitela quer em células HeLa corroboraram estes resultados (Remy, 1992; Baxi e Vishwanatha, 1995).

Outros estudos, porém, apresentam resultados que contrastam e contrariam estes dados, pois não se observou qualquer efeito estimulador do Ap_4A quer sobre a DNA polimerases α (nem ß ou γ) de mieloma de rato, *in vitro*, (Ono e col., 1980) quer sobre a síntese de DNA em fibroblastos humanos (Edwards e Kaufmann, 1982). Do mesmo modo, os resultados obtidos por König e col. (1983), em estudos *in vitro*, com o complexo DNA polimerase-primase apontam no sentido de ser o ATP, e não o Ap_4A, o responsável pela estimulação deste complexo e, como tal, da síntese de DNA.

Na regeneração hepática, Weinmann-Dorsch e col. (1984) e Andersson e Lewan (1988) obtiveram do mesmo modo resultados díspares entre si. Enquanto que, os primeiros observaram um aumento de cerca de 65 vezes superior dos níveis de Ap_4A relativamente às células em estado não proliferativo, o aumento encontrado pelos segundos foi apenas de duas vezes.

Esta disparidade de resultados pode ser explicada pelos baixos níveis de concentração destes compostos nos diferentes tecidos, bem como, na dificuldade técnica de os obter e quantificar (Garrison e Barnes, 1992).

1.3.c.4. Interacção com receptores celulares.

O Ap_4A encontra-se presente, em valores de concentração da ordem de nanomolar (nM) (Garrison e col., 1992), em diversos orgãos e tecidos animais, como no rato (cérebro, coração, fígado, rim e testículos) e no cobaio (coração fígado músculo e rim). Contudo, valores superiores, da ordem de micromolar, podem ser encontrados nas plaquetas sanguíneas humanas (Flodgaard e Klenow, 1982; Sillero e col., 1994). Valores mais elevados ainda, da ordem de milimolar, nos grânulos cromafínicos da glândula da medula adrenal bovina foram descritos por Rodriguez del Castillo e col. (1988), embora Sillero e col. (1994) tenham encontrado, neste tecido, valores cerca de 100 vezes inferiores, da ordem de μM. Recentemente, estes compostos dinucleósidos polifosfatos, nomeadamente o Ap_4A e o Ap_5A, foram igualmente encontrados nas vesículas sinápticas de *Torpedo* e em sinaptossomas cerebrais de rato, em concentrações da ordem de μM (Pintor e Miras-Portugal, 1993).

Os baixos e indetectáveis níveis plasmáticos de Ap_4A são o resultado conjunto das baixas concentrações deste dinucleótido nos distintos tecidos e do grau de diluição que sofrem quando libertadas na corrente sanguínea. Por outro lado, os dinucleósidos polifosfatos libertados podem exercer os seus efeitos *in situ*, nas proximidades do local de libertação ou em locais mais distantes levados pela corrente sanguínea, actuando como modulares intra ou extracelulares, respectivamente. Um exemplo desta actuação como modulador extracelular, é o efeito que certos dinucleósidos polifosfatos exercem sobre o sistema vascular (Busse e col., 1988). De notar, que a determinação *in vivo* dos tempos de semi-vida do Ap_4A, no plasma e no sangue total, foram de cerca de 6 e 3 min, respectivamente (Lüthje e Ogilvie, 1988). Uma vez na circulação, o Ap_4A é distribuido por todo o organismo, podendo ser degradado por acção de enzimas hidrolíticas

presentes quer no plasma quer na superfície das membranas celulares, como as fosfátases e as fosfodiestérases (Cameselle e col., 1984; Ogilvie, 1992; Guranowski e Sillero, 1992).

Os efeitos exercidos por este dinucleósido polifosfato podem ser atribuidos à acção da própria molécula ou aos seus produtos de degradação (ATP, ADP, AMP ou adenosina), mediante a ligação a receptores purínicos do tipo P_1 e P_2 (Linden, 1994; Baxi e Vishwanatha, 1995), agonistas, respectivamente, da adenosina e do ATP. A existência de receptores específicos membranares para o Ap_4A, em diversos tecidos de rato, foi observada por Hilderman e col. (1991), sendo esses resultados corroborados por outros estudos (Ogilvie, 1992; Pintor e col., 1993; Pintor e Miras-Portugal, 1995). As características de especificidade desses receptores foi comprovada ao se observar, por parte dos dinucleósidos polifosfato, como o Ap_3A, Ap_5A, Ap_6A e o Ap_3G, uma competitividade com o Ap_4A, ao contrário do verificado com os mononucleósidos fosfato da adenina (ATP, ADP, AMP), o GTP e a adenosina (Hilderman e col., 1991). Esta especificidade foi, uma vez mais comprovada pela inibição da ligação do Ap_4A ao receptor mediante a utilização de anticorpos monoclonais (Walker e col., 1993).

A existência de receptores específicos para dinucleósidos polifosfatos é reforçada por estudos efectuados anteriormente pelo grupo de Sillero (Grau e col., 1982) em que se demonstrou a presença de receptores para o Gp_4G em homogeneizados cerebrais. Nesses estudos demonstrou-se ainda, que o Ap_4A não competia com o Gp_4G para essa ligação.

1.3.c.5. Efeito sobre a função das plaquetas.

As plaquetas contêm nos seus corpos densos, entre outros constituintes, o ADP, o ATP, bem como o Ap_4A e o Ap_3A.

O ADP induz a agregação plaquetária de uma forma reversível e rápida, em concentrações da ordem de micromolar, através da sua ligação a receptores localizados na membrana plaquetária (Born, 1962).

O Ap_4A e o Ap_3A, por seu lado, exercem efeitos antagónicos entre si neste processo de agregação plaquetária. O Ap_4A exerce um efeito anti-agregante e anti-trombótico (Louie e col., 1988), que pode ser explicado por dois mecanismos diferentes:

1. Impede a ligação do ADP ao seu receptor, mediante um processo de inibição competitiva (inibe a indução provocada pelo ADP),

2. Através do ATP (produto resultante da sua hidrólise) o qual, à semelhança com Ap_4A, é um inibidor competitivo da ligação a receptores do ADP (Ogilvie, 1992).

O Ap_3A exerce um efeito agregante das plaquetas similar ao efeito do ADP, embora mais lento. Este efeito, é mediado pelo ADP que se forma como resultado da degradação do Ap_3A no meio extracelular por fosfodiestérases e não desta molécula como tal (Lüthje e Ogilvie, 1984). Este facto, justifica a ausência de efeito agregante do Ap_3A verificado em células não possuidoras de fosfodiestérases (Ogilvie, 1992), bem como, um efeito mais lento e mais continuado que o provocado pelo ADP.

1.3.c.6. Efeito sobre as células cromafínicas.

Conjuntamente com as catecolaminas, o ATP e o ADP, o ácido ascórbico, etc. (Winkler e Westhead, 1980), os dinucleósidos polifosfatos, como o Ap_4A, Ap_5A e Ap_6A (Castillo e col., 1992; Pintor e col., 1991, 1992), são libertados dos grânulos cromafínicos da medula da supra renal quer *in vivo*, para a corrente sanguínea quer *in vitro*, para o liquido de prefusão. Esta secreção resulta do efeito estimulador provocado por certos compostos, como a acetilcolina, o carbacol ou altas concentrações de K^+.

Compostos de tipo Ap_nA (Ap_3A, Ap_4A e Ap_5A) actuam como estimuladores das células cromafínicas provocando a libertação das catecolaminas, embora, com um efeito significativamente inferior (cerca de 10%) ao causado pela secreção devida à nicotina quando em concentração 50 vezes inferior (100 µM contra 2 µM, respectivamente). A presença conjunta destes dinucleótidos com a nicotina durante a indução da secreção medular de catecolaminas, provoca uma resposta secretória ligeiramente inferior à obtida com a nicotina isoladamente (Castro e col., 1990).

1.3.c.7. Efeito sobre o sistema vascular.

O ATP, em concentrações da ordem de µM, actua sob o sistema vascular exercendo um efeito vasodilatador ou vasoconstritor, de acordo com o estado estrutural do endotélio, isto é, em condições de integridade ou de lesão, respectivamente.

O Ap_3A e o Ap_4A influenciam o tonus muscular das artérias mesentéricas de coelho, provocando ambos, em condições de integridade física do vaso, um efeito de vasodilatação, embora, o segundo provoque um

efeito contrário, quando em condições de lesão vascular (Busse e col., 1988). Do mesmo modo, o Ap_5A e o Ap_6A provocam vasoconstrição renal e anéis aórticos, em concentrações da ordem de nM, do rato (Schlüter e col., 1994).

Ralevic e col. (1995) sugeriram, com base nos resultados observados em artérias mesentéricas de rato, que os dinucleósidos polifosfatos exerciam efeitos distintos sobre o sistema vascular, de acordo com o número de grupos fosfato constituintes da sua cadeia interna. Assim, se esse número fosse inferior a 3 ou igual ou superior a 4, os dinucleósidos polifosfatos actuariam como vasodilatadores ou como vasoconstritores, respectivamente.

A actuação vasodilatadora ou vasoconstritora dos distintos compostos dinucleótidos dependem da sua ligação a diferentes receptores.

1.3.d. Genes codificadores de enzimas intervenientes no metabolismo dos dinucleósidos polifosfatos.

1.3.d.1. Dinucleósido tetrafosfátase.

O gene *apaH* é um gene codificador da dinucleósido tetrafosfátase simétrica, identificado na *E. coli* por Mechulam e col. (1985).

Estirpes de *E. coli*, resultantes de transformação com plasmídeos, capazes de expressar este gene, caracterizam-se por uma actividade enzimática 30 vezes superior à observada em estirpes não transformadas. Foi ainda demonstrado, que a concentração de Ap_4A presente nas estripes não transformadas era 10 vezes inferior à verificada nas estirpes transformadas. Em estirpes incapazes de expressar esse gene as concentrações de Ap_4A presentes eram de 16 a 100 vezes superiores às observadas em estirpes contróis (Farr e col., 1989; Lévêque e col., 1990).

Relativamente à dinucleósido tetrafosfátase assimétrica, os seus genes codificadores foram identificados na placenta humana (Thorne e col., 1995) e na *Schizosaccharomyces pombe* (identificado como *aph1*) (Huang e col., 1995), com pequena homologia entre si. Enquanto que a de origem placentária humana tem uma sequência designada de MutT, parecida com outras pertencentes a pirofosfátases de nucleótidos, a segunda contém uma designada de HIT (tríade de histidinas) similar à apresentada por proteínas da família HIT.

1.3.d.2. Dinucleósido tetrafosfato fosforílase.

Os genes *APA1* e *APA2*, codificantes de duas isoenzimas da dinucleósido tetrafosfato fosforílase, foram identificados no cromossoma III e IV, respectivamente, da *Saccharomyces cerevisiae*. Estas, possuem uma sequência de aminoácidos idêntica em 60% (Garrison e col., 1992; Plateau e Blanquet, 1994).

Em estirpes expressando apenas um dos genes (*APA1* ou *APA2*) ou nenhum deles observou-se um aumento das concentrações de Ap_4A, particularmente significativo (50 vezes superior) no último caso. Estes dados sugerem que, *in vivo*, estas enzimas intervêm principalmente nos processos degradativos deste dinucleótido. Porém, num estudo efectuado com uma estirpe de *S. cerevisiae*, contendo um plasmídeo multicópia, capaz de produzir grandes quantidades de fosforílase I, Avila e col. (1991) verificaram um aumento dos níveis de Ap_4A, Ap_4G e Gp_4G, contrariando a hipótese anteriormente formulada.

1.3.d.3. Relação entre o metabolismo de dinucleósidos polifosfatos e um possível gene supressor de tumores.

O gene *FHIT* é um gene caracterizado por possuir uma sequência com uma homologia com a dinucleósido tetrafosfátase assimétrica da *Schizosaccharomyces pombe*, de cerca de 69% (Ohta e col., 1996).

Foi clonado a partir de região (FRA3B) situada nas proximidades do local onde se verificava uma translocação entre os cromossamas 3 e 8 (t(3,8)(p14,2;q24)) (Cohen e col., 1979), em membros de uma família com elevada frequência de casos de carcinomas renais, em idades jovens. Recentemente, verificou-se que em cerca de 50% dos casos de tumores do esófago, estômago e cólon (Ohta e col., 1996) e em valores mais elevados em tumores pulmonares (Sozzi e col., 1996), esse gene contém uma mutação ou, mesmo, não é transcrito. A proteína resultante da expressão deste gene *FHIT* (gene supressor de tumores) em *E. coli* possui capacidades hidrolíticas sobre Ap_3A (Barnes e col., 1996), sugerindo uma possível relação entre o metabolismo de dinucleósidos polifosfatos e a tumorogénese.

2. Objectivos

1. O estudo do metabolismo dos nucleótidos purínicos, constitui, há já algum tempo, uma das principais linhas de investigação, dos Doutores Günther-Sillero e Sillero (Sillero e Sillero, 1987, 1989; Sillero e col., 1993; Bleisch e col., 1994). Estes autores observaram que os dinucleósidos tetrafosfatos eram importantes compostos reguladores da interconversão metabólica, dos nucleótidos purínicos: a diaguanosina tetrafosfato como activador da GMP redúctase (Renart e col., 1976), a diadenosina tetrafosfato como activador da AMP desamínase (Fernández e col., 1984) e da 5'-nucleotídase citosólica IMP/GMP específica (Pinto e col, 1986).

2. Ao iniciar este trabalho, tinha sido descrita e caracterizada no cérebro de rato uma 5'-nucleotídase de alta afinidade para o AMP como substrato (Ipata, 1968; Montero e Fes, 1982; Mallol e Bozal, 1983, Orford e col., 1991), conhecendo-se, no entanto, relativamente pouco sobre a 5'-nucleotídase IMP/GMP específica nesse orgão (Pinto e Fernández, 1987; Bontemps e col., 1989a; Itoh e col., 1992).

3. Dada a importância que o metabolismo de nucleótidos tem no cérebro, onde, ligeiras disfunções neste quadro podem dar lugar a graves alterações neurológicas, propôs-se, como objectivo principal deste tese, estudar a actividade 5'-nucleotídase citosólica IMP/GMP específica de cérebro de rato.

4. Se se conseguisse a purificação da enzima estudar-se-íam as suas propriedades cinéticas e moleculares, assim como, o efeito dos dinucleósidos polifosfatos e moléculas similares sobre a velocidade enzimática. Propuseram-se, ainda, outros objectivos adicionais, como o estudo do seu papel catalítico em extracto cru de cérebro e o estudo comparativo das sequências nucleóticas e peptídicas da enzima 5'-nucleotídase citosólica, em banco de dados de sequências.

3. Material e Métodos

3.1. Material

3.1.a. Material biológico

Como material biológico usaram-se nas experiências ratos Sprague - Dawley, machos, de idade compreendida entre as 10 e as 11 semanas de vida. Possuíam um peso médio de cerca de 270 g (230-300g), sendo alimentados *ad libitum* com uma dieta de rações Sanders e água.

A ração Sanders, embora de composição quantitativa não definida pelo fabricante, sob o ponto de vista qualitativo é constituída por uma mistura de farinha de carne, gorduras, amido e celulose, suplementada com vitaminas (A, D e E) e minerais (cálcio, fósforo e sódio).

3.1.b. Aparelhos

Na homogeneização do tecido cerebral utilizou-se o tubo de Potter com um êmbolo revestido com teflon ou um homogeneizador Polytron da casa Kinematica AG.

Nas centifugações utilizaram-se distintas centrifugas de acordo com os objectivos pretendidos. Assim, foram utilizadas (i) uma centrifuga da marca Beckman, modelo GPR centrifuge e uma microcentrifuga Heareus Sepateca modelo Biofuge 13, ambas centrifugas de mesa, (ii) centrifugas refrigeradas de alta velocidade Beckman, modelo J2-21 e (iii) ultracentrifugas, Beckman, modelos XL-80, L8-80M e L8-55.

As pesagens efectuaram-se em balanças Sartorius e Salter electroscale, modelo KE-1200A.

As determinações espectrofotométricas realizaram-se em espectrofotómetros Zeiss, modelo PMQ3, Shimadzu modelo UV-160A e em leitor de micro ELISA da Bioteck Instruments, modelo EL 340 acoplado a um computador e impressora MacIntosh.

As incubações das diferentes reacções enzimáticas foram realizadas em banhos termoestatizados da casa New Brunswick Scientific, modelo G-76, da casa Braun-Biotech, modelo Thermomix 1420 e em aparelho termoestatizado Techne Dri-Block, modelo DB-2A.

Na medição dos valores de pH das distintas soluções de trabalho utilizou-se o aparelho Crison, modelo MicropH 2000 da casa Crison Instruments S.A.

Nas técnicas cromatográficas em coluna utilizaram-se na recolha das fracções, colectores LKB, modelo 7000, Ultrorac e RediFrac de Pharmacia.

Nas electroforeses utilizou-se uma fonte de alimentação da Apparatus Corporation, modelo EC 105. A camara de electroforese era o modelo Mini-Protean II Electrophoresis Cell da Bio-Rad.

Na cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), utilizou-se um cromatógrafo líquido da casa Hewlett-Packard, modelo 1090 com detector de díodos em circuito integrado. Este cromatógrafo estava acoplado a um computador modelo HP 9000-300, da casa Hewlett-Packard. Utilizou-se ainda um outro cromatógrafo da marca Waters, modelo 440, acopolado a um detector da mesma marca e, ainda, a um integrador modelo 3390A de Hewlett-Packard.

Utilizaram-se colunas de Hypersil ODS (C18) da Hewlett-Packard de duas distintas dimensões - (i) 4,6 x 100 mm e (ii) 2,1 x 100 mm - protegidas, respectivamente, com pré-colunas igualmente de Hypersil ODS (C18) de 4,6 x 20 mm e 2,1 x 20 mm.

Para a cromatografia de interacção hidrofóbica (HIC) utilizou-se um cromatógrafo da marca Waters, acoplado a um colector de fracções RediFrac da casa Pharmacia.

Na medição da radioactividade das amostras utilizou-se um aparelho de contagem de cintilações da marca Beckman, modelo LS 1701. Do mesmo modo utilizou-se um outro aparelho automático da marca Packard (electronic autoradiographic), modelo Instant imager, da casa Canbera Company, acopolado a um computador IBM e a uma impressora HP laser Jet 4, da Hewlett-Packard.

Na recolha das fracções do gradiente de sacarose utilizou-se uma bomba colectora de gradientes da marca Auto Densi Flow II C da casa HaakeBuchler.

Na liofilização das amostras utilizou-se um liofilizador da marca Virtis.

A água utilizada durante o trabalho experimental foi água destilada e desionizada por um sistema de filtros da marca Fisons Scientific Apparatus. A água utilizada nas técnicas de cromatografia líquida de alta resolução foi purificada por um sistema Milli Q da Milipore.

No tratamento matemático do metabolismo purínico cerebral utilizou-se um computador MacIntosh, modelo Quadra 650 C.

3.1.c. Produtos

Os nucleótidos (ADP, GTP, CTP) foram da Boehringer. Os restantes nucleótidos, bem como os dinucleótidos utilizados (Ap_2A, Ap_3A, Ap_4A, Ap_5A e Ap_6A) e as cadeias de polifosfatos foram da Sigma. O Gp_4G foi obtido a partir dos cistos de *Artemia salina* (Vallejo e col., 1974), sendo os restantes dinucleótidos utilizados, obtidos por síntese no laboratório, utilizando a luciferase de-pirilampo (*Photinus pyralis*) (Sillero e col., 1991; Ortiz e col., 1993).

A [8-^{3}H] Guanosina e a [8-^{14}C] guanosina-5'-monofosfato foram, respectivamente da ICN Radiochemicals e da Moravek Biochemicals.

A luciférase do pirilampo (*Photius pyralis*) foi da Boehringer (cat.nº 411523) ou da Sigma (cat. L-5256). A pirofosfátase inorgânica de levedura e a fosfátase alcalina de intestino de vitela foram da Boehringer (respectivamente, cat.nº 108987 e cat. nº 108138)

As placas utilizadas nas cromatografias de camada fina (TLC) foram de PEI-celulose Cel 300 PEI/UV_{254} da Macherey-Nagel (artº 801063).

As resinas utilizadas foram das casas Pharmacia (Sephacryl S-300, PD-10 de Sephadex G-25, Sepharose 4B), Serva (DEAE-celulose e celulose do tipo P), e Amicon (Gel de Dyematrex Green A - nº 19311). As colunas Mono Q HR 5/5 e Phenylsuperose HR 5/5 eram da casa Pharmacia Biotech.

Na concentração das amostras por membrana utilizaram-se da Amicon os microconcentradores Microcon 50 e concentradores Centriplus 50, e da Vivascience, Lda. os concentradores Vivaspin 500.

Como marcadores de massa molecular, utilizaram-se em cromatografia de filtração por gel em Sephacryl S-300 ou gradiente de sacarose, as enzimas (lactato desidrogénase, pruvato cínase, adenosina desamínase e catálase) da casa Boehringer, e nas electroforeses de poliacrilamida em SDS uma mistura de proteínas padrão - Standarts SDS-PAGE - da BioRad (cat.nº 1561-0304).

O reagente de Bradford foi da Bio-Rad (cat nº 500-0006).

O metanol usado em HPLC foi da casa Riedal-de Haën. O brometo de tetrabutilamónio foi da Merck (cat. nº 818839). Os filtros de tipo HA (0,45 µm de tamanho de poro) para soluções hidrofílicas e do tipo HV (0,45 µm de tamanho de poro) para soluções orgânicas foram da Millipore.

O líquido de cintilação utilizado foi o Optiphase "Hisafe", da Wallac de Fisons Chemicals, Loughborough Leics (cat. nº sc-9195-21).

Todos os restantes produtos utilizados foram de pureza analítica da Merck ou da Sigma.

3.1.d. Soluções tampão

3.1.d.1. THE

Utilizada na homogeneização para a purificação e caracterização da enzima, é constituída por 50 mM de Tris, ajustado a pH 7,4 com HCl, 1 mM de EDTA, 10 mM de ß-mercaptoetanol e 0,28 M de sacarose, suplementada com 2 µg/ml de leupeptina e 2 mM de PMSF.

3.1.d.2. TSE

Utilizada, essencialmente, na purificação da enzima, é constituída por 50 mM de Tris, ajustado a pH 7,4 com HCl, 1 mM de EDTA e 10 mM de ß-mercaptoetanol, suplementada com 2 µg/ml de leupeptina e 2 mM de PMSF.

3.1.d.3. TH

Utilizada na homogeneização do tecido cerebral para estudo do metabolismo é constituída por 50 mM de Tris, ajustado a pH 7,4 com HCl, 10 mM de ß-mercaptoetanol e 0,28 M de sacarose.

3.1.d.4. TS

Utilizada, essencialmente, no estudo do metabolismo cerebral é constituída por 50 mM de Tris, ajustado a pH 7,4 com HCl e 10 mM de ß-mercaptoetanol.

3.2. Métodos

3.2.a. Preparação de homogeneizados tecidulares e obtenção da fracção citosólica

Durante o processo de purificação da 5'-nucleotídase citosólica, os ratos foram mortos por decapitação entre as 10 e as 11 horas da manhã sendo os seus cérebros imediatamente extraídos e mergulhados numa solução tampão constituida por 50 mM Tris, ajustada a pH 7,4 com HCl, 1

mM de EDTA, 10 mM de ß-Mercaptoetanol, 0,28 M de Sacarose, suplementada com 2 mM de PMSF e 2 µg/ml de leupeptina (THE).

Após pesagem, o tecido cerebral foi homogeneizado em 5 volumes de THE com auxílio de um Polytron (Kinematica AG) em três impulsos ("burst") de 30 s cada, intervalados com 30 s de repouso em gelo.

A mesma metodologia de trabalho foi utilizada na obtenção de material para o estudo comparativo da enzima presente nos distintos orgãos. Para este estudo, os ratos foram mortos por exsanguentação, mediante punção cardíaca, sendo os tecidos obtidos, imediatamente separados e tratados individualmente.

Para o estudo das actividades nucleotidásicas totais, o tecido cerebral de rato foi obtido como o descrito anteriormente e imediatamente mergulhado numa solução tampão a pH 7,4, constituída por 50 mM de Tris, HCl e 0,28 M de sacarose. Após pesagem, o tecido cerebral total foi homogeneizado em 3 volumes da mesma solução tampão, com auxílio de um tubo de Potter, com 6 impulsos de 30 segundos.

Na preparação dos homogeneizados de cistos de *Artemia*, estes (2g) foram hidratados mediante suspensão em 50 ml de água destilada fria, deixados em repouso por um período de 20 minutos, ao fim do qual se eliminaram por decantação conjuntamente com a água os que flutuavam. Esta operação é repetida duas vezes. Os cistos hidratados foram ressuspendidos em 50 ml de uma solução de hipoclorito de sódio a 1%, e mantidos sob agitação contínua e suave durante 5 minutos, com o objectivo de fragilizar a sua membrana externa. Após sedimentação e decantação da suspensão, os cistos precipitados foram lavados, com tampão de homogeneização, até desaparecimento do cheiro de hipoclorito de sódio. Procedeu-se em seguida a uma nova lavagem com 10 ml da mesma solução tampão de homogeneização. Os cistos foram completamente secos, procedendo-se à sua trituração em almofariz. Esta operação foi acompanhada pela observação microscópica do triturado, dando-se por terminada quando a grande maioria dos mesmos foi destruída. Uma vez bem triturados, adicionaram-se pouco a pouco 10 ml de solução tampão de THE, obtendo-se assim um homogeneizado dos cistos da *Artemia*.

Os homogeneizados, obtidos segundo os protocolos anteriormente descritos, foram centrifugados a 31 000 x *g* por um período de 25 minutos, sendo os respectivos sobrenadantes recuperarados e sujeitos a uma nova centrifugação a 150 000 x *g* por um período de 60 minutos. Os sobrenadantes resultantes desta última centrifugação, constituem a

fracção solúvel do citoplasma, isto é, o citosol. Todas as operações foram efectuadas à temperatura de 4°C.

Para o estudo do metabolismo purínico cerebral, as respectivas fracções citoplasmáticas foram, normalmente, dialisadas frente a tampão de 50 mM Tris, HCl (pH 7,4) e 10 mM de ß-mercaptoetanol (TS) por um período mínimo de 16 horas com duas mudas de solução tampão. Os casos particulares indicam-se a cada momento.

3.2.b. Fraccionamento com sulfato de amónio

À fracção citosólica de cérebro de rato homogeneizado em solução tampão THE adicionaram-se, de uma forma lenta e gradual, sulfato de amónio, finamente pulverizado, até atingir a saturação final de 45% (277 g/l). A suspensão formada foi deixada em contacto, à temperatura de 4°C e sob agitação contínua, por um período de 4 a 5 horas, ao fim do qual foi centrifugada a 31 000 x *g*, durante 30 minutos. O precipitado formado foi ressuspendido em solução de TSE, sendo de seguida dialisado frente à mesma solução.

Quando se procedeu ao estudo do comportamento da enzima na presença de sulfato de amónio (0 a 45% e de 45 a 65%), ao sobrenadante anterior foi adicionado novamente sulfato de amónio até atingir a saturação final de 65% (134 g/l), sendo esta nova suspensão tratada como se descreveu anteriormente.

3.2.c. Determinação das actividades enzimáticas da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica.

3.2.c.1. Actividade 5'-nucleotidásica

A acção 5'-nucleotidásica da enzima sobre o substrato nucleósido 5'-monofosfato dá origem, como produtos da reacção, a P_i e ao nucleósido correspondente, podendo, deste modo, determinar-se a sua actividade mediante a quantificação quer do P_i quer do nucleósido formado.

3.2.c.1.a. Quantificação do fósforo inorgânico (P_i)

A mistura de reacção normalmente utilizada era constituída por 50 mM de solução tampão de Imidazol, HCl (pH 7,0), 5 mM de $MgCl_2$, 0,22 M de NaCl, 0,1% BSA, 2 mM de IMP, como substrato da enzima e 0,050 mM

de Ap_4A como efector enzimático, para um volume final de 0,2 ml (mistura de reacção padrão). A adição da enzima à mistura, em quantidades adequadas, determinava o tempo zero da incubação que se efectuava a 37°C, normalmente, por um período de 30 minutos. Uma vez terminado este tempo de incubação, a reacção enzimática era parada pela adição de 1,45 ml de um reagente - reagente de Ames (Ames,1966) - constituído por 0,42 M de molibdato de amónio em 0,5 M de ácido sulfúrico, ácido ascorbico a 12% e dodecilsulfato de sódio (SDS) a 3,7% na proporção de 6:1:1. Após a adição do reagente procedeu-se a nova incubação a 45°C por 25 minutos, para permitir o desenvolvimento da cor. A leitura da absorbância era feita a 820nm.

Paralelamente fizeram-se os brancos correspondentes sem enzima e sem substrato e uma série de padrões de fosfato contendo 0, 10, 20 30, 40 e 50 nanomoles. Nas condições de ensaio e a 820 nm, a um nanomole de fósforo inorgânico corresponde um valor de absorção média de 0,017 em um intervalo de valores absolutos entre 0,016 e 0,020.

Uma Unidade (U) de enzima é definida como a quantidade de enzima que converte 1 µmole de substrato por minuto, nas condições de ensaio.

3.2.c.1.b. Quantificação dos nucleósidos formados

(i) Por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)

A mistura de reacção utilizada era básicamente a mesma que a descrita no método anterior (3.2.c.1.a). Após término do período de tempo de incubação da reacção enzimática recolhiam-se aliquotas do meio de ensaio que se diluíam em água destilada fria, normalmente numa diluição de 3 vezes, e mergulhavam-se em banho maria fervente, por um período de 90 segundos. Após este período de tempo os tubos eram colocados imediatamente em gelo e congelados até ao momento de ensaio.

Normalmente, alíquotas de 0,050 ml de amostra previamente filtrada por filtros Millipore (0,45 µm) eram injectados numa coluna de Hypersil ODS e eluídas de acordo com o descrito no ponto 3.2.e.1. Após eluição da amostra da coluna e obtido o seu perfil cromatográfico, procedeu-se à quantificação dos produtos formados mediante a medição das áreas dos picos e comparando-as com curvas de calibração realizadas com concentrações conhecidas do produto a quantificar.

(ii) Por cromatografia em camada delgada (TLC)

Para um volume final de 12,5 µl, a mistura de reacção continha 100 mM de Imidazol, HCl (pH 7,0), 5 mM de $MgCl_2$, 0,22 M de NaCl, 0,52 mM de [8-^{14}C] GMP (actividade específica 6,8 µCi/µmol) como substrato, 0,2% BSA, efector (que em cada caso se indica) e enzima.

Após término dos períodos de incubação a 37°C, a reacção era terminada mediante a aplicação de alíquotas de 3 a 4 µl de cada amostra em placa de PEI-celulose. Depois de seca a placa era eluída com água destilada até à altura de 10 cm. Antes de se proceder à sua eluição aplica-se no local de origem quantidades apropriadas de GMP e de Guo não marcadas. A análise dos resultados efectuou-se pela quantificação do produto guanosina de acordo com o descrito no ponto 3.2.e.2.

3.2.c.2. Actividade fosfotransferásica

A mistura de reacção continha, para um volume final de 0,025 ml, 100 mM de solução tampão de Imidazol, HCl (pH 7,0), 5 mM de $MgCl_2$, 0,22 M de NaCl, 5 mM de IMP ou GMP como substratos dadores de grupos fosfato, 1 mM de guanosina e 0,5 µCi de [8-^{3}H] Guanosina (19 Ci/mmol), 0,1 mM de Ap_4A como efector e enzima. A mistura de reacção foi incubada a 37 °C, durante 60 e 120 minutos, sendo a reacção parada pela aplicação de alíquotas de 4 µl de amostra numa placa de PEI-celulose, previamente preparada. A placa de TLC era eluida com água até à altura de 10 cm. Depois de seca a placa, procedeu-se à localização das manchas, de acordo com protocolo de análise dos resultados descrito no ponto 3.2.e.2.

3.2.d. Outras determinações enzimáticas

3.2.d.1. Fosfátase alcalina (EC 3.1.3.1)

Para um volume final de 1 ml a mistura de reacção era constituída por tampão Tris, HCl 50 mM (pH 8,8), 5 mM de $MgCl_2$, 6 mM de p-nitro fenilfosfato e enzima. A adição da enzima à mistura de reacção determinou o tempo zero do período de incubação que se prolongou por 30 minutos à temperatura de 37°C. Após este período, a reacção foi parada pela adição de 5 ml de NaOH 0,2 M e a absorção foi medida a um comprimento de onda de 405 nm. Paralelamente, e nas mesmas condições de ensaio, efectuaram-se os brancos de enzima e do substrato.

O coeficiente de absorção molar (ε) para o p-nitrofenol, nestas condições, é de 18,5 $cm^{-1}mM^{-1}$ (Walter e Schütt, 1974).

3.2.d.2. Fosfátase ácida (EC 3.1.3.2)

Para o volume final de 0,5 ml, a mistura de reacção era constituída por 50 mM de tampão de succinato de sódio, ajustado a pH 3,9, 5 mM de $MgCl_2$, 2,5 mM de p-nitrofenilfosfato e fracção enzimática. Em paralelo, e nas mesmas condições, efectuaram-se os brancos de enzima e da mistura de reacção. A mistura de reacção foi incubada à temperatura de 37°C por um período de 30 minutos, ao fim dos quais, a reacção foi parada pela adição de 0,8 ml de NaOH 0,2M. Os valores de absorção foram lidos a 405 nm.

3.2.d.3. Catálase (EC 1.11.1.6)

A mistura de reacção utilizada continha para um volume final de 1,0 ml, 50 mM de tampão fosfato de sódio (pH 7.0), 10 mM de peróxido de hidrogénio e fracção enzimática. A adição do peróxido de hidrogénio (substrato) à mistura de reacção determinava o início da reacção, medindo-se, à temperatura ambiente, a diminuição da absorção em função do tempo, a 240 nm. (ε= 39,4 $cm^{-1}mM^{-1}$ (Aebi, 1983)).

O substrato da reacção foi preparado extemporâneamente, em tampão de fosfato de sódio 50 mM, ajustado a pH 7,0, e 0,05 mM de EDTA, a uma concentração final de 0,3 M.

3.2.d.4. Adenosina desamínase (EC 3.5.4.4)

A mistura de reacção continha 50 mM de Tris, HCl (pH 7.5), 0,05 mM de adenosina, e fracção enzimática, num volume final de 1,0 ml.

A determinação da actividade da enzima efectuou-se medindo a diminuição de absorção a 265 nm em função do tempo (ε=-8,6 $cm^{-1}mM^{-1}$ (Agarwal e Parks, 1978)).

3.2.d.5. Piruvato cínase (EC 2.7.1.40)

A mistura de reacção continha, para um volume final de 2,0 ml, 50 mM de Tris, HCl (pH 7.5), 5 mM de $MgCl_2$, 0,15 mM de NADH + H^+, 2 mM

de fosfoenolpiruvato, 2,5 mM de ADP, 0,2 U de lactato desidrogénase de músculo de vitela e de fracção enzimática.

A determinação da actividade da enzima efectuou-se medindo a diminuição de absorção do NADH + H^+, a 340 nm (ε= 6,2 $cm^{-1}mM^{-1}$) em função do tempo.

3.2.d.6. Lactacto Desidrogénase (EC 1.1.1.28)

A mistura de reacção continha 50 mM de Tris, HCl (pH 7,5), 0,15 mM de NADH + H^+, 1 mM de piruvato e fracção enzimática num volume final de 2,0 ml. A determinação da actividade da enzima efectuou-se medindo a diminuição de absorção do NADH + H^+, a 340 nm em função do tempo.

3.2.e. Separação de nucleótidos

3.2.e.1. Por cromatografia liquída de alta resolução (HPLC)

Utilizaram-se colunas Hypersil ODS (C18) da Hewlett-Packard de 5 µm de diâmetro de particula, protegidas por pré-colunas igualmente de Hypersil ODS (C18) mas de dimensões inferiores. Com estas colunas utilizou-se um cromatógrafo acoplado a um computador. Estas colunas Hypersil ODS são colunas de fase reversa que se comportam como se fossem colunas de troca-iónica na presença de brometo de tetrabutilamónio (TBA) no tampão de eluição.

Antes de se proceder à separação cromatográfica, as colunas foram equilibradas com a solução tampão inicial. Para isso, as colunas lavaram-se sucessivamente com cerca de 5 volumes de uma solução tampão de 5 mM de fosfato de sódio, pH 7,0, em 20 mM de TBA e 20% de metanol, (a seguir designado por solução tampão de equilibrio), 5 volumes de solução tampão de 100 mM fosfato de sódio, pH 7,0, em 20 mM de TBA e 20% de metanol, e finalmente com 5 volumes da mesma solução tampão de equilibrio. Em seguida 0,050 ml das amostras a ensaiar, previamente filtradas por filtros Millipore HAWP, injectaram-se na coluna de Hypersil ODS (4,6 x 100 mm ou 2,1 x 100 mm) previamente equilibrada, de acordo com o descrito anteriormente. De referir que, à semelhança das amostras em ensaio, todas as fases móveis antes de serem utilizadas foram, igualmente, filtradas por este tipo de filtros ou por filtros Millipore HVLP (se continham metanol).

A amostra foi eluída a um fluxo constante de 0,5 ml/min, mediante um gradiente linear de 20 minutos de fosfato de sódio (5-30 mM), em 20 mM de TBA e 20% de metanol, seguido de um segundo gradiente, igualmente linear, mas de 10 minutos de fosfato de sódio (30-100 mM) em 20 mM de TBA e 20% de metanol. A eluição das colunas e respectivo traçado do seu pefil cromatográfico foi acompanhada passo a passo mediante a visualização das variações da absorção a um comprimento de onda de 260 nm, no qual todos os (di)nucleótidos(sidos) ou respectivas bases absorvem.

Os picos obtidos nos cromatogramas foram caracterizados (i) pela determinação dos seus tempos de retenção na coluna e também, (ii) pela comparação do seu espectro na zona do ultravioleta com espectros característicos existentes em memória computorizada. Do mesmo modo, a partir das áreas dos picos do cromatograma quantificaram-se nucleótidos(sidos) ou respectivas bases presentes na mistura (i) utilizando curvas de calibração realizadas com concentrações conhecidas do (di)nucleótido(ósido) ou correspondentes base(s), nas mesmas condições cromatográficas, ou (ii) em termos percentuais, exprimindo a área de cada pico em função da área global correspondente à totalidade dos picos cromatográficos formados.

3.2.e.2. Por cromatografia em camada delgada (TLC)

Neste tipo de cromatografia utilizaram-se placas preparadas comercialmente de celulose de fosfoetilenimina (PEI-celulose). Estas placas (20 x 20 cm), são constituídas por um suporte plástico flexível sobre o qual se estende uma camada de celulose, com a espessura de 0,1 mm, contendo um indicador de fluorescência. Antes de serem utilizadas as placas foram lavadas uma vez mediante eluição de forma ascendente com uma solução de NaCl a 10%. Em seguida, as placas foram submetidas a 3 lavagens, em condições idênticas às anteriores, com água destilada. Finalmente, as placas foram secas com o auxílio de uma corrente de ar quente ou, então, deixadas ao ar devidamente protegidas. Antes de serem usadas, a partir de uma distância de cerca de 2 cm de cada uma das extremidade das placas cromatográficas, marcaram-se os locais de aplicação das amostras em estudo intervaladas por uma distância mínima de 1,5 cm.

Aplicaram-se, normalmente, alíquotas de 3 a 4 µl das misturas de reacção nas placas cromatográficas. No caso da utilização de material radioactivo, antes de se proceder à eluição da placa, aplicou-se no ponto de

aplicação das amostras igual volume de material não radioactivo com o fim de melhor visualisar e identificar o produto formado sem interferir na contagem da radioactividade A aplicação de cada alíquota efectuou-se sob uma corrente de ar quente e em pequenas quantidades (cerca de 1 µl de cada vez) com o objectivo de secar muito bem a mancha formada, evitando assim uma grande dispersão da mesma no ponto de aplicação. Uma vez aplicadas as alíquotas, as placas de cromatografia foram eluídas com água destilada até que a frente do eluente percorresse uma distância de aproximadamente 10 cm desde o ponto de aplicação.

Terminada a eluição, as placas foram secas e procedeu-se à localização das manchas dos nucleósidos(tidos) na placa de cromatografia aproveitando as capacidades que possuem de anular a fluorescência da placa à luz de UV (254 nm). Uma vez localizadas, recortaram-se em pequenos quadrados que se introduziram em recipientes próprios, contendo líquido de cintilação para sua quantificação, mediante determinação da respectiva radioactividade. De acordo com esta metodologia, os nucleósidos monofosfatos ficam retidos no ponto de aplicação das amostras enquanto que os nucleósidos migram apresentando valores de Rf de 0,34.

Em alguns casos, quando o isótopo utilizado era ^{14}C, utilizou-se um aparelho (analisador linear de radioactividade) que permitia quantificar as radiações emitidas pelos compostos radioactivos a partir da própria placa. A leitura da radiação das placas efectuava-se de uma forma automática permitindo a quantificação da radioactividade de cada pico, bem como da radioactividade total por integração dos picos do cromatograma.

3.2.f. Síntese específica e purificação de heterodinucleósidos polifosfatos

A mistura reaccional utilizada na síntese deste tipo de compostos continha, para um volume final de 1 ml, 50 mM de tampão Hepes, KOH (pH 7,5), 5 mM de $MgCl_2$, 0,1 % de BSA, 0,1 mM de D-luciferina, 1 U de pirofosfátase inorganica, 0,33 mg de luciférase e concentrações equimoleculares de ATP[γS] e nucleósidos trifosfato (NTP). O período de incubação foi de 24 horas à temperatura de 30°C. Alíquotas de 0,005 ml foram recolhidas, convenientemente diluidas e analisadas por HPLC para quantificar a formação do(s) dinucleótido(s). Uma vez terminada a reacção de síntese do(s) dinucleósido(s) polifosfatos, as misturas de ensaio foram incubadas a 37°C, durante um período de 2 horas, na presença de 5 U de

fosfatase alcalina. Em seguida colocaram-se em banho maria fervente durante 90 segundos com o fim de desnaturar a proteína presente.

A purificação dos distintos nucleótidos sintetizados foi efectuda mediante a utilização de uma coluna Mono Q HR 5/5 (*Fig. 4 A*).

Antes de se proceder à separação cromatográfica, a coluna foi equilibrada com 10 ml de uma solução tampão de 0,17 M de bicarbonato de amónio, pH 8,7 (solução tampão de equilíbrio), seguida de nova lavagem de 10 ml de uma solução-tampão de 1,0 M de bicarbonato de amónio, pH 8,7 e, para terminar, novamente com a solução tampão de equilibrio (10 ml).

Em seguida 0,50 ml de amostra, previamente filtrada por filtros Millipore HAWP, foram injectados na coluna. A eluição efectuou-se a um fluxo constante de 1,0 ml/min, mediante a aplicação de um gradiente linear de 30 minutos de bicarbonato de amónio (0,17 M - 1,0 M) a pH de 8,7, seguida de uma eluição isocrática de 20 minutos de bicarbonato de amónio 1 M e ao mesmo valor de pH, tendo sido recolhidas fracções de 1 ml. O perfil cromatográfico foi acompanhado passo a passo mediante a visualização das variações da absorção a um comprimento de onda de 260 nm. As fracções que continham o(s) heteronucleótido(s) foram reunidas, liofilizadas à secura, ressuspendidas num pequeno volume de água destilada e novamente liofilizadas para eliminar completamente o bicarbonato de amónio.

Para se comprovar o grau de purificação dos nucleótidos obtidos, alíquotas das fracções, após ressuspenção dos respectivos liofilizados, foram analisadas por HPLC, utilizando uma coluna Hypersil ODS (C18) (*Fig. 4 B*), como se refere no ponto 3.2.e.1. A *Fig. 4* representa os perfis cromatográficos do processo de síntese de Ap4G (caso exemplificativo).

3.2.g. Separação cromatográfica de polifosfatos, recuperação e quantificação.

Utilizou-se uma coluna de DEAE-celulose de 5 ml equilibrada com uma solução tampão de 0,1 M de bicarbonato de amónio (pH 8,0). Após aplicação de quantidades adequadas dos polifosfatos em estudo, a coluna foi eluída com um gradiente de concentração em bicarbonato de amónio (pH 8,0) de 0,1 M a 0,4 M (para análise dos compostos P_i, PP_i, P_3, P_4 e P_5) e de 0,1 M a 0,8 M (para análise dos polifosfatos comerciais, P_{15} e P_{35}). O fluxo de eluição foi de 20-30 ml/h, recolhendo-se fracções de 2 ml.

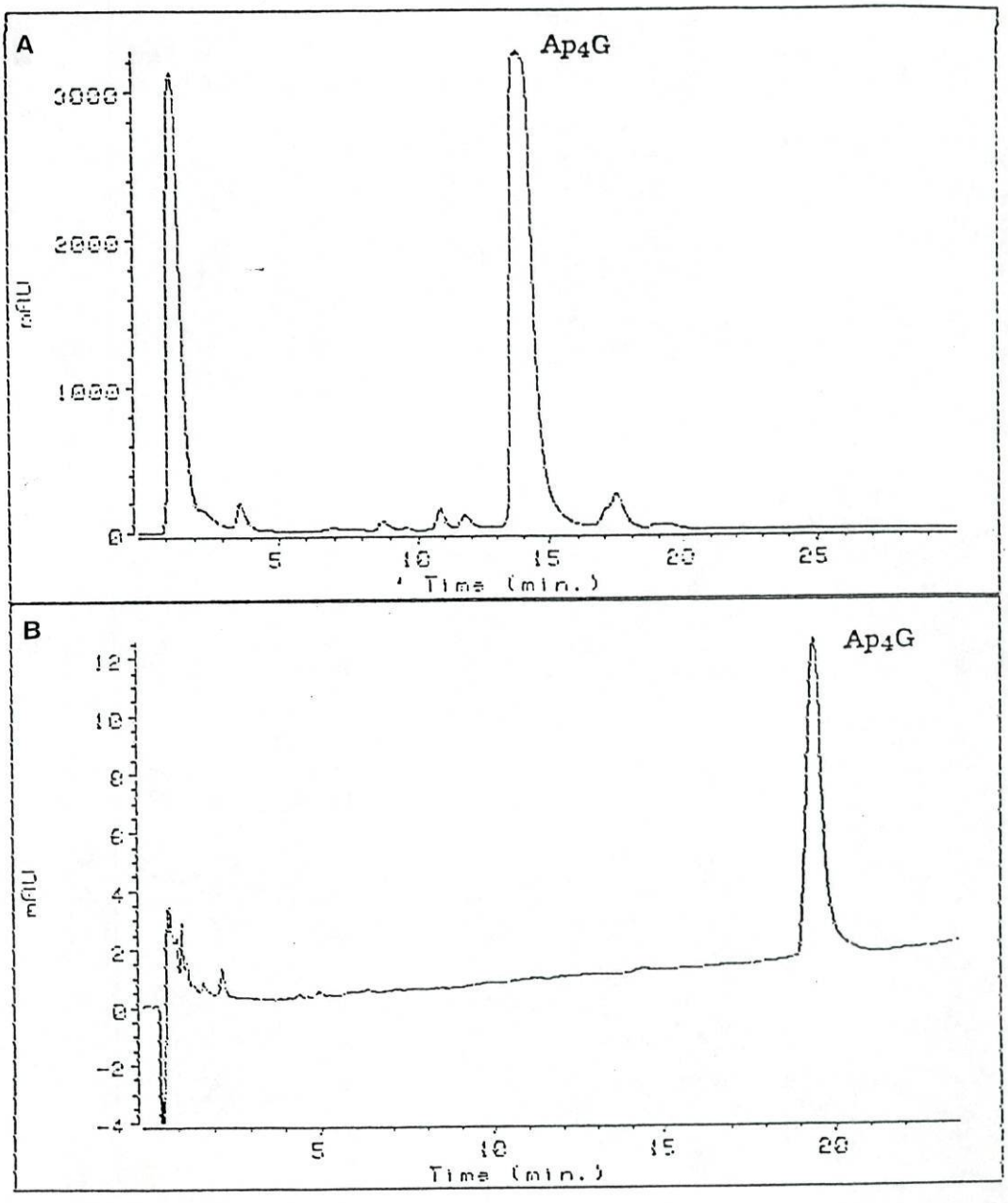


Fig. 4. Síntese de Ap_4G a partir de ATP[γS] e de GTP.

A. Perfil cromatográfico resultante da aplicação de uma alíquota de 0,5 ml da mistura de reacção para a síntese de Ap_4G, depois de tratada com fosfátase alcalina, na coluna de Mono Q eluída como se descreve no texto. B. Perfil cromatográfico resultante da aplicação de uma alíquota contendo Ap_4G purificado, numa coluna de Hypersil ODS (C18), eluída de acordo com o descrito em 3.2.e.1.

A análise qualitativa e quantitativa dos compostos resultantes do fraccionamento cromatográfico, foi efectuada mediante a adição de 1 mM de $MgCl_2$ e 1,7 U de fosfátase alcalina a uma alíquota de cada uma das fracções recolhidas, com o fim de hidrolisar todos os fosfatos. Após incubação a 37°C durante 60 minutos, determinou-se o P_i formado (Material e Métodos). Alternativamente, a hidrólise dos fosfatos foi conseguida mediante a incubação de alíquotas das fracções, suplementadas com ácido-súlfurico à concentração final de 0,5 M, a 100°C, durante 15 min, determinando-se o P_i formado de igual maneira.

As fracções pretendidas foram reunidas e liofilizadas. Após serem novamente ressuspendidas em 1 ml de água, foram sujeitas a liofilização, sendo o liofilizado retomado em 0,2 ml de água destilada. A concentração molar de cada preparação foi determinada a partir da quantidade de P_i total determinado, e do número de fosfatos estimado em cada cadeia para cada composto.

3.2.h. Centrifugação em gradiente de sacarose

Em solução tampão de TSE prepararam-se duas soluções de sacarose de concentrações diferentes, respectivamente, 5 e 20%.

Em tubo de centrifuga apropriado, depositaram-se primeiramente 5,6 ml da solução mais concentrada em sacarose. Em seguida, e sobre esta, adicionaram-se outros 5,6 ml da solução de sacarose a 5% com o máximo cuidado para evitar misturar as duas soluções. O tubo foi tapado e colocado, lenta e cuidadosamente, em posição horizontal pelo período de 4 a 5 horas à temperatura ambiente para se formar o gradiente contínuo. Antes da sua utilização, os gradientes foram deixados em repouso a 4°C.

Quantidades apropriadas de amostra (cerca de 0,2 ml) foram aplicadas na superfície do gradiente, sendo este, em seguida centrifugado a 38 000 x *g* durante 17 horas, numa ultracentrifuga refrigerada, utilizando rotor basculante SW-41, à temperatura de 2 °C. Terminada a centrifugação, e por aspiração desde a superficie dos tubos com auxílio de um fraccionador automático de gradientes, foram recolhidas fracções de 7 gotas (cerca de 0,3 ml).

Como marcadores de peso molecular utilizaram-se a catálase de figado de vitela (EC.1.11.1.6.) e a adenosina desamínase (EC.3.5.4.4). Uma alíquota de 0,02 ml da mistura destas duas enzimas de peso molecular conhecido, respectivamente 240 kDa e 38 kDa, foram adicionadas à superfície do gradiente simultaneamente com a amostra.

A massa molecular da enzima 5'-nucleotídase IMP/GMP específica foi determinada tendo como base a fórmula proposta por Martin y Ames (1961), que relaciona os valores de $S_{20,w}$ com as massas moleculares das proteínas problema e padrão, segundo,

$$S_{20,w}\ (px)/S_{20,w}\ (pp) = (MM\ (px)/MM\ (pp))^{2/3}$$

representando, MM, a massa molecular, (px), a proteína problema e (pp), a proteína padrão.

Se o volume das fracções recolhidas for suficientemente homogéneo, as distâncias percorridas pelas proteínas no gradiente podem ser substituidas pelo número de fracções. A distância de uma proteína pode, então, ser descrita como o número da fracção a que corresponde o máximo de actividade enzimática, podendo a fórmula de cálculo reescrever-se, de acordo com

$$MM\ (px) = MM\ (pp) \times [\text{distância}\ (px)/\ \text{distância}\ (pp)]^{3/2}$$

3.2.i. Métodos de concentração das amostras

Por vezes, dados os seus baixos teores em proteínas, algumas amostras, nomeadamente as provenientes da etapa 4 do processo de purificação, foram sujeitas a processos de concentração e/ou dessalinização. Estas técnicas de concentração foram utilizadas, normalmente, como etapas prévias quer na quantificação das proteínas, quer na preparação da(s) amostra(s) para electroforese.

3.2.i.1. Concentradores de membrana

Utilizaram-se concentradores Vivaspin 500 descartáveis de tipo 50000 MW (Vivascience), ou concentradores Microcon 50 (Amicon), ambos com uma capacidade máxima de 0,5 ml. O protocolo utilizado, com este tipo de dispositivo concentrador era muito simples consistindo apenas na centrifugação de 0,5 ml da amostra a concentrar, a 15 000 x *g*, durante 15 minutos e a 4°C (o volume mínimo residual está situado entre 5 e 15 µl).

Para volumes superiores até 15 ml utilizaram-se os concentradores Centriplus 50 (Amicon). O protocolo seguido, com este tipo de concentrador consistiu na centrifugação, à temperatura de 4°C, de um

volume de amostra adequado, não superior a 15 ml, a 3 000 x *g*, durante um período de tempo variavel em função do volume inicial da amostra (para 15 ml de volume inicial o período de centrifugação é de 40 a 45 minutos). O volume final da amostra (o volume mínimo residual é da ordem dos 0,5 ml) é por sua vez recuperado por transferência do reservatório de concentração para o reservatório de recuperação através de uma nova centrifugação de 3 a 4 minutos a 2 000 x *g*.

3.2.i.2. Sacarose

O material a concentrar era introduzido em manga de diálise, sendo em seguida totalmente submergida em sacarose sólida, por períodos convenientes, normalmente de 30 minutos. Uma vez absorvidas as quantidades de liquido pretendidas, a manga de diálise era submetida a uma diálise contra cerca de 1000 vezes o seu volume do tampão desejado.

3.2.i.3. Precipitação com ácido tricloroacético

De acordo com esta metodologia, as proteínas de uma determinada amostra eram precipitadas pela adicão de ácido tricloroacético até uma concentração final de 10%. A suspensão era imediatamente agitada e deixada em repouso por um período de 12 horas à temperatura de 4°C. O precipitado formado era então lavado com uma mistura em partes iguais de etanol absoluto e éter, centrifugado, sendo o sobrenadante rejeitado por decantação. Este processo era efectuado, pelo menos, duas vezes. Em seguida o precipitado proteico era lavado com éter frio, decantado, sendo o éter residual evaporado com o auxílio de uma corrente de ar quente. Todo este processo era efectuado em câmara fria à temperatura de 4°C para evitar a evaporação dos reagentes.

3.2.j. Troca de tampão por cromatografia em coluna de Sephadex G-25

Um dos processos utilizados na eliminação de compostos de baixo valor de massa molecular, particularmente na dessalinização das amostras, na troca e/ou eliminação de tampão das mesmas, foi o recurso a colunas de filtração por gel - coluna PD 10 (1,5 x 5 cm) - constituída por Sephadex G-25. A coluna era previamente equilibrada com cerca de 3 vezes o seu volume com o tampão final pretendido. Uma vez terminado este

passo, um volume máximo de 2,5 ml de amostra era aplicado na coluna, procedendo-se em seguida à sua eluição com o tampão utilizado no equilíbrio da mesma. Os primeiros 2,5 ml eluídos eram regeitados, recolhendo-se os 3,5 ml seguintes. A diluição da amostra final era de 1,4 vezes.

Estes 3,5 ml recolhidos contêm os constituintes da amostra em estudo com excepção daqueles com menor valor de massa molecular que eluem mais tarde.

Como o volume máximo aplicável é de 2,5 ml, nos casos em que o volume de amostra a utilizar é menor torna-se necessário ajustar o seu volume. Do mesmo modo, quando o volume da amostra é superior fazem-se sucessivas aplicações de 2,5 ml, lavando depois de cada aplicação, pelo menos, com um volume de solução tampão de equilibrio para eliminar os sais presentes no tampão de amostra.

3.2.k. Electroforese em gel de poliacrilamida

O perfil electroforético de proteínas das amostras em estudo foi obtido mediante electroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS), de acordo com o procedimento descrito por Laemmli (1970).

A electroforese realizou-se em placas de vidro apropriadas (10 x 10 x 0,15 cm), com 5 cm de gel separador de poliacrilamida a 12% (pH 8,8) e 2 cm de gel concentrador, igualmente de poliacrilamida mas a 4% (pH 6,8). A solução tampão de electroforese era constituída por Tris (25 mM), glicina (192 mM) e SDS 0,1% (p/v).

Às amostras em estudo adicionaram-se quantidades adequadas de tampão de amostra constituido por 65 mM de Tris, HCl, pH 6,8, 10% de glicerol (p/v), 2% SDS e 0,1% (p/v) de azul de bromofenol, bem como, por ditiotreitol (DTT) na concentração final de 60 mM. Em seguida, submeteram-se as amostras a aquecimento em banho maria fervente por 5 minutos, ao fim dos quais se colocaram imediatamente em gelo pelo período de 2 minutos. Foram centrifugadas a 13 000 rpm durante 1 min e aplicadas no gel. A electroforese decorreu sob uma corrente de 30 mA (200 V), pelo período de cerca de uma hora e à temperatura ambiente. Paralelamente, e nas mesmas condições, preparou-se uma solução padrão de proteínas constituídas por Fosforílase b (97,4 kDa), albumina sérica (66,2 kDa), ovoalbulmina (45,0 kDa), anídrase carbónica (31,0 kDa), inibidor da tripsina (21,5 kDa) e a lisozima (14,4 kDa).

Após electroforese a detecção e visualização das bandas de proteínas foi efectuada por dois processos de coloração diferentes de acordo com os objectivos propostos:

(i) Coloração com o Azul Brilhante de Comassie (Comassie Brillant Blue R 250), segundo o protocolo descrito por Fairbanks e col. (1971).

(ii) Coloração pelo nitrato de prata, de acordo com o protocolo descrito por Merril (1981).

3.2.l. Determinação de proteínas

A quantificação das proteínas efectuou-se mediante a aplicação do método colorimétrico, proposto por Bradford (1976) utilizando o reagente de Bradford (Comassie Brillant Blue G-250) e como proteína padrão a albumina sérica bovina (BSA). Estes ensaios efectuaram-se sempre em duplicado e com pelo menos duas quantidades diferentes de amostra.

Em ensaios preliminares para determinação do volume de amostra apropriado para o método de Bradford procedeu-se à medição da absorvância da amostra a 280 nm e a 260 nm, determinando-se, assim o correspondente teor em proteínas, de acordo com Stoscheck (1990). No traçado dos perfis de eluição cromatográficos de proteínas utilizou-se, simplesmente, a medição da absorção a 280 nm.

3.2.m. Determinação da concentração das soluções de nucleótidos

As soluções de nucleótidos efectuaram-se mediante dissolução em água de quantidades adequadas de cada (di)nucleótido(sido) obtidas por pesagem. Uma vez obtidas estas soluções as molaridades de cada uma delas foi confirmada por absorção, conhecidos os respectivos valores de coeficiente de extinção molar a determinado comprimento de onda correspondente ao seu máximo de absorção a pH 7,0 (Dunn e Hall, 1968; Holler e col., 1983).

3.2.n. Preparação de Cibacron Blue F3G-A Sepharose 4B

O cibacron blue F3G-A Sepharose 4B preparou-se de acordo com o protocolo modificado proposto por Böhme e col. (1972), que essencialmente se traduz na substituição da resina de Sephadex G-200, por ele utilizada, por Sepharose 4B.

O primeiro passo consistiu na obtenção de um gel de Sepharose 4B mediante a diluição de 100 ml de Sepharose 4B em 1000 ml de água destilada. Uma vez formada esta suspensão procedeu-se ao seu aquecimento em banho maria a 60°C.

Paralelamente, dissolveu-se em 30 ml de água destilada 1 g de Cibacron-Blue F3G-A e adicionou-se ao gel de Sepharose 4B gota a gota sob agitação suave e constante. Uma vez adicionado todo o corante a solução foi mantida em contínua e lenta agitação por mais 15 minutos.

Em seguida adicionaram-se 45 g de NaCl sob agitação contínua por mais 30 minutos. Terminado este período de tempo elevou-se a temperatura da mistura até 71°C, sempre com agitação contínua, de forma a evitar a liquefacção do gel uma vez que a sua temperatura de fusão é de 75°C. Em seguida adicionou-se 4 g de carbonato de sódio (Na_2CO_3) mantendo-se a temperatura e a agitação constantes por mais 90 minutos. Ao fim deste período deixou-se arrefecer esta suspensão à temperatura ambiente sem agitação. Eliminou-se o excesso de corante não ligado à Sepharose 4B mediante uma filtração por funil de Büchner. Esta filtração foi efectuada com cuidado de modo a evitar uma possível ruptura do gel.

O gel foi continuamente lavado até se verificar ausência de coloração das soluções de lavagem e guardado em 0,02 % de azida sódica até ao momento de emprego.

4. Resultados e Discussão

4.1. Purificação e propriedades da 5'-nucleotídase citosólica IMP/GMP específica

4.1.a. Estudos preliminares

Antes de se estabelecer o protocolo mais adequado para a purificação da 5'-nucleotídase activada por Ap_4A realizaram-se uma série de provas que incluíam, principalmente, fraccionamento proteico com sulfato de amónio, cromatografia de troca-iónica e cromatografia de afinidade. Apresentar-se-á, em seguida, um breve resumo destacando os resultados mais importantes.

4.1.a.1. Actividades nucleotidásicas no cérebro de rato. Evidência da existência da enzima 5'-nucleotídase activada por Ap_4A no cérebro de rato.

Franco e col. (1981) descreveram a presença, no cérebro de rato, de uma 5'-nucleotídase solúvel possuindo como substrato preferencial o AMP (K_m = 24 μM), seguido de IMP (K_m = 110 μM) e de GMP (K_m = 220 μM), cuja actividade não era dependente da presença de iões Mg^{2+}.

Posteriormente, o mesmo grupo de trabalho (Centelles e col.,1986) encontraram que as 5'-nucleotídases solúvel e membranar de cérebro de rato eram cineticamente indistinguíveis, caracterizando-se por possuírem valores similares de K_m e de K_i para o AMP e ADP, respectivamente. Outra característica muito particular destas nucleotídases era a sua inibição irreversível por EDTA (Mallol e Bozal, 1983).

Ao iniciar o estudo sobre as 5'-nucleotídases de cérebro de rato propôs-se verificar a existência, para além da enzima 5'-nucleotídase solúvel acima descrita e inibida por nucleósidos tri- e difosfatos, da 5'-nucleotídase solúvel, estimulada pelo ATP, Ap_4A e por 2,3-difosfoglicerato e dependente da presença de iões Mg^{2+}, descrita em outros tecidos estudados (Itoh e col., 1967; Itoh, 1981; Itoh e Oka,1985; Pinto e col., 1986, 1987; Bontemps e col., 1988, 1989a,b; Spychala e col., 1988, 1989; Le Hir, 1991).

A existência da enzima 5'-nucleotídase activada por Ap_4A no cérebro de rato foi posta em evidência através do estudo cromatográfico de um homogeneizado celular em coluna de Sephacryl S-300. Alíquotas das distintas fracções obtidas foram suplementadas com EDTA e incubadas a 4°C, durante 18 horas, com o fim de inactivar a 5'-nucleotídase previamente descrita (Franco e col., 1981; Mallol e Bozal, 1983). Após este

tempo, determinaram-se, em paralelo, as actividades enzimáticas sobre o AMP, IMP e IMP na presença de Ap_4A como efector, nas fracções pre-incubadas na presença de EDTA e nas mesmas fracções mantidas em idênticas condições de incubação mas sem EDTA.

Os resultados obtidos encontram-se detalhados na *Fig. 5.*

Na parte A da Figura (fracções não incubadas com EDTA) observa-se um pico de actividade hidrolítica sobre o AMP (0,5 mM) cujo máximo corresponde à fracção 71. Com o IMP (0,5 mM) como substrato, a actividade foi algo menor apesar do seu perfil de actividade ser muito parecido ao obtido em presença de AMP. A actividade sobre o IMP não se alterou significativamente em presença Ap_4A. Na parte B da mesma Figura (resultados obtidos pela determinação em simultâneo das actividades enzimáticas nas fracções com e sem pré-incubação com EDTA), verifica-se ao pré-incubar com EDTA), (i) uma grande diminuição da actividade enzimática sobre o IMP, (ii) uma forte activação pelo Ap_4A, e (iii) um deslocamento, neste último caso, do máximo de actividade três fracções para a direita.

Estes resultados apontam claramente para a existência de, pelo menos, duas actividades 5'-nucleotidásicas solúveis no cérebro de rato:

(i) A primeira, eluindo em fracções correspondentes a um peso molecular mais elevado e que poderia tratar-se da 5'-nucleotídase já descrita.

(ii) A segunda, activada pelo Ap_4A, de massa molecular algo menor e que deveria corresponder à 5'-nucleotídase IMP/GMP específica, descrita em outros tecidos.

Assumindo que o Ap_4A estimula a 5'-nucleotídase purificada, em, aproximadamente, 6 vezes, calculou-se a partir da actividade verificada na ausência e na presença de Ap_4A, que nas fracções não tratadas com EDTA, apenas, cerca de 10% da actividade hidrolítica total sobre o IMP, poderia corresponder á enzima IMP/GMP específica.

4.1.a.2. Fraccionamento com sulfato de amónio.

Segundo os dados bibliográficos da enzima purificada a partir de outras fontes, a actividade 5'-nucleotidásica precipita, na sua maior parte, na presença de 45% de saturação de sulfato de amónio.

Com o fim de comprovar se no cérebro de rato, o comportamento era similar, procedeu-se ao fraccionamento de um homogeneizado de cérebro em THE, obtido como se descreve em Material e Métodos, com sulfato de

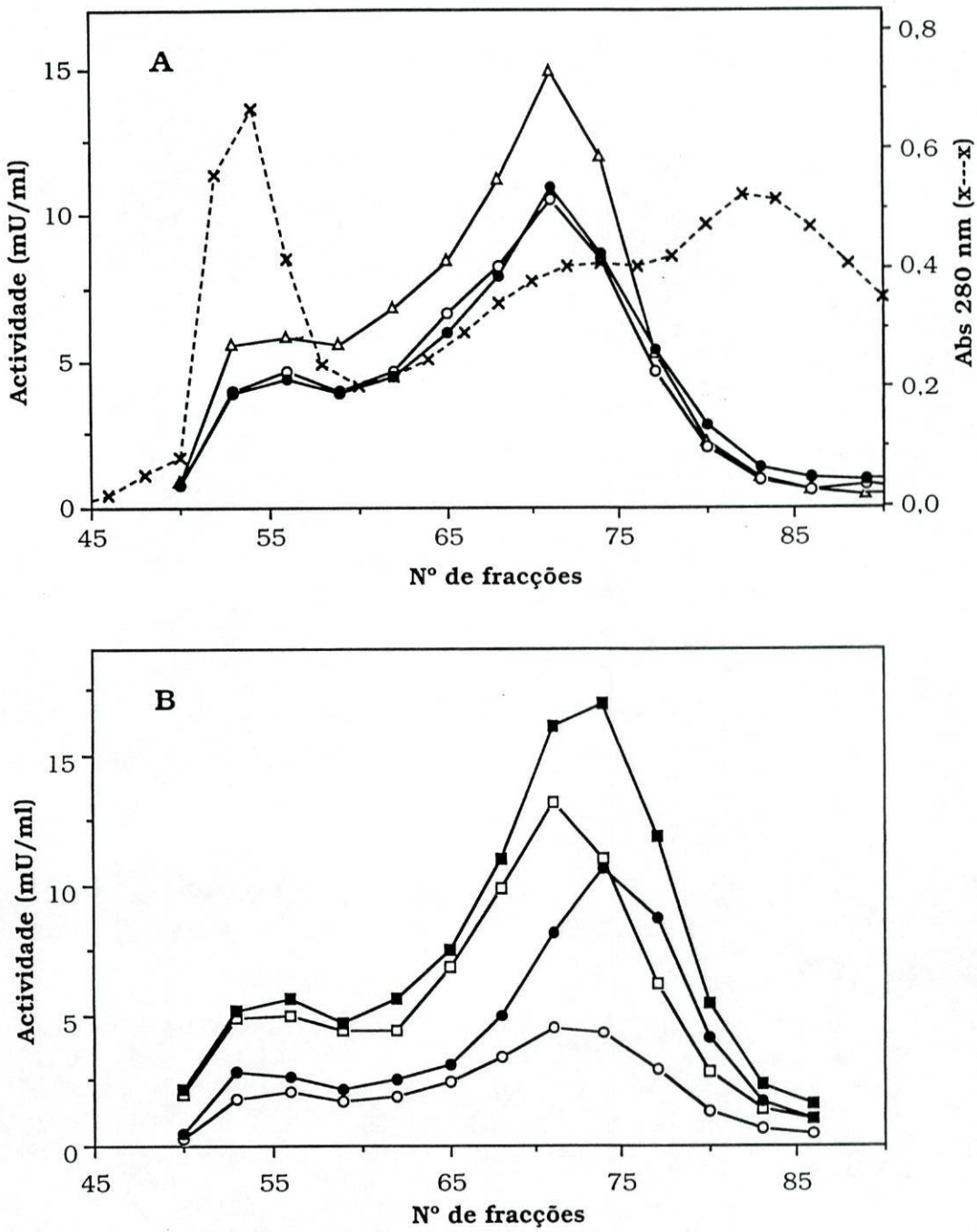


Fig. 5. Actividades nucleotidásicas no cérebro de rato.

Numa coluna de Sephacryl S-300 (2 x 100 cm), equilibrada em TS, aplicaram-se 6,5 ml de um precipitado com sulfato de amónio até 70% de saturação, proveniente de um homogeneizado cerebral de rato. Após aplicação da amostra a coluna foi eluída a um fluxo de 5 ml/h com TS, sendo recolhidas fracções de 2,5 ml.

Em **A**, as actividades sobre o AMP (▵) e o IMP (ambos na concentração final de 0,5 mM) na presença (•) e na ausência (○) de Ap_4A foram determinadas pela quantificação do P_i formado (Material e Métodos). O perfil proteico (a tracejado) foi determinado pela absorção a 280 nm. Em **B**, alíquotas das fracções obtidas foram incubadas 18 horas a 4°C na presença (circulos) e na ausência (quadrados) de EDTA (concentração final de 1 mM). Em ambos os casos as actividades foram determinadas em paralelo sobre IMP (2 mM) na presença (negro) e na ausência (branco) de Ap_4A como o descrito em **A**.

amónio de 0-45 % e de 45-65 %. Nos precipitados obtidos determinou-se os seus teores em proteínas e a suas actividades 5'-nucleotidásicas.

