

JOSÉ MAURO GRANJEIRO 766

## PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA FOSFATASE ÁCIDA DE RIM BOVINO

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Departamento de Bioquímica do  
Instituto de Biologia da Universidade  
Estadual de Campinas.

este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato(a)  
José Mauro Granjeiro 25  
e aprovada pela Comissão Julgadora. 02/94

*Hiroschi Aoyama*

**ORIENTADOR**  
Prof. Dr. HIROSHI AOYAMA  
Depto de Bioquímica  
UNICAMP.

CAMPINAS - SP

1994

G766p

21312/BC

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

À Denize, minha esposa, sempre companheira apoiando-me em todos os instantes, com paciência, carinho e espírito crítico que muito me ajudaram a realizar este trabalho;

Aos meus pais, Sebastião e Paschoalina, grandes amigos que me deram a oportunidade e incentivo para chegar até aqui;

Aos meus irmãos, Vera, Paulo e André, pela amizade e apoio;

Dedico este trabalho

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Hiroshi Aoyama pela orientação firme e segura, e pela amizade a mim dedicada. Seu caráter e integridade são exemplos marcantes que deram especial complementação à minha formação. Agradeço ainda por suas observações e conselhos, muito importantes na execução deste trabalho.

Ao Prof. Eulázio M. Taga, grande amigo, pela paciência e confiança nos meus passos iniciais no Departamento de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru. Sua dedicação e conhecimento são estímulos importantes e despertaram-me grande interesse pela vida acadêmica.

À Profa. Olinda Tarzia, pela amizade e incentivo desde os primeiros trabalhos, na iniciação científica.

Aos Profs. Lúcia Pereira-da-Silva, Satie H. Ogo e Pedro Luiz O. Volpe, pela revisão e análise criteriosas desta dissertação.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, do Instituto de Biologia/UNICAMP, pelos ensinamentos transmitidos.

À Srta. Káthia M. O. dos Santos pela ajuda inestimável na parte experimental deste trabalho.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Bauru pelo auxílio na realização dos levantamentos bibliográficos e obtenção das separatas, sem os quais este trabalho não poderia ser desenvolvido.

À Carmem, Cláudia, Hernandes, Márcio, Marilena, Marlene, Nadja e Patrícia pelo estímulo constante e amizade.

A todos os amigos do curso de Pós-Graduação em Bioquímica, pelo convívio agradável e aprendizado.

Aos colegas do Laboratório de Química de Proteínas pelo apoio na execução de parte deste trabalho.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica da FOB/USP, Gilmar, Lúcia, Telma e Vera, pelo apoio e colaboração.

Ao companheiro Ovídio pelo grande auxílio na obtenção e processamento inicial do rim bovino.

À Dona Jedida e Dona Cida pela presença alegre e prestativa, colaborando para que tudo estivesse em ordem no laboratório.

À Andréia, Dayse, Marina e Mírian, pela convivência agradável e auxílio na secretaria.

Ao Seu José e Seu Jaime pelo zelo na manutenção do Departamento de Bioquímica-IB/UNICAMP.

À Faculdade de Odontologia de Bauru/USP, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Eymar Sampaio Lopes, pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação no Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia/UNICAMP.

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru/USP pela obtenção da bolsa PICD-Capes.

À Capes, através do PICD, pela liberação do auxílio financeiro.

À FAEP/UNICAMP, FAPESP e CNPq, pelo apoio financeiro para a compra de material permanente e de consumo em projetos de pesquisa aprovados.

Ao Frigorífico Mondelli, pela gentil cessão do material biológico essencial à realização deste trabalho.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Aspectos Gerais.....	1
1.2. Distribuição da Fosfatase Ácida.....	3
1.3. Formas Isoenzimáticas.....	6
1.4. Purificação, Características Físico-Químicas e Cinéticas .....	11
1.5. Importância do Estudo da Fosfatase Ácida.....	24
2. PROPOSIÇÃO.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Material.....	27
3.1.1. Obtenção do rim bovino.....	27
3.1.2. Reagentes.....	27
3.2. Métodos.....	28
3.2.1. Determinação da Atividade Enzimática.....	28
3.2.2. Determinação de Proteína .....	29
3.2.3. Tratamento das Resinas.....	30
3.2.4. Concentração da Solução Proteica.....	30
3.2.5. Purificação da Fosfatase Ácida de BPM do Rim Bovino.....	30
3.2.6. Estudos Eletroforéticos .....	32
3.2.7. Determinação da Composição de Aminoácidos .....	33
3.2.8. Determinação da Massa Molecular.....	34
3.2.9. Determinação dos Parâmetros Cinéticos.....	35

3.2.10. Estudos de Inativação Térmica.....	35
3.2.11. Efeito de Compostos na Atividade .....	35
3.2.12. Determinação da Energia de Ativação.....	35
3.2.13. Estudos de Transfosforilação .....	35
3.2.14. Estudos de Especificidade.....	36
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
4.1. Purificação.....	37
4.2. Estudo Eletroforético.....	38
4.3. Determinação da Composição de Aminoácidos.....	38
4.4. Determinação da Massa Molecular .....	38
4.5. Estudos Cinéticos .....	43
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>74</b>
<b>6. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>95</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>96</b>

## ABREVIATURAS

<b><math>\beta</math>-Naftil-P</b>	$\beta$ -Naftil-Fosfato
<b>A.E.</b>	Atividade Específica
<b>ADP</b>	Adenosina Difosfato
<b>APM</b>	Alto Peso Molecular <sup>1</sup>
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>BPM</b>	Baixo Peso Molecular
<b>BSA</b>	Albumina de Soro Bovino
<b>DEAE-Sephadex</b>	Dietilaminoetil-Sephadex
<b>DTNB</b>	Ácido Ditibisnitrobenzóico
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>E<sub>a</sub></b>	Energia de Ativação
<b>EDTA</b>	Ácido Etileno Diamino Tetraacético
<b>EGF</b>	Fator de Crescimento Epidermal
<b>FAc</b>	Fosfatase Ácida
<b>FMN</b>	Flavina Mononucleotídeo
<b>K<sub>a</sub></b>	Constante de Afinidade
<b>K<sub>av</sub></b>	Coefficiente de Partição

\* Muito embora o termo *massa molecular relativa* ( $M_r$ ) esteja sendo hoje corretamente utilizado no lugar de *peso molecular*, adotaremos o termo *peso molecular* (PM) para a classificação das fosfatases ácidas quanto aos seus valores de  $M_r$ . Diversos autores utilizam ainda hoje o termo *peso molecular* assumindo-se como subentendido seu significado como  $M_r$  (PRICE & STEVENS, 1989; ZHANG & VAN ETEN, 1990; DEUTSCHER, 1990).

<b>K<sub>i</sub></b>	Constante de Inibição
<b>K<sub>M</sub></b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>K<sub>p</sub></b>	Constante de Michaelis-Menten na Presença de Inibidor
<b>M<sub>r</sub></b>	Massa Molecular Relativa
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidada
<b>NEM</b>	N-etilmaleimida
<b>p-NFenol</b>	p-Nitrofenol
<b>p-NPP</b>	p-Nitrofenil Fosfato
<b>PSP</b>	Piridoxal-5-Fosfato
<b>PAGE</b>	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
<b>pCMB</b>	p-Cloromercuribenzoato
<b>Pi</b>	Fosfato Inorgânico
<b>pI</b>	Ponto Isoelétrico
<b>PMI</b>	Peso Molecular Intermediário
<b>PTPP</b>	Fosfotirosina-Proteína Fosfatase
<b>SDS</b>	Lauril Sulfato de Sódio
<b>SP-Sephadex</b>	Sulfopropil-Sephadex
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetrametiletlenodiamina
<b>Tyr-P</b>	Tirosina-Fosfato
<b>UE</b>	Unidade Enzimática
<b>V<sub>max</sub></b>	Velocidade Máxima

## RESUMO

A fosfatase ácida de BPM do rim bovino foi purificada 1.640 vezes até a homogeneidade, com rendimento de 7%, através de um procedimento envolvendo fracionamento com sulfato de amônio, tratamento ácido e cromatografia de troca-iônica em SP-Sephadex com eluição por íon-afinidade. Os critérios de pureza utilizados foram a A.E., PAGE, SDS-PAGE, filtração em gel (Superdex HR 70) e análise da composição de aminoácidos. A enzima purificada (A.E. de  $100 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) é composta por uma cadeia polipeptídica simples e possui  $M_r$  de 13,6 e 17,8 kDa, como determinado através da filtração em gel e SDS-PAGE, respectivamente. A composição parcial de aminoácidos (Cys e Trp não foram determinados) foi obtida após a hidrólise ácida da proteína purificada seguida da análise dos resíduos de aminoácidos e evidenciou a existência de, pelo menos, 152 resíduos de aminoácidos. O estudo do efeito do pH na atividade enzimática revelou uma faixa de pH ótimo de 4,5 a 5,5. A enzima apresentou uma atividade máxima a  $60^\circ\text{C}$  e, nesta temperatura, maior estabilidade no pH 5,5. A atividade da enzima foi relativamente pouco sensível a diversos compostos, reagentes redutores de tióis e íons metálicos, exceto pela inibição por  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  e pela ativação por guanosina. O estudo de inibidores demonstrou insensibilidade ao tartarato e fluoreto e inibição por vanadato ( $K_i$ ,  $0,465 \mu\text{M}$ ), piridoxal-5-fosfato ( $K_i$ ,  $2,18 \mu\text{M}$ ), fosfato inorgânico ( $K_i$ ,  $0,769 \text{mM}$ ), pCMB e molibdato de amônio. A energia de ativação para a hidrólise do p-NPP, determinada pelo gráfico de Arrhenius, foi de  $43,31 \text{kJ.mol}^{-1}$ . A análise da capacidade da enzima catalisar a reação de transfosforilação demonstrou que diversos álcoois atuaram como aceptores de fosfato neste tipo de reação, tendo se destacado o glicerol e o metanol como os melhores aceptores. Dos substratos testados, o p-NPP,  $\beta$ -Naftil-P, a FMN e a Tyr-P foram os únicos hidrolisados significativamente com  $K_M$  de 0,14; 0,4; 0,3 e 7,9 mM, respectivamente. A faixa de pH ótimo para a hidrólise da Tyr-P e FMN foi de 5,0 a 5,5.

## SUMMARY

A low molecular weight bovine kidney acid phosphatase was purified 1640-fold to homogeneity, with 7% recovery, by a procedure involving ammonium sulfate fractionation, acid treatment, and SP-Sephadex ion-exchange chromatography with ion-affinity elution. The following homogeneity criteria were used: specific activity, PAGE, SDS-PAGE, gel filtration (Superdex HR 70) and amino acid composition. The purified enzyme (specific activity  $100 \mu\text{mol mL}^{-1}\text{mg}^{-1}$ ) contained a single peptide chain and had a relative molecular mass of 13.6 and 17.8 kDa as determined by gel filtration chromatography and SDS-PAGE, respectively. The partial amino acid composition of this enzyme, after acid hydrolysis, showed at least 152 amino acid residues. The amino acid Cys and Trp were not determined. The p-NPP hydrolysis reaction catalyzed by this enzyme had a broad pH optimum of 4.5-5.5 and maximal activity at  $60^\circ\text{C}$ . In this temperature the enzyme was more stable at pH 5.5. Reducing thiol compounds, metal ions and other different compounds did not affect significantly the enzyme activity except for the inhibition by  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  and activation by guanosine. The enzyme was also inhibited by vanadate ( $K_i$ ,  $0.465 \mu\text{M}$ ), pyridoxal-5-phosphate ( $K_i$ ,  $2.18 \mu\text{M}$ ), inorganic phosphate ( $K_i$ ,  $.769 \text{ mM}$ ), pCMB and ammonium molybdate. Both tartrate and fluoride were very weak inhibitors. An activation energy value of  $43.31 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  was determined from Arrhenius plot for the hydrolysis of p-NPP reaction catalyzed by the enzyme. Both glycerol and methanol increased significantly the acid phosphatase activity, acting as good acceptors in the transphosphorylation reaction also catalyzed by the enzyme. The apparent  $K_M$  values obtained, at  $37^\circ\text{C}$  and pH 5.0, for the best substrates were 0.14 mM, 0.4 mM, 0.3 mM and 7.9 mM for p-NPP,  $\beta$ -Naphthyl-P, FMN and Tyr-P, respectively. At the same conditions, a pH optimum value of 5.0-5.5, was obtained for the FMN- and Tyr-P-directed acid phosphatase reaction.

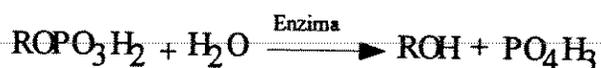
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Aspectos Gerais

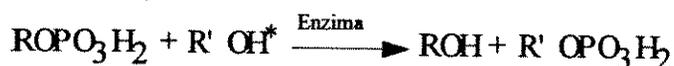
A fosfatase ácida (FAC) ou ortofosfato monoéster fosfohidrolase (E.C. 3.1.3.2) é amplamente distribuída na natureza e sua atividade se caracteriza pela hidrólise de uma grande variedade de ésteres ortofosfato e também por reações de transfosforilação.

Essas duas reações podem ser esquematizadas da seguinte maneira:

**Hidrólise:**



**Transfosforilação:**



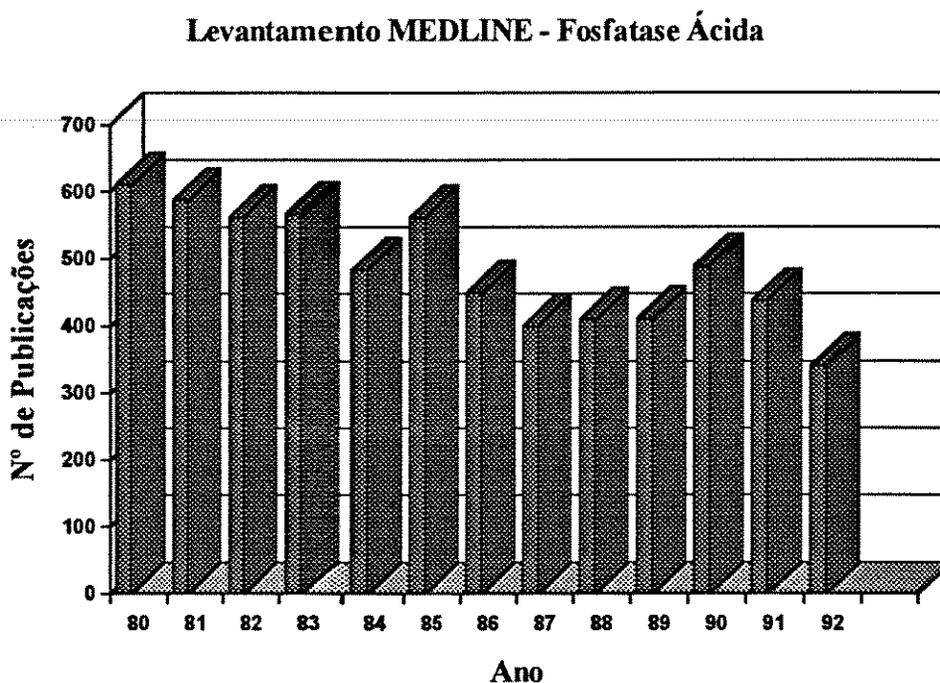
\* Aceptor: Álcool

Uma retrospectiva histórica nos mostra que a atividade da fosfatase ácida foi identificada por ROCHE (1931) ao observar a presença, em eritrócitos, de uma enzima capaz de hidrolisar a ligação ésterfosfato do monofenilfosfato e monoalquilfosfato com um pH ótimo entre 5,6 e 6,0, diferentemente da fosfatase de glóbulos brancos que catalisa esta reação com um pH ótimo de 8,8 a 9,0.