Como se pode observar, os resultados obtidos (*Tabela 1*) apontam no sentido da enzima precipitar preferencialmente no intervalo de saturação entre 0 e 45% e ter uma precipitação inferior a 10% do total recuperado, quando o intervalo de saturação em sulfato de amónio está comprendido entre os 45 e os 65%. Deste modo, pareceu mais conveniente sacrificar os cerca de 10% de actividade e utilizar para a purificação da enzima o precipitado de proteínas obtido no intervalo de 0 a 45% de saturação, onde a actividade específica é superior.

Tabela 1. Fraccionamento da actividade 5'-nucleotidásica de cérebro de rato, com sulfato de amónio.

Sulfato de amónio (%)	Actividade total (mU)	Proteínas totais (mg)	Actividade específica (mU/mg)
0-45	307	33,0	9,3
45-65	32	18,8	1,7

A determinação da actividade enzimática foi efectuada após diálise dos respectivos precipitados, frente a TSE, quantificando o Pi formado, usando como substrato o IMP (2 mM) na presença de Ap4A (0,050 mM), segundo as condições descritas em Material e Métodos. Na determinação da concentração em proteínas utilizou-se o método de Bradford (1976).

4.1.a.3. Cromatografia em coluna de fosfocelulose.

A aplicação da cromatografia com uma resina de fosfocelulose, ao processo de purificação da enzima em estudo, deveu-se ao facto de a mesma ter sido utilizada por outros autores com bom rendimento na purificação da mesma enzima a partir de outros tecidos (Naito e Tsushima, 1976; Itoh, 1981; Carson e Wasson, 1982; Itoh e Oka, 1985; Spychala e col., 1988; Truong e col., 1988; Itoh e Yamada, 1990; Le Hir, 1991).

Num dos primeiros ensaios efectuados, nas condições descritas na *Fig. 6*, obteve-se um perfil cromatográfico que punha em evidência a existência de dois picos de actividade nucleotidásica sobre o IMP, eluíndo o primeiro com o excluído da coluna cromatográfica, e o segundo, aquando a aplicação do gradiente linear de NaCl. A distribuição percentual da actividade enzimática recuperada sobre o IMP nos picos excluído e eluído com o gradiente de NaCl era de, respectivamente, 52 % e 48 %.

Observou-se, igualmente, que às razões entre as actividades fosfatásicas sobre o IMP na presença e na ausência de 0,050 mM de Ap_4A, correspondiam, para o primeiro e para o segundo picos, valores de, respectivamente, 2,8 e 6,0. Estes dados, sugerem a co-eluição no excluído de actividades fosfatásicas não estimuladas pelo Ap_4A, dando lugar, como se observa na *Fig. 6*, a que os picos máximos de actividade para o IMP na presença e na ausência de Ap_4A não sejam coincidentes.

Os resultados obtidos, indicam, por um lado, a existência de mais que uma actividade nucleotidásica na fracção de 45 % de sulfato de amónio e, por outro, a actividade 5'-nucleotidásica activada pelo Ap_4A elui, principalmente, durante a aplicação do gradiente de NaCl, se bem que parte se recupere no excluído da coluna.

Com o fim de esclarecer se a actividade 5'-nucleotidásica estimulada pelo Ap_4A que se recupera no excluído podia ser atribuída a uma sobrecarga da coluna, procedeu-se à repetição do ensaio, duplicando o volume da coluna e variando as condições de eluição, já que, neste caso, depois de eluir a amostra com a solução tampão de equilíbrio, se eluiu com uma solução tampão de TSE, suplementada com 0,2 M de NaCl, antes da aplicação do gradiente de 0,2 a 0,8 M em NaCl na mesma solução tampão de TSE.

Nestas condicões de eluição observam-se três picos de actividade nucleotidásica (*Fig. 7*), eluindo o (i) primeiro, com o excluído da coluna cromatográfica, (ii) o segundo, quando a eluição se processa com a solução tampão de TSE suplementada com 0,2 M de NaCl e (iii) o terceiro quando a eluição é realizada mediante a utilização de um gradiente contínuo de NaCl (0,2 a 0,8 M).

A distribuição percentual da actividade enzimática recuperada sobre o IMP em presença de Ap_4A nos picos I, II e III foram de, respectivamente, 42%, 14% e 44%. As razões entre as actividades nucleotidásicas sobre o IMP determinadas na presença e na ausência de 0,050 mM de Ap_4A foi de 1,5, 3,6 e 5,7 para os picos I, II e III, respectivamente. O aumento para o

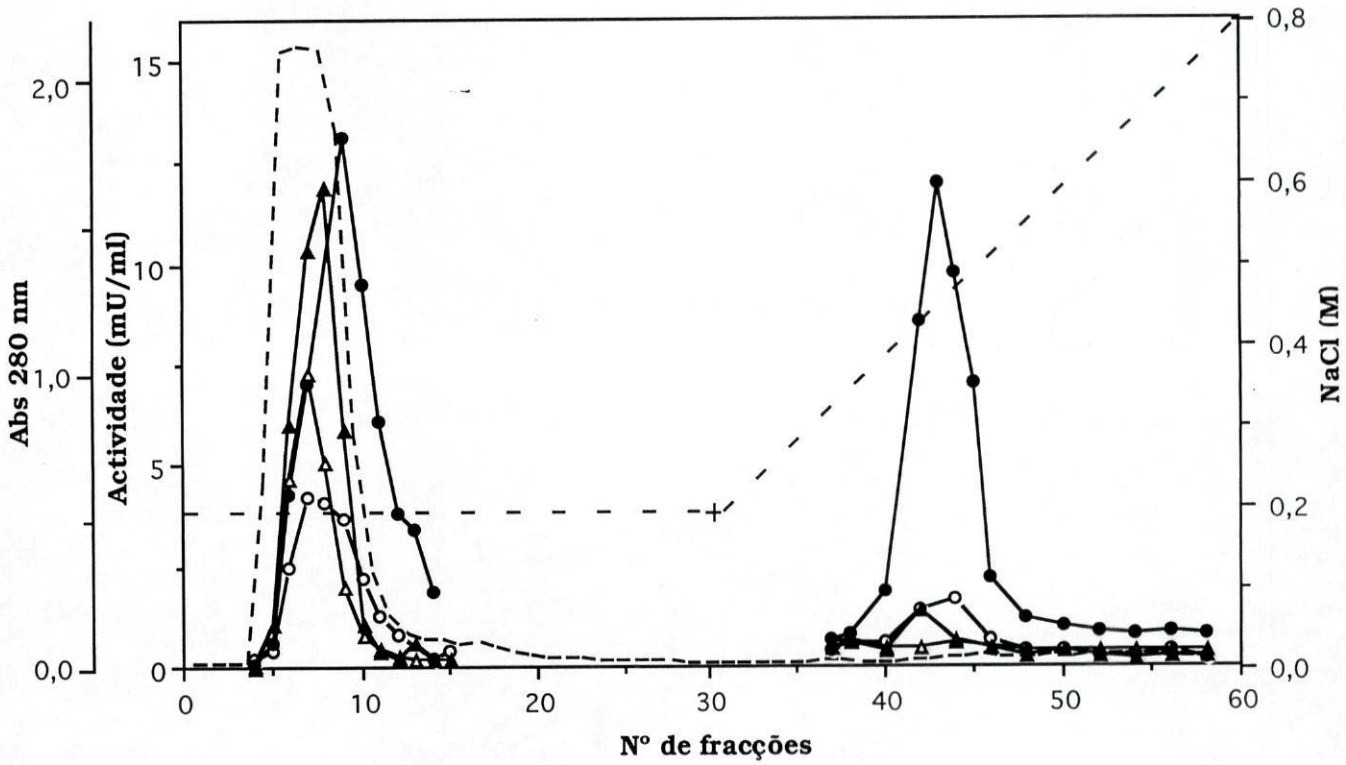


Fig. 6. Cromatografia em coluna de fosfocelulose (8 ml).

A uma coluna de fosfocelulose de 8 ml, equilibrada com uma solução de TSE suplementado com 0,2 M de NaCl aplicaram-se 3,2 ml (28,2 mg de proteína) da fracção de 45 % de sulfato de amónio (proveniente de homogeneizado de cérebro de rato). A coluna foi lavada com uma solução tampão de TSE de equilibrio (40 ml) e eluída por um gradiente de 40 ml de NaCl de 0,2 a 0,8M (--+--) na mesma solução tampão. A eluição decorreu a um fluxo constante de 35-40 ml/h e o volume das fracções recolhidas foi de 1,2 ml. A actividade nucleotidásica foi determinada pela quantificação do P_i formado (Material e Métodos), utilizando o IMP (círculo) e o AMP (triângulo) como substratos (2 mM) na presença (a negro) e na ausência (a branco) de Ap_4A (0,050 mM). O perfil proteico (tracejado) foi determinado a 280 nm.

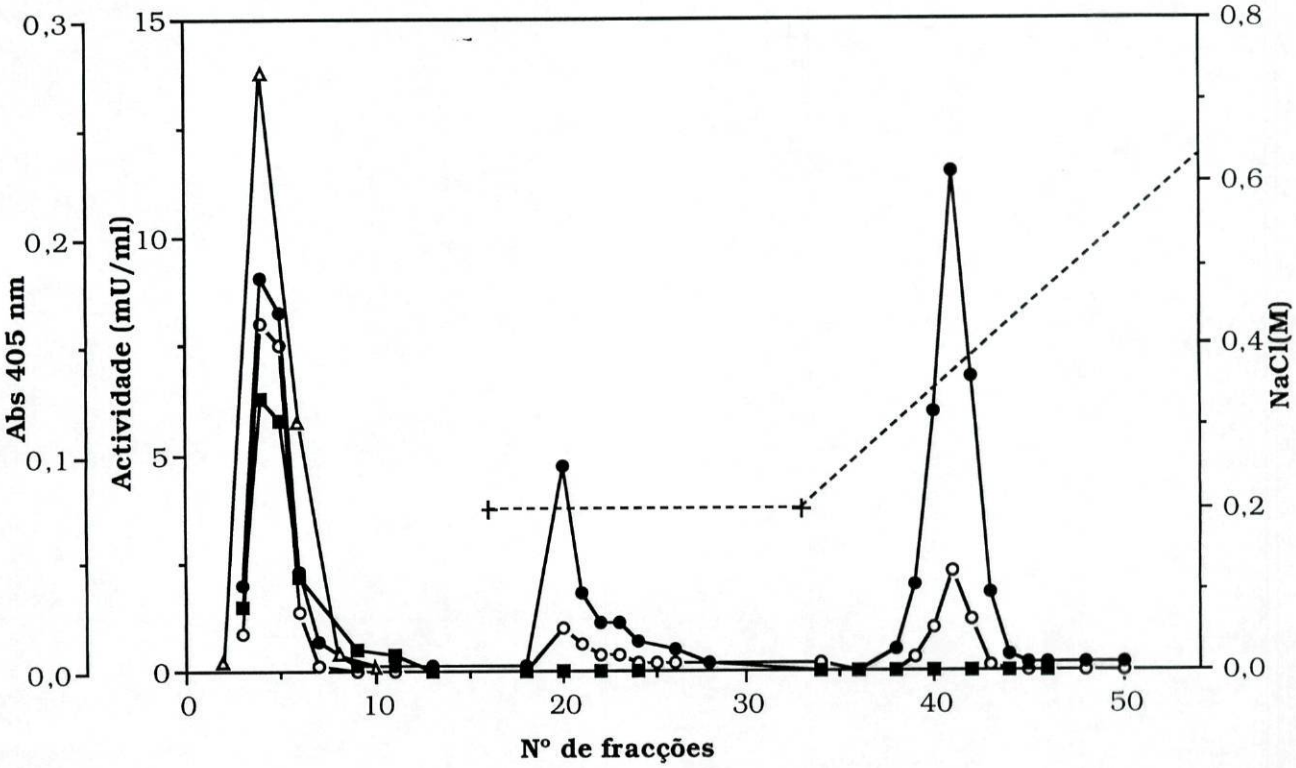


Fig. 7. Cromatografia em coluna de fosfocelulose (17 ml).

A uma coluna de coluna de fosfocelulose de 17 ml (5,5 x 2,0 cm), equilibrada com solução tampão de TSE aplicaram-se 3,4 ml (25,7 mg de proteína) da fracção de 45 % de sulfato de amónio. A eluição decorreu, sucessivamente, (i) com 45 ml de solução tampão de equilibrio, (ii) com uma solução tampão de TSE suplementada com 0,2 M de NaCl (45 ml) e por fim, (iii) com um gradiente de 85 ml de NaCl (0,2 a 0,8M) na mesma solução tampão de TSE. A actividade 5'-nucleotidásica foi determinada pela quantificação do P_i formado (Material e Métodos), utilizando como substratos, o IMP na presença (●) e na ausência de (○) Ap_4A e o AMP na presença de Ap_4A (■). O perfil das actividades fosfatásicas inespecíficas (▲) foi determinado a 405 nm, usando o p-nitrofenilfosfato como substrato (Material e Métodos).

dobro do tamanho da coluna não teve como consequência o aumento da actividade 5'-nucleotidásica eluída com a aplicação do gradiente.

Como se pode verificar na *Fig. 7*, as actividades fosfatásicas inespecíficas, determinadas em meio ácido e em meio alcalino, como se descreve em Material e Métodos, aparecem no excluído da coluna (pico I). Estas actividades são as responsáveis em parte pela libertação do P_i quando se utilizam o IMP ou o AMP como substratos, embora ainda se observe uma certa actividade enzimática estimulada pelo Ap_4A, sobre estes nucleósidos monofosfatos.

A existência de actividade nucleotidásica sobre o AMP, observa-se essencialmente nas fracções correspondentes ao excluído da coluna (pico I). Nas fracções correspondentes aos picos II e III a actividade sobre o AMP é praticamente vestigial quando na ausência de Ap_4A.

Em relação com a actividade nucleotidásica estimulada pelo Ap_4A presente nos picos II e III observou-se que possuiam uma estabilidade diferente em relação à temperatura. Na *Tabela 2* e nas *Fig. 8 e Fig. 9* estão representados os resultados obtidos quando alíquotas das fracções correspondentes aos picos II e III da coluna de fosfocelulose foram incubadas na presença de BSA 1 mg/ml, (i) pelo período de 5 minutos a diferentes temperaturas (40, 45, 50, 55, 60 e 70 °C) ou (ii) a uma temperatura constante de 50 °C e variando o tempo de incubação (5, 10, 20 e 30 minutos).

Os valores de T_m, isto é, o valor da temperatura para a qual corresponde uma inactivação de 50% da enzima, determinados para cada um dos picos de actividade II e III, (*Fig. 8*) foram de 49 °C e 57° C, respectivamente.

O perfil de inactivação da enzima, quando incubada a uma mesma temperatura (50 °C) durante tempos diferentes, é muito distinto para os picos II e III. Enquanto que, o pico II perde cerca de 70 % de sua actividade nos primeiros 10 minutos de incubação, mantendo-se praticamente constante até ao término do ensaio (30 min), a actividade correspondente ao pico III diminui gradualmente (perde, apenas, cerca 18 % nos 10 primeiros minutos), apresentando ao fim de 30 minutos uma actividade residual de cerca de 60%. Este distinto comportamento da actividade nucleotidásica presente em ambos picos poderia ser explicada pelo facto de (i) tratar-se de duas actividades diferentes, (ii) ser a mesma actividade mas de algum modo distinta (proteólise parcial da enzima, distintos graus de agregação da mesma, etc) ou então (iii) pela presença de duas actividades

distintas no pico II, sendo uma mais sensível ao calor, responsável pela queda brusca inicial, e outra mais estável e mais similar ao pico III.

Tabela 2. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima.

	Pico II		Pico III	
°C	(mU/ml)	(%)	(mU/ml)	(%)
35	4,6	100	7,9	100
40	4,9	107	8,3	105
45	3,6	78	7,6	96
50	1,9	41	6,8	86
55	0,7	15	6,3	80
60	0,1	4	0,5	6
70	<0,1	<4	<0,5	<6

Após incubação durante 5 minutos, as alíquotas de enzima foram colocadas em gelo e centrifugadas a 13 000 rpm durante 2 min. A actividade nucleotidásica residual de cada amostra foi determinada pela quantificação do P_i formado (Material e Métodos). Todos os ensaios foram efectuados em duplicado.

Como se referiu anteriormente este tipo de resina foi utilizado como suporte em colunas de cromatografia durante os processos de obtenção e/ou de purificação de enzima similar, presente em outros tecidos e/ou proveniente de outras origens. Apesar da sua frequente utilização, até ao momento, nenhum dos distintos estudos efectuados descreveu ou referiu a existência de 2 picos de actividade enzimática (pico II e pico III) encontrados durante e execução deste trabalho. Este facto pode ser explicado pelos diferentes protocolos de eluição utilizados durante os processos cromatográficos. Enquanto que, em alguns casos, a eluição se processa com a aplicação de um gradiente em NaCl de 0,2 M a 0,8 M

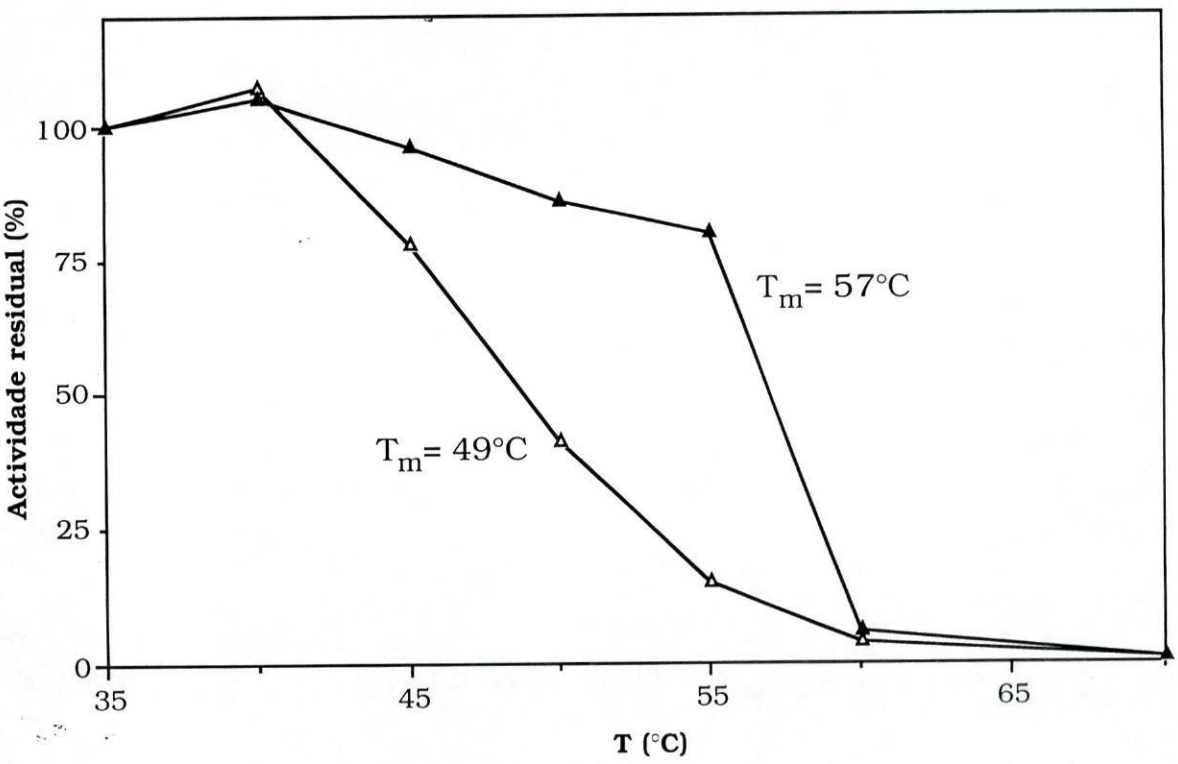


Fig. 8. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima.

A actividade enzimática residual de cada um dos picos II (△) e III (▲) da coluna de fosfocelulose, foi determinada pela quantificação do P_i (Material e Métodos) após pré-incubação de alíquotas de enzima durante 5 min a diferentes valores de temperatura, tal como indicado no texto. Todos os ensaios foram efectuados em duplicado.

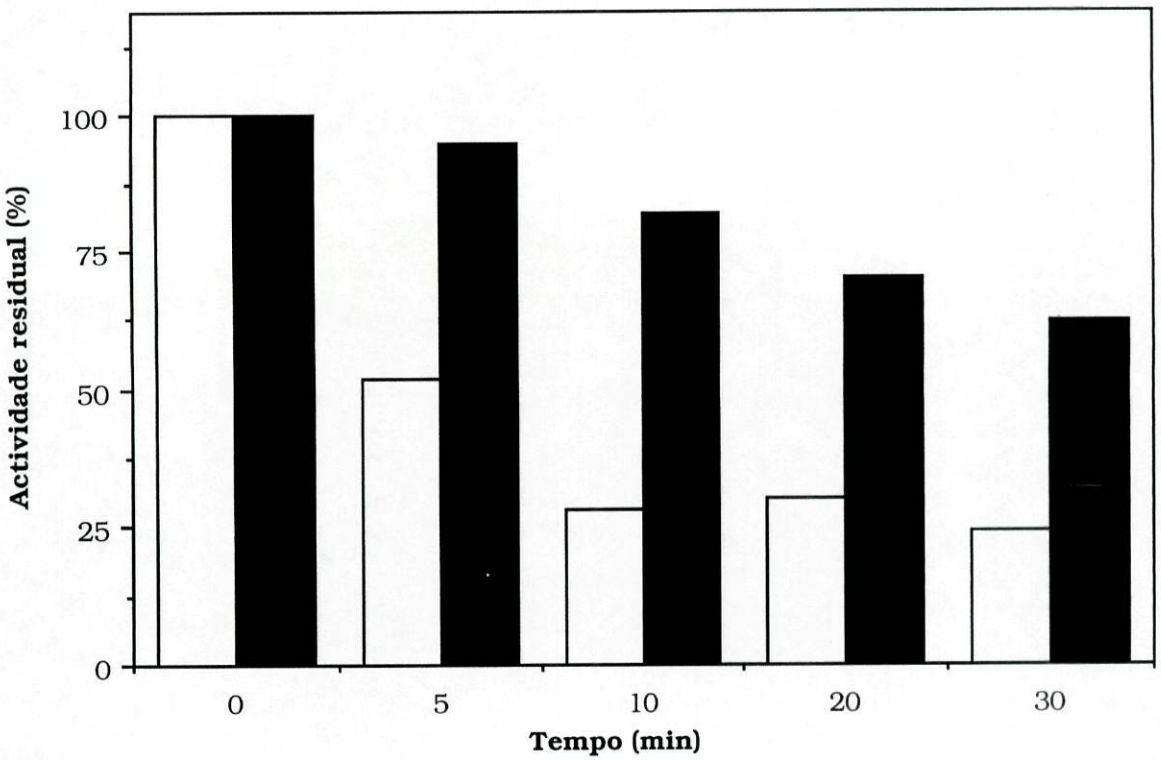


Fig. 9. Efeito do tempo de aquecimento sobre a actividade da enzima.

Amostras dos picos II (branco) e III (negro) da coluna de fosfoceluose foram incubadas na presença de BSA 1 mg/ml, à temperatura de 50°C, durante os períodos de tempo indicados. Ao fim desses tempos, determinaram-se as correspondentes actividades residuais pela quantificação do P_i formado (Material e Métodos). Todos os ensaios foram efectuados em duplicado.

depois de uma prévia lavagem com 0,2 M de NaCl em tampão de equilibrio e na qual, aparentemente, não se determina a actividade (Naito e Tsushima, 1976; Itoh, 1981; Carson e Wasson, 1982; Itoh e Yamada, 1990), noutros, a etapa de fosfocelulose aplica-se depois de uma prévia cromatografia de afinidade em AMP-Sepharose (Truong e col., 1988; Spychala e col., 1988; Le Hir, 1991).

4.1.a.4. Cromatografia de afinidade em coluna de Cibacron Blue F3G-A Sepharose 4B

O estudo da aplicação desta cromatografia de afinidade ao processo de purificação da 5'-nucleotídase de cérebro de rato teve como base os bons resultados com ela obtidos durante a última etapa de purificação da 5'-nucleotídase a partir da *Artemia* (Pinto e col., 1987).

A resina utilizada, constituída por Sepharose 4B onde se liga covalentemente o Cibacron Blue, foi preparada segundo o protocolo descrito em Material e Métodos. Como fonte de enzima foi utilizado o material correspondente ao pico III da coluna de fosfocelulose.

Realizaram-se dois tipos de ensaios:

(i) Eluição da enzima pela aplicação de um gradiente descontínuo de concentração crescente de NaCl em tampão de eluição (*Fig. 10*).

(ii) Eluição da actividade enzimática mediante a aplicação de um gradiente contínuo de NaCl no mesmo tampão de eluição uma vez que é conhecida a concentração de NaCl correspondente à eluição da enzima (*Fig. 11*).

Se bem que o rendimento obtido com este tipo de coluna tenha sido satisfatório sob o ponto de vista de recuperação das actividades nucleotidásicas (60-80%), o facto de observar-se, de uma maneira sistemática, a presença de mais que um pico de actividade (*Fig. 11*), fenómeno não previamente descrito para esta enzima, conduziu à opção de estudar o comportamento da mesma noutro tipo de colunas de afinidade.

4.1.a.5. Cromatografia da 5'-nucleotídase em coluna de afinidade de Dyematrex Green A

O Dyematrex Green A é uma resina de afinidade constituida por agarose ligada covalentemente ao corante Matrex Green A. Este tipo de resina foi utilizado inicialmente por Tozzi e col. (1991), durante a

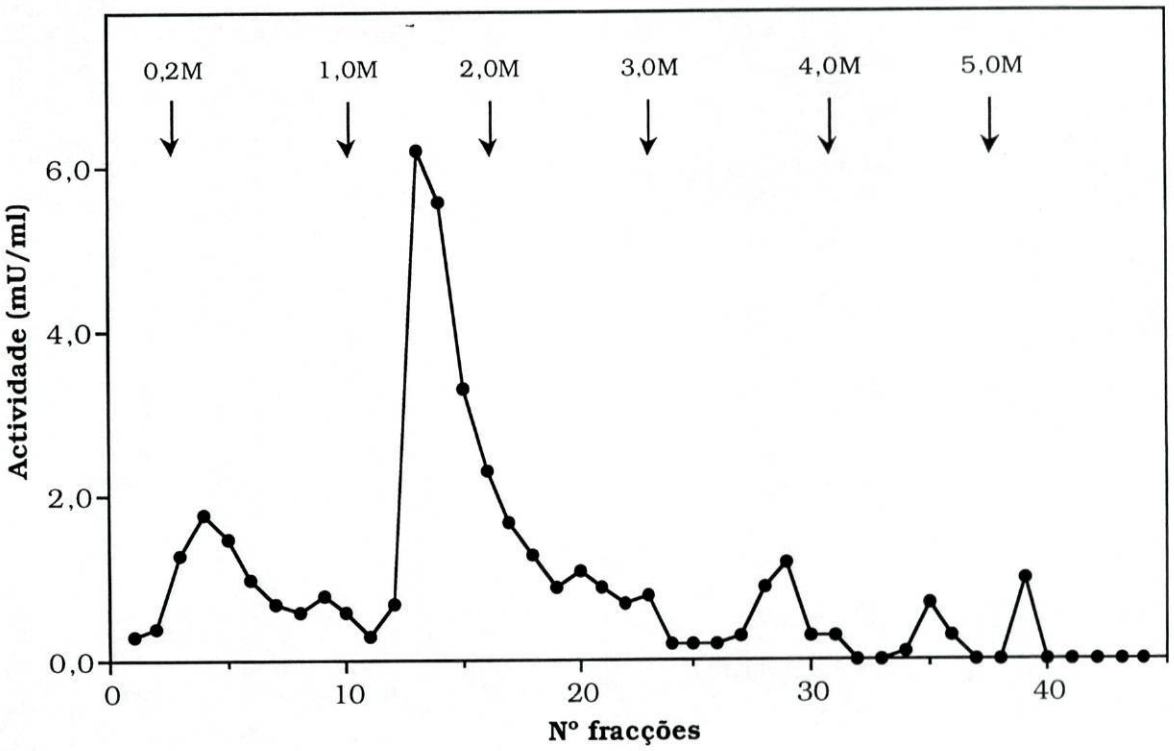


Fig. 10. Perfil cromatográfico da actividade 5'-nucleotidásica em coluna de Cibacron Blue F3G-A Sepharose 4B, mediante eluição por gradiente descontínuo de NaCl.

A uma coluna de 1,7 ml equilibrada com solução tampão de TSE suplementada com 0,2 M de NaCl aplicaram-se 0,95 ml (25 mU) de enzima correspondente ao pico III da coluna de fosfocelulose. Aplicada a amostra, a coluna foi sujeita a uma lavagem com 4,0 ml da mesma solução tampão de TSE suplementada com 0,2 M de NaCl. De seguida eluíu-se sucessivamente, com 3,5 ml de cada uma das soluções de NaCl indicadas, em TSE. A actividade 5'-nucleotidásica nas distintas fracções (•) foi determinada mediante a quantificação do P_i formado (ver Material e Métodos).

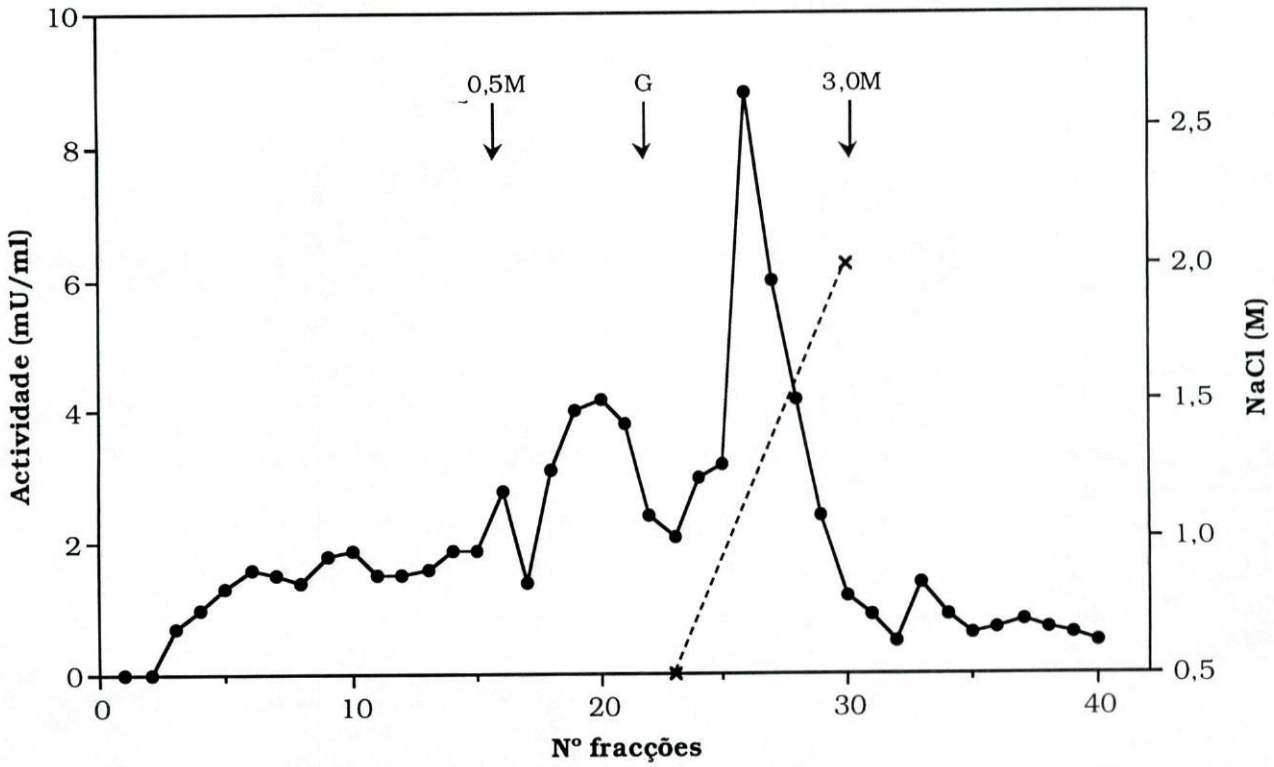


Fig. 11. Perfil cromatográfico da actividade 5'-nucleotidásica em coluna de Cibacron Blue F3G-A Sepharose 4B, utilizando um gradiente contínuo de NaCl em solução tampão de TSE.

A uma coluna de 1,7 ml aplicaram-se 13 ml (109 mU) de enzima proveniente do pico III de uma coluna de fosfocelulose. Após a aplicação, a coluna, previamente equilibrada, foi lavada com 7 ml de uma solução de TSE suplementada com 0,5 M de NaCl. Seguidamente procedeu-se à sua eluição utilizando um gradiente linear de 7 ml de NaCl de 0,5M a 2,0 M em TSE (-×-). A eluição terminou com 10 ml de TSE, suplementada com 3,0 M de NaCl. O volume das fracções recolhidas foi de 1,0 ml. A actividade 5'-nucleotidásica (•) determinou-se mediante a quantificação do P_i formado, como se descreve em Material e Métodos.

purificação da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica a partir de carcinoma do cólon humano, com aparentemente, bons resultados.

Com o objectivo de estudar a sua possível aplicação ao processo de purificação da 5'-nucleotídase de cérebro de rato, realizaram-se vários ensaios que a seguir se descrevem, utilizando o pico III da coluna de fosfocelulose (*Fig. 7*).

Em primeiro lugar estudou-se a eluição da enzima mediante a aplicação de um gradiente descontínuo de concentrações crescentes de NaCl numa solução tampão de TSE (*Fig. 12*). Nestas condições, no perfil cromatográfico obtido observam-se dois picos de actividade 5'-nucleotidásica claramente definidos, correspondendo um à eluição com 1,0 M de NaCl e outro, à eluição com 2,0 de NaCl. A actividade total recuperada em cada foi de 55% e de 45%, respectivamente, para o primeiro e para o segundo pico. De ambos os picos efectuou-se o estudo electroforético em gel de poliacrilamida, na presença de SDS, observando-se em ambos casos a presença de uma banda, que se supõe ser a banda correspondente à enzima em estudo, de idêntica massa molecular com cerca de 52 kDa (resultados não apresentados).

Na tentativa de comprovar se a existência destes dois picos de actividade estaria ou não relacionada com fenómenos proteolíticos, procedeu-se ao estudo comparativo do perfil de eluição da actividade da enzima obtida (i) na ausência de antiproteases, (ii) na presença de 2 mM de PMSF e (iii) na presença conjunta de 2 mM PMSF e de 2 μg/ml de Leupeptina. Os resultados obtidos demonstraram que, em qualquer uma destas situações, o perfil cromatográfico se mantinha sem alterações significativas (*Fig. 13*).

Os resultados da electroforese na presença de SDS de cada um dos picos com actividade 5'-nucleotidásica que eluíam com 1,0 M (pico I) ou com 2,0 M (pico II) de NaCl na coluna de Dyematrex Green A pareciam indicar que ambos correspondiam à mesma proteína, possivelmente em distintos graus de agregação. Procurou-se, então, estudar qual seria o resultado, se cada um deles fosse recromatografado na mesma coluna e nas mesmas condições.

Para isso reuniram-se, separadamente, as fracções com actividade 5'-nucleotidásica correspondentes a os picos I e II (*Fig. 12*). Após diluição conveniente, cada um dos picos foi aplicado numa coluna de Dyematrex Green A e eluídos mediante a aplicação de um gradiente descontínuo de NaCl, em solução tampão de TSE, como descrito na *Fig. 12*. O rendimento da actividade enzimática obtida foi de 100% para o pico I e de 82% para o

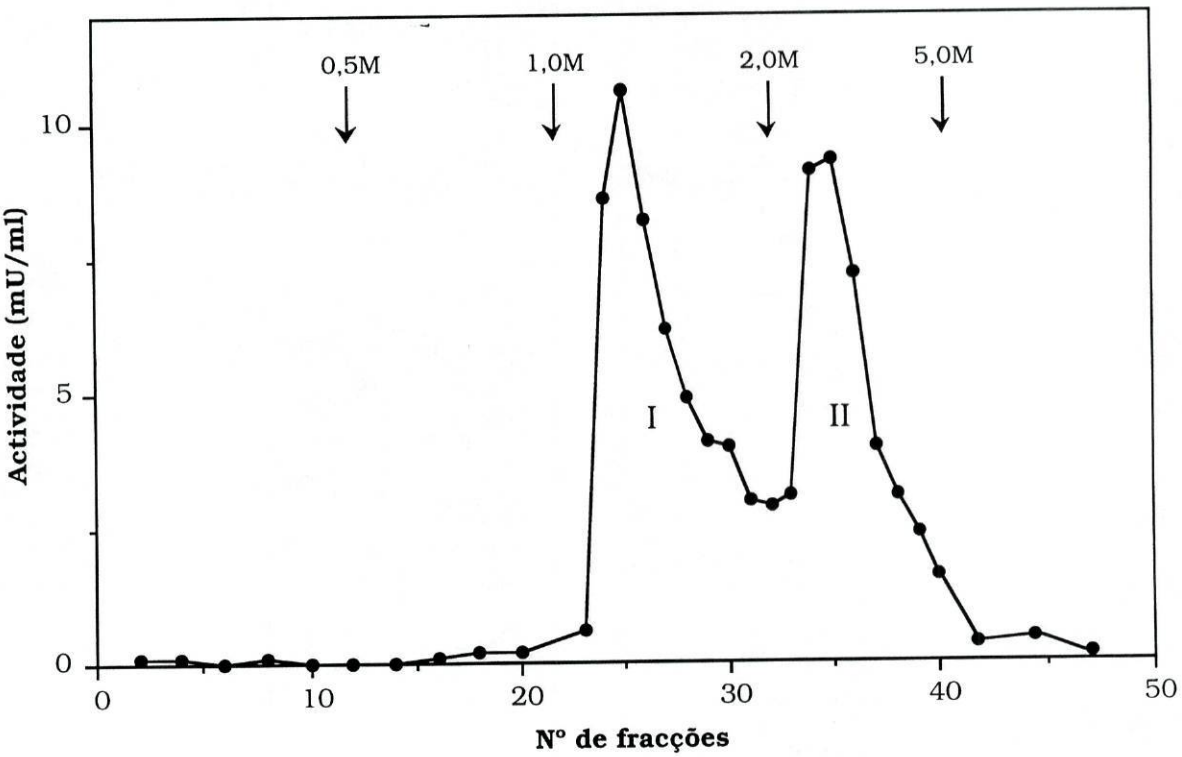


Fig. 12. Perfil cromatográfico da 5'-nucleotídase na coluna de Dyematrex Green A eluída com gradiente descontínuo ("pulsos") de NaCl em TSE.

A uma coluna de 1,3 ml, equilibrada com uma solução de TSE, suplementada com 0,5 M de NaCl, aplicaram-se 10 ml (0,2 mg de proteína) de enzima do pico III da coluna de fosfocelulose. A coluna foi eluída com a solução tampão de equilibrio, sendo depois, sucessivamente eluída com 9,0 ml de TSE suplementado com 1,0 M de NaCl, seguida de nova eluição de 9 ml com o mesmo tampão de TSE, suplementado com 2,0 M de NaCl. A eluição terminou com uma lavagem de 7,0 ml de TSE, suplementado com 5,0 M de NaCl. O volume das fracções recolhidas foi de 0,85 ml. A actividade nucleotidásica foi determinada pela quantificação do P_i formado, de acordo com o descrito em Material e Métodos.

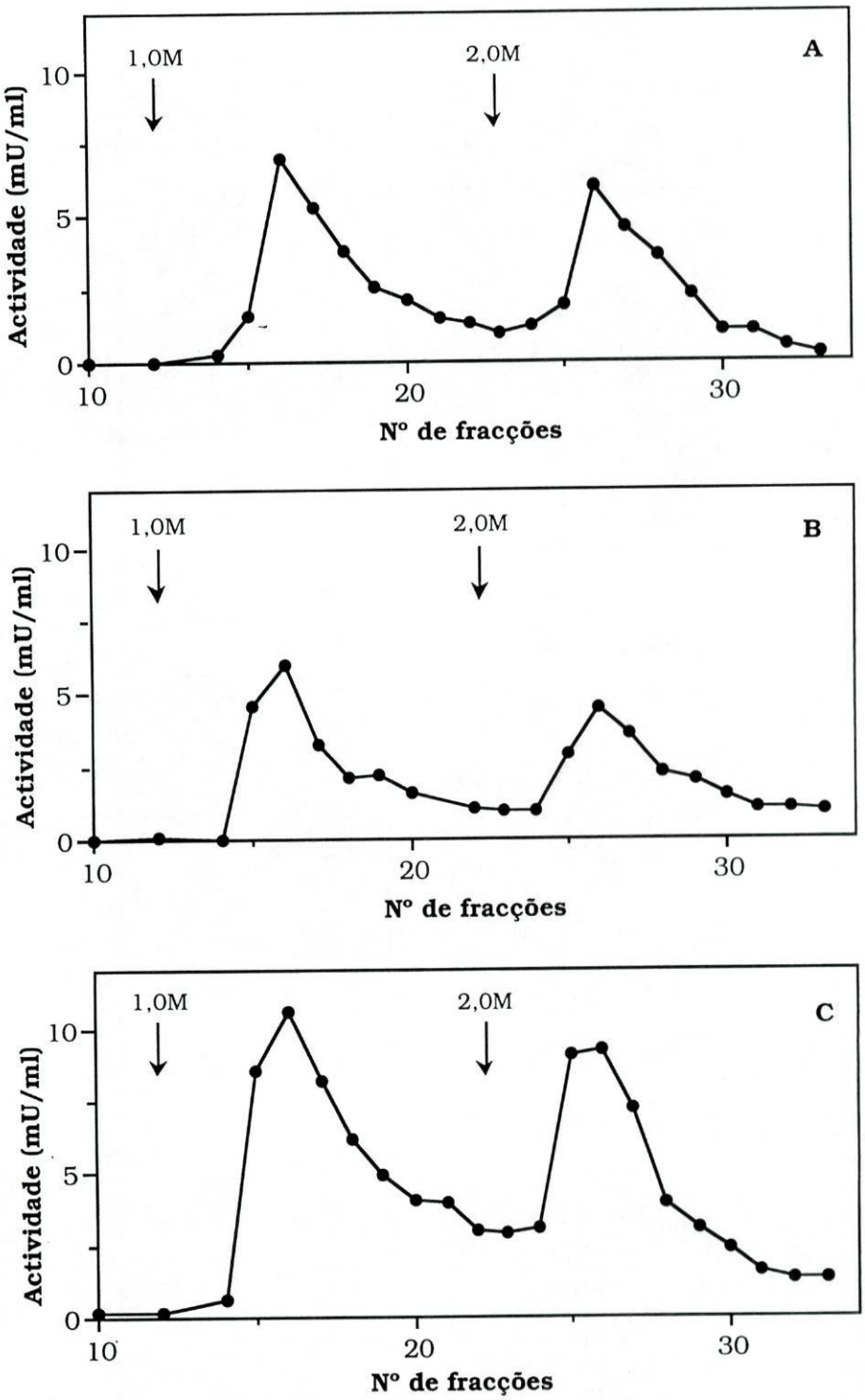


Fig. 13. Perfil cromatográfico da 5'-nucleotídase na coluna de Dyematrex Green A eluída com gradiente descontínuo de NaCl na ausência e na presença de antiproteases.

A uma coluna de 1,3 ml, equilibrada com tampão de TSE, suplementado com 0,5 M de NaCl, aplicaram-se separadamente 0,2 mg de proteína, do pico III da coluna de fosfocelulose. A eluição efectuou-se, na ausência de proteases (A), na presença de 2 mM de PMSF (B) e na presença de 2 mM de PMSF e 2 µg/ml de leupeptina (C). A eluição da coluna e a determinação da actividade nucleotidásica das fracções obtidas foram efectuadas como o descrito na *Fig. 12.*

pico II. Os perfis cromatográficos, recolhidos na *Fig. 14*, são semelhantes aos obtidos anteriormente, sugerindo uma interconversão entre ambos os picos de actividade. Deste modo, os diferentes dados obtidos sobre o comportamento cromatográfico da 5'-nucleotídase podem ser explicados não por fenómenos proteolíticos, dado que a presença de compostos antiproteolíticos nas soluções de eluição não modificam esse comportamento, mas sim como resultado de estados de agregação/desagregação da enzima.

Finalmente compararam-se as actividades relativas utilizando o IMP, AMP e GMP como substratos (2 mM), na presença e na ausência de 0,1 mM de Ap_4A, como efector, entre os dois picos de actividade enzimática obtidos na cromatografia em coluna de Dyematrex Green A. Como se pode verificar, pelos resultados obtidos (*Tabela 3*) não se verificaram grandes diferenças entre o comportamento da enzima dos respectivos picos de actividade no que respeita à actividade enzimática sobre os distintos substratos estudados. A activação da enzima devido à presença de Ap_4A é neste caso inferior à habitualmente obtida devido à presença no sistema de ensaio de uma concentração em NaCl de 0,5 M (resultante da eluição da coluna), concentração que por si só, exerce um efeito activador sobre a enzima.

Tabela 3. Estudo comparativo da actividade 5´-nucleotidásica dos picos I e II da coluna de Dyematrex Green A, frente a distintos substratos.

Substrato (2 mM)	Pico I (mU/mL)		Pico II (mU/ml)	
	+ Ap4A	- Ap4A	+ Ap4A	–Ap4A
IMP	6,3	4,7	6,8	4,0
AMP	1,3	0,5	0,35	<0,1
GMP	5,1	3,2	5,9	3,2

A actividade enzimática foi determinada pela quantificação do P_i (Material e Métodos). Todos os ensaios foram efectuados em duplicado.

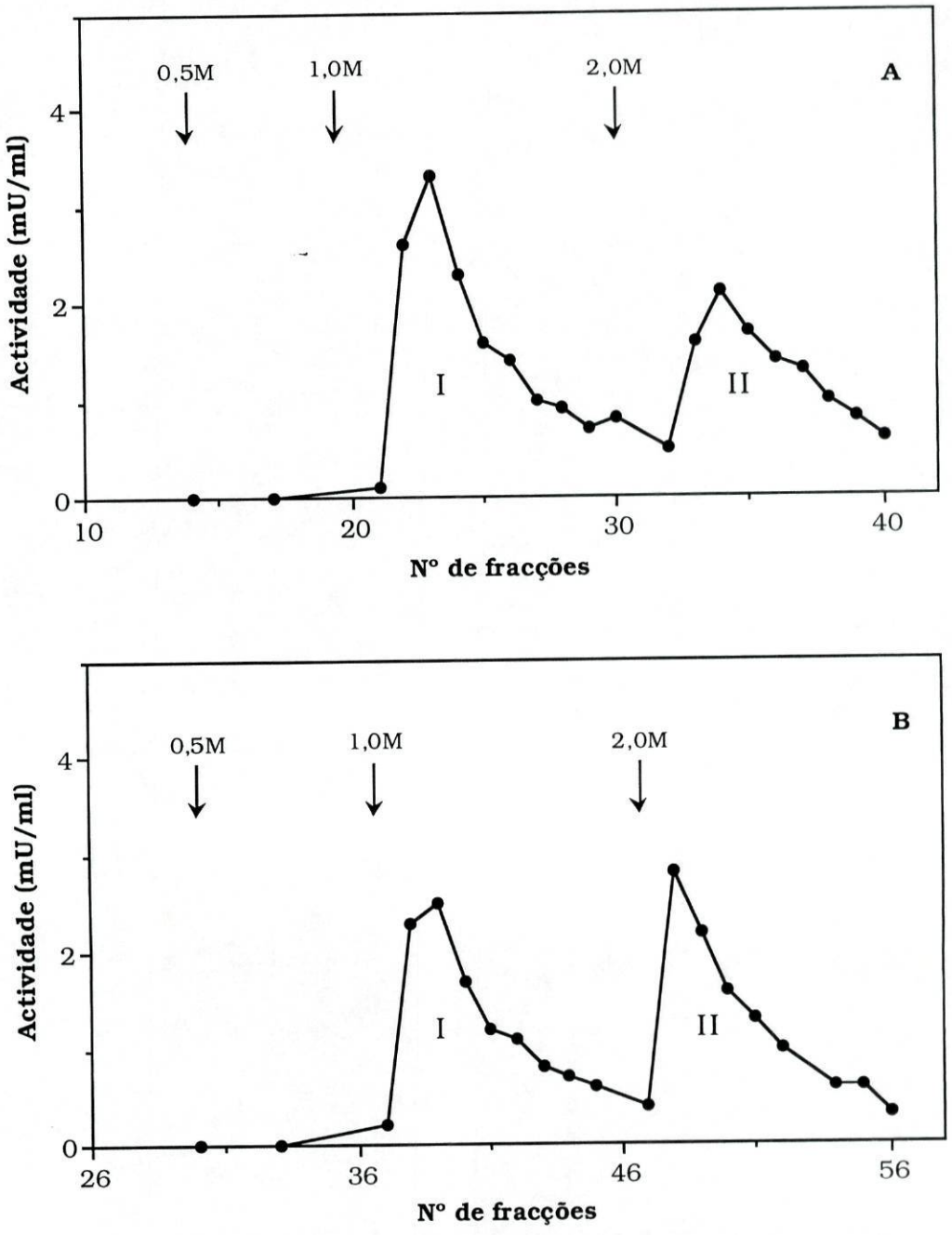


Fig. 14. Recromatografia dos picos I e II em coluna de Dyematrex Green A

Numa coluna de 1,3 ml, equilibrada com TSE suplementado con 0,5 M NaCl, processaram-se, separadamente, alíquotas dos picos I e II (veja-se *Fig. 12).* A amostra foi eluída com o tampão de equilibrio, seguida de duas novas eluições com TSE suplementado com 1,0 M e 2,0 M de NaCl.

Em **A**, aplicou-se o pico I, três vezes diluído em solução tampão de TSE a um volume final de 10,3 ml (21,5 mU). Em **B**, aplicou-se o pico II, seis vezes diluído na mesma solução tampão de TSE a um volume final de 22,1 ml (24,5 mU). A actividade 5'-nucleotidásica foi determinada quantificando o P_i formado (Material e Métodos)

Por último estudou-se também o comportamento do pico II da coluna de fosfocelulose na coluna de Dyematrex Green A, eluíndo-a com um gradiente descontínuo crescente de NaCl. Os resultados obtidos (*Fig. 15*) mostram um perfil cromatográfico praticamente similar ao apresentado pelo pico III, compatível com a presença da mesma actividade enzimática em ambos os picos II e III da coluna de fosfocelulose.

4.1.b. Purificação da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica do tecido cerebral do rato.

A purificação da enzima citosólica 5'-nucleotídase IMP/GMP específica a partir do cérebro do rato foi um processo complexo envolvendo inúmeras tentativas, descritas muito resumidamente em estudos preliminares (4.1.a), que serviram de base e permitiram estabelecer um protocolo definitivo de purificação da enzima a partir do tecido cerebral do rato, baseado em 5 etapas.

Durante todo o processo de purificação, a determinação da actividade 5'-nucleotidásica da enzima foi efectuada, essencialmente, pela quantificação do P_i formado, utilizando o IMP como substrato e o NaCl como efector enzimático, segundo protocolo analítico descrito em Material e Métodos, considerando-se uma unidade de enzima (U) como a quantidade de enzima capaz de transformar 1 µmol de substrato, nas condições de ensaio. Ao longo de todo o processo todas as operações foram efectuadas à temperatura de 4°C. A purificação da enzima que se descreve a seguir é representativa dos resultados que se obtêm seguindo este protocolo.

4.1.b.1. Preparação do homogenizado (etapa 1).

Imediatamente após a extracção, o tecido cerebral de três ratos (5,7 g) foi homogeneizado numa solução tampão de TSE, e centrifugado para obtenção da fracção citosólica, segundo o descrito em Material e Métodos. Obteve-se um volume final de 22,5 ml com um teor em proteínas de 3,3 mg/ml e uma activadade nucleotidásica total de 373,5 mU.

4.1.b.2. Fraccionamento proteico por "salting-out" (etapa 2).

Passo 1. Precipitação a 45% de saturação de sulfato de amónio

A 22,2 ml do sobrenadante resultante da etapa anterior foi adicionado sulfato de amónio até se atingir uma percentagem de saturação nesse sal

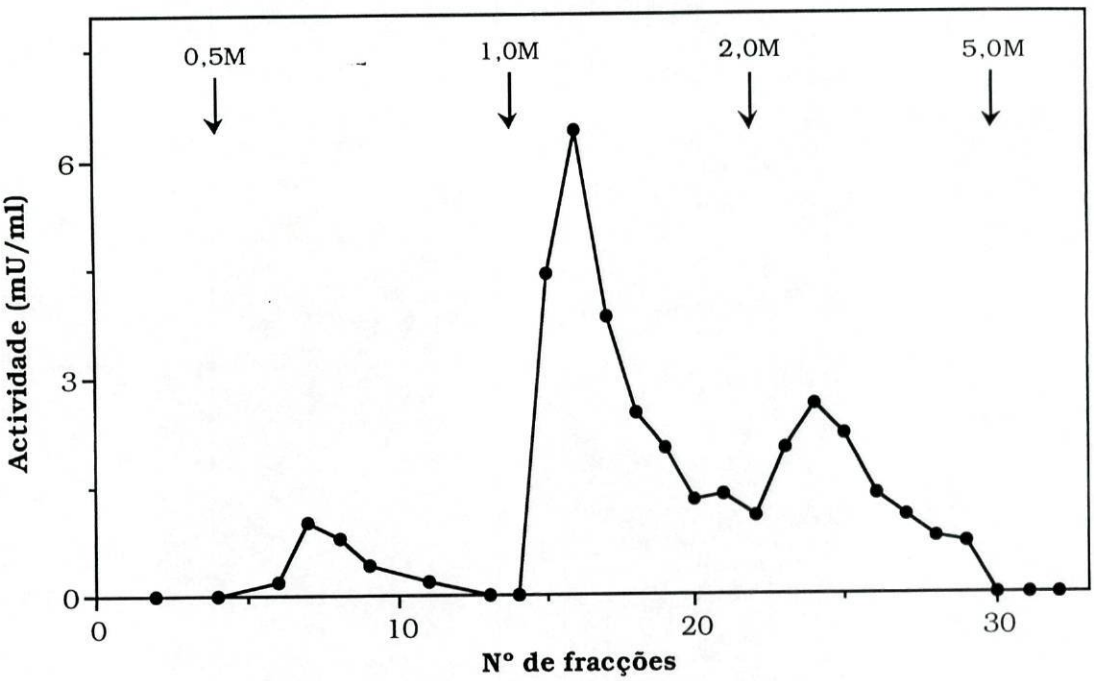


Fig. 15. Cromatografia do pico II da coluna de fosfocelulose em coluna de Dyematrex Green A.

Numa coluna de Dyematrex Green A (1,3 ml de volume) aplicaram-se 7,0 ml (42 mU) de amostra do pico II da coluna de fosfocelulose. A amostra foi eluída com 6,0 ml de TSE, suplementado com 0,5 M de NaCl, e, sucessivamente, com 7,0 ml de TSE suplementado com 1,0 M, 2,0 M e 5,0 M de NaCl. A velocidade de fluxo de eluição foi de 40 ml/h e a actividade enzimática de cada fracção recolhida (0,85 ml) determinada pela quantificação de P_i.

de 45%. O precipitado assim obtido foi ressuspendido numa solução tampão de TSE.

Passo 2. Diálise do precipitado.

Esta ressuspenção foi dialisada contra 100 volumes de solução tampão de TSE, por um periodo de 2 horas, seguida de nova diálise contra 250 volumes de mesmo tampão por um período de 12 horas. Ao fim deste tempo, o dialisado foi centrifugado a 12 000 x *g*, por um período de 25 minutos, recuperando-se o sobrenadante (4,35 ml), tendo-se determinado o seu teor em proteínas (4,7 mg/ml) e a actividade nucleotidásica total (362 mU totais).

4.1.b.3. Cromatografia em coluna de fosfocelulose (etapa 3).

O dialisado resultante da etapa anterior foi, seguidamente, aplicado numa coluna de fosfocelulose de 17,0 ml de volume, previamente equilibrada com a solução tampão de TSE. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com solução tampão de equilibrio, sendo, em seguida, eluída sucessivamente com (i) solução tampão de TSE, suplementado com 0,2 M de NaCl e (ii) por um gradiente de 0,2 a 0,8 M em NaCl, na mesma solução tampão (*Fig. 16*). A actividade recuperada foi de 74%.

Como foi mostrado nos ensaios preliminares, o pico II e pico III de actividade desta coluna correspondem à mesma proteína. Optou-se, no entanto, por continuar o processo de purificação da enzima 5'-nucleotídase IMP/GMP específica com a reunião das fracções correspondentes ao pico III de actividade, dado que, a actividade recuperada no pico II é menor e está associada a um mais alto teor em proteínas.

4.1.b.4. Cromatografia em coluna de Dyematrex Green A (etapa 4).

Os ensaios preliminares (ver *Fig. 12*) mostraram que nesta coluna de afinidade eluem 2 picos de actividade 5'-nucleotidásica, ao se proceder à sua eluição com 1 e 2 M de NaCl em TSE, respectivamente. Como também se demonstrou a interconversão entre ambos os picos, para simplificar a purificação desta proteína, no procedimento que se descreve a seguir, realiza-se uma única eluição com 2 M de NaCl em tampão.

As fracções com actividade nucleotidásica constituintes do pico III do perfil cromatográfico da coluna de fosfocelulose, foram reúnidas e aplicadas numa coluna de Dyematrex Green A de 1,3 ml de volume,

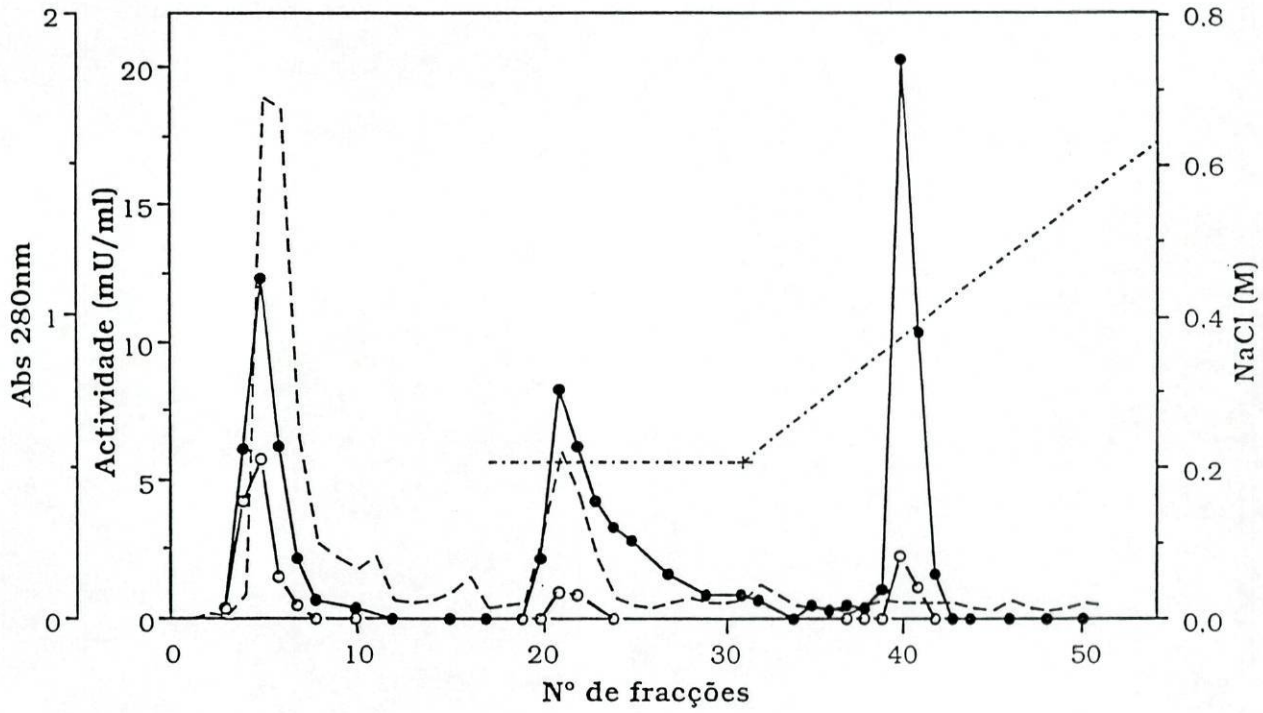


Fig. 16. Cromatografia em coluna de fosfocelulose (etapa 3 de purificação).

Um volume de 3,8 ml, proveniente da etapa 2 do processo de purificação foi aplicado numa coluna de 5,5 x 2,0 cm (17,0 ml) de fosfocelulose, previamente equilibrada com solução tampão de TSE. Após aplicação da amostra, procedeu-se à sua eluição com 42 ml de solução tampão de TSE, suplementado com 0,2 M de NaCl, seguida de um gradiente de 84 ml, de 0,2 a 0,8 M de NaCl na mesma solução tampão (··+··). O fluxo de eluição foi de 30 ml/h, sendo o volume de cada fracção de 2,85 ml. A actividade enzimática foi determinada sobre o IMP (2 mM) na presença (•) e na ausência (o) de 1 M de NaCl mediante a quantificação do P_i, sendo o perfil de proteínas determinado pela absorção a 280 nm (tracejado).

previamente equilibrada com uma solução tampão de TSE, suplementada com 0,5 M de NaCl. Após aplicação da amostra, a coluna foi lavada com a mesma solução tampão utilizada na prévia equilibração da coluna e eluída, seguidamente, com solução tampão de TSE, suplementada com 2,0 M em NaCl (*Fig. 17*). O rendimento da actividade foi de 51%.

4.1.b.5. Cromatografia em coluna de Phenyl superose (etapa 5).

As fracções com actividade resultantes da cromatografia da coluna anterior foram reunidas e aplicadas (3,0 ml) numa coluna de Phenyl superose de 1 ml de volume, previamente equilibrada com uma solução tampão de TSE, suplementado com 3,0 M de NaCl. Antes da aplicação, ao volume de amostra total a aplicar foi adicionada uma quantidade apropriada de NaCl até se atingir a concentração final de 3,0 M neste sal. Depois de aplicada a amostra, a coluna foi eluída mediante um gradiente de 3,0 M a 0,2 M de NaCl em solução tampão de TSE. A actividade nucleotidásica foi recuperada em duas fracções (*Fig. 18*), correspondendo a uma concentração em NaCl aproximada de 2,5 M.

Na Tabela 4 encontram-se os resultados obtidos ao longo do processo de purificação, com o qual se obtem um rendimento de 8 % e uma purificação de 450 vezes.

4.1.b.6. Estudo electroforético da enzima.

As diferentes etapas do processo de purificação da enzima foram acompanhadas pelo estudo do perfil electroforérico das proteínas, efectuado na presença de SDS, como se descreve em Material e Métodos (3.2.k).

Em geles de poliacrilamida a 12%, preparados como se descreve em Material e Métodos, aplicaram-se alíquotas de amostras provenientes das etapas 3, 4 e 5 de purificação. Dado o seu alto teor em NaCl, que interfere no desenvolvimento da electroforese, e o seu baixo teor em proteínas, as amostras das etapas 4 e 5 de purificação (cromatografias em colunas de Dyematrex Green A e de Phenil superose) foram concentradas em sacarose e de seguida dialisadas contra TSE.

Os resultados obtidos, representados na *Fig. 19*, mostram que à medida que avança o processo de purificação diminui o número de bandas de proteínas, mantendo-se, contudo, a presença de uma banda,

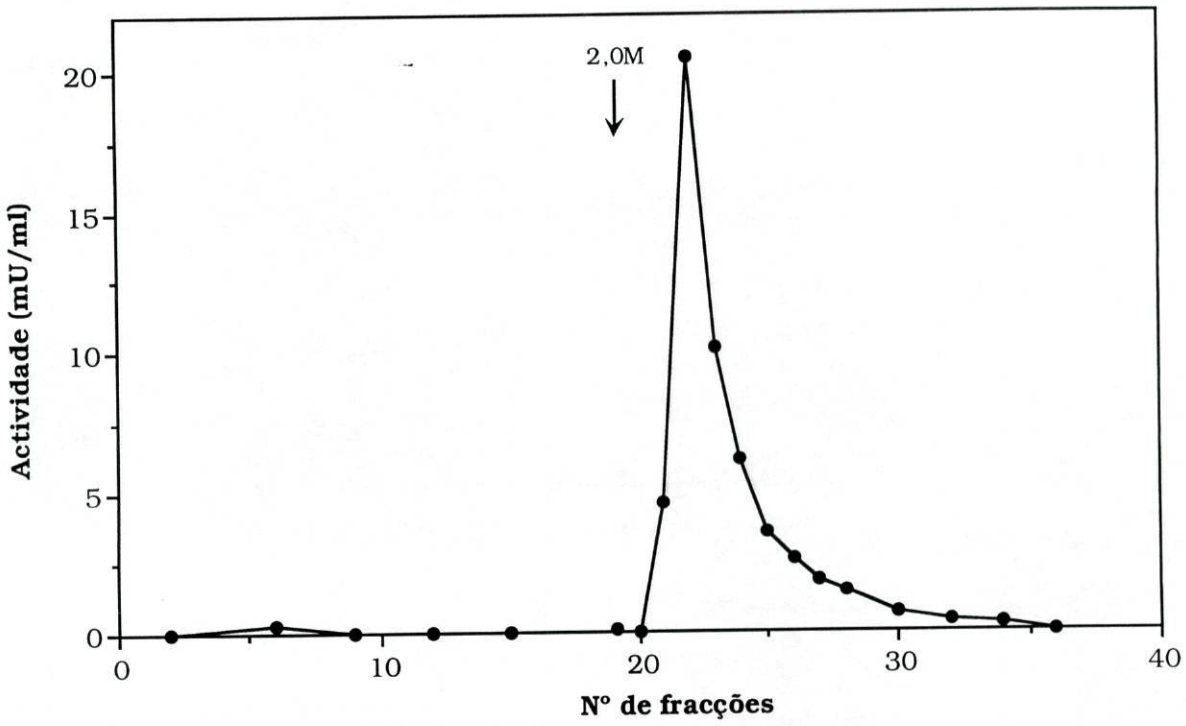


Fig. 17. Cromatografia em coluna de Dyematrex Green A (etapa 4 de purificação).

Um volume de 5,2 ml resultante da reunião das fracções com actividade nucleotidásica do pico III da coluna de fosfocelulose (etapa 3 de purificação), foi aplicado numa coluna de Dyematrex Green A de 1,3 ml (1,6 x 1,0 cm), previamente equilibrada com tampão de TSE, suplementado com 0,5 M de NaCl. A coluna foi, em seguida, lavada com 9 ml da mesma solução tampão e eluída com igual volume de TSE, suplementado com 2,0 M em NaCl. A eluição decorreu a um fluxo de 40 ml/h, recolhendo-se fracções de 0,85 ml. A actividade enzimática determinou-se sobre o IMP (2 mM) na presença de 1 M de NaCl (•), pela quantificação do P_i.

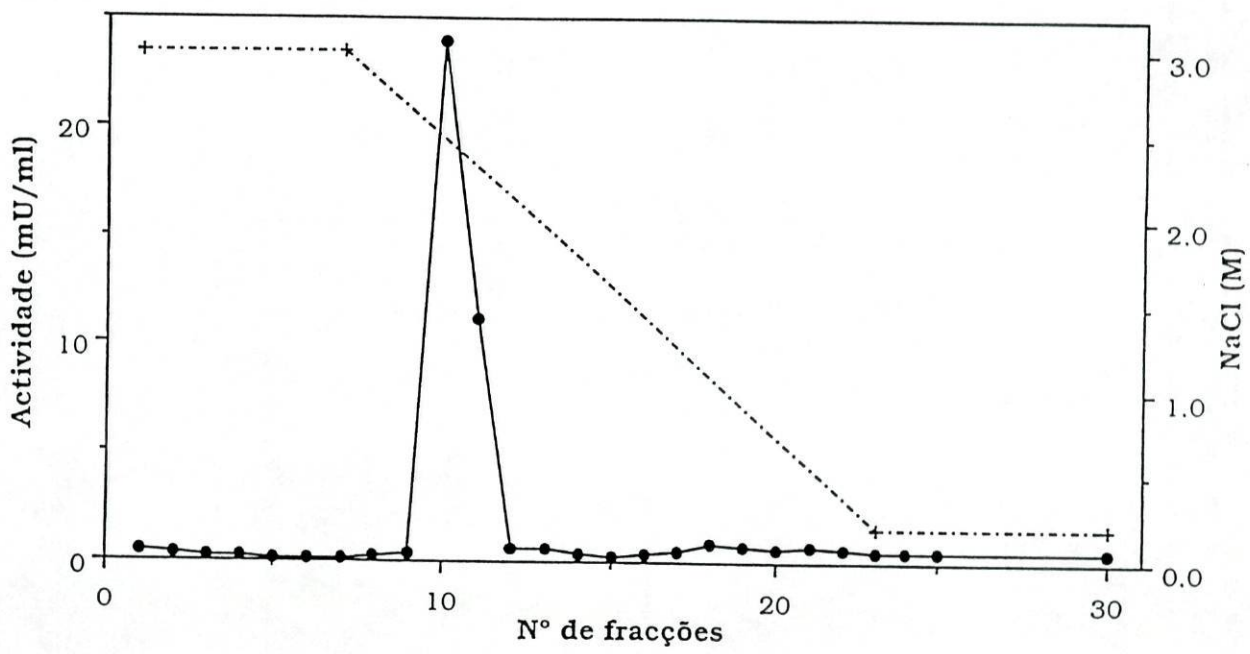


Fig. 18. Cromatografia em coluna hidrofóbica de Phenyl superose (etapa 5 de purificação).

Um volume de 3,0 ml, ajustado a 3,0 M em NaCl, proveniente da reunião das fracções com actividade nucleotidásica da coluna de Dyematrex Green A (etapa 4 de purificação) foi aplicada numa coluna de 1 ml de Phenyl superose, acoplada a um sistema de FPLC (Waters), previamente equilibrada com TSE, suplementado com 3,0 ml de NaCl. A coluna foi eluída, com um gradiente de 30 minutos de 3,0 M até 0,2 M de NaCl em TSE (··+··), seguido de, uma lavagem com o mesmo tampão de TSE, suplementado com 0,2 NaCl, por um período de 5 minutos. O fluxo de eluição foi de 0,25 ml/min, a uma pressão máxima de 14 bar. A actividade enzimática foi determinada sobre o IMP (2 mM) na presença de 1 M de NaCl (•). O rendimento da coluna foi de 65%.

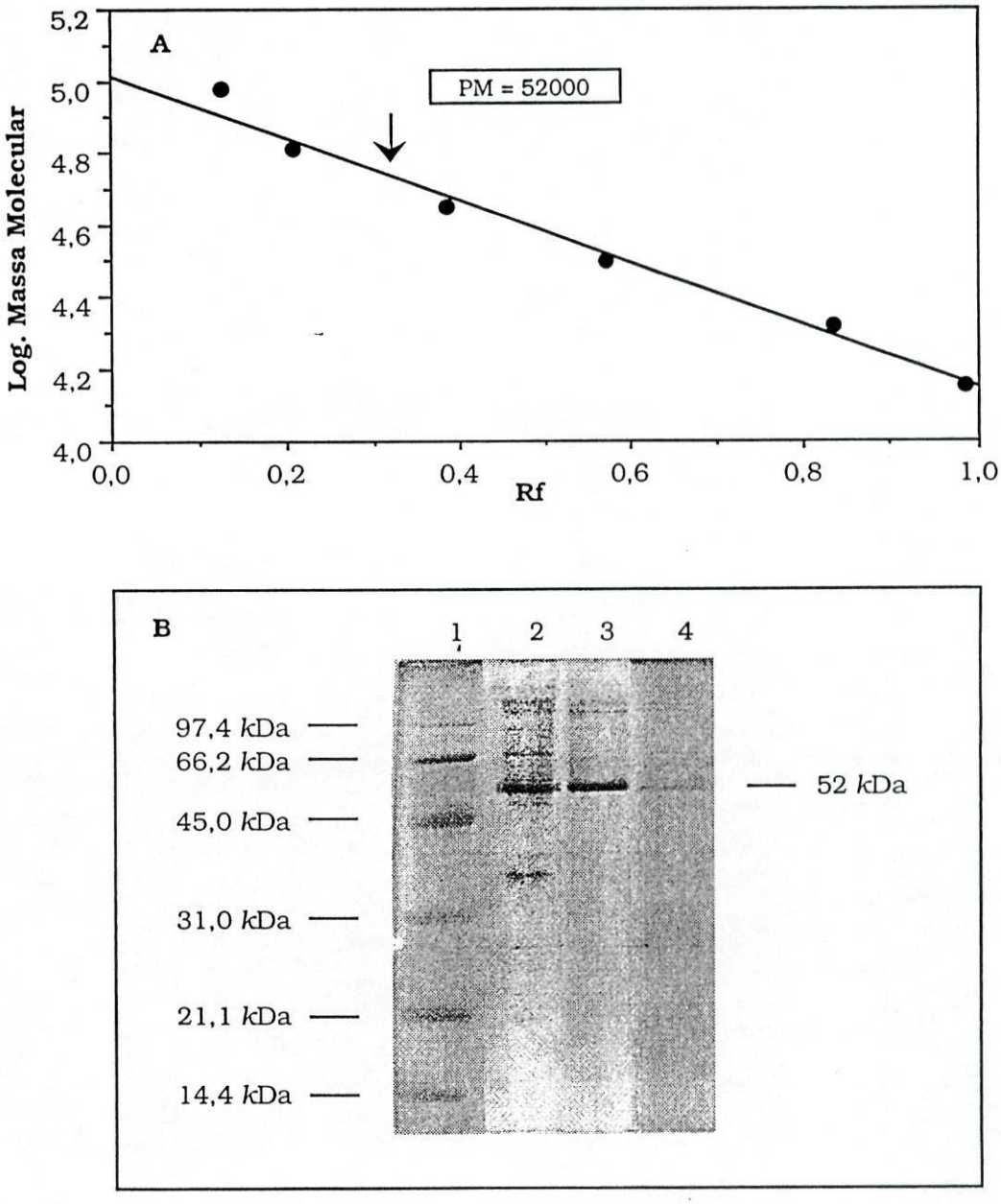


Fig. 19. Electroforese em gel de poliacrilamida a 12% em presença de SDS.

Aplicaram-se em gel de poliacrilamida a 12% (10 x 10 cm), alíquotas do pico III de actividade (Etapa 3 de purificação) (2), da coluna de Dyematrex Green A (Etapa 4 de purificação) (3), e da coluna de Phenyl superose (4), previamente concentradas em sacarose e dialisadas contra tampão de amostra (ver Material e Métodos) durante 16 horas, e uma mistura de proteínas de massa molecular conhecida como padrão (1).

Em **A**, Curva padrão de proteínas de massa molecular conhecida: Fosforílase b (97,4 kDa), albumina sérica (66,2 kDa), ovoalbulmina (45,0 kDa), anídrase carbónica (31,0 kDa), inibidor da tripsina de soja (21,5 kDa) e lisozima (14,4 kDa). Em **B**, A electroforese decorreu na presença de SDS, a uma voltagem de 190 V durante cerca de 60 minutos. A revelação do gel foi efectuada pelo nitrato de prata de acordo com Merril (1981).

Tabela 4. Purificação da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica de cérebro de rato.

	Volume total (ml)	Proteínas totais (mg)	Actividade total (mU) IMP	Actividade total (mU) IMP+NaCl	(IMP+NaCl)/IMP	Actividade específica (mU/mg)	Rendimento total (%)	Purificação
Homogeneizado (150 000 x *g*) (Etapa 1)	22,5	74,3	216	373,5	1,72	5	100	1
$(NH_4)_2SO_4$ (0-45%) (Etapa 2)	4,35	20,4	66,2	362	5,46	17,7	97	3,5
Fosfocelulose (Etapa 3)	6,5	0,29	11,0	99,8	9,0	344	26,7	69
Dyematrex Green A (Etapa 4)	5,35	0,080	N.D.	48,2	N.D.	602	12,9	120
Phenyl superose (Etapa 5)	1,79	0,014	N.D.	31,3	N.D.	2235	8,4	447

correspondente à enzima, durante todo o processo de purificação. O valor de massa molecular determinado foi de 52 kDa.

4.1.c. Determinação da massa molecular da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica

De acordo com os resultados obtidos mediante a utilização de técnicas cromatográficas de filtração em gel e técnicas de separação por gradiente contínuo de sacarose, os distintos dados bibliográficos atribuem à 5'-nucleotídase IMP/GMP específica, uma massa molécular que varia entre 165 kDa (embriões da *Artemia*) (Pinto e col., 1987) e 265 kDa (pulmão de porco) (Itoh e Yamada, 1990). É uma enzima tetramérica, variando os valores de massa molecular determinados das suas subunidades entre 42 kDa (Pinto e col., 1987) e 70 kDa (Oka e col, 1988, 1989). No primeiro caso (Pinto e col., 1987) o valor foi determinado em enzima purificada de Artemia, utilizando técnicas electroforéticas na presença de SDS; no segundo, recorrendo-se a técnicas de "immunoblotting" utilizando um extrato proteico obtido directamente de fígado de galinha mediante solubilização com SDS a quente e com um anticorpo específico.

4.1.c.1. Por filtração em gel

A determinação da massa molecular da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica do cérebro de rato foi um processo que inicial e repetitivamente se tentou com enzima parcialmente purificada da coluna de fosfocelulose e utilizando uma coluna de BioSil-Sek 250 de filtração em gel por HPLC. Nesses ensaios, apesar de se terem obtido curvas padrão com proteínas de massa molecular conhecida perfeitamente reprodutíveis, não foi possível encontrar actividade enzimática nas fracções eluídas, devido possivelmente à sua perda, ao longo da eluição.

A seguir, utilizou-se uma coluna de Sephacryl S-300 (150 ml), previamente equilibrada em solução tampão de TSE. No momento de aplicação da amostra (etapa 2 de purificação) aplicaram-se, simultaneamente, adenosina desamínase (ADA), piruvato cínase (PK) e lactato desidrogénase (LDH). A estas proteínas, que actuam como marcadores, correspondem valores de massa molecular de, respectivamente, 37 kDa, 135 kDa e 232 kDa.

O perfil de eluição das proteínas marcadoras obteve-se determinando, nas fracções eluídas, as actividades enzimáticas da ADA, PK e LDH, de

acordo com o descrito em Material e Métodos. O perfil da actividade enzimática da enzima em estudo foi obtido pela determinação, nas diferentes fracções obtidas, pela determinação do P_i, na presença e na ausência de Ap_4A.

Os resultados (*Fig. 20*) mostram a existência de dois picos de actividade enzimática perfeitamente distintos: (i) o primeiro, co-eluíndo com o pico máximo de proteínas, de acordo com a absorção ocorrida a 280 nm, ao qual corresponde um valor de massa molecular não determinado, e (ii) o segundo, eluindo mais tarde, a cujo volume de eluição corresponde um valor de massa molecular de cerca de 275 kDa.

O pico de actividade que elui nas fracções correspondentes ao excluído da coluna deve corresponder a uma forma agregada da enzima.

4.1.c.2. Por centrifugação em gradiente de sacarose

Outra metodologia utilizada na tentativa de determinação dos valores de massa molecular foi através da sedimentação em gradiente de sacarose.

Na superfície de um gradiente contínuo de sacarose de 5 a 20%, preparado como se descreve em Material e Métodos, aplicaram-se 0,2 ml de enzima (fracções correspondentes ao pico III da coluna de fosfocelulose, etapa 3 do processo de purificação) previamente concentrada (13 vezes) num sistema de membrana Centriplus 50 (Amicon). Simultaneamente aplicaram-se adenosina desamínase e catálase, como marcadores de massa molecular conhecida.

O gradiente foi centrifugado e processado como indicado em 3.2.h.

Observou-se, pelos resultados obtidos, o aparecimento de um pico de actividade 5'-nucleotidásica, cujo máximo correspondia a um valor de massa molecular, determinado como se descreve em Material e Métodos, de 186 kDa. No entanto, este pico apresentava um aspecto irregular, não simétrico, parecendo ser o resultado de três outros picos menores, aos quais corresponderiam valores de massa molecular situados entre 149 kDa e 238 kDa (*Fig. 21*).

4.1.c.3. Comentários finais

Os resultados das determinações efectuadas com enzima no estado nativo apontam para valores de massa molecular compreendidos entre 200 kDa, determinados com enzima purificada através da sedimentação em gradiente de sacarose e 275 kDa, utilizando técnicas de filtração em gel e

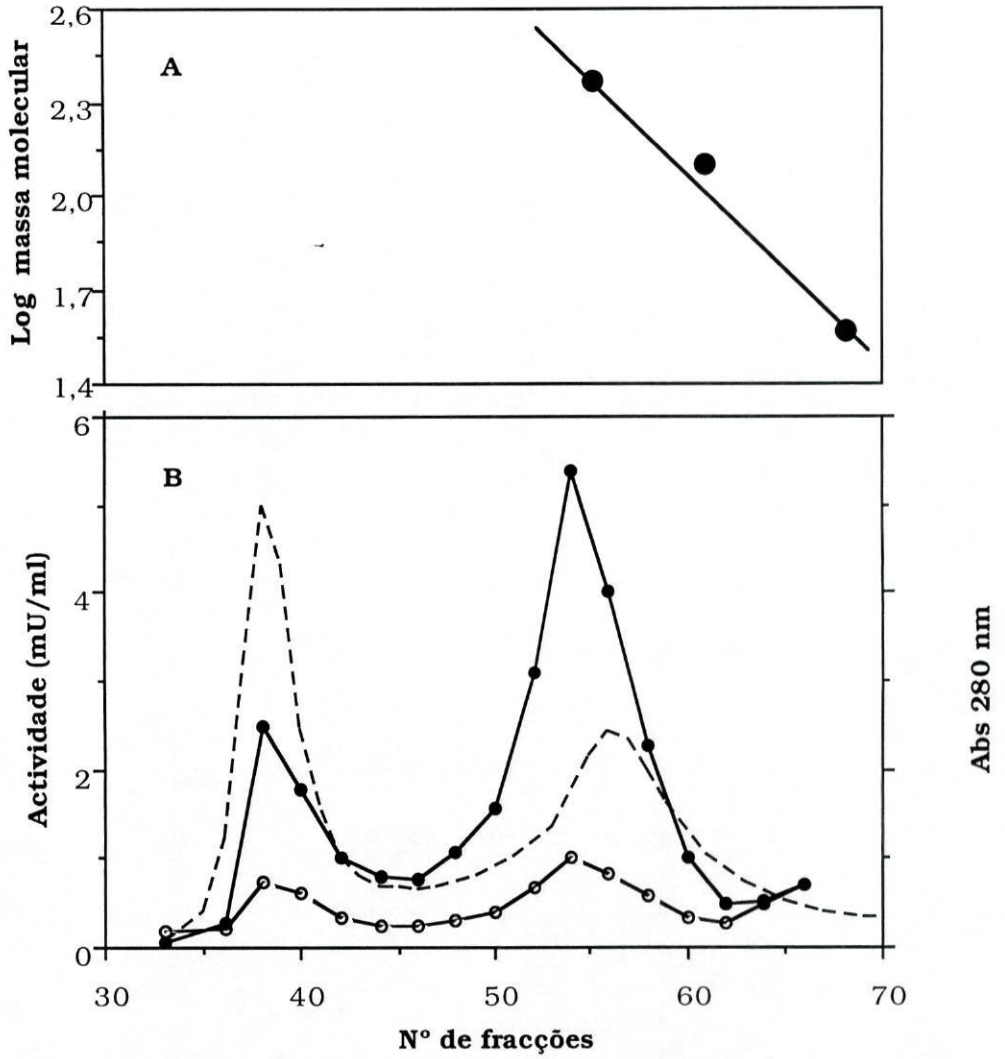


Fig. 20. Perfil cromatográfico da actividade da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica em coluna de Sephacryl S-300. Determinação da sua massa molecular.

Numa coluna de Sephacryl S-300 (1,65 x 70 cm), equilibrada em TSE aplicaram-se 2,3 ml de enzima resultante do fraccionamento por sulfato de amónio (45%). Em simultâneo com a aplicação da amostra aplicaram-se quantidades apropriadas de proteínas de massa molecular conhecida: Adenosina desamínase (37 kDa), lactato desidrogénase (135 kDa) e piruvato cínase (232 kDa). A coluna foi eluída com TSE, sendo o fluxo de 5 ml/h e recolhidas fracções de 1,43 ml. O perfil de eluição das proteínas marcadoras (●) foi estabelecido com base nos picos das respectivas actividades enzimáticas determinadas, de acordo com o descrito em Material e Métodos. O perfil da actividade da enzima em estudo foi determinado pela quantificação do P_i, na presença (•) e na ausência (o) de Ap_4A. O perfil cromatográfico das proteínas foi traçado medindo a absorvância a 280 nm (tracejado).

A, Eluição das proteínas padrão utilizadas em função da sua massa molecular; **B**, perfil de eluição da actividade 5'-nucleotidásica.

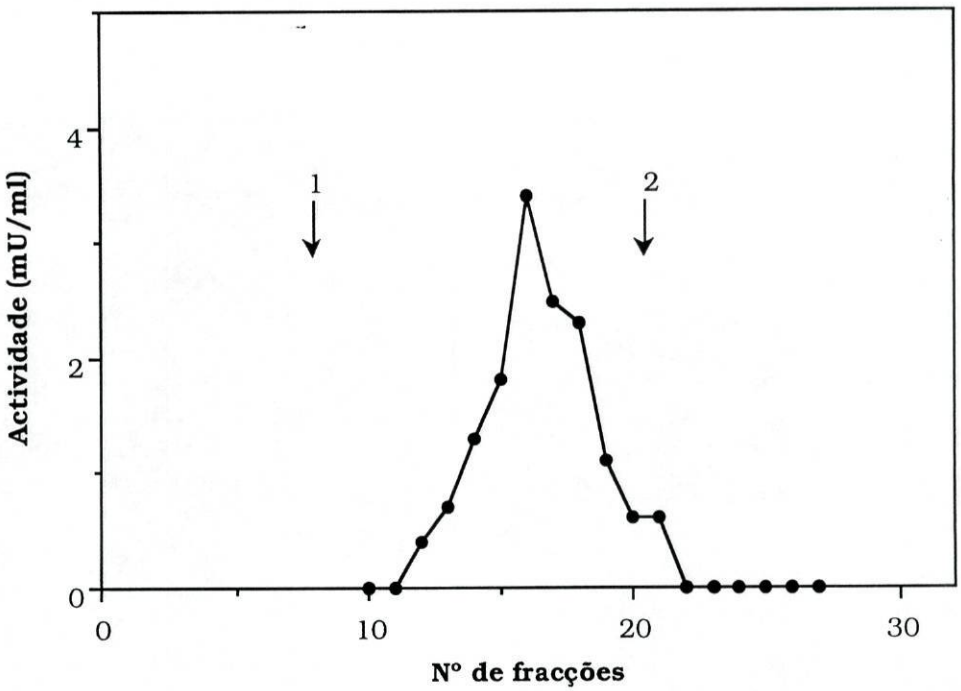


Fig. 21. Determinação da massa molecular da 5'-nucleotídase por gradiente de sacarose.

Aplicaram-se na superfície de um gradiente de sacarose (5-20%), 0,2 ml (12 mU) de enzima (etapa 3 de purificação) concentrada em Centriplus 50, e 0,020 ml de uma mistura contendo adenosina desamínase e catálase. O gradiente foi centrifugado durante 17 horas a 38 000 *x g*, recolhendo-se fracções de 0,3 ml, a partir da superfície do gradiente através de fraccionador automático de gradientes. As actividades das enzimas adenosina desamínase, catálase foram determinadas como se detalha em Material e Métodos e a 5'-nucleotídase, pela quantificação do Pi. Os valores de massa molecular foram determinados tendo como base os picos das actividade das enzimas. O rendimento do gradiente foi de 53%.

As setas 1 e 2 representam os picos de actividade da adenosina desamínase e da catálase, respectivamente.

com enzima menos purificada. Por outro lado, o valor de massa molecular das subunidades da enzima obtido mediante electroforese em presença de SDS (52 kDa), parece ser de certo modo compatível com o valor obtido com o gradiente de sacarose.

Esta aparente contradição entre ambos os resultados obtidos com a enzima nativa, poderia, á luz dos dados constantes na literatura, ser explicada por fenómenos de proteólise, não evitados pela presença de PMSF e leupeptina, que ocorreriam durante o processo de purificação e que justificariam as diferenças observadas.

À semelhança do que ocorre com a enzima nativa, os valores de massa molecular das subunidades podem, do mesmo modo, ser o resultado de fenómenos de proteólise. De facto, esta hipótese é corroborada pelo grupo de Itoh (Oka e col., 1988, 1989), ao comparar estudos electroforéticos, efectuados na presença de SDS, de enzima obtida, com ou sem leupeptina como agente antiproteolítico, a partir do figado da galinha. Nesses estudos verificou que a enzima obtida na ausência de leupeptina dava origem a duas bandas bem definidas, correspondentes a valores de massa molecular de 51 e 100 kDa, facto que não ocorria quando na presença de leupeptina em que aparecia apenas uma única banda correspondente a 57 kDa. Na sequência desses mesmos estudos, Oka e col. (1988), demonstrou, mediante a solubilização directa dos tecidos com SDS tamponado a quente e analisando o respectivo extrato (condições em que os efeitos proteolíticos são minimizados), o aparecimento no perfil electroforético de uma única banda com um valor correspondente a 70 kDa.

Em 1990, Itoh e Yamada, ao estudarem o comportamento electroforético na presença de SDS de enzima de pulmão, encontraram duas bandas, às quais correspondiam valores de massa molecular de 69 kDa (predominante) e 62 kDa (menos intensa). Observaram, ainda, que o perfil electroforético da enzima quando incubada na ausência de antiproteases, revelava a existência de uma única banda a 62 kDa, corroborando, uma vez mais, a existência de fenómenos proteolíticos.

Mais recentemente, a partir da sequência de aminoácidos deduzida a partir de um cDNA codificante da 5'-nucleotídase citosólica humana, clonado a partir de uma biblioteca de placenta humana, determinou-se um valor de massa molecular das subunidades de 64 966 Da.

Em face destes dados, é possível que o valor de massa molecular da enzima nativa se aproxime mais do obtido mediante filtração em gel, que do obtido por gradiente de sacarose, e que o valor de 52 kDa obtido para a subunidade da enzima, seja o resultado de uma proteólise parcial.

Para finalizar, deve ter-se conta que o valor de massa molecular de 275 kDa obtido por filtação por gel, ter sido determinado usando como proteína padrão de massa molecular mais elevada, a piruvato cínase (PK), que possui um valor inferior (232 kDa).

4.1.d. Propriedades da 5'-nucleotídase

4.1.d.1. Linearidade da reacção enzimática

A determinação da actividade da 5'-nucleotídase pode ser efectuada com base na quantificação dos produtos finais das reacções enzimáticas por ela catalisadas - 5'-nucleotidásica (1) e fosfotransferásica (2):

$$E + 5'\text{-NMP} \longrightarrow E + N + P_i \qquad (1)$$

$$E + {}^*N + NMP \longrightarrow E + {}^*NMP + N \qquad (2)$$

Deste modo, a actividade 5'-nucleotidásica da enzima pode ser determinada mediante a quantificação do P_i ou do nucleósido (N) formado por hidrólise do NMP, após separação cromatográfica por HPLC ou TLC. Por outro lado, a determinação da actividade fosfotransferásica pode efectuar-se medindo a quantidade de radioactividade incorporada no nucleósido monofosfato formado (*NMP).

O estudo da linearidade das reacções enzimáticas foi efectuado em função da quantidade de enzima e do tempo de incubação, verificando linearidade em ambas as reacções enzimáticas, nas condições de ensaio normalmente utilizadas (*Fig. 22* e *Fig. 23*).

4.1.d.2. Influência dos valores de pH na velocidade da reacção

O estudo da influência dos valores de pH na actividade nucleotidásica foi efectuado com enzima parcialmente purificada da etapa 3 do processo de purificação.

A representação grafica dos resultados (*Fig. 24*) mostra que a actividade enzimatica, com ambas soluções tampão, varia em função dos valores de pH em forma de campanula, apresentando uma zona de valores de pH óptima entre os 6,5 e os 7,0.

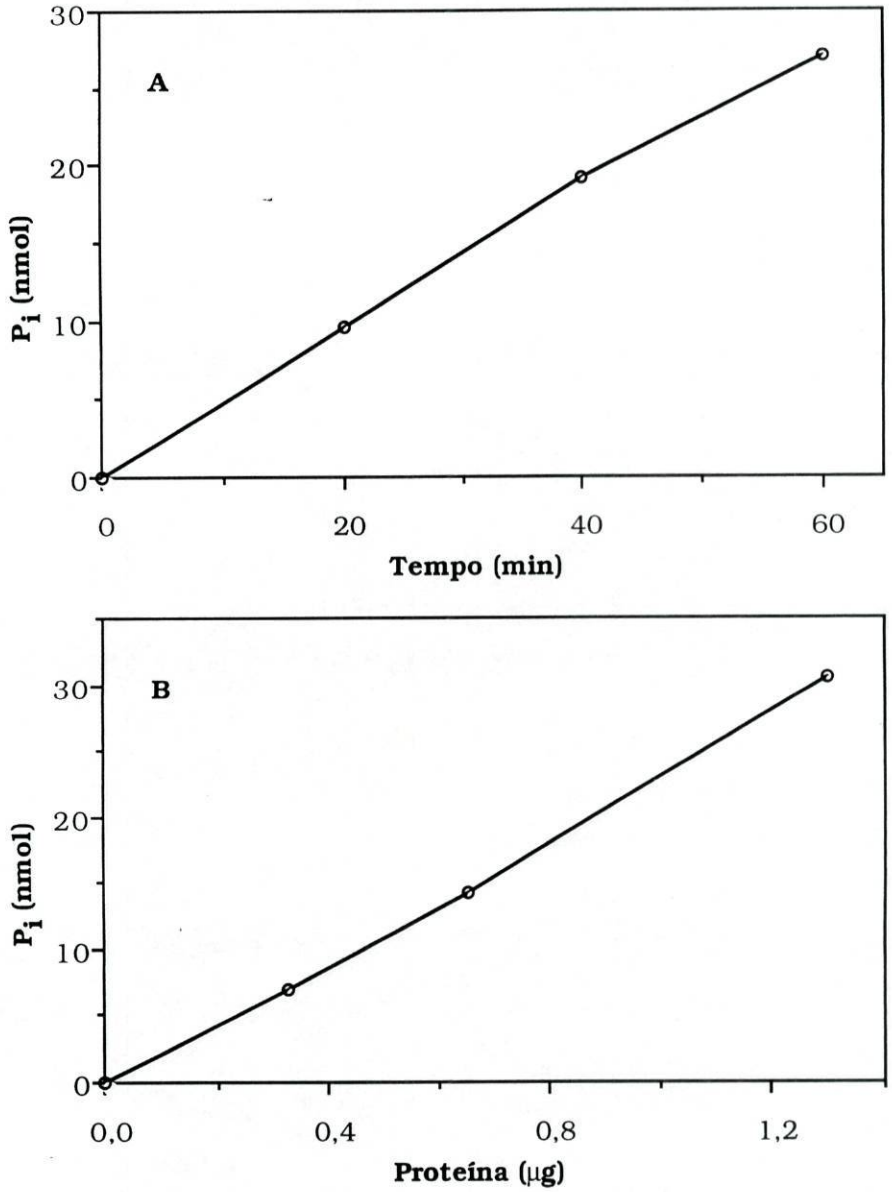


Fig. 22. Determinação da actividade da 5'-nucleotídase. Quantificação do P_i formado. Linearidade com o tempo e com a quantidade de enzima.

Nos ensaios, realizados em duplicado, utilizou-se o IMP como substrato, 0,050 mM de Ap_4A como efector e enzima parcialmente purificado da etapa 3 de purificação, como descrito em Material e Métodos.
A. Actividade em função do tempo de incubação, utilizando 0,65 μg de proteína.
B. Actividade em função da quantidade de proteína, incubando 30 minutos.

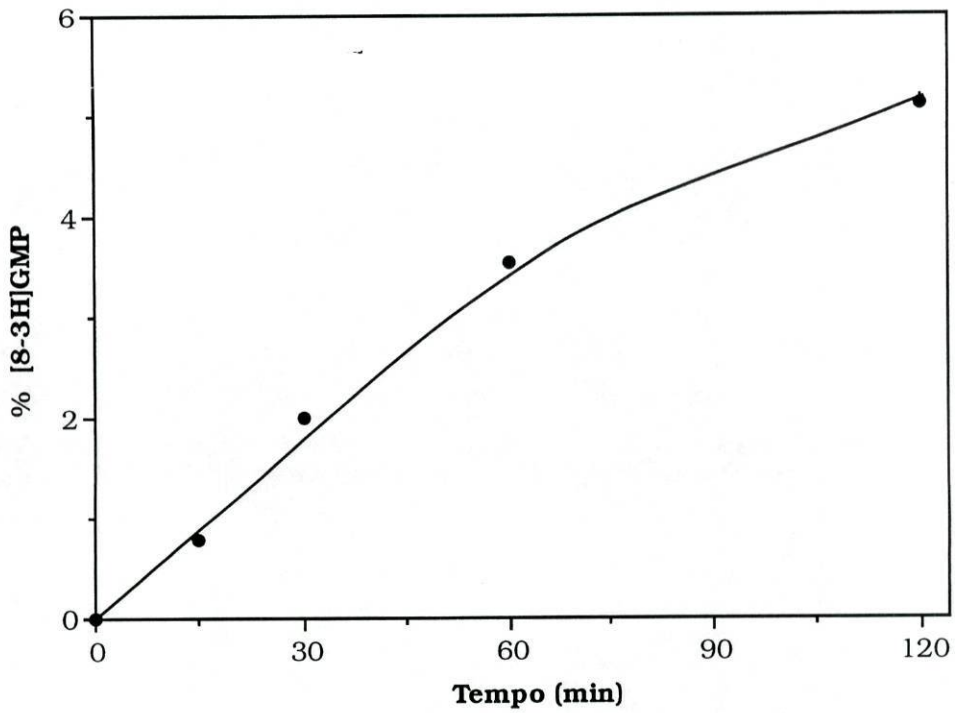


Fig. 23. Determinação da actividade fosfotransferásica da 5'-nucleotídase. Quantificação do GMP radioactivo formado. Linearidade com o tempo.

Nos ensaios, realizados em duplicado, utilizou-se 2 mM de GMP, 1mM de [8-^{3}H] Guo (actividade específica 20 mCi/mmol), como substratos dador e receptor do grupo P_i, respectivamente, 0,050 mM de Ap_4A e enzima parcialmente purificada da coluna de fosfocelulose. A reacção decorreu a 37°C e ao fim dos tempos indicados, alíquotas de 3 µl foram aplicados em placa de PEI-celulose e eluídos com água. Na análise dos resultados seguiu-se o protocolo descrito em Material e Métodos.

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA

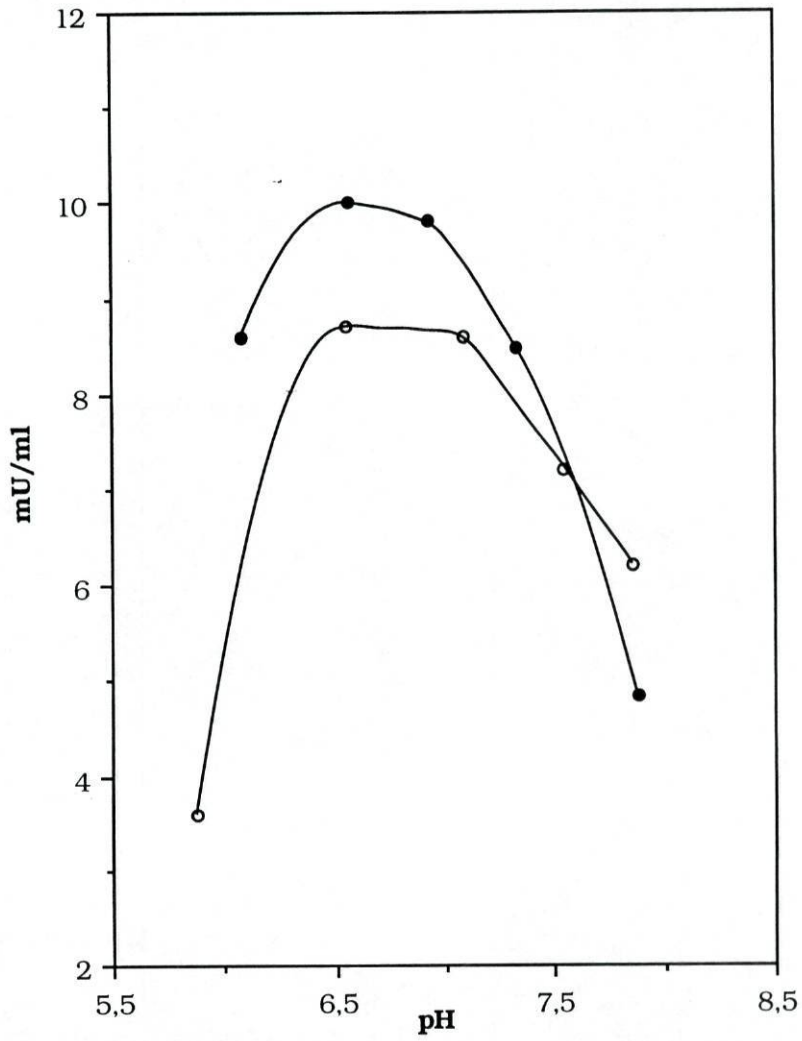


Fig. 24. Efeito da variação dos valores de pH na actividade 5'-nucleotidásica.

A mistura reaccional continha, para o volume final de 0,2 ml, 100 mM de solução tampão (Imidazol (o) ou Tris (•), ajustados a distintos valores de pH com HCl, 5 mM de $MgCl_2$, 0,22 M de NaCl, 0,1% de BSA, 2 mM de IMP, 0,1 mM de Ap_4A, e enzima. A mistura foi incubada pelo período de 30 minutos a 37°C. A actividade enzimática foi determinada através da quantificação do P_i de acordo com o descrito em Material e Métodos. Todos os ensaios foram efectuados em duplicado, sendo os valores de pH determinados na mistura de reacção.

4.1.d.3. Influência da temperatura na velocidade da reacção

O estudo da influência dos valores da temperatura na actividade enzimática foi efectuado com enzima da etapa 3 do processo de purificação. A mistura da reacção foi incubada durante 30 minutos a diferentes temperaturas (0, 25, 30, 35, 42, 50 e 60 °C) sendo a actividade da enzima determinada pela quantificação do P_i.

Pelos resultados obtidos (*Fig. 25*) observa-se a existência de uma zona de temperatura situada entre os 35°C e os 42°C em que a variação da actividade enzimática não ultrapassa os 10%. Nas condições de ensaio, a temperatura óptima de reacção enzimática é de 37°C.

4.1.d.4. Efeito de distintas soluções tampão na actividade nucleotidásica

A determinação da actividade da 5'-nucleotídase tem sido efectuada na presença de variadas soluções tampão como sejam os casos de Imidazol (Itoh, 1981, Worku e Newby, 1982; Worku e col., 1983, Spychala e col., 1989), o Mes (Bontemps e col., 1988), Tes (Skladanowski e col., 1989, 1996), Mops (Truong e col., 1988; Le Hir, 1991), Tris, maleato (Van den Berghe e col., 1977; Tjernshaugen e Fritzson, 1984), etc.

Itoh (1981), com enzima purificada de figado de rato, demonstrou que a velocidade da reacção enzimática aumentava 1,8 vezes, quando à mistura de reacção, contendo 100 mM de Imidazol, pH 6,5 (3 mM de IMP) se adicionava 150 mM de Tris, maleato ao mesmo pH. Verificou, ainda, que essa adição de Tris,maleato dava origem à diminuição dos valores de K_m de 1,0 para 0,2 mM. Com o AMP como substrato (3 mM) verificou que o Tris, maleato transformava a cinética sigmoidal da enzima numa cinética hiperbólica, não observando alterações na V_{max}. Na continuação desse estudo, concluiu, ainda, que a presença de outros sais carboxílicos de Tris (acetato, fumarato e succinato) estimulavam a velocidade da enzima.

Deste modo, e como a actividade enzimática parece depender da solução tampão utilizada na sua determinação, decidiu-se estudar a possível influência de distintas soluções tampão mantendo constante a sua concentração final e a um valor de pH final fixo, situado na zona de pH óptimo.

Usaram-se comparativamente as seguintes soluções tampão: imidazol, HCl, Tris, HCl, Tris, maleato, Hepes, KOH, Mes, KOH e Bis/Tris, HCl.

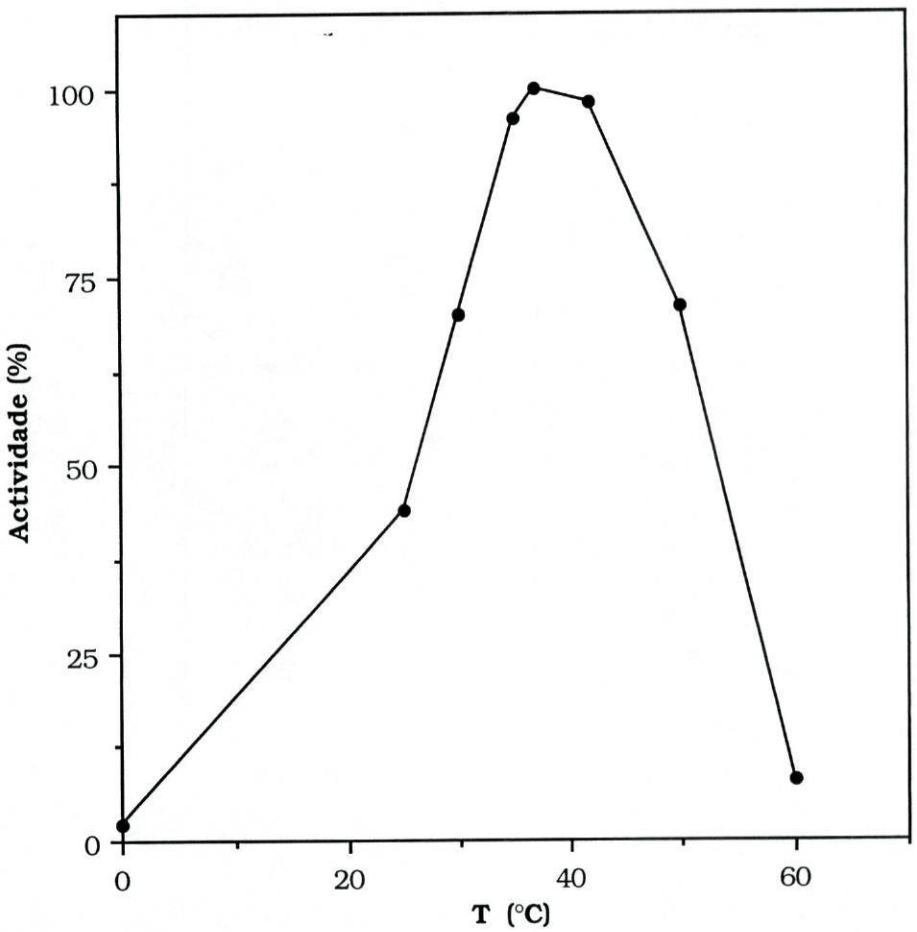


Fig. 25. Influência da temperatura na actividade da enzima.

A actividade da enzima foi determinada pela quantificação do P_i, numa mistura da reacção padrão, contendo 0,1 mM de Ap_4A, 2 mM de IMP, 1 mg/ml de BSA e enzima. A mistura reaccional foi incubada durante 30 minutos às temperaturas indicadas.

Os valores estão expressos em termos percentuais considerando como 100% a actividade enzimática de 8,9 mU/ml obtida a 37°C.

Os resultados obtidos (*Tabela 5*) mostram que com respeito à solução tampão de imidazol, habitualmente utilizada, as soluções tampão estudadas exercem um ligeiro efeito activador sobre a actividade nucleotidásica, apresentando a solução tampão de Mes, o maior efeito (1,4 vezes).

Tabela 5. Actividade relativa da 5'-nucleotídase em função da solução tampão utilizada na mistura de ensaio.

Tampão	pH final	Actividade (mU/ml)	Actividade (%)
Imidazol, HCl	6,65	10,3	100
Tris, HCl	6,68	13,0	127
Tris, maleato	6,62	13,4	131
Hepes, KOH	6,69	11,7	114
Mes, KOH	6,65	14,5	141
Bis/Tris, HCl	6,63	11,2	109

A mistura de reacção era constituída por 5 mM de $MgCl_2$, 0,1% de BSA, 0,22 M de NaCl, 2 mM de IMP, 0,1 mM de Ap4A, enzima e 100 mM de solução tampão. A mistura foi incubada a 37°C pelo período de 30 minutos, aos fim dos quais se quantificou o P_i formado. Todos os resultados foram obtidos em duplicado.

4.1.d.5. Estabilidade da 5'-nucleotídase

Procedeu-se ao estudo da estabilidade da 5'-nucleotídase parcialmente purificada (etapa 3 de purificação) mediante a quantificação da actividade residual presente em alíquotas, às quais se adicionaram previamente BSA até à concentração final de 1 mg/ml, mantidas a diferentes temperaturas e por diferentes períodos de tempo.

Os resultados obtidos (*Tabela 6*) demostram que:

(i) A actividade enzimática não sofre alterações quando as amostras são mantidas à temperatura ambiente por um período de, pelo menos, 48 horas.

(ii) A estabilidade das amostras, embora as diferenças não sejam significativas, parece ser maior a 4°C e a -70°C que a -20°C.

(iii) A liofilização não parece afectar a actividade enzimática das amostras, pelo menos nas condições de ensaio utilizadas.

Estes resultados sugerem que o BSA, nas concentrações utilizadas, exerce um efeito estabilizador sobre a enzima, uma vez que na sua ausência a actividade enzimática praticamente se perde ao fim de 48 horas (resultados não mostrados).

Verificou-se, igualmente, uma elevada estabilidade enzimática, (uma semana sem qualquer alteração da sua actividade) quando à enzima da etapa 3 da purificação se adicionava previamente NaCl e $MgCl_2$ nas concentrações finais de, respectivamente, 2 M e 5 mM, e se concentrava em sacarose seguido de diálise de 12 horas contra uma solução tampão de TSE, suplementada com NaCl e $MgCl_2$ nas mesmas concentrações finais.

Tabela 6. Estudo da estabilidade da enzima 5'-nucleotídase IMP/GMP específica.

	Actividade enzimática (mU/ml)					
	0 horas	**24 horas**	**48 horas**	**96 horas**	**7 dias**	**14 dias**
25°C	11,3	9,5	12,0	-	-	-
4°C	11,3	9,7	9,0	10,2	10,2	10,7
-20°C	11,3	10,8	10,2	8,3	8,5	9,1
-70°C	11,3	9,9	9,3	10,2	10,8	10,8
Liofiliz.	11,3	-	-	9,6	-	-

Alíquotas da enzima (etapa 3 de purificação) foram incubadas, na presença de BSA 1 mg/ml, a 25 °C, a 4°C, a -20°C e a -70°C, durante os períodos de tempo indicados. Uma outra alíquota foi liofilizada.Todos os ensaios foram efectuados em duplicado. A actividade residual foi determinada pela quantificação do P_i libertado por acção da enzima, após incubação a 37°C durante 30 min, de acordo com o descrito em Material e Métodos.

4.1.d.6. Especificidade de substrato

Como substratos preferenciais, a 5'-nucleotídase utiliza o IMP, GMP XMP e deoxiderivados correspondentes, segundo uma cinética hiperbólica ou ligeiramente sigmoidal. A enzima apresenta uma cinética sigmoidal com o AMP como substrato, não exercendo praticamente qualquer acção sobre este nucleótido quando presente em concentrações fisiológicas (Van den Berghe e col., 1977; Itoh e-col., 1978; Itoh, 1981, 1993).

Com enzima proveniente da etapa 3 de purificação procedeu-se ao estudo da especificidade de substrato da enzima utilizando distintos compostos (IMP, GMP, AMP, UMP, XMP CMP, 3'-GMP, 3'-AMP, 3'-UMP, 2'-AMP, 2'-UMP e dAMP) em idêntica concentração final (2 mM), na presença e na ausência de Ap_4A como efector enzimático.

Na *Tabela 7* mostram-se os resultados obtidos, nas condições de ensaio referidas, e expressos em termos percentuais, utilizando como termo comparativo a actividade da enzima sobre o IMP. A observação dos resultados permite verificar a especificidade da enzima para os nucleósidos 5'-monofosfatos sendo os mais efectivos o 5'-IMP e o 5'-GMP, com percentagens de actividade muito próximas, em presença de activador. Com o 5'-XMP ou o 5'-AMP observam-se valores de actividade máxima bastante inferiores às obtidas com o 5'-IMP. Observa-se, igualmente, a ausência de actividade enzimática sobre o dAMP e sobre qualquer um dos nucleósidos 3'- ou 2'-monofosfatos.

4.1.d.7. Efeito da concentração do substrato na velocidade da reacção enzimática. Determinação dos valores de K_m e $V_{máx}$.

Para o estudo do efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da reacção, a mistura da reacção continha enzima e concentrações variáveis de cada um dos distintos nucleósidos monofosfatos utilizados como substratos (IMP, AMP, GMP e XMP),, decorrendo a reacção enzimática na presença e na ausência de 0,050 mM de Ap_4A.

Os resultados obtidos encontram-se descritos na *Tabela 8*. Os mesmos resultados estão representados na *Fig. 26* sob a forma de gráficos v *versus* [S] e $1/v$ *versus* 1/[S] (Dixon e Webb, 1979).

Tabela 7. Especificidade da enzima 5'-nucleotídase IMP/GMP específica frente a distintos compostos utilizados como substratos.

Substrato (2 mM)	**Sem Ap_4A** (%)	**Com Ap_4A (0,050 mM)** (%)
5'-IMP	100	100
5'-GMP	66	84
5'-UMP	14	27
5'-XMP	10	21
5'-AMP	9	4
5'-CMP	18	5
3'-AMP	<1	<1
3'-UMP	<1	<1
3'-GMP	<1	<1
2'-AMP	<1	<1
2'-UMP	<1	<1
*d*AMP	<1	<2

Os resultados, expressos percentualmente, correspondem aos valores médios obtidos em quadriplicado, considerando as actividades da enzima sobre o IMP de 2,9 mU/ml e 12,0 mU/ml, na ausência e na presença de 0,050 mM de Ap_4A, respectivamente. A actividade enzimática foi determinada pela quantificação do P_i. Todos os ensaios foram efectuados em duplicado.

Tabela 8. Valores das constantes cinéticas $V_{máx}$ e K_m ($S_{0,5}$) da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica.

Substrato	Sem Ap_4A			Com Ap_4A		
	$V_{máx.}$ mU/mg	K_m ($S_{0,5}$) mM	n_H	$V_{máx.}$ mU/mg	K_m ($S_{0,5}$) mM	n_H
IMP	5	0,6	0,8	25	0,3	1,1
GMP	25	4,6	1,0	25	0,7	1,2
XMP	26	11	1,2	26	4,7	1,0
AMP	15	15	2,3	15	7,0	1,7

Estes valores foram obtidos segundo a representação de Hill (Dixon e Webb, 1979), a partir dos resultados obtidos experimentalmente. Utilizou-se enzima parcialmente purificada obtida precipitação com sulfato de amónio (25%-45%) e eluição por uma coluna de Sephacryl S-300.

4.1.d.8. Efectores da 5'-nucleotídase

4.1.d.8.a. Efeito dos catiões monovalentes

De acordo com os dados bibliográficos, a presença de catiões monovalentes alcalinos, como o Na^+ e o K^+, quando presentes em concentrações elevadas (superiores às dos metais divalentes) são capazes de estimular a actividade da enzima 5'-nucleotídase citosólica IMP/GMP específica. Esta activação da enzima traduz-se na sua capacidade de diminuir e aumentar os valores de, respectivamente, K_m e $V_{max.}$ enzimáticas, tanto na presença de IMP como na presença de AMP como substratos. A presença destes catiões é ainda capaz de transformar cinéticas sigmoidais em cinéticas do tipo hiperbólico, como acontece com o AMP como substrato. Os catiões Li^+ são, igualmente, capazes de activar a enzima mas em menor extensão que os anteriormente referidos (Itoh, 1981; Itoh e Yamada, 1990).

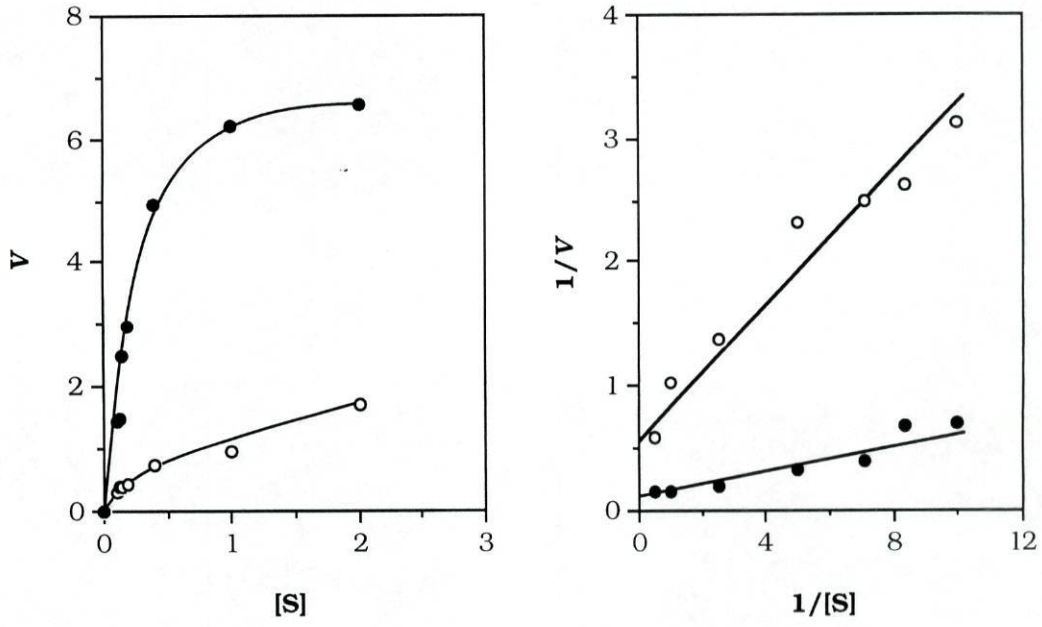
A enzima usada nestes ensaios foi enzima proveniente da coluna de fosfocelulose (etapa 3 do processo de purificação), sujeita previamente a um processo de dessalinização com uma coluna de PD-10 (ver ponto 3.2.j

Fig. 26. Representações gráficas do efeito da concentração de distintos substratos na velocidade de reacção catalisada pela 5'-nucleotídase: *v versus* [S] e 1/*v versus* 1/[S].

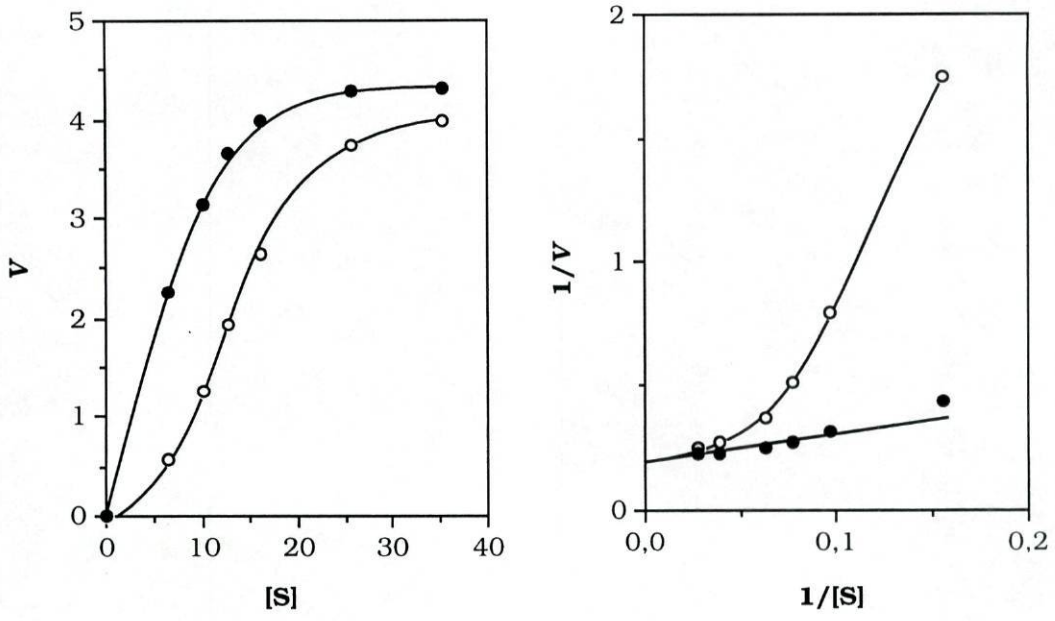
A mistura de reacção era constituída por 50 mM Imidazol,HCl (pH 6,6), 5 mM de $MgCl_2$, 0,1% de BSA, 0,22 M de NaCl, concentrações variáveis de distintos substratos IMP (0 a 2 mM) (A), AMP (0 a 35,2 mM) (B), GMP (0 a 2,6 mM) (C) e XMP (0 a 11 mM) (D), na presença (•) e na ausência (o) de 0,05 mM de Ap_4A, e enzima (purificada por filtração em Sephacryl S-300). A actividade enzimática foi determinada pela quantificação de P_i (Material e Métodos).

v e [S], estão expressos em mU/ml e mM, repectivamente.

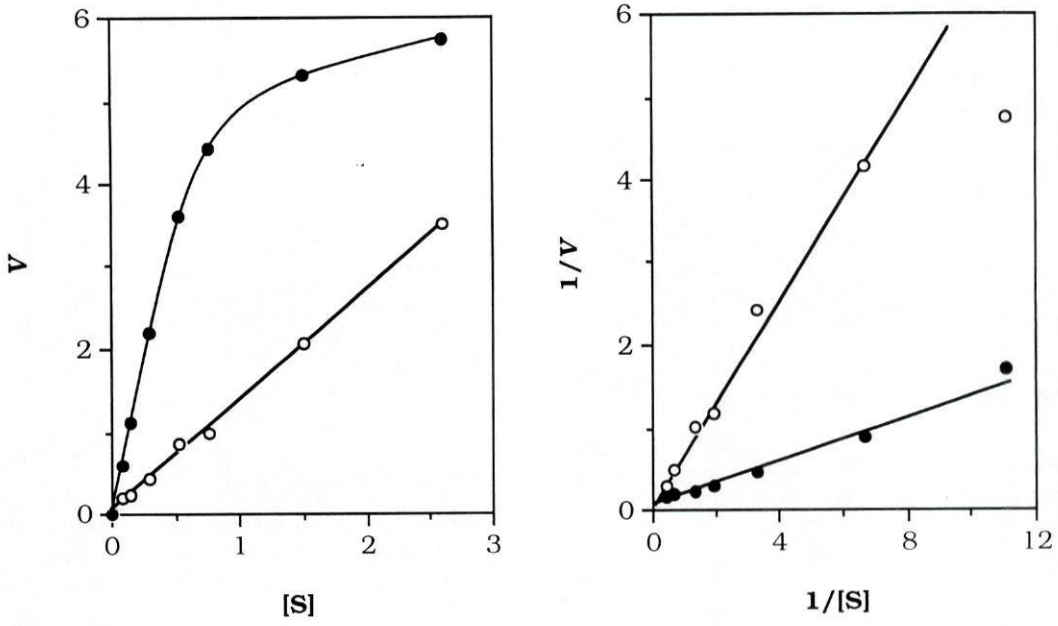
A. IMP



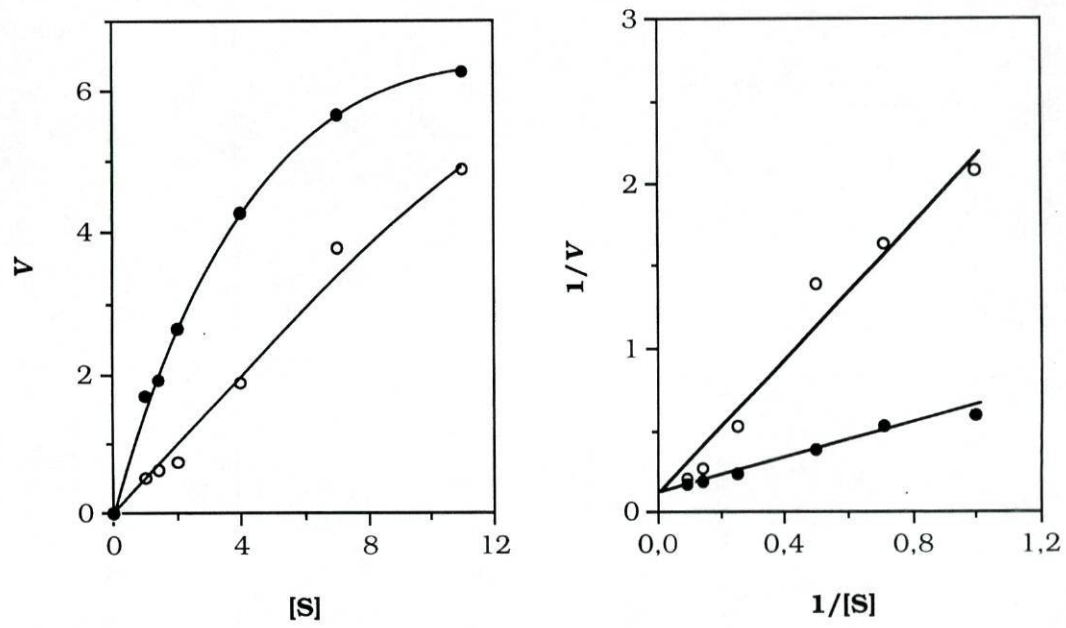
B. AMP



C. GMP



D. XMP



de Material e Métodos), para eliminar o NaCl utilizado durante o seu processo de purificação.

Ensaiou-se o efeito de três catiões monovalentes (Na^+, K^+ e Li^+), a concentrações de 0 a 1,2 M.

(i) Influência de catiões Na^+.

A actividade nucleotidásica aumenta com a concentração do catião, alcançando-se um máximo para valores de cerca de 1,0 M, no qual a actividade aumentou umas 8 vezes em relação ao control sem Na^+. Na presença de Ap_4A, a actividade máxima atinge-se para valores de concentração em Na^+ de cerca de 0,4 M, observando-se uma activação, em presença de Na^+, de apenas cerca de 2 vezes. Os efeitos estimuladores do Ap_4A e do Na^+ não são aditivos (*Fig. 27 A*).

(ii) Influência dos catiões K^+.

O efeito deste ião apenas se observa a concentrações superiores a 0,25 M. A partir deste valor, a actividade enzimática aumenta, igualmente, cerca de 8 vezes. Em presença de Ap_4A, alcança-se uma activação máxima sensivelmente inferior a 2 vezes (*Fig. 27 B*).

(iii) Influência dos catiões Li^+.

Não se observam alterações apreciáveis na actividade da enzima para concentrações em Li^+ até 1,2 M. Na presença de Ap_4A, observa-se uma pequena activação da enzima para concentrações de 0,1 M em Li^+. Valores superiores são inibidores da enzima (*Fig. 27 C*).

4.1.d.8.b. Efeito dos catiões divalentes.

Os dados descritos na literatura são unânimes em considerar os catiões Mg^{2+}, como indispensáveis para a optimização da actividade da enzima 5'-nucleotídase citosólica, purificada a partir de distintos tecidos ou organismos (Itoh e col., 1967; Itoh, 1981, 1994; Itoh e Oka,1985; Pinto e col., 1987; Spychala e col., 1988; Itoh e Yamada, 1990; Le Hir, 1991).

Outros catiões divalentes são igualmente capazes de substituir os catiões Mg^{2+}, mas com uma eficácia significativamente inferior, como sejam, por ordem decrescente de efectividade, o Co^{2+}, o Ni^{2+} e o Mn^{2+}. A actividade da enzima é, no entanto, reduzida ou praticamente nula quando na presença dos catiões divalentes Ca^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+} e o Pb^{2+} (Itoh e col., 1967; Itoh, 1981,1994; Tsushima, 1986; Itoh e Yamada, 1990).

Num primeiro ensaio, utilizando a mistura de reacção padrão, comparou-se o efeito de duas concentrações (1 e 5 mM) de distintos catiões

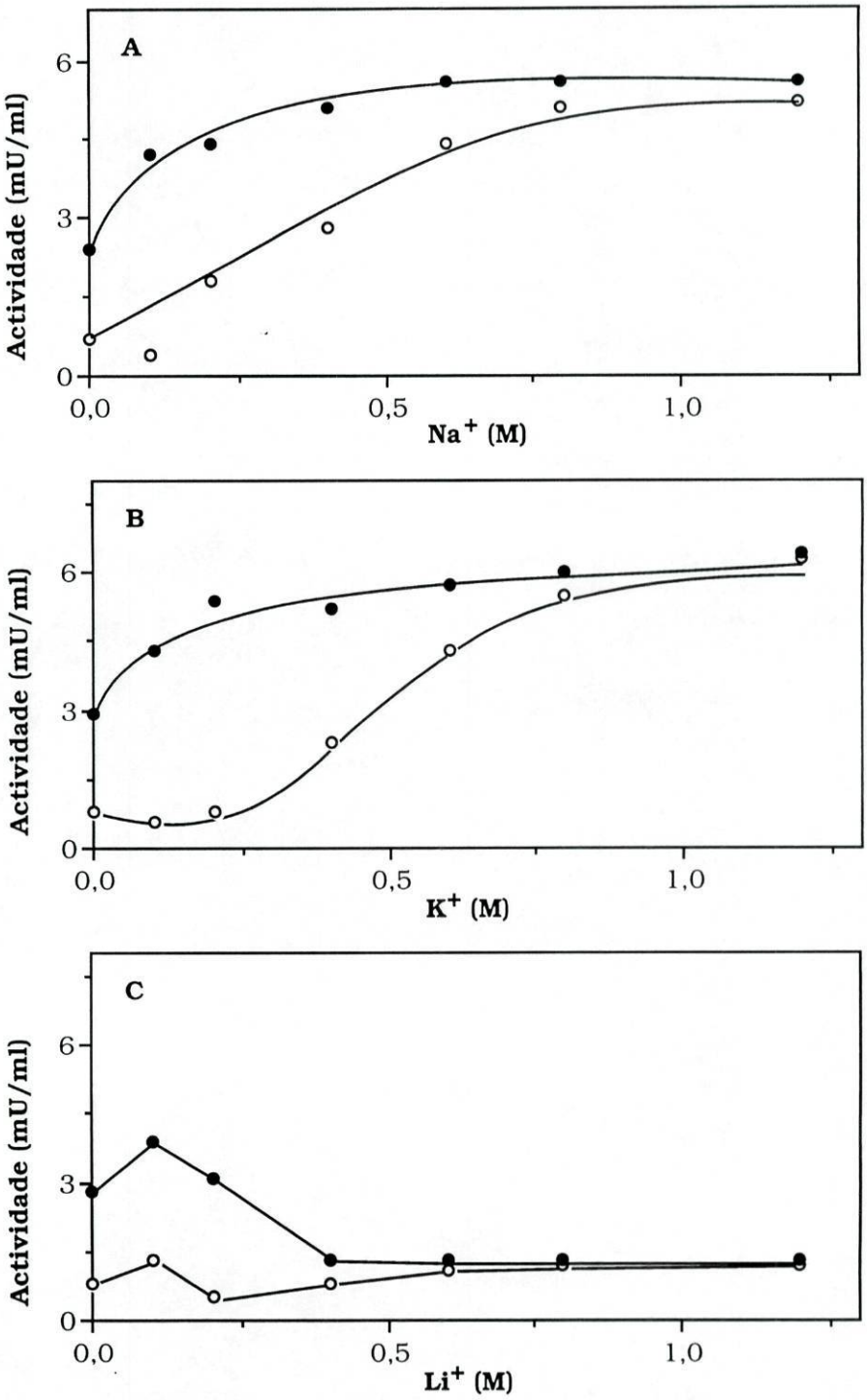


Fig. 27. Efeito dos catiões monovalentes sobre a actividade da enzima.

A amostra de enzima utilizada (etapa 3 de purificação) foi previamente dessalinizada por filtração em gel, como descrito em Material e Métodos. Na mistura de reacção utilizou-se o IMP como substrato e variadas concentrações de cada um dos diferentes catiões monovalentes indicados: Na^+ (A), K^+ (B) e Li^+ (C). A reacção decorreu na ausência (o) e na presença (•) de Ap_4A. A mistura foi incubada a 37 °C, durante 30 minutos, sendo a actividade nucleotidásica determinada pela quantificação do P_i, de acordo com o detalhado em Material e Métodos. Todos os resultados foram obtidos em duplicado.

divalentes (Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Ba^{2+} e Ca^{2+}), sobre a actividade da enzima, parcialmente purificada da etapa 3 do processo de purificação. Os resultados obtidos (*Tabela 9*) mostram que:

(i) O magnésio é o catião que maior efeito exerce sobre a enzima, quer na concentração de 1 mM, quer em concentração mais elevada (5 mM).

(ii) Na presença de catiões Co^{2+} e de Mn^{2+} os valores máximos de actividade nucleotidásica são, respectivamente, de cerca um terço da actividade máxima obtida com os catiões Mg^{2+}.

(iii) Na presença dos catiões Cu^{2+}, o valor máximo da actividade enzimática corresponde a cerca de 11% da correspondente actividade na presença do magnésio, enquanto que com os catiões Ni^{2+} e Zn^{2+} a actividade nucleotidásica é, em ambos os casos, uma actividade praticamente residual.

(iv) Os restantes catiões divalentes ensaiados não foram capazes de substituir o magnésio ou qualquer um dos restantes catiões na reacção enzimática, não tendo praticamente qualquer influência na actividade nucleotidásica.

Curvas de activação dos diferentes catiões divalentes.

A mistura de reacção foi em tudo semelhante à mistura de reacção habitualmente utilizada, sendo o $MgCl_2$ substituído por concentrações variáveis, normalmente entre 0 e 10 mM, dos catiões Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+} ou Ni^{2+}. O ensaio foi efectuado na presença e na ausência de 0,050 mM de Ap_4A como efector enzimático.

Os resultados demonstram que a actividade nucleotidásica é estrictamente dependente da presença de catiões divalentes e particularmente dos iões magnésio, uma vez que, a falta destes se traduz na ausência total de actividade nucleotidásica. Obteve-se com este catião e na presença de Ap_4A, uma curva hiperbólica (*Fig. 28*), sendo a actividade máxima enzimática atingida a partir da uma concentração em magnésio de cerca de 1 mM. Nas referidas condições de ensaio o valor de K_a é de 0,5 mM. Na ausência de Ap_4A a actividade máxima da enzima é cerca de 4 vezes inferior à correspondente actividade verificada quando na presença de Ap_4A, apresentando valores de K_a cerca de 10 vezes superiores (3,9 mM).

Com os catiões cobalto e na presença de Ap_4A, a curva de activação enzimática é hiperbólica, à semelhança da curva obtida com o magnésio, podendo substituir os iões magnésio, mas com menor efectividade. O valor máximo de actividade é atingido para concentrações em Co^{2+} de cerca de 3

mM, mantendo-se esse efeito pelo menos até à concentração de 50 mM (resultado não mostrado). O valor de K_a é de 1,4 mM.

Tabela 9. Comparação do efeito exercido por distintos catiões divalentes na actividade da enzima 5'-nucleotídase IMP/GMP específica.

	1 mM	5 mM
Mg^{2+}	100	100
Mn^{2+}	36	12
Co^{2+}	30	46
Cu^{2+}	< 1	< 11
Ni^{2+}	3	7
Zn^{2+}	6	< 1
Ba^{2+}	< 1	< 1
Ca^{2+}	< 1	< 1

A mistura de reacção utilizada continha os constituintes habituais na mistura de reacção padrão e duas concentrações diferentes (1 e 5 mM) dos catiões indicados. A mistura foi incubada a 37°C durante 30 minutos e a actividade nucleotidásica determinada pela quantificação do P_i formado (Material e Métodos).

As actividades enzimáticas estão expressas em valor percentual comparativamente com a actividade máxima obtida na presença de 1 e de 5 mM de Mg^{2+}, respectivamente, de 9,8 e12 mU/ml.

A partir da curva da actividade enzimática, obtida na presença dos catiões níquel, igualmente na presença de Ap_4A, pode observar-se que a reacção enzimática, para valores de concentração em Ni^{2+} inferiores a 2 mM, decorre muito lentamente. Para valores superiores a 2 mM, a actividade nucleotidásica, aumenta gradualmente, atingindo o seu máximo

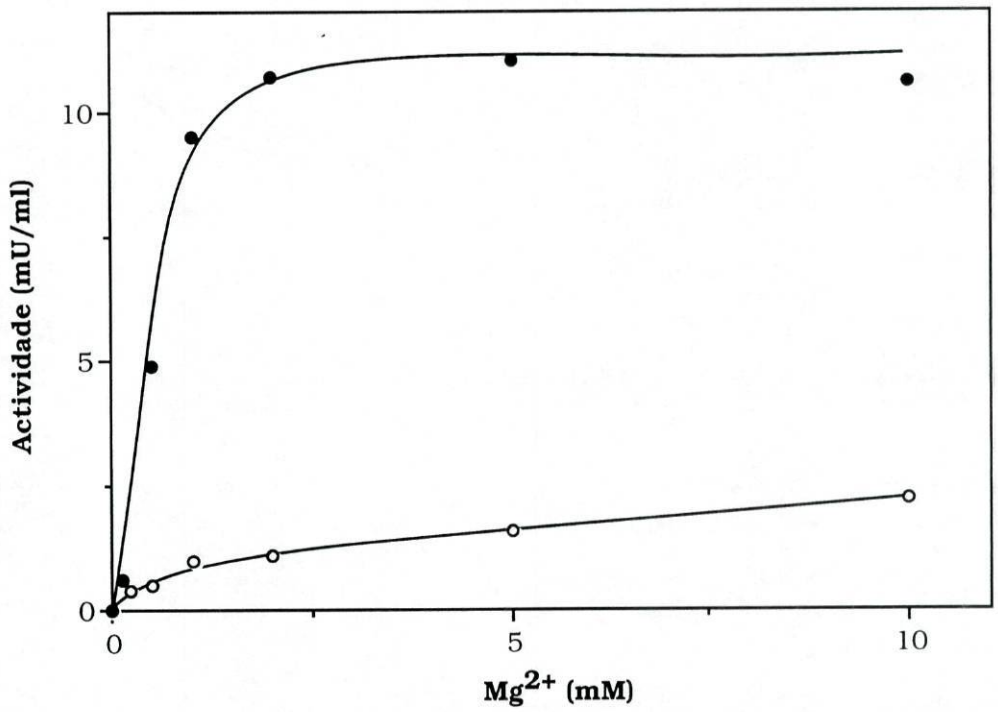


Fig. 28. Efeito da concentração do catião Mg^{2+} na actividade nucleotidásica.

A mistura de reacção continha os constituintes normais da mistura de reacção padrão, enzima parcialmente purificada da coluna de fosfocelulose e concentrações variáveis (0 a 10 mM) de Mg^{2+}. A reacção decorreu na presença (•) ou na ausência (o) de 0,05 mM de Ap4A. A mistura reaccional foi incubada a 37°C durante 30 minutos. A actividade nucleotidásica foi determinada pela quantificação do P_i como se descreve em Material e Métodos.

na presença de 25 mM em Ni^{2+}, a partir do qual diminui ligeiramente até valores de concentração de 50 mM (resultado não apresentado).

A curva de actividade enzimática obtida com o manganésio, na presença de Ap_4A, apresenta um aspecto diferente das correspondentes curvas obtidas com qualquer outro catião divalente. Verifica-se com este catião, um aumento brusco da actividade que se mantém praticamente constante entre valores de concentração em manganésio situados entre 0,3 e 1,0 mM, diminuindo depois abruptamente até valores próximos de zero.

Na *Fig. 29* observam-se, comparativamente, o comportamento da enzima na presença dos catiões divalentes referidos, até à concentração de 10 mM.

Os resultados obtidos com a enzima de cérebro de rato corroboram os descritos com enzimas similares de origens distintas (Itoh e col., 1967, 1978; Itoh, 1981, 1994; Tsushima, 1986; Spychala e col., 1988; Itoh e Yamada, 1990; Le Hir, 1991; Niedzwiecka e Jaroszewizz, 1996).

4.1.d.8.c. Efeito de nucleótidos, Ap_4A e 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG).

Em 1977, Van den Berghe e col. descreveram, pela primeira vez, o efeito estimulador do ATP e do GTP, em concentrações da ordem de mM, sobre a enzima 5'-nucleotídase citosólica purificada a partir do fígado de rato. O efeito destes nucleósidos trifosfatos sobre a enzima traduz-se na capacidade de, simultaneamente, aumentarem e diminuirem os valores de, respectivamente, $V_{máx}$ e K_m, quando utilizam como substratos o IMP, GMP e AMP. Estes efectores apresentam ainda a particularidade de transformarem em cinéticas hiperbólicas as cinéticas sigmoidais que se verificam quando o AMP é utilizado como substrato (Van den Berghe e col., 1977; Itoh e col.,1978; Itoh e Oka, 1985; Tsushima, 1986; Spychala e col., 1988; Itoh e Yamada, 1990). Outros nucleótidos e derivados são igualmente capazes de activar a enzima, como por exemplo o dATP (Itoh e Yamada, 1990) e o AMP-PCP (β,γ-metileno adenosina 5'-trifosfato) (Pinto e col., 1987). O ADP bem como o derivado AMP-CP (α,β-metileno adenosina 5'-difosfato) - inibidor da ecto-5'-nucleotídase - exercem efeito semelhante, mas em menor grau (Bontemps, 1989a,b; Itoh e col.,1986; Itoh e Yamada, 1990). Estes efeitos activadores foram, em estudos subsequentes, demonstrados, igualmente, em enzimas similares total ou parcialmente purificadas de outros tecidos (Spychala e col., 1988; Truong e col., 1988; Itoh, 1994).