Por um longo período, a distinção entre fosfatases ácidas e alcalinas foi baseada no pH ótimo. Posteriormente, outras características mais intrínsecas do mecanismo de reação serviram para melhor diferenciar essas duas enzimas. Assim, além dos substratos usuais, observou-se que as fosfatases alcalinas catalisam a hidrólise de monoésteres S-substituídos de ácido fosfortiósico do tipo  $\text{RSPO}_3\text{Na}_2$  junto à ligação S-P, produzindo ortofosfato e o correspondente tio-álcool. Por sua vez, as fosfatases ácidas catalisam a hidrólise de monoésteres O-substituídos de ácido fosfortiósico do tipo  $\text{ROPO}_2\text{SKH}$ , produzindo o álcool e o ácido tiosfosfórico (NEUMAN, 1968). Outro aspecto observado é a insensibilidade das FACs à presença de cátions mono e divalentes no meio de reação (CHAIMOVICH & NOME, 1970), ao contrário das fosfatases alcalinas, as quais requerem metais para sua atividade, principalmente o  $\text{Mg}^{2+}$  (REID & WILSON, 1971). Esses fatos nos

permitted visualizing mechanisms of reaction different for the two enzymes, suggesting the requirement of an oxygen atom between the radical and the phosphate for the activity of the acid phosphatase.

As FAc's have been studied from the most different points of view. The graph below shows the variation of the number of publications on acid phosphatases over the last 13 years.



The numbers were extracted from Medline, which includes the Index Medicus and the Index Dental Literature, and was restricted to the period covered between 1980 and 1992. In these 13 years, about 6,400 works were published and indexed in the above cited works. It is important to emphasize that this is a partial number because Medline does not cover all the periodicals where acid phosphatase is published, such as for example Chemical Abstracts and Biological Abstracts.

However, there are no recent bibliographic revisions on acid phosphatases. The last ones were described in the article by HOLLANDER (1971) and in the thesis of

doutoramento de TAGA (1979).

Desta maneira, no presente trabalho, julgamos conveniente destacar alguns aspectos da literatura, direcionando-os aos eventos mais relacionados aos nossos propósitos.

## 1.2. Distribuição da Fosfatase Ácida

Os estudos acerca da fosfatase ácida demonstraram que esta enzima é amplamente distribuída tanto no reino vegetal (BARBER et alii, 1971; KNOX & HESLOP, 1971; MEYER et alii, 1971; KUBICZ, 1973; JACOB & SONTAG, 1974; UEHARA et alii, 1974; PARK & VAN ETEN, 1986; ULLAH & GIBSON, 1988; PANARA, PASQUALINI & ANTONIELLI, 1990), em animais (BALDIJÃO et alii, 1975; GALKA et alii, 1980; LAWRENCE & VAN ETEN, 1981; BAXTER & SUELTER, 1985; WAHEED et alii, 1988; ZHANG & VAN ETEN, 1990) e em microrganismos (FITZGERALD, 1952; TSUBOI et alii, 1957; BOER & STEIN-PARVÉ, 1966; MATSUMURA, 1968; YOSHIDA & TAMIYA, 1971; DIBENEDETTO & COZZANI, 1975; SHIMADA, SHINMYO & ENATSU, 1977; LOVELACE; DWYER & GOTTLIEB, 1986; McLAUGHLIN, 1986; HASSAN & COOMBS, 1987; SCHELL, STIERHOF & OVERATH, 1990).

A investigação da fosfatase ácida em microrganismos é particularmente importante em tripanossomastídeos, mais especificamente em espécies de *Leishmania*, responsáveis por significativa morbidade e mortalidade no mundo. Através de técnicas histoquímicas, demonstrou-se que as formas promastigotas contêm abundante atividade fosfatásica, localizada assimetricamente na membrana externa da célula (GOTTLIEB & DWYER, 1981). REMALEY et alii (1985a), identificaram 3 fosfatases ácidas da fração de membrana de promastigotas de *L. donovani* todas com  $M_r$  acima de 100 kDa e distintas quanto à sensibilidade a inibidores (especialmente complexos polianiônicos de molibdênio), quanto ao  $pI$  e especificidade para o substrato. Estudos de localização citoquímica em *L. mexicana amazonensis* (PIMENTA & De SOUZA, 1986), e imunoquímica em *L. donovani* (BATES; HERMES & DWYER, 1989), mostraram que o estágio amastigoto também produz uma fosfatase ácida solúvel, mas a identificação da FAc localizada na membrana plasmática, neste estágio é controversa.

Evidências de um possível papel fisiológico para a fosfatase ácida de

membrana foi sugerido por REMALEY et alii (1984 e 1985b), os quais demonstraram que uma preparação de fosfatase ácida pura inibia a produção do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio, tanto quanto diminuía o consumo de O<sub>2</sub> pelos neutrófilos humanos estimulados. Sugere-se ainda (DAS et alii, 1986) que a capacidade de desfosforilar um segundo mensageiro intracelular envolvido na ativação do sistema fagocitário (o inositol trifosfato), poderia comprometer a resposta da célula hospedeira à infecção.

Quanto ao reino vegetal, existem muitos relatos sobre a identificação e purificação de FAc em tecidos de plantas como em folhas de trigo (ROBERTS, 1956), milho (SLACK; HATCH & GOODCHILD, 1969), tabaco (SHAW, 1966), em plantas superiores (BOROUGHES, 1954), túber de batata doce (UEHARA; FUJIMOTO & TANIGUCHI, 1974), no látex da *Hevea Brasiliensis* (JACOB & SONTAG, 1974), em escutelo de semente de milho em germinação (ROSSI et alii, 1981), na membrana tilacóide de *Sorghum vulgare* (RENGASAMY; SELVAN & GNANAM, 1981), em semente de amendoim (BASHA, 1984), de girassol (PARK & VAN ETTEN, 1986), de algodão (BHARGAVA & SACHAR, 1987), de soja (ULLAH & GIBSON, 1988), no pólen de *Brassica campestris* e *Lilium regale* (STROTHER et alii, 1985), na camada aleurônica (GABARD & JONES, 1986) e coleótilos da cevada (PASQUALINI et alii, 1992), na parede celular de células de tabaco em cultura (KANEKO; KIKUTI & KUBOTA, 1990), em culturas de endosperma de milho (MIERNYK, 1992).

A importância do estudo das FAc em plantas decorre da possível participação desta enzima no metabolismo do fósforo, elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento normais dos órgãos das plantas (BASHA, 1984). A localização desta enzima em plantas, no citoplasma e na parede celular, tem sido confirmada por métodos citoquímicos e sua atividade encontra-se aumentada durante a germinação ou deficiência de fosfato inorgânico (GABARD & JONES, 1984 e LEE, 1988). As enzimas da parede celular têm sido associadas à hidrólise de determinados substratos oferecidos externamente à célula em tecidos não danificados. As FAc extracelulares de raiz poderiam tornar acessível para a absorção uma quantidade adicional de fosfato inorgânico a partir de sua liberação da matéria orgânica do solo. Neste caso, identificou-se em laboratório, que certos ésteres fosfato (inositol hexafosfato, inosina monofosfato e glicerofosfato) seriam fontes efetivas de fosfato para o crescimento do trigo, arroz, rabanete (LEE, 1988).

As fosfatases ácidas em plantas têm sido detectadas em formas moleculares múltiplas, algumas delas apresentam-se como glicoproteínas. Estes fatores explicam, ao menos em parte, as variadas propriedades cinéticas apresentadas. A purificação e caracterização das isoformas nos órgãos de plantas é necessária, a fim de permitir o estudo do possível papel desta enzima nestes tecidos.

A revisão da literatura realizada por TAGA em 1979 destaca a ocorrência da FAc em diversos tecidos animais tais como: próstata, placenta, corpo lúteo, testículo, útero, cérebro, fígado, tireóide, coração, rim, baço, glândulas salivares, osso, dente, periodonto, gengiva, pele, nervos e gânglios nervosos. No sangue, ela pode ser detectada tanto nos eritrócitos e leucócitos, como no plasma onde, algumas vezes, é utilizada para o diagnóstico de algumas doenças. É encontrada somente em quantidades pequenas nos músculos esquelético e cardíaco, no pâncreas e na mucosa do intestino delgado. Na cauda de girino, parece estar relacionada com a metamorfose. De modo geral, é encontrada nos fluidos corporais: plasma e líquido intersticial (ROSENBLIT et alii, 1974), líquido sinovial (BECKMAN et alii, 1971) e líquido amniótico (HERAK et alii, 1970); nas secreções, como saliva (LURA, 1947; DENTAY & RAE, 1949; NAKAMURA et alii, 1970; BENEDEK-SPAT, 1973), leite (ANDREWS & PALLAVICINI, 1973) e sêmen (GONZALEZ & NEISEL, 1973) onde é de grande importância na medicina legal para a identificação de manchas suspeitas (HOEHN et alii, 1971); e nas excreções, como urina, provavelmente por contaminação pelo sêmen (SCHMIDT, 1961) e mecônio (ELIAKIS & COUTSELINIS, 1971).

Células de origem mesenquimal, que estão ativamente envolvidas na digestão intra e/ou extra celular, bem como células epiteliais, contêm elevados níveis de atividade da fosfatase ácida. A distribuição e propriedades da FAc de células de origem mesenquimal, indicam uma interrelação entre células mononucleares e multinucleares ativamente envolvidas em algum processo digestivo (EGGERT & GERMAIN, 1980). No interior celular são encontradas invariavelmente nos lisossomos (sendo considerada como um marcador lisossomal por DE DUVE et alii em 1955 e DE DUVE, WATTIAUX & BAUDHUIN, 1962), mas também no citoplasma (DE ARAÚJO; MIES & MIRANDA, 1976) e, segundo alguns autores, nos microssomos (LIN & FISHMAN, 1972), aparelho de Golgi (JONESCU & JONESCU, 1970; FREILICH, 1971; NYQUIST & NOLLENHAUER, 1973; COLEMAN; SCHOFIELD & McDONALD, 1980) e membrana celular (HIMENO

et alii, 1989 e 1991).

Utilizando a fosfatase ácida como uma ferramenta para o estudo histoquímico dos tecidos, ISACSSON (1986), avaliou a distribuição da fosfatase ácida em glândula salivar de ratos, utilizando o  $\alpha$ -naftil fosfato como substrato. Seus resultados mostraram uma forte atividade fosfatásica na glândula parótida acinar e nos ductos secretores proximais das células, em oposição à ausência de atividade nas glândulas mucosas menores. Relataram ainda que o fluoreto e o molibdato inibem completamente a atividade da fosfatase ácida em todas as estruturas analisadas. Posteriormente, HARRISON, AUGER & BADIR (1988), identificaram, histoquimicamente, atividade de fosfatase ácida em glândulas salivares parótida e submandibular. Foi ainda utilizada na identificação de osteoclastos (HERMANNNS, 1987; AKISAKA et alii, 1989), fibroblastos secretando ou reabsorvendo colágeno (YAJIMA, 1988), em células espermáticas de *Ceratis capitata*, onde a enzima estaria, possivelmente, envolvida no metabolismo do fosfato. Parece claro que as enzimas hidrolíticas, em particular, participam ativamente do processo de diferenciação das células espermáticas (BÁO & DOLDER, 1990).

Em 1983, LILJA, LINDSKOG & HAMMARSTROM, analisaram a degradação tecidual causada por movimentação dentária ortodôntica em ratos. Verificaram nas primeiras 10 horas de tratamento ortodôntico, que as células contendo fosfatase ácida mudaram de uma distribuição não específica para se concentrarem nas zonas de pressão. A alta atividade encontrada estaria relacionada com a reabsorção óssea e a remodelação do ligamento periodontal.

### 1.3. Formas Isoenzimáticas

A FAc não apenas é amplamente distribuída na natureza, como também existe sob diversas formas isoenzimáticas em um mesmo tecido, isoformas estas distintas quanto à  $M_r$ , especificidades quanto a substratos, sensibilidade a inibidores,  $pI$ , presença e número de carboidratos ligados à cadeia polipeptídica.

Em raiz de trigo foram detectadas 3 FAc solúveis no citoplasma: FAc-1 (64,0 kDa), FAc-2 (52,0 kDa) e FAc-3 (28,0 kDa) e 2 ligadas à parede celular: FAc-4 (62,0 kDa) e FAc-5 (30,0 kDa). As fosfatases ligadas à membrana somente foram extraídas, em parte, após a incubação com NaCl. Todas as isoformas foram

separadas por filtração em gel e cromatografia de troca-iônica. A não especificidade quanto ao substrato levou alguns autores (HASEGAWA; LYNN & BROCKBANK, 1976), a sugerir o envolvimento das fosfatases de membrana na mobilização de fosfato a partir do fosfato orgânico do solo. A fosfatase ácida do túber de batata foi purificada e caracterizada por KRUZEL & MORAWIECKA (1982), os quais demonstraram também a existência de carboidratos em sua estrutura. A análise da composição de aminoácidos revelou que 38% dos resíduos eram constituídos por Asp, Ser, Glu e Gly, podendo os dois primeiros estar envolvidos na formação das ligações glicosídicas entre a proteína e a estrutura de carboidratos (KUBICZ; MORAWIECKA & KRUZEL, 1974). Analisando o perfil enzimático da FAc em raiz de cevada, PANARA; PASQUALINI & ANTONIELLI (1990), identificaram 5 formas: 2 solúveis ( $S_1$  e  $S_2$ ) e 3 ligadas à parede celular ( $W_1$ ,  $W_2$  e  $W_3$ ), extraídas em tampão contendo NaCl. As frações correspondentes a  $S_1$  e  $W_2$  apresentaram uma  $M_r$  de 76,0 kDa, as frações  $S_2$  e  $W_3$  de 25,0 kDa e a  $W_1$  de 166,0 kDa. Um aspecto interessante quanto a formas múltiplas da FAc ocorre em sementes de *Vigna sinensis* (BISWAS & CUNDIFF, 1991). Quando da germinação da semente, ocorre um aumento significativo na atividade de algumas isoformas, bem como outras somente são sintetizadas após 24-48 horas do início da germinação. Neste tecido, 4 FAc foram separadas e parcialmente purificadas e apresentaram as seguintes  $M_r$ : FAc-I - 150,0 kDa; FAc-II - 99,0 kDa; FAc-III - 48,0 kDa; FAc-IV - 62,0 kDa. Os autores sugeriram que estas enzimas estariam envolvidas com a renovação de diferentes compostos fosforilados.

Embora diversos parâmetros cinéticos para cada isoforma tenham sido estabelecidos, o significado fisiológico das mesmas é incerto. Sabe-se que o fosfato está envolvido em uma variedade de reações durante o desenvolvimento celular como a formação de ácidos nucleicos, fosfolipídeos, açúcares fosfatados, entre outras. Dessa maneira, a atividade fosfatásica durante a germinação deveria ser maior, a fim de reciclar o fosfato nas células embrionárias em proliferação. Isto seria obtido pela célula aumentando a quantidade da enzima ou através de isoformas com diferentes afinidades pelos substratos nas condições existentes na célula., conferindo uma vantagem a mais ao embrião em germinação do que a existência de apenas uma simples enzima. Em função das propriedades bioquímicas comuns, BISWAS & CUNDIFF, 1991, sugerem que esta classe de enzimas possa ser controlada pelo mesmo gene estrutural .

Em mamíferos, o que normalmente ocorre é algo similar ao observado por DI PIETRO & ZENGERLE (1967) que evidenciaram 3 isoenzimas na placenta humana denominando-as I, II e III. Segundo seus cálculos, as mesmas teriam  $M_r > 200,0$ ;  $> 105,0$  e  $> 35,0$  kDa, respectivamente. As isoenzimas de APM (I e II) eram bastante inespecíficas com relação ao substrato, possuindo padrões de ativação e inibição exatamente opostos à isoenzima III e assemelhando-se bastante às enzimas lisossomais. A isoenzima III, atípica em relação às primeiras (DI PIETRO, 1968), exibiu uma reatividade inesperada sobre o 17- $\beta$ -estradiol-3-fosfato, com menor  $K_M$  e maior  $V_{max}$  do que com o p-NPP, substrato padrão para quase todas as fosfatases ácidas. Ressalta-se que essa é uma das primeiras referências a uma atividade específica da isoenzima III na literatura, onde uma fosfatase ácida de BPM apresentou uma clara preferência por determinado substrato, que não o clássico p-NPP. Tanto a isoenzima I como a II, de APM, não hidrolisaram o 17- $\beta$ -estradiol-3-fosfato.