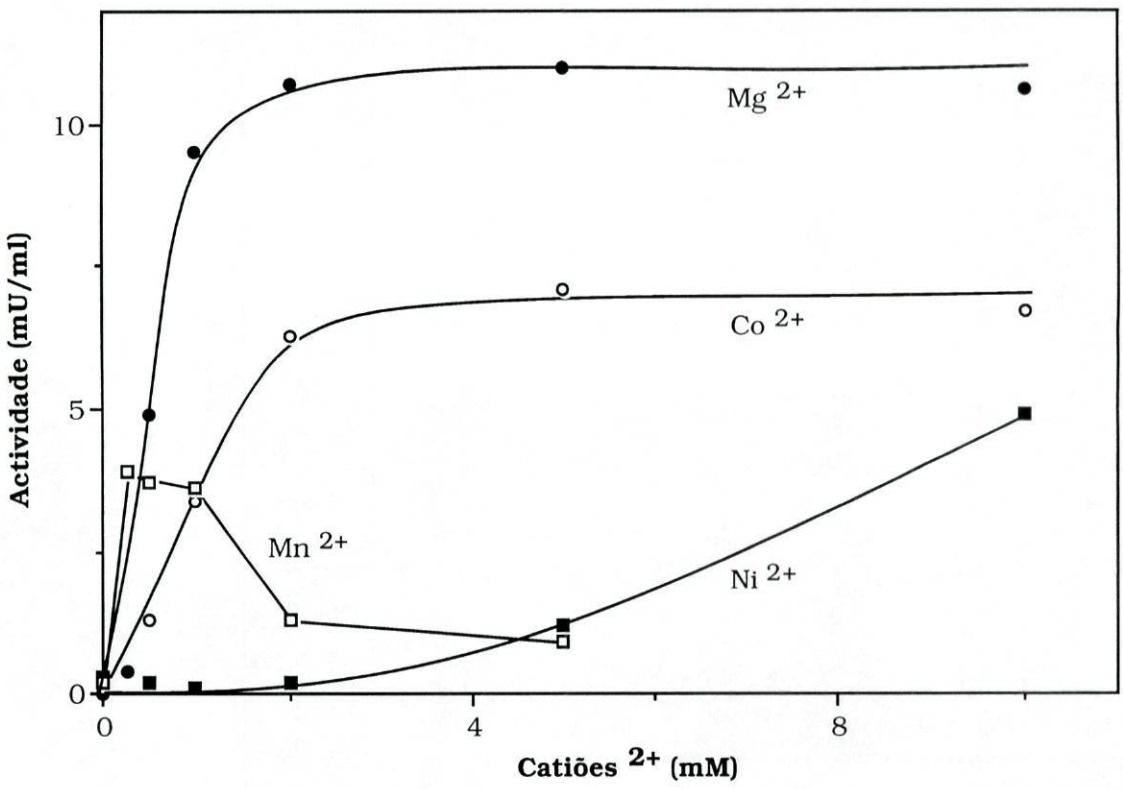


Fig. 29. Comparação entre os efeitos dos catiões Mg^{2+},Co^{2+}, Ni^{2+} e Mn^{2+} sobre a actividade da enzima.

A mistura de reacção continha enzima parcialmente purificada da coluna de fosfocelulose, 0,050 mM de Ap_4A e concentrações variáveis (0 a 10 mM) de cada um dos catiões em estudo. Os restantes constituintes, bem como o protocolo de determinação da actividade nucleotidásica, foram em tudo idênticos aos descritos na figura anterior (*Fig. 28*).

Em 1986, o grupo de Sillero (Pinto e col. 1986) ao estudar o metabolismo dos compostos purínicos nos embriões de *Artemia* descreveu pela primeira vez o efeito estimulador do Ap_4A sobre a 5'-nucleotídase citosólica presente neste crustáceo. Nesse mesmo estudo, verificou ainda que esse efeito se reproduzia em enzima similar, purificada a partir do fígado de rato. Estudos subsequentes vieram a confirmar o efeito estimulador do Ap_4A, bem como de compostos com ele relacionados, sobre a enzima total ou parcialmente purificada de outras origens (Itoh e Yamada, 1990; Le Hir, 1991; Itoh, 1994) O mecanismo de actuação deste composto dinucleósido tetrafosfato era similar ao descrito para o ATP, com a particularidade de exercer o seu efeito a valores de concentração de duas ordens de grandeza inferiores.

Sensivelmente pela mesma altura, Bontemps e col. descreveram nos eritrócitos humanos o efeito estimulador do 2,3-DPG (Bontemps e col, 1986, 1988, 1989a,b) sobre a 5'-nucleotídase, efeito esse cujo mecanismo de acção era semelhante ao descrito para o ATP, diminuindo os valores de K_m e aumentando a V_{max}. Mais ainda, esses efeitos verificavam-se para valores de concentrações da mesma ordem de grandeza que os do ATP. Estudos posteriores, em enzimas similares provenientes de distintas origens, vieram a demonstrar a universalidade destes efeitos (Itoh e Yamada, 1990; Le Hir, 1991; Itoh, 1994). Outros derivados do glicerol, 2-DPG e 3-DPG, actuam igualmente como efectores da enzima, mas em grau inferior (Itoh e Yamada, 1990)

Mais recentemente, Le Hir (1991), demonstrou a capacidade fortemente efectora do decavanadato (forma decamérica do vanadato, um composto inibidor das actividades fosfatásicas). Utilizando enzima parcialmente purificada dos rins de rato encontrou que a velocidade de hidrólise do IMP (1 mM) aumentava 16 vezes, quando na presença de 100 nM decavanadato.

Num primeiro ensaio decidiu-se estudar o comportamento de distintos compostos como possíveis efectores da enzima 5'-nucleotídase de cérebro de rato em idênticas concentrações finais (0,050 mM). O facto de se usar este valor de concentração teve como base a experiência adquirida com a enzima da *Artemia* e com o Ap_4A como activador (Pinto e col. 1986) .

Na presença de IMP como substrato na concentração final de 1,0 mM, procedeu-se ao estudo dos possíveis efeitos do Ap_4A, ATP, ADP, Ado, $Ado+P_4$, p_4A, P_4, 2,3-DPG, sobre a actividade nucleotidásica, nas concentrações finais de 0,050 mM.

Pelos resultados obtidos, detalhados na *Tabela 10*, pode-se verificar que, nas condições de estudo utilizadas, os únicos compostos com evidentes efeitos activadores foram o Ap_4A e o 2,3-DPG e, que, compostos estruturalmente semelhantes ao Ap_4A, como sejam, p_4A, ATP, ADP, P_4 e a associação Ado + P_4, praticamente não exercem qualquer efeito sobre a actividade da enzima.

Ensaiaram-se, em paralelo, PP_i e P_3, não se tendo verificado qualquer efeito sobre a actividade da enzima (resultados não mostrados).

Tabela 10. Efeito dos distintos compostos indicados sobre a actividade da enzima 5'-nucleotídase IMP/GMP específica.

Substrato (1 mM)	**Efector** (0,050 mM)	**mU/ml**	**Actividade** (%)	**Activação**
IMP	–	1,8	100	1,0
+	Ap_4A	12,3	683	6,8
+	P_4A	2,8	156	1,6
+	ATP	1,8	100	1,0
+	ADP	1,5	83	0,8
+	Ado + P_4	1,8	100	1,0
+	Ado	1,8	100	1,0
+	P_4	1,8	100	1,0
+	2,3-DPG	7,0	389	3,9

A determinação da actividade efectuou-se pela quantificação da inosina formada utilizando como substrato o IMP, como efectores, os compostos indicados na concentração de 0,050 mM e enzima (0,325 mg de proteína) parcialmente purificada (etapa 3). A mistura de reacção foi incubada à temperatura de 37°C, durante 40 min, sendo, depois de filtrada, analisada por HPLC (ver Material e Métodos). Todos os ensaios foram executados em duplicado. (+) e (-) Representam, respectivamente, a presença ou a ausência no meio de reacção, dos compostos descriminados.

4.1.d.8.d. Estudo comparativo entre o Ap_4A e o 2,3-DPG como efectores. Determinação das constantes de activação (K_a).

Para este estudo, na mistura de reacção utilizou-se 1 mM de IMP como substrato e concentrações variáveis de Ap_4A (0 a 0,2 mM) e de 2,3-DPG (0 a 5,0 mM).

A parte A da *Fig. 30*, representa o perfil cromatográfico dos produtos de degradação da actividade 5'-nucleotidásica da enzima sobre o IMP. Como se pode observar, à medida que aumenta a concentração de Ap_4A no ensaio aumenta a quantidade de inosina formada, sendo, contudo esse aumento menos pronunciado a partir de uma concentação do efector de cerca de 100 µM. A parte B da mesma Figura, representa o mesmo perfil de degradação de IMP na presença de 2,3-DPG como efector. Verifica-se, igualmente, o aumento da formação de inosina como resultado do aumento da concentração no meio de ensaio da concentração de efector. A partir de valores de concentração em 2,3-DPG de cerca de 500 µM, praticamente não se observa alteração significativa da quantidade de inosina formada.

De acordo com estes resultados, e com os representados na *Fig. 31*, verifica-se que o Ap_4A comporta-se como melhor e mais eficaz efector da enzima, apresentando valores de K_a, cerca de 6 vezes inferiores aos correspondentes valores do 2,3-DPG.

4.1.d.8.e. Dinucleósidos polifosfatos (Ap_nA). Constantes de activação (K_a) para Ap_4A, Ap_5A e Ap_6A.

Conhecido o comportamento efector do Ap_4A sobre a enzima pretendeu-se, em seguida estudar o efeito de outros compostos do tipo Ap_nA. O ensaio foi efectuado utilizando 1 mM de IMP como substrato e distintos polifosfatos de diadenosina (Ap_2A, Ap_3A, Ap_4A, Ap_5A e Ap_6A) na concentração final de 0,050 mM.

Observou-se que enquanto os dinucleósidos polifosfatos do tipo Ap_nA, em que $n \geq 4$, activam em cerca de 6 a 7 vezes a 5'-nucleotídase, aqueles com um valor de $n<4$, não exercem qualquer efeito sobre a referida enzima (*Tabela 11*).

Uma vez que se verificou um efeito activador de Ap_4A, Ap_5A e Ap_6A sobre a 5'-nucleotídase prodeceu-se à determinação das suas constantes de activação, adicionando à mistura de reacção anteriormente descrita,

A

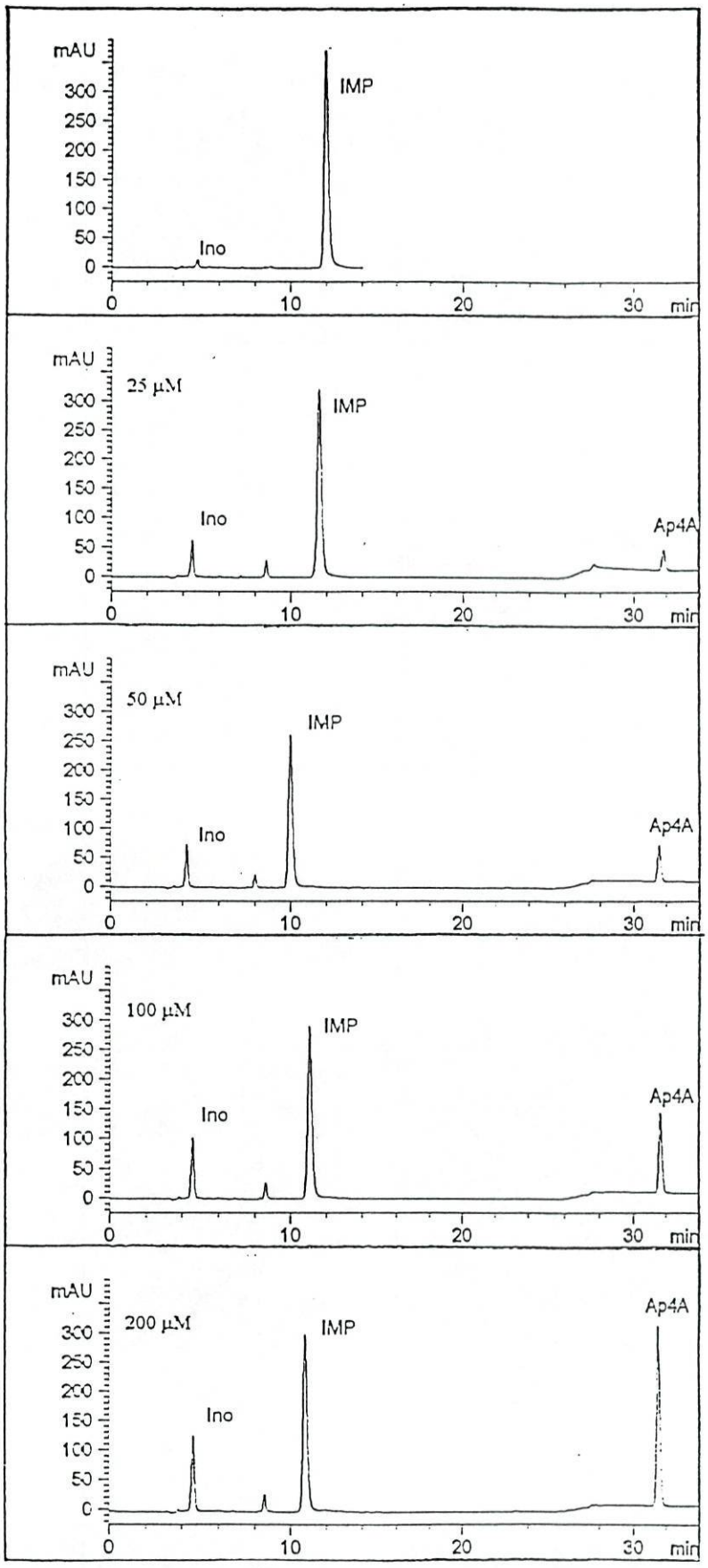
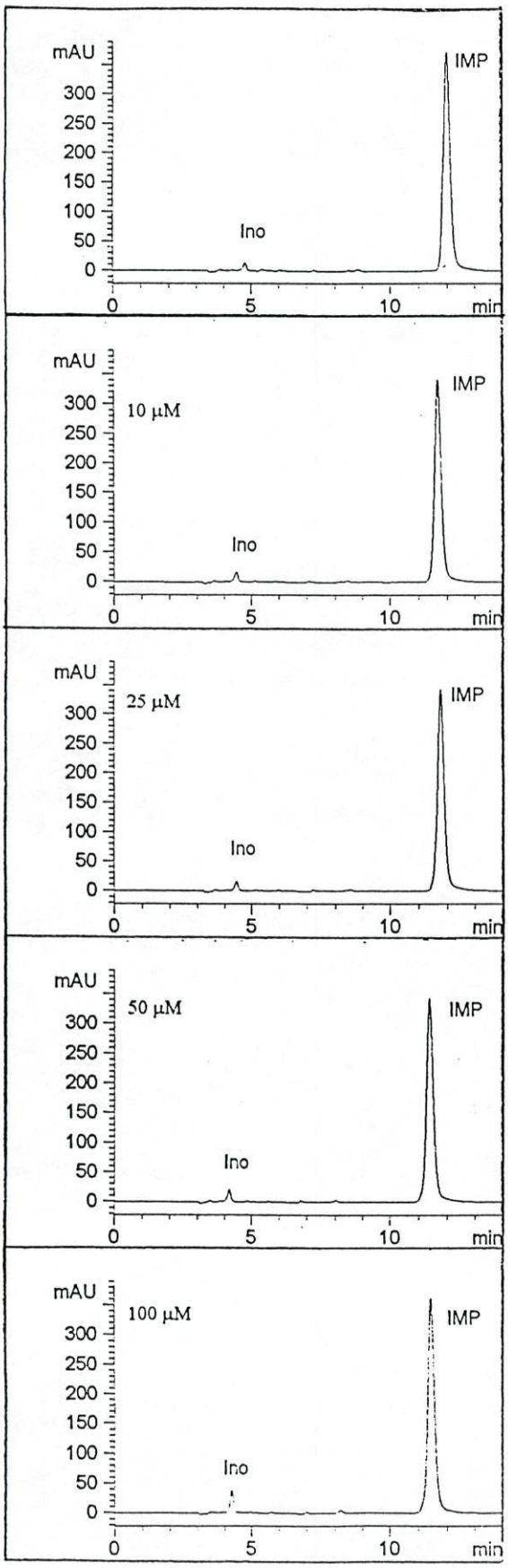
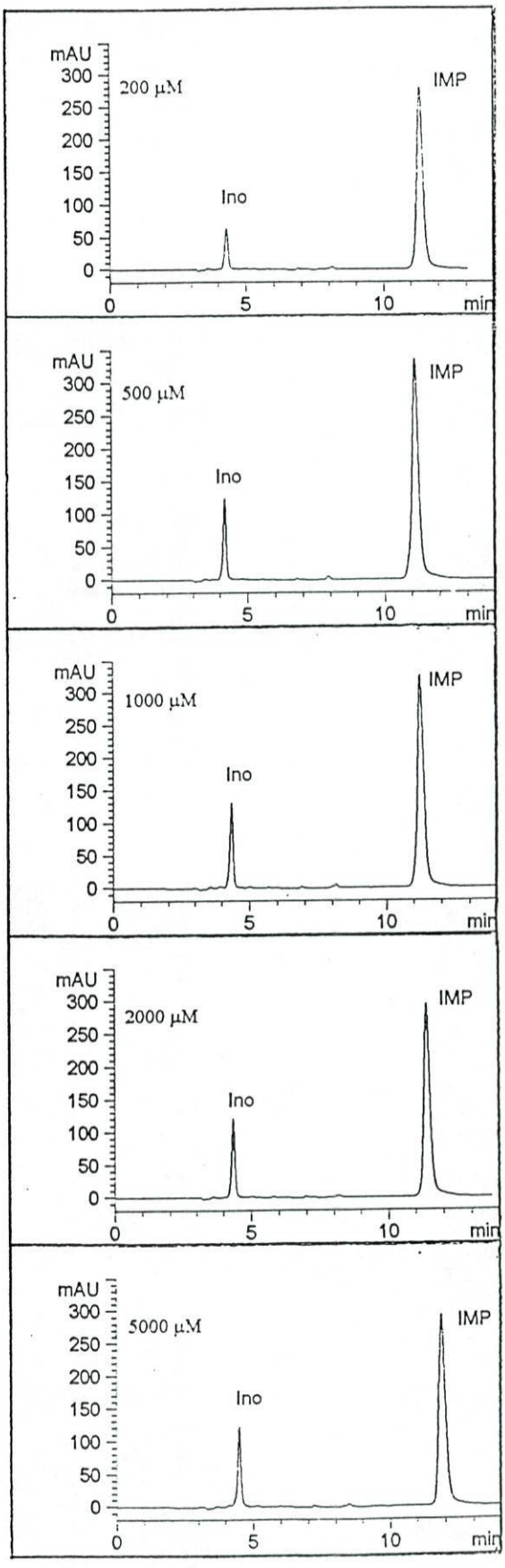


Fig. 30. Efeito do Ap_4A e do 2,3-DPG sobre a actividade da 5'-nucleotídase.

A mistura de reacção continha 1 mM de IMP, enzima da etapa 3 de purificação e os efectores, Ap_4A (**A**) e 2.3-DPG (**B**), nas concentrações indicadas. A mistura foi incubada a 37°C, durante 45 min e as actividades enzimáticas determinadas por HPLC, como se detalha em Material e Métodos. Todos os ensaios foram efectuados em duplicado.

B


mAU
300
250
200
150
100
50
0
IMP
Ino
0
5
10
min
10 μM
25 μM
50 μM
100 μM


mAU
300
250
200
150
100
50
0
200 μM
500 μM
1000 μM
2000 μM
5000 μM
IMP
Ino
0
5
10
min

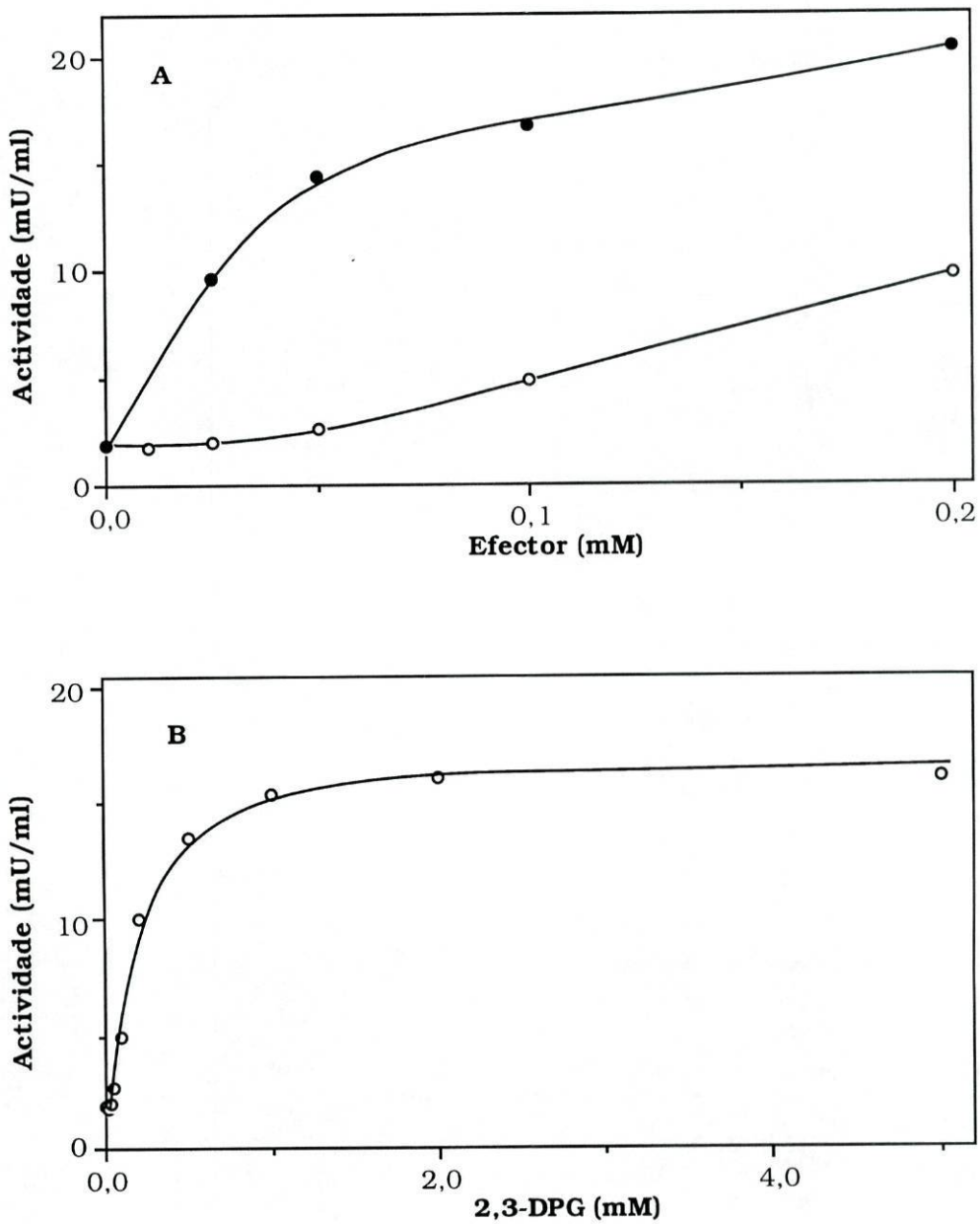


Fig. 31. Estudo comparativo entre o Ap_4A e o 2,3-DPG como efectores da 5'-nucleotídase. Curvas de activação e determinação dos valores de K_a.

A mistura de reacção utilizada foi similar à descrita na *Tabela 10*, substituindo os distintos efectores em estudo, por Ap_4A (0 a 0.2 mM) e 2,3-difosfoglicerato (0 a 5,0 mM). A mistura foi incubada a 37°C durante 45 min. As amostras depois de filtradas foram analizadas por HPLC (Material e Métodos). Com base nos resultados obtidos, os valores de K_a calculados para o Ap_4A e 2,3-DPG foram de 44 e 263 μM, respectivamente.

Em **A**, aspecto comparativo entre as curvas de activação de Ap_4A(•) e 2,3-DPG (o) (0 - 0,2 mM); em **B**, curva de activação da enzima com 2,3-DPG.

concentrações variáveis (6,5, 12,5, 25, 50 e 100 μM) de efector (Ap_4A, Ap_5A e Ap_6A).

Tabela 11. Efeito dos dinucleósidos polifosfatos (Ap_nA) sobre a actividade da 5'-nucleotídase citosólica IMP/GMP específica.

Substrato (1 mM)	Efector (0,050 mM)	mU/ml	Actividade (%)	Activação
IMP	–	1,6	100	1,0
+	Ap_2A	2,1	131	1,3
+	Ap_3A	1,8	113	1,1
+	Ap_4A	10,3	644	6,4
+	Ap_5A	10,0	625	6,3
+	Ap_6A	11,0	688	6,9

A mistura de reacção continha, para um volume final de 0,100 ml, 100 mM de solução tampão Imidazol-HCl, pH 7,0, 5 mM de $MgCl_2$, 0,1% de BSA, 0,22M de NaCl, 1 mM de IMP, 0,050 mM de um dos seguintes polifosfatos de diadenosina indicados e enzima parcialmente purificada. A actividade enzimática foi determinada pela quantificação da inosina formada por HPLC. Todos os ensaios foram efectuados em duplicado.

(+) e (-) Representam, respectivamente, a presença ou a ausência, no meio de reacção, dos compostos indicados.

À medida que aumenta o número de grupos fosfato da cadeia interna desses compostos diminuem os valores dos K_a respectivos, apresentando o Ap_4A o valor mais elevado e o Ap_6A o valor mais baixo (*Fig. 32* e *Tabela 12*).

Valores de activação da enzima de 4,3 e 4,2 vezes, respectivamente, com Ap_4A e AP_5A, e de, respectivamente, 2,8 e 2,5, foram encontrados com enzima proveniente de pulmão de porco (Itoh e Yamada, 1990) e de extracto de levedura (*S. cerevisiae*) (Itoh, 1994). Estes valores, apesar de determinados com concentrações finais nesses dinucleósidos polifosfatos

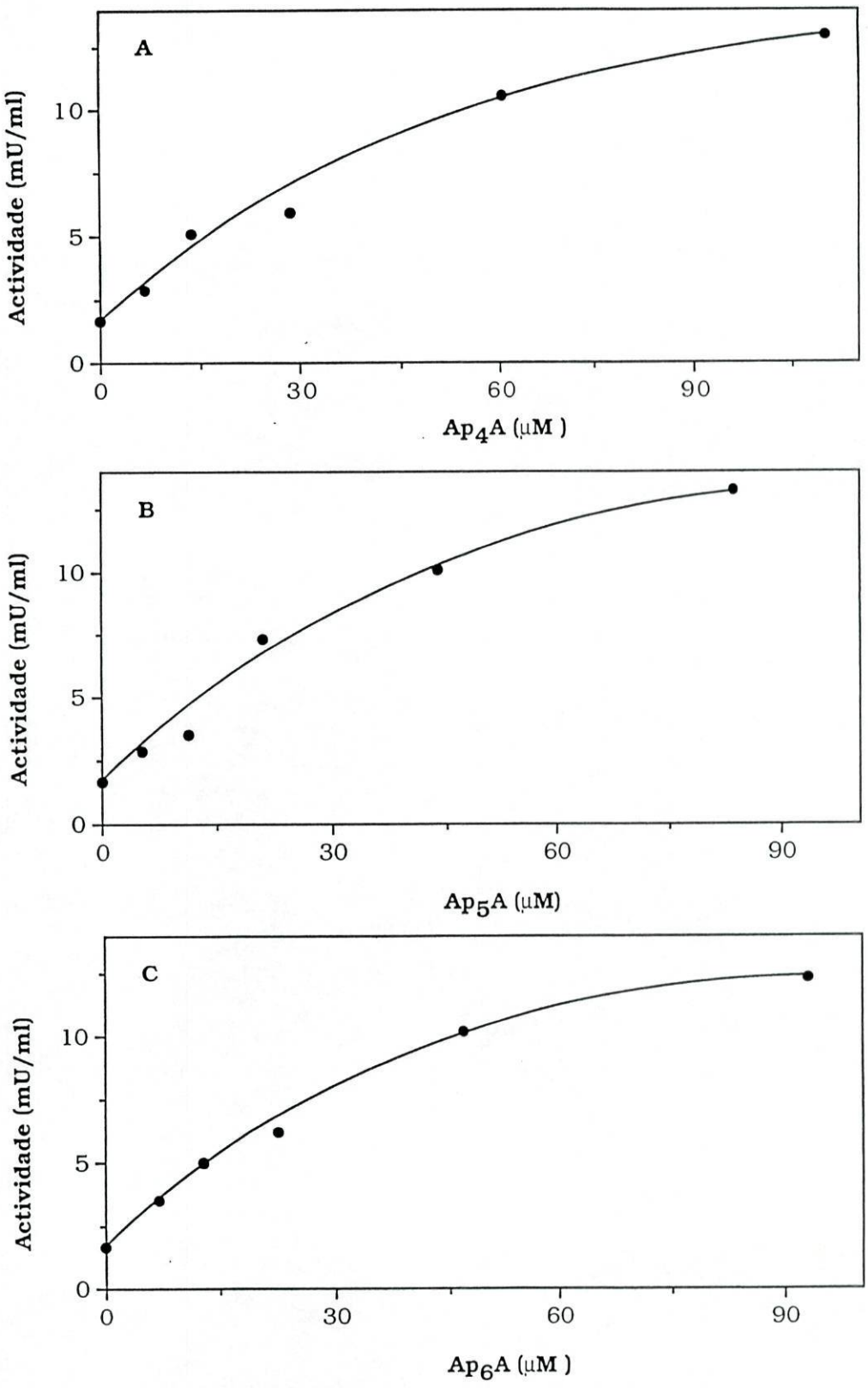


Fig. 32. Curvas de activação e determinação dos valores de K_a do Ap_4A, Ap_5A e Ap_6A.

A mistura de reacção continha 1 mM de IMP, enzima parcialmente purificada da coluna de fosfocelulose e concentrações variáveis (6,5 a 100 µM) de cada um dos efectores em estudo, Ap_4A (**A**), Ap_5A (**B**) e Ap_6A (**C**). Após incubação a 37°C, durante 45 min. As actividades enzimáticas foram determinadas por HPLC, como se detalha em Material e Métodos. Todos os ensaios foram efectuados em duplicado.

de, respectivamente, 1 e 2,5 mM, são inferiores aos descritos neste trabalho

Tabela 12. Valores das constantes de activação aparentes (K_a) do Ap_4A, Ap_5A e Ap_6A sobre a 5´-nucleotídase.

Efector	V_{max}* (mU/ml)	K_a* (μM)
Ap_4A	23,7 ± 5,5	82,9 ± 37,8
Ap_5A	22,5 ± 5,5	76,6 ± 32,2
Ap_6A	17,4 ± 1,9	56,6 ± 12,3

* Os valores de V_{max}. e de K_a foram determinados a partir dos resultados obtidos experimentalmente e mediante a aplicação de um programa informático a esse fim destinado, desenvolvido no laboratório por Rui Fontes, com base nos trabalhos de Wilkinson (1961) e Duggleby (1981).

A activação enzimática verificada pelo Ap_3A (1 mM) sobre as referidas enzimas, respectivamente, de 2,8 e de 2 vezes (Itoh e Yamada, 1990), não foi confimada, neste trabalho, com enzima similar de cérebro do rato. Estas diferenças de activação podem ser explicadas, não só, pelas diferentes origens da enzima, mas também, pelas condições de ensaio utilizadas, nomeadamente, pela concentração em efector ensaiada (0,05 mM) e pela presença na mistura de reacção de mais ou menos NaCl, capaz de estimular a actividade enzimática.

4.1.d.8.f. Efeito dos heterodinucleósidos polifosfatos.

Como se observou nos ensaios realizados anteriormente, apenas os dinucleósidos polifosfatos com um número de fosfatos nas suas cadeias internas igual o superior a 4 se comportaram como activadores da 5'-nucleotídase. Com base nestes dados pretendeu-se saber o que ocorreria se

se mantivesse constante o número de fosfatos da cadeia e se se alterasse uma ou as duas base constituintes deste tipo de compostos.

Sendo assim, procedeu-se ao estudo dos efeitos de alguns compostos polifosfatos relativamente fáceis de obter ou de sintetizar no laboratório, posuidores dessas caracteristicas.

O ensaio foi efectuado nas mesmas condições que o escrito no ponto 4.1.d.8.2, utilizando como efectores os seguintes compostos: Ap_4C, Ap_4G, Ap_4I, Ap_4U, Ap_4X, Ap_4A, $Ap_4{\varepsilon}A$, $ddAp_4A$ e Gp_4G.

De acordo com os resultados obtidos e apresentados na *Tabela 13* verifica-se, que:

(i) De todos os compostos ensaiados o Ap_4A é o que apresenta um efeito activador mais potente.

(ii) Quando uma das bases é a adenina e a outra uma purina diferente, Ap_4G, Ap_4X e Ap_4I, obtém-se uma activação comparada com a do Ap_4A de 80, 65 e 58%, respectivamente; no caso do Gp_4G, em que a base adenina do Ap_4G foi substituida por outra purina (guanina), obtém-se uma activação comparada com a do Ap_4A de 44%.

(iii) Se uma das bases é a adenina e a outra uma pirimidina (Ap_4U, Ap_4C) o dinucleósido polifosfato resultante não é activador.

(iv) Os resultados obtidos com o $Ap_4{\varepsilon}A$ e o $ddAp_4A$, indicam que o tamanho da base, assim como a integridade da molécula de ribose são essenciais para que o Ap_4A seja activador.

4.21.d.8.g. Efeito dos polifosfatos P_5 e P_{15}

A hipótese de estudar a possível capacidade efectora dos compostos polifosfatos sobre a actividade da enzima 5'-nucleotídase surgiu como resultado da activação da mesma pelo Ap_4A, Ap_5A e Ap_6A, e do decréscimo dos respectivos valores de K_a aparente de acordo com o aumento do número de grupos fosfato internos.

Para se proceder ao estudo dos polifosfatos decidiu-se, primeiramente, estudar o efeito do P_5 e do P_{15}, uma vez que constituem compostos comerciais de polifosfatos de cadeia imediatamente superior a 4, utilizando na mistura de reacção 1 mM de IMP e concentrações variáveis (5, 10, 25, 50, 100, 200 e 500 μM) dos compostos polifosfatos P_5 e P_{15}.

Na *Tabela 14* e na *Fig. 33* observa-se que, enquanto que o P_5 não exerce um efeito activador da enzima, o P_{15} apresenta um comportamento similar ao dos dinucleósidos polifosfatos da adenosina, activando a enzima em cerca de 7 a 8 vezes. O valor de K_a calculado a partir dos dados obtidos

para esse polifosfato foi de 8,0 μM ± 0,7, inferior aos correspondentes valores obtidos para os dinucleósidos de diadenosina.

Tabela 13. Efeito dos heterodinucleósidos polifosfatos e do Gp_4G sobre a actividade da 5-nucleotídase.

Substrato (1 mM)	Efector (0,050 mM)	mU/ml	Actividade (%)	Activação
IMP	–	1,7	100	1,0
+	Ap_4A	8,5	500	5,0
+	Gp_4G	3,7	218	2,2
+	Ap_4G	6,8	400	4,0
+	Ap_4I	4,9	288	2,9
+	Ap_4C	1,2	71	0,7
+	Ap_4U	1,8	106	1,1
+	Ap_4X	5,5	324	3,3
+	$Ap_4\varepsilon A$	2,6	153	1,5
+	$ddAp_4A$	2,8	165	1.7

A determinação da actividade da 5'-nucleotídase foi efectuada mediante a quantificação da inosina formada na presença dos efectores indicados e enzima (etapa 3 do processo de purificação) por HPLC (Material e Métodos).

(+) e (-) Representam, respectivamente, a presença ou a ausência no meio reaccional dos compostos descriminados.

4.1.e. Análise cromatográfica de polifosfatos comerciais.

4.1.e.1. Análise de P_5.

Os ensaios antes descritos foram efectuados com o polifosfato P_5, produto da casa Sigma (S-5878), designado como "sodium phosphate glass

Type 5", com um comprimento de cadeia de fosfatos, segundo a casa comercial, de 5 ± 2.

Tabela 14. Influência dos polifosfatados, P_5 e P_{15}, na actividade da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica.

Efector (μM)	Actividade (mU/ml)	
	P_5	P_{15}
–	1,7	1,7
5	1,7	6,3
10	1,6	8,5
25	1,7	10,2
50	1,7	12,3
100	2,0	12,5
200	2,1	12,8
500	1,7	14,3

A determinação da actividade da 5'-nucleotídase foi efectuada mediante a quantificação da inosina formada na presença dos efectores indicados e enzima (etapa 3 do processo de purificação) por HPLC (Material e Métodos).

Na tentativa de se saber qual a concentração exacta em P_5 utilizada nos ensaios tornou-se necessário conhecer a verdadeira distribuição dos polifosfatos no produto, procedendo-se para isso à análise de uma alíquota por cromatografia de troca-iónica (coluna de DEAE-celulose).

Os resultados obtidos (*Fig. 34*) mostram uma série de picos correspondentes a P_i, PP_i, P_3, P_4 e P_5, como se pode posteriormente

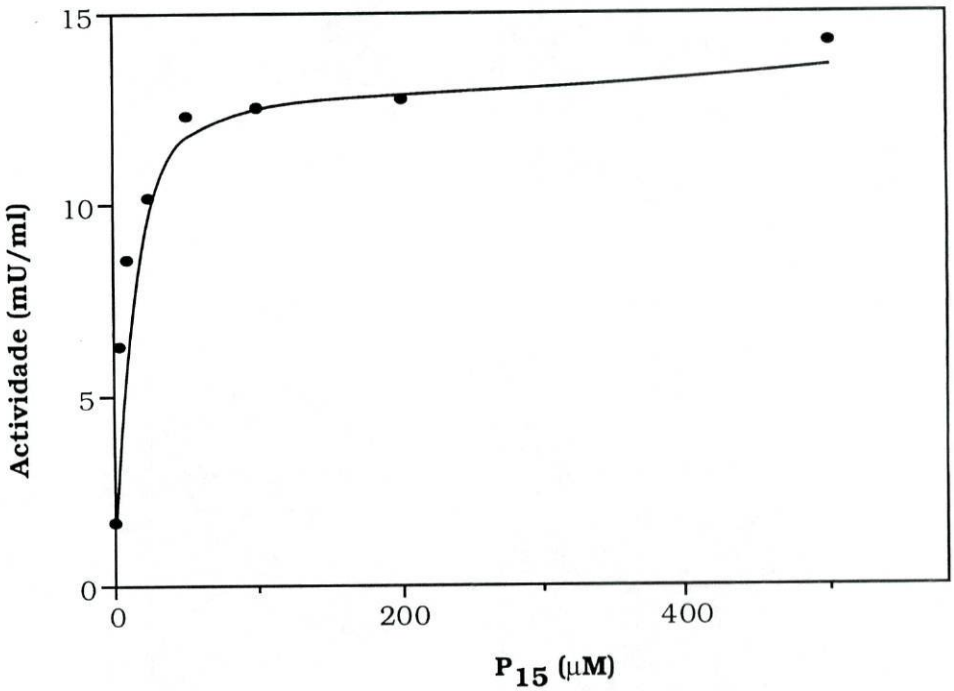


Fig. 33. Efeito da concentração de P_{15} na actividade nucleotidásica da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica.

A determinação da actividade foi efectuada, pela quantificação da inosina formada, concentrações variáveis de P_{15} e enzima proveniente da coluna de fosfocelulose. Após incubação a 37°C durante 45 min, as amostras foram analisadas por HPLC (Material e Métodos).

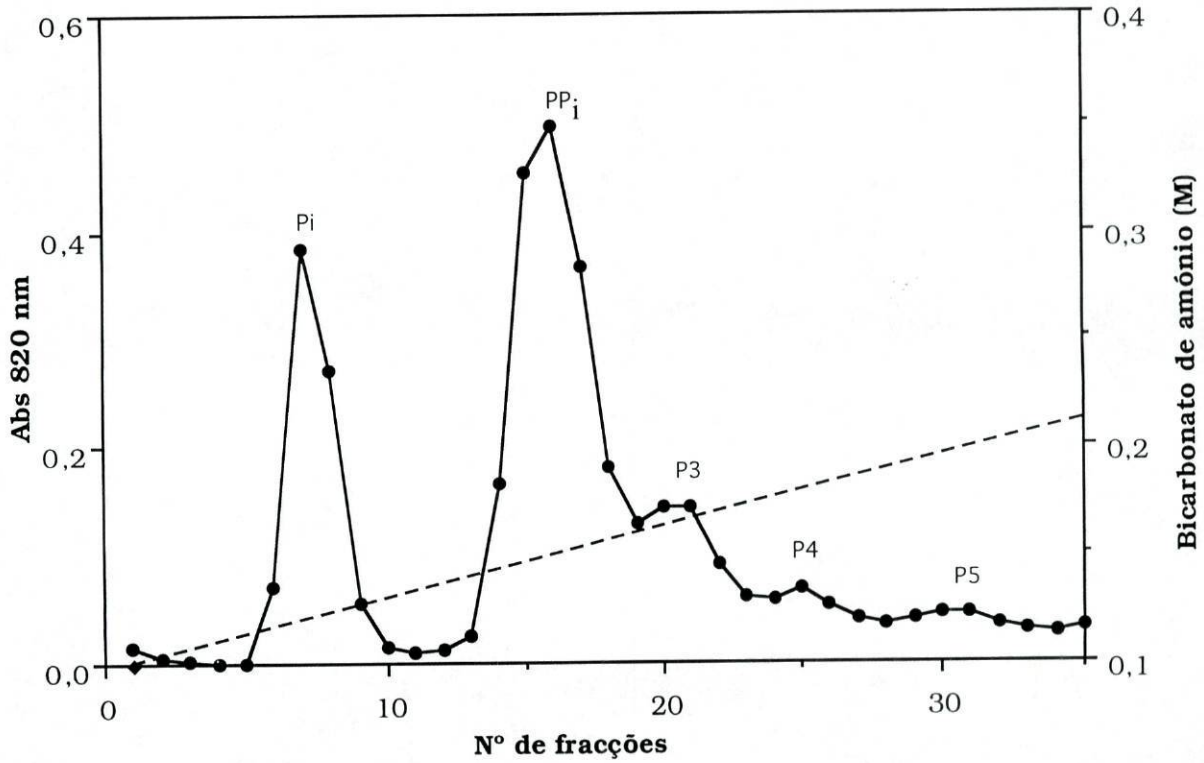


Fig. 34. Cromatografia do polifosfato P_5 comercial (Sigma) em coluna de DEAE-celulose.

Numa coluna de DEAE-celulose de 5 ml, equilibrada com uma solução tampão de 0,1 M de bicarbonato de amónio (pH 8,0), aplicaram-se 0,06 ml de uma solução de P_5 10 mM. A coluna foi eluída por um gradiente contínuo de bicarbonato de amónio (pH 8,0) de 0,1 M a 0,4 M (200 ml). O fluxo de eluição foi de 25-30 ml/h. A alíquotas das fracções cromatográficas recolhidas (2,2 ml) adicionou-se $MgCl_2$ a uma concentração final de 1 mM e 1,7 U de fosfátase alcalina com o fim de hidrolizar todos os fosfatos. Depois de incubar a 37°C durante 60 minutos, determinou-se o Pi formado (Material e Métodos).

demonstrar, mediante a eluição de padrões nas mesmas condições. Como se pode observar a maior parte do P_5 utilizado estava constituído por PP_i.

4.1.e.2. Análise de P_{15}.

Nos ensaios efectuados com P_{15} utilizou-se o produto comercial da casa Sigma (S-6003), designado como "sodium phosphate glass Type 15", possuindo um tamanho médio de cadeia, segundo a casa comercial, de 18 grupos fosfato.

Uma vez que este produto P_{15} actua como activador da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica, sem prévia purificação, procedeu-se à determinação da sua composição qualitativa com o objectivo de saber qual ou quais os compostos polifosfatos constituintes eram realmente os causadores desse efeito.

Os resultados observados na *Fig. 35.* mostram um pico principal que deverá corresponder, possivelmente, a P_{18} e uma série de picos, aos quais se assumiu corresponder a compostos com número determinado de fosfatos, tendo como referência os perfis de eluição obtidos com o P_i, PP_i, P_3, P_4 e P_5.

4.1.f. Estudo do efeito activador dos distintos polifosfatos sobre a actividade da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica. Determinação das K_a para o P_{18}, P_{19}, P_{20} e P_{35}.

Uma vez separados os distintos compostos constituintes do produto P_{15}, estudou-se o efeito que individualmente exerciam sobre a actividade enzimática, em primeiro lugar a uma concentração final de 0,05 mM e, seguidamente, a uma concentração final em fósforo total de 0,75 mM .

Na mistura de reacção padrão utilizou-se 1 mM de IMP e 0,050 mM do polifosfato indicado.

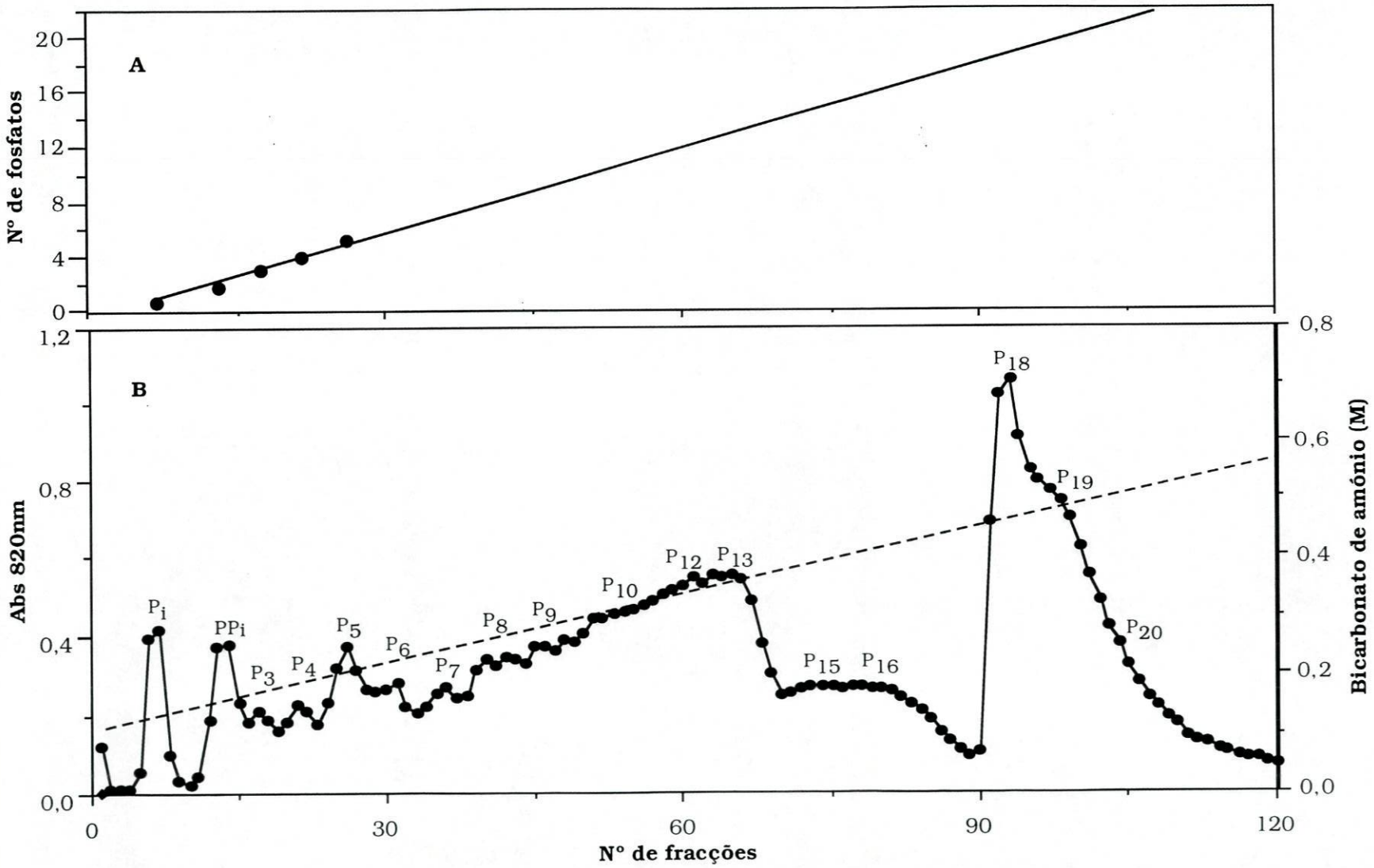
De acordo com os resultados obtidos observa-se que os polifosfatos, com um número de grupos fosfato na sua cadeia igual ou superior a 7, comportam-se como activadores da enzima, notando-se ainda, um salto significativo de activação com os polifosfatos P_{18}, P_{19} e P_{20}. A partir do ensaio em que se mantém o fosfato total igual, independentemente do polifosfato utilizado, também se concluiu que os polifosfatos P_{18} P_{19} e P_{20}, são de efeito mais potente (*Tabela 15* e *Fig. 36*).

Seguidamente, e nas mesmas condições do ensaio anterior, determinaram-se as constantes de activação (K_a) para os polifosfatos mais

Fig. 35. Cromatografia do polifosfato P_{15} (Sigma) em coluna de DEAE-celulose.

A. Relação entre o número de resíduos de fosfato e o número da fracção correspondente eluída. Os pontos a negro representam as fracções onde eluem os compostos utilizados como padrões, respectivamente, P_i, P_2, P_3, P_4 e P_5.

B. Numa coluna de DEAE-celulose de 5 ml, equilibrada com uma solução tampão de 0,1 M de bicarbonato de amónio (pH 8,0), aplicaram-se 0,9 ml de uma solução 3 mM de P_{15}. A coluna foi eluída pela aplicação sucessiva de dois gradientes contínuos de 200 ml: o primeiro, de bicarbonato de amónio de 0,1M a 0,4M (pH 8,0) e o segundo, de bicarbonato de amónio 0,4M a 0,8M, (pH 8,0). O fluxo de eluição, o volume das fracções recolhidas e o procedimento analítico utilizado foram idênticos aos descritos na *Fig. 34*.


A
B
Nº de fosfatos
Abs 820nm
Bicarbonato de amónio (M)
Nº de fracções
Pi
PPi
P3
P4
P5
P6
P7
P8
P9
P10
P12
P13
P15
P16
P18
P19
P20

activadores, P_{18}, P_{19} e P_{20}, utilizando concentrações que variaram entre 0 e 25 μM. Os valores de V_{max} e K_a obtidos encontram-se detalhados na *Tabela 16.*

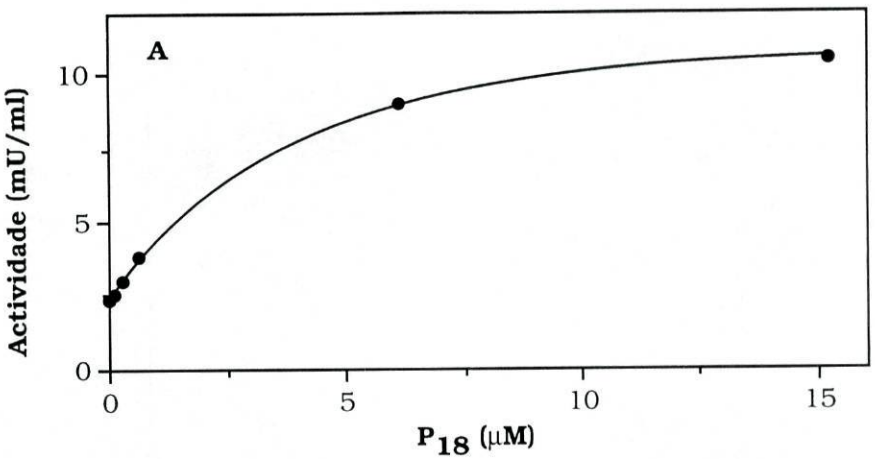
Tabela 15. Efeito dos distintos polifosfatos na actividade da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica.

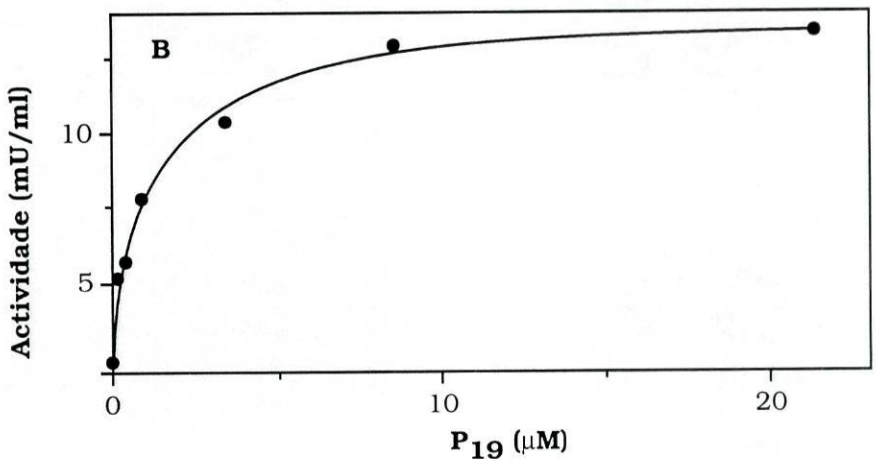
Polifosfatos	Actividade (mU/ml)	
	0,05 mM (Polifosfatos)	0,75 mM (P_i total)
-	2,4	2,4
P_5	2,9	4,1
P_7	6,4	10,9
P_9	4,0	7,8
P_{10}	6,9	10,1
P_{12}	9,0	7,9
P_{13}	6,6	6,6
P_{15}	5,7	6,6
P_{16}	4,2	4,6
P_{18}	14,9	13,8
P_{19}	17,9	15,9
P_{20}	17,1	21,9

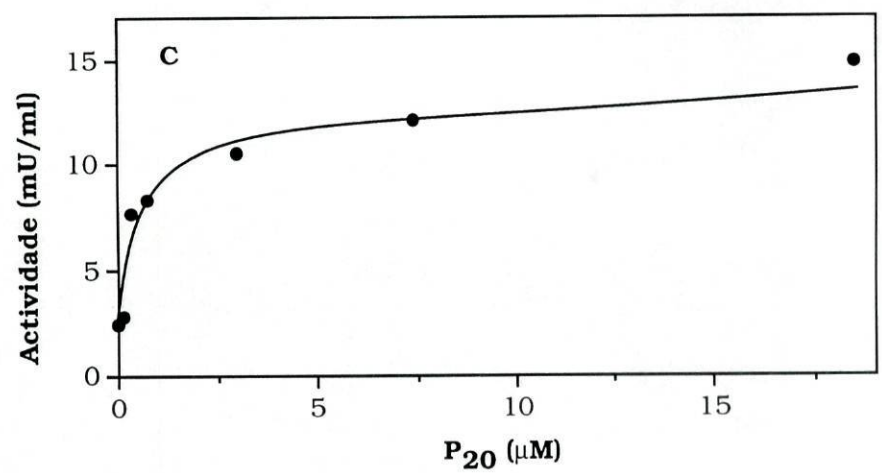
A reacção decorreu na presença de 1 mM de IMP como substrato, de cada um dos polifosfatos indicados na concentração final de 0,050 mM ou na concentração em Pi total final de 0,75 mM, e enzima parcialmente purificada da etapa 3 do processo de purificação. A mistura foi incubada a 37°C durante 45 minutos. As amostras foram analisadas por HPLC como se descreve em Material e Métodos.

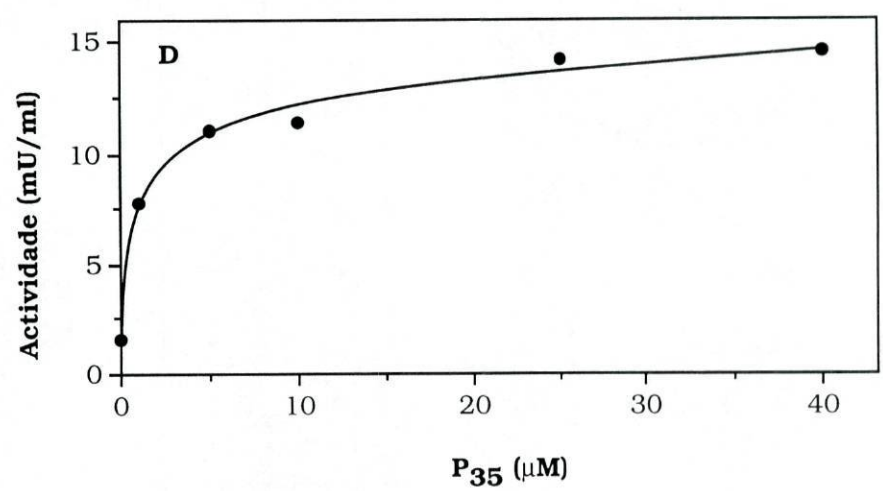
Fig. 36. Efeito activador de distintos polifosfatos sobre a 5´-nucleotídase. Determinação das constantes de activação (K_a) para o P_{18} (A), P_{19} (B), P_{20} (C) e P_{35} (D).

A mistura de reacção utilizada foi em tudo idêntica à descrita *Fig. 33*, decorrendo a reacção na presença de 1 mM de IMP e de concentrações variáveis (0 a 25 μM) do polifosfato indicado. A mistura foi incubada a 37°C durante 45 minutos e analisada por HPLC, como descrito em Material e Métodos.


A
Actividade (mU/ml)
0
5
10
0
5
10
15
P18 (μM)


B
Actividade (mU/ml)
5
10
0
10
20
P19 (μM)


C
Actividade (mU/ml)
0
5
10
15
0
5
10
15
P20 (μM)


D
Actividade (mU/ml)
0
5
10
15
0
10
20
30
40
P35 (μM)

Como os polifosfatos de cadeia mais longa eram os que exerciam um maior efeito activador, procedeu-se, igualmente, ao ensaio de P_{35} da Sigma (S-4504), cujo tamanho médio da cadeia é de 35 ± 4, sem qualquer purificação prévia, segundo as condições de ensaio anteriores, adicionando-se quantidades variáveis (1 a 40 μM) desse polifosfato. Os valores de V_{max} e K_a obtidos encontram-se descritos na *Tabela 16.*

Tabela 16. Valores de V_{max} e K_a de P_{18}, P_{19}, P_{20} e P_{35}·

Efector	$V_{máx.}$ (mU/ml)	K_a (μM)
P_{18}	10,0 ± 4,2	3,5 ± 0,5
P_{19}	11,2 ± 0,6	0,9 ± 0,2
P_{20}	11,3 ± 1,0	0,6 ± 0,2
P_{35}*	12,5 ± 10,8	1,3 ± 0,5

* Não purificado.

Os resultados demonstram que o efeito estimulador da actividade da enzima por parte dos polifosfatos de cadeia longa exerce-se com valores de concentração baixos, apresentando valores de K_a inferiores, em pelo menos uma ordem de magnitude, aos correspondentes valores dos dinucleósidos de diadenosina.

Dada a sua semelhança de carga eléctrica com os polifosfatos, ensaiou-se igualmente o poli-L-glutâmico (P-1818 Sigma), de massa molecular de cerca de 1000, nas mesmas condições protocolares e nas concentrações finais de 0,2 mg/ml (120 μM), não se tendo obtido qualquer efeito activador da actividade enzimática. A possibilidade da polilisina (P-0879 Sigma-PM 4000) actuar como inibidora da actividade enzimática (dada a semelhança estrutural com os polifosfatos de cadeia longa que são

estimuladores dessa mesma actividade, mas de características catiónicas) foi também testada na concentração de 50 μg/ml (12,5 μM) sem resultados positivos.

4.1.g. Efeito do P_i na actividade da 5'-nucleotídase.

A inibição pela presença de P_i (1 a 4 mM) da actividade da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica é uma das características comuns a este tipo de enzimas de distintas origens. Esta acção é mediada pelo aumento dos valores de $S_{0,5}$ de todos os substratos, não modificando as velocidades máximas das reacções em que intervêm (Van den Berghe e col., 1977; Itoh, 1978, 1981; Tsushima, 1986; Itoh e Yamada, 1990; Le Hir, 1991). Esta inibição é revertida pela presença de activadores, como seja o ATP (Van den Berghe, 1977; Itoh e Oka, 1985; Itoh e col., 1986; Itoh e Yamada, 1990). Esta reversão é tanto maior quanto maior for a concentração dos activadores (Tsushima, 1986).

Procedeu-se ao estudo do efeito do P_i sobre a actividade da enzima, utilizando-se na mistura de reacção como substrato ^{14}C-GMP, variadas concentrações de P_i (0, 0,25, 0,50, 1,25, 2,50, 5,00 mM) e enzima. Observou-se, a partir dos resultados experimentais (*Fig. 37*) um efeito inibidor importante sobre a actividade da enzima por parte dos iões P_i, quer na presença quer na ausência de 0,1 mM de Ap_4A, corroborando os resultados obtidos com enzimas similares de outras origens. Nas condições de ensaio utilizadas não se verificou uma significativa reversão do efeito inibitório do P_i pelo Ap_4A, que pode ser explicada pelas baixas concentrações de activador utilizadas.

4.1.h. Actividade fosfotransferásica da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica.

Para além de ter uma acção nucleotidásica sobre os nucleósidos monofosfatos, a enzima 5'-nucleotídase IMP/GMP específica possui a capacidade adicional de actuar como catalisadora na transferência de um grupo fosfato de um dador conveniente a um receptor apropriado, como já foi exemplificado no ponto 1.2.c.1, do capítulo de Introdução.

Num estudo preliminar comparou-se qual dos nucleósidos monofosfatos, IMP ou GMP, possuía maior capacidade de ceder o seu grupo fosfato a um substrato aceitador. Como substrato aceitador de grupos

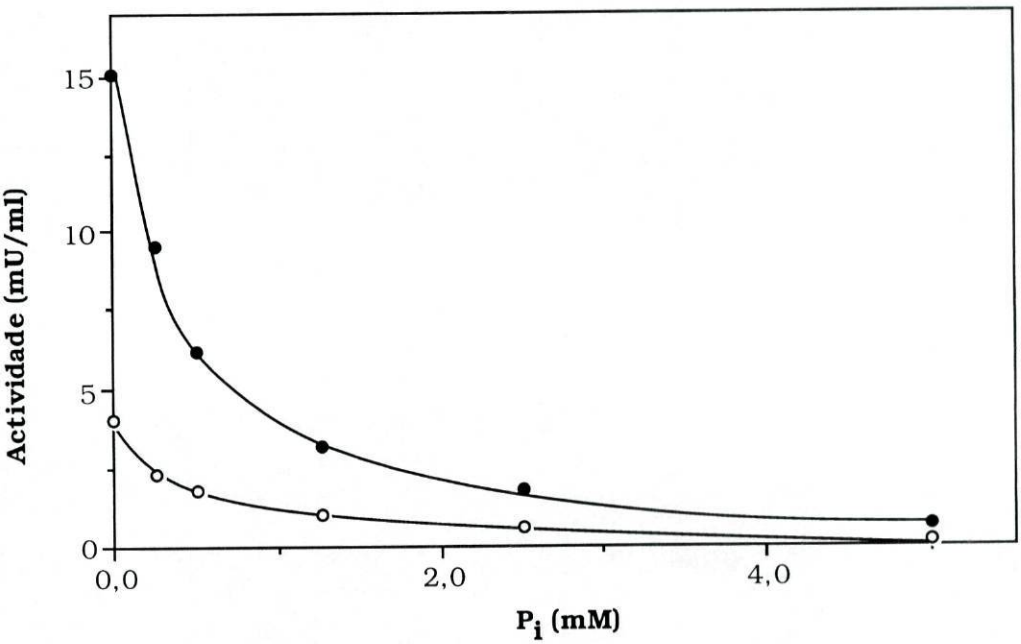


Fig. 37. Efeito inibidor do Pi na actividade da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica.

A mistura de reacção, para um volume final de 12,5 µl, era constituida por 0,52 mM de GMP, 0,05 µCi de ^{14}C-GMP, concentrações variadas de P_i e enzima parcialmente purificada da coluna de fosfocelulose (pico III), concentrada em Centriplus 50 (Amicon), na presença (●) e na ausência (○) de 0,1 mM de Ap_4A. A reacção decorreu à temperatura de 37°C e após incubação aplicaram-se 0,003 ml em placa de PEI-celulose. A placa foi eluída com água e a actividade da enzima determinada pela quantificação da guanosina marcada radioactivamente resultante da hidrólise de ^{14}C-GMP, como descrito em Material e Métodos.

fosfato utilizou-se a guanosina por ser o nucleósido marcado radioactivamente mais facilmente disponível.

A observação dos resultados obtidos, descritos na *Tabela 17*, apontam no sentido de considerar-se o IMP como melhor dador de grupos fosfato que o GMP. Estes dados conduziram a que se utilizasse no estudo da actividade fosfotransferásica, o IMP como nucleótido dador de grupos fosfato.

Tabela 17. Estudo comparativo entre o 5'-IMP e o 5'-GMP como substratos fosforilantes da guanosina.

Efector	Dador			
	GMP		IMP	
Ap_4A (mM)	60 min	120 min	60 min	120 min
–	333*	783	582	1295
0,1	1262	3826	3785	5435
0,4	4316	6673	2000	5403

Na mistura de reacção utilizou-se 5 mM de IMP ou GMP, 1mM de Guo e 0,5 µCi de [8-^{3}H] Guo (19 Ci/mmol) e enzima parcialmente purificada da etapa 3 de purificação. A reacção enzimática decorreu na ausência e na presença de duas concentrações finais distintas (0,1 mM e 0,4 mM) de Ap_4A como activador. Após incubação a 37°C durante 60 e 120 min, alíquotas de 3 µl foram aplicadas numa placa de cromatografia de TLC de PEI-celulose. A placa foi eluída com água destilada e a actividade fosfotransferásica determinada pela quantificação da radioactividade incorporada no GMP (Material e Métodos).

* Os resultados estão expressos em pmoles de [8-^{3}H]GMP formados.

4.2.h.1. Perfil cromatográfico da actividade 5'-nucleotidásica e fosfotransferásica em coluna de Dyematrex Green A.

Durante o processo de escolha das etapas mais adequadas para a purificação da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica ensaiaram-se simultaneamente as actividades 5'-nucleotidásicas e fosfotransferásicas com o fim de establecer se se tratava ou não da mesma enzima.

Assim, no caso particular da cromatografia em Dyematrex Green A (etapa 4 de purificação), determinaram-se ambas as actividades nas fracções resultantes. Os resultados obtidos, representados graficamente na *Fig. 38*, mostram idênticos perfis entre as duas actividades enzimáticas, bem como a existência de uma razão praticamente constante das actividades nucleotidásica *versus* fosfotransferásica, ao longo de todo o perfil cromatográfico.

4.1.h.2. Efectores da actividade fosfotransferásica. $Ap_nA(N)$, 2,3-DPG e P_{15}.

Utilizando os compostos dinucleósidos polifosfatos com capacidades efectoras previamente demonstradas sobre a actividade nucleotidásica da enzima 5'-nucleotídase IMP/GMP específica, estudou-se o comportamento desses mesmos efectores sobre a actividade fosfotranferásica.

Na mistura de reacção, idêntica à anterior, utilizaram-se distintos efectores enzimáticos (Ap_4A, Ap_5A, Ap_6A, Ap_4G, Ap_4X, Ap_4U, P_{15} e 2,3-DPG) na concentração final de 0,1 mM e enzima.

Os resultados obtidos (*Fig. 39* e *Tabela 18*) mostram que, nas condições de ensaio:

(i) Os compostos activadores da actividade 5'-nucleotidásica são igualmente capazes de exercerem efeitos similares sobre a actividade fosfotransferásica.

(ii) Entre todos os compostos estudados os dinucleósidos polifosfatos de diadenosina (Ap_4A, Ap_5A e Ap_6A) são os que exercem um efeito activador mais efectivo (8 a 10 vezes), à semelhança do que ocorre com a actividade nucleotidásica.

(iii) Encontram-se valores de activação ligeiramente inferiores (cerca de 8) quando uma base dos heterodinucleósidos polifosfatos é a adenina e a outra é uma base purínica distinta (Ap_4G e Ap_4X). Quando a segunda base é uma pirimidina (Ap_4U) o efeito activador é significativamente inferior.

(iv) O composto polifosfato P_{15} é igualmente um bom activador (cerca de 8 vezes), valores similares aos descritos para os dinucleósidos polifosfatos.

(v) A activação da enzima pelo 2,3-DPG (cerca de 4 vezes) é metade da obtida com os dinucleósidos polifosfatos e com o P_{15}.

Mais ainda, pode observar-se que, em geral, o ensaio é linear até aos 60 min de incubação.

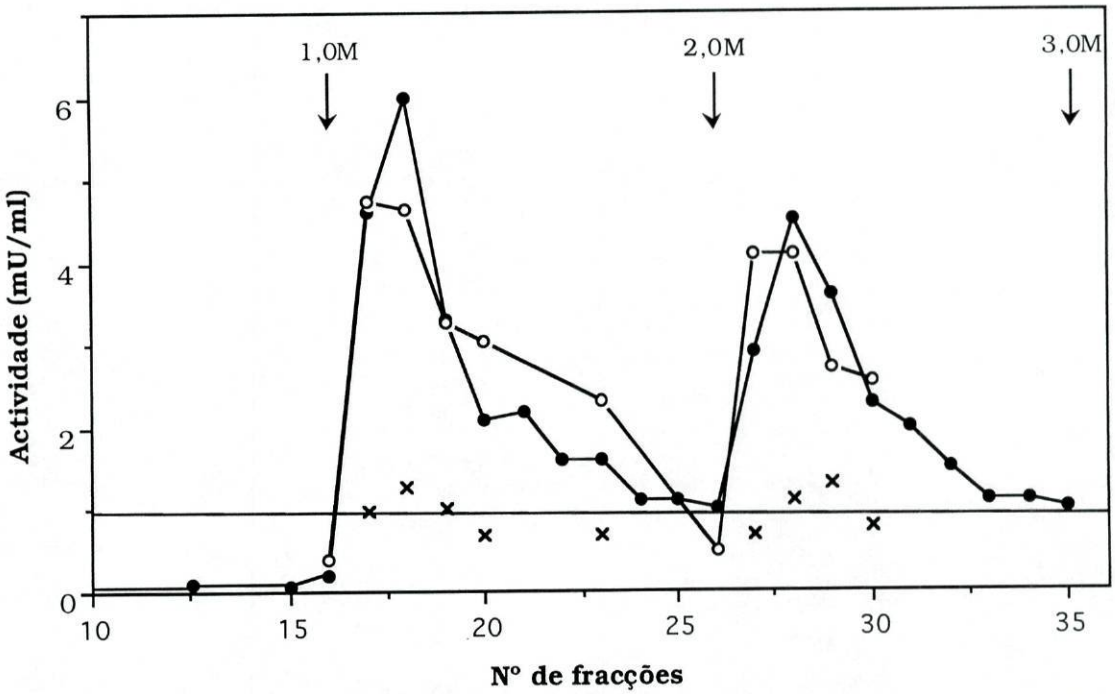


Fig. 38. Perfis cromatográficos das actividades nucleotidásica e fosfotransferásica da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica em coluna de Dyematrex Green A.

A uma coluna de Dyematrex Green A de 1,7 ml aplicaram-se 5,8 ml de enzima parcialmente purificada da coluna de fosfocelulose. A coluna foi eluída sucessivamente com 5 ml de TSE, suplementado com 0,5 M de NaCl, e com 8,0 ml de cada uma das seguintes soluções de NaCl na mesma solução tampão: 1,0 M, 2,0 M e 3,0 M. O fluxo de eluição foi de 40 ml/h. O volume das fracções foi de 0,85 ml. As actividades nucleotidásicas (•) das fracções foram determinadas pela quantificação do P_i. Em paralelo determinaram-se as actividades fosfotransferásicas (o), mediante a quantificação do GMP marcado radioactivamente, utilizando como substratos dador o IMP e como receptor a [8-^{3}H] guanosina, na presença de 0,1 mM de Ap_4A como efector, segundo o descrito em Material e Métodos.

(×) Representa as razões entre as actividades 5'-nucleotidásica *versus* fosfotransferásica.

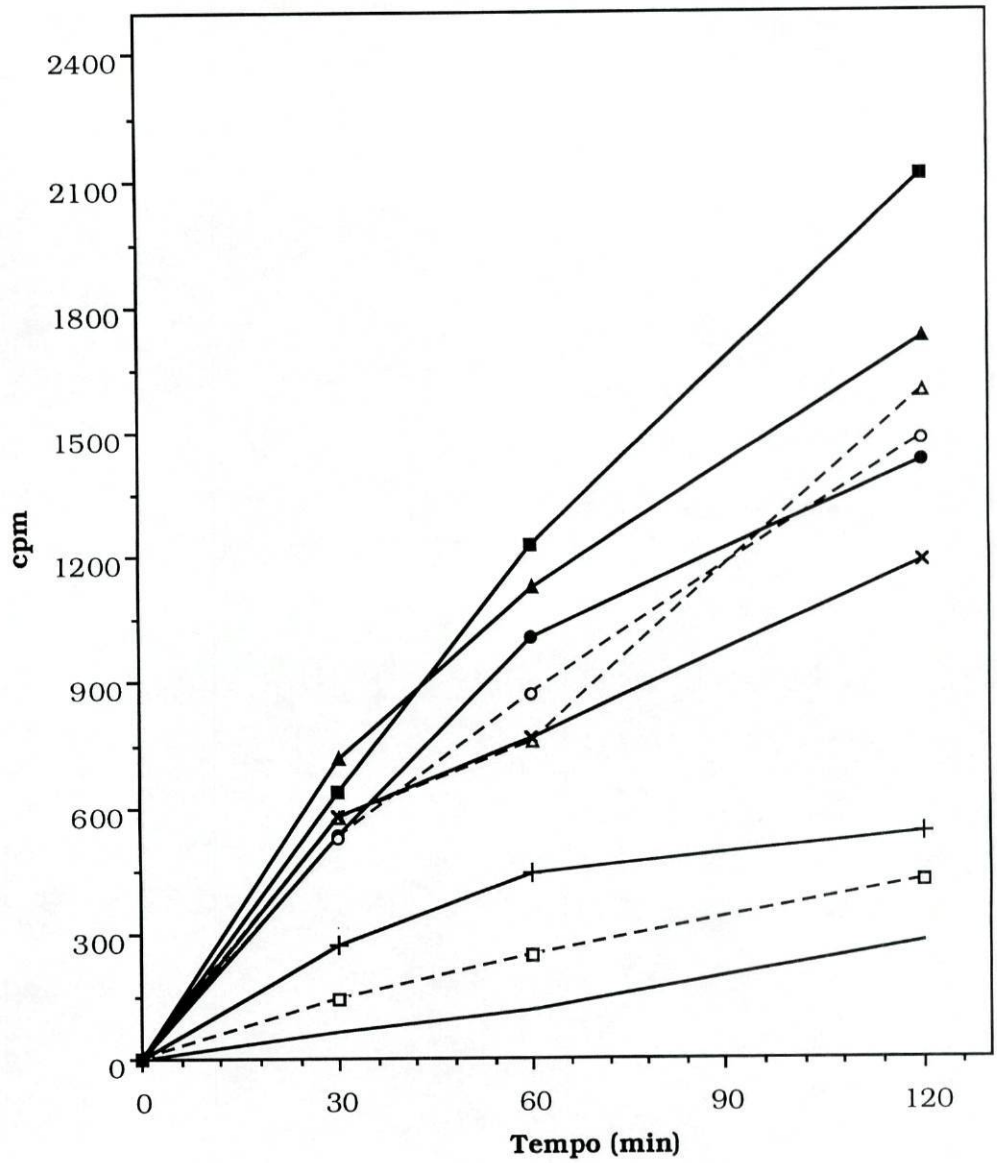


Fig. 39. Representação gráfica do efeito de distintos compostos como efectores da actividade fosfotransferásica da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica.

A mistura de reacção continha 5 mM de IMP, 1mM de Guo e 0,5 μCi de [8-^{3}H] Guo (19 Ci/mmol), 0,1 mM de cada um dos seguintes compostos: Ap_4A (●), Ap_5A (▲), Ap_6A (■), Ap_4G (○), Ap_4X (△), Ap_4U (□), P_{15} (×) e 2,3-DPG (+) e enzima (etapa 3 do processo de purificação). Após incubação a 37 °C durante os tempos indicados, alíquotas de 3 μl foram aplicadas numa placa de cromatografia de TLC de PEI-celulose. A placa foi eluída com água destilada e a actividade fosfotransferásica determinada pela quantificação da radioactividade incorporada no GMP (Material e Métodos). A linha contínua sem símbolos, representa a actividade fosfotransferásica na ausência de efectores.

A activação obtida com o Ap_4A e com 2,3-DPG da actividade fosfotransferásica tinha sido préviamente descrita em linfoblastos humanos (Johnson e Fridland, 1989), no carcinoma de cólon humano (Tozzi e col., 1991), no timo de vaca (Pesi e col., 1994, 1996) e em fibroblastos do pulmão de hamster (Turriani e col., 1994).

Tabela 18. Influência de distintos dinucleósidos polifosfatos, 2,3-DPG e polifosfato P_{15} na actividade fosfotransferásica da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica.

Efectores (0,1 mM)	Actividade relativa (%)
–	100
Ap_4A	831
Ap_5A	1024
Ap_6A	1007
Ap_4G	772
Ap_4X	757
Ap_4U	212
2,3-DPG	395
P_{15}*	762

Os resultados foram determinados a partir os valores obtidos ao fim de 30 minutos de incubação da mistura de reacção descrita na *Fig. 39.*

(–) Ausência de efector; (*) P_{15} sem purificação prévia.

4.1.i. Níveis de 5'-nucleotídase IMP/GMP específica em distintos tecidos de rato.

Como foi referido anteriormente quando se utilizou a coluna de cromatografia de afinidade de Dyematrex Green A, durante os estudos preliminares do processo de purificação da 5'-nucleotídase IMP/GMP (ver ponto 4.1.a.5) observaram-se dois picos de actividade enzimática, utilizando o IMP como substrato da enzima: (i) o primeiro, quando se eluía com TSE suplementado com 1,0 M de NaCl e (ii) o segundo, quando a eluição se processava igualmente com a mesma solução tampão mas agora suplementada com 2,0 M de NaCl. A análise posterior de ambos os picos mostrou que: (i) electroforeticamente, na presença de SDS, apresentavam uma banda característica correspondente a um valor de massa molecular de 52 kDa, compatível com o respectivo valor de massa molecular da enzima em estudo; (ii) possuíam igualmente actividade fosfotransferásica, utilizando o IMP, como substrato dador, e a guanosina, como substrato aceitador de grupos fosfato; e, (iii) as razões entre as respectivas actividades fosfotransferásica e nucleotidásica eram praticamente similares.

Com base nestes resultados, decidiu-se, neste suporte cromatográfico, estudar o comportamento da enzima 5'-nucleotídase IMP/GMP específica provenientes de outros tecidos do rato (coração, fígado, pulmão e testículos) com o intuito de verificar se esse comportamento era específico desta enzima cerebral ou se era comum às mesmas enzimas presentes em outros tecidos. Para efectuar este estudo, os ratos foram mortos por exsanguentação, mediante punção cardíaca, evitando deste modo qualquer contaminação proveniente do tecido sanguíneo. Os tecidos foram imediatamente colhidos e homogeneizados em Polytron com solução tampão de THE, num volume correspondente a 5 vezes o seu peso, sendo posteriormente tratados como descrito anteriormente na obtenção da fracção citosólica celular.

Dado que este estudo se efectuou mediante a aplicação directa na coluna de Dyematrex Green A, do material correspondente à etapa 2 de purificação (ver *Tabela 4*) dos distintos tecidos, procurou-se saber, previamente, em que zona ou em que fracções eluíam as actividades fosfatásicas inespecíficas, utilizando o cérebro como material de ensaio exemplificativo. Este estudo tornava-se necessário uma vez que estas enzimas hidrolisam os nucleósidos monofosfatos, podendo, por isso, interferir na determinação da actividade nucleotidásica. Observando os

resultados obtidos, com o tecido cerebral (*Fig. 40*), verifica-se que as actividades fosfatásicas inespecíficas eluem aquando a lavagem da coluna com solução de TSE, suplementada com 0,5 M de NaCl, não apresentando praticamente alguma actividade ao longo do restante perfil de eluição.

No tratamento cromatográfico das amostras dos distintos tecidos que se seguiu, a quantidade em volume de amostra a aplicar dependia do tecido a estudar. Porém, e para que todos os tecidos estivessem em condições de ensaio comparáveis, a quantidade total em proteínas aplicada por cada tecido foi, invariavelmente, de cerca de 5 mg. Os perfis cromatográficos obtidos com os distintos tecidos (*Fig. 41*) confirmaram a existência, em todos os tecidos estudados, de dois picos de actividade 5'-nucleotídase compatíveis com os observados com o tecido cerebral, eluídos a diferentes concentrações de NaCl (1,0 M e 2,0 M).

Na tentativa de explicar os resultados anteriores pretendeu-se verificar se a existência dos dois picos de actividade seria consequência de uma possível acção de enzimas proteolíticas presentes nos diferentes tecidos analizados. Com este fim, compararam-se os perfis obtidos com o perfil de actividade da enzima 5'-nucleotídase IMP/GMP específica proveniente de cistos de *Artemia*, tratados como se detalha em Material e Métodos, uma vez que, na sua fase cística este invertebrado não possui, ou apenas possui residualmente, actividades proteolíticas (Osuna e col., 1977) e fosfatásicas (Raineri, 1987). Dado que, a 5'-nucleotídase presente quer nos cistos de *Artemia* quer nos diferentes tecidos apresentam perfis cromatográficos similares, nas mesmas condições de eluição da coluna (*Fig. 41 A*), a hipótese de possíveis efeitos proteolíticos serem os responsáveis pelos dois picos de actividade obtidos deverá ser praticamente descorada.

A partir dos resultados obtidos nas condições de ensaio anteriores podem-se, ainda, obter algumas conclusões, particularmente no que respeita à distribuição quantitativa da enzima nos distintos tecidos estudados. Comparando os valores de actividade específica entre os diferentes tecidos estudados (*Tabela 19*), observa-se que o coração é o que, em princípio, possui o valor mais elevado. Os valores de actividade enzimática elevados obtidos com a enzima do tecido cardíaco podem, contudo, não ser exclusivamente devidos à 5'-nucleotídase IMP/GMP específica. Este orgão além de possuir a 5'-nucleotídase IMP/GMP específica possui ainda uma outra 5'-nucleotídase distinta que actua principalmente sobre o AMP (5'-nucleotídase AMP específica), embora também actue sobre o IMP (Newby, 1988; Truong e col., 1988; Darvish e Metting 1993). De facto, os resultados obtidos nestas condições apontam

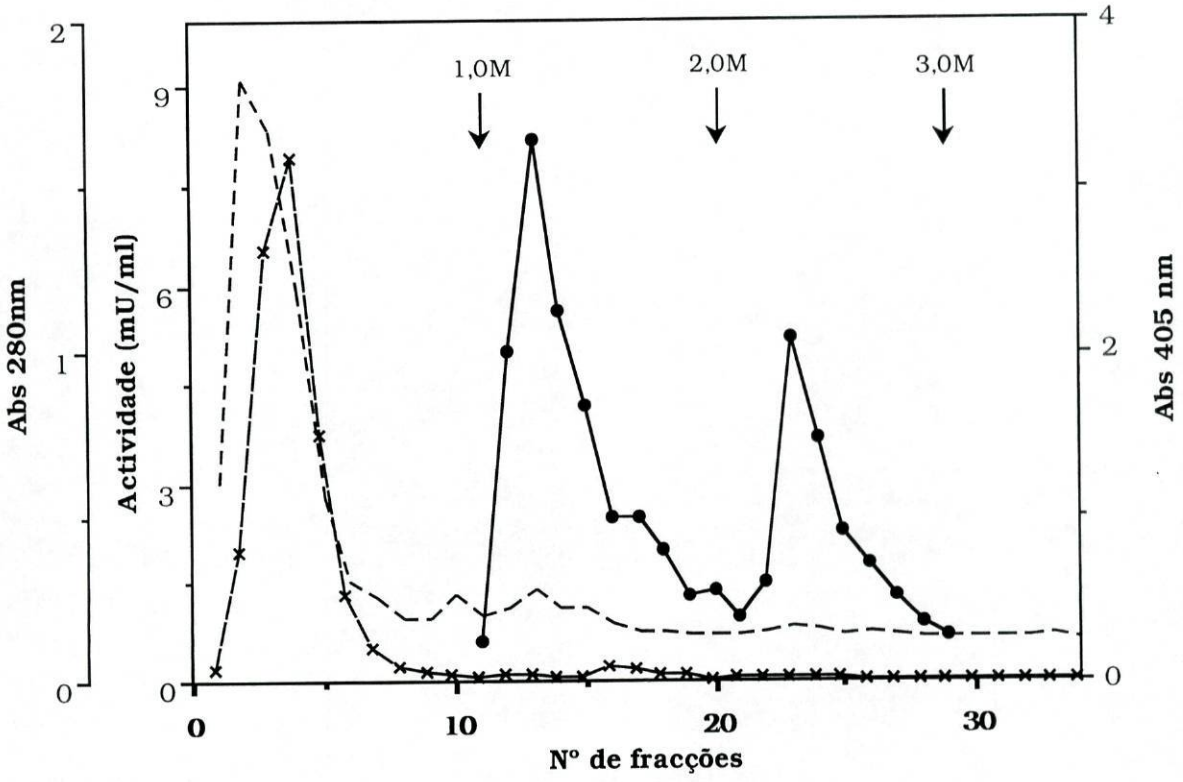


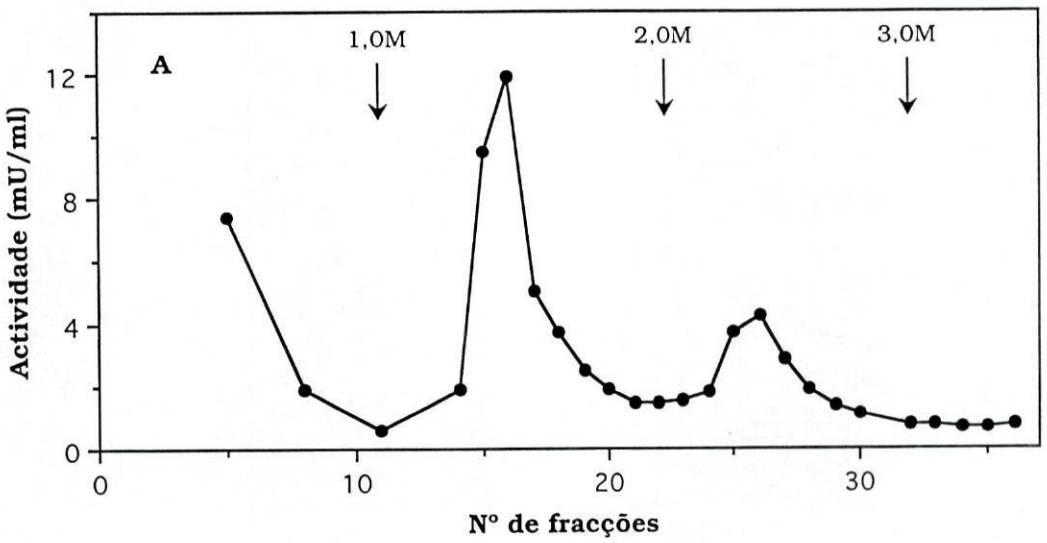
Fig 40. Perfil cromatográfico da actividade da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica e das fosfátases inespecíficas de cérebro de rato numa coluna de Dyematrex Green A.

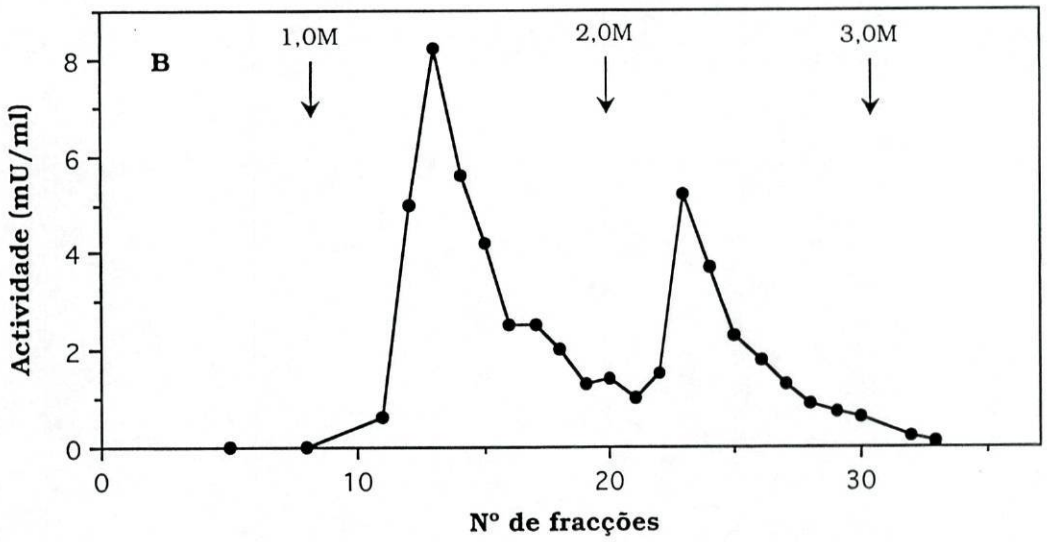
Aplicou-se numa coluna de Dyematrex Green A de 1,3 ml de volume (1,6 cm x 1,0 cm), uma amostra (28 mU) de enzima da etapa 2 de purificação de tecido cerebral do rato. A coluna foi lavada com uma solução de TSE suplementada com 0,5 M de NaCl, sendo eluída 3 vezes sucessivas com a mesma solução tampão de TSE, suplementada com (i) 1,0 M, (ii) 2,0 M e (iii) 3,0 M em NaCl. O fluxo de eluição foi de 40 ml/h e as fracções recolhidas de 0,85 ml. As actividades da 5'-nucleotídase citoplasmática (•), na presença de Ap4A, foram determinadas através da quantificação do P_i e expressas em mU/ml (Material e Métodos). As actividades das fosfatases inespecíficas (×) foram determinadas, a pH 7,0, usando o p-nitrofenilfosfato (6 mM) como substrato e acompanhando a absorção a 405 nm; O perfil proteico (tracejado) foi determinado mediante a leitura dos valores de absorção a 280 nm.

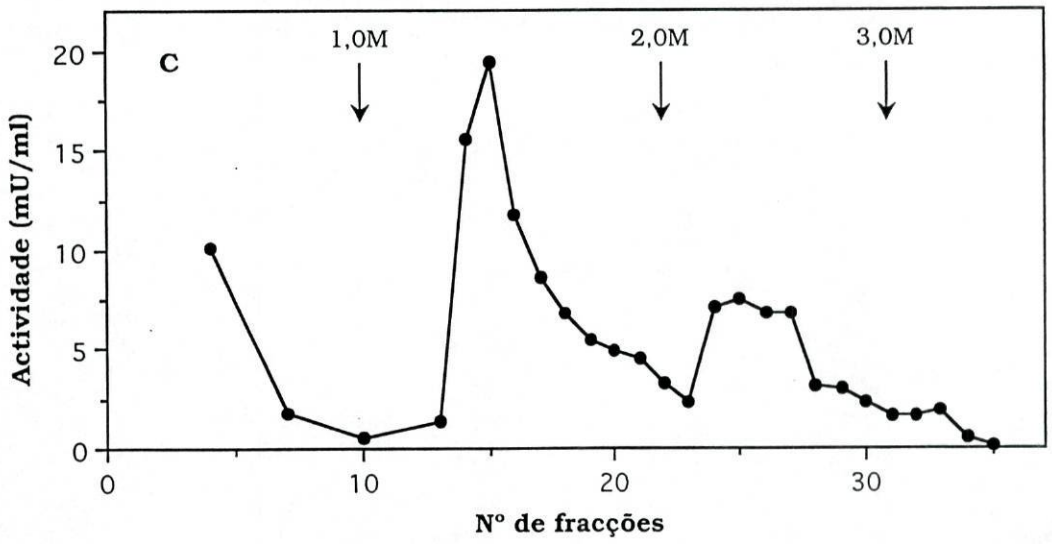
Fig. 41. Perfis cromatográficos da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica de distintos tecidos do rato e de cistos de *Artemia*.

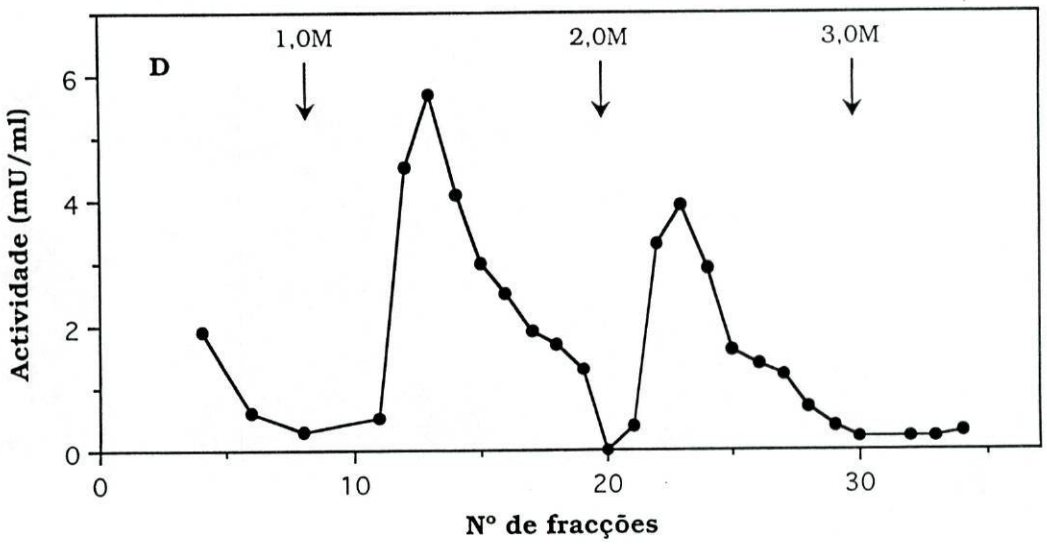
Alíquotas de enzima dialisada, com um teor em proteínas de cerca de 5 mg, provenientes da precipitação por sulfato de amónio (0 a 45%) de homogeneizados cistos de *Artemia* e de cada um dos tecidos de rato indicados foram aplicados numa coluna de Dyematrex Green A de 1,3 ml de volume. As condições de eluição e a determinação das actividades enzimáticas nas fracções eluídas foram idênticas às descritas na *Fig. 40.*

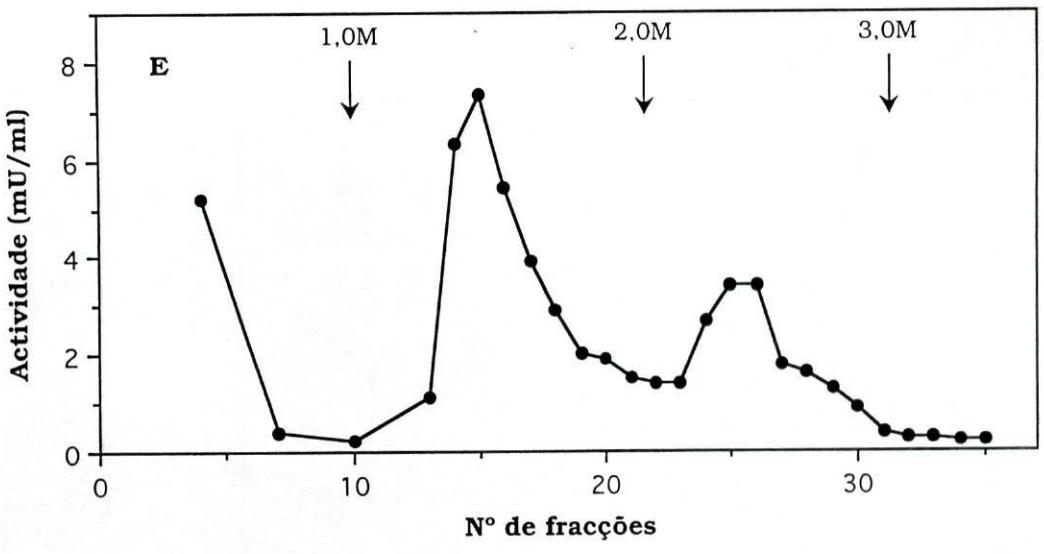
Em **A**, cistos de *Artemia*; **B**, cerébro; **C**, coração; **D**, fígado; **E**, pulmão e **F**, testículos.


A
1,0M
2,0M
3,0M
Actividade (mU/ml)
12
8
4
0
0
10
20
30
Nº de fracções


B
1,0M
2,0M
3,0M
Actividade (mU/ml)
8
6
4
2
0
0
10
20
30
Nº de fracções


C
1,0M
2,0M
3,0M
Actividade (mU/ml)
20
15
10
5
0
0
10
20
30
Nº de fracções


D
1,0M
2,0M
3,0M
Actividade (mU/ml)
0
2
4
6
0
10
20
30
N° de fracções


E
1,0M
2,0M
3,0M
Actividade (mU/ml)
0
2
4
6
8
0
10
20
30
N° de fracções

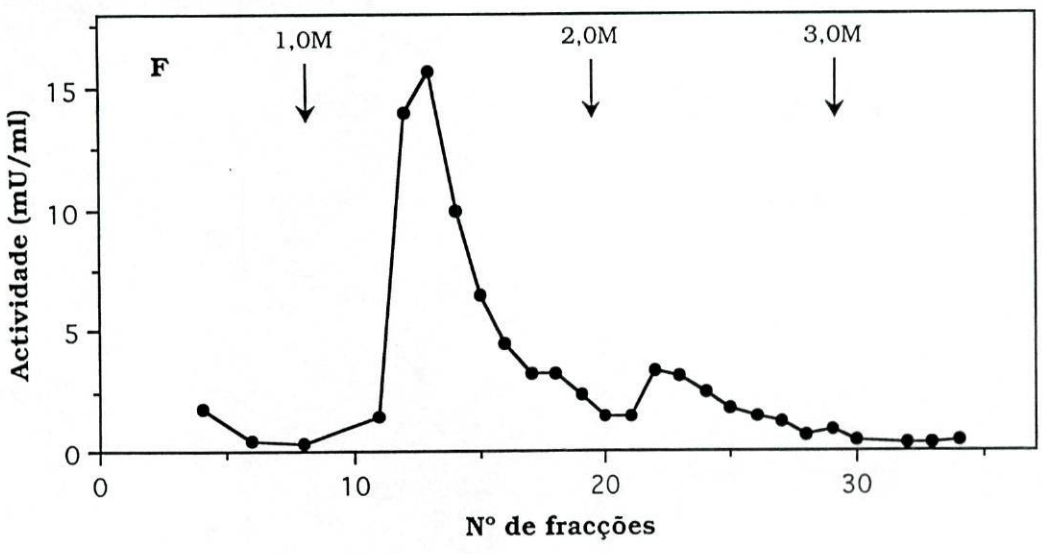

F
1,0M
2,0M
3,0M
Actividade (mU/ml)
0
5
10
15
0
10
20
30
N° de fracções

Tabela 19. Distribuição da actividade da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica em distintos tecidos.

	Proteínas (mg/g tecido)	Actividade enzimática (mU/g tecido)				Actividade específica (mU/mg)	
		Pico I	Pico II	Total	I/II	Pico I	Pico II
Artemia	2,6	17,3	8,5	25,8	2,0	6,6	3,3
Cérebro	4,0	16,7	10,8	27,5	1,5	4,2	2,7
Coração	4,1	57,7	29,8	87,5	1,9	14,0	7,3
Fígado	23,3	97,7	60,3	158,0	1,6	4,2	2,6
Pulmão	7,6	43,7	21,4	65,1	2,0	5,8	2,8
Testículos	10,7	112	29,5	141,5	3,8	10,4	2,8

para o facto de a razão entre as actividade sobre o IMP e o AMP, para a enzima 5'-nucleotídase IMP/GMP específica, ser superior no cérebro que no coração (4,58 e 1,50, respectivamente) (resultados não apresentados).

Comparando as actividades enzimáticas totais por peso de tecido (mU/g de tecido) da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica nos distintos tecidos e nas condições de ensaio, encontram-se os valores mais elevados nos testículos e no fígado e os mais baixos no cérebro. Distribuição semelhante da actividade enzimática foi encontrada por Itoh e col. (1991, 1992), utilizando técnicas imunológicas, apresentando valores que, embora distintos, são da mesma ordem de grandeza. As razões entre os picos de actividade I e II estão compreendidas entre 1,5 (cérebro) e 2,0 (pulmão), com excepção dos testículos que atingem valores de 3,8.

4.2. Metabolismo de nucleótidos purínicos em extracto de cérebro.

4.2.a. Introdução.

Os estudos que se descrevem neste capítulo pretendem contribuir para um melhor conhecimento do papel das 5'-nucleotídases no metabolismo dos nucleótidos purínicos, sob um ponto de vista mais geral.

Dado a grande dificuldade experimental de realizar *in vivo* este tipo de estudos, recorreu-se a extractos crus de cérebro de rato, mais concretamente ao respectivo sobrenadante de 150000 x *g*, obtido num meio isotónico, como se refere na parte de Material e Métodos. O extracto foi incubado num meio tamponado, na presença de nucleósidos monofosfato: AMP, IMP, GMP e XMP. Alíquotas da mistura de reacção foram analisadas por HPLC, obtendo-se o perfil cromatográfico dos produtos de degradação correspondentes. Em cada caso, os produtos foram identificados pelo espectro de absorção no ultravioleta e por comparação com padrões que se analisaram em paralelo.

Com a análise destes resultados obteve-se uma visão parcial do papel das 5'-nucleotidases no metabolismo dos nucleósidos monofosfato, que se ampliou com um estudo mais sistemático do destino metabólico dos produtos resultantes da degradação destes nucleótidos. Este estudo metabólico mais detalhado desenvolveu-se segundo duas vertentes - experimental e matemática - sendo esta última uma ferramenta flexível e muito útil para estudar situações e hipóteses metabólicas que seriam

muito laboriosas e algumas vezes quase impossíveis de levar a cabo experimentalmente. Como se verá, seguidamente, estes dois tipos de estudos resultaram complementares para entender melhor o metabolismo dos nucleótidos purínicos no cérebro.

4.2.b. Visão geral do metabolismo dos nucleósidos monofosfato: AMP, IMP, GMP e IMP.

O procedimento geral utilizado neste estudo foi o seguinte:

A fracção citoplasmática de cérebro de rato, utilizada como fonte de enzimas, foi obtida em meio isotónico (ver Material e Métodos) e dialisada durante 16 horas frente a tampão TS. Os ensaios realizaram-se com o extracto recém-obtido e sem congelação prévia. A mistura de reacção, para um volume final de 0,15 ml continha os seguintes componentes: 50 mM Tris,HCl (pH 7,4), 5 mM $MgCl_2$ e distintos nucleótidos (AMP ou IMP ou GMP ou XMP) em duas concentrações finais diferentes de 0,2 e 1 mM. As misturas de reacção incubaram-se a 30°C, recolhendo-se alíquotas ao fim dos tempos indicados na Figuras (geralmente de 0, 10, 30 e 60 min) que foram analisadas mediante HPLC, como se indica em Material e Métodos. Seguidamente descrevem-se os resultados obtidos com este procedimento.

Degradação de AMP

Os painéis da esquerda e da direita da *Fig. 42* indicam os resultados obtidos na presença de AMP nas concentrações finais de 1 e 0,2 mM, respectivamente. O pico que aparece com um tempo de retenção (tr) de cerca de 10,5 min corresponde ao AMP. No painel da esquerda (AMP, 1 mM) observa-se que durante o tempo de reacção a percentagem de AMP consumido foi muito baixo, enquanto que no painel da direita, esse consumo de AMP pode ser apreciado perfeitamente no cromatograma. Em ambos os casos, os produtos de degradação que se obtiveram foram adenosina (Ado) (tr, 3,9), inosina (Ino) (tr, 3,6) e hipoxantina (H) (tr, 3,2).

Ainda que à primeira vista pareça mais elevada a velocidade de formação dos produtos de degradação, no caso em que se utilizou AMP 0,2 mM, verifica-se que não é assim. Neste tipo de representações, nas quais se recolhem vários cromatogramas simultaneamente, o computador representa-os, tomando como referência o pico cromatográfico mais alto. No caso de AMP 1 e 0,2 mM a altura deste pico foi de, respectivamente, 350 e 175 miliunidades de absorvância (mAu). Por sua vez, a altura do pico

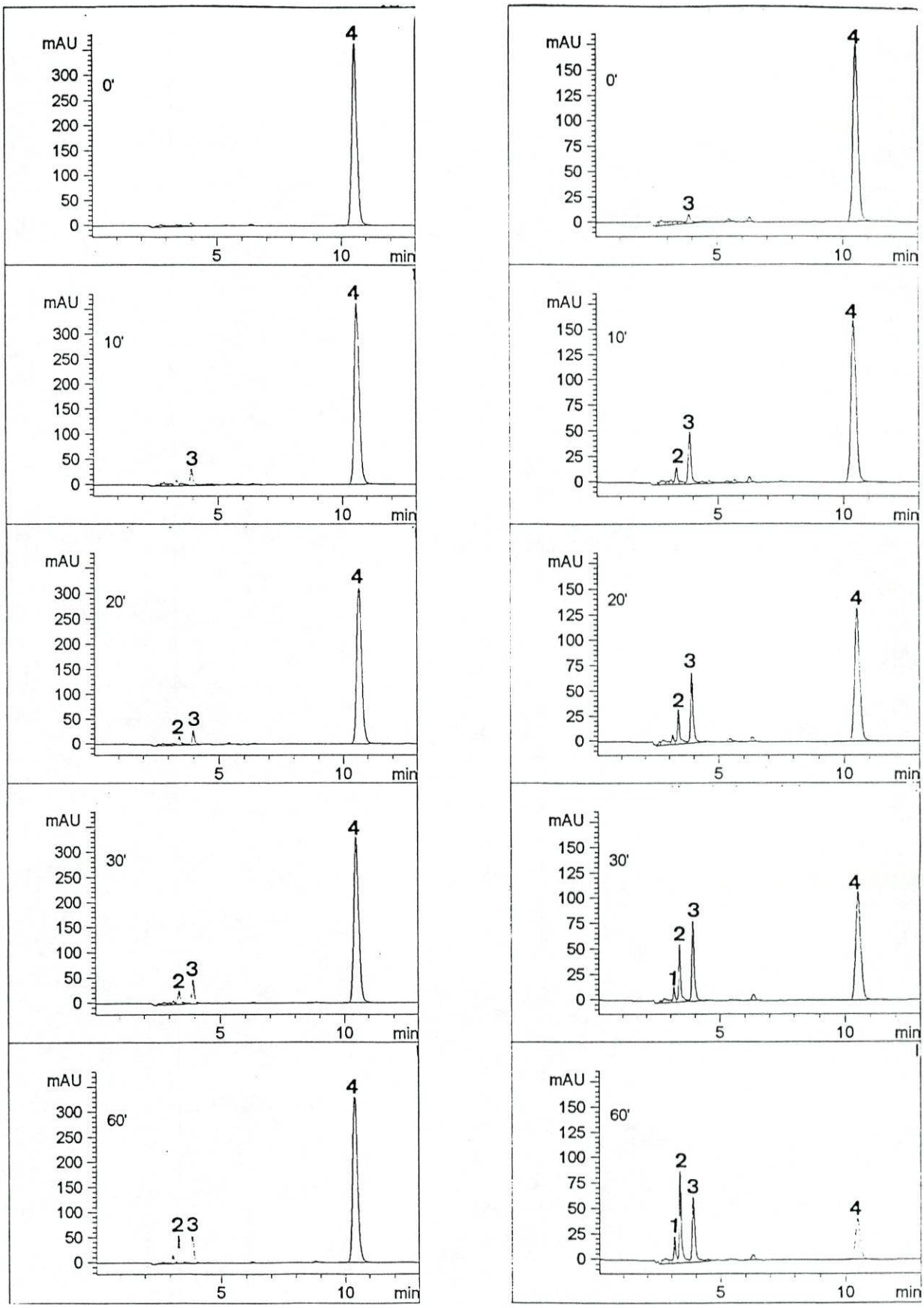


Fig. 42. Perfil cromatográfico dos produtos de degradação do AMP em extracto de cérebro.

Para um volume final de 0,15 ml a reacção continha 50 mM de Tris, HCl (pH 7,4), 5 mM de $MgCl_2$, 1 ou 0,2 mM de AMP (painel da esquerda e da direita, respectivamente) e fracção citoplasmática de extracto de cérebro. A mistura foi incubada a 30°C, retirando-se, aos tempos indicados, alíquotas que foram analisadas por HPLC, como se descreve em Material e Métodos.

(1, hipoxantina; 2, inosina; 3, adenosina; 4, AMP).

cromatográfico é condicionada pela quantidade total de amostra que se aplica na coluna, o mesmo é dizer, do grau de diluição da amostra a analisar.

Degradação de IMP

A degradação do IMP (*Fig. 43*) teve como produtos a inosina (tr, 3,6) e a hipoxantina (tr, 3,2). O pico pequeno que se observa, com um tr de 6,3, visível na maior parte dos cromatogramas, é uma contaminação presente no extracto de cérebro.

As considerações que se fizeram para o AMP, referente ao tamanho relativo dos picos, aplica-se, igualmente, a este caso e ao dos nucleótidos que se seguem.

Degradação de GMP

Com a incubação deste nucleótido em extracto de cérebro obtiveram-se alguns resultados interessantes e significativos (*Fig. 44*): (i) a tempos curtos, o único produto visível da degradação deste nucleótido é a guanosina (tr, 3,3 min); (ii) no caso de GMP 0,2 mM o aparecimento, ao fim de 60 min de incubação, de um pico de xantina, em posição de tr de cerca de 4,9 min, não se observando, contudo, o aparecimento de guanina; (iii) a incubação da amostra até às 24 horas mostrou que todo o GMP foi convertido em dois compostos: xantina (tr, 4,9 min) e outro de natureza desconhecida com um tr de 5,6, e com um espectro parecido com o da xantina.

Degradação de XMP

A partir de XMP (*Fig. 45*) originou-se a xantosina como produto principal, ao qual corresponde um valor de tr de 6,1.

4.2.c. Determinação e compilação das constantes cinéticas das enzimas implicadas no metabolismo dos nucleótidos purínicos presentes em extractos de cérebro.

Para o cálculo matemático, a que se referirá posteriormente, tornava-se necessário conhecer as velocidades máximas e as constantes cinéticas

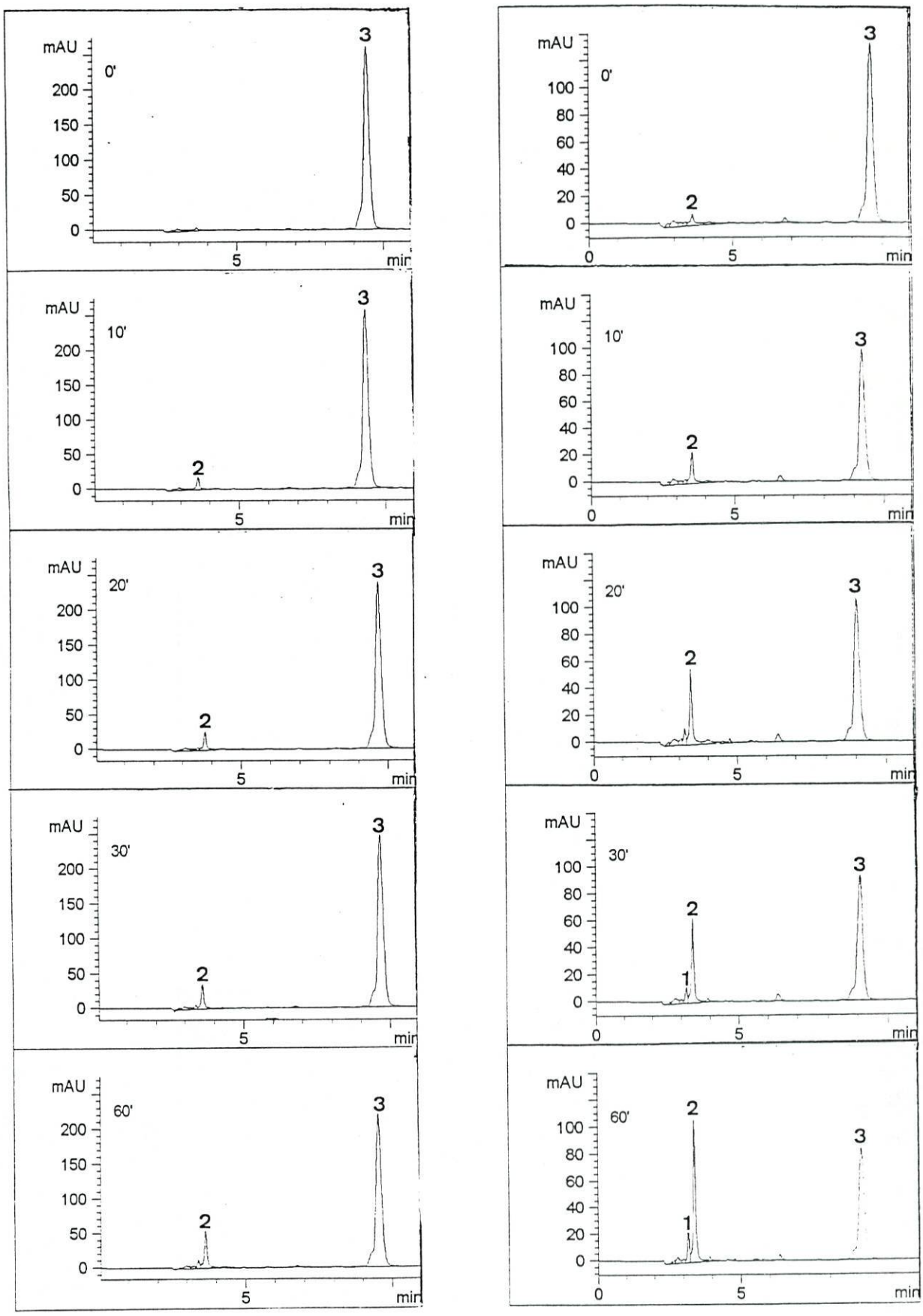


Fig. 43. Perfil cromatográfico dos produtos de degradação do IMP em extracto de cérebro.

A mistura de reacção foi idêntica à descrita na figura anterior. substituindo o AMP pelo IMP, nas mesmas concentrações finais de 1 (painel da esquerda) e 0,2 mM (painel da direita). A análise das amostras foi efectuada por HPLC (ver Máterial e Métodos).

(1. hipoxantina; 2. inosina; 3. IMP).

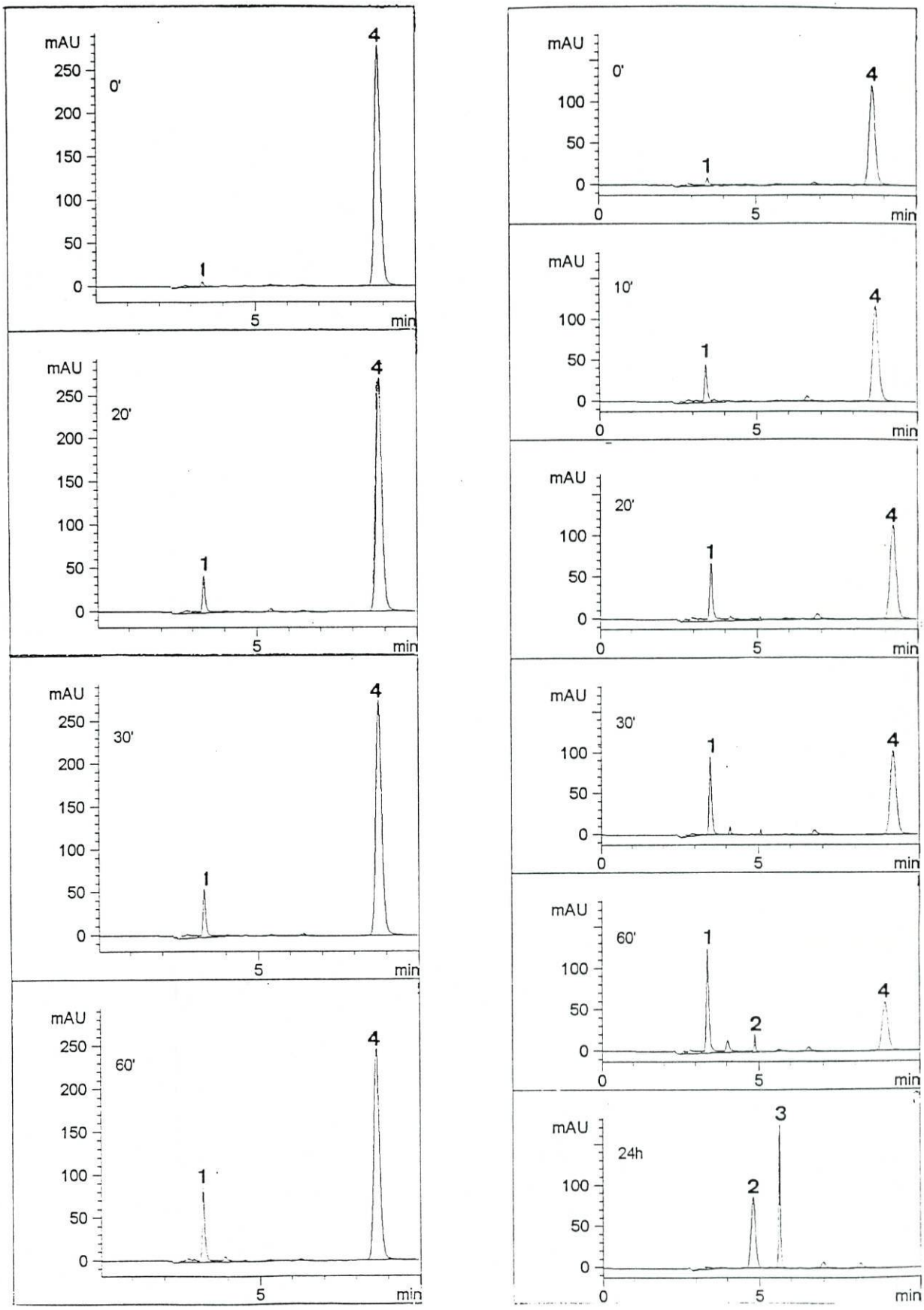


Fig. 44. Perfil cromatográfico dos produtos de degradação do GMP em extracto de cérebro.

A mistura de reacção foi idêntica à descrita na Fig. 42, substituindo o AMP pelo GMP, nas mesmas concentrações finais de 1 (painel da esquerda) e 0,2 mM (painel da direita). A análise das amostras foi efectuada por HPLC (ver Máterial e Métodos).

(1. guanosina; 2. xantina; 3. composto de natureza desconhecida; 4. GMP).

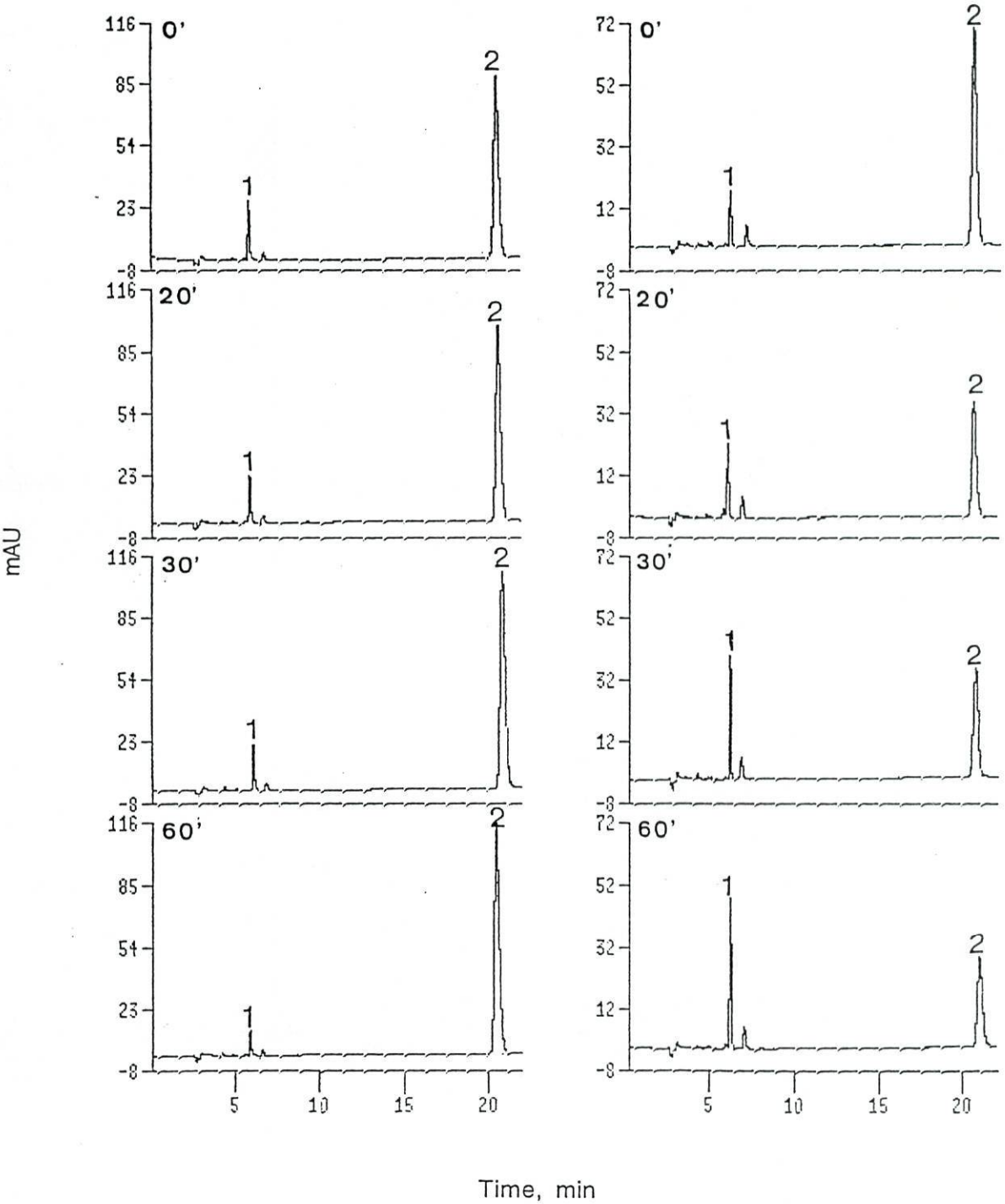


Fig. 45. Perfil cromatográfico dos produtos de degradação do XMP em extracto de cérebro.

A análise dos produtos de degradação do XMP (1 e 0,2 mM, painel da esquerda e da direita, respectivamente)) em extracto de cérebro foi efectuada, segundo o procedimento e condições idênticas às dos anteriores nucleótidos AMP, IMP e GMP (ver legendas das Figuras respectivas).

(1. xantosina; 2. XMP).

das enzimas que participam nos passos intermediários do metabolismo dos nucleótidos purínicos.

Em todos os casos, com excepção da 5'-nucleotídase, considerou-se V_{max} como a velocidade determinada experimentalmente em presença do correspondente nucleótido, nucleósido ou base, a uma concentração de 1 mM. A velocidade determinou-se a distintos tempos com o objectivo de se assegurar que se estava numa zona linear. As amostras analisaram-se por HPLC. No caso da 5'-nucleotídase, calculou-se o valor de V_{max} a partir dos resultados experimentais, considerando os respectivos valores de K_m determinados. Os resultados experimentais obtidos encontram-se na *Tabela 20*. As unidades de medida das V_{max} referidas foram uniformizadas em termos de mU/mg de proteína. Para passar estas unidades a mU/g de cérebro basta multiplicar pelo factor 8. Os valores de K_m e de K_i para os compostos implicados em cada reacção foram determinados experimentalmente ou recolhidos da literatura, segundo se indica na *Tabela 20*.

4.2.d. Tratamento matemático geral. Caso do metabolismo de derivados da adenina e hipoxantina.

O tratamento matemático está em parte inspirado nos trabalhos de Franco e Canela, 1984. Estes investigadores realizaram um estudo sobre os níveis que os compostos purínicos e seus derivados - nucleótidos, nucleósidos e bases - poderiam alcançar em estado estacionário num sistema modelo. Aqui utilizou-se um modelo parecido, aplicado ao caso dos extractos crus de cérebro. Para isso, seguiram-se os seguintes passos:

a) Descrição das vias metabólicas possíveis dos nucleótidos de adenina e hipoxantina (*Fig. 46*).

b) Formulação geral das equações da velocidade das enzimas participantes neste metabolismo (*Tabela 21*).

c) Formulação das equações diferenciais gerais (*Tabela 22*).

d) Formulação matemática de casos particulares

4.2.d.1. Tratamento matemático geral

Como o metabolismo dos nucleótidos da adenina e da hipoxantina estão intimamente relacionados, procedeu-se ao seguinte tratamento matemático:

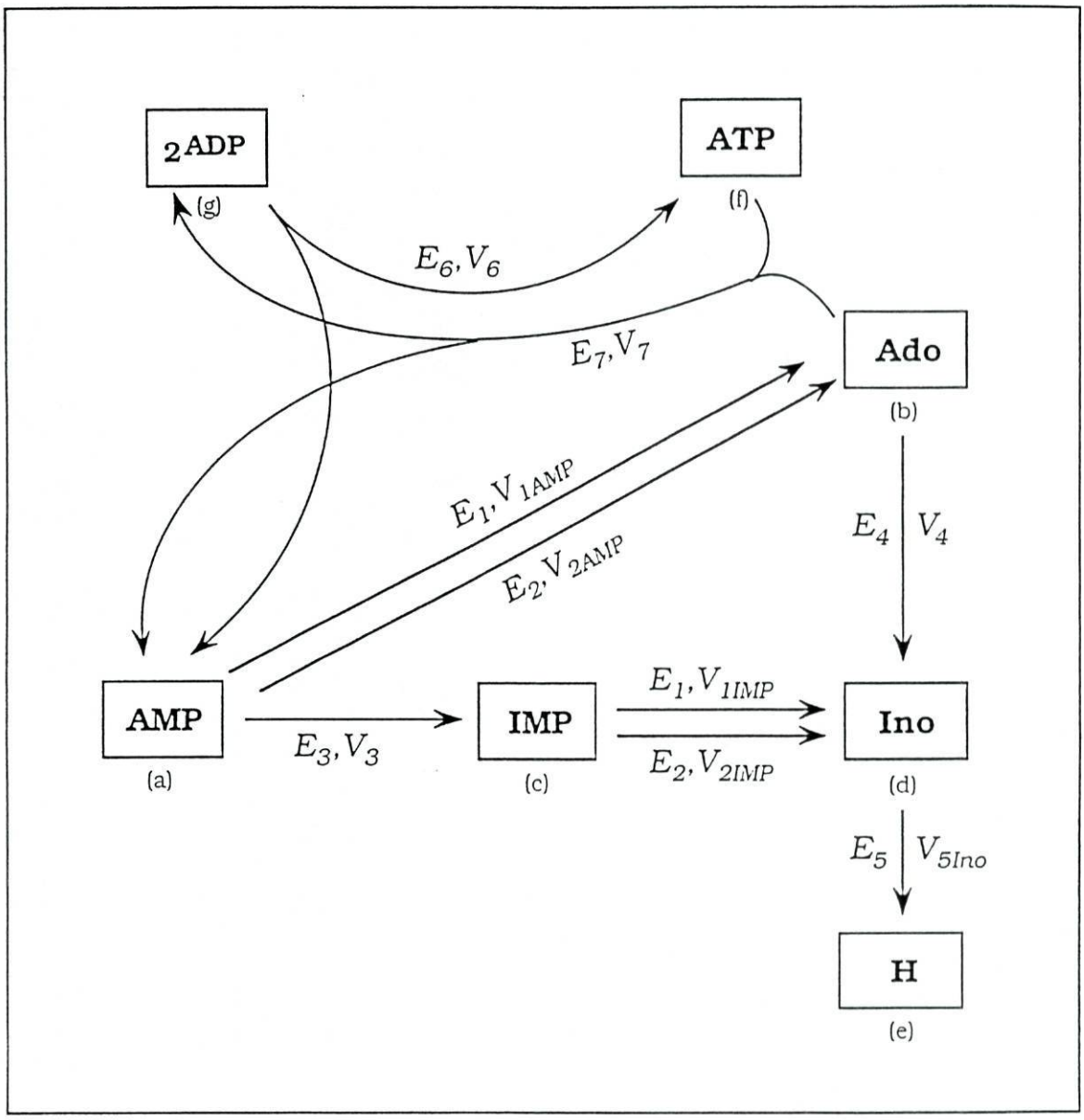


Fig. 46. Esquema geral do metabolismo dos compostos purínicos derivados da adenina e hipoxantina.

Substratos: a, AMP; b, adenosina; c, IMP; d, inosina; e, hipoxantina (H); f, ATP; g, ADP. Enzimas (E_n): E_1, 5'-nucleotídase solúvel de alta afinidade; E_2, 5'-nucleotídase IMP/GMP específica; E_3, AMP desaminase; E_4, adenosina desaminase; E_5, nucleosídase; E_6, adenilato cínase ou miocínase; E_7, adenosina cínase. V_n, velocidade máxima da reacção enzimática catalisada por E_n.

Tabela 20. Valores das constantes cinéticas (K_m e K_i) das enzimas intervenientes no metabolismo purínico cerebral.

Enzima	V_{max} (mU/mg)	K_m (μM)	K_i (μM)
Miocínase (E_6)	1000 [1]	500 (AMP) [2] 1 300 (ADP) [2] 300 (ATP) [2]	500 (AMP) [2] 1300 (ADP) [2] 300 (ATP) [2]
Adenosina cínase (E_7)	3,7 [a]	0,2 (Ado) [3] 20 (ATP) [3]	30 (Ado) [4] 200 (AMP) [5] 1 200 (ADP) [5]
5´-Nucleotídase Alta afinidade (E_1)	24 (AMP) [a] 16 (IMP) [a] 13 (GMP) [a] 5 (XMP) [a]	24 (AMP) [7] 110 (IMP) [7] 220 (GMP) [7] 1 400 (XMP) [7]	0,013 (ADP) [7] 0,032 (ATP) [7]
5´-Nucleotídase IMP-GMP específica (E_2)	4,8 (AMP) [a] 1,6 (IMP) [a] 8 (GMP) [a] 8 (XMP) [a] 4,8 (AMP) [b] 8 (IMP) [b] 8 (GMP) [b] 8 (XMP) [b]	15 000 AMP) [a] 7 000 (AMP) [c] 600 (IMP) [a] 300 (IMP) [c] 4 600 (GMP) [a] 700 (GMP) [c] 11 000 (XMP) [a] 4 700 (XMP) [c]	15 000 (AMP) [a] 7 000 (AMP) [c] 600 (IMP) [a] 300 (IMP) [c] 6 800 (Ino) [8] 4 600 (GMP) [a] 700 (GMP) [c] 11 000 (XMP) [a] 4 700 (XMP) [c]
AMP desamínase (E_3)	80 [b]	7 [d]	3 400 (IMP) [9]
Adenosina desamínase (E_4)	14 [a]	54 [6]	570 (Ino) [6] 300 (Guo) [6] 1 090 (A) [6]
Nucleosídase (E_5)	2,0 (Ino) [a] 4,0 (Guo) [a] 0,3 (Xao) [a]	300 (Ino) [10] 300 (Guo)[10] 300 (Xao) [10]	300 (Ino) [10] 300 (Guo) [10] 300 (Xao) [10]
Guanina desamínase (E_8)	46 [a]	6,4 [6]	119 (Xan) [6]

[a] Valores determinados experimentalmente; [b] Valores determinados experimentalmente na presença de ATP; [c] Valores determinados experimentalmente na presença de Ap4A; [d] Valores calculados durante a aplicação do programa. E_n, representa o número da enzima no esquema de metabolismo da *Fig. 46.*

[1] Schultz e Lowenwtein, 1976; [2] Long. C.,1968; [3] Yamada e col., 1980; [4] Newby e col., 1983; [5] Fox e Kelley, 1978; [6] Franco e col., 1981; [7] Mallol e Bozal, 1988; [8] Worku e Newby, 1982; [9] Franco e Canela,1984; [10] Takagi e Horecker, 1957.

Tabela 21. Equações gerais de velocidade das enzimas intervenientes no metabolismo purínico cerebral.

$$v_{1AMP} = \frac{[\mathrm{AMP}]V_{1\mathrm{AMP}}}{[\mathrm{AMP}] + K_{m\mathrm{AMP}} + [\mathrm{Ado}]\frac{K_{m\mathrm{AMP}}}{K_{i\mathrm{Ado}}} + [\mathrm{ATP}]\frac{K_{m\mathrm{AMP}}}{K_{i\mathrm{ATP}}} + [\mathrm{ADP}]\frac{K_{m\mathrm{AMP}}}{K_{i\mathrm{ADP}}} + [\mathrm{IMP}]\frac{K_{m\mathrm{AMP}}}{K_{m\mathrm{IMP}}}}$$

$$v_{2AMP} = \frac{[\mathrm{AMP}]V_{2\mathrm{AMP}}}{[\mathrm{AMP}] + K_{m\mathrm{AMP}} + [\mathrm{Ado}]\frac{K_{m\mathrm{AMP}}}{K_{i\mathrm{Ado}}} + [\mathrm{IMP}]\frac{K_{m\mathrm{AMP}}}{K_{m\mathrm{IMP}}}}$$

$$v_{1IMP} = \frac{[\mathrm{IMP}]V_{1\mathrm{IMP}}}{[\mathrm{IMP}] + K_{m\mathrm{IMP}} + [\mathrm{Ino}]\frac{K_{m\mathrm{IMP}}}{K_{i\mathrm{Ino}}} + [\mathrm{ATP}]\frac{K_{m\mathrm{IMP}}}{K_{i\mathrm{ATP}}} + [\mathrm{ADP}]\frac{K_{m\mathrm{IMP}}}{K_{i\mathrm{ADP}}} + [\mathrm{AMP}]\frac{K_{m\mathrm{IMP}}}{K_{m\mathrm{AMP}}}}$$

$$v_{2IMP} = \frac{[\mathrm{IMP}]V_{2\mathrm{IMP}}}{[\mathrm{IMP}] + K_{m\mathrm{IMP}} + [\mathrm{Ino}]\frac{K_{m\mathrm{IMP}}}{K_{i\mathrm{Ino}}} + [\mathrm{AMP}]\frac{K_{m\mathrm{IMP}}}{K_{m\mathrm{AMP}}}}$$

$$v_3 = \frac{[\mathrm{AMP}]V_3}{[\mathrm{AMP}] + K_{m\mathrm{AMP}} + [\mathrm{IMP}]\frac{K_{m\mathrm{AMP}}}{K_{i\mathrm{IMP}}}}$$

$$v_4 = \frac{[\mathrm{Ado}]V_4}{[\mathrm{Ado}] + K_{m\mathrm{Ado}} + [\mathrm{Ino}]\frac{K_{m\mathrm{Ado}}}{K_{i\mathrm{Ino}}}}$$

$$v_{5Ino} = \frac{[\mathrm{Ino}]V_{5\mathrm{Ino}}}{[\mathrm{Ino}] + K_{m\mathrm{Ino}} + [\mathrm{IMP}]\frac{K_{m\mathrm{Ino}}}{K_{i\mathrm{IMP}}}}$$

Tabela 21. Equações gerais de velocidade das enzimas intervenientes no metabolismo purínico cerebral (continuação).

$$v_6 = \frac{\frac{[ADP][ADP]V_6}{K_{mADP}K_{iADP}} - \frac{[AMP][ATP]V_6}{K_{mATP}K_{iAMP}}}{1 + \frac{[ADP]}{K_{iADP}} + \frac{[ADP]}{K_{iADP}} + \frac{[ADP][ADP]}{K_{mADP}K_{iADP}} + \frac{[ATP]}{K_{iATP}} + \frac{[AMP]}{K_{iAMP}} + \frac{[AMP][ATP]}{K_{mAMP}K_{iATP}}}$$

$$v_7 = \frac{[Ado][ATP]V_7}{A + B + C + D + E}$$

em que,

$$A = K_{mATP}K_{iAdo} + [Ado]K_{mATP} + [ATP]K_{mAdo} + [ATP][Ado]$$

$$B = \frac{[AMP]K_{mATP}K_{iAdo}}{K_{iAMP}} + \frac{[ADP]K_{mATP}K_{mAMP}K_{iAdo}}{K_{mADP}K_{iAMP}}$$

$$C = \frac{[ADP][AMP]K_{mATP}K_{iAdo}}{K_{mADP}K_{iAMP}} + \frac{[Ado][ADP]K_{mAMP}K_{mATP}}{K_{mADP}K_{iAMP}}$$

$$D = \frac{[ATP][AMP]K_{mAdo}}{K_{iAMP}} + \frac{[ATP][ADP][Ado]}{K_{iADP}}$$

$$E = \frac{[ATP][ADP][AMP]K_{mATP}K_{iAdo}}{K_{mADP}K_{iAMP}K_{iATP}}$$

Tabela 22. Equações diferenciais gerais do metabolismo purínico cerebral.

$$\frac{d[\mathrm{AMP}]}{dt} = \mathrm{a}'[t] = v_6 + v_7 - v_{1AMP} - v_{2AMP} - v_3$$

$$\frac{d[\mathrm{Ado}]}{dt} = \mathrm{b}'[t] = v_{1AMP} + v_{2AMP} - v_7 - v_4$$

$$\frac{d[\mathrm{IMP}]}{dt} = \mathrm{c}'[t] = v_3 - v_{1IMP} - v_{2IMP}$$

$$\frac{d[\mathrm{Ino}]}{dt} = \mathrm{d}'[t] = v_4 + v_{1IMP} + v_{2IMP} - v_{5Ino}$$

$$\frac{d[\mathrm{H}]}{dt} = \mathrm{e}'[t] = v_{5Ino}$$

$$\frac{d[\mathrm{ATP}]}{dt} = \mathrm{f}'[t] = v_6 - v_7$$

$$\frac{d[\mathrm{ATP}]}{dt} = \mathrm{g}'[t] = v_7 - v_6$$

(i) Utilizou-se o Programa "Mathematica" para MacIntosh (a seguir designado por o Programa) capaz de resolver várias equações diferenciais simultaneamente.

(ii) Submeteram-se, por princípio, todas as equações possíveis para tratar o conjunto das interconversões entre nucleótidos de adenina e de hipoxantina, tal como se especifica na *Tabela 22.*

O formato matemático requerido pelo Programa especifica-se na *Tabela 23*, ao qual se tem de introduzir algumas anotações:

a) Vn, representa velocidades máximas (V_1, V_2, V_3, etc) e o sub-índice de V corresponde à enzima que participa em cada passo metabólico, tal como se especifica na *Fig. 46.* Em certas ocasiões a mesma enzima pode transformar mais de um nucleótido, como seja por exemplo, a 5'-nucleotídase (E_1 ou E_2) que hidrolisa o IMP ou o AMP. Como a cada caso particular corresponde uma velocidade diferente, acrescenta-se a Vn, o nucleótido correspondente. Por exemplo, V_{1AMP}=24, indica que a enzima E_1 catalisa a hidrólise de AMP a uma V_{max} de 24 mU/mg.

b) O Programa "Mathematica" mostrava sinais de erros potenciais para distinguir variáveis tão parecidas como V_{1AMP}, V_{1IMP}. Por isso, utilizaram-se letras maiúsculas e minúsculas para definir os substratos das reacções (AMP, imp, ADO, ino, etc,).

c) m e I, indicam valores de K_m e K_i, respectivamente. Por exemplo, m_{1AMP} é o valor de K_m da enzima E_1 para o AMP; I_{4ino}, é o valor de K_i da enzima E_4 para a inosina, etc..

d) o Programa para a resolução das equações diferenciais consta das seguintes partes:

A. Valores para as constantes de velocidades máximas, expressas em mU/mg de proteína.

B. Valores para as constantes de Michaelis, expressas em μM.

C. Valores para as constantes de inibição, expressas em μM.

D. Formulação das equações diferenciais, desenvolvidas na *Tabela 23*, segundo os dados constantes na *Tabela 22.*

As letras referem-se aos seguintes substratos: a, AMP; b, adenosina (ADO); c, IMP; d, inosina (Ino); e, hipoxantina (Hyp); f, ATP e g, ADP (ver *Fig. 46*); as letras seguidas de apóstrofo, referem-se a derivadas: por exempo, a'[t], indica a derivada de AMP com respeito ao tempo. A formulação das equações fez-se de acordo com as especificações do Programa "Mathematica" e tendo em conta as equações de velocidade da *Tabela 21.*

Tabela 23. Tratamento matemático geral do metabolismo de derivados da adenina e hipoxantina.