Duas isoenzimas da fosfatase ácida,  $E_1 (> 100,0$  kDa) e  $E_2 (< 40,0$  kDa), foram purificadas a partir da tibia e fêmur de ratos recém-nascidos (ANDERSON & TOVERUD, 1979). As características de  $E_1$  (sensível ao tartarato), assemelham-se às FAcS de APM dos tecidos moles, sugerindo que se localizam nas vesículas de Golgi e nos lisossomos de osteoblastos. Muito embora  $E_2$  (insensível ao tartarato) tenha sido fortemente inibida por pCMB, difere das FAcS de BPM dos tecidos moles em função da especificidade de substratos, uma vez que hidrolisa preferencialmente ADP e ATP. Esta isoenzima pode ser responsável pela maioria, se não toda atividade fosfatásica detectável nos lisossomos, nas dobras da membrana celular e nos vacúolos de osteoclastos. Destaca-se o estímulo da atividade enzimática da  $E_2$  em presença de  $Fe^{2+}$  (principalmente quando associado à presença de ascorbato), mesmo em meio neutro, o que seria importante se a enzima desempenhasse sua função biológica em pH fisiológico normal, função esta que estaria correlacionada à reabsorção óssea (ANDERSON & TOVERUD, 1982).

FUJIMOTO et alii (1984) relataram a existência de isoformas da FAc e sua distribuição em vários tecidos de mamíferos como rim, fígado, cérebro, pâncreas, baço, intestino e estômago de bovinos; rim e fígado de ratos; rim de porco, coelho, cachorro e cobaia. Este polimorfismo também foi identificado em lisossomos de fibroblastos humanos, onde diferenças qualitativas e quantitativas na composição da FAc foram observadas entre o compartimento pré-lisossomal e os lisossomos,

através da análise ultra-estrutural. O estudo mostrou que a fosfatase ácida encontrada nos pré-lisossomos de fibroblastos humanos em cultura pode ser distinguida citoquímica, bioquímica e imunologicamente daquela presente nos lisossomos (KELLY et alii, 1989).

DISSING & SVENSMARK, em 1990, purificaram e caracterizaram as isoenzimas A, B e C de eritrócitos humanos, codificados por três alelos (ACP1<sup>\*A</sup>, ACP1<sup>\*B</sup> e ACP1<sup>\*C</sup>), cada um deles gerando duas isoenzimas, *f* e *s*. As 6 isoenzimas (A*f*, A*s*, B*f*, B*s*, C*f*, C*s*) possuem  $M_r$  aproximado de 18 kDa. Os estudos cinéticos e físico-químicos apontam diferenças significantes entre as isoenzimas *f* e *s*. Contudo, apesar de geneticamente diferentes, as isoenzimas *f* exibiram propriedades similares, se não idênticas, tendo o mesmo ocorrido entre as isoenzimas *s*. Os autores sugerem que as isoenzimas *f* e *s* possuem diferentes funções na célula.

PANARA et alii (1992), estudando comparativamente diversos tecidos em mamíferos, identificaram múltiplas formas da fosfatase ácida. Seus resultados indicaram que a fosfatase ácida de APM é preferencialmente expressa em tecidos que estão em proliferação celular. Por outro lado, a de BPM parece ser característica dos tecidos altamente diferenciados como nervos, músculos e eritrócitos.

Tem sido observado que muitas das FAc conhecidas são glicoproteínas heterogêneas cuja multiplicidade se deve, em parte, às variações nos resíduos de carboidratos. Em 1985, KUBICZ; WAHEED & VAN ETTEN, isolaram e caracterizaram uma FAc de APM do fígado de bagre (um dímero de  $M_r$  de 82,5 kDa), possivelmente uma metaloenzima, em duas isoformas distintas quanto ao pI. O conjunto de resultados sugere que as diferentes conformações das isoenzimas podem ser influenciadas pelas unidades de carboidratos. A importância das cadeias oligosacarídicas foi ainda reforçada por MRSA et alii (1989) após verificarem que formas glicosiladas da fosfatase ácida secretada por levedura (*S. cerevisiae*) foram significativamente mais estáveis que as formas não glicosiladas. Alguns estudos buscaram ainda verificar distintas bioatividades de diferentes glicofomas (JANSKA; KUBICZ & SZALEWICZ, 1989), heterogeneidade oligosacarídica (KUBICZ et alii, 1990; KUBICZ; SZALEWICZ & CHRAMBACH, 1991), composição de aminoácidos e propriedades imunoquímicas das glicofomas (SZALEWICZ et alii, 1992). Entretanto, somente em poucos casos a relação entre a

multiplicidade de isoformas enzimáticas e variações de carboidratos foi reforçada pela análise de carboidratos, como relatado para as fosfatases ácidas de próstata humana (OSTROWSKI et alii, 1976), de próstata canina (SAINI & VAN ETTEN, 1978; McTIGUE & VAN ETTEN, 1982) e de fígado de carpa (JANSKA & KUBICZ, 1985).

Assim, de maneira geral, as fosfatases ácidas de animais podem ser classificadas em 4 classes, de acordo com a  $M_r$  e sua localização subcelular, a saber: FAc-I, 200,0 kDa, associada à fração microssomal; FAc-II, 100,0 kDa, de origem lisossomal; FAc-III, 40,0 kDa e FAc-IV, de 8,0 a 18,0 kDa, ambas solúveis no citoplasma (FILBURN, 1973; DE ARAÚJO; MIES & MIRANDA, 1976; BAXTER & SUELTER, 1984).

Porém, quanto às características físico-químicas e cinéticas podem se enquadrar em 3 grupos. As fosfatases ácidas de APM ( $> 100,0$  kDa), normalmente são inibidas por tartarato e fluoreto e insensíveis a agentes bloqueadores de grupos -SH e ao formaldeído. Apresentam ao menos uma histidina essencial à catálise, localizada próximo ou no sítio ativo (VAN ETTEN & McTIGUE, 1977; TAGA, 1979; SKINNGSRUD & NUSTAD, 1982). As fosfatases ácidas de BPM ( $< 20,0$  kDa), apresentam grupos -SH reduzidos próximos ou no sítio ativo, implicados no mecanismo de catálise (BALDIJÃO et alii, 1975). São apontadas como isoenzimas importantes no metabolismo de células diferenciadas não proliferantes do tecido nervoso (CHAIMOVICH & NOME, 1970), em eritrócitos (WHITE & BUTTERWORTH, 1971) e em células musculares (BAXTER & SUELTER, 1985). Apresentam marcante inibição por agentes bloqueadores de grupos -SH, metais pesados e são insensíveis ao tartarato e fluoreto. Suas atividades são independente de metais e exibem, em relação às outras classes, uma maior especificidade quanto ao substrato (FILBURN, 1973). Uma terceira classe de fosfatases ácidas compreende as enzimas de PMI (entre 30,0 e 60,0 kDa). Apresentam uma baixa especificidade quanto a substratos embora possa-se identificar uma atividade significativa sobre nucleotídeos fosfatados, piridoxal-5-fosfato,  $\beta$ -glicerofosfato e  $\text{NADP}^+$ . A sensibilidade ao tartarato e fluoreto é variável, mas íons metálicos e pCMB interferem fracamente (PANARA; ANGIOLILLO & PASCOLINI, 1989; VINCENT & AVERILL, 1990a). As FAc de APM e de PMI normalmente são glicoproteínas e, especialmente a FAc de PMI, possui um núcleo metálico em sua estrutura (HARA et alii, 1984; BURMAN et alii, 1986; JANSKA et alii, 1986).

Uma rara exceção nos estudos de isoformas enzimáticas é o relato de ANDREWS & PALLAVICINI (1973), os quais identificaram apenas uma FAc no leite bovino. Porém, os autores ressaltaram que, em função da técnica empregada no primeiro passo de purificação (troca aniônica), não se podia excluir a existência de outra(s) isoenzima(s) que não teria(m) se adsorvido à resina.

#### 1.4. Purificação, Características Físico-Químicas e Cinéticas

Desde a identificação da fosfatase ácida por ROCHE em 1931, um número imenso de trabalhos tem se referido à purificação da fosfatase ácida de diversas fontes porém, a grande variabilidade de formas isoenzimáticas com características próprias, impediu a utilização de uma técnica única para sua purificação. Assim, de acordo com a isoenzima de interesse e a fonte de estudo, lançou-se mão de procedimentos específicos. Com relação à purificação e caracterização de FAc de APM e PMI, cujos estudos fogem do objetivo de nosso trabalho, destacamos na Tabela I algumas das referências mais significativas.

Quanto às FAc de BPM, um dos primeiros trabalhos de purificação foi realizado por HEINRIKSON em 1969, a partir do fígado bovino ( $M_r$  de 16,0 kDa). A enzima foi purificada 4300 vezes, com um rendimento de 15% e uma A.E. de 52 UE/mg. Exibiu um pH ótimo em torno de 5,5 e a atividade permaneceu estável na presença de fosfato ou EDTA, mesmo em soluções diluídas, mas instável em presença de  $Mg^{2+}$  ou 2-mercaptoetanol. Os únicos substratos hidrolisados em uma taxa considerável foram o p-NPP, a FMN e a glicose-6-fosfato. Uma vez que a enzima se liga a uma resina de troca catiônica e pode ser eluída pela ação do fosfato inorgânico (inibidor competitivo e produto da reação catalisada pela enzima), o autor sugere que o sítio ativo da FAc de BPM possua uma região catiônica, como proposto para a ribonuclease.

CHAIMOVICH & NOME (1970) purificaram a FAc de BPM do cérebro bovino (13,0 kDa) através de uma modificação da técnica de HEINRIKSON (1969). A enzima foi purificada mais de 800 vezes, com um rendimento de 32% e A.E. de 25 UE/mg. Estudos do efeito do pH revelaram uma larga faixa de pH ótimo (de 4,8 a 5,8); diversos metais divalentes foram testados e apresentaram leve inibição ou nenhum efeito, com exceção do  $Cu^{2+}$  e  $Hg^{2+}$ , fortemente inibidores. O EDTA não teve efeito e a inibição por  $Hg^{2+}$ , NEM e pCMB, esta última, revertida pela adição de 2-mercaptoetanol, levaram os autores a sugerir que algum grupo -SH

seria importante para a atividade enzimática. Estudos de inibição e transfosforilação para o metanol usando dois diferentes substratos, realizado por BALDIJÃO et alii (1975), indicaram que a FAc de BPM do cérebro bovino forma uma fosforil-enzima, sendo que o passo de fosforilação não poderia ser o limitante da velocidade. Os estudos de inibição com pCMB e DTNB indicaram a existência de 2 grupos -SH livres essenciais a atividade catalítica. Relataram ainda que o substrato não protegia contra a ação do pCMB, ao contrário, causava inicialmente um aumento na inibição. Este efeito foi visto como uma mudança da estequiometria da inibição, causada pela exposição de um dos grupos -SH na presença do substrato. A aparente inibição ocorreria através da transferência interna do inibidor, de um grupo -SH para outro. Posteriormente, o papel desses grupos SH foram mais detalhadamente estudados (BITTENCOURT & CHAIMOVICH, 1976), concluindo-se que um dos grupos -SH da FAc de BPM do cérebro bovino estaria envolvido em uma interação sensível à força iônica com outro(s) grupo(s) que afetaria(m) sua reatividade.

**TABELA I. Relação de fosfatases ácidas de APM e BPM purificadas de diversas fontes.**

REFERÊNCIA	FONTE	TECIDO	APM	PMI
ROBINSON & GLEW, 1980	Humano	baço		X
DAVIS; LIN & AVERILL, 1981	Humano	baço		X
RUSCIANO et alii, 1988	Humano	próstata	X	
HAYMAN et alii, 1989	Humano	osteoclastoma		X
KUBICZ; WAHEED & VAN ETEN, 1985	Peixe	fígado	X	
KATO et alii, 1986	Rato	osso		X
BINGHAN & GARVER, 1990	Bovino	glândula mamária		X
JACOB & SONTAG, 1974	Seringueira	látex	X	
RENGASAMY; SELVAN & GNANAM, 1981	Sorgo	membrana tilacóide		X
ROSSI et alii, 1981	Milho	escutelo		X
SUGIURA et alii, 1981	Batata Doce	túber	X	
PARK & VAN ETEN, 1986	Girassol	semente	X	
HEFLER & AVERILL, 1987	Batata Doce	túber	X	
ULLAH & GIBSON, 1988	Soja	cotilédone		X
KANEKO; KIKUTI & KUBOTA, 1990	Tabaco	folha		X
MIERNYK, 1992	Milho	endosperma		X

A menor das 3 formas da fosfatase ácida do fígado bovino foi purificada mais de 9.000 vezes por LAWRENCE & VAN ETTEN (1981) e mostrou-se homogênea à análise em diversos métodos. A  $M_r$  foi calculada em 14,4 (Sephadex G-75), 16,1 (SDS-PAGE) e 16,5 kDa (composição aminoácidos). O estudo revelou diferenças significantes em relação à purificação anteriormente publicada por HEINRIKSON (1969); revelou também propriedades comuns às FAc de BPM de outras fontes, incluindo o efeito de inibidores e a existência de um resíduo de cisteína essencial à atividade. Os autores sugeriram ainda que o grupo sulfidrílico atuava formando um intermediário fosfo-enzima e discutiram que a cisteína do sítio ativo funcionava não apenas como um catalisador nucleofílico na enzima mas imaginaram-na envolvida na manutenção da estrutura. TAGA & VAN ETTEN (1982) purificaram até a homogeneidade a FAc de BPM do fígado humano, a qual apresentou uma cadeia polipeptídica única e  $M_r$  de 14,4 kDa (SDS-PAGE). A análise de aminoácidos revelou 6 resíduos de cisteína, 2 de metionina e 3 de histidina. A enzima catalisou ainda a hidrólise do acetilfosfato com uma velocidade 8 vezes maior que a referida para a acilfosfatase de eritrócito humano. No mesmo ano, LAIDLER; TAGA & VAN ETTEN, trataram a fosfatase ácida de fígado humano com vários reagentes específicos para grupos sulfidrílicos. A análise global dos resultados é consistente com a interpretação de que existem 6 grupos sulfidrílicos livres sendo, ao menos um, essencial à atividade enzimática.

Em 1984, BAXTER & SUELTER relataram um aumento de 80% na atividade fosfatásica do músculo peitoral distrófico de aves, o qual foi devido à forma citossólica de BPM. A forma lisossomal não apresentou aumento significativo. No ano seguinte, os mesmos autores purificaram a enzima de baixo peso do músculo distrófico. Esta apresentou-se em duas formas, A e B, diferentes sob diversos aspectos como o  $pI$ , especificidade quanto ao substrato e no efeito causado pela guanosina (somente a forma B é ativada). Ambas enzimas hidrolisaram FMN, mas somente a forma A hidrolisou a fosfo-tirosina no pH 5,0; no pH 7,0, somente a FMN e o 4-metil-umbeliferilfosfato foram hidrolisados significativamente. Entretanto, nenhuma das isoenzimas foi capaz de atuar sobre a cadeia leve de miosina fosforilada. Os autores verificaram que em tecidos com alta taxa catabólica a atividade da FAc de BPM era maior e sugeriram um papel ativo dessas enzimas nestes processos catabólicos (BAXTER & SUELTER, 1985).