A	B	C
V1AMP = 24 V1imp = 16 V2AMP = 4.8 V2imp = 8 V3 = 80 V4 = 14 V5ino= 2 V6 = 1000 V6r = 1000 V7 = 3.7	m1AMP = 24 m1imp =110 m2AMP = 7000 m2imp = 300 m3AMP = 7 m4ADO = 54 m5ino = 300 m6adp = 1300 m6AMP = 500 m6APPP = 300 m7ADO = 0.2 m7adp = 1200 m7AMP = 200 m7APPP = 20	I1ADO = 24 I1adp = 0.013 I1APPP = 0.032 I1ino = 110 I2ADO = 7000 I2ino = 6800 I3imp = 3400 I4ino = 570 I5hyp = 300 I6adp = 1300 I6AMP = 500 I6APPP = 300 I7ADO = 30 I7adp = 1200 I7AMP = 200 I7APPP = 20

Vn, V_{max} da enzima n, expressa em mU/mg de proteína; m e I, constantes de Michaelis (K_m) e de inibição (K_i), respectivamente, expressas em µM. A, B, C, D e E, representam as distintas partes em que foi subdividido o programa (ver texto).

Os valores constantes desta Tabela foram utilizados no estudo teórico da metabolização do AMP, em presença de um valor de carga adenílica de 0,8 (C.A.=0.8).

Tabela 23. Tratamento matemático geral do metabolismo de derivados da adenina e hipoxantina (continuação).

D

```
NDSolve[{a'[t] == (g[t]g[t]V6/(m6adp I6adp)-a[t]f[t]V6r/
(m6APPP I6AMP))/(1+2g[t]/I6adp+g[t]g[t]/(m6adp I6adp)+
f[t]/I6APPP+a[t]/I6AMP+a[t]f[t]/(m6APPP I6AMP)) +
 b[t]f[t]V7/(m7APPP I7ADO+b[t]m7APPP+f[t]m7ADO+f[t]b[t]+
(a[t]m7APPP I7ADO/I7AMP+g[t]m7APPP m7AMP I7ADO/(m7adp I7AMP))+
(g[t]a[t]m7APPP I7ADO/(m7adp I7AMP)+ b[t]g[t]m7AMP m7APPP/
(m7adp I7AMP))+(f[t]a[t]m7ADO/I7AMP+f[t]g[t]b[t]/I7adp)+
f[t]g[t]a[t]m7APPP I7ADO/(m7adp I7AMP I7APPP)) -
a[t]V3/(a[t]+m3AMP+c[t] m3AMP/I3imp) -
a[t]V1AMP/(a[t]+m1AMP+b[t] m1AMP/I1ADO+c[t] m1AMP/m1imp+
f[t] m1AMP/I1APPP+g[t] m1AMP/I1adp) -
a[t]V2AMP/(a[t]+m2AMP+b[t]m2AMP/I2ADO+c[t] m2AMP/m2imp),

b'[t] == a[t]V1AMP/(a[t]+m1AMP+b[t] m1AMP/I1ADO+c[t] m1AMP/m1imp+
f[t] m1AMP/I1APPP+g[t] m1AMP/I1adp) +
a[t]V2AMP/(a[t]+m2AMP+b[t]m2AMP/I2ADO+c[t] m2AMP/m2imp) -
b[t]V4/(b[t]+m4ADO+d[t] m4ADO/I4ino),

c'[t] == a[t]V3/(a[t]+m3AMP+c[t] m3AMP/I3imp) -
c[t]V2imp/(c[t]+m2imp+d[t] m2imp/I2ino+a[t] m2imp/m2AMP) -
c[t]V1imp/(c[t]+m1imp+d[t] m1imp/I1ino+a[t] m1imp/m1AMP +
f[t] m1AMP/I1APPP+g[t] m1AMP/I1adp),

d'[t] == c[t]V2imp/(c[t]+m2imp+d[t] m2imp/I2ino+a[t] m2imp/m2AMP) +
c[t]V1imp/(c[t]+m1imp+d[t] m1imp/I1ino+a[t] m1imp/m1AMP+
f[t] m1AMP/I1APPP+g[t] m1AMP/I1adp) +
b[t]V4/(b[t]+m4ADO+d[t] m4ADO/I4ino) -
d[t]V5/(d[t]+m5ino+e[t] m5ino/I5hyp),

e'[t] == d[t]V5/(d[t]+m5ino+e[t] m5ino/I5hyp),

f'[t] == (g[t]g[t]V6/(m6adp I6adp)-a[t]f[t]V6r/(m6APPP I6AMP))/
(1+2g[t]/I6adp+g[t]g[t]/(m6adp I6adp)+f[t]/I6APPP+a[t]/
I6AMP+a[t]f[t]/(m6APPP I6AMP)) -
 b[t]f[t]V7/(m7APPP I7ADO+b[t]m7APPP+f[t]m7ADO+f[t]b[t]+
(a[t]m7APPP I7ADO/I7AMP+g[t]m7APPP m7AMP I7ADO/(m7adp I7AMP))+
(g[t]a[t]m7APPP I7ADO/(m7adp I7AMP)+ b[t]g[t]m7AMP m7APPP/
(m7adp I7AMP))+(f[t]a[t]m7ADO/I7AMP+f[t]g[t]b[t]/I7adp)+
f[t]g[t]a[t]m7APPP I7ADO/(m7adp I7AMP I7APPP)),

g'[t] == -(g[t]g[t]V6/(m6adp I6adp)-a[t]f[t]V6r/(m6APPP I6AMP))/
(1+2g[t]/I6adp+g[t]g[t]/(m6adp I6adp)+f[t]/I6APPP+a[t]/
I6AMP+a[t]f[t]/(m6APPP I6AMP)) +
 b[t]f[t]V7/(m7APPP I7ADO+b[t]m7APPP+f[t]m7ADO+f[t]b[t]+
(a[t]m7APPP I7ADO/I7AMP+g[t]m7APPP m7AMP I7ADO/(m7adp I7AMP))+
(g[t]a[t]m7APPP I7ADO/(m7adp I7AMP)+ b[t]g[t]m7AMP m7APPP/
(m7adp I7AMP))+(f[t]a[t]m7ADO/I7AMP+f[t]g[t]b[t]/I7adp)+
f[t]g[t]a[t]m7APPP I7ADO/(m7adp I7AMP I7APPP)),
```

E

```
a[0] == 300, b[0] == 0, c[0] == 0, d[0] == 0,  e[0] == 0,
f[0] == 2700, g[0] == 1000}, {a, b, c, d, e, f, g}, {t, 0, 50}]
```

E. Concentrações iniciais dos substratos que participam na reacção, seguido do "tempo de cálculo" para o Programa. Este tempo de cálculo não tem necessariamente que corresponder ao tempo (em minutos) de ensaio.

Aplicação prática

O caso mais geral é aquele em que participam todas as enzimas e todos os substrato. Para isso, basta considerar os valores das constantes de V_{max}, K_m e K_i da *Tabela 23 A, B, C* e os valores iniciais das concentrações dos substratos, da parte *E* da mesma Figura.

Em qualquer caso particular no qual não participem algumas enzimas e/ou alguns substratos, basta igualar a 0 (zero) os valores correspondentes. Por exemplo, se se pretende estudar exclusivamente a degradação da inosina, 1 mM, deve considerar-se apenas as enzimas e os substratos participantes, dando o valor de zero às restantes constantes. Neste caso concreto (veja-se *Tabela 23 A*): $V_{5ino} = 2$ e igualam-se a 0 (zero) os restantes valores de V_{max}; nas condições iniciais faz-se e[0] = 1000 e dá-se o valor de 0 (zero) a todos os outros substratos (*Tabela 23 E*). Da mesma forma, quando se se pretendem estudar condições enzimáticas variáveis, podem alterar-se os valores de K_m ou de K_i (*Tabela 23 B,C*).

Com este simples procedimento o tratamento matemático da qualquer situação particular torna-se fácil, sem ser necessário alterar as condições gerais estabelecidas na *Tabela 23*.

Degradação de AMP

Quando se incuba AMP em presença de extracto de cérebro, pode medir-se o curso de aparição da adenosina, inosina e hipoxantina *Fig. 47*. A aparição exclusiva destes três compostos indica, numa primeira aproximação, que as enzimas intervenientes neste processo são as duas 5'-nucleotídases (E_1 e E_2), a adenosina desamínase (E_4) e a nucleosídase (E_5).

Com a ajuda do Programa pode analisar-se o metabolismo de AMP da seguinte forma:

(i) Em todos os casos considera-se a presença das enzimas E_4 e E_5.

(ii) A participação da enzima E_2 no metabolismo do AMP é pouco relevante, uma vez que considerando $E_1=0$, os níveis de AMP não sofrem alterações apreciáveis (*Fig. 48 C*).

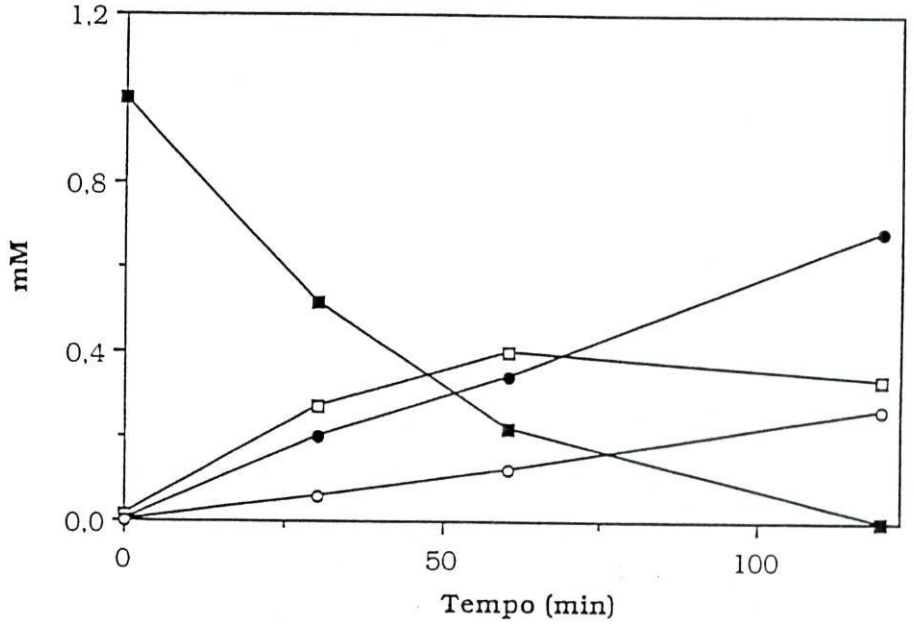


Fig. 47. Degradação metabólica do AMP em extracto de cérebro de rato.

Para um volume final de 0,15 ml, a reacção continha 50 mM de Tris, HCl (pH 7,4), 5 mM de $MgCl_2$, 1 mM de AMP e fracção citoplasmática de extracto de cérebro. A mistura foi incubada a 30°C, retirando-se, aos tempos indicados, alíquotas que foram analisadas por HPLC, como se descreve em Material e Métodos.

(AMP (■); adenosina (□); inosina (○); hipoxantina (△).

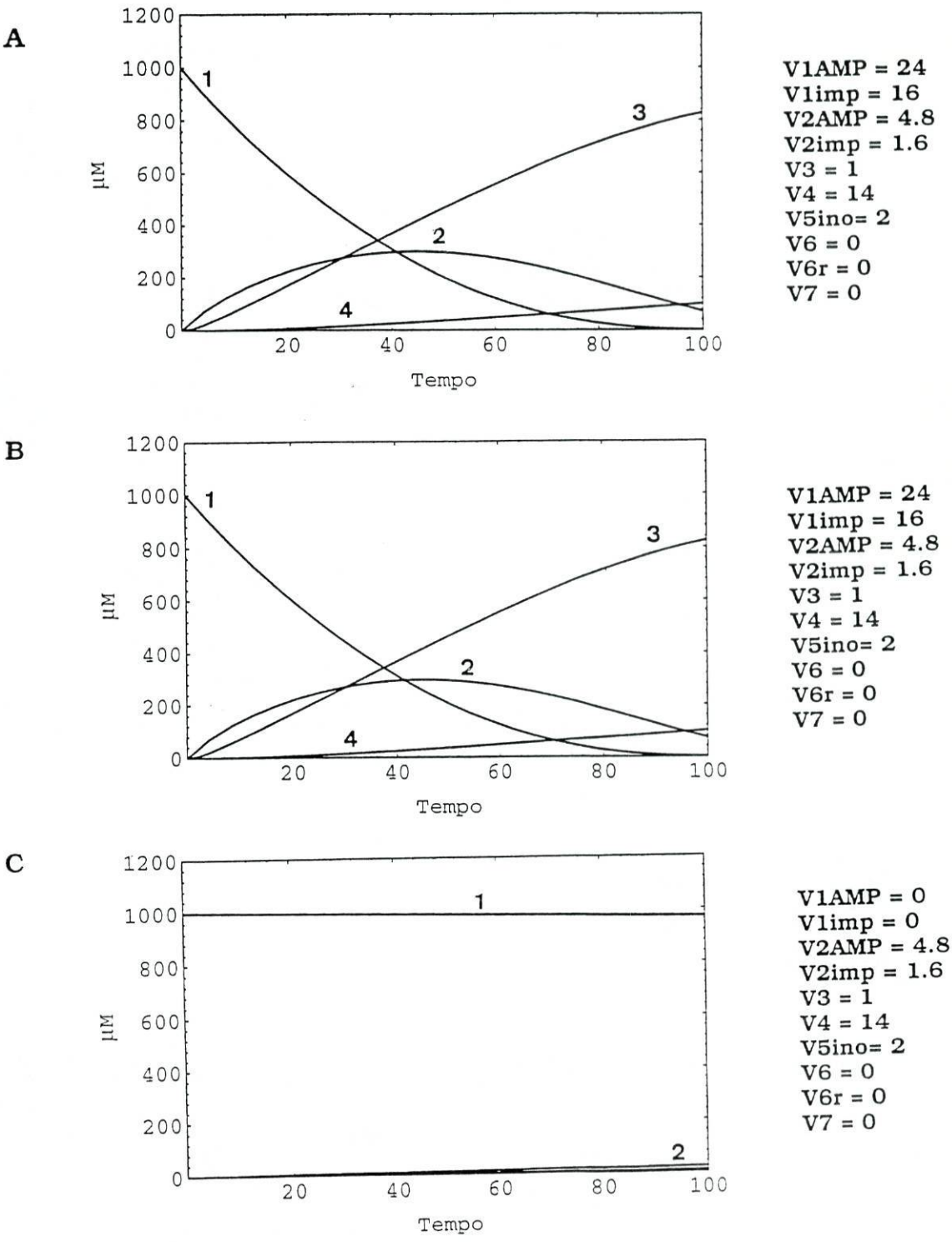


Fig. 48. Estudo matemático teórico da degradação do AMP (A). Comparação teórica da contribuição das enzimas 5'-nucleotídases solúvel de alta afinidade (B) e IMP/GMP específica (C) para processo.

O estudo teórico comparativo efectuou-se considerando os valores de velocidades máximas das enzimas participantes, indicados na figura. Os restantes valores das constantes cinéticas requeridas para este estudo, encontram-se na *Tabela 20*.

(1, AMP; 2, adenosina; 3, inosina; 4, hipoxantina)

(iii) A metabolização do AMP é catalisada preferencialmente pela enzima E_1, já que o resultado experimental é praticamente coincidente o teórico, considerando E_1=24 e E_2=0 (*Fig. 48 B*).

(iv) Considerando, simultaneamente E_1 e E_2, o perfil experimental da degradação do AMP assemelha-se, em grande medida, ao teórico (*Fig. 48 A*).

(v) A importância relativa de E_1 e E_2 sobre o metabolismo do AMP pode também quantificar-se por um outro método diferente - método do reservatório metabólico - desenvolvido por Ribeiro e col., 1990. Este método é suficientemente explicitito e simples para não ter que fazer-se um desenvolvimento explicativo demasiadamente alongado. De um modo muito simplificado, a actuação de cada enzima é simulada por um orifício na parede de um reservatório. A área e a altura média do orifício representam a V_{max} e o K_m, respectivamente, de cada enzima. O método calcula a percentagem de contribuição de cada uma das enzimas para o metabolismo de um determinado substrato comum a ambas. Observa-se na *Fig. 49* que, qualitativa e quantitativamente, a enzima E_1, em relação à enzima E_2, contribui de uma forma mais significativa e preponderante no metabolismo do AMP.

Degradação de IMP

A degradação de IMP por extracto de cérebro, origina a aparição de inosina e, em menor quantidade, de hipoxantina. As enzimas que, teoricamente, intervêm neste processo são as 5'-nucleotídases (E_1 e E_2) e a nucleosídase (E_5). Os resultados experimentais coincidem, em boa medida, com os teóricos (*Fig. 50*). Observe-se que 60 min de tempo experimental, corresponde a cerca de 20 unidades de tempo teórico (*Fig. 50 B*).

Pelas mesmas razões e com os mesmos procedimentos utilizados para o caso do AMP pode demonstrar-se que a enzima que prioritariamente intervém na degradação do IMP, é a E_1.

4.2.e. Influência da carga adenílica sobre o metabolismo do AMP (IMP).

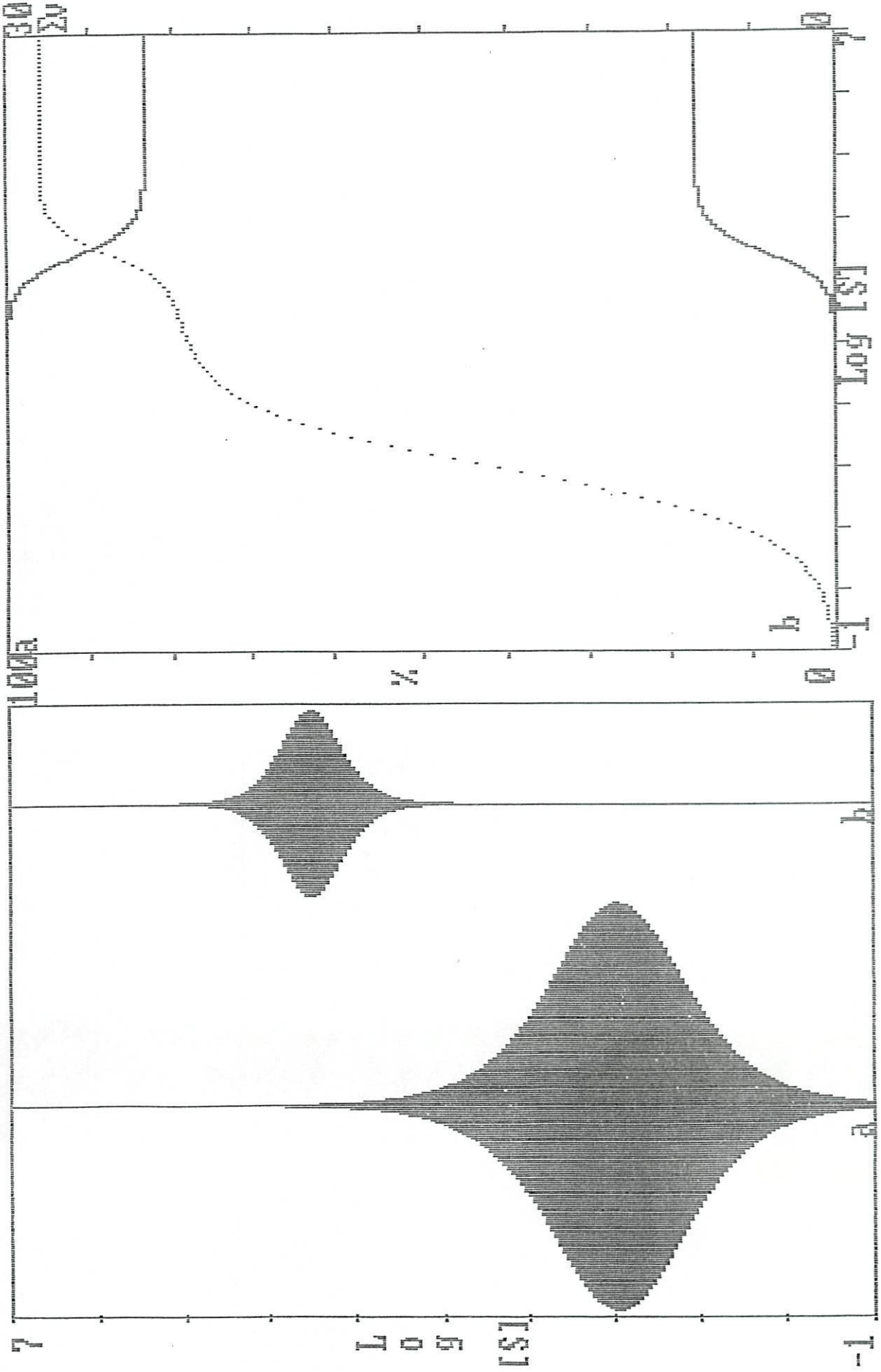
Como é sabido, a carga adenílica (C.A.), definida como,

$$C.A. = \frac{[ATP] + 1/2\,[ADP]}{[ATP] + [ADP] + [AMP]}$$

Fig. 49. Representação gráfica da contribuição relativa das enzimas E_1 e E_2 no metabolismo do AMP, aplicando o método do reservatório metabólico (Ribeiro e col. 1990).

No painel da esquerda, encontram-se representados os orifícios na parede do reservatório correspondente às enzimas E1 (esquerda) e E2 (direita) que transformam um substrato comum, AMP. No painel da direita, representa-se a contribuição percentual de E1 e E2 e a velocidade total de transformação do AMP em cada momento, em função da sua concentração.

Este estudo efectuou-se considerando os valores de V_{max} e K_m, utilizados no estudo matemático teórico (*Fig. 48*) e constantes da *Tabela 20*.



30
Σν
0
100a
%
0
b
-1
Log [S]
7
7
Log [S]
-1
a
b

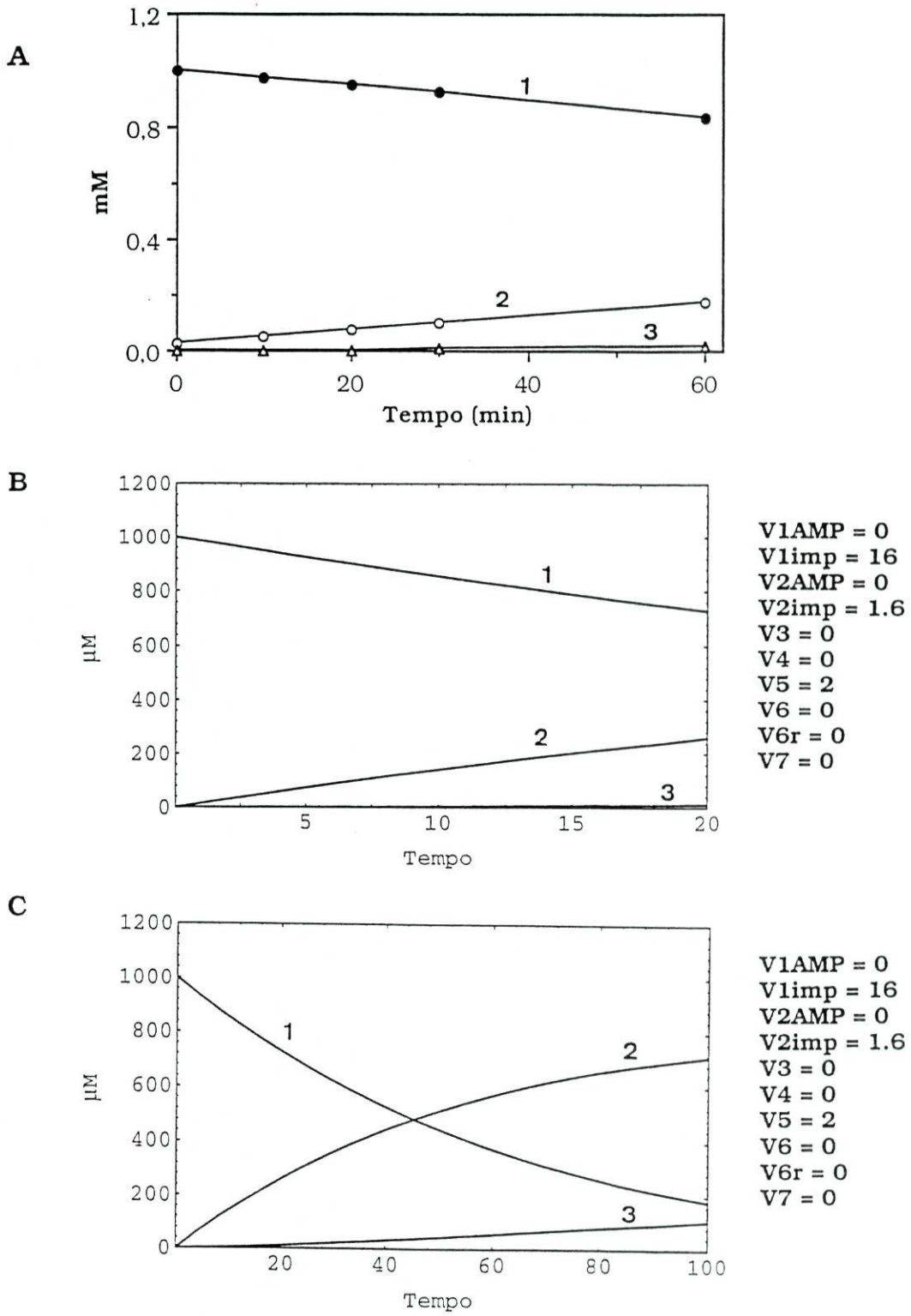


Fig. 50. Degradação metabólica do IMP em extracto de cérebro de rato. Comparação entre os resultados experimentais e os teóricos.

Os resultados experimentais (**A**) obtiveram-se incubando 1 mM de IMP com extracto de cérebro, de acordo com os procedimentos e condições referidas na *Fig. 47*. Os resultados teóricos, representados em duas escalas de unidades de tempo (**B** e **C**), foram obtidos considerando os valores de velocidades máximas referidas na figura. Os restantes valores das constantes cinéticas, das enzimas intervenientes neste processo, encontram-se na *Tabela 20*.

(IMP (•, 1); inosina (○, 2); hipoxantina (△, 3)).

(Atkinson, 1968), exerce uma influência significativa sobre uma grande quantidade de sistemas enzimáticos intervenientes tanto no catabolismo como no anabolismo celular.

Efectuou-se um estudo sistemático da influência da C.A. sobre o metabolismo do AMP, utilizando-se 4 diferentes valores de C.A.: 0,8, 0,6, 0,4 e 0,2. Para se conseguirem estas condições, utilizaram-se distintas concentrações finais em AMP, ADP e ATP, detalhadas na *Tabela 24*. Como pôde verificar-se, os valores iniciais de concentração em AMP são afectados pelo valor de C.A. A seguir, descrevem-se os resultados obtidos.

Tabela 24. Concentrações finais individuais em ATP, ADP e AMP, a diferentes valores de cargas adenílicas.

Nucleótido	C.A. 0,8 (mM)	C.A. 0,6 (mM)	C.A. 0,4 (mM)	C.A. 0,2 (mM)
ATP	2,7	1,7	0,9	0,6
ADP	1,0	1,4	1,4	1,2
AMP	0,3	0,9	1,7	2,2

O cálculo destes valores, expressos em mM, foi efectuado, considerando 1 mM de Mg^{2+} livre total, uma concentração total em nucleótidos de adenina de 4 mM e um valor da constante de equilibrio para a reacção catalisada pela adenilato cínase de 0,8, de acordo com Chapman e col., 1976.

Carga adenílica (C.A.) de 0,8.

Com o objectivo de melhor apreciar o destino metabólico do AMP, ADP e ATP, nestas condições, representam-se os resultados experimentais obtidos, na *Fig. 51*, em duas escalas diferentes, representando-se, numa delas os valores obtidos com ATP e na outra não . Nesta Figura observa-se: (i) um aumento inicial ligeiro das concentrações de ATP, mantendo-se posteriormente esses níveis em estado estacionário; (ii) uma diminuição acentuada de ADP e AMP; (iii) um forte aumento seguido de diminuição na

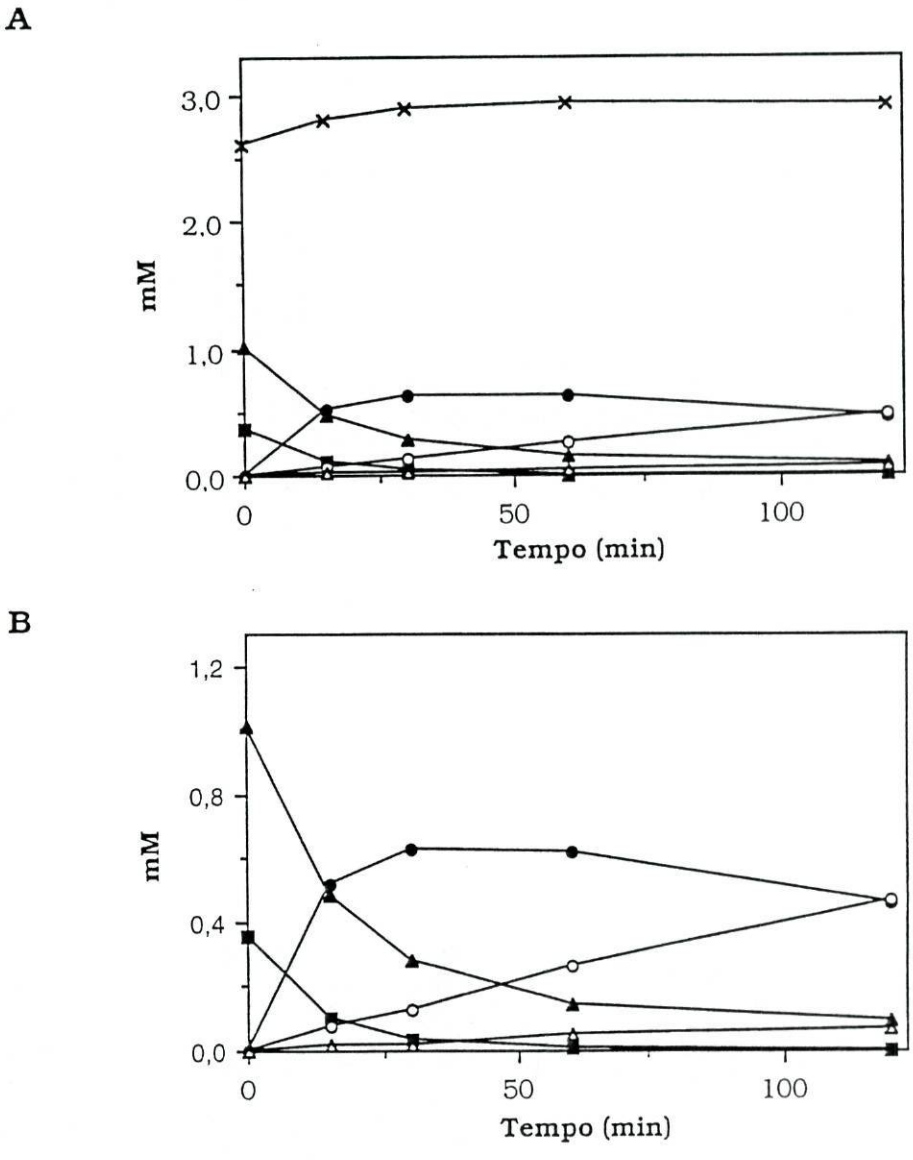


Fig. 51. Degradação de AMP na presença de um valor de carga de adenílica de 0,8 (C.A.=0,8).

Para um volume final de 0,15 ml, a mistura de reacção continha, 50 mM de Tris. HCl (pH7.4), 5 mM de $MgCl_2$, 0,3 mM de AMP, 1 mM de ADP, 2.7 mM de ATP e fracção citoplasmática de extracto de cérebro. A mistura foi incubada a 30°C, sendo as alíquotas, retiradas aos tempos indicados, analisadas por HPLC, como se descreve em Material e Métodos.

A representação geral dos perfis metabólicos dos produtos e substratos envolvidos na degradação do AMP; **B** representação parcial da degradação do AMP, não abrangendo as variações metabólicas do ATP.

(ATP (×); ADP (▲); AMP (■); IMP (●); inosina (○); hipoxantina (△)).

concentração de IMP; (iv) um aumento continuado da concentração de inosina e de hipoxantina formadas e, (v) ausência de adenosina. Considerando os resultados experimentais, procedeu-se ao respectivo estudo teórico, podendo observar-se na *Fig. 52*, igualmente em duas escalas, os resultados obtidos. Este estudo não se pode prolongar para além do tempo teórico de 60 unidades, devido, unicamente, à enorme quantidade de cálculo necessária, incompatível com a capacidade e potência do computador utilizado.

O perfil de degradação de AMP pode interpretar-se da seguinte forma:

A. Quando se incubam simultaneamente ATP, ADP e AMP ocorre um processo de interconversão entre estes nucleótidos, no qual podem participar as nucleósido monofosfato e nucleósido difosfato cínases e a adenilato cínase ou miocínase (E_6).

Com o objectivo de simplificar o tratamento matemático considerou-se apenas a intervenção da miocínase segundo um mecanismo enzimático do tipo bi-bi ao acaso e à qual corresponde a equação de velocidade v_6 da *Tabela 21*. Para esta enzima, assumiu-se o valor de V_{max} de 1000, descrito por Schultz e Lowenstein (1976), tanto em directo (V_6) como em reverso (V_{6r}).

B. Contrariamente ao observado apenas com o AMP, neste caso aparece IMP, indicando que, nestes condições experimentais, a presença interventiva da AMP desamínase. Com efeito, é sabido que esta enzima é activada pelo ATP (em concentrações fisiológicas de AMP (0,1 a 0,3 mM) (Chapman e Atkinson, 1973)) e por Ap_4A (Fernández e col., 1984).

C. A ausência de adenosina pode ser interpretada por:

(i) Uma forte actividade da adenosina cínase (E_7).

(ii) Inibição da 5'-nucleotídase (E_1) por acção do ADP e ATP (Mallol e Bozal, 1983; Madrid-Marina e Fox, 1986; Orford e col., 1991).

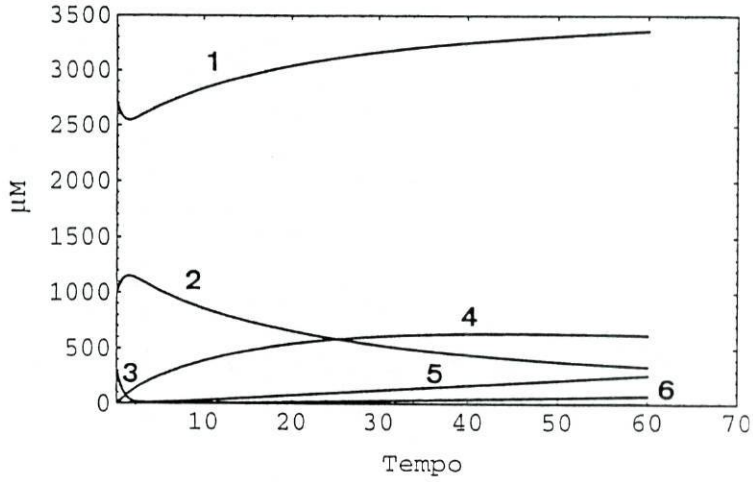
(iii) Presença de uma forte actividade da adenosina desamínase.

As alternativas possíveis referidas nas alíneas A., B. e C. estudaram-se experimental e teoricamente.

No caso A. observou-se que com a simples introdução no sistema de equações da enzima miocínase (E_6), os resultados teóricos se aproximavam dos experimentais.

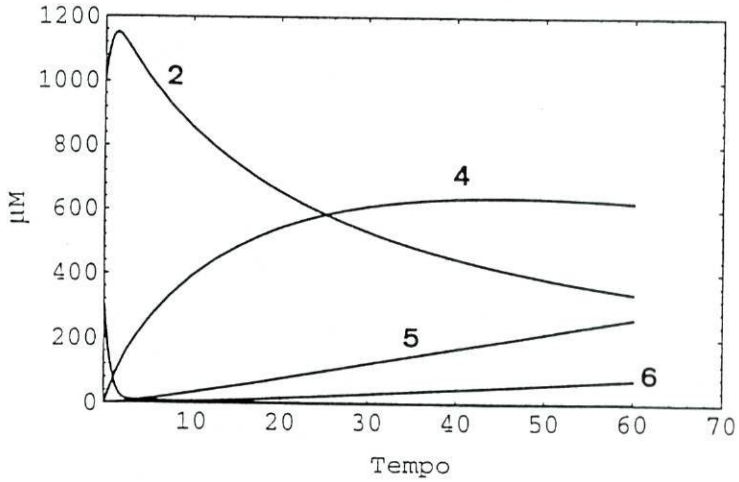
No caso B. os resultados experimentais e teóricos aproximam-se quando, no sistema, se introduz a equação referente à enzima AMP desamínase (E_3), com um valor de V_{max}=80, determinado experimentalmente. Deste modo, e nestas condições, o valor de Vmax para esta enzima, passa de valores negligenciáveis (<1 mU/mg) a 80 mU/mg, na

A



V1AMP =24
V1imp = 16
V2AMP = 4.8
V2 imp = 8
V3 = 80
V4 =14
V5= 2
V6 = 1000
V6r = 1000
V7 = 3.7

B



V1AMP =24
V1imp = 16
V2AMP = 4.8
V2 imp = 8
V3 = 80
V4 =14
V5= 2
V6 = 1000
V6r = 1000
V7 = 3.7

Fig. 52. Estudo teórico da degradação de AMP em presença de um valor de C.A.=0,8.

Consideraram-se, para este estudo, os valores de velocidades máximas das enzimas referidas na figura. Os valores das constantes cinéticas das enzimas participantes encontram-se na *Tabela 20*. Como valores de f[0] (ATP), g[0] (ADP) e a[0] (AMP), consideraram-se, 2700, 1000 e 300, respectivamente.Os resultados representam-se a duas escalas distintas de concentrações, de 0 a 3200 (**A**) e de 0 a 1200 µM (**B**),

(1, ATP; 2, ADP; 3, AMP; 4, IMP; 5, inosina; 6, hipoxantina).

ausência e presença de ATP, respectivamente. Procedeu-se, igualmente, a ajustes matemáticos do valor de K_m para esta enzima. A melhor aproximação entre os resultados teoricos e os experimentais conseguiu-se apenas, quando, além do valor de V_{max}, se considerou m3AMP=7.

Em relação ao caso C. a incubação de adenosina em presença de ATP deu origem à formação de AMP e ADP, com uma velocidade determinada de 3,7 mU/mg. Com a introdução desta enzima (E7) e deste valor de V_{max} no Programa "Mathematica" não se apreciou a aparição de adenosina nem tão pouco ocorreram alterações significativas no perfil metabólico dos substratos estudados (resultados não mostrados). A forte inibição da 5'-nucleotídase E_1 por acção de ADP e ATP, contribuiu para a não aparição de adenosina, impedindo ou diminuindo drásticamente a sua formação a partir do AMP. A contribuição da presença de ADP e ATP na velocidade real da enzima E_1, afectando tanto o AMP como o IMP, determinou-se mediante a inclusão, nas equações correspondentes a essa enzima E_1, dos seguintes termos:

$$[ADP]\ \frac{K_{mAMP}}{K_{iADP}} \quad e \quad [ATP]\ \frac{K_{mAMP}}{K_{iATP}}$$

para o AMP, e

$$[ADP]\ \frac{K_{mIMP}}{K_{iADP}} \quad e \quad [ATP]\ \frac{K_{mIMP}}{K_{iATP}}$$

para o IMP como substrato.

Desta forma as alterações de velocidade são validadas tanto na presença de ATP como na sua ausência, dado que, neste último caso, os termos correspondentes ficam matemáticamente anulados. Igualmente, sob um ponto de vista matemático, foi descartada a contribuição da actividade da adenosina desamínase no metabolismo do AMP, já que, considerando V4=0 não se observa a aparição de adenosina.

A interpretação mais aceitável dos resultados obtidos é que em consequência da activação da AMP desamínase pelo ATP, o AMP é metabolizado a IMP justificando assim, o aumento de IMP observado e a não aparição de adenosina.

Outros valores de carga adenílica: 0,6; 0,4 e 0,2.

O estudo da influência da carga adenílica sobre o AMP foi completado analisando a sua degradação metabólica em presença de concentrações de AMP, ADP e ATP, correspondentes aos valores de 0,6, 0,4 e 0,2. A partir dos resultados experimentais e teóricos representados na *Fig. 53* pode observar-se uma boa correlação entre ambos. Os comentários que poderiam fazer-se são parecidos ao caso da carga adenílica de 0,8 e, em consequência, omitem-se.

4.2.f. Caso do metabolismo do GMP e de XMP.

Degradação de GMP.

Os resultados experimentais obtidos indicam que a diminuição da concentração de GMP, quando incubado em presença de extractos de cérebro, é acompanhado pelo aumento rápido da concentração de guanosina, seguido da aparição de xantina (*Fig. 54*). A não observação da guanina como um dos produtos de degradação pode ser justificada pela presença de uma forte actividade da guanina desamínase que transforma a guanina em xantina. Deste modo, nesta via metabólica podem intervir as enzimas 5´-nucleotídases de alta afinidade (E_1) e IMP/GMP específica (E_2), uma nucleosídase (E_5) e a guanina desamínase (E_8) (*Fig. 55*).

Estes resultados experimentais podem ser simulados matemáticamente considerando os valores das constantes cinéticas V_{1GMP} e V_{2GMP}, para estas enzimas, de 13 e 8, respectivamente, que se encontram especificados na *Tabela 20*.

Degradação de XMP.

Os produtos resultantes da degradação de XMP, quando incubado em presença de extracto de cérebro (*Fig. 56*), mostram a diminuição da concentração de XMP, com o concomitante aumento da formação de xantosina. Estes resultados indicam que, neste processo metabólico, podem intervir as enzimas E_1 e E_2 (*Fig. 57*), responsáveis pela conversão do XMP ao seu nucleósido correspondente, não se verificando a aparição de xantina.

A degradação deste nucleótido pode, igualmente ser acompanhada pelo seu estudo teórico, considerando os valores de V_{1XMP} e V_{2XMP} de 5 e

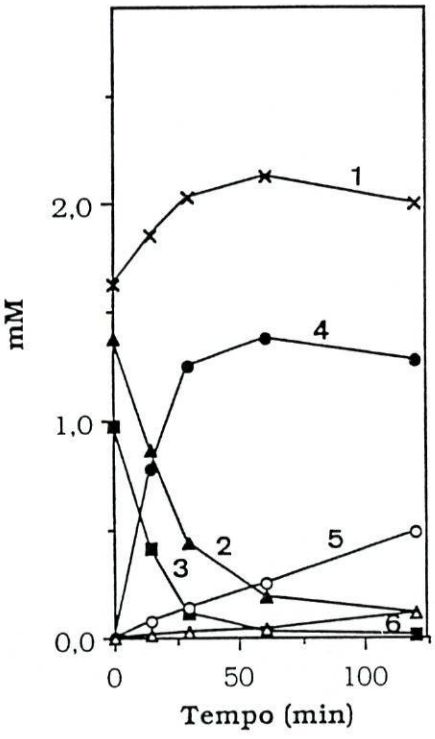
Fig. 53. Degradação metabólica de AMP, pelo extracto de cérebro de rato, em presença de distintos valores de C.A.. Comparação entre os resultados experimentais e teóricos.

Em **A**, os ensaios experimentais efectuaram-se, segundo procedimento e condições descritas na *Fig. 51*, incubando concentrações variáveis de AMP, ADP e ATP em presença de extracto de cérebro, de acordo com o valor de carga adenílica indicada (*Tabela 24*). Em **B**, os ensaios teóricos efectuaram-se pelo método aqui apresentado considerando como valores de a[0], f[0] e g[0] os valores correspondentes às concentrações de AMP, ATP e ADP utilizados em **A**, para cada valor de carga adenílica. Os valores das constantes cinéticas das enzimas intervenientes utilizados nestes estudos foram idênticos aos referidos na *Fig. 52*.

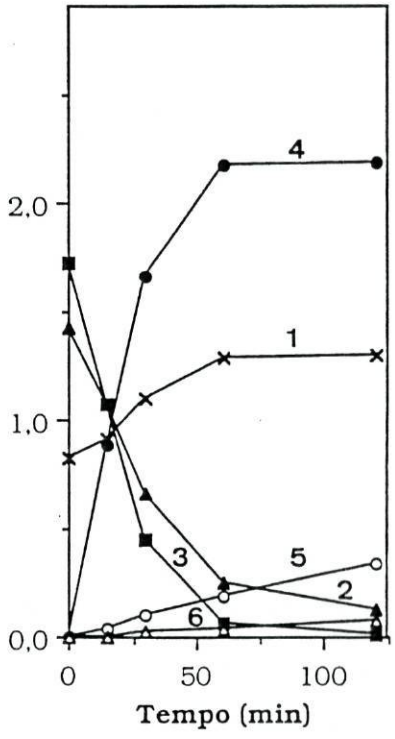
(ATP (×,1); ADP (▲,2); AMP (■,3); IMP (●,4); inosina (○,5); hipoxantina (△,6))

A

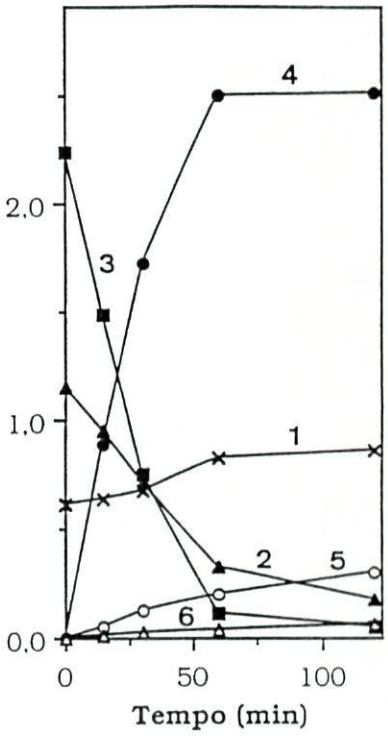
C.A.=0,6



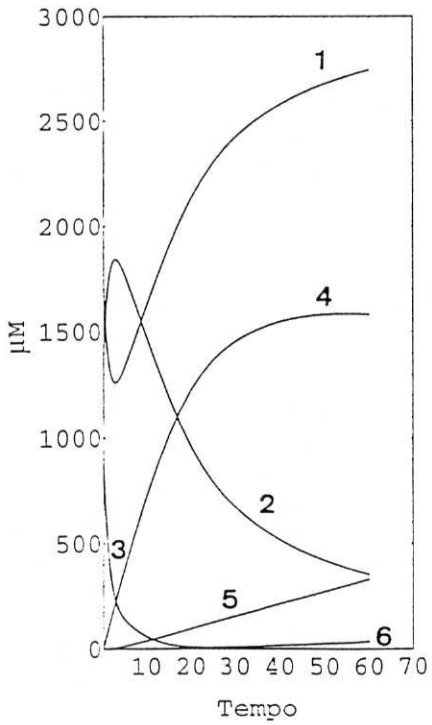
C.A.=0,4

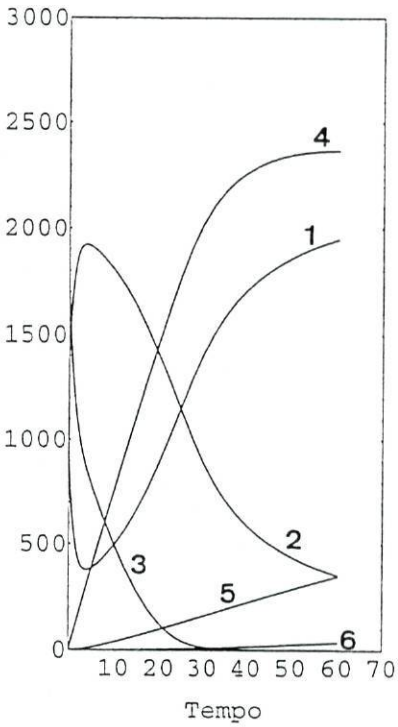


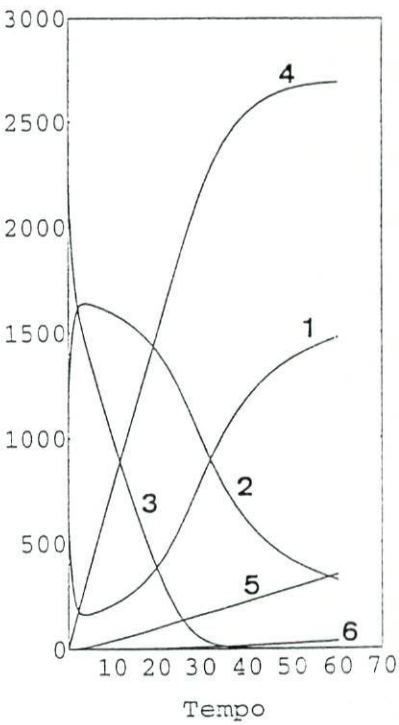
C.A.=0,2



B







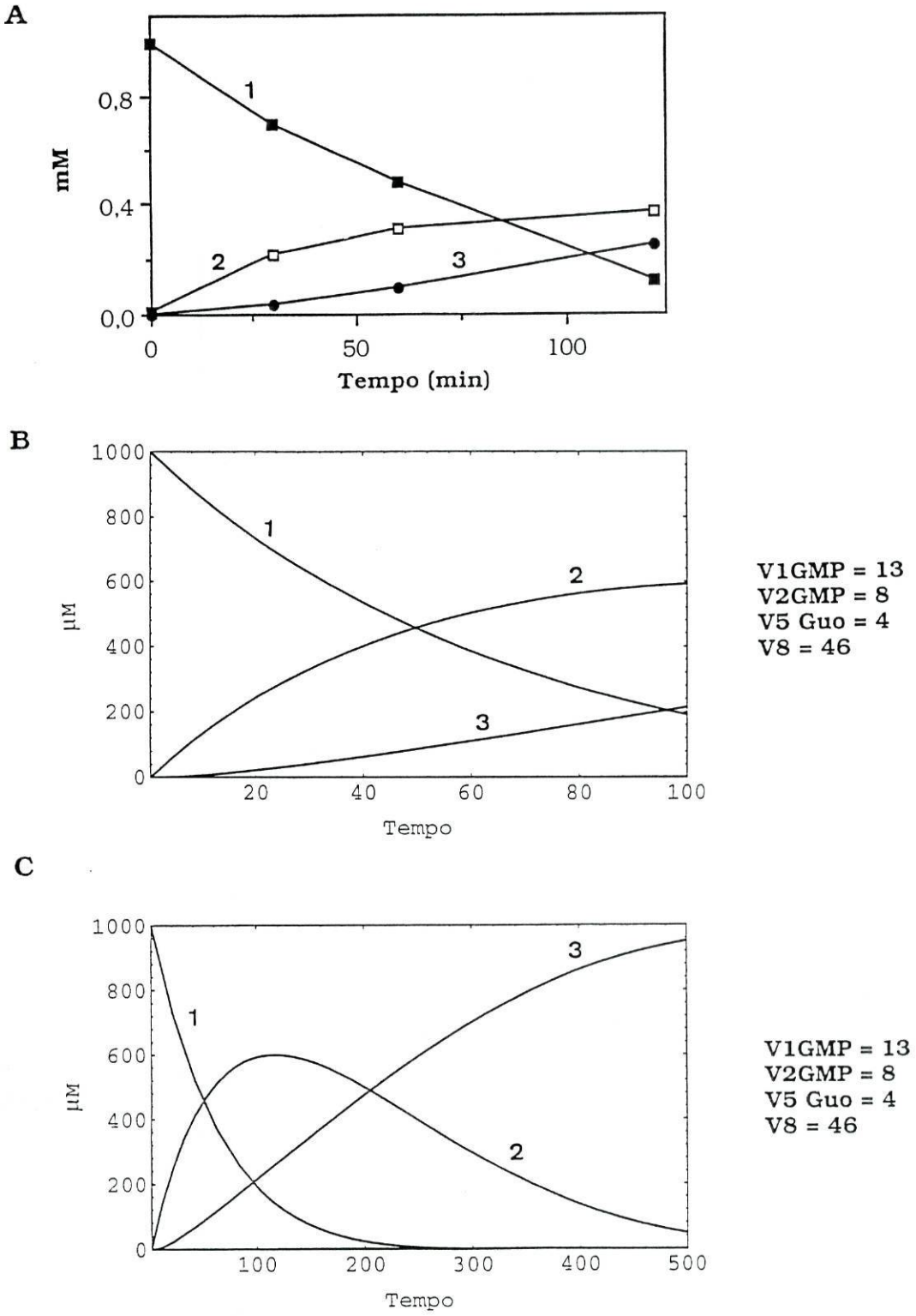
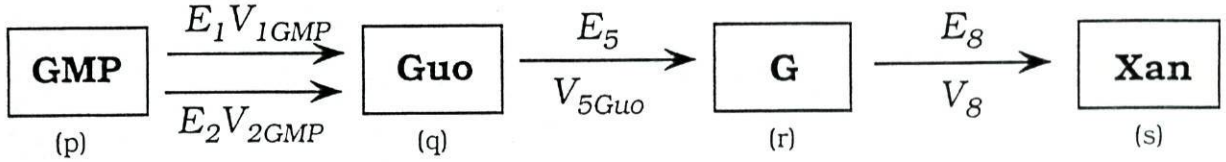


Fig. 54. Degradação de GMP em extracto cerebral de rato. Comparação entre os resultados experimentais e os teóricos.

O ensaio experimental (**A**) foi efectuado incubando GMP em extracto de cérebro, analisando-se alíquotas da mistura de reacção, ao fim dos tempos indicados, por HPLC (Material e Métodos). O ensaio teórico, representado em duas escalas distintas de tempo (**B** e **C**), foi efectuado pelo método descrito, utilizando os valores das constantes cinéticas das enzimas descritos na *Tabela 20*.

(GMP (■, 1); guanosina (□, 2); xantina (●, 3)).

A



B

$$v_{1GMP} = \frac{[GMP]V_{1GMP}}{[GMP] + K_{mGMP} + [Guo]\frac{K_{mGMP}}{K_{iGuo}}}$$

$$v_{2GMP} = \frac{[GMP]V_{2GMP}}{[GMP] + K_{mGMP} + [Guo]\frac{K_{mGMP}}{K_{iGuo}}}$$

$$v_{5Guo} = \frac{[Guo]V_{5Guo}}{[Guo] + K_{mGuo} + [G]\frac{K_{mGuo}}{K_{iG}}}$$

$$v_8 = \frac{[G]V_8}{[G] + K_{mG} + [Xan]\frac{K_{mG}}{K_{iXan}}}$$

C

$$\frac{d[GMP]}{dt} = p'[t] = -v_{1GMP} - v_{2GMP}$$

$$\frac{d[Guo]}{dt} = q'[t] = v_{1GMP} + v_{2GMP} - v_{5Guo}$$

$$\frac{d[G]}{dt} = r'[t] = v_{5Guo} - v_8$$

$$\frac{d[Xan]}{dt} = s'[t] = v_8$$

Fig. 55. Metabolismo de GMP no cérebro de rato. Esquema metabólico de degradação (A). Equações matemáticas gerais (B) e diferenciais (C) do catabolismo de GMP.

Substratos: p, GMP; q, guanosina; r, guanina; s, xantina. Enzimas (E_n): E_1, 5'-nucleotídase solúvel de alta afinidade; E_2, 5'-nucleotídase IMP/GMP específica; E_5, nucleosídase; E_8, guanina desaminase. V_n, velocidade máxima da reacção enzimática catalisada pela enzima E_n.

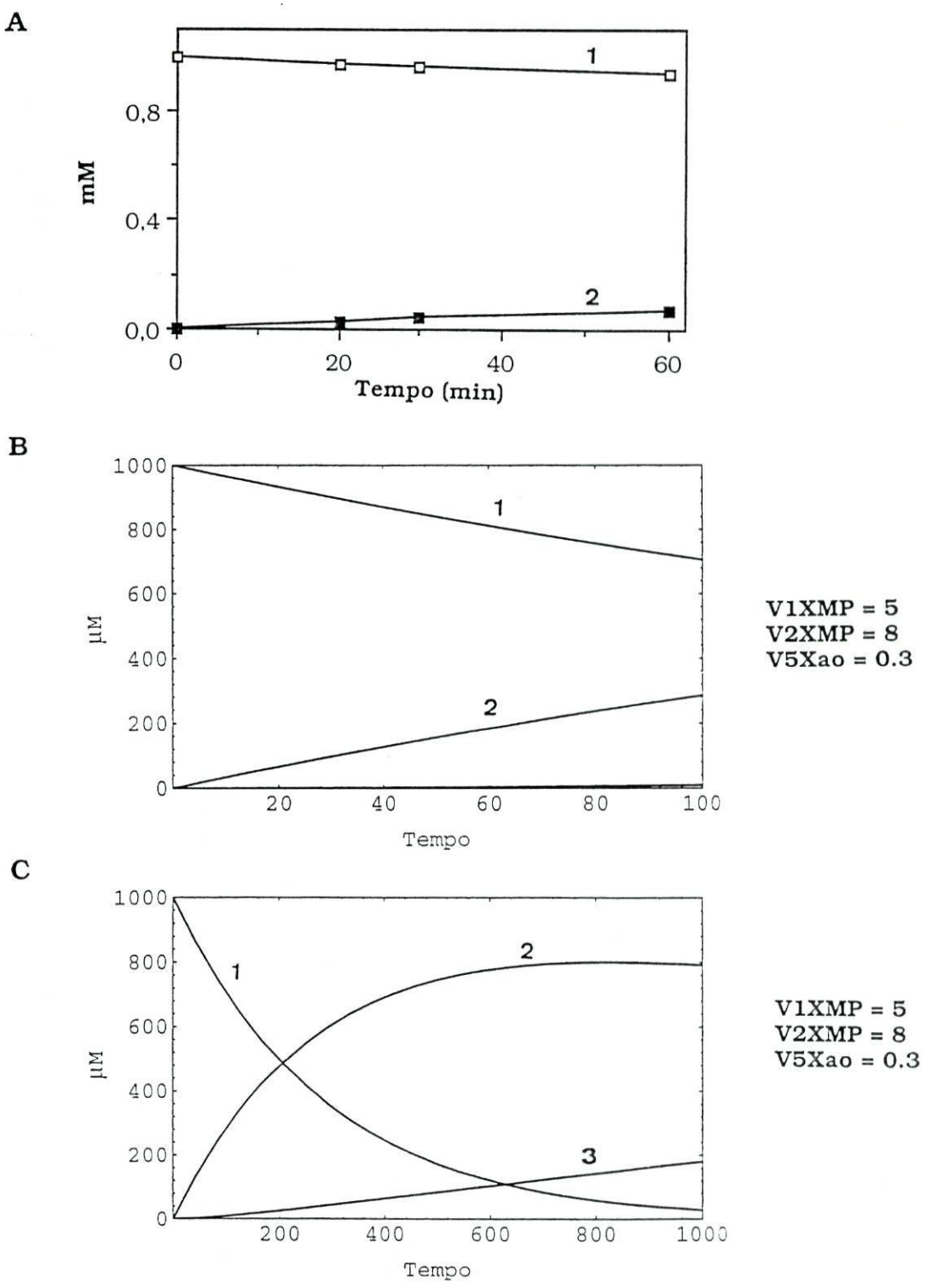
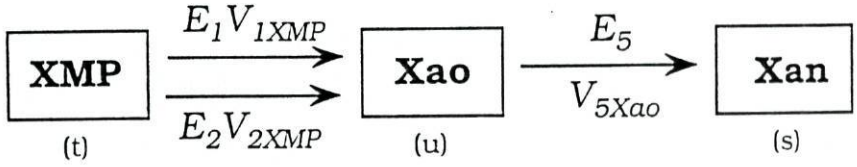


Fig. 56. Degradação de XMP em extracto cerebral de rato. Comparação entre os resultados experimentais e os teóricos.

O ensaio experimental (**A**) foi efectuado incubando XMP em extracto de cérebro, analisando-se alíquotas da mistura de reacção, ao fim dos tempos indicados, por HPLC (Material e Métodos). O ensaio teórico, representado em duas escalas distintas de tempo (**B** e **C**), foi efectuado pelo método descrito utilizando os valores das constantes cinéticas das enzimas descritos na *Tabela 20*.

(XMP (□, 1); xantosina (■, 2)).

A



B

$$v_{1XMP} = \frac{[XMP]V_{1XMP}}{[XMP] + K_{mXMP} + [Xao]\frac{K_{mXMP}}{K_{iXao}}}$$

$$v_{2XMP} = \frac{[XMP]V_{2XMP}}{[XMP] + K_{mXMP} + [Xao]\frac{K_{mXMP}}{K_{iXao}}}$$

$$v_{5Xao} = \frac{[Xao]V_{5Xao}}{[Xao] + K_{mXao} + [X]\frac{K_{mXao}}{K_{iXan}}}$$

C

$$\frac{d[XMP]}{dt} = t'[t] = -v_{1XMP} - v_{2XMP}$$

$$\frac{d[Xao]}{dt} = u'[t] = v_{1XMP} + v_{2XMP} - v_{5Xao}$$

$$\frac{d[Xan]}{dt} = s'[t] = v_{5Xao}$$

Fig. 57. Metabolismo de XMP no cérebro de rato. Esquema metabólico de degradação (A). Equações matemáticas gerais (B) e diferenciais (C) do catabolismo de XMP.

Substratos: t, XMP; u, xantosina; s, xantina. Enzimas (E_n): E_1, 5'-nucleotídase solúvel de alta afinidade; E_2, 5'-nucleotídase IMP/GMP especifica; E_5, nucleosídase. V_n, velocidade máxima da reacção enzimática catalisada pela enzima E_n.

8, respectivamente. A aplicação do Programa nestas condições permitiu a obtenção de resultados praticamente sobreponíveis aos obtidos experimentalmente, como se pode verificar *Fig. 56 B*, podendo ainda prever e demonstrar o aparecimento tardio da xantina, por acção de uma nucleosídase (E5), cuja velocidade reacção por ela catalisada (V_{5Xao}) é muito pequena (*Fig. 56 C*).

4.2.g.Casos particulares.

Influência de P_i.

Paralelamente com os ensaios efectuados com a carga adenílica de 0,8, procedeu-se ao estudo a influência do P_i, em concentrações de 2 mM, sobre o metabolismo purínico.

Os resultados mostram que, enquanto que em ambas as situações se mantém o consumo de ADP e AMP, na presença de P_i observa-se um aumento dos níveis de IMP e um decréscimo dos de inosina. consistentes com a inibição da 5'-nucleotídase pelo P_i (*Fig. 58*). Apesar da presença de activadores ser capaz de reverter o efeito de inibição pelo P_i (Itoh e col., 1986), observou-se, não obstante, uma inibição de 35% na formação de inosina e hipoxantina. A velocidade de reacção determinada, na presença de 1 mM de IMP e 2 mM de P_i foi de 5,2 mU/mg.

Matemáticamente, este efeito pode, do mesmo modo, ser simulado (*Fig. 59*). No entanto, como o P_i se comporta como inibidor competitivo da enzima, torna-se necessário incluir na reacção de velocidade v_{2IMP} (ver *Tabela 21*) um factor que reflita esse efeito:

$$[Pi]\frac{K_{mIMP}}{K_{iPi}}$$

Itoh e Yamada (1990) encontraram um valor de K_m aparente da enzima em relação ao IMP de 4,6 mM, na presença de 1 mM de P_i. Na ausência de P_i, o K_m encontrado foi de 0,7 mM. Para efeito de cálculo matemático assumir-se-á um valor de K_i de 0,179, calculado a partir destes dados. Para melhor visualização dos resultados teóricos, desenhou-se uma grelha no interior da *Fig. 59*.

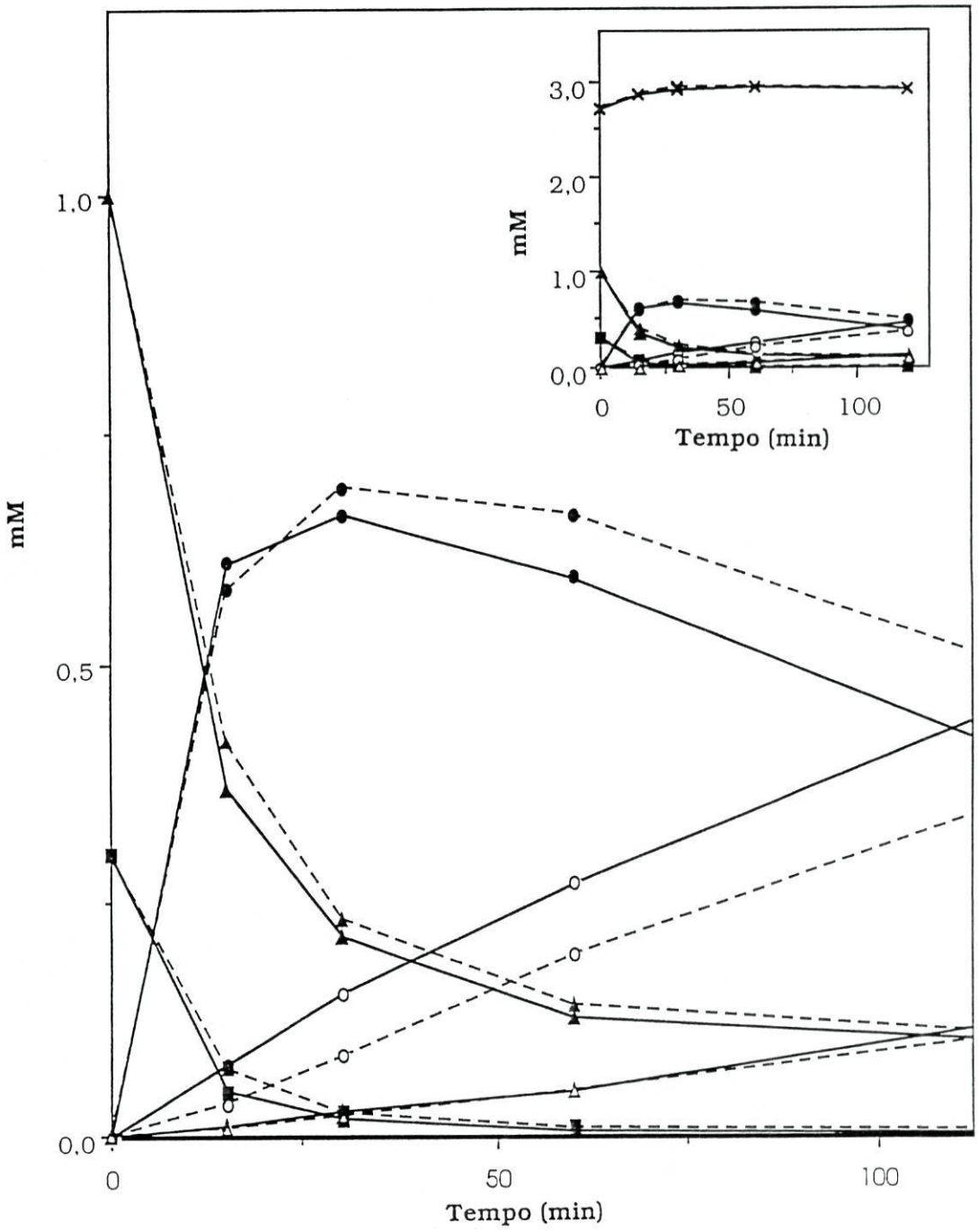


Fig. 58. Efeito do Pi sobre o metabolismo dos nucleótidos da adenina e hipoxantina.

O ensaio foi efectuado na presença de um valor de carga adenílica de 0,8, na presença (tracejado) e na ausência (contínuo) de 2 mM de Pi e extracto de cérebro. A mistura de reacção foi incubada a 30°C. Ao fim dos tempos indicados recolheram-se alíquotas que foram analizadas por HPLC. Na figura no canto superior direito pode observar-se, sob um ponto de vista global, a variação dos produtos e dos substratos envolvidos neste processo ao longo do tempo de ensaio.

ATP (×); ADP (▲); AMP (■); IMP (●); inosina (○); hipoxantina (△).

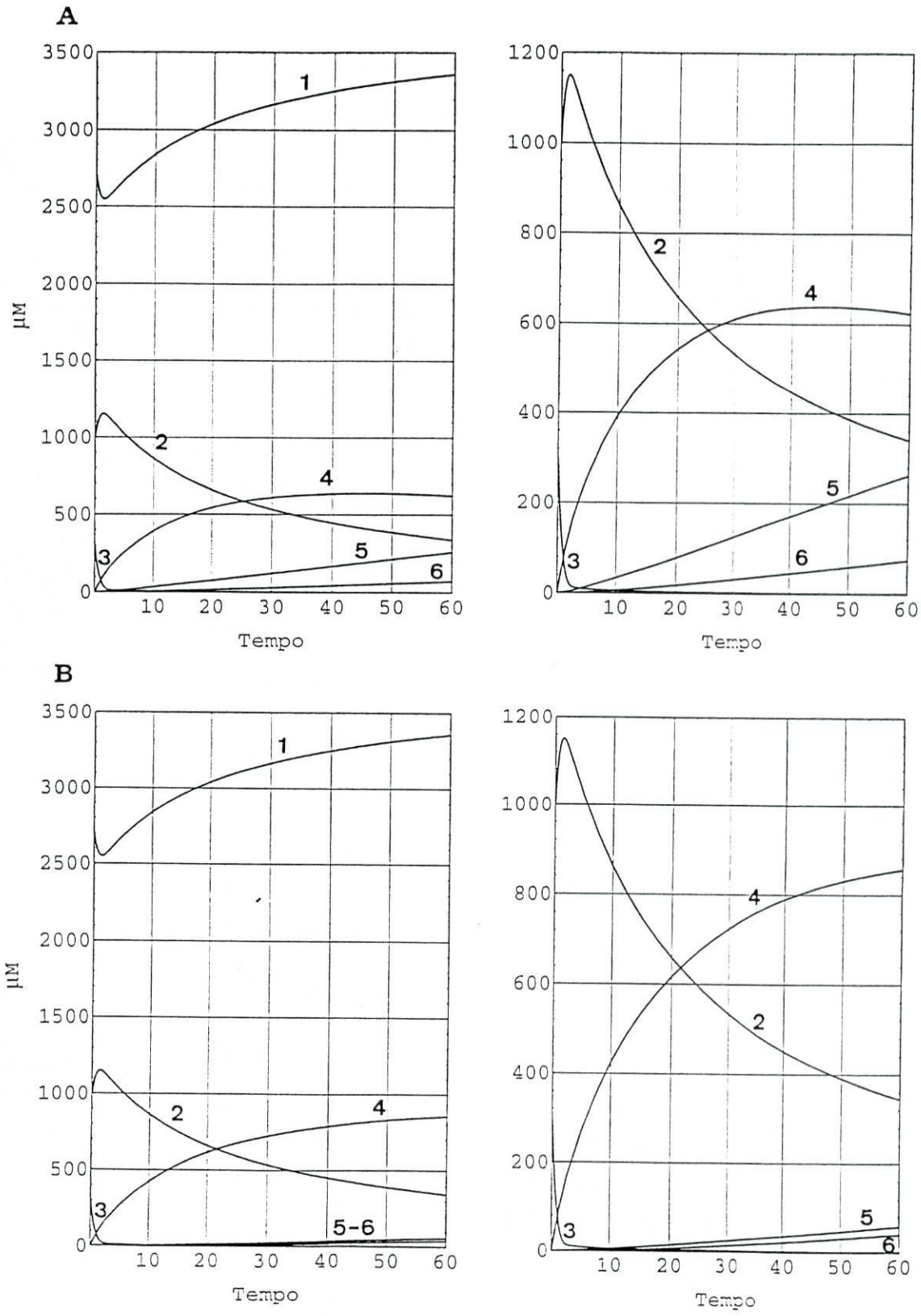


Fig. 59. Estudo teórico do efeito do Pi sobre o metabolismo dos nucleótidos da adenina e hipoxantina.

O estudo teórico do metabolismo dos nucleótidos de adenina e hipoxantina. na ausência (**A**) e na presença (**B**) de 2 mM de P_i, efectuou-se considerando os valores de C.A.=0,8, bem como, os valores das constantes cinéticas das enzimas intervenientes no processo, referidos na *Tabela 20*. Os resultados representam-se em duas escalas diferentes de concentração, 0 a 3500 (esquerda) e 0 a 1200 µM (direita).

(1, ATP; 2, ADP; 3, AMP; 4, IMP; 5, inosina; 6, hipoxantina).

Efeito do EDTA.

Sabia-se que o EDTA era um forte inibidor da enzima E_1, (Mallol e Bozal, 1983). Esta inibição é irreversível, sendo explicada pela acção exercida pelo EDTA sobre a estrutura proteica através de interações inespecíficas.

Como um modo adicional para analisar este efeito estudou-se o metabolismo de GMP (1 mM), na fracção citosólica de cérebro de rato, dialisada na presença e na ausência de 1 mM de EDTA. Os valores de velocidade calculados, na ausência e na presença de EDTA foram de13,4 mU/g e de 4,5 mU/mg, respectivamente. (*Fig. 60 A*).

Estes resultados podem ser simulados pelo Programa considerando a inibição total da enzima E_1, fazendo em consequência $V_{1GMP}=0$ (*Fig. 60 B*).

4.3. Comparação entre sequências de nucleótidos codificantes e respectivas sequências de aminoácidos da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica e de outras proteínas.

4.3.a. Pesquisa de sequências das 5'-nucleotídases (EC 3.1.3.5).

As sequências de nucleótidos dos genes codificantes para as enzimas, englobadas sob a designação genérica de 5'-nucleotídases, assim como, as respectivas proteínas codificadas pelos mesmos, foram obtidas através da pesquisa num banco de dados ("GenBank", Pearson e Lipman, 1988). O resultado desta pesquisa indica a existência de 5 sequências às quais correspondem distintos números de código de acesso à referida base de dados (*Tabela 25*).

4.3.b. Comparação entre sequências codificantes de nucleótidos e respectivas sequências de aminoácidos de distintas 5'-nucleotídases.

A análise comparativa entre as sequências de nucleótidos e das respectivas sequências de aminoácidos das distintas 5'-nucleotídases, descritas na *Tabela 25*, efectuou-se mediante o recurso a um programa de computador (GeneJockey). Os resultados desta análise podem ser representados graficamente num sistema de eixos coordenados, x e y (matriz), em que cada ponto nele contido representa a correspondência

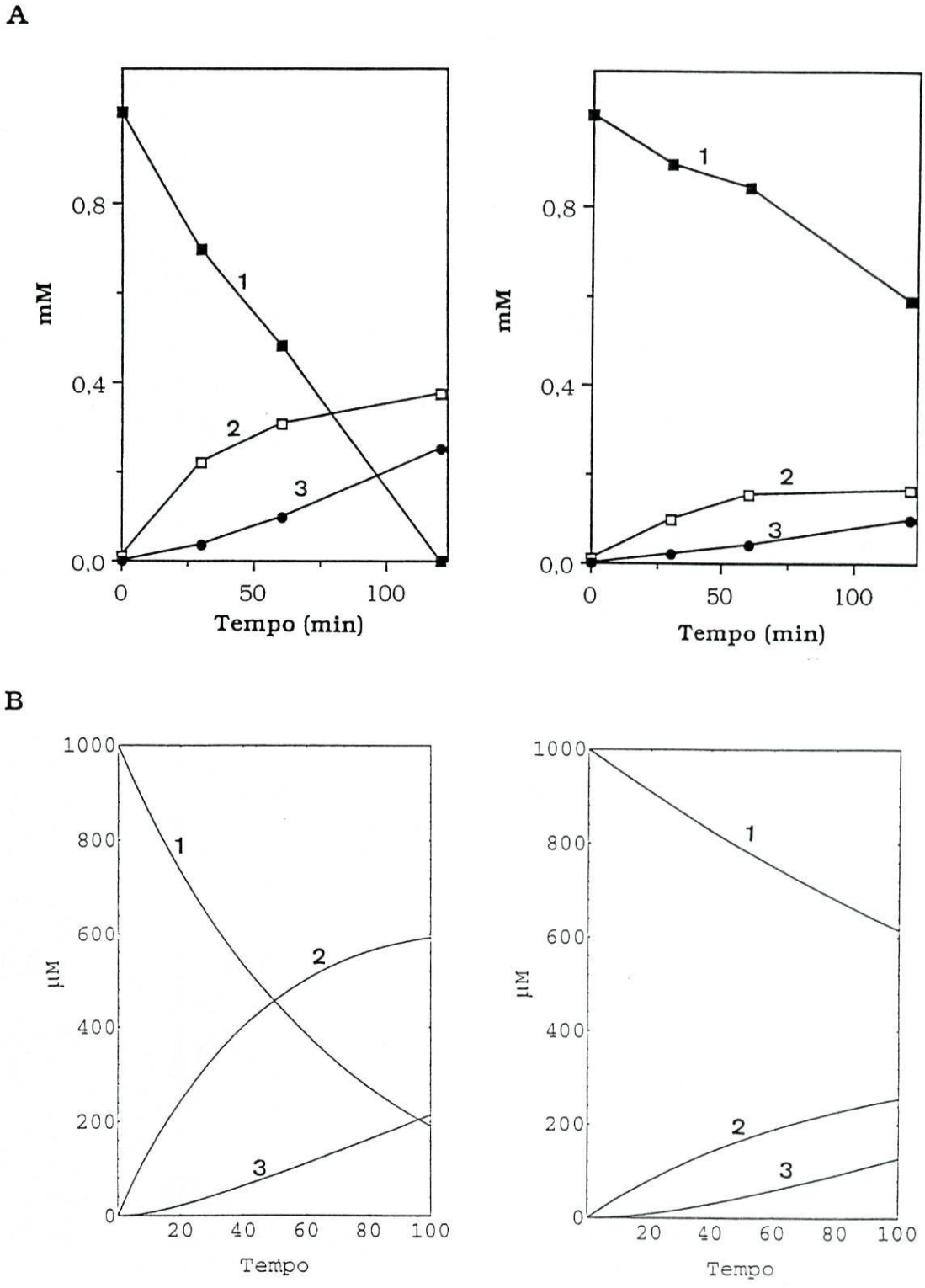


Fig. 60. Efeito do EDTA sobre o metabolismo do GMP.

A. O ensaio experimental foi efectuado incubando GMP em extracto de cérebro na ausência (esquerda) e na presença (direita) de 1 mM de EDTA., analisando-se alíquotas da mistura de reacção, ao fim dos tempos indicados, por HPLC (Material e Métodos). **B.** O ensaio teórico do metabolismo da degradação de GMP efectuou-se considerando os valores de velocidade determinados experimentalmente na ausência (esquerda) e presença de EDTA (direita). As restantes constantes cinéticas utilizadas encontram-se na *Tabela 20*.

(GMP (■, 1); guanosina (□, 2); xantina (●, 3))

Tabela 25. Família de 5'-nucleotídases (EC 3.1.3.5) sequenciadas, existentes no banco de dados "GenBank".

Nº de acesso	Definição	Palavras chave Comentários	Ref.
X55740	cDNA para 5'-nucleotídase humana	Membrana, Glicosilfosfatidilinositol-proteína	1,2
D38524	mRNA para 5'-nucleotídase humana	Citosólica,	3
X62278	mRNA para 5'-nucleotídase de *D.ommata*	"AMP-ase, Nucleotídase"	4,5
J05214	mRNA para 5'-nucleotídase de rato	5'-Nucleotídase, 5'-Ribonucleótido fosfohidrólase	6
D14541	mRNA bovina para 5'-nucleotídase	Glicosilfosfatidilinositol-proteína	7

Referências: 1. Misumi e col., 1990b; 2. Tkehara, Y., submetimento directo (23/10/1990); 3. Oka e col., 1994; 4. Volknandt e col., 1991; 5. Volknandt, W., submetimento directo (26/9/1991); 6. Misumi e col., 1990a; 7. Suzuki, 1993.

entre sequências de 10 nucleótidos ou aminoácidos idênticos de cada uma das proteínas em estudo. Quando se verifica similaridade ou identidade sequencial entre várias séries de nucleótidos ou de aminoácidos, criam-se zonas ou linhas mais ou menos contínuas e em posição diagonal cujo tamanho dependerá do grau de homologia entre essas mesmas sequências.

4.3.b.1. 5'-Nucleotídase de membrana humana (X55740) como termo de comparação.

A 5'-nucleotídase e membrana humana foi comparada com todas as 5'-nucleotídases tendo em conta as sequências de nucleótidos (*Fig. 61*) e correspondentes sequências de aminoácidos (*Fig. 62*) que já tinham sido descritas anteriormente.

No que respeita à sequência de nucleótidos:

(i) Não existe qualquer relação de semelhança ou identidade entre esta enzima e a de origem citosólica de placenta humana (*Fig. 61 A*).

(ii) Existe uma certa semelhança com a ecto 5'-nucleotídase (X62278), particularmente entre os nucleótidos em posição 300 e 1000 de ambos os genes *(Fig. 61 B)*.

(iii) A semelhança é muito maior com as 5'-nucleotídases J05214 e D14541 (*Fig. 61 C,D*).

No que respeita às sequências de aminoácidos:

(i) Não se observa nenhuma identidade com a 5'-nucleotídase citosólica (D38524) (*Fig. 62 A*).

(ii) A semelhança com a sequência X62278 é agora muito mais acentuada que no caso da sequência de nucleótidos codificantes (*Fig. 62 B*).

(iii) Existe uma certa identidade com as sequências J05214 e D14541 (*Fig. 62 C, D*).

4.3.b.2. 5'-Nucleotídase citosólica (D38524), como termo de comparação.

Neste caso não se observaram zonas de homologia entre as sequências de nucleótidos (Fig. 63) e dos respectivos aminoácidos (Fig. 64) desta enzima e das restantes 5'-nucleotídases.

Esta falta de homologia pode relacionar-se com as diferentes origens das enzimas em estudo. De facto, verifica-se que, com a excepção da 5'-nucleotídase de origem citoplasmática, todas as outras enzimas são

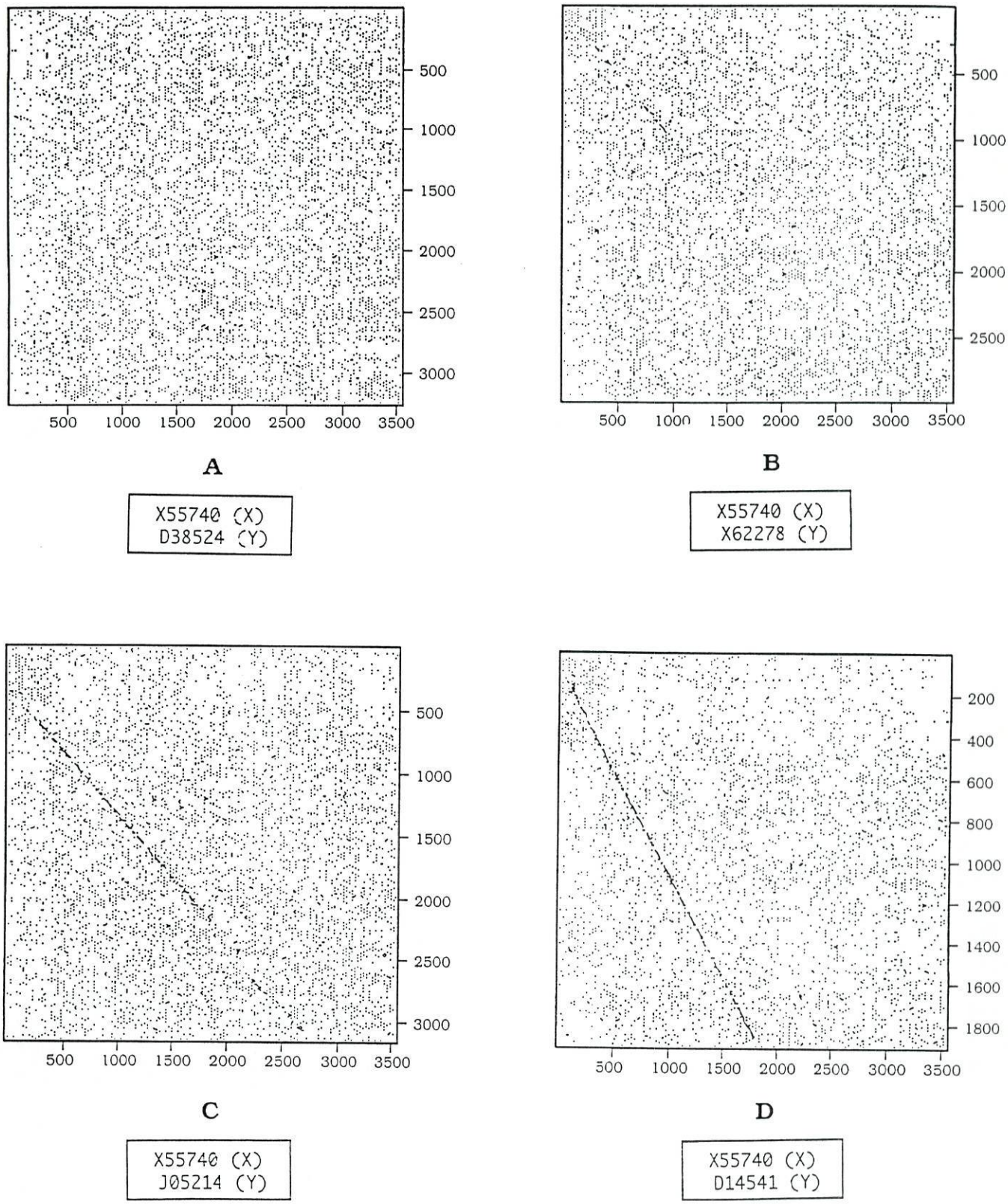


Fig. 61. Comparação entre as sequência de nucleótidos codificantes para a 5'-nucleotídase de membrana (X55740) e para outras 5'-nucleotídases (D38524, X62278, J05214 e D 14541). Representação gráfica em matriz.

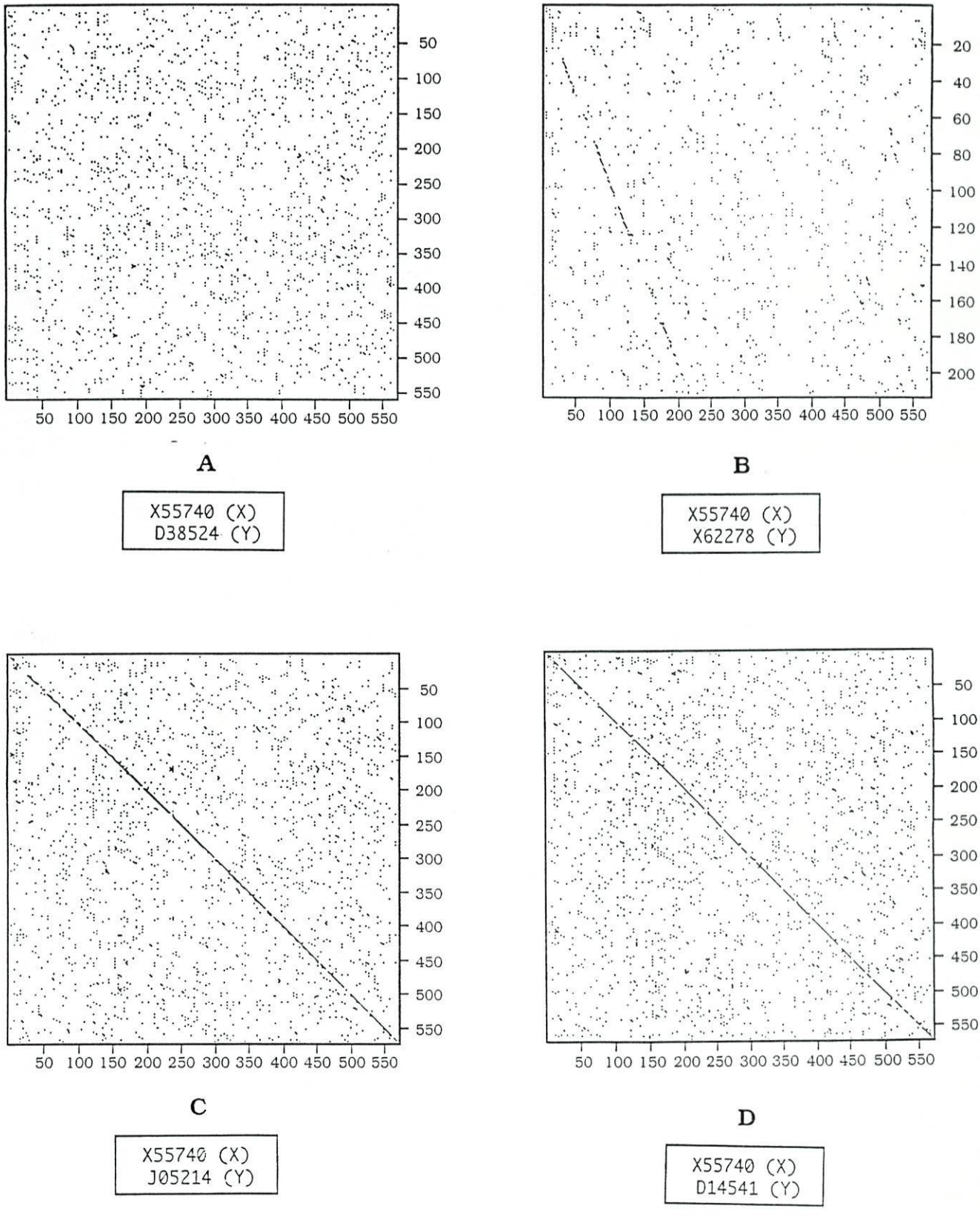
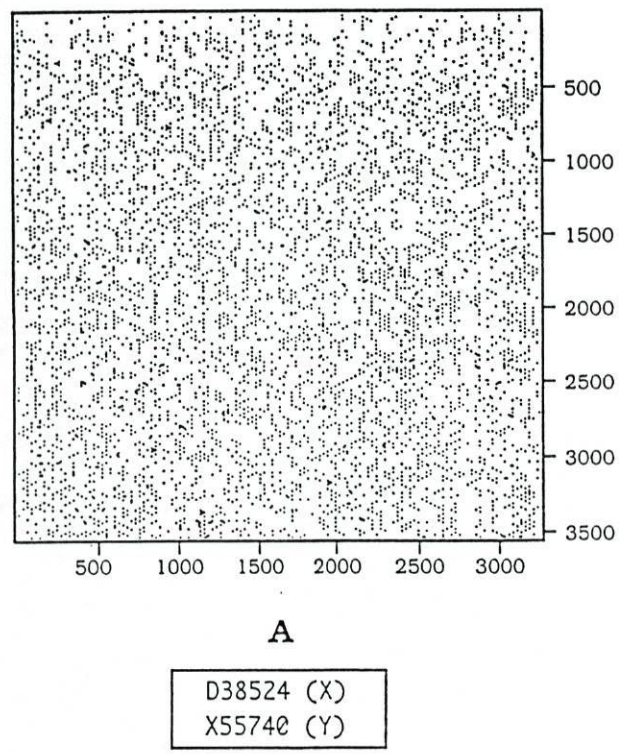
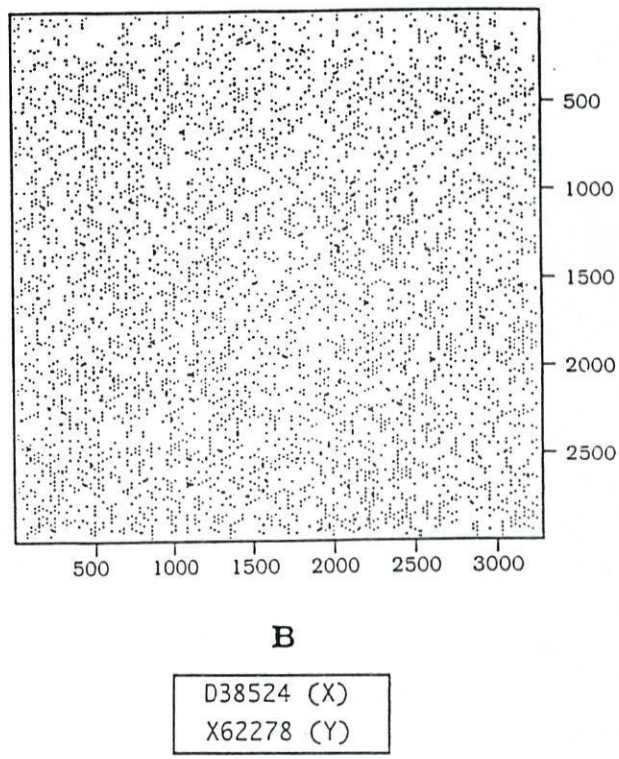
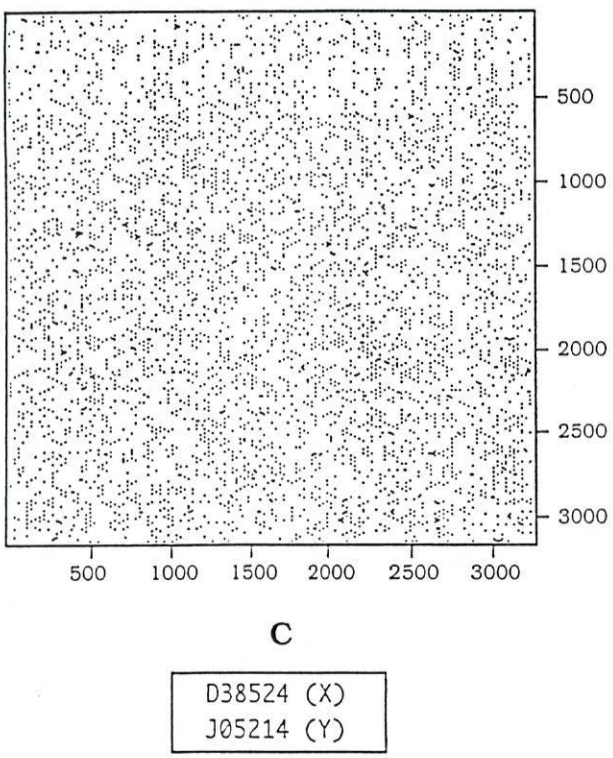


Fig. 62. Comparação entre as sequência de aminoácidos da 5'-nucleotídase de membrana (X55740) e de outras 5'-nucleotídases (D38524, X62278, J05214 e D 14541). Representação gráfica em matriz.







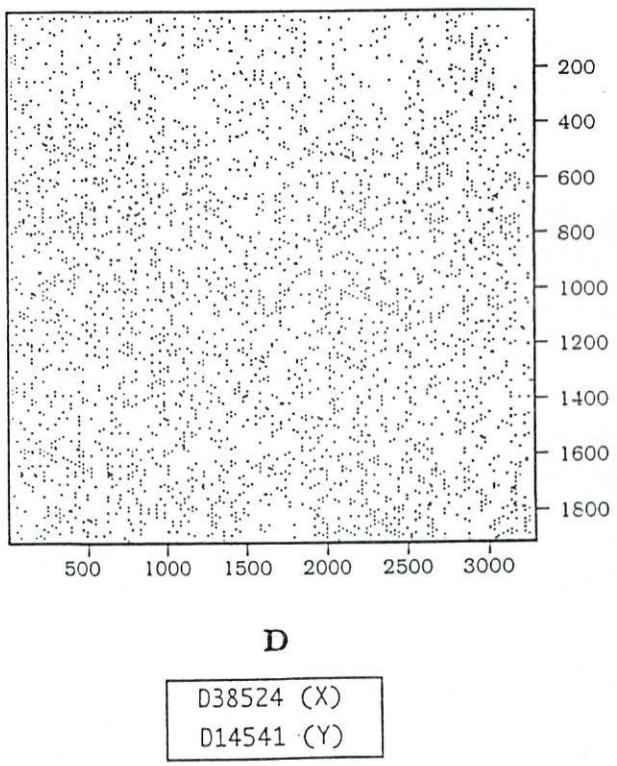
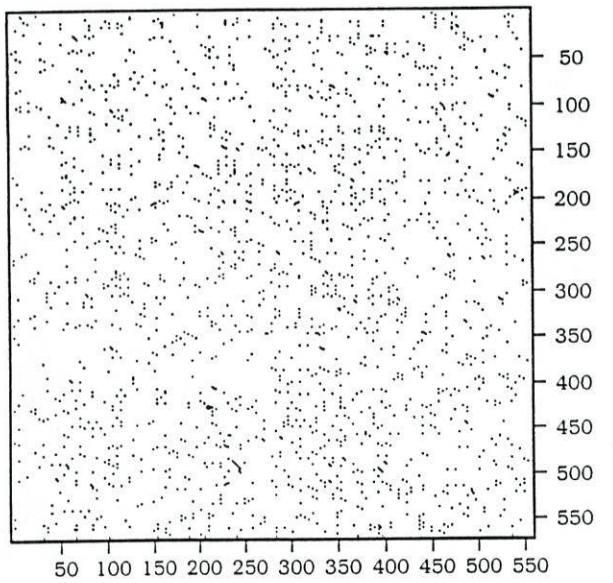
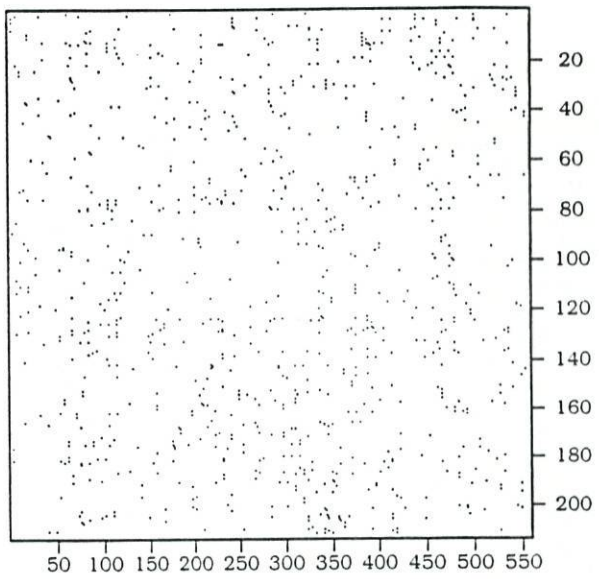


Fig. 63. Comparação entre as sequência de nucleótidos codificantes para a 5'-nucleotídase citosólica (D38524) e para outras 5'-nucleotídases de origem distinta (X55740, X62278, J05214 e D14541). Representação gráfica em matriz.



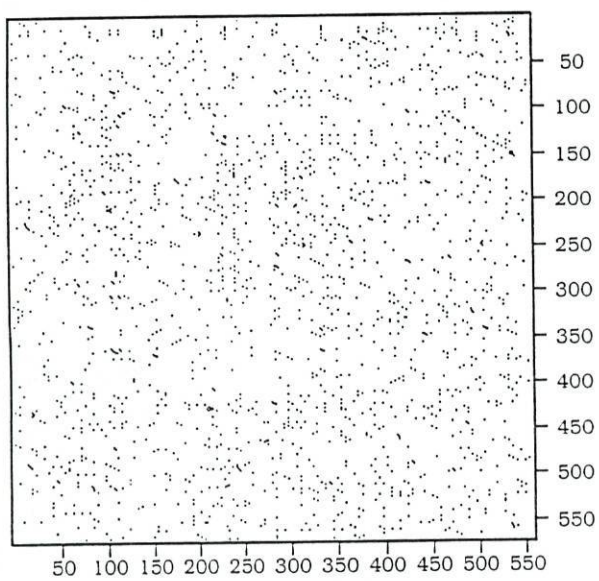
A

D38524 (X)
X55740 (Y)



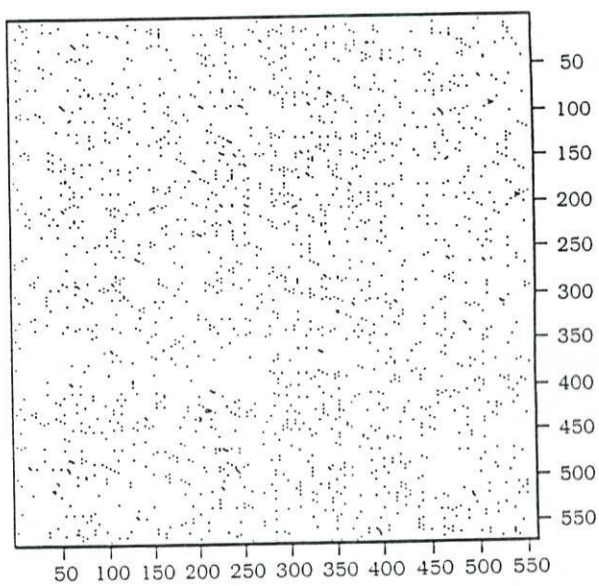
B

D38524 (X)
X62278 (Y)



C

D38524 (X)
J05214 (Y)



D

D38524 (X)
D14541 (Y)

Fig. 64. Comparação entre as sequências de aminoácidos da 5'-nucleotídase citosólica (D38524) e de outras 5'-nucleotídases de origem distinta (X55740, X62278, J05241 e D14541). Representação gráfica em matriz.

enzimas membranares ou possuem o grupo glicosil-fosfatidilinositol (GPI), sugestivo de uma origem membranar.

4.3.c. 5'-Nucleotídase citosólica (D38524): estudo da sua homologia com outras proteínas.

Dado o interesse desta enzima para este trabalho procedeu-se a um estudo algo mais detalhado da sua sequência de nucleótidos codificantes *(Fig. 65)* e da correspondente sequência de aminoácidos (*Fig. 66).*

Da análise destas sequências podem fazer-se algumas considerações:

1. Enquanto que a sequência de nucleótidos do fragmento de DNA, recolhido sob o número de acesso D38524, se compõe de 3256 nucleótidos, a proteína correspondente contém apenas 561 aminoácidos, isto é, um número de aminoácidos menor do que o que corresponderia àquele segmento de nucleótidos. O primeiro quadro de leitura aberto do segmento localiza-se no tripleto ATG, situado entre os nucleótidos 84-86. A partir deste ponto a proteína continua até o tripleto GAA (nucleótidos 1764-1766).

```
MSTSWSDRLQ NAADMPANMD KHALKKYRRE AYHRVFVNRS LAMEKIKCFG
FDMDYTLAVY KSPEYESLGF ELTVERLVSI GYPQELLSFA YDSTFPTRGL
VFDTLYGNLL KVDAYGNLLV CAHGFNFIRG PETREQYPNK FIQRDDTERF
YILNTLFNLP ETYLLACLVD FFTNCPRYTS CETGFKDGDL FMSYRSMFQD
VRDAVDWVHY KGSLKEKTVE NLEKYVVKDG KLPLLLSRMK EVGKVFLATN
SDYKYTDKIM TYLFDFPHGP KPGSSHRPWQ SYFDLILVDA RKPLFFGEGT
VLRQVDTKTG KLKIGTYTGP LQHGIVYSGG SSDTICDLLG AKGKDILYIG
DHIFGDILKS KKRQGWRTFL VIPELAQELH VWTDKSSLFE ELQSLDIFLA
ELYKHLDSSS NERPDISSIQ RRIKKVTHDM DMCYGMMGSL FRSGSRQTLF
ASQVMRYADL YAASFINLLY YPFSYLFRAA HVLMPHESTV EHTHVDINEM
ESPLATRNRT SVDFKDTDYK RHQLTRSISE IKPPNLFPLA PQEITHCHDE
DDDEEEEEEE E
```

Fig. 65. Sequência de aminoácidos da 5'-nucleotídase citosólica de placenta humana (D38524)

CGCGCGTTGA GGCGGCTGCA GCAGTTGCGC GCTGGGATTG TTGCGGTGCG
CTGGAGCCGA ATACAAAATA CAGTTAAAAT AAAATGTCGA CCTCCTGGAG
TGATCGGTTA CAGAATGCAG CAGATATGCC TGCTAACATG GATAAGCATG
CCCTGAAAAA GTATCGTCGA GAAGCCTATC ATCGGGTGTT TGTGAACCGA
AGTTTAGCAA TGGAAAAGAT AAAGTGTTTT GGTTTTGATA TGGATTATAC
CCTTGCTGTG TACAAGTCCC CAGAGTATGA GTCCCTTGGT TTTGAGCTTA
CTGTGGAGAG ATTAGTTTCT ATTGGCTATC CCCAGGAGTT GCTCAGCTTT
GCTTATGATT CTACATTCCC TACCAGGGGA CTTGTCTTTG ACACACTGTA
TGGAAATCTT TTGAAAGTCG ATGCCTATGG AAACCTCTTG GTCTGTGCAC
ATGGATTTAA CTTTATAAGG GGACCAGAAA CTAGAGAACA GTATCCAAAT
AAATTTATCC AGCGAGATGA TACTGAAAGA TTTTACATTC TGAACACACT
ATTCAACCTA CCAGAGACCT ACCTGTTGGC CTGCCTAGTA GATTTTTTTA
CTAATTGTCC CAGATATACC AGTTGTGAAA CAGGATTTAA AGATGGGGAC
CTCTTCATGT CCTACCGGAG TATGTTCCAG GATGTAAGAG ATGCTGTTGA
CTGGGTTCAT TACAAGGGCT CCCTTAAGGA AAAGACAGTT GAAAATCTTG
AGAAGTATGT AGTCAAAGAT GGAAAACTGC CTTTGCTTCT GAGCCGGATG
AAGGAAGTAG GGAAAGTATT TCTTGCTACC AACAGTGACT ATAAATATAC
AGATAAAATT ATGACTTACC TGTTTGACTT CCCACATGGC CCCAAGCCTG
GGAGCTCCCA TCGACCATGG CAGTCCTACT TTGACTTGAT CTTGGTGGAT
GCACGGAAAC CACTCTTTTT TGGAGAAGGC ACAGTACTGC GTCAGGTGGA
TACTAAAACT GGCAAGCTGA AAATTGGTAC CTACACAGGG CCCCTACAGC
ATGGTATCGT CTACTCAGGA GGTTCTTCTG ATACGATCTG TGACCTGTTG
GGAGCCAAGG GAAAAGACAT TTTGTATATT GGAGATCACA TTTTTGGGGA
CATTTTAAAA TCAAAGAAAC GGCAAGGGTG GCGAACTTTT TTGGTGATTC
CTGAACTCGC ACAGGAGCTA CATGTCTGGA CTGACAAGAG TTCACTTTTC
GAAGAACTTC AGAGCTTGGA TATTTTCTTG GCTGAACTCT ACAAGCATCT
TGACAGCAGT AGCAATGAGC GTCCAGACAT CAGTTCCATC CAGAGACGTA
TTAAGAAAGT AACTCATGAC ATGGACATGT GCTATGGGAT GATGGGAAGC
CTGTTTCGCA GTGGCTCCCG GCAGACCCTT TTTGCCAGTC AAGTGATGCG
TTATGCTGAC CTCTATGCAG CATCTTTCAT CAACCTGCTG TATTACCCTT
TCAGCTACCT CTTCAGGGCT GCCCATGTCT TGATGCCTCA TGAATCAACG
GTGGAGCACA CACACGTAGA TATCAATGAG ATGGAGTCTC CTCTTGCCAC
CCGGAACCGC ACATCAGTGG ATTTCAAAGA CACTGACTAC AAGCGGCACC
AGCTGACACG GTCAATTAGT GAGATTAAAC CTCCCAACCT CTTCCCACTG
GCCCCCCAGG AAATTACACA CTGCCATGAC GAAGATGATG ATGAAGAGGA
GGAGGAGGAG GAAGAATAAG GAGGAAAACC AAAACCCCAA GCACCCATTA
AACAAGTCCT GGCAGGACTC ACAGGAACAA ACGAGGTCCC TGTTAGGGTT
CTACTCGGGG GAGGGAGGGG GCTCCATGAA AGGTACGTCT GAAAAGTTTC
TGAAGATTTT ATTATCATAG ATACTTGTTT TGGTTTTGTG TATCTGTACT
CTCTGCAGAT GGTCCAAAAT TGTAATGGAG TCTGTATTAG AAGAAAATAA
GGGTAAAATC AGGCTGAACT GCATGTATAT GGCTCCACTG TGGCTTGTGA
CACTTTTAAA ATCATCCGTA TGTCAGTGTA TCTGGATACA CGAGGAAAAG
GAAAGAGTCT CAGAGTGGAA CAAAGAGTGG GAAGAGGTGA TCTGTAATGT
TACAAATTGT GCTATTACTC CAAGGTCCAA CTTTTCCAGT GCATTACATG
GTATTGTATA TCAGTGGAGA AATGTATTAT TTCCATGATC AAATGTAGTC
TCTGTTAAGG TCAAGTTTTC TTTTATAAGC CTTTAATTCA TCCTCAGTGA
CTCTGGCAAG GCTGCTTCTC TATCACTGGC TTTGCACAGA AGTATGCTCT
ACTTGCGTTG CTTTAGGGCA GGATTCTATT TTGAGGGAAA AGACAGTATC
CTTATTACCT TTTGTTTGTT TAATAGCACA AATGCTTATT TGTTATCCAA
AAACAACCTC CTTCTTATCT GTGATAAATC TATAGAAAGA ATTTAGCTGC
AAGTGGACAA AGGAACAAGC CCCCAGAAAA GAAAGGGAAG AACTGCCTTC
TTATACTACA GAACATGCAT TAGTGTGGGC TATATAGCTG TGGCTCATGC
TACCCAATTC CAGATTTCTT TGTCCTCTAA GAGTTGATTG CTGTATATTA
AAATTGAACA TCAGAGGATG GGAAGAGGGC TCTGTAAGCC AGAACCTTAC
TAAAGTAGAG GGCACAATCA GTGTGAATAA ATCCACTTCA GAATCTCAAG
TCAAGGCCAG GCACGGCGGC TCACGCCTGT AATCCCAGCA CTTTGGGAGG
CCGAGACAGG CGGATCACCT GAGGTCGGGA GTTCGAGACC AGCCTTACCA
ACATGGAGAA ACCCCATCTC TACTAAAAAT ACAAAATTAC CTGGGCGTGG
TGGTGCATGC CTGTAATCCC ATCATCTACT CAGGAGGCTG AGGCAGGAGA
ATTGCTTGAA CCCAGGAGGC GGAGGTTGCA GTGAGCCAGG ATTGTGCCAT
TGCACTCCAG CCTGGGCAAC AAGAACAAAA CTCCATCTCA AAAAATAAAA
ATCCCAATCC CAAGTCGAAA TCACCTCTTG TTTTAAACAA GAATGAATCA
TTACTGTGTA TGTTAGGGTA TTAAAACTGT TTCACCAGTA CAGTGAAAGT
TGTTTCAACA TTTTAAACAA ACAGTGGTTA TAGACTCTTT CTTTAACCAT
TGTATATTTT CTTCCATTCT TGTCATTGGT CAATAGGGGA GGGTAGATTA
GCTGCT

Fig. 66. Sequência de nucleótidos codificantes para a 5'-nucleotídase citosólica de placenta humana (D38524).

2. Ressalta a presença de 13 resíduos carregados - glutamato (E) e aspartato (D) - na sua extremidade carboxílica final, salientando-se, de um modo particular, uma sequência de 8 glutamatos terminais. Estes 13 resíduos carregados correspondem à sequência GAC GAA GAT GAT GAT GAA GAG GAG GAG GAG GAG GAA GAA que constitui o fragmento 1728-1766 da sequência de nucleótidos.

3. Considerando a presença de poliglutamato na extremidade carboxílica da proteína pesquisou-se, através do programa "retrieve" de proteínas, a presença deste fragmento em outras proteínas, tendo-se verificado a sua presença em uma grande variedade de proteínas. Resultados parecidos obtiveram-se quando a pesquisa se efectuou através da sequência de nucleótidos 1728-1788 que codificam o fragmento de poliglutamato-aspartato terminal. Não se detalham os resultados destas pesquisas já que se afastam do objectivo deste trabalho.

Não obstante, o facto de a 5'-nucleotídase citosólica conter na sua extremidade carboxílica estes resíduos ácidos, permitiu, por um lado, tentar a produção de um anticorpo contra o poliglutamato (ver Considerações finais) e, por outro, a observação de uma franca homologia com o receptor da proteína A do surfactante pulmonar (SP-A) (n° de acesso L10124), como a seguir se verá.

4.3.c.1. Estudo comparativo entre a 5'-nucleotídase citosólica e o receptor da SP-A.

Dada a analogia entre esta última proteína e a 5'-nucleotídase decidiu-se comparar, na sua totalidade, as respectivas sequências de nucleótidos e as correspondentes sequências de aminoácidos (*Fig. 67*).

Como se pode observar existem zonas de grande homologia entre as sequências de nucleótidos codificantes para a 5'-nucleotidase citosólica (D38524) e para o receptor específico da SP-A (L10124), sensivelmente entre os nucleótidos em posição de cerca de 1200 e 2800 e 50 e 1600, respectivamente (*Fig. 67 A*). A análise das sequências de aminoácidos (*Fig. 67 B*), contudo, é mais elucidativa, observando-se homologia entre os resíduos de aminoácidos situados sensivelmente entre as posições 400 e 560 (D38524) e entre 0 e 130 (B48516).

Comparando os aminoácidos de cada uma das sequências peptídicas destas proteínas (*Fig. 68*), observou-se uma identidade absoluta entre os

primeiros 132 resíduos da sequência do receptor da SP-A (1-132) e os últimos 132 da sequência da enzima citosólica (430-561).

O que é o receptor da Proteína A do surfactante do pulmão (SP-A)?

O surfactante pulmonar é um complexo lipoproteico produzido e secretado pelas células tipo II dos alvéolos que intervem na diminuição e na manutenção de uma baixa tensão superficial na interface ar/líquido intra-alveolar, evitando o seu colapso após a expiração (Kuroki e Akino, 1991).

É constituido por cerca de 90% de fosfolípidos (particularmente a fosfatidilcolina e o fosfatidilglicerol), e 10% de proteínas. Entre as várias proteínas presentes no surfactante pulmonar, as SP-A, SP-B, SP-C e SP-D são as 4 proteínas mais conhecidas, sendo a primeira, o seu mais abundante componente proteico (Casals e col., 1993; Rubio e col., 1995).

A SP-A é uma glicoproteína, octadecamérica, polimórfica, cujo peso molecular do seu monómero se situa entre 29-36 kDa (Kuroki e col., 1988; Kuroki e Akino, 1991; Casals e col., 1993; Strayer e col., 1993; Rubio e col., 1995).

Além de promover a interacção entre fosfolípidos, a transformação dos corpos lamelares secretados em mielina tubular dentro dos alvéolos, e de estar implicada em mecanismos de defesa (opsonização e promoção da fagocitose), a SP-A actua como proteína reguladora da secreção do surfactante, inibindo a secreção fosfolipídica. Esta acção é mediada pela alta afinidade desta proteína para um receptor específico, constituído por 284 aminoácidos, presente na membrana das células tipo II dos alvéolos (Kuroki e col., 1988; Kuroki e Akino, 1991).

Foram precisamente as sequências codificantes e peptídicas deste receptor membranar o objecto de estudo comparativo com as correspondentes sequências da enzima 5'-nucleotídase citosólica.

Observando-se esta homologia e aceitando a ligação da SP-A ao seu receptor específico, sugere-se a possibilidade de a proteína SP-A poder inter-reagir com a 5'-nucleotídase citosólica tendo como consequência uma diminuição da sua actividade enzimática. Como estes estudos estão fora do alcance deste trabalho, refere-se apenas, como uma hipótese merecedora de um estudo mais aprofundado.

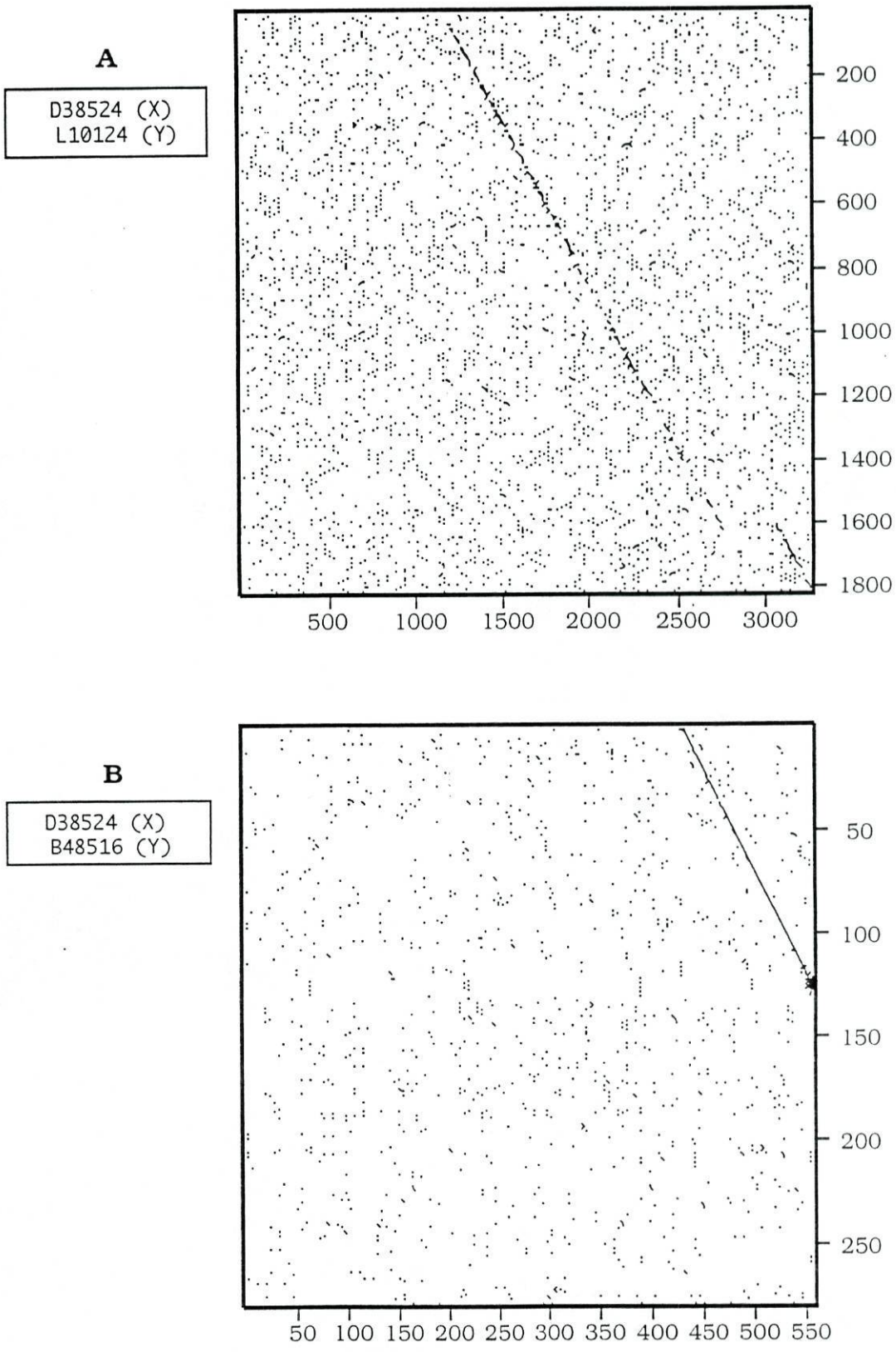


Fig. 67. Representação gráfica de matrizes de comparação entre sequências de (A) nucleótidos codificantes para a 5'-nucleotídase citosólica (D38524) e para o receptor da SP-A (L10124) e, (B) de aminoácidos da 5'-nucleotídase citosólica (D38524) e o receptor do SP-A (B48516).

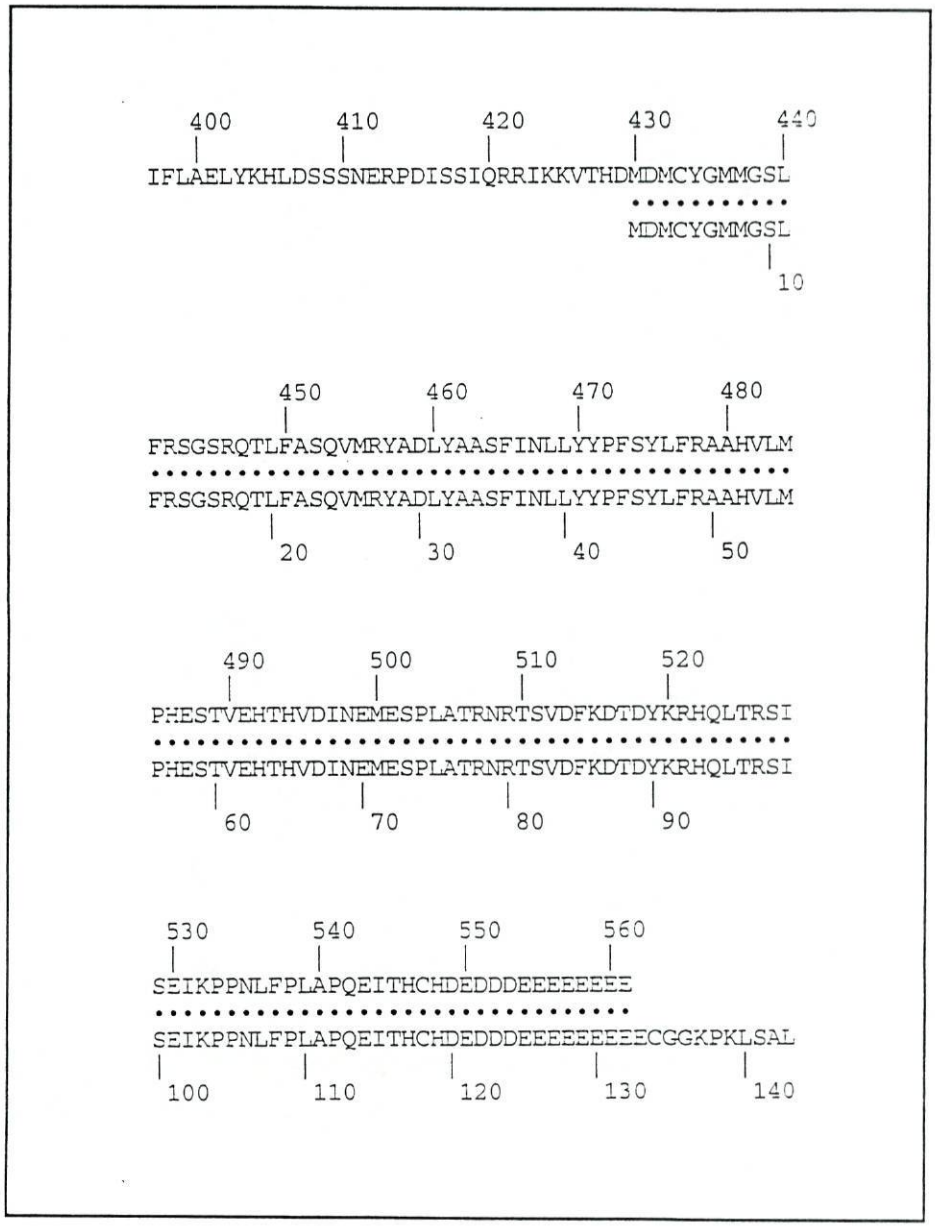


Fig. 68. Comparação entre as sequências peptídicas da 5'-nucleotídase citosólica (D38524) e do receptor da proteina A do surfactante pulmonar (SP-A) (B48516).

Os pontos a negro representam identidade de aminoácidos, que se verifica entre os resíduos de aminoácidos 430 e 561 da 5'-nucleotídase citosólica (D38524) e entre os resíduos 1 e 132 do receptor da SP-A (B48516).

5. Considerações finais

Com se referiu no capítulo da Introdução existem várias enzimas com actividade 5'-nucleotidásica, presentes em quase todos os tecidos. Estas enzimas diferem na especificidade para o substrato, na distribuição subcelular, no efeito que exercem os catiões sobre essas actividades, etc. No entanto, apesar de desempenharem funções relevantes no metabolismo de nucleótidos, não está ainda devidamente esclarecido o papel que cada uma delas desempenha no control dos níveis de adenosina, níveis esses que ajudam a regular uma enorme quantidade de funções biológicas. Parecia, portanto, fundamental, ter um melhor conhecimento das enzimas que regulam a síntese deste nucleósido. Quando se iniciou este estudo, e, contrariamente, ao verificado relativamente aos níveis e distribuição de adenosina (WojciK e Neff, 1982; Braas e col., 1986), o cérebro de rato era um dos tecidos menos estudados quanto a actividades 5'-nucleotidásicas. Em consequência, pareceu ser de todo o interesse analisar as 5'-nucleotídases solúveis de cérebro de rato, responsáveis pela hidrólise intracelular dos nucleósidos monofosfatos.

Como se mencionou anteriormente, o grupo de Bozal descreveu, em 1981 (Franco e col., 1981), a presença no cérebro de rato de uma actividade 5'-nucleotídase solúvel de alta afinidade para o AMP (K_m = 24 μM), não dependente da presença de iões Mg^{2+} para a sua actividade e inibida por ATP e ADP. Mais recentemente, Orford e Saggerson (1996) purificaram do cérebro de rato uma actividade citosólica com caracteristicas cinéticas similares à anterior (trata-se provavelmente da mesma actividade) e mostraram que a proteína purificada possuía um resíduo de fosfatidilinositol. Esta actividade, pese a encontrar-se na fracção solúvel, pode ter como origem a enzima membranar, quer pela acção sobre esta exercida por fosfolípases quer como resultado de uma solubilização parcial da membrana (ver Introdução).

Se bem que esta 5'-nucleotídase solúvel, com alta afinidade para o AMP, pareça ser, em princípio, uma enzima chave para a produção de adenosina no citoplasma, o facto de ser fortemente inibida pelo ATP (K_i da ordem de micromolar) sugere um contributo pouco significativo, como actividade geradora desse nucleósido.

Ao iniciar este trabalho, o grupo de Sillero tinha já evidências indirectas da existência, no cérebro de rato, de uma actividade 5'-nucleotídase distinta da mencionada anteriormente, e que se tratava, possivelmente, da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica, estimulada pelo ATP e Ap4A e descrita em outros tecidos (Pinto e Fernández, 1987). Neste trabalho propôs-se, em primeiro lugar, purificá-la à homogeneidade e

caracterizar a sua actividade no cérebro. Em segundo lugar, estudar o metabolismo de nucleótidos, em presença da fracção citosólica de cérebro de rato, bem como, do AMP, em presença de concentrações fisiológicas de ADP e ATP.

A confirmação da existência de uma 5'-nucleotídase, activada pelo Ap_4A, na fracção citosólica de cérebro de rato, foi obtida, quando, essa fracção foi cromatografada numa coluna de exclusão molécular. Nas fracções recolhidas foram ensaiadas as actividades 5'-nucleotidásicas depois de uma prévia incubação na presença e na ausência de EDTA, composto que inibe a 5'-nucleotídase de alta afinidade para o AMP (Franco e col., 1981; Mallol e Bozal, 1983). Como se observa na *Fig. 5*, a incubação na presença de EDTA deslocou a actividade activada pelo Ap_4A, três fracções para a direita, com respeito à actividade determinada na ausência de EDTA.

Confirmada a presença no citosol de cérebro de rato da actividade 5'-nucleotídase activada por este dinucleósido polifosfato (Ap_4A) procedeu-se à sua purificação. Numa primeiro etapa, e com base em esquemas de purificação desenvolvidos por outros, para a enzima de fígado de rato, e pelo grupo de Sillero, para a enzima de *Artemia*, estabeleceram-se as condições mais adequadas para a purificação da enzima de cérebro. O resultado final encontra-se na *Tabela 4*.

Os dados mais importantes a destacar neste processo de purificação são os seguintes:

(i) A actividade IMP/GMP específica total recuperada no citoplasma de cérebro de rato (sobrenadante de 150 000 x *g*) foi de 66 mU/g de cérebro ou de 5 mU/mg de proteína. Este último valor é muito similar aos encontrados para esta actividade no fígado de rato (6 mU/mg (Itoh, 1981)) e no pulmão de porco (4,8 mU/mg (Itoh e Yamada, 1990)).

(ii) A diferença mais significativa encontrada, durante a purificação da enzima de cérebro, em relação a outras purificações descritas, foi o facto de, estas não mencionarem a obtenção de distintos picos de actividade quando se empregam colunas de fosfocelulose ou de afinidade, como ocorre com a enzima de cérebro (ver *Fig. 7*, *Fig. 11* e *Fig. 12*). Unicamente Bontemps e col. (1988), ao estudarem as actividades 5'-nucleotídase em eritrócitos humanos, referem a obtenção de dois picos de actividade, ao aplicar em coluna de DEAE-Trisacryl hemolizados de sangue "outdate" (caducado), picos esses que se interconvertiam quando se procedia a uma pré-incubação do hemolizado com 2 mM de 2,3-DPG. No caso presente, a pré-incubação com 2,3-DPG (resultados não apresentados) não teve o

mesmo efeito. Contudo, quando se recromatografaram, serparadamente, os picos I e II da coluna de afinidade de Dyematrex Green A (*Fig. 13*), cada um deles deu novamente origem aos picos I e II. Ambos os picos davam lugar a uma mesma banda, de aproximadamente 52 kDa, quando se analisaram por electroforese em gel, em condições desnaturantes.

De igual modo, ao estudar o comportamento da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica de distintos tecidos de rato, em coluna de afinidade (Dyematrex Green A) (ponto 4.2.i), encontrou-se que, em todos eles, esta actividade eluía em dois picos, cujo quociente (I/II) estava compreendido entre 1,2 e 2 (com excepção dos testículos). Neste estudo, incluíu-se também a enzima de cistos de *Artemia*, já que nesse estádio, a *Artemia* possui apenas uma actividade proteolítica vestigial. Apesar de tudo, o quociente de actividade entre os picos I e II foi, igualmente, de 2. Parece, pois, ser altamente improvável que, os distintos picos de actividade que se obtêm durante a cromatografia, tanto em coluna de fosfocelulose como de afinidade, se devam a artefactos proteolíticos, devendo corresponder, antes sim, a agregados da enzima. De facto, a facilidade da enzima de formar agregados, observou-se ao tentar determinar o peso molecular da mesma, no estado nativo, por filtração em gel (ver *Fig. 20*).

No entanto, é muito dificil descorar completamente a hipótese de, ao longo do processo de purificação, a enzima não sofrer ataques proteolíticos. Na realidade, durante os estudos efectuados para determinação da massa molecular, observou-se de uma forma sistemática, que à medida que aumentava o grau de purificação da enzima, menor era esse valor. Este facto, sugere que em algum passo desse processo a enzima sofre proteólise. Do mesmo modo, o valor de 52 kDa determinado para as sub-unidades, pode ser o resultado desses mesmos fenómenos. De facto, essa possibilidade encontra-se descrita na literatura, alicerçada pelo facto de a mesma enzima, tratada segundo condições e metodologias diferentes, apresentar valores de massa molecular das suas subunidades, igualmente diferentes (Oka e col., 1988).

Os estudos realizados sobre as propriedades cinéticas da enzima purificada, assim como, a sua dependência de metais, fazem com que a enzima de cérebro seja indistinguível da de outras fontes.

Como já se mencionou anteriormente no capítulo de Introdução, a activação da enzima pelo ATP e GTP (Van den Berghe e col., 1977), e pelo 2,3-DPG (Bontemps e col.,1988), ocorre quando em concentrações da ordem de milimolar, Em 1986, Pinto e col. descreveram o efeito estimulador da diadenosina tetrafosfato em concentrações 100 vezes mais

baixas. Neste trabalho estudaram-se, comparativamente, como efectores da enzima, todos os diadenosina polifosfatos (Ap_nA) comerciais ($2 \leq n \leq 6$). Aproveitando os conhecimentos que se dispunham para sintetizar heterodinucleósidos tetrafosfatos, sintetizaram-se e ensaiaram-se os compostos recolhidos na *Tabela 14*: Ap_4A, Ap_4G, Ap_4I, Ap_4C, Ap_4U, Ap_4X, $Ap_4\varepsilon A$, $ddAp_4A$. Pelos resultados obtidos, e como se comenta no ponto 4.1.d.8.f., o Ap_4A resultou ser melhor activador que qualquer um dos outros heteroderivados ensaiados. A substituição de uma das adeninas por uma purina distinta (G, X ou I), diminuia o efeito activador; se era substituída por uma pirimidina (U ou C) o dinucleótido resultante já não era activador. Outras modificações, como a eliminação dos grupos OH em posição 2' e 3' de uma das ribose, ou a introdução de um grupo eteno numa das moléculas de adenina, eliminava o efeito activador do composto resultante.

Estudando o efeito dos diadenosina polifosfatos sobre a enzima, observou-se que à medida que aumentavam o seu número de fosfatos internos, mais efectivos se tornavam estes compostos como activadores da enzima. Estes resultados sugeriram que a própria cadeia de fosfatos, independentemente dos extremos de adenosina, podia, igualmente, actuar como efectores da reacção. Para isso, ensaiaram-se o efeito dos polifosfatos comerciais, Type 5 e Type 15 (Sigma), com um comprimento de cadeia de fosfatos de 5 ± 2 e 18 ± 3, respectivamente. De acordo com os resultados inicialmente obtidos, enquanto que o P_5 não exercia um efeito activador sobre a enzima, o P_{15} resultou ser tão activador como os polifosfatos de diadenosina, mas com uma constante de activação (K_a) menor. Dado que, os produtos comerciais P_5 e P_{15} são, na realidade, uma mistura de polifosfatos de distinto comprimento de cadeia, pareceu conveniente analisar a sua composição, antes de tirar quaisquer conclusões em definitivo. Para isso, apuraram-se métodos cromatográficos de separação de fosfatos, utilizando uma coluna de DEAE-celulose e uma eluição com um gradiente de bicarbonato de amónio. A identidade dos polifosfatos eluidos em cada fracção determinou-se mediante os seguintes procedimentos:

i) Calculou-se o fósforo total em todas as fracções, hidrolizando os polifosfatos (P_n) mediante tratamento prévio com fosfatase alcalina, ou por hidrólise em meio ácido (ver Material e Métodos) obtendo-se, desta forma, o perfil cromatográfico de eluição dos preparados comerciais P_5 e P_{15}.

ii) Nas mesmas condições experimentais, cromatografaram-se os produtos comerciais, P_i, PP_i, P_3, P_4 e P_5, o que serviu para construir uma

recta padrão, relacionando o comprimento da cada cadeia de fosfatos com o volume ou a fracção respectiva a que eluiam.

iii) Mediante esta curva padrão, e considerando que se mantinha a linearidade, calculou-se o valor de n, dos P_n, em cada fracção.

Os resultados obtidos, aplicando esta metodologia, foram os seguintes:

A. O polifosfato tipo P_5 comercial estava constituido principalmente por P_i e PP_i, isto é, não era P_5. Estes resultados foram obtidos em várias preparações comerciais, da casa Sigma, todas elas referenciadas como P_5.

B. Com os polifosfatos do tipo P_{15}, observou-se um pico preponderante correspondente a P_{18}, o que estava de acordo com as especificações da casa Sigma e com os cálculos efectuados, confirmando a validade do procedimento experimental utilizado.

Como se pode verificar na *Tabela 15*, todos os polifosfatos ensaiados estimulavam a 5'-nucleotídase, sendo, particularmente activas, as fracções correspondentes a um número de fosfatos igual a 18, 19 e 20. Os valores de K_a determinados, como se pode observar na *Tabela 16*, foram de cerca de 1 micromolar, isto é, aproximadamente 50 vezes mais baixos que os valores de K_a determinados para os polifosfatos de diadenosina. Ensaiou-se, igualmente, o polifosfato P_{35}, sem purificar, ante a impossibilidade de obter uma separação de todos os seus componentes, e mesmo assim, o valor de K_a determinado foi também da ordem de 1 micromolar. É de prever que alguns dos seus constituintes tenham valores de K_a ainda mais baixos.

Le Hir (1991) descreveu o efeito activador do decavanadato sobre a actividade 5'-nucleotidásica da enzima, em concentrações da ordem de 0.1 μM. Uma vez que, os iões fosfato e vanadato são estruturalmente semelhantes, os seus poliderivados tornam-se estruturalmente muito semelhantes. Deste modo, é de prever, que o efeito provocado sobre a enzima por estes compostos seja explicado por um mecanismo de actuação semelhante.

Como já se referiu no capítulo de Introdução, a 5'-nucleotídase IMP/GMP específica além da sua actividade 5'-nucleotidásica, actua também como uma fosfotransférase, catalisando a tranferência de um grupo fosfato de um dador apropriado (IMP, GMP, etc) para um receptor adequado (Ino, Guo, etc). Na *Tabela 18* encontram-se os resultados obtidos ao estudar os dinucleósidos polifosfatos e o polifosfato P_{15} sobre esta actividade.

Da análise desses resultados observa-se que compostos estimuladores da actividade 5'-nucleotidásica da enzima, comportam-se, igualmente, como estimuladores da sua actividade fosfotransferásica. Mais ainda, o grau de efectividade de cada um desses compostos sobre a enzima é semelhante para ambas as actividades. Compostos não activadores da actividade 5'-nucleotidásica, comportam-se. da mesma forma, em relação à actividade fosfotransferásica.

Os resultados obtidos, quantificando simultâneamente cada uma destas actividades, na presença de Ap_4A como efector e em fracções recolhidas de uma coluna de Dyematrex Green A, mostraram uma relação entre ambas próxima da unidade (ver *Fig. 38*). Os trabalhos de Pesi e col. (Pesi e col., 1994, 1996) parecem indicar, contudo, que em condições fisiológicas, a actividade preponderante seria a fosfotransferásica, dependendo apenas da disponibilidade de substratos dador e receptor adequados.

Outro capítulo deste trabalho foi dedicado ao estudo do metabolismo dos nucleótidos purínicos em extracto de cérebro.

Com este estudo pretendeu-se ter outra visão sobre o papel das 5'-nucleotídases no metabolismo dos nucleótidos purínicos. Para isso, incubaram-se AMP, GMP, IMP e XMP em presença da fracção citoplasmática de cérebro, seguindo-se a formação dos produtos de degradação de cada nucleótido. Estes ensaios foram ainda ampliados com ensaios similares, utilizando como substratos, as correspondentes bases e nucleósidos purínicos, tendo sido, também, analisada a influência de distintos valores de carga adenílica (C.A.) sobre o metabolismo de AMP. Todos estes ensaios foram efectuados através da análise dos produtos de degradação mediante cromatografia liquída de alta resolução (HPLC). Esta técnica é especialmente adequada para este tipo de ensaios, devido às propriedades de absorção no ultravioleta que apresentam estes compostos, permitindo seguir, de uma maneira fácil, a sua aparição durante o processo cromatográfico e caracterizar as alterações nos aneis purínicos mediante a análise do seu espectro ultravioleta.

Apesar da bondade desta técnica, e por forma a complementar os resultados do estudo deste metabolismo, foi efectuado, em paralelo, um estudo teórico, sobre as alterações teóricas que sofririam os metabolitos submetidos à acção sequencial ou simultânea de todos as enzimas capazes de modificá-los, presentes no extracto de cérebro.

Este estudo efectuou-se desenvolvendo as equações diferenciais adequadas, que puderam ser resolvidas com a ajuda do Programa

"Mathematica". O tratamento matemático seguido, está bastante detalhado na parte de Resultados e Discussão, pelo que, aqui, se limitará a expor os resultados mais conclusivos que se obtiveram, com ambos os estudos.

1. A degradação do AMP, em presença de extracto de cérebro, deu origem à aparição exclusiva de adenosina, inosina e hipoxantina, não se observando a aparição de IMP. Este perfil de degradação indica que, nestas condições, o AMP é degradado exclusivamente através das 5'-nucleotídases.

Como se sabe, são duas as enzimas que participam nesta etapa: a 5'-nucleotídase de alta afinidade para o AMP, aqui designada por E_1, e a específica para o IMP/GMP, designada de E_2. Mediante tratamento matemático, e baseados nos resultados experimentais, demonstrou-se que a enzima responsável pelos resultados obtidos era a E_1, sem que a enzima E_2, participasse de um modo significativo na degradação de AMP.

2. A degradação do IMP originou a aparição de inosina e hipoxantina e a do XMP apenas de xantosina.

3. É significativo que o GMP origine, como produtos de degradação, exclusivamente, a guanosina e a xantina. A tempos longos de incubação permanece apenas a xantina, aparecendo, ainda, um novo produto cuja natureza está actualmente a ser investigada. É também significativo que não se observe a formação de guanina (*Fig. 44*). Após o tratamento experimental e teórico concluiu-se que este facto poderia ser interpretado pela presença de uma forte actividade da guanina desamínase que rapidamente transforma a guanina, que se forma pela acção da guanosina hidrolase (uma nucleosídase), em xantina.

4. Tanto em 1., como em 2. e em 3., não se observou a aparição de ácido úrico. Embora esteja descrita a presença, em pequenas quantidades, de xantina oxídase no cérebro (Betz, 1985; Moriwaki e col., 1993), nestas condições, esta enzima é muito pouco efectiva. Pode, pois, concluir-se que os produtos finais da degradação dos nucleótidos purínicos são a hipoxantina (para o AMP e IMP), e a xantina (para o GMP e XMP).

5. O metabolismo do AMP é radicalmente alterado, quando o meio de ensaio se suplementa com ADP e ATP. O ensaio efectuou-se em quatro condições distintas de carga adenílica (C.A.): 0,8, 0,6, 0,4 e 0,2. O resultado mais significativo foi, nestas condições, a aparição de IMP e a não aparição de adenosina, contrastando claramente com os resultados em que se incubou AMP na ausência de ATP.