Reforçando a hipótese daqueles autores, CHERNOFF & LI relataram em 1985, um dos primeiros estudos relacionando a atividade PTPP (fosfotirosina-proteína fosfatase) com as fosfatases ácidas. Esta enzima de 15,0 kDa, purificada por CHERNOFF & LI em 1983, não era retida em DEAE-celulose e apresentava semelhanças com a FAc de BPM de outros tecidos (SHIBKO & TAPEL, 1963; HEINRIKSON, 1969; HOFFMAN & DI PIETRO, 1972; DE ARAÚJO, MIES & MIRANDA, 1976; TAGA & VAN ETEN, 1982). Baseados em publicações anteriores CHERNOFF & LI (1985) propuseram que qualquer fosfatase capaz de hidrolisar o p-NPP, independente da forma molecular, localização celular ou tecidual, possuiria uma atividade proteína fosfatase altamente específica para proteínas tirosina fosforiladas. Esta atividade poderia representar uma função biológica das fosfatases ácidas. Outro aspecto abordado foi a forte inibição na atividade PTPP, causada pelo vanadato, tanto da FAc de BPM como da FAc de APM. Entretanto, como verificaram uma inibição pelo molibdato mais intensa que com o vanadato, sugeriram maiores estudos a fim de verificar qual deles seria um inibidor mais específico das PTPPs.

Em 1988, WAHEED et alii, purificaram até a homogeneidade uma fosfatase ácida da placenta humana não identificada por DI PIETRO e ZENGERLE em 1967. Utilizando uma modificação do processo empregado por TAGA & VAN ETEN em 1982, os autores obtiveram um alto rendimento (43%) possivelmente devido à eliminação da precipitação isoelétrica e de repetidas cromatografias de troca iônica no processo de purificação. O estudo da especificidade do substrato mostrou que a enzima era capaz de hidrolisar preferencialmente a Tyr-P em relação a outros aminoácidos fosforilados, bem como a angiotensina I, banda 3 de eritrócitos e a tirosina quinase p<sup>40</sup>. Duas características são muito interessantes nesta fosfatase ácida. A primeira é a inibição da enzima por DNA e a ligação entre ela e uma matriz DNA-celulose no pH 5,0 e não no pH 7,5, o que sugeria que esta ligação era do tipo eletrostático. A segunda característica é a presença de 20% de aminoácidos hidrofóbicos na composição da enzima, o que poderia explicar a formação de agregados proteicos em soluções com baixa concentração de proteínas ou em presença de moderada ou alta concentração de sais (glicerol a 10-20% previnha este efeito). Como consequência, ocorreria perda da atividade enzimática pela formação de ligações dissulfeto intermolecular entre os grupos tiólicos. Estes agregados inativos tiveram sua atividade completamente reativada após tratamento com guanidina-HCl 4M contendo DTT 10 mM seguido de diálise contra tampão

acetato 10 mM, pH 5,0.

A atividade fosfo-tirosínica da FAc de BPM citossólica foi demonstrada novamente em 1989 por RAMPONI et alii. A enzima purificada do fígado bovino atuou sobre o receptor ( $^{32}\text{P}$ )-autofosforilado do fator de crescimento epidermal, EGF, ( $K_M$  de 4 nM). O o-vanadato e pHMB (p-hidroximercuribenzoato) significativamente inibiram a reação, sugerindo o requerimento de grupos sulfidrílicos para a atividade PTPP. A enzima apresentou atividade em uma larga faixa de pH (5,5 a 7,5) e restrita à Tyr-P e ao receptor ( $^{32}\text{P}$ )-autofosforilado do EGF, não hidrolisando caseína-Ser-( $^{32}\text{P}$ ), Ser-P ou Thr-P. Os autores sugeriram que a FAc de BPM citossólica poderia ter um papel regulador na sinalização transmembrana dependente do receptor do EGF. Nesse mesmo ano, este grupo determinou a seqüência de aminoácidos completa desta enzima, composta de 157 resíduos de aminoácidos, tendo o grupo amino-terminal acetilado (esta acetilação tem sido postulada como característica de proteínas sintetizadas em polissomos livres no citoplasma), 8 resíduos cisteína na forma tiol livre e a arginina como resíduo carboxi-terminal. A  $M_r$  calculada pela seqüência foi de 17,9 kDa. Duas cisteínas (12 e 17) foram detectadas no ou próximas do sítio ativo através da reação com ( $^{14}\text{C}$ )-iodoacetato na presença e ausência de fosfato inorgânico (CAMICI et alii, 1989). Contudo, os autores sugeriram que a Cys-12 era a maior responsável pela inativação da enzima uma vez que apresentou uma reatividade com o iodoacetato 3,5 vezes maior que a Cys-17. Não foi identificada homologia seqüencial com duas isoenzimas de acilfosfatases conhecidas e nem com a fosfatase ácida púrpura ou com a Uteroferrina, as quais apresentam o grupo N-terminal livre.

Em 1990, SAEED et alii, purificaram a fosfatase ácida de BPM do cérebro bovino (17,4 kDa) através de um processo envolvendo o uso de cromatografia de afinidade composta do ácido p-aminobenzilfosfônico em suporte de agarose. Este tipo de cromatografia já havia sido utilizado com sucesso anteriormente por DISSING, DAHL e SVENSMARK (1979) para a purificação da fosfatase ácida de BPM de eritrócitos humanos. A purificação da FAc de BPM de cérebro bovino por esta técnica resultou em um rendimento de 14,8%, com uma A.E. de 110 UE/mg. A enzima consistia de uma cadeia polipeptídica simples e possuía propriedades cinéticas similares às outras FAc de BPM de outros tecidos, destacando-se a ativação da enzima por compostos como a guanosina e certos álcoois. Este tipo de ativação foi anteriormente estudada por TANIZAKI; BITTENCOURT &

CHAIMOVICH (1977), os quais demonstraram que os nucleotídeos de purina não se ligam à enzima livre, mas sim ao intermediário enzima-substrato. A ativação pelo glicerol resultou de uma reação de transfosforilação que competiu favoravelmente com a reação de hidrólise do intermediário fosfo-enzima. SAEED et alii (1990) relataram pela primeira vez a forte inibição competitiva da enzima pelo piridoxal-5-fosfato ( $K_i$  de 7  $\mu$ M), enquanto a piridoxamina-5-fosfato apresentou um  $K_i$  muito maior (13,7 mM), o que sugeria a existência de pelo menos um resíduo de lisina no sítio ativo. Estudos com compostos específicos (iodoacetato e 1,2-ciclohexanediona) revelaram ainda que a enzima devia possuir ao menos uma cisteína e arginina no sítio ativo. Com relação à especificidade de substrato destacaram que a FMN foi o único substrato fisiológico hidrolisado em uma taxa considerável e a hidrólise da Tyr-P reforçava a possibilidade da enzima estar envolvida na desfosforilação de proteínas fosforiladas em tirosina.

Ainda em 1990, DISSING e SVENSMARK, purificaram seis isoenzimas (As, Bs, Cs, Af, Bf, Cf) da fosfatase ácida de eritrócitos humanos (ACPI) até a homogeneidade. O processo de purificação envolveu uma cromatografia de troca iônica e duas cromatografias de afinidade (ácido p-aminobenzilfosfônico-Sepharose). O rendimento obtido foi de 34% com uma A.E. de 36 e 49 UE/mg de proteína, para as formas *f* e *s*, respectivamente. A  $M_r$  das isoenzimas foi estimado entre 17 e 18 kDa, sendo que o da forma *f* era ligeiramente superior ao da forma *s*. Estas duas formas apresentaram ainda significantes diferenças quanto a alguns parâmetros cinéticos e físico-químicos. As isoenzimas *f*, geneticamente diferentes, apresentaram características idênticas ou similares entre si, o mesmo ocorrendo com as isoenzimas *s*.

No mesmo ano, ZHANG e VAN ETTEN, purificaram a fosfatase ácida de BPM de coração bovino, com um rendimento de 31% e A.E. de 114 e 86 UE/mg e  $K_M$  de 0,38 e 14 mM para o p-NPP e Tyr-P, respectivamente. Devido à semelhança das características físico-químicas e cinéticas com as fosfatases ácidas de coração bovino (CHERNOFF e LI, 1985), de placenta humana (WAHEED et alii, 1988) e de cérebro bovino (RAMPONI et alii, 1989) os autores propuseram que o papel fisiológico desta enzima seria o de agir como uma PTPP. Baseados na especificidade para derivados Tyr-P e na potente ação inibitória do vanadato, reforçaram a hipótese de que esta inibição seletiva pelo vanadato dever-se-ia à formação de um éster tirosina-vanadato, similar ao substrato (ou ao estado de

transição). O éster tirosina-vanadato seria um inibidor mais potente das PTPP, do que o vanadato sozinho. Isto foi reforçado pela observação de que a constante de equilíbrio para a esterificação da tirosina-vanadato é muitas vezes maior que a constante de equilíbrio para éster de serina- e treonina-vanadato. Relataram ainda que a velocidade global de hidrólise do p-NPP na presença de um acceptor nucleofílico (álcool) aumentava sensivelmente em relação ao controle, composto apenas pela água como nucleófilo, enquanto o nível de fosfato inorgânico produzido permanecia relativamente constante. Estudos mecanísticos e cinéticos detalhados sobre a reação de hidrólise catalisada pela fosfatase ácida de BPM do coração bovino foram desenvolvidos por ZHANG & VAN ETTEN em 1991. Estes autores concluíram que a quebra do intermediário fosfo-enzima era o passo limitante da reação, confirmando a hipótese sugerida anteriormente (HICKEY & VAN ETTEN, 1972; OSTROWSKI & BARNARD, 1973; BALDIJÃO et alii, 1975; TANIZAKI; BITTENCOURT & CHAIMOVICH, 1977).

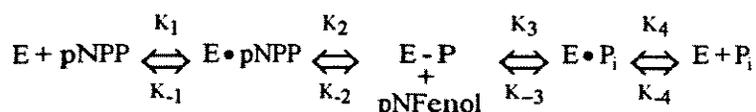
Concomitantemente, DISSING, JOHNSEN e SENSABAUGH (1991), determinaram a seqüência de aminoácidos das isoenzimas Bf e Bs codificadas pelo alelo ACPI<sup>\*B</sup>. Elas exibiram estruturas primárias similares, mas não idênticas, com uma única cadeia polipeptídica de 157 resíduos, acetilada no resíduo de alanina N-terminal. Ambas isoenzimas não apresentaram glicosilação e os pesos moleculares estimados foram de 17.9 e 17.8 kDa para as isoenzimas *f* e *s*, respectivamente. Os autores ressaltaram a grande homologia entre a isoenzima Bs e a fosfatase ácida citossólica do fígado bovino. Nenhuma homologia foi encontrada com outras proteínas sequenciadas, estabelecendo que esta fosfatase ácida de BPM seria produto de uma família de genes distintos.

ZHANG; DAVIS & VAN ETTEN (1992) realizaram estudos de modificação covalente e inativação dirigida ao sítio ativo com a finalidade de identificar os resíduos presentes no sítio ativo da PTPP de BPM do coração bovino. A re-análise de diversos experimentos anteriormente realizados deveu-se ainda à constatação de que o tampão cacodilato era um inibidor competitivo da enzima do fígado bovino. Os resultados obtidos sugeriram que ao menos um resíduo de arginina, dois de cisteína e um de histidina estariam próximos ou no sítio ativo. O estudo revelou que a histidina do sítio ativo podia ter duas funções: durante a fosforilação da enzima, ela podia atuar como um ácido, doando um próton para o grupo que sai, facilitando a partida do fenol ou álcool. Ou ainda, na desfosforilação do intermediário

fosfoenzima, a histidina agiria como uma base, auxiliando o ataque nucleofílico de uma molécula de água. Ainda em 1992, CHIARUGI et alii postularam diferentes papéis para quatro cisteínas presentes na PTPP do fígado bovino. Estes expressaram a enzima como uma proteína associada a proteína ligadora de maltose em *E. coli*. Os autores concluíram que Cys-12 e 17 estavam envolvidas diretamente no sítio ativo da enzima e sugeriram que Cys-62 e 145 possuíam apenas papel secundário na atividade catalítica desta enzima.

A fim de facilitar uma detalhada análise da estrutura e função da PTPP de BPM do coração bovino, WO et alii (1992), a clonaram, sequenciaram, e a expressaram em *E. coli*. A enzima expressa era solúvel e cataliticamente ativa, sendo facilmente isolada e purificada. A proteína recombinante apresentou  $M_r$  de 18,0 kDa (SDS-PAGE) e reação cruzada com o anticorpo obtido contra as enzimas do coração bovino e placenta humana. A seqüência de aminoácidos da região N-terminal da proteína expressa, após a remoção da metionina, mostrou-se idêntica à da enzima isolada diretamente do tecido bovino exceto pelo fato de que esta última possuía como N-terminal, uma alanina acetilada. Levando-se em conta os limites de erro experimental, os autores concluíram que as propriedades cinéticas da proteína recombinante e nativa eram as mesmas. As análises acerca de um intermediário covalente resultaram na identificação de um cisteinil fosfato. Estes resultados em conjunto com os de ZHANG; DAVIS & VAN ETTEN (1992), levaram este grupo de pesquisadores a propor um modelo de estrutura do sítio ativo e seu mecanismo de reação. O sítio ativo da enzima conteria uma bolsa hidrofóbica composta, ao menos, por outros quatro grupos funcionais: um resíduo de arginina, um de histidina e dois de cisteínas. A bolsa hidrofóbica define um importante elemento na especificidade do substrato uma vez que substratos com estruturas aromáticas são preferencialmente ligados (ZHANG & VAN ETTEN, 1990). A função do resíduo de arginina seria, presumivelmente, o de providenciar uma interação iônica com o fosfato e, assim, ancorar e orientar o substrato. O resíduo de cisteína com pKa de 7,5 (medido em presença de iodoacetamida ou epóxidos específicos para o sítio ativo) atuaria como nucleófilo do sítio ativo fosforilado durante o "turnover" da enzima. Podendo ainda participar em uma estrutura de par iônico tipo His<sup>+</sup>/Cys<sup>-</sup>, no complexo enzima-substrato. O resíduo de histidina poderia atuar como um ácido em potencial doando um próton para o oxigênio do grupo que sai (fenol), facilitando sua liberação. Por outro lado, na desfosforilação o resíduo de His atuaria como uma base, auxiliando o ataque nucleofílico da água uma vez que a ligação

cisteinil-fosfato isolada não era muito reativa. O aumento na velocidade de reação, comparada com a quebra espontânea de uma ligação tiol fosfato, poderia ser devido, ao menos em parte, aos efeitos de orientação e polarização causado pela arginina, uma vez que poderia se esperar que isto facilitasse o ataque nucleofílico da fosfoenzima pela água. O esquema cinético pode ser descrito por uma sequência ordenada uni-bi com no mínimo quatro passos (ZHANG & VAN ETTEN, 1991):



Muito embora avanços tenham sido obtidos no desenvolvimento de técnicas de purificação da fosfatase ácida de BPM e no estudo de suas características cinéticas, quase nada se sabe de definitivo com relação ao seu papel fisiológico e substratos naturais. Um dos primeiros substratos sugeridos como fisiológicos foi a FMN, a qual teria modificada sua permeabilidade através das membranas celulares, pela ação da FAc de BPM (TAGA & VAN ETTEN, 1982). Apesar de diversos autores relatarem a hidrólise da FMN pela FAc de BPM (TAGA & VAN ETTEN, 1982; SAEED et alii, 1990), poucos trabalhos estudaram mais a fundo esta característica. ZHANG & VAN ETTEN (1990) utilizaram a FMN e alguns análogos como substratos, apesar de serem formalmente ésteres alquil fosfatos. Demonstraram claramente que o substrato deve possuir algum tipo de grupamento aromático ligado à sua estrutura. A distância entre a estrutura aromática e o grupo inorgânico também é importante e até a presença de um grupo hidroxil adjacente pode ser favorável. Em 1992 FUCHS; SHEKELS & BERNLOHR caracterizaram cineticamente a atividade FMN-fosfatase da isoforma  $\beta$  da FAc de adipócitos. Esta isoenzima também apresenta uma atividade PTPP. Para este fim os autores utilizaram FAc de BPM codificada pelo gene humano ACP1 e clonado como uma proteína associada (GST-HAAP $\beta$ ), capaz de hidrolisar *in vitro* a Tyr-P, fosfo-ALBP (proteína fosforilada do adipócito ligadora de lipídio) e FMN. Os resultados mostraram que a atividade catalítica sobre a FMN foi maior do que sobre a Tyr-P ou fosfo-ALBP; a atividade FMN-fosfatase está localizada, em sua maioria (90%), no extrato solúvel e seu perfil de eluição coincide com o da atividade da FAc de BPM codificada pelo gene ACP1.

Muito embora a presença do fósforo nas proteínas seja conhecida há cerca de

100 anos, sua importância tem crescido desde a descoberta da regulação de enzimas pela fosforilação reversível. O interesse atual remonta aos trabalhos de KREBS, FISCHER & LARNER no período de 1955 a 1970, quando descobriram que o controle neural e hormonal do metabolismo do glicogênio nos músculos esqueléticos era mediado por mudanças no estado de fosforilação das enzimas glicogênio fosforilase, fosforilase quinase e glicogênio sintetase. Estas permaneceram como os únicos exemplos deste fenômeno até os anos 60 quando a situação mudou rapidamente após a descoberta da proteína quinase dependente do AMP-cíclico. Como resultado, um crescimento extraordinário e ainda acelerado nesta área exhibe dezenas de enzimas e incontáveis outras proteínas reguladas desta maneira.

A firme associação do fosfato à proteína ocorre de variadas formas. A mais comum envolve a esterificação do fosfato à Ser e Thr com quantidades menores ligadas à Lys, Arg, His, Asp, Glu e Cys. A ligação a resíduos de Tyr ocorrem com frequência bem menor, normalmente de 0,01 a 0,05% do conteúdo total de fosfoaminoácido de uma célula normal (HUNTER & SEFTON, 1980), entretanto, estes valores crescem para 1 a 3% quando as células são infectadas por vírus (SEFTON et alii, 1981; FRANK & SARTORELLI, 1986). A fosforilação reversível de proteínas é agora reconhecida como sendo o maior mecanismo de controle de eventos intracelulares em células eucarióticas (KREBS & BEAVO, 1979; COHEN, 1982; COHEN, 1989). Processos tão diversos quanto o metabolismo, contração, transporte e secreção através da membrana, transcrição e tradução de genes, divisão celular, fertilização e mesmo a memória, são todos regulados por esta versátil modificação pós-tradução. A fosforilação (ou desfosforilação) de resíduos de Ser, Thr e Tyr disparam mudanças conformacionais em proteínas específicas, alterando suas propriedades biológicas. O nível de fosforilação em qualquer momento, reflete a atividade relativa de proteínas quinases e fosfatases que catalisam o processo de interconversão.

As estruturas e funções de algumas proteínas quinases e seus mecanismos de regulação são bem conhecidos. Algumas são específicas para determinado substrato enquanto outras fosforilam uma variedade de proteínas intracelulares. A atividade de proteínas quinases são controladas por diversos meios, mais freqüentemente por segundo mensageiros e efetores alostéricos e pela fosforilação (MILLER, BENOIRE-PARSONS & WHITE, 1982; HUNTER & COOPER, 1985;

CARPENTER, 1987; BUDE & CHOLLET, 1988; LORD et alii, 1991; VALLANCE & WHETTON, 1991; LEDBETTER et alii, 1991; COHEN, 1992). Similarmente ao que ocorre com as proteínas quinases, as Ser/Thr-proteínas fosfatases tem sido alvo de intensos estudos com relação à sua estrutura, especificidade de substrato e regulação em células eucarióticas, mostrando inclusive que os procedimentos empregados para a identificação e quantificação das proteínas fosfatases em células animais são também aplicáveis a plantas superiores (DEANA et alii, 1982; POLYA & HARITOU, 1988; COHEN, 1989; MacKINTOSH & COHEN, 1989; MacKINTOSH, COGGINS & COHEN, 1991; YUPSANIS et alii, 1993). Apesar da grande importância da fosforilação (e desfosforilação) de Ser/Thr-proteínas, muita atenção tem sido focalizada na fosforilação da Tyr em proteínas celulares por quinases específicas. Este tipo de fosforilação tem sido relacionado com a regulação de atividades celulares incluindo proliferação, diferenciação e transformação. Diversos estudos relataram que o conteúdo de Tyr-P aumenta em até 500 vezes após a transformação causada por retrovírus oncogênicos onde proteínas necessárias para a transformação neoplásica de diversos vírus tumorogênicos exibem atividade Tyr-quinase (BISHOP, 1985). A identificação de Tyr-quinases não-virais, especialmente receptores de fatores de crescimento, também reforçam a importância da fosforilação de resíduos de Tyr na fisiologia de células não transformadas (HUNTER & COOPER, 1985; CARPENTER, 1987). Assim, a fim de que o sistema de fosforilação da Tyr sirva como um importante mecanismo fisiológico de regulação, o processo deve ser reversível, isto é, o processo de remoção do fosfato do resíduo de Tyr tem que existir. A atividade enzimática responsável pela desfosforilação de proteínas fosforiladas em tirosina é desempenhada pelas fosfo-tirosina proteínas fosfatases (PTPP). É razoável esperar que o nível de proteínas fosforiladas em tirosina na célula, resulte do balanço da atividade tanto de Tyr-quinases quanto das PTPP (POT & DIXON, 1992; WALTON & DIXON, 1993).

Dentre diversos trabalhos que reforçaram esta relação entre as Tyr-quinases e -fosfatases, destacam-se dois relatos. KLARLUND (1985) demonstrou que, em cultura de células NRK-1, a inibição da atividade PTPP através da ação do vanadato resultava na indução da transformação celular. O efeito foi dose-dependente, reversível e ocorreu em outras três linhagens de células de camundongo. Resultados semelhantes foram obtidos por KREMERSKOTHEN & BARNEKOW (1993), utilizando células de fibroblasto de embrião de galinha.

FRANK & SARTORELLI (1986) demonstraram que, apesar da atividade Tyr-quinase total aumentar marcadamente durante a diferenciação granulocítica e monocítica, esta atividade foi contrabalançada por uma grande elevação da atividade PTPP, sendo muito maior nas células maduras do que nas células HL-60 indiferenciadas, sugerindo que esta mudança é importante para a maturação.

A análise do efeito indutor do vanadato na acumulação de fosfo-tirosina juntamente com a ativação de consumo de  $O_2$  em células HL60 diferenciadas e permeabilizadas, demonstrou que estes efeitos dependem da presença de NADPH (TRUDEL, PÂQUET & GRINSTEIN, 1991). Traços de superóxido (produzido pela mitocôndria ou membrana microssomal) converteria o vanadato em  $V(4^+)-OO$  e  $V(4^+)-OOH$  em presença de NADPH, os quais parecem ser as espécies biologicamente ativas. Os peróxidos do vanadato são potentes inibidores da atividade PTPP, possivelmente pela formação de um análogo do estado de transição (STANKIEWICZ & GRESSER, 1988), o que resultaria no acúmulo de proteínas fosforiladas em Tyr em função da ação contínua de proteínas quinases constitutivas. A fosforilação de proteína(s) envolvida(s) na ativação da NADPH-oxidase promoveria um grande aumento na respiração, gerando mais superóxido. O superóxido produzido pelo estímulo da oxidase iria por sua vez aumentar a concentração de  $V(4^+)-OO$  e  $V(4^+)-OOH$ , amplificando fortemente a fosforilação e conseqüentemente o consumo de  $O_2$ . Destaca-se ainda o efeito sinérgico entre o vanadato e a água oxigenada mimetizando os efeitos da insulina, como por exemplo, o estímulo da fosforilação em diversas proteínas. Quando combinados, estes compostos apresentavam efeitos maiores do que a soma de seus efeitos individuais, os quais parecem ser secundários à inibição da atividade PTPP (KLARLUND, 1985; STANKIEWICZ & GRESSER, 1988; TRUDEL, PÂQUET & GRINSTEIN, 1991; GORDON, 1991).

As PTPP foram identificadas em diversos tecidos de mamíferos e plantas, apresentando-se sob diversas formas com seu  $M_r$  variando de 15 kDa a mais 100 kDa; de maneira geral são fortemente inibidas por  $Zn^{2+}$ , vanadato e molibdato. No entanto, a sensibilidade à presença de  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  e EDTA varia dentre as diversas formas de PTPP. A mesma diversidade é encontrada com relação à dependência de grupos tiólicos onde algumas formas são fortemente dependentes destes compostos (SHRINER & BRAUTIGAN, 1984). Quanto ao pH ótimo, porém, normalmente a atividade é máxima em meio neutro (CHERNOFF & LI,

1983 e 1985). Em função da existência de diversos tipos de PTPP com propriedades distintas, diversas técnicas de purificação e de ensaio da atividade foram estabelecidas (USHIRO & COHEN, 1980; LIN, 1980; CHERNOFF & LI, 1983; CLARI, BRUNATI & MORET, 1986; CHENG & TAO, 1989; LAU, FARLEY & BAYLINK, 1989; HUNTER, 1989; TROWBRIDGE, 1991; MILLAR & RUSSEL, 1992; POT & DIXON, 1992). A análise das diferenças entre este grupo de enzimas e as Ser- Thr-fosfatases, bem como as similaridades entre as proteínas com atividade específica sobre proteínas fosforiladas em resíduos de Tyr, demonstram claramente que as PTPP consistem de uma classe separada de enzimas (CHARBONNEAU et alii, 1988; TONKS et alii, 1988; TONKS, DILTZ & FISCHER, 1988a e b; CHARBONNEAU et alii, 1989; COOL et alii, 1989).

Um relato excitante com relação a este aspecto foi apresentado por LEIS & KAPLAN (1982). Estes identificaram uma fosfatase ácida na membrana plasmática do astrocitoma humano com marcada especificidade sobre proteínas fosforiladas em tirosina, não hidrolisando  $\beta$ -glicerofosfato, o-fosforilcolina, 5'-AMP, o-Ser-P ou o-Thr-P. Posteriormente, diversos autores relataram a identificação e purificação de fosfatases ácidas com especificidade para Tyr-P e/ou proteínas-P em diversos tipos de tecidos como na membrana tilacóide de cloroplastos do trigo (YANG; DANKO & MARKWELL, 1987), no osso (LAU; FARLEY & BAYLINK, 1987), na placenta humana (WAHEED et alii, 1988), no soro de pacientes com câncer de próstata (NGUYEN; CHAPDELAINÉ & CHEVALLER, 1990), em *Pseudomonas pseudomallei* e *Pseudomonas cepacia* (KANAI & KONDO, 1991). Recentemente, VINCENT & AVERILL (1990b), analisaram a seqüência de aminoácidos de algumas fosfo-proteínas fosfatase e fosfatases ácidas púrpura humana e encontraram regiões de homologia entre as seqüências. Concluíram através de seus resultados e outros estudos analíticos, que as fosfo-proteínas fosfatase 1, 2A e 2B são, provavelmente, metaloenzimas contendo ferro ou zinco, com sítios ativos estruturalmente iguais ou muito semelhantes àqueles apresentados pelas fosfatases ácidas púrpura.

Atualmente o progresso neste campo defronta-se com dois problemas básicos. Primeiro, o desconhecimento dos verdadeiros substratos fisiológicos destas enzimas e seus possíveis efetores/inibidores. Segundo, pelas dificuldades para sua purificação, muitas vezes resultando na obtenção de pequena quantidade da enzima, nem sempre homogênea, dificultando a realização dos estudos cinéticos e físico-

químicos. Estes problemas são também sentidos com relação ao estudo destas enzimas em plantas, onde a identificação da atividade PTPP ocorre mais escassamente que nos tecidos de mamíferos.

### 1.5. Importância do Estudo da Fosfatase Ácida

Como amplamente abordado nos itens anteriores, a fosfatase ácida mostra-se ubíquamente distribuída na natureza e em diversas formas moleculares com características distintas. Além deste aspecto, a literatura é rica em relatos associando a atividade enzimática alterada (quer aumentada, quer diminuída) em diversos processos patológicos, especialmente aqueles envolvendo processos infecciosos, inflamatórios ou tumorais. Exemplificando podemos citar que os níveis ou a atividade enzimática da fosfatase ácida de APM ou PMI encontra-se aumentada no extrato de tecido gengival de pacientes com periodontopatias (KINA, 1987); no soro de pacientes com carcinoma de próstata (HUDSON, TSUBOI & MITTELMAN, 1955), de pacientes com desordens renais (KUMAR & GUPTA, 1971), de pacientes com doença de Gaucher (ROBINSON & GLEW 1980), de pacientes com leucemia retículo endotelial (KETCHAM et alii, 1985); na saliva de pacientes com câncer bucal (POLICE & D'ALISE, 1961); no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide (BECKMAN et alii, 1971); no fluido uterino humano, podendo ser um índice de infertilidade (SINGH, 1991); a fosfatase ácida serve também para o acompanhamento do tratamento da osteoporose em pacientes submetidos à ovariectomia (STEPÁN et alii, 1989). Pode ainda ser utilizada como marcador histoquímico para estudo de osteoclastos (COLE & WALTERS, 1987); como marcador da virulência de populações de promastigotos de *Leishmania donovani* (SINGLA; KHULLER & VINAYAK, 1992) e como marcador do processo de mielinização em cérebro de rato em desenvolvimento (NG; CHAN & TAM, 1993); como marcador de macrófagos ativados (SCHINDELMEISER; GULLOTTA & MÜNSTERMANN, 1989).

O interesse no estudo da FAc de BPM se deve à sua possível participação nos processos de proliferação, crescimento e diferenciação celular uma vez que algumas isoenzimas são capazes de catalisar a hidrólise de proteínas fosforiladas em resíduos de Tyr. Contudo, sua função biológica ainda não foi determinada nem tampouco seus substrato fisiológico. A compreensão mais profunda do papel representado pela fosfatase ácida nestes processos somente será possível após um estudo mais detalhado das propriedades cinéticas dessas enzimas, o que contribuiria

para o esclarecimento de seu mecanismo de ação. Os resultados até hoje obtidos permitem sugerir o envolvimento desta enzima com o metabolismo de fosfolipídeos, na regulação das enzimas que necessitam de piridoxal-fosfato, no transporte de esteróides, no metabolismo da vitamina B<sub>6</sub>, no metabolismo ósseo e dental, na espermatogênese (SCHMIDT, 1961; TAGA, 1979), na metamorfose, durante a redução e perda da cauda dos urodelos (BENSON, 1972) e de girinos (FILBURN & VANABLE, 1973; ROBINSON, 1972).

## 2. PROPOSIÇÃO

Em função das variadas características apresentadas por FAc de BPM nos diferentes tecidos onde foi detectada, não há uma técnica única para sua purificação, sendo necessário estabelecer metodologias específicas a cada tecido em estudo. Algumas publicações têm relatado técnicas de purificação caras com o uso de cromatografias de afinidades, as quais nem sempre são disponíveis aos laboratórios com recursos limitados. Além disso, a análise da literatura nos revela a existência de poucos trabalhos voltados para o estudo da FAc de BPM, em especial a do rim bovino. HEINRIKSON relatou em 1969 a obtenção da FAc de BPM com uma aparente homogeneidade e A.E. de 45 UE/mg de proteína. Nenhum outro parâmetro foi investigado. Posteriormente, FUJIMOTO et alii, em 1984, publicaram a purificação e caracterização de duas isoenzimas da FAc de PMI do rim bovino. Para efeito de comparação de algumas propriedades, também purificaram as isoenzimas de APM e BPM. Neste trabalho, os autores analisaram o perfil destas isoenzimas nos diversos órgãos de bovinos, comparando com o de rato, coelho, suíno, cão e cobaia. A atividade relativa entre as 3 formas revelou que em diversos órgãos de bovinos, inclusive o rim, cerca de metade da atividade enzimática era proporcionada pela FAc de BPM. De toda atividade apresentada no extrato de rim, cerca de 50% localizava-se no córtex renal, 15% na medula e 30% na papila. FUJIMOTO et alii realizaram a purificação através da mesma técnica empregada por HEINRIKSON, 1969. Não apresentaram os dados de uma tabela de purificação, não sendo possível calcular o rendimento ou atividade específica.