Estes resultados podem ser explicados quer experimental quer teóricamente, pela acção simultânea e contrária do ATP, sobre as enzimas

AMP desamínase e 5'-nucleotídase solúvel de alta afinidade para o AMP. De facto, o ATP é um forte activador da enzima responsável pela desaminação do AMP em IMP (AMP desamínase) (Chapman e Atkinson, 1973) e um forte inibidor da segunda, responsável pela conversão de AMP em adenosina (Mallol e Bozal, 1983).

Efectuou-se, igualmente, um estudo, que se apresenta na parte 4.3., sobre a similitude de sequências das 5'-nucleotídases.

Tomando como referência a 5'-nucleotídase humana de membrana (X55740) observou-se significativa homologia de sequências de nucleótidos dos seus genes codificantes, bem como, das sequências de aminoácidos respectivas, com outras 5'-nucleotídases de origem membranar, mas não com a 5'-nucleotídase citosólica. Esta enzima, cujo gene foi clonado a partir da placenta humana, não apresentava, por sua vez, zonas de homologia com nenhuma outra nucleotídase. A 5'-nucleotídase citosólica possuía, contudo, a particularidade de, na sua extremidade carboxílica, apresentar um fragmento de poliglutamato, com base no qual se procedeu a uma série de ensaios.

Deste modo, tentou-se obter anticorpos frente a L-poliglutamato comercial, usando a galinha como animal produtor de anticorpos. Para isso, vários animais foram injectados com uma solução de L-poliglutamato em soro de Freund's, analisando-se a presença de anticorpos na gema dos ovos do animal. Aplicando uma metodologia convencional, descrita por Polsen e col. (1985), isolaram-se as imunoglobulinas presentes na gema de ovo, investigando-se a aparição de anticorpos frente ao L-poliglutamato, dias depois da injecção do antigénio. Apesar de se ter observado a produção do anticorpo correspondente, este não teve nenhum efeito apreciável sobre a enzima. Devido a esta falta de actividade esta parte não se descreve em Resultados.

Em consequência da pesquisa de similitudes entre sequências de observou-se, inesperadamente, uma franca homologia entre a 5'-nucleotídase citosólica (nº de acesso D38524) e o receptor da proteina A do surfactante do pulmão, quer a nível de nucleótidos dos seus genes codificantes, quer a nível dos aminoácidos respectivos, Actualmente, não se vislumbra uma razão para tal homologia, ainda mais quando se trata de uma enzima solúvel e um receptor de membrana. É de crer, no entanto que se trata de um facto significativo que mereceria um estudo posterior que, desde logo, cai fora do alcance deste trabalho.

6. Conclusões

1. A actividade 5'-nucleotídase IMP/GMP específica foi purificada cerca de 450 vezes, a partir da fracção citoplasmática de tecido cerebral de rato, utilizando métodos convencionais (fraccionamento com sulfato de amónio, cromatografia em coluna de fosfocelulose, cromatografia de afinidade e cromatografia de interacções hidrofóbicas). A actividade específica final da enzima purificada foi de 2,2 U/mg de proteína.

2. A enzima purificada apresentou as seguintes características:

2.1. Estrita dependência da presença dos catiões divalentes, com a seguinte actividade relativa: Mg^{2+} (100) > Co^{2+} (46%) > Mn^{2+} (12) > Cu^{2+} (11) > Ni^{2+} (7). Os catiões monovalentes, Na^+ e K^+, quando em concentrações elevadas, e na presença de catiões divalentes, comportam-se como activadores da reacção enzimática.

2.2. Os valores de K_m ($S_{0,5}$) para substratos indicados foram, na ausência (e presença de 0,050 mM de Ap_4A), os seguintes: IMP, 0,6 (0,3); GMP, 4,6 (0,7); AMP, 15 (7,0) e XMP, 11 (4,7) mM.

2.3. Os valores de pH e de temperatura óptimos de reacção, determinado com IMP como substrato, estavam compreendidos entre 6,5 e 7,0 e entre 35 e 42 °C, respectivamente.

2.4. Ensaiaram-se várias séries de efectores com as seguintes actividades relativas (os números entre parêntesis indicam os valores de K_a (μM), quando determinados):

Homodinucleósidos polifosfatos: Ap_4A (83) > Gp_4G.

Heterodinucleósidos tetrafosfatos: Ap_4A > Ap_4G > Ap_4X > Ap_4I > $ddAp_4A$ > $Ap_4\varepsilon A$ > Ap_4U > Ap_4C.

Diadenosina polifosfatos: Ap_6A (57) > Ap_5A (77) > Ap_4A (83). O Ap_3A e o Ap_2A não foram efectores.

Polifosfatos: P_{20} (0,6) > P_{19} (0,9) > P_{18} (3,5) > P_{12}.> P_{10}.

2,3-Difosfoglicerato < Ap_4A.

Segundo estes dados:

a. Para que um diadenosil-polifosfato seja activador da enzima, necessita de ter, pelo menos, na sua cadeia interna, 4 fosfatos.

b. Compostos do tipo Ap_4N, perdem bastante capacidade efectora quando N é uma pirimidina.

c. Os polifosfatos (P_n), com um número de fosfatos superior a 5 (n>5), são efectores da reacção, sendo os de cadeia mais longa, os mais eficazes.

2.5. Compostos efectores da actividade nucleotidásica são igualmente efectores da actividade fosfotransferásica, com as seguintes actividades relativas:

$Ap_6A > Ap_5A > Ap_4A > P_{15} > Ap_4G > Ap_4X >$ 2,3 -DPG $> Ap_4U$.

3. Estudou-se o destino metabólico das bases, nucleósidos e nucleótidos purínicos, mediante incubação na presença do sobrenadante de 150 000 x *g* de extracto cerebral de rato. Procedeu-se, em paralelo, a um estudo matemático, mediante a resolução de equações diferenciais com a ajuda do Programa "Mathematica". Com ambos estes estudos obtiveram-se resultados parecidos. As conclusões foram as seguintes:

3.1. Na ausência de ATP, o AMP é degradado preferencialmente a adenosina, com a intervenção preponderante da enzima 5'-nucleotídase de alta afinidade.

3.2. Valores de carga adenílica variáveis (0,8, 0,6, 0,4 e 0,2) influenciam significativamente o destino metabólico do AMP, sendo este metabolizado preferencialmente via IMP, sem que se observe a formação de adenosina.

3.3. O cérebro contém uma forte actividade guanina desamínase, responsável pela obtenção da xantina, como produto final da degradação do GMP, sem que se visualize a formação intermediária de guanina.

3.4. A partir de XMP e de GMP, obtêm-se, após longos períodos de incubação, um composto de natureza desconhecida, que procede da xantina.

4. Observou-se grande homologia entre as sequências nucleotídicas dos genes codificantes para 5'-nucleotídase citosólica e para o receptor da proteína A do surfactante pulmonar, bem como, entre as respectivas sequências de aminoácidos.

7. Bibliografia

Aebi, H. E. (1983). Catalase. Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U., ed.) 3ª ed., Vol. III, Verlag Chemie, Weinheim. 273-286.

Agarwal R. P. e Parks, R. E. Jr. (1978). Adenosine deaminase from human erithrocytes. Methods Enzymol. 51, 502-507.

Agbaria, R., Mullen, C. A., Hartman, N. R., Cooney, D. A., Hao, Z., Blaese, R. M. e Johns, D. G. (1994). Effects of IMP dehydrogenase inhibitors on the phosphorylation of ganciclovir in MOLT-4 cells before and after Herpes Simplex virus thymidine kinase gene transduction. Molecular Pharmacology 45, 777-782.

Ahluwalia, G., Cooney, D. A., Bondoc, L. L., Currens, M. J., Ford, H., Johns, D. G., Mitsuya, H. e Fridland, A. (1990). Inhibitors of IMP dehydrogenase stimulate the phosphorylation of the antiviral nucleoside 2',3'-dideoxyguanosine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 171, 1297-1303.

Allsop, J. e Watts, R. W. E. (1983). Purine *de novo* synthesis in liver and developing rat brain, and the effect of some inhibitors of purine nucleotide interconversion. Enzyme 30, 172-180.

Ames, B. N. (1966). Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. Methods Enzymol. 8, 115-118.

Andersson, M. e Lewan, L. (1988). Early increase in diadenosine tetraphosphate in regenerating rat liver. Exp. Cell Res. 175, 414-418.

Atkinson, D. E. (1968). The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. Biochemistry 7, 4030-4034.

Avila, D. M., Robinson, A. K., Kaushal, V. e Barnes, L. D. (1991). A paradoxical increase of a metabolite upon increased expression of its catabolic enzyme: the case of diadenosine tetraphosphate (Ap_4A) and Ap_4A phopshorylase I in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 173, 7875-80.

Bailyes, E. M., Newby, A. C., Siddle, K. e Luzio, J. P. (1982). Solubilization and purification of rat liver 5'-nucleotidase by use of a zwitterionic detergent and a monoclonal-antibody immunoadsorbent. Biochem. J. 203, 245-251.

Bailyes, E. M., Ferguson, M. A. J., Colaco, C. A. L. S. e Luzio, J. P. (1990). Inositol is a constituent of detergent-solubilized immunoaffinity-purified rat liver 5'-nucleotidase. Biochem. J. 265, 907-909.

Baiocchi, C., Pesi, R., Camici, M., Itoh, R. e Tozzi, M. G. (1996). Mechanism of the reaction catalysed by cytosolic 5'-nucleotidase/ phosphotransferase: formation of a phosphorylated intermediate. Biochem. J. 317, 797-801.

Balzarini, J., Lee, C-K., Herdewijn, P. e De Clercq, E. (1991). Mechanism of the potentiating effect of ribavirin on the activity of 2',3'-dideoxyinosine against Human Immunodeficiency Virus. J. Biol. Chem. 266, 21509-21514.

Barnes, L. D. e Culver, C. A. (1982). Isolation and characterization of diadenosine 5',5'''-P^1,P^4-tetraphosphate pyrophosphohydrolase from *Physarum polycephalum*. Biochemistry 21, 6123-6128.

Barnes, L. D., Garrison, P. N., Siprashvili, Z., Guranowski, A., Robinson, A. K., Ingram, S. W., Croce, C. M., Ohta, M. e Huebner, K. (1996). Fhit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5',5'''-P^1,P^3-triphosphate hydrolase. Biochemistry 35, 11529-11535.

Baron, M. D., Pope, B. e Luzio, J. P. (1986). The membrane topography of ecto-5'-nucleotidase in rat hepatocytes. Biochem. J. 236, 495-502.

Baxi, M. D. e Vishwanatha, J. K. (1995). Diadenosine polyphosphates: their biological and pharmacological significance. J. Pharmacol. Toxicol. Methods 33, 121-128.

Betz, A. L.(1985). Identification of hypoxanthine transport and xanthine oxidase activity in brain capillaries. J. Neurochem., 44, 574-579.

Bleisch, S., Sillero, M. A. G, Torrecilla, A. e Sillero, A. (1994). Uric acid synthesis by rat liver supernatants from purine bases, nucleosides and nucleotides. Effect of allopurinol. Cell Biochem. Funtion 12, 237-245.

Böhme, H.-J., Kopperschläger, G., Schulz, J. e Hofmann, E. (1972). Affinity chromatography of phosphofructokinase using Cibacron blue F3G-A. J. Chromatogr. 69, 209-214.

Bondoc, L. L. Jr., Ahluwalia, G., Cooney, D. A., Hartman, N. R., Johns, D. G. e Fridland, A. (1992). Metabolic pathways for the activation of the antiviral agent 2',3'-dideoxyguanosine in human lymphoid cells. Mol. Pharmacol. 42, 525-530.

Bontemps, F., Van den Berghe, G. e Hers, H. G. (1986). Identification of a purine 5'-nucleotidase in human erythrocytes. Adv. Exp. Med. Biol. 195 B, 283-290.

Bontemps, F., Van den Berghe, G. e Hers, H.-G. (1988). 5'-Nucleotidase activities in human erythrocytes. Biochem. J. 250, 687-696.

Bontemps, F., Vincent, M. F., Van den Bergh, F., van Waeg, G. e Van den Berghe, G. (1989a). Stimulation by glycerate 2,3-bisphosphate: a common property of cytosolic IMP-GMP 5'-nucleotidase in rat and human tissues. Biochim. Biophys. Acta 997, 131-134.

Bontemps, F., Vincent, M. F., Van den Bergh, F., van Waeg, G. e Van den Berghe, G. (1989b). Stimulation by glycerate 2,3-bisphosphate: a common property of cytosolic purine 5'-nucleotidase in various tissues. Adv. Exp. Med. Biol. 253 B, 141-147.

Born, G. V. R. (1962). Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. Nature194, 927-929.

Braas, K, Newby, A. C., Wilson, V. S. e Snyder, S. H. (1986). Adenosine-containing neurons in the brain localized by immunocytochemistry. J. Neurosci. 6, 1952-1961.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Brevet, A., Coste, H., Fromant, M., Plateau, P. e Blanquet, S. (1987). Yeast diadenosine 5',5'''-P^1,P^4-tetraphosphate α, β-phosphorylase behaves as a dinucleoside tetraphosphate synthetase. Biochemistry 26, 4763-4768.

Brosh, S., Sperling, O., Bromberg, Y. e Sidi, Y. (1990). Developmental changes in the activity of enzymes of purine metabolism in rat neuronal cells in culture and in whole brain. J. Neurochemistry 54, 1776-1781.

Busse, R., Ogilvie, A. e Pohl, U. (1988). Vasomotor activity of diadenosine triphosphate and diadenosine tetraphosphate in isolated arteries. Am. J. Physiol. 254, H828-H832.

Cameselle, J. C., Costas, M. J.,Sillero, M. A. G. e Sillero, A. (1982). Bis-(5-guanosyl) tetraphosphatase in rat tissues. Biochem. J. 201, 405-410.

Cameselle, J. C., Costas, M. J.,Sillero, M. A. G. e Sillero, A. (1984). Two low Km hydrolytic activities on dinucleoside 5',5'''-P^1,P^4-tetraphosphates in rat liver. Characterization as the specific dinucleoside tetraphosphatase and a phosphodiesterase I-like enzyme. J. Biol. Chem. 259, 2879-2885.

Cammer, W., Sirota, S. R., Zimmermann, T. R. Jr. e Norton, W. T. (1980). 5'-Nucleotidase in rat brain myelin. J. Neurochem. 35, 367-373.

Canales, J., Fernández, A, Faraldo, A., Pinto, R. M., Sillero, A. e Günther Sillero, M. A. (1985). IMP dehydrogenase from *Artemia* embryos: molecular forms, purification and properties. Comp. Biochem. Physiol. 81B, 837-844.

Carreras, J., Bartrons, R., Climent, F. e Cusso, R. (1986). Bisphosphorylated metabolites of glycerate, glucose, and fructose: Functions, metabolism and molecular pathology. Clin. Biochem. 19, 348-358.

Carson, D. A. e Wasson, D. B. (1982). Characterization of an adenosine 5'-triphosphate- and deoxyadenosine 5'-triphosphate - activated nucleotidase from human malignant lymphocytes. Cancer Res. 42, 4321-4324.

Carson, D. A., Haertle, T., Wasson, D. B. e Richman, D. D. (1988). Biochemical genetic analysis of 2', 3'-dideoxyadenosine metabolism in human T lymphocytes.Biochem. Biophys. Res. Commun. 151, 788-793.

Carson, D. A., Carrera, C. J., Wasson, D. B. e Iizasa, T. (1991). Deoxyadenosine-resistant human T lymphoblasts with elevated 5'-nucleotidase activity. Biochim. Biophys. Acta 1091, 22-28.

Casals, C., Miguel, E. e Perez-Gil, J. (1993). Tryptophan fluorescence study on the interaction of pulmonary surfactant protein A with phospholipid vesicles. Biochem. J. 296, 585-593.

Castillo, C. J. F., Moro, M. A., Del Valle, M., Sillero, A., Garcia, A. G. e Sillero, M. A. G. (1992). Diadenosine tetraphosphate is co-released with ATP and catecholamines from bovine adrenal medulla. J. Neurochem. 59, 723-732.

Castro, E., Torres, M., Miras-Portugal, M. T. e González, M. P. (1990). Effect of diadenosine polyphosphates on catecholamine secretion from isolated chromaffin cells. Br. J. Pharmacol. 100, 360-364.

Centelles, J. J., Franco, R., Canela, E. I. e Bozal, J. (1986). Kinetics of the 5'-nucleotidase and the adenosine deaminase in subcellular fractions of rat brain. Neurochem. Res. 11, 471-479.

Chagoya de Sánchez, V., Múñoz, R. H., Suárez, J., Vidrio, S., Yáñez, L. e Múños, M. D. (1993). Day-night variations of adenosine and its metabolizing enzymes in the brain cortex of the rat - possible physiological significance for the energetic homeostasis and the sleep-wake cycle. Brain Res. 612, 115-121.

Chapman, A. G. e Atkinson, D. E. (1973). Stabilization of adenylate energy charge by the adenylate deaminase reaction. J. Biol. Chem. 248, 8309-8312.

Chapman, A. G., Miller, A. L. e Atkinson, D. E. (1976). Role of the adenylate deaminase reaction in regulation of adenine nucleotide metabolism in Ehrlich ascites tumor cells. Cancer Res. 36, 1144-1150.

Cirri, P., Chiarugi, P., Camici, G., Manao, G., Raugei, G., Cappugi, G.e Ramponi, G. (1993). The role of Cys12, Cys17 and Arg18 in the catalytic mechanism of low-Mr cytosolic phosphotyrosine protein phosphatase. Eur. J. Biochem. 214, 647-657.

Cohen, A. J., Li, F. P., Berg, S., Marchetto, D. J., Tsai, S., Jacobs, S. C. e Brown, R. S. (1979). Hereditary renal-cell carcinoma associated with a chromosomal translocation. N. Eng. J. Med. 301, 592-595.

Cooney, D. A., Ahluwalia, G., Mitsuya, H., Fridland, A., Johnson, M., Hao, Z, Dalal, M., Balzarini, J., Broder, S e Johns, D. G. (1987). Initial studies on the cellular pharmacology of 2',3'-dideoxyadenosine, an inhibitor of HTLV-III infectivity. Biochem. Pharmacol. 36, 1765-1768.

Connolly, K. J. e Hammer, S. M. (1992). Antiretroviral therapy: Reverse transcriptase inhibition. Antimicrob. Agents Chemother. 36, 245-254.

Darvish, A. e Metting, P. J. (1993). Purification and regulation of an AMP-specific cytosolic 5'-nucleotidase from dog heart. Am. J. Physiol. 264, H1528-H1534.

Darvish, A., Postlewaite, J. J. e Metting, P. J. (1993). Immunogold localization of adenosine 5'-monophosphate-specific cytosolic 5'-nucleotidase in dog heart. Hypertension 21, 906-910.

Dixon, M. e Webb, E. C. (1979). Enzymes, 3ª Ed..Dixon, M. e Webb, E. C. Eds. Academic Press, New York, 1116 p.

Duggleby, R. G. (1981). A nonlinear regression program for small computers. Anal. Biochem. 110, 9-18.

Dunn, D. B. e Hall, R. H. (1968). Purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides: physical constants and spectral properties. Handbook of Biochemistry. Selected data for molecular biology. 2nd edition. Sober, H. A. Ed. The chemical rubber Co., Cleveland, Ohio. G-3 a G-238.

Edwards, M. J. e Kaufmann, W. K. (1982). Replicative DNA synthesis in permeable fibroblasts from normal individuals and ataxia-telangiectasia patients. Biochim. Biophys. Acta 721, 223-225.

Fairbanks, G., Steck, T. L. e Wallach, D. F. H. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry 10, 2606-2617.

Faraldo, A., Pinto, R. M., Canales, J., Fernández, A., Sillero, A. e Günther Sillero, M. A. (1983). Presence of two isozymes of adenylosuccinate synthetase in *Artemia salina* embryos. Purification and properties. Comp. Biochem. Physiol. 75B, 221-226.

Farr, S. B., Arnosti, D. N., Chamberlin, M. J. e Ames, B. N. (1989). An *apa*H mutation causes AppppA to accumulate and affects motility and catabolite repression in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5010-5014.

Fernández, A., Costas, M. J., Günther Sillero, M. A. e Sillero, A. (1984). Diadenosine tetraphosphate activates AMP deaminase from rat muscle. Biochem. Biophys. Res. Commun. 121, 155-161.

Fini, C., Palmerini, C. A., Damiani, P., Stochaj, U., Mannherz, H. G. e Floridi, A. (1990). 5'-Nucleotidase from bull seminal plasma, chicken gizzard and snake venom is a zinc metalloprotein. Biochim. Biophys. Acta 1038, 18-22.

Flodgaard, H. e Klenow, H. (1982). Abundant amounts of diadenosine 5', 5'''-P1, P4-tetraphosphate are present and releasable, but metabolically inactive, in human platelets. Biochem. J. 208, 737-742.

Fox, I. H. e Kelley, W. N. (1978). The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells. Ann. Rev. Biochem. 47, 655-686.

Fox, J. A., Soliz, N. M. e Saltiel, A. R. (1987). Purification of a phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase C from liver plasma membranes: A possible target of insulin action. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 2663-2667.

Franco, R., Canela, E. I. e Bozal, J. (1981). Catabolismo purínico en cerebro de rata. Rev. Esp. Fisiol. 37, 255-262.

Franco, R. e Canela, E. I. (1984). Computer simulation of purine metabolism. Eur. J. Biochem. 144, 305-315.

Fredholm, B. B. e Lindgren, E. (1983). Inhibition of soluble 5'-nucleotidase from rat brain by different xanthine derivatives. Biochem. Pharmacol. 32, 2832-2834.

Fridland, A., Connelly, M. C. e Robbins, T. J. (1986). Tiazofurin metabolism in human lymphoblastoid cells: evidence for phosphorylation by adenosine kinase and 5'-nucleotidase. Cancer Res. 46, 532-537.

Fritzson, P. (1969). Nucleotidase activities in the soluble fraction of rat liver homogenate. Partial purification and properties of a 5'-nucleotidase with pH optimum 6,3. Biochim. Biophys. Acta 178, 534-541.

Fritzson, P., Haugen, T. B. e Tjernshaugen, H. (1986). The presence and activity in normal and regenerating rat liver postmicrosomal supernatant fraction of an enzyme with properties similar to those of membrane-bound 5'-nucleotidase. Biochem. J. 239, 185-190.

García-Agúndez, J. A., Cameselle, J. C., Costas, M. J., Günther Sillero, M. A. e Sillero, A. (1991). Particulate diadenosine 5',5'''-P^1,P^3-triphosphate hydrolases in rat brain: two specific dinucleoside triphosphatases and two phosphodiesterase I-like hydrolases. Biochim. Biophys. Acta, 1073, 402-409.

Garrison, P. N. e Barnes, L. D. (1992). Determination of dinucleoside polyphosphates. Ap_4A and other dinucleoside polyphosphates. McLennan,A. Ed. CRC Press, Inc, Boca Raton, F. L. 29-61.

Garrison, P. N., Koob, M. e Barnes, L. D. (1992). Physical mapping of the *Saccharomyces cerevisiae* Ap_4A phosphorylase I-encoding gene by the Achilles' cleavage method. Gene, 111, 131-134.

Goerlich, O., Foeckler, R. e Holler, E. (1982). Mechanism of synthesis of adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine (AppppA) by aminoacyl-tRNA synthetases. Eur. J. Biochem. 126, 135-142.

Grau, V. P., Günther Sillero, M. A. e Sillero, A. (1982). Binding of P^1,P^4-bis (5'-guanosyl) tetraphosphate to brain. J. Biol. Chem. 257, 11848-11851.

Grondal, E. J. M. e Zimmermann, H. (1987). Purification, characterization and cellular localization of 5'-nucleotidase from *Torpedo* electric organ. Biochem. J. 245, 805-810.

Grummt, F. (1978). Diadenosine 5',5'''-P^1,P^4-tetraphosphate triggers initiation of *in vitro* DNA replication in baby hamster kidney cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 371-375.

Grummt, F., Waltl, G., Jantzen, H.-M., Hamprecht, K., Huebscher, U. e Kuenzle, C. C. (1979). Diadenosine 5',5'''-P^1,P^4-tetraphosphate, a ligand of the 57-kilodalton subunit of DNA polymerase α. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6081-6085.

Guan, K. L. e Dixon, J. E. (1991). Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate. J. Biol. Chem. 266, 17026-17030.

Guranowski, A. e Blanquet, S. (1985). Phosphorolytic cleavage of diadenosine 5',5'''-P^1,P^4-tetraphosphate. Properties of homogeneous diadenosine 5',5'''-P^1,P^4-tetraphosphate alpha, beta-phosphorylase from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 260, 3542-3547.

Guranowski, A. e Sillero, A. (1992). Enzymes cleaving dinucleoside polyphosphates. Ap4A and other dinucleoside polyphosphates. McLennan,A. Ed. CRC Press, Inc, Boca Raton, F. L. 81-133.

Guranowski, A., Jakubowski, H. e Holler, E. (1983). Catabolism of diadenosine 5',5'''-P^1,P^4-tetraphosphate in procaryotes. Purification and properties of diadenosine 5',5'''-P^1,P^4-tetraphosphate (symmetrical) pyrophosphohydrolase from *Escherichia coli* K12. J.Biol. Chem. 258, 14784-14789.

Guranowski, A., Starzynska, E. e Wasternack, C. (1988). Specific phosphorylase from *Euglena gracilis* splits diadenosine 5',5'''-P^1,P^4-tetraphosphate (Ap_4A) and diadenosine 5',5'''-P^1,P^3-triphosphate (Ap_3A). Int. J. Biochem. 20, 449-455.

Guranowski, A., Günther Sillero, M. A. e Sillero, A. (1990). Firefly luciferase synthesizes P^1,P^4-bis(5'-adenosyl) tetraphosphate (Ap_4A) and other dinucleoside polyphosphates. FEBS Lett. 271, 215-218.

Guranowski, A., Günther Sillero, M. A. e Sillero, A. (1994). Adenosine 5'-tetraphosphate and adenosine 5'-pentaphosphate are synthesized by yeast acetyl coenzyme A synthetase. J. Bacteriol. 176, 2986-2990.

Hilderman. R. H., Martin, M., Zimmermann, J. K. e Pivorun, E. B. (1991). Identification of a unique membrane receptor for adenosine 5',5'''-P^1,P^4-tetraphosphate. J. Biol. Chem. 266, 6915-6918.

Holler, E., Holmquist, B., Vallee, B. L., Taneja, K. e Zamecnik, P. (1983). Circular dichroism and ordered structure of bisnucleoside oligophosphates and their Zn^{2+} and Mg^{2+} complexes. Biochemistry 22, 4924-4933.

Hooper, N. M., Broomfield, S. J. e Turner, A. J. (1991). Characterization of antibodies to the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchors of mammalian proteins. Biochem. J. 273, 301-306.

Huang, Y., Garrison, P. N. e Barnes, L. D. (1995). Cloning of the *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding diadenosine 5',5'''-P^1,P^4-tetraphosphate (Ap_4A) asymmetrical hydrolase: sequence similarity with the histidine triad (HIT) protein family. Biochem. J. 312, 925-932.

Hurley, M. C., Palella, T. D. e Fox, I. H. (1983). Human placental deoxyadenosine and deoxyguanosine phosphorylating activity. J. Biol. Chem. 258, 15021-15027.

Ipata, P. L. (1968). Sheep brain 5'-nucleotidase. Some enzymic properties and allosteric inhibition by nucleoside triphosphates. Biochemistry 7, 507-515.

Itoh, R. (1981). Purification and some properties of cytosol 5'-nucleotidase from rat liver. Biochim. Biophys. Acta 657, 402-410.

Itoh, R. (1993). IMP-GMP 5'-nucleotidase. Mini review. Comp. Biochem. Physiol. 105B, 13-19.

Itoh, R. (1994). Purification and some properties of an IMP-specific 5'-nucleotidase from yeast. Biochem. J. 298, 593-598.

Itoh, R. e Oka, J. (1985). Evidence for existence of a cytosol 5'-nucleotidase in chicken heart: Comparison of some properties of heart and liver enzymes. Comp. Biochem. Physiol. 81B, 159-163.

Itoh, R. e Yamada, K. (1990). Pig lung 5'-nucleotidase: effect of diadenosine 5',5'''-P^1,P^4-tetraphosphate and its related compounds. Int. J. Biochem. 22, 231-238.

Itoh, R. e Yamada, K. (1991). Determination of cytoplasmic 5'-nucleotidase which preferentially hydrolyses 6-hydroxypurine nucleotides in pig, rat and human tissues by immunotitration. Int. J. Biochem. 23, 461-465.

Itoh, R., Mitsui, A. e Tsushima, K. (1967). 5'-Nucleotidase of chicken liver. Biochim. Biophys. Acta. 146, 151-159.

Itoh, R., Usami, C., Nishino, T. e Tsushima, K. (1978). Kinetic properties of cytosol 5'-nucleotidase from chicken liver. Biochim. Biophys. Acta. 526, 154-162.

Itoh, R., Oka, J. e Ozasa, H. (1986). Regulation of rat heart cytosol 5'-nucleotidase by adenylate energy charge. Biochem. J. 235, 847-851.

Itoh, R., Echizen, H., Higuchi, M., Oka, J. e Yamada, K. (1992). A comparative study on tissue distribution and metabolic adaptation of IMP-GMP 5'-nucleotidase. Comp. Biochem. Physiol. 103B, 153-159.

Izuta, S., Saneyoshi, M., Sakurai, T., Suzuki, M., Kojima, K. e Yoshida, S. (1991). The 5'-triphosphates of 3'-azido-3'-deoxythymidine and 2',3'-dideoxynucleosides inhibit DNA polymerase γ by different mechanisms. Biochem. Biophys. Res. Commun. 179, 776-783.

Johnson, M. A. e Fridland, A. (1989). Phosphorylation of 2',3'-dideoxyinosine by cytosolic 5'-nucleotidase of human lymphoid cells. Mol. Pharnacol. 36, 291-295.

Johnson, M. A. Ahluwalia, G., Connelly, M. C., Cooney, D. A., Broder, S., Johns, D. G e Fridland, A. (1988). Metabolic pathways for the activation of the antiretroviral agent 2',3'-dideoxyadenosine in human lymphoid cells. J. Biol. Chem. 263, 15354-15357.

Johns, D. G., Ahluwalia, G. S., Cooney, D. A., Mitsuya, H. e Driscoll, J. S. (1993). Enhanced stimulation by ribavirin of the 5'-phosphorylation and anti-Human Immunodeficiency Virus activity of purine 2'-ß-fluoro-2',3'-dideoxynucleosides. Mol. Pharmacol. 44, 519-523.

Kanemitsu, H., Tamura, A., Kirino, T., Karasawa, S., Sano, K., Iwamoto, T., Yoshiura, M. e Iriyama, K. (1988). Xanthine and uric acid levels in rat brain following focal ischemia. J. Neurochem. 51, 1882-1885.

Kawasaki, H., Carrera, C. J., Piro, L. D., Saven, A., Kipps, T. J. e Carson, D. A. (1993). Relationship of deoxycytidine kinase and cytoplasmic 5'-nucleotidase to the chemotherapeutic efficacy of 2-chlorodeoxyadenosine. Blood 81, 597-601.

Keller, P. M., McKee, S. A. e Fyfe, J. A. (1985). Cytoplasmic 5'-nucleotidase catalyzes acyclovir phosphorylation. J. Biol. Chem. 260, 8664-8667.

Kleineke, J., Düls, Ch. e Söling, H. D. (1979). Subcellular compartmentation of guanine nucleotides and functional relationships between the adenine and guanine nucleotide systems in isolated hepatocytes.FEBS Lett. 107, 198-202.

Klemens, M. R., Sherman, W. R., Holmberg, N. J., Ruedi, J. M., Low, M. G. e Thompson, L. F. (1990). Characterization of soluble vs. membrane-bound human placental 5'-nucleotidase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 172, 1371-1377.

König, H., Riedel, H. D. e Knippers, R. (1983). Reactions *in vitro* of the DNA polymerase-primase from *Xenopus laevis* eggs. A role for ATP in chain elongation. Eur. J. Biochem. 135, 435-442.

Khorana, H. G. (1961). Phosphodiesterases. The Enzymes.2° Ed.,vol. V. Boyer, P. D., Lardy, H. e Myrbach, K. Ed. Academic Press, New York, 79-94.

Kuroki, Y. e Akino, T. (1991). Pulmonary surfactant protein A (SP-A) specifically binds dipalmitoylphosphatidylcholine. J. Biol. Chem. 266, 3068-3073.

Kuroki, Y., Mason, R. J. e Voelker, D. R. (1988). Alveolar type II cells express a high-affinity receptor for pulmonary surfactant protein A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5566-5570.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembling of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Le Hir, M. e Dubach, U. C. (1988). An ATP-inhibited soluble 5'-nucleotidase of rat kidney. Am. J. Physiol. 254, F191-F195.

Le Hir, M. (1991). A soluble 5'-nucleotidase in rat kidney. Stimulation by decavanadate. Biochem. J. 273, 795-798.

Lévêque, F., Blanchin-Roland, S., Fayat, G., Plateau, P. e Blanquet, S. (1990). Design and characterization of *Escherichia coli* mutants devoid of Ap4N-hydrolase activity. J. Mol. Biol. 212, 319-239.

Linden, J. (1994). Purinergic systems. Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular, and Medical Aspects. 5th ed. Eds. Siegel, G. J., published by Raven Press, Ltd, New York. 401-416.

Lobatón, C. D., Vallejo, C. G., Sillero, A e Sillero M. A. G. (1975). Diguanosinetetraphosphatase from rat liver: Activity on diadenosine tetraphosphate and inhibition by adenosine tetraphosphate. Eur. J. Biochem. 50, 495-501.

Long, C. (1968). Adenylate kinase (Myokinase). Biochemists Handbook. Long,C.(Ed.) E & F.N. Spon, Ltd, London.

Louie, S., Kim, B. K. e Zamecnik, P. (1988). Diadenosine 5',5'''-P^1,P^4-tetraphosphate a potential antithrombotic agent. Thromb. Res. 49, 557-565.

Low, M. G. e Prasad, A. R. S. (1988). A phospholipase D specific for the phosphatidylinositol anchor of cell-surface proteins is abundant in plasma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 980-984.

Lüthje, J. e Ogilvie, A (1984). Diadenosine triphosphate (Ap_3A) mediates human platelet aggregation by liberation of ADP. Biochim. Biophys. Res. Commun. 118, 704-709.

Lüthje, J. e Ogilvie, A (1988). Catabolism of Ap_4A and Ap_3A in whole blood. The dinucleotides are long-lived signal molecules in blood ending up as intracellular ATP in erythrocytes. Eur. J. Biochem. 173, 241-245.

Madrid-Marina, V. (1990). Soluble "High Km" 5'-nucleotidase activity in human T- and B-lymphoblasts: isolation and some properties. Int. J. Biochem. 22, 1283-1289.

Madrid-Marina, V. e Fox, I. H. (1986). Human placental cytoplasmic 5'-nucleotidase. Kinetic properties and inhibition. J. Biol. Chem. 261, 444-452.

Maguire, G. A. e Gossner, A. (1995). Glycosyl phosphatidyl inositol phospholipase D activity in human serum. Ann. Clin. Biochem. 32, 74-78.

Mallol, J. e Bozal, J. (1983). Modification of 5'-nucleotidase activity by divalent cations and nucleotides. J. Neurochem. 40, 1205-1211.

Mallol, J. e Bozal, J. (1988). 5'-Nucleotidase from bovine brain cortex: effect of solubilization on enzyme kinetics and modulation. Neurochem. Int. 12, 61-67.

Martin, R. G. e Ames, B. N. (1961). A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: application to protein mixtures. J.Biol.Chem. 236,1372-1379.

Mechulam, Y., Fromant, M., Mellot, P., Plateau, P., Blanchin-Roland, S., Fayat, G. e Blanquet, S. (1985). Molecular cloning of the *Escherichia coli* gene for diadenosine 5',5'''-P^1,P^4-tetraphosphate pyrophosphohydrolase. J. Bacteriol. 164, 63-69.

Meftah, S., Prasad, A. S., Lee, D.-Y. e Brewer, G. J. (1991). Ecto 5'-nucleotidase (5' NT) as a sensitive indicator of human zinc deficiency. J. Lab. Clin. Med. 118, 309 - 316.

Meghji, P., Holmquist, C. A. e Newby, A. C. (1985). Adenosine formation and release from neonatal-rat heart cells in culture. Biochem. J. 229, 799-805.

Meghji, P., Middleton, K. M. e Newby, A. C. (1988a). Absolute rates of adenosine formation during ischaemia in rat and pigeon hearts. Biochem. J. 249, 695-703.

Meghji, P., Rubio, R. e Berne, R. M. (1988b). Intracellular adenosine formation and its carrier-mediated release in cultured embryonic chick heart cells. Life Sci. 43, 1851-1859.

Merril, C. R. (1981). Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels. Science 211, 1437-1438.

Miller, W. H. e Miller, R. L. (1980). Phosphorylation of acyclovir (acycloguanosine) monophosphate by GMP kinase. J. Biol. Chem. 255, 7204-7207.

Miller, W. H., Daluge, S. M., Garvey, E. P., Hopkins, S., Reardon, J. E., Boyd, F. L. Miller, R. L. (1992). Phosphorylation of carbovir enantiomers by cellular enzymes determines the stereoselectivity of antiviral activity. J. Biol. Chem. 267, 21220-21224.

Miras-Portugal, M. T., Pintor, J., Rotllán, P. e Torres, M. (1990). Characterization of ectonucleotidases in chromaffin cells. Ann. N.Y. Acad. Sci. 603, 523-526.

Misumi, Y., Ogata, S., Hirose, S. e Ikehara, Y.(1990a). Primary structure of rat liver 5'-nucleotidase deduced from the cDNA. Presence of the COOH-terminal hydrophobic domain for possible post-translational modification by glycophospholipid. J. Biol. Chem. 265, 2178-2183.

Misumi, Y., Ogata, S., Ohkubo, K., Hirose, S. e Ikehara, Y.(1990b). Primary structure of human placental 5'-nucleotidase and identification of the glycolipid anchor in the mature form. Eur. J. Biochem. 191, 563-569.

Mitsuya, H. e Broder, S.(1987). Strategies for antiviral therapy in AIDS. Nature 325, 773-778.

Mitsuya, H., Jarrett, R. F., Matsukura, M., Veronese, F. M., DeVico, A. L., Sarngadharan, M. G., Johns, D. G., Reitz, M. S. e Broder, S. (1987). Long-term inhibition of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (human immunodeficiency virus) DNA synthesis and RNA expression in T cells protected by 2',3'-dideoxynucleosides in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 2033-2037.

Montero, J. M. e Fes, J. B. (1982). Purification and characterization of bovine brain 5' nucleotidase. J. Neurochem. 39, 982-989.

Moriwaki, Y., Yamamoto, T., Suda, M., Nasako, Y., Takashaki, S.,Agbedana, O. E., Hada, T. e Higashino, K. (1993). Purification and immunohistochemical tissue localization of human xanthine oxidase. Biochim. Biophys. Acta 1164, 327-330.

Mueller, K., Palmour, R., Andrews, C. D. e Knott, P. J. (1985). In vivo voltammetric evidence of production of uric acid by rat caudate. Brain Res. 335, 231-235.

Muilerman, H. G., Lasthuis, A. M., Hooghwinkel, G. J. M. e Van Dijk, W. (1984). On the presence of two non-specific nucleotide-sugar-hydrolysing enzymes in rat liver. Biochem. J. 220, 95-103.

Müller, K., Schellenberger, V., Borneleit, P. e Treide, A. (1991). The alkaline phosphatase from bone: transphosphorylating activity and kinetic mechanism. Biochim. Biophys. Acta 1076, 308-313.

Naito, Y. e Tsushima, K. (1976), Cytosol 5'-nucleotidase from chicken liver purification and some properties. Biochim. Biophys. Acta 438, 159-168.

Naito, Y. e Lowenstein, J. M. (1985). 5'-Nucleotidase from rat heart membranes. Biochem. J. 226, 645-651.

Newby, A. C. (1980). Role of adenosine deaminase, ecto-(5'-nucleotidase) and ecto-(non-specific phosphatase) in cyanide-induced adenosine monophosphate catabolism in rat polymorphonuclear leucocytes. Biochem. J. 186, 907-918.

Newby, A. C. (1988). The pigeon heart 5'-nucleotidase responsible for ischaemia-induced adenosine formation. Biochem. J. 253, 123-130.

Newby, A. C. e Holmquist, C. A. (1981). Adenosine production inside rat polymorphonuclear leucocytes. Biochem. J. 200, 399-403.

Newby, A. C., Luzio, J. P. e Hales, C. N. (1975). The properties and extracellular location of 5'-nucleotidase of the rat fat-cell plasma membrane. Biochem. J. 146, 625-633.

Newby, A. C., Holmquist, C. A., Illingworth, J. e Pearson, J. D. (1983). The control of adenosine concentration in polymorphonuclear leucocytes, cultured heart cells and isolated perfused heart from the rat. Biochem. J. 214, 317-323.

Niedzwiecka, J. e Jaroszewicz, L. (1996). Soluble 5'-nucleotidase from thyroid gland, partial purification and properties. Biochem. Biophys. Res. Commun. 221, 471-476.

Ogata, S., Hayashi, Y., Misumi, Y. e Ikehara, Y. (1990). Membrane-anchoring domain of rat liver 5'-nucleotidase: Identification of the COOH-terminal serine-523 covalently attached with a glycolipid. Biochemistry 29, 7923-7927.

Ogilvie, A. (1992). Extracellular functions for Ap_nA. Ap_4A and other dinucleoside polyphosphates. McLennan,A. Ed. CRC Press, Inc, Boca Raton, F. L. 229-273.

Ogilvie, A. e Antl, W. (1983). Diadenosine tetraphosphatase from human leukemia cells. J. Biol. Chem. 258, 4105-4109.

Ogilvie, A., Lüthje, J., Pohl, U. e Busse, R. (1989). Identification and partial characterization of an adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine hydrolase on intact bovine aortic endothelial cells. Biochem. J. 259, 97-103.

Ohta, M., Inoue, H., Cotticelli, M. G., Kastury, K., Baffa, R., Palazzo, J., Siprashvili, Z., Mori, M., McCue, P., Druck, T., Croce, C. M. e Huebner, K. (1996). The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. Cell. 84, 587-597.

Oka, J., Ozasa, H. e Itoh, R. (1988). A reappraisal of the subunit molecular mass of chicken liver cytosol 5'-nucleotidase. Biochim. Biophys. Acta 953, 114-118.

Oka, J., Ozasa, H., Itoh, R. e Yokota, S. (1989). Purine 5'-nucleotidase. Its reestimated subunit molecular mass and immunocytochemical localization in chicken liver. Adv. Exp. Med. Biol. 253 B, 113-118.

Oka, J., Matsumoto, A, Hosokawa, Y e Inoue, S. (1994). Molecular cloning of human cytosolic purine 5'-nucleotidase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 205, 917-922.

Ono, K., Iwata, Y., Nakamura, H. e Matsukage, A. (1980). Selective inhibition of terminal deoxynucleotidyl transferase by diadenosine 5',5'''-P^1,P^4-tetraphosphate. Biochem. Biophys. Res. Commun. 95, 34-40.

Orford, M. e Saggerson, D. (1996). A low-Km 5'-nucleotidase from rat brain cytosolic fraction: purification, kinetic properties, and description of regulation by a novel factor that increases sensitivity to inhibition by ATP and ADP. J. Neurochem. 67, 795-804.

Orford, M., Mazurkiewicz, D. e Saggerson, D. (1991). Soluble 5'-nucleotidase activities in rat brain. J. Neurochem. 56, 141-146.

Orr, D. C., Figueiredo, H. T, Mo, C.-L., Penn, C. R e Cameron, J. M. (1992). DNA chain termination activity and inhibition of human immunodeficiency virus reverse transcriptase by carbocyclic 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyguanosine triphosphate. J. Biol. Chem. 267, 4177-4182.

Ortiz, B., Sillero, A. e Günther-Sillero, M. A. (1993). Specific synthesis of adenosine (5')tetraphospho(5')nucleoside and adenosine (5')oligophospho(5')adenosine (n>4) catalyzed by firefly luciferase. Eur. J. Biochem. 212, 263-270.

Ortiz, B., Fernández, V. M., Günther Sillero, M. A., e Sillero, A. (1995). Influence of oxygen, dehydroluciferin, luciferin and 6'-ethyl-luciferin on the synthesis of adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine (Ap4A) by firefly luciferase. J. Photochem. Photobiol. B. 29, 33-36.

Osuna, C., Olalla, A., Sillero, A., Günther Sillero, M. A. e Sebastián, J. (1977). Induction of multiple proteases during the early larval development of *Artemia salina*. Dev. Biol. 61, 94-103.

Parrilla, R., Jiménez, M. I. e Ayuso-Parrilla, M. S. (1976). Cellular redistribution of metabolites during glucagon and insulin control of gluconeogenesis in the isolated perfused rat liver. Arch. Biochem. Biophys. 174, 1-12.

Pearson, W. R. e Lipman, D. J. (1988). Improved tool for biological sequence comparison. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444-2450.

Pesi, R., Turriani, M., Allegrini, S., Scolozzi, C., Camici, M., Ipata, P. L. e Tozzi, M. G. (1994). The bifunctional cytosolic 5'-nucleotidase: regulation of the phosphotransferase and nucleotidase activities. Arch. Biochem. Biophys. 312, 75-80.

Pesi, R., Baiocchi, C., Tozzi, M. G. e Camici, M. (1996). Synergistic action of ADP and 2,3-bisphosphoglycerate on the modulation of cytosolic 5'-nucleotidase. Biochim. Biophys. Acta 1294, 191-194.

Piec, G. e Le Hir, M. (1991). The soluble "low-km" 5'-nucleotidase of rat kidney represents solubilized ecto-5'-nucleotidase. Biochem. J. 273, 409-413.

Pieters, R., e Veerman, A. J. P. (1988). The role of 5'-nucleotidase in therapy-resistance of childhood leukemia. Medical Hypotheses II, 77-80.

Pieters, R., Huismans, D. R. e Veerman, A. J. P. (1987). Are children with lymphoblastic leukaemia resistant to 6-mercaptopurine because of 5'-nucleotidase?. The Lancet II, 1471.

Pieters, R., Huismans, D. R., Loonen A. H., Peters G. J., Hahlen, K., van der Does-Van den Berg, A., van Wering, E. R. e Veerman, A. J. P. (1992). Relation of 5'-nucleotidase and phosphatase activities with immunophenotype, drug resistance and clinical prognosis in childhood leukemia. Leukemia Res. 16, 873-880.

Pinto, R. M. e Fernández, A. (1987). Comunicação. XIV Congresso Nacional de Bioquimica (SEB). Málaga, Espanha.

Pinto, R. M., Canales, J., Günther-Sillero, M. A. e A. Sillero, A. (1986). Diadenosine tretraphosphate activates cytosol 5'-nucleotidase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 138, 261-267.

Pinto, R. M., Canales, J., Faraldo, A., Sillero, A. e Günther-Sillero, M. A. (1987). Cytosol 5'-nucleotidase from *Artemia* embryos. Purification and properties. Comp. Biochem. Physiol. 86B, 49-53.

Pinto, R. M., Costas, M. J., Fernández, A., Canales, J., García-Agúndez, J. A. e Cameselle, J. C. (1991). Dinucleoside tetraphosphatase from human blood cells. FEBS 287, 85-88.

Pintor, J. e Miras-Portugal, M. T. (1993). Diadenosine polyphosphates (Ap_xA) as new neurotransmitters. Drug Development Research 28, 259-262.

Pintor, J. e Miras-Portugal, M. T. (1995). A novel receptor for diadenosine polyphosphates coupled to calcium increase in rat midbrain synaptosomes. Br. J. Pharmacol. 115, 895-902.

Pintor, J., Torres, M. e Miras-Portugal, M. T. (1991). Carbachol induced release of diadenosine polyphosphates-Ap_4A and Ap_5A-from perfused bovine adrenal medulla and isolated chromaffin cells. Life Sci. 48, 2317-2324.

Pintor, J., Rotllán, P., Torres, M. e Miras-Portugal, M. T. (1992). Characterization and quantification of diadenosine hexaphosphate in chromaffin cells: granular storage and secretagogue-induced release. Anal. Biochem. 200, 296-300.

Pintor, J., Díaz-Rey, M. A. e Miras-Portugal, M. T. (1993). Ap_4A and ADP-β-S binding to P_2 purinoceptors present on rat brain synaptic terminals. Br. J. Pharmacol. 108, 1094-1099

Plateau, P. e Blanquet, S. (1992). Synthesis of NpnN (n=3 or 4) *in vitro* and *in vivo*. Ap_4A and other dinucleoside polyphosphates. McLennan,A. Ed. CRC Press, Inc, Boca Raton, F. L. 63-79.

Plateau, P. e Blanquet, S. (1994). Dinucleoside oligophosphates in micro-organisms. Adv. Microb. Physiol. 36, 81-108.

Plateau, P., Fromant, M., Brevet, A., Gesquière, A. e Blanquet, S. (1985). Catabolism of bis (5'-nucleosidyl) oligophosphates in *Escherichia coli*: metal requirements and substrate specificity of homogeneous diadenosine-5',5'''-P^1,P^4-tetraphosphate pyrophosphohydrolase. Biochemistry, 24, 914-922.

Plateau, P., Fromant, M., Schmitter, J. M., Buhler, J. M. e Blanquet, S. (1989). Isolation, characterization, and inactivation of the *APA1* gene encoding yeast diadenosine 5',5'''-P1,P4-tetraphosphate phosphorylase. J. Bacteriol., 171, 6437-6445.

Plateau, P., Fromant, M., Schmitter, J. M. e Blanquet, S. (1990). Catabolism of bis(5'-nucleosidyl) tetraphosphates in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol.,172, 6892-6899.

Polson, A., Coetzer, T:, Kruger, J., von Maltzahn, E. e van der Merwe, K. J. (1985). Improvements in the isolation of IgY from the yolks of eggs laid by immunized hens. Immunological Invest. 14, 323-327

Raineri, M. (1987). Histochemical and biochemical study of alkaline phophatase (ALP) activity in developing embryos and larvae of *Artemia*. Artemia Research and its applications. Vol. 2 Decleir, W., Moens, I., Slegers, H., Sorgeloos, P., e Jaspers, E. (eds.) Univer Press, Wettern, Belgium. 562 p..

Ralevic, V., Hoyle, C. H., Burnstock, G. (1995). Pivotal role of phosphate chain length in vasoconstrictor versus vasodilator actions of adenine dinucleotides in rat mesenteric arteries. J. Physiol. 483, 703-713.

Rapaport, E. e Zamecnik, P. (1976). Presence of diadenosine 5',5'''-P^1,P^4-tetraphosphate (Ap_4A) in mammalian cells in levels varying widely with proliferative activity of the tissue: a possible "pleiotypic activator". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 3984-3988.

Razzell, W. E. (1963). Phosphodiesterases. Methods Enzymol. 6, 236-258.

Remy, P. (1992). Intracellular functions of Ap_nN: eukaryotes. Ap_4A and other dinucleoside polyphosphates. McLennan,A. Ed. CRC Press, Inc, Boca Raton, F. L. 151-206.

Renart, M. F., Renart, J., Sillero, M. A. G e Sillero, A. (1976). Guanosine monophosphate reductase from *Artemia salina*: Inhibition by xanthosine monophosphate and activation by diguanosine tetraphosphate. Biochemistry 15, 4962-4966.

Ribeiro, J. M., Juzgado, D., Crespo, E. e Sillero, A. (1990). Computer program for the reservoir model of metabolic crossroads. Comput. Biol. Med. 20, 35-46.

Rodríguez del Castillo, A., Torres, M., Delicado, E.G. e Miras-Portugal, M. T. (1988). Subcellular distribution studies of diadenosine polyphosphates -Ap_4A and Ap_5A- in bovine adrenal medulla: presence in chromaffin granules. J. Neurochem. 51, 1696-1703.

Rubio, S., Lacaze-Masmonteil, T., Chailley-Heu, B., Kahn, A., Bourbon, J. R. e Ducroc, R. (1995). Pulmonary surfactant protein A (SP-A) is expressed by epithelial cells of small and large intestine. J. Biol. Chem. 270, 12162-12169.

Sarnesto, A., Linder, N. e Raivio, K. O. (1996). Organ distribution and molecular forms of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase protein. Lab. Invest. 74, 48-56.

Sarup, J. C. e Fridland A. (1987). Identification of purine deoxyribonucleoside kinases from human leukemia cells: substrate activation by purine and pyrimidine deoxyribonucleosides. Biochemistry 26, 590-597.

Saunders, P. P. e Lai, M. M. (1983). Nucleoside kinase activities of chinese hamster ovary cells. Biochim. Biophys. Acta 761, 135-141.

Schlüter, H., Offers, E., Brüggemann, G., van der Glet, M., Tepel, M., Nordhoff, E., Karas, M., Spieker, C., Witzel, H. e Zidek, W. (1994). Diadenosine phosphates and the physiological control of blood pressure. Nature 367, 186-188.

Schultz, V. e Lowenstein, J. M. (1976). Purine nucleotide cycle. Evidence for the occurrence of the cycle in brain. J. Biol. Chem. 251, 485-492.

Schütz, W., Schrader, J. e Gerlach, E. (1981). Different sites of adenosine formation in heart. Am. J. Physiol. 240, H963-H970.

Siess, E. A. e Wieland, O. H. (1979a). Isolated hepatocytes as a model for the study of stable glucagon effects on mitochondrial respiratory functions. FEBS Lett. 101, 277.

Siess, E. A. e Wieland, O. H. (1979b). I. Subcellular distribution of guanine and uracil nucleotides and of succinate in normal and glucagon-stimulated hepatocytes. Hoope Seyler's Z. Physiol. Chem., 360, 1677.

Sillero, A. e Günther-Sillero, M. A. (1987). Interconversion of purine nucleotides in *Artemia*: a review. Artemia Research and its Applications. Vol. 2. Decleir, W., Moens, L., Slegers, H., Jaspers, E. e Sorgeloos, P. (Eds). Univer Press, Wettern, Belgium. 562 p.

Sillero, A. e Günther-Sillero, M. A. (1989). Purine nucleotide metabolism in *Artemia*. Biochemistry and Cell Biology of Artemia. MacRae, T. H., Bagshaw, J. C. e Warner, A. R. Eds. CRC Press, Florida. 95-111.

Sillero, A., Cameselle, J. C. e Günther Sillero, M. A. (1986). Dinucleósido-polifosfatos. Bioquímica y Bilogía Molecular. Temas de actualidad para graduados. Ochoa, S., Leloir, L. F., Oró, J. & Sols, A. Eds. Editorial Salvat, Barcelona. 197-201.

Sillero, A., Günther-Sillero, M. A. e Hernandorena, A. (1993). Effects of diets containing adenosine, guanosine, inosine or xanthosine on the nucleotide content of *Artemia*. Influence of mycophenolic acid. Cell Biochem. Function 11, 193-200.

Sillero, M. A. G. e Cameselle, J. C. (1992). Interactions of dinucleoside polyphosphates with enzymes and other proteins. Ap_4A and other dinucleoside polyphosphates. McLennan, A. Ed. CRC Press, Inc, Boca Raton, F. L. 205-228.

Sillero, M. A. G., Guranowski, A. e Sillero, A. (1991). Synthesis of dinucleoside polyphosphates catalyzed by firefly luciferase. Eur. J. Biochem. 202, 507-513.

Sillero, M. A. G., Del Valle, M., Zaera, E., Michelena, P., Garcia, A. G. e Sillero, A. (1994). Diadenosine 5',5'''-P^1,P^4-tetraphosphate (Ap_4A), ATP and catecholamine content in bovine adrenal medulla, chromaffin granules and chromaffin cells. Biochimie 76, 404-409.

Skladanowski, A. C. e Newby, A. C. (1990). Partial purification and properties of an AMP-specific soluble 5'-nucleotidase from pigeon heart. Biochem. J. 268, 117-122.

Skladanowski, A. C., Sala, G. B. e Newby, A. C. (1989). Inhibition of IMP-specific cytosolic 5'-nucleotidase and adenosine formation in rat polymorphonuclear leucocytes by 5'-deoxy-5'-isobutylthio derivatives of adenosine and inosine. Biochem. J. 262, 203-208.

Skladanowski, A. C., Miscetti, P., Newby, A. C. e Zydowo, M. M. (1991). Diphosphonucleosides are indispensable cofactors of AMP-specific cytoplasmatic 5' - nucleotidase catalysed reaction. Adv. Exp. Med. Biol. 309 B, 163-167.

Skladanowski, A. C., Smolenski, R. T., Tavenier, M., De Jong, J. W., Yacoub, M. H. e Seymour, A.-M. L. (1996). Soluble forms of 5'-nucleotidase in rat and human heart. Am. J. Physiol. 270, H1493-H1500.

Sozzi, G., Veronese, M. L., Negrini, M., Baffa, R., Cotticelli, M. G., Inoue, H., Tornielli, S., Pilotti, S., De Gregorio, L., Pastorino, U., Pierotti, M. A., Ohta, M., Huebner, K. e Croce, C. M. (1996). The FHIT gene at 3p14.2 is abnormal in lung cancer. Cell 85, 17-26.

Spychala, J., Madrid-Marina, V. e Fox, I. H. (1988). High-Km soluble 5'-nucleotidase from human placenta. Properties and allosteric regulation by IMP and ATP. J. Biol. Chem. 263, 18759-18765.

Spychala, J., Madrid-Marina, V., Nowak, P. J. e Fox, I. H. (1989). AMP and IMP dephosphorylation by soluble high- and low-Km 5'-nucleotidases. Am. J. Physiol. 256, E386-E391.

Stanley, K. K, Edwards, M. R. e Luzio, J. P. (1980). Subcellular distribution and movement of 5'-nucleotidase in rat cells. Biochem. J. 186, 59-69.

Starnes, M. C. e Cheng, Y.-C. (1987). Cellular metabolism of 2',3'-dideoxycytidine, a compound active against Human Immunodeficiency Virus *in vitro*. J. Biol. Chem. 262, 988-991.

Stochaj, U., Flocke, K., Mathes, W. e Mannherz, H. G. (1989). 5'-Nucleotidases of chicken gizzard and human pancreatic adenocarcinoma cells are anchored to the plasma membrane via a phosphatidylinositol-glican. Biochem. J. 262, 33-40.

Stoscheck, C. M. (1990). Quantitation of proteins. Methods Enzymol. 182, 50-68.

Strayer, D. S., Yang, S. e Jerng, H. H. (1993). Surfactant protein A-binding proteins. J. Biol. Chem. 268, 18679-18684.

Suzuki, K. (1993). Purification and cDNA cloning of bovine liver 5'-nucleotidase, a GPI-anchored protein, and its expression in COS cells. J. Biochem. 113, 607-613.

Takagi, Y. e Horecker, B. L. (1957). Purification and properties of a bacterial riboside hydrolase. J. Biol. Chem. 225, 77-86.

Thomas, J. R., Dwek, R. A. e Rademacher, T. W. (1990). Structure, biosynthesis, and function of Glycosylphosphatidylinositols. Biochemistry 29, 5413-5422.

Thompson, L. F. (1991). 5'-Nucleotidase - an overview of the last three years. Purine and Pyrimidine Metabolism in Man VII, Part B, 145-149. Edited by R. A. Harkness et al., Plenum Press, New York.

Thompson, L. F., Ruedi, J. M. e Low, M. G. (1987). Purification of 5'-nucleotidase from human placenta after release from plasma membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. Biochem. Biophys. Res. Commun. 145, 118-125.

Thorne, N. M. H., Hankin, S., Wilkinson, M. C., Nuñez, C., Barraclough, R. e McLennan, A. G. (1995). Human diadenosine 5',5'''-P^1,P^4-tetraphosphate pyrophosphohydrolase is a member of the MutT family of nucleotide pyrophosphatases. Biochem. J. 311, 717-721.

Tjernshaugen, H. e Fritzson, P. (1984). Activity of cytosolic 5'-nucleotidase in regenerating rat liver after partial hepatectomy. Int. J. Biochem. 16, 607-613.

Torres, M., Pintor, J. e Miras-Portugal, M. T. (1990). Presence of ectonucleotidases in cultured chromaffin cells: Hydrolysis of extracellular adenine nucleotides. Arch. Biochem. Biophys. 279, 37-44.

Tozzi, M. G., Camici, M., Falcone, V., Turriani, M., Turchi, G. e Ipata, P. L. (1989). 8-Azaguanosine-5'-monophosphate synthesis via nucleoside kinase in cultured chinese hamster lung fibroblasts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 159, 854-861.

Tozzi, M. G., Camici, M., Pesi, R., Allegrini, S., Sgarrella, F. e Ipata, P. L. (1991). Nucleoside phosphotransferase activity of human colon carcinoma cytosolic 5'-nucleotidase. Arch. Biochem. Biophys. 291, 212-217.

Truong, V. L., Collinson, A. R. e Lowenstein, J. M. (1988). 5'-Nucleotidases in rat heart. Evidence for the occurrence of two solubles enzymes with different substrate specificities. Biochem. J. 253, 117-121.

Tsushima, K., (1986). Properties of cytosol 5'-nucleotidase and its role in purine nucleotide metabolism. Adv. Enz. Reg. 25, 181-200.

Tsuzuki, J. e Newburgh, R. W. (1975). Inhibition of 5'-nucleotidase in rat brain by methylxanthines. J. Neurochem. 25, 895-896.

Turriani, M., Pesi, R., Nardone, A., Turchi, G., Sgarrella, F., Ipata, P. L. e Tozzi, M. G. (1994). Cytosolic 5'-nucleotidase/nucleoside phosphotransferase: a nucleoside analog activating enzyme?. J. Biochem. Toxicology 9, 51-57.

Vallejo, C. G., Sillero, M. A. G. e Sillero, A. (1974). Diguanosinetetraphosphate guanylohydrolase in *Artemia salina*. Biochim.Biophys. Acta 358, 117-125.

Van den Berghe, G., Pottelsberghe, C. van, e Hers, H.-G. (1977). A kinetic study of the soluble 5'-nucleotidase of rat liver. Biochem. J. 162, 611-616.

Vogel, M., Kowalewski, H., Zimmermann, H., Janetzo, A., Margolis, R. U. e Wollny, H.-E. (1991). Association of the HKN-1 epitope with 5'-nucleotidase from Torpedo marmorata (electric ray) electric organ. Biochem. J. 278, 199-202.

Vogel, M., Kowalewski, H., Zimmermann, H., Hooper, N. M. e Turner, A. J. (1992). Soluble low-Km 5'-nucleotidase from electric-ray (Torpedo marmorata) electric organ and bovine cerebral cortex is derived from the glycosyl-phosphatidylinositol-anchored ectoenzyme by phospholipase C cleavage. Biochem. J. 284, 621-624.

Volknandt, W., Vogel, M., Pevsner, J., Misumi, Y., Ikehara, Y. e Zimmermann, H. (1991). 5'-Nucleotidase from the electric ray electric lobe. Eur. J. Biochem. 202, 855-861.

Wajner, M. e Harkness, R. A.(1989). Distribution of xanthine dehydrogenase and oxidase activities in human and rabbit tissues, Biochim. Biophys. Acta 991, 79-84.

Walker, J., Lewis, T. E., Pivorun, E. P. e Hilderman, R. H. (1993). Activation of the mouse heart adenosine 5',5'''-P^1-P^4- tetraphosphate receptor. Biochemistry 32, 1264-1269.

Walter, K. e Schütt, C. (1974). Acid and alkaline phosphatase in serum. (Two-point method). Methods of Enzymatic Analysis. Bergmeyer, H.U., Ed., 2° ed. Vol.2, Verlag Chemie, Weinheim. 856-860.

Wang, L., Karlsson, A. Arnér, E. S. J. e Eriksson, S. (1993). Substrate specificity of mitochondrial 2'-deoxyguanosine kinase. J. Biol. Chem. 268, 22847-22852.

Warner, A. H. e Finamore, F. J. (1965). Isolation, purification and characterization of P^1,P^4-diguanosine 5'-tetraphosphate asymmetrical-pyrophosphohydrolase from brine shrimp eggs. Biochemistry 4, 1568-1575

Warner, A. H., Beers, P. C. e Huang, F. L. (1974). Biosynthesis of the diguanosine nucleotides. I. Purification and properties of an enzyme from yolk platelets of brine shrimp embryos. Can. J. Biochem. 52, 231-240.

Weinmann-Dorsch, C., Hedl A., Grummt, I., Albert, W., Ferdinand, F. J., Friis, R. R., Pierron, G., Moll, W. e Grummt, F. (1984). Drastic rise of intracellular adenosine(5')tetraphospho(5')adenosine correlates with onset of DNA synthesis in eukaryotic cells. Eur. J. Biochem. 138, 179-185.

White E. L., Parker, W. B., Ross, L. J. e Shannon, W. M.(1993). Lack of synergy in the inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by combinations of the 5'-triphosphates of various anti-HIV nucleoside analogs.Antiviral Res. 22, 295-308.

Wilkinson, G. N. (1961). Statistical estimations in enzyme kinetics. Biochem. J. 80, 324-333.

Williamson, D. H. e Brosnan, J. T. (1974). Concentrations of metabolites in animal tissues. Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 4, Bergmeyer, H. U., Ed., Academic Press, New York, 2302.

Winkler, H. e Westhead, E. (1980). The molecular organization of adrenal chromaffin granules. Neuroscience 5, 1803-1823.

Wojcik, W. J. e Neff, N. H. (1982). Adenosine measurement by a rapid HPLC-fluorometric method: induced changes of adenosine content in regions of rat brain. J. Neurochem. 39, 280-282.

Worku, Y. e Newby, A. C. (1982). Nucleoside exchange catalysed by the cytoplasmic 5'-nucleotidase. Biochem. J. 205, 503-510.

Worku, Y. e Newby, A. C. (1983). The mechanism of adenosine production in rat polymorphonuclear leucocytes. Biochem. J. 214, 325-330.

Worku, Y., Luzio, J. P. e Newby, A. C. (1984). Identification of histidyl and cysteinyl residues essential for catalysis by 5'-nucleotidase. FEBS 167, 235-240.

Yamada, Y., Goto, H. e Ogasawara, N. (1980). Purification and properties of adenosine kinase from rat brain. Biochim. Biophys. Acta 616, 199-207.

Yamada, Y., Goto, H. e Ogasawara, N. (1983). Purine nucleoside kinases in human T- and B-lymphoblasts. Biochim. Biophys Acta 761, 34-40.

Yamazaki, Y., Collinson, A. R., Truong, V. L. e Lowenstein, J. M. (1989). Regulation of soluble 5'-nucleotidase I from rabbit heart. Adv. Exp. Med. Biol. 253B, 107-111.

Yamazaki, Y., Truong, V. L. e Lowenstein, J. M. (1991). 5'-Nucleotidase I from rabbit heart. Biochemistry 30, 1503-1508.

Yarchoan, R., Mitsuya, H., Myers, C. E. e Broder, S. (1989). Clinical pharmacology of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (zidovudine) and related dideoxynucleosides. New Engl. J. Med. 321, 726-738.

Zamecnik, P. C., Stephenson, M. L., Janeway, C. M. e Randerath, K. (1966). Enzymatic synthesis of diadenosine tetraphosphate and diadenosine triphosphate with a purified lysyl-sRNA synthetase. Biochem. Biophys. Res. Commun.24, 91-97.

Zekri, M., Harb, J., Bernard, S. e Meflah, K. (1988). Purification of bovine liver cytosolic 5'-nucleotidase. Eur. J. Biochem. 172, 93-99.

Zimmermann, H. (1992). 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. Biochem. J. 285, 345-365.

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA

Fig. 41. Perfis cromatográficos da 5'-nucleotídase IMP/GMP específica de distintos tecidos do rato e de cistos de *Artemia*.

Alíquotas de enzima dialisada, com um teor em proteínas de cerca de 5 mg, provenientes da precipitação por sulfato de amónio (0 a 45%) de homogeneizados cistos de *Artemia* e de cada um dos tecidos de rato indicados foram aplicados numa coluna de Dyematrex Green A de 1,3 ml de volume. As condições de eluição e a determinação das actividades enzimáticas nas fracções eluídas foram idênticas às descritas na *Fig. 40.*

Em **A**, cistos de *Artemia*; **B**, cerébro; **C**, coração; **D**, fígado; **E**, pulmão e **F**, testículos.

Errata

Pág.	Linha	Onde se lê	Deve ler-se
2	8	18	1,8
18	34	matrix	matriz
23	18	substratos	substratos dadores
29	8 (eq.2)	E-aa-AMP	E-aa-AMP + tRNA
30	12 (eq.7)	PP_i	ATP
30	12 (eq.7)	E + LH + Ap_4A	E + LH_2 + Ap_4A
30	16	sintetisar	sintetizar
94	14	Artemia	*Artemia*
103	5	(...30, 35, 42...)	(...30, 35, 37, 42...)
121	Tabela 10	P4A	p_4A
134	31	(*Tabela 15* e *Fig. 36*)	(*Tabela 15*)
137	3	*Tabela 16.*	*Tabela 16* e *Fig. 36.*
164	Tabela 20	(K_m e K_i)	(V_{max}, K_m e K_i)
166	Tabela 21	[AMP][ATP]V_6	[AMP][ATP]V_{6r}
173	B (Fig. 48)	V2AMP=4.8 V2imp=1.6	V2AMP=0 V2imp=0
174	9	explicitito	explícito
188	8 (Fig. 56)	(..., 2)).	(..., 2); xantina (3)).

Errata

Pág.	Linha	Onde se lê	Deve ler-se
2	8	18	1,8
12	12	inositol	fosfatidilinositol
18	34	matrix	matriz
23	18	substratos	substratos dadores
29	8 (eq.2)	E-aa-AMP	E-aa-AMP + tRNA
30	12 (eq.7)	PP_i	ATP
30	12 (eq.7)	$E + LH + Ap_4A$	$E + LH_2 + Ap_4A$
30	16	sintetisar	sintetizar
30	28	dinucleósido	nucleósido
94	14	Artemia	*Artemia*
103	5	(...30, 35, 42...)	(...30, 35, 37, 42...)
120	22	DPG e 3-DPG	PG e 3-PG
121	Tabela 10	P_4A	p_4A
134	31	(*Tabela 15* e *Fig. 36*)	(*Tabela 15*)
137	3	*Tabela 16.*	*Tabela 16* e *Fig. 36.*
164	Tabela 20	(K_m e K_i)	(V_{max}, K_m e K_i)
165	Tabela 21	[IMP] $\frac{K_mIno}{K_iIMP}$	[H] $\frac{K_mIno}{K_iH}$
166	Tabela 21	$[AMP][ATP]V_6$	$[AMP][ATP]V_{6r}$
172	8 (Fig.47)	(○); hipoxantina (▵))	(●); hipoxantina (○))
173	B (Fig. 48)	V2AMP=4.8 V2imp=1.6	V2AMP=0 V2imp=0
174	9	explicitito	explícito
188	8 (Fig. 56)	(..., 2)).	(..., 2); xantina (3)).