Assim, a ausência de um trabalho específico e profundo sobre a purificação e caracterização da Fac de BPM do rim bovino, aliada à detecção de uma possível atividade PTPP, nos conduziram ao estudo desta enzima. O presente trabalho tem como objetivo a purificação da fosfatase ácida de BPM do rim bovino e sua caracterização por parâmetros eletroforéticos, físico-químicos e cinéticos. O projeto visa abordar dois pontos fundamentais como a utilização de uma metodologia simples e de baixo custo para a purificação da fosfatase ácida de BPM constituído de fracionamento com sal neutro, precipitação isoelétrica, uso de colunas cromatográficas de troca iônica e exclusão molecular. A enzima purificada será caracterizada quanto a seus parâmetros cinéticos, como  $V_{max}$ ,  $K_M$ , especificidade de substrato, inibidores, efeito da temperatura e do pH, estabilidade térmica aliada ao estudo de possíveis efetores de sua atividade e de prováveis aceptores de fosfato.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Obtenção do rim bovino

O rim bovino foi obtido do frigorífico Mondelli, Bauru (SP), removido logo após o sacrifício do animal, transportado para o laboratório em gelo moído, limpo e estocado a -20 °C.

##### 3.1.2. Reagentes

Resinas para as colunas cromatográficas: SP-Sephadex C50-120 e Sephadex G25 (Sigma Chemical Co.); Superdex HR 70 10/30 (Pharmacia).

Reagentes para eletroforese: Acrilamida, N'-N'-Metilenebisacrilamida, TEMED, Persulfato de Amônio, Azul de Bromofenol, Riboflavina, Coomassie Brilliant Blue, Fast Blue BB e  $\beta$ -Naftil Fosfato (Sigma Chemical Co.).

Substratos: p-Nitrofenil Fosfato,  $\beta$ -Naftil Fosfato, Flavina Mononucleotídeo, Tirosina Fosfato, Serina Fosfato, Treonina Fosfato,  $\beta$ -Glicerofosfato, AMP, D-Glicose-1-Fosfato, Piridoxal-5-Fosfato, Ácido-6-Fosfoglicurônico (Sigma Chemical Co.).

Inibidores: Molibdato de Amônio, Fluoreto de Sódio, EDTA (E. Merck Darmstadt), o-Vanadato, m-Vanadato, pCMB, Piridoxal-HCl (Sigma Chemical Co.).

Reagentes para preparo dos tampões: Ácido Acético, Glicina (E. Merck Darmstadt); Hepes, Imidazol, Glicil-glicina, Tris (Sigma Chemical Co.).

Reagentes redutores de tióis: Ditioneitol, Glutathione Reduzida, 2-mercaptoetanol (Sigma Chemical Co.).

Padrões para determinação da  $M_r$ : para filtração em gel (Pharmacia) e SDS-PAGE (Sigma Chemical Co.).

Todos os demais reagentes utilizados possuíam grau analítico. As soluções foram preparadas com água bi-destilada e deionizada.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Determinação da Atividade Enzimática

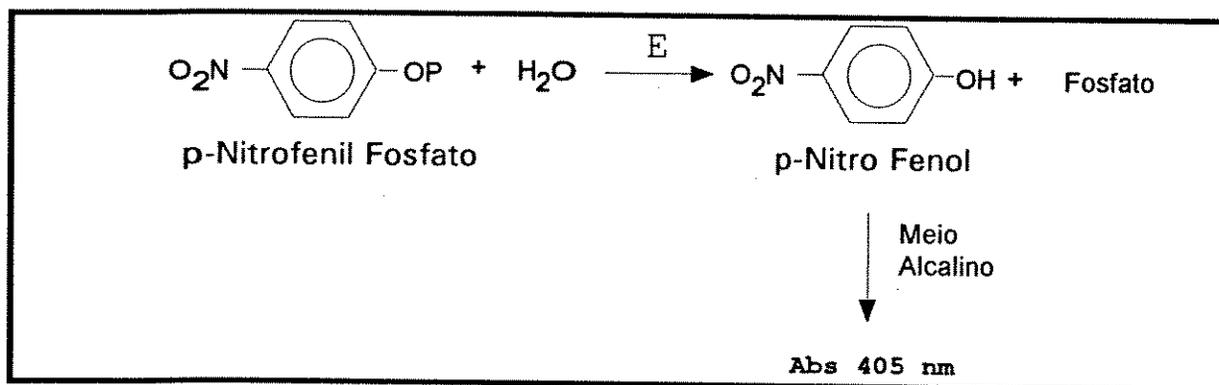
Para a determinação da atividade, a menos que se indique especificamente, a enzima foi diluída em tampão acetato 100 mM, pH 5,0, imediatamente antes do ensaio, e mantida a 4°C.

A atividade enzimática foi determinada através de dois métodos: formação do p-Nitrofenol, utilizando o p-NPP como substrato e determinando-se a quantidade de fosfato liberado, utilizando-se outros fosfatos orgânicos como substratos.

#### a) Determinação do p-Nitrofenol (p-NFenol)

Para um volume final de 2,0 mL, a reação foi iniciada pela adição da enzima a um meio contendo 100 mM de tampão acetato de sódio, pH 5,0, e 5 mM do p-NPP. A paralisação ocorreu pela adição de 1,0 mL de NaOH 1,0 N, após incubação por 2 min a 37°C. Nos controles a enzima foi adicionada após a colocação do NaOH.

A formação do p-Nitrofenol foi determinada espectrofotometricamente pela leitura da absorção a 405 nm (espectrofotômetro DU-2, Beckman), tomando-se o valor de  $17.800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  como coeficiente de extinção molar da forma do p-nitrofenóxido (CHAIMOVICH & NOME, 1970). A reação ocorre segundo o seguinte esquema:



(ESQUEMA 1)

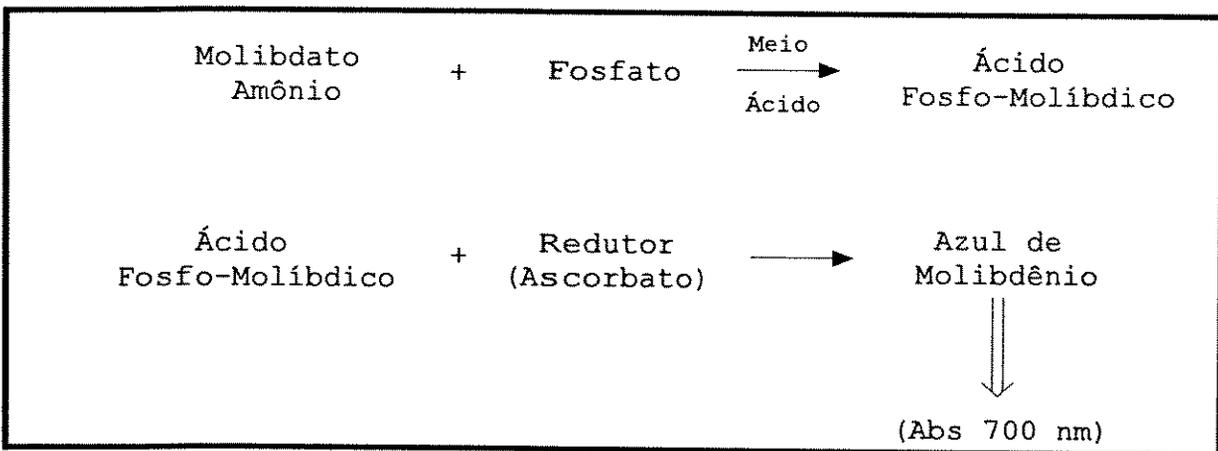
Uma Unidade de Atividade Enzimática (UE) é definida como a quantidade

de enzima necessária para produzir 1  $\mu\text{mol}$  de p-Nitrofenol por minuto.

A Atividade Enzimática Específica (A.E.) é expressa como Unidade de Atividade Enzimática por miligrama de proteína (A.E. = UE/mg).

### *b) Determinação do Fosfato Inorgânico*

A velocidade da reação também foi determinada pela quantificação do fosfato liberado durante a hidrólise do substrato, como descrito por LOWRY & LOPES (1945). A reação procedeu essencialmente como descrito em (3.2.1.a), exceto pela paralisação do ensaio com 1,0 mL de molibdato de amônio 3% (em acetato de sódio 0,2 M, pH 4,0). A coloração foi desenvolvida pela adição de ácido ascórbico 1% (em acetato de sódio 0,2 M, pH 4,0). Nos controles a enzima foi adicionada após a paralisação com molibdato de amônio 3% em todos os ensaios. Após 30 min a temperatura ambiente, mediu-se a absorbância a 700 nm. Coeficiente de extinção molar do azul de molibdênio:  $4.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Este método baseia-se na seguinte reação:



(ESQUEMA 2)

### 3.2.2. Determinação de Proteína

A proteína foi quantificada pelo método de LOWRY como descrito por HARTREE (1972). A reação foi iniciada pela adição de 2,0 mL do Reagente C a 0,2 mL da Amostra. Após 10 min, adicionou-se 0,2 mL do Reagente de Folin (1:1). A leitura da Absorbância foi realizada a 660 ou 750 nm após 30 min de espera a temperatura ambiente. Como padrão utilizou-se a albumina de soro bovino.

- . Reagente A - Carbonato sódio 2% em NaOH 0,1 N
- . Reagente B -  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,5% em Citrato de Sódio 1%
- . Reagente C - 1 mL Reagente B + 50 mL Reagente A
- . Reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 1:1 em  $\text{H}_2\text{O}$ )

O perfil proteico obtido das colunas cromatográficas foi estabelecido através da leitura direta da  $A_{280}$  (LAYNE, 1957).

### **3.2.3. Tratamento das Resinas**

A resina de troca iônica SP-Sephadex C50-120 e a de filtração em gel Sephadex G-25 foram hidratadas com água deionizada e, posteriormente, tratadas com o tampão de equilíbrio adequado de acordo com FISHER (1969). Imediatamente antes da montagem da coluna a suspensão contendo a resina foi deaerada.

### **3.2.4. Concentração da Solução Proteica**

As soluções proteicas (concentração proteica maior que 1,0 mg/mL) foram concentradas por precipitação com sulfato de amônio sólido a 60% de saturação. A concentração de soluções diluídas nas etapas finais de purificação foi realizada por ultrafiltração sob pressão de nitrogênio em um aparelho AMICON R.402, utilizando-se membranas Millipore do tipo UM-10 e PM-10.

### **3.2.5. Purificação da Fosfatase Ácida de BPM do Rim Bovino**

As etapas abaixo descritas foram realizadas a 4 °C.

O rim bovino, fresco ou descongelado (1,5 kg), cortado em fatias e moído em um processador de carnes doméstico (Britânia), foi homogeneizado em tampão acetato 300 mM, pH 5,0 (homogeneizador Omni-mixer, 3 min, veloc. máx.), na proporção de 1,0 g de tecido para 4,0 mL de tampão. A solução final obtida permaneceu sob agitação por 60 min. Em seguida, centrifugou-se o homogeneizado a 10.000 x g, por 20 min. Desprezado o precipitado, coletou-se o sobrenadante, o qual foi filtrado em gaze dobrada 4 vezes. O efluente obtido constituiu o extrato límpido.

### *Fracionamento com Sulfato de Amônio*

Realizou-se o fracionamento a 30% de saturação adicionando-se sulfato de amônio sólido (164 g por litro de solução) ao extrato que permaneceu sob agitação lenta por 2 horas. Em seguida, centrifugou-se a 10.000 x g, por 20 min. O precipitado foi desprezado e coletou-se o sobrenadante ao qual adicionou-se sulfato de amônio até 60% de saturação (181 g por litro de solução). Adicionado paulatinamente todo o sal, a solução foi deixada sob agitação lenta por 2 horas. Após este período, centrifugou-se novamente a solução a 10.000 x g por 20 min. Desta vez o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso, no menor volume possível, em tampão acetato 10 mM, pH 5,0, contendo cloreto de sódio 250 mM.

### *Precipitação Isoelétrica*

À solução obtida na fase anterior adicionou-se ácido acético glacial 2 M (frio), sob agitação, até atingir o pH 4,15. Imediatamente após, centrifugou-se a 15.000 x g por 20 min e desprezou-se o precipitado. O pH do sobrenadante foi reajustado a pH 5,0 pelo acréscimo de tampão Tris 2 M (frio), sob agitação.

### *Concentração com Sulfato de Amônio*

A solução fracionada pela variação no pH foi concentrada com sulfato de amônio sólido a 60% de saturação (361 g por litro). Após 2 horas sob agitação, a solução foi centrifugada a 10.000 x g por 20 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em tampão acetato 10 mM, pH 5,0 contendo EDTA 5 mM e 2-Mercaptoetanol 1 mM, no menor volume possível. A suspensão foi clarificada por centrifugação a 20.000 x g por 20 min.

### *Cromatografia em SP-Sephadex - I*

A amostra clarificada (300 mL) foi aplicada a uma coluna de SP-Sephadex (4,5 x 16,5 cm) previamente equilibrada com tampão acetato 10 mM (pH 5,0). A lavagem da coluna ocorreu com o mesmo tampão até  $A_{280}$  praticamente igual a zero. A eluição da atividade se deu aplicando-se tampão fosfato 300 mM (pH 6,0). Foram coletadas frações de 25,0 mL, sob um fluxo de 4,0 mL/min (bomba

peristáltica BP-100, Incibrás). As frações eluídas com o tampão fosfato contendo mais do que 0,1 UE/mL foram reunidas e a solução resultante foi concentrada com sulfato de amônio sólido a 75% de saturação e centrifugada a 6.000 x g por 30 min. O precipitado foi ressuspensão em tampão acetato 10 mM (pH 5,0).

### *Cromatografia em SP-Sephadex - II*

A fração da etapa anterior (14,6 mL) foi aplicada a uma segunda coluna de SP-Sephadex (2,5 x 9,0 cm) previamente equilibrada com tampão acetato 10 mM, pH 5,0, contendo sulfato de amônio 100 mM. A coluna foi lavada com o mesmo tampão até A<sub>280</sub> praticamente igual a zero. A enzima foi eluída como descrito anteriormente e as frações (20,0 mL) contendo atividade superior a 0,1 UE/mL foram reunidas (pool IV) e concentradas por ultrafiltração (Material e Métodos, 3.2.4). Para estudos posteriores a enzima foi armazenada a -20°C em presença de glicerol 50% e 2-mercaptoetanol 10<sup>-3</sup> M.

### **3.2.6. Estudos Eletroforéticos**

#### *Eletroforese em pH 4,3 - Condições Não Desnaturantes*

Foi realizada conforme descrito por REISFELD et alii (1962), utilizando-se o tampão acetato pH 4,3 no gel de separação. A eletroforese em disco foi realizada em uma coluna de gel de poliacrilamida (PAGE), consistindo de 2 partes: (1) gel de concentração com poros de maior diâmetro; e (2) gel de corrida com poros de menor diâmetro onde ocorre a separação eletroforética da proteína. As condições de preparo dos géis, bem como das soluções são essencialmente as descritas por REISFELD et alii (1962). A eletroforese foi executada aplicando-se uma corrente de 5 mA por tubo, até que o marcador ("front") estivesse próximo da extremidade inferior do gel. Ao final, os géis foram imediatamente removidos do tubo de vidro com auxílio de uma seringa onde a agulha é passada suavemente entre o gel e a parede do vidro, em movimentos circulares tomando o cuidado de não quebrar o gel, ao mesmo tempo em que se injetou uma fina camada de água ou tampão de corrida entre o gel e o tubo.

O gel foi corado como descrito por VESTERBERG (1972). A solução corante era constituída de 0,3 g de "Coomassie Brilliant Blue", dissolvido em uma solução contendo 75,0 mL de metanol, 186,0 mL de água deionizada e, em seguida, adicionados 9,0 g de ácido sulfosalicílico e 30,0 g de ácido

tricloroacético. O tempo de coloração variou, para todos os sistemas, de 1 a 2 horas; ao final deste período os géis corados para proteína e atividade foram descorados por lavagens em solução contendo 80,0 mL de ácido acético e 250 mL de etanol por litro de solução, de acordo com VESTERBERG (1972). A estocagem dos géis se deu em uma solução de ácido acético 7% dentro de tubos longos e de pequeno diâmetro com tampa plástica de rosca.

### *Detecção de Atividade Enzimática no Gel de Eletroforese*

A eletroforese para a detecção da atividade enzimática no gel de poliacrilamida foi realizada através de uma modificação do método de ALLEN & GOCKERMAN (1964). O gel de separação foi preparado na concentração final de 7,5% em tampão Histidina-NaOH 50 mM, pH 7,5. O tampão dos eletrodos foi Histidina 10 mM, sendo o pH ajustado para 7,5 com Tris. Após a polimerização do gel (40 min) realizou-se uma pré-corrida em câmara fria (4°C) por cerca de 4 a 5 horas. Esta pré-corrida teve por finalidade eliminar o persulfato de amônio e, principalmente, a obtenção de uma diferença de potencial entre 300 a 400 volts e uma corrente de 5 mA por tubo. Ao final da pré-corrida, trocou-se o tampão dos eletrodos e a amostra foi colocada em tampão (Histidina-Tris) contendo 10% de glicerol. A corrida propriamente dita foi iniciada com uma corrente de 5 mA por tubo e teve uma duração de 4 horas. Entretanto, após as primeiras 2 horas, trocou-se a solução tampão dos eletrodos antes de prosseguir a corrida pelas últimas 2 horas.

A atividade enzimática foi demonstrada no gel de acordo com a técnica de GOMES (1978) usando  $\beta$ -Naftil fosfato (50 mM) e Fast Blue BB (1 mg/mL) em tampão Tris-Maleato (100 mM), pH 6,0. O gel foi incubado no sistema descrito acima a 37°C até o aparecimento da coloração. Esta variou conforme a concentração de enzima utilizada na corrida. Os géis foram descorados como descrito nos item anterior.

### **3.2.7. Determinação da Composição de Aminoácidos**

Uma alíquota de 200  $\mu$ l da enzima (1,76 mg/mL) foi aplicada a uma coluna de Sephadex G-25 (11 x 1,5 cm), previamente equilibrada com tampão acetato 100 mM, pH 5,0, com o objetivo de remover o glicerol e o 2-mercaptoetanol presentes na amostra. Em seguida, a amostra (cerca de 200  $\mu$ g) foi liofilizada e

submetida à hidrólise com HCl 6,0 N, contendo algumas gotas de fenol, por um período de 24 horas a 110°C e analisada pelo analisador de aminoácidos automático Beckman, modelo 7.300. Todo o procedimento foi realizado em duplicata.

### 3.2.8. Determinação da Massa Molecular

#### *a) Filtração em Gel (Superdex HR 70)*

A  $M_r$  da enzima pura foi determinado por filtração em Superdex HR 70 10/30, acoplada a um sistema FPLC da Pharmacia, equilibrada em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, contendo 2-mercaptoetanol 1,0 mM. A coluna foi calibrada com as seguintes proteínas de  $M_r$  conhecida: Quimotripsinogênio A (25,60 kDa), Ovalbumina (43,0 kDa), Albumina de Soro Bovino (66,3 kDa) e Azul de Dextrana (2.000,0 kDa).

#### *b) Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS*

A mobilidade eletroforética em condições desnaturantes foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida (10,0%) contendo SDS de acordo com a técnica de WEBER & OSBORNE (1969). As seguintes proteínas de  $M_r$  conhecida foram utilizadas como padrões: Lisozima (14,3 kDa),  $\beta$ -Lactoglobulina (18,4 kDa), Tripsinogênio (24,0 kDa), Pepsina (34,7 kDa) e Albumina de Soro Bovino (66,3 kDa).

Os géis de poliacrilamida na concentração de 10,0% de acrilamida e 0,3% de bisacrilamida, foram preparados em tampão fosfato de sódio 200 mM (pH 7,2), contendo 1,0% de SDS e colocados a polimerizar em tubos de 8,0 x 0,6 cm. Os dois compartimentos do aparelho de eletroforese foram preenchidos com o tampão do gel diluído 1:1 com água deionizada. As amostras para a corrida foram preparadas tomando-se 1 volume de cada amostra ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e 9 volumes do tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0, contendo 1,0% de SDS, 1,0% de 2-mercaptoetanol, azul de bromofenol 0,05% em água e 1 gota de glicerol sendo incubadas por 5 min a 100°C. Estas amostras de proteínas foram cuidadosamente pipetadas em cada tubo e a corrida eletroforética, com uma corrente elétrica de 8 mA por tubo, teve duração de 4 horas e foi realizada a temperatura ambiente.

A coloração dos géis foi realizada durante 2 horas com uma solução

contendo 1,25 g de "Coomassie Brilliant Blue" em uma mistura de 454 mL de metanol 50% e 46 mL de ácido acético glacial. A descoloração foi obtida após lavagens sucessivas em uma solução contendo 75 mL de ácido acético glacial, 50 mL de metanol e 875 mL de água deionizada.

### 3.2.9. Determinação dos Parâmetros Cinéticos

Os parâmetros cinéticos da reação catalisada pela FAc de BPM do rim bovino foram determinados utilizando-se o p-NPP como substrato (Material e Métodos 3.2.1.a), incubando-se 10 min. Todos os ensaios cinéticos, sem exceção, foram feitos, ao menos, em quadruplicata.

### 3.2.10. Estudos de Inativação Térmica

A inativação térmica da enzima foi realizada a diferentes valores de pH e na temperatura de 60°C. Cerca de 17,6 µg de enzima foram pré-incubadas nas condições acima descritas e, a intervalos de tempo definidos; alíquotas de 500 µl foram retiradas e colocadas em gelo moído. Logo após, a atividade enzimática foi determinada conforme descrito em Métodos (3.2.1.a) sendo a concentração final da enzima 0,88 µg por tubo.

### 3.2.11. Efeito de Compostos na Atividade

O efeito de diversos compostos na atividade da FAc de BPM do rim bovino foi verificado como descrito em Material e Métodos (3.2.1.a ou b), a 37°C por 10 min. A atividade na ausência do composto foi tomada como 100%.

### 3.2.12. Determinação da Energia de Ativação

A energia de ativação ( $E_a$ ) foi determinada através do gráfico de Arrhenius:

$$\log V_{\max} \times \frac{1}{T}$$

### 3.2.13. Estudos de Transfosforilação

O ensaio foi realizado utilizando-se o p-NPP como substrato conforme descrito em Métodos (3.2.1.a, b e 3.2.9.) na presença e ausência de possíveis aceptores. A transferência do fosfato para o aceptor, catalisada pela enzima, pode ser verificada quantificando-se o fosfato inorgânico (Pi) produzido pela hidrólise

do substrato na ausência ou presença do acceptor em potencial. Nas mesmas condições, também quantificou-se a formação do p-NFenol. Se o composto acrescido ao meio de ensaio efetivamente receber o fosfato do substrato por transfosforilação catalisada pela enzima, haverá uma diferença entre o nível de p-NFenol (que expressará a máxima capacidade de hidrólise da enzima) e o de Pi no meio de reação pois, uma parte do fosfato será transferido para o acceptor. A atividade de transfosforilação é dada, então, pela razão entre o p-Nitrofenol e Pi produzidos nas mesmas condições experimentais. A transferência será tanto maior quanto menor a concentração do Pi acumulado no meio de reação.

#### **3.2.14. Estudos de Especificidade**

A atividade da enzima sobre substratos em potencial foi testada quantificando-se o fosfato liberado como descrito em Material em Métodos (3.2.1.b). A atividade sobre o p-NPP foi tomada como 100%.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Purificação

A fosfatase ácida de rim bovino (1,5 kg) foi purificada cerca de 1640 vezes, com uma atividade específica de 100 UE/mg e um rendimento de 7%. Não se notou diferenças no rendimento ou processamento do rim fresco, recém colhido, e aquele estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A Tabela II exhibe um resumo dos passos fundamentais para o processo de purificação.

Algumas condições para a extração da fosfatase ácida do tecido foram testadas variando-se a relação entre o volume do tampão/grama de tecido de 1 a 5. O pH foi estabelecido em 5,0 em função da experiência anteriormente adquirida pelo laboratório no estudo de fosfatase ácida e nos relatos da literatura. Escolhida a condição ótima (4:1), obtinha-se com regularidade uma atividade enzimática de cerca de 0,7 U/ml no extrato, o que correspondia, em média, a 2,4 UE/grama de tecido de rim bruto, com uma atividade enzimática específica de 0,061 UE/mg de proteína (Tabela 1). A quantidade de proteína no extrato correspondia a aproximadamente 5% da quantidade de rim utilizado.

A etapa de fracionamento com sulfato de amônio apresentou, em média, cerca de 10% de perda na atividade enzimática da fosfatase ácida em relação ao extrato sem contudo promover aumento significativo na A.E.. Este passo associado à precipitação ácida e concentração com sulfato de amônio resultava em uma grande perda da atividade enzimática, cerca de 60%. Porém, esta perda sempre era acompanhada pela redução em até 70% da proteína total existente no extrato mas a A.E. apenas passava de 0,061 para 0,097 UE/mg.

A primeira cromatografia em SP-Sephadex (Figura 1) apresentou um pico de atividade durante a lavagem da coluna (tampão acetato 100 mM, pH 5,0) o qual é coincidente com um pico de grande concentração proteica (pool I). Durante a eluição com tampão fosfato (300 mM), outro pico de atividade foi obtido juntamente com um pequeno pico de proteína (pool II).

De maneira similar ao passo anterior, a segunda cromatografia em SP-Sephadex (Figura 2) mostrou-se reproduzível nas diversas purificações. O equilíbrio da resina com um tampão de maior força iônica (sulfato de amônio 100 mM)

proporcionou a resolução de dois picos de atividade enzimática, um destes eluído por tampão fosfato (300 mM), o qual coincidiu com um pequeno pico de proteína (pool IV).

#### 4.2. Estudo Eletroforético

A análise através da eletroforese em condições não desnaturantes permitiu detectar a presença de apenas uma banda proteica quando utilizamos o método descrito no item 3.2.6 em pH 4,3, com a amostra de proteína pura obtida no último passo do processo de purificação (Figura 3, Géis A e B). Esta banda proteica coincidiu com a banda de atividade enzimática detectada na eletroforese em pH 7,5 (Figura 3, Gel D), reforçando o grau de pureza da proteína e correlacionando a atividade enzimática com a banda proteica (Figura 3).

#### 4.3. Determinação da Composição de Aminoácidos

A análise preliminar da composição de aminoácidos nos propiciou a obtenção do número de resíduos de aminoácidos existentes na fosfatase ácida do rim bovino. Estes dados são resumidos na Tabela III. A  $M_r$  mínima obtido é de 16,7 kDa, em função da não determinação do número de resíduos de Cys e Trp.

#### 4.4. Determinação da Massa Molecular

A  $M_r$  da enzima pura foi determinado por filtração em Superdex HR 70 10/30. O cálculo da  $M_r$  foi obtida através do gráfico semi-log do  $M_r$  x  $K_{AV}$ , sendo o  $K_{AV}$  obtido através da seguinte equação:

$$K_{AV} = \frac{V_R - V_0}{V_C - V_0}$$

(EQUAÇÃO 1)

onde,  $V_R$  = volume de retenção da amostra;

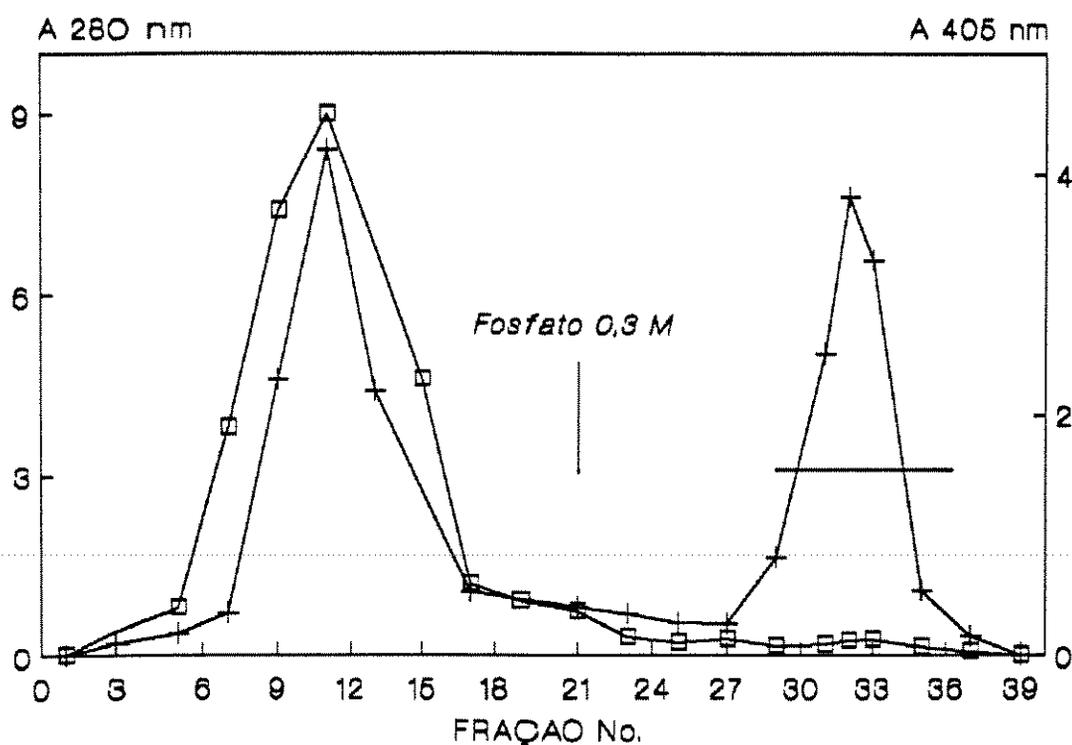
$V_0$  = volume morto da coluna;

$V_C$  = volume da coluna.

**TABELA II. Purificação da Fosfatase Ácida de Rim Bovino.**

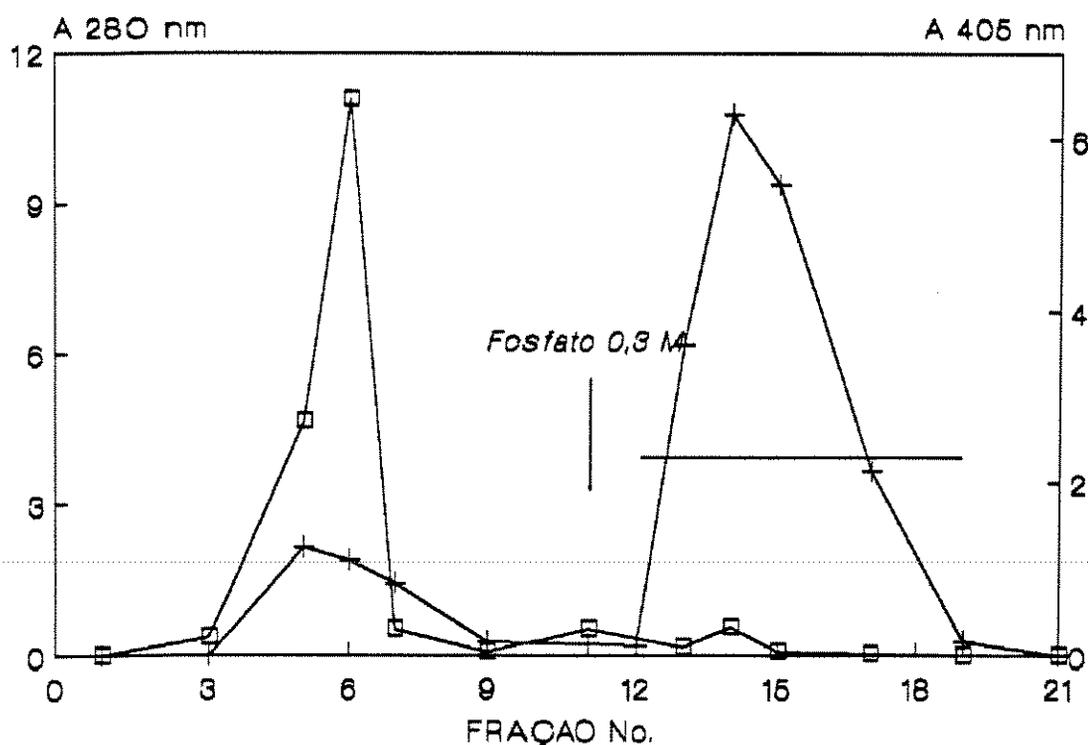
Para a purificação, 1,5 kg de rim bovino foram utilizados.

FRAÇÃO	VOL. (mL)	ATIV. UE/mL	PROT. mg/mL	A.E. (UE/mg)	PURIF. (x)	REND. (%)
Extrato	4.740,0	0,77	12,7	0,061	1,0	100,0
Sulfato de Amônio 30-60%	550,0	5,95	68,0	0,087	1,4	89,7
Precipitação Isoelétrica	750,0	1,88	23,7	0,097	1,6	38,3
SP-Sephadex - I	14,6	25,40	4,2	6,1	99,2	10,4
SP-Sephadex - II	5,2	49,17	0,5	100,0	1.640,0	7,0



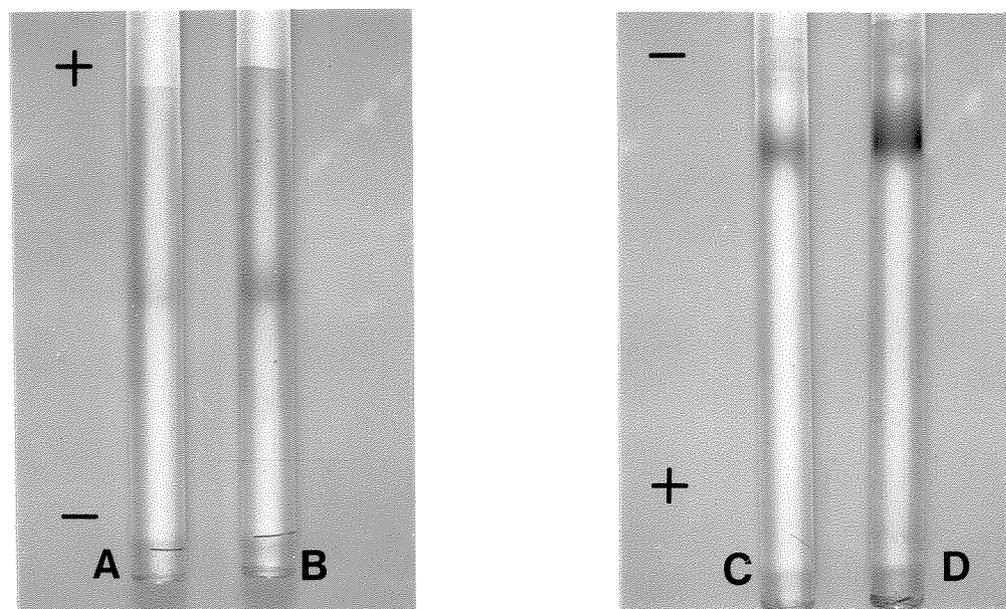
### FIGURA 1. Cromatografia em SP-Sephadex - I.

A amostra clarificada após a concentração com sulfato de amônio foi aplicada à primeira coluna de SP-Sephadex C-50 (4,5 x 16,5 cm) equilibrada com tampão acetato 10 mM (pH 5,0). Utilizou-se o mesmo tampão para a lavagem da coluna e o tampão fosfato 300 mM (pH 6,0) para a eluição. As frações (25,0 mL) foram monitoradas a 280 nm para proteína (□) e a 405 nm para a atividade (+). As frações com mais de 0,1 UE/mL foram reunidas (linha sólida do segundo pico de atividade, pool II) e concentradas com sulfato de amônio a 75% de saturação.



### FIGURA 2. Cromatografia em SP-Sephadex - II

O sobrenadante limpido do passo anterior foi aplicado a uma segunda coluna de SP-Sephadex (2,5 x 9,0 cm) equilibrada com tampão acetato 10 mM (pH 5,0) contendo sulfato de amônio 100 mM. A coluna foi lavada e a atividade eluída conforme descrito na Figura 1. As frações (20,0 mL) foram monitoradas a 280 nm para proteína (□) e 405 nm para a atividade (+) e, aquelas contendo mais de 0,1 UE/mL, foram reunidas (linha sólida no segundo pico de atividade, pool IV) e concentradas por ultrafiltração sob pressão de nitrogênio.



**FIGURA 3. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida. Coloração para Proteína (pH 4,3 e 7,5) e Atividade (pH 7,5).**

As condições de corrida são descritas no texto (Material e Métodos 3.2.6.). A quantidade de proteína aplicada foi: Géis A (30,0  $\mu\text{g}$ ) e B (60,0  $\mu\text{g}$ ), pH 4,3, coloração para proteína; Géis C (50,0  $\mu\text{g}$ ) e D (85,0  $\mu\text{g}$ ), pH 7,5, coloração para proteína e atividade, respectivamente.

O  $V_0$  e  $V_C$  foram obtidos, respectivamente, através do volume de retenção do Azul de Dextrana (9,05 mL) e do manual de especificações técnicas do fabricante da coluna (24,0 mL).

O perfil do cromatograma exibe um pico de atividade único e simétrico, ligeiramente deslocado de um pequeno pico de proteína. Na fração de maior atividade, a A.E. era de 100 UE/mg de proteína (Figura 4). A  $A_{280}$  detectada na fração nº 9 corresponde ao Azul de Dextrana, utilizado como referência para o  $V_0$ . A regressão linear dos pontos obtidos no gráfico do log da  $M_r$  contra o  $K_{av}$  nos permitiu estimar a  $M_r$  em 13,6 kDa (Figura 5).

A  $M_r$  da FAc também foi determinado através da mobilidade da enzima em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, verificando-se a presença de uma única banda bem definida, mesmo em presença de concentrações crescentes de proteína (Figura 6), o que também evidencia a homogeneidade da amostra. A regressão linear dos pontos obtidos no gráfico do log da  $M_r$  contra a mobilidade eletroforética relativa nos permitiu estimar a  $M_r$  da fosfatase ácida em 17,8 kDa. Este valor foi obtido através do gráfico do log da  $M_r$  x Mobilidade (Figura 7), calculado a partir da seguinte equação:

$$\text{Mobilidade} = \frac{\text{Comprim. gel antes}}{\text{Migração corante}} \times \frac{\text{Migração Proteína}}{\text{Comprim. gel após Descoloração}}$$

(EQUAÇÃO 2)

#### 4.5. Estudos Cinéticos

A reação de hidrólise do p-NPP pela fosfatase ácida de BPM do rim bovino exibe uma relação de proporcionalidade entre a quantidade de produto liberado e o tempo de incubação a qual mantêm-se com certeza até 20 minutos de incubação (Figura 8). A partir deste ensaio, os demais experimentos foram realizados com um tempo de incubação de 10 minutos.

A formação do produto, para um tempo de incubação fixo, é diretamente proporcional à concentração de enzima adicionada. Esta relação é seguramente

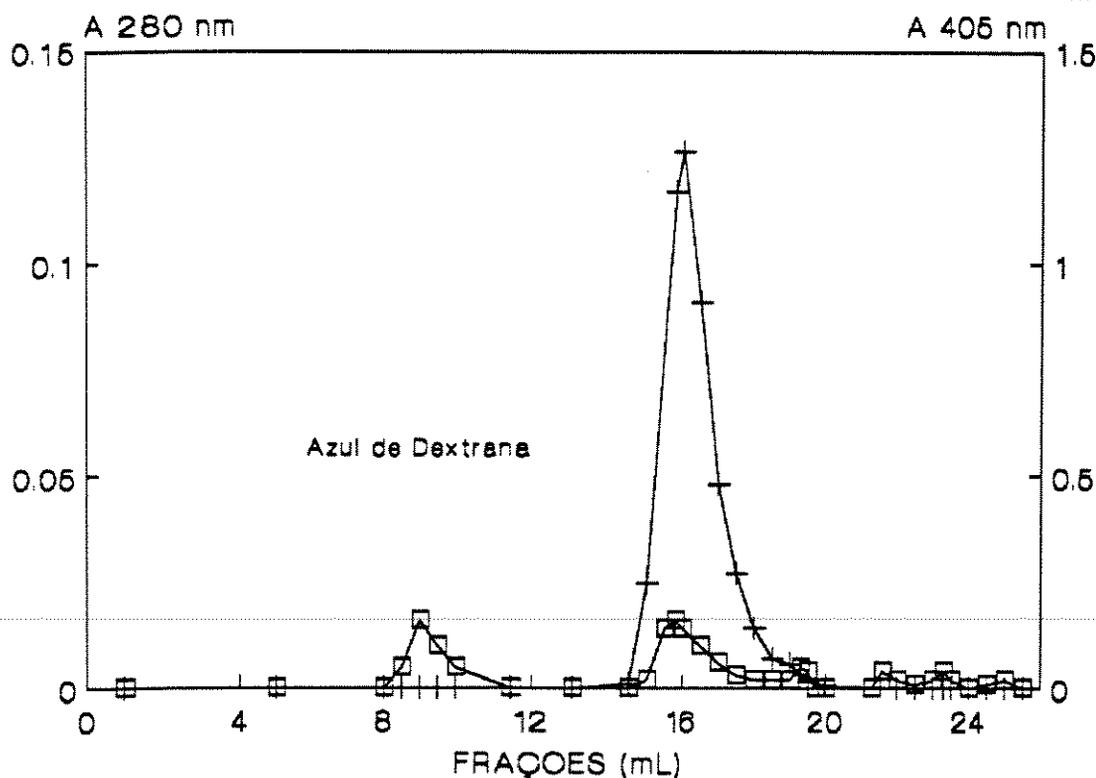
linear até 1,0  $\mu\text{g}$  de enzima/tubo, correspondendo a 2,3 unidades Absorbância a 405 nm (Figura 9).

O estudo da influência do pH na atividade da enzima revelou um pH ótimo de 5,0 porém, dois aspectos devem ser ressaltados neste ensaio. Primeiro, entre os valores de pH 3,0 e 5,5, a variação na quantidade de produto liberado é mínima (aproximadamente de 10% entre o pico e os extremos), evidenciando muito mais um platô de atividade do que um pH ótimo; segundo, a alta atividade obtida nos valores de pH 2,8 e 3,0 com tampão glicina (Figura 10).

### TABELA III. Composição de Aminoácidos da Fosfatase Ácida de Rim Bovino.

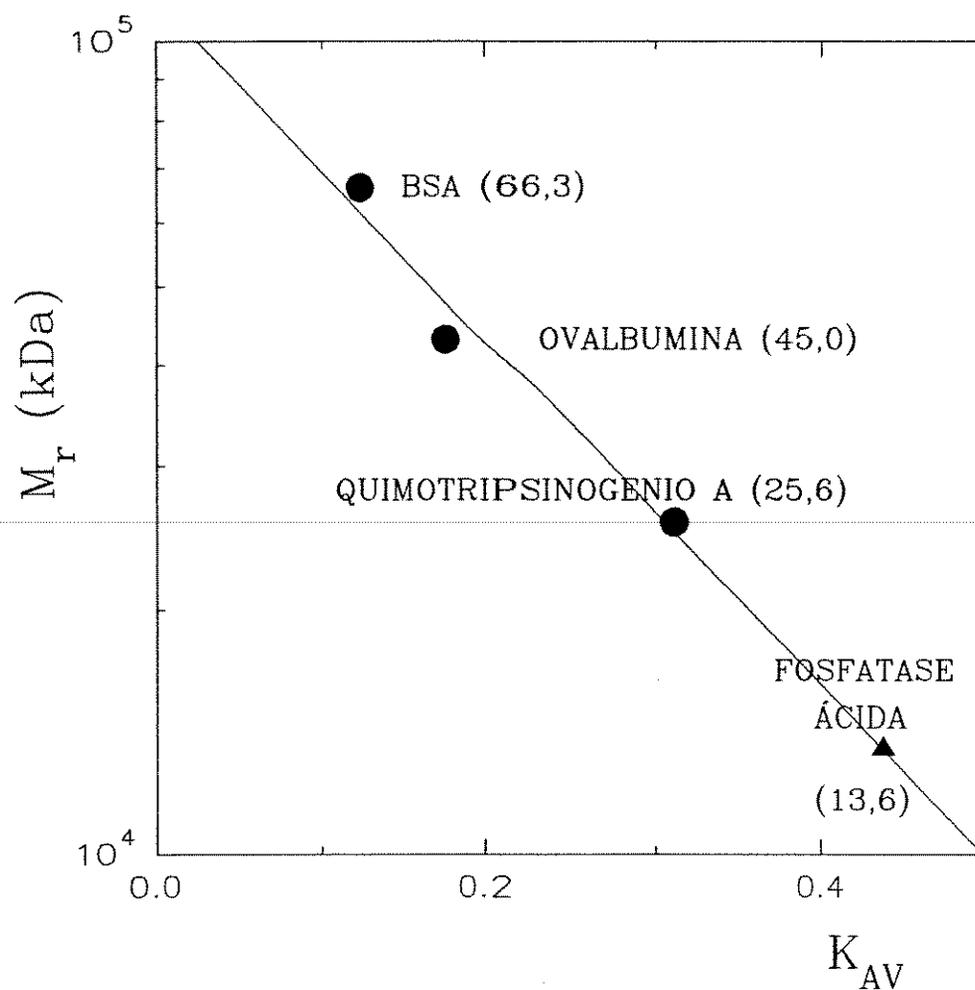
Hidrólise por 24 horas a 110°C em HCl 6,0 N. O resultado é a média aritmética de duas análises.

Aminoácido	Número Integral de Resíduos
Asp	20
Thr	7
Ser	7
Glu	17
Pro	8
Gly	12
Ala	10
Cys	N.D.
Val	13
Met	3
Ile	7
Leu	12
Tyr	5
Phe	5
His	5
Lys	10
Arg	11
Trp	N.D.
Total:	152



**FIGURA 4. Cromatografia de Exclusão Molecular - Superdex 75 HR 10/30.**

Uma alíquota de 50  $\mu\text{l}$  da fosfatase ácida de rim bovino nativa ( $1,76 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foi submetida à cromatografia em uma coluna de filtração em gel equilibrada com tampão acetato 100 mM, pH 5,0, contendo 1,0 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol. A eluição foi realizada com o mesmo tampão e as frações (1,0 mL) foram monitoradas a 280 nm para proteína (□) e a 405 nm para atividade (+). A coluna foi pré-calibrada com os seguintes marcadores de  $M_r$ : (1) Azul de Dextrana 2000 ( $M_r > 2.000$  kDa), (2) Albumina de Soro Bovino (66,3 kDa), (3) Ovalbumina (43,0 kDa), (4) Quimotripsinogênio A (25,6 kDa).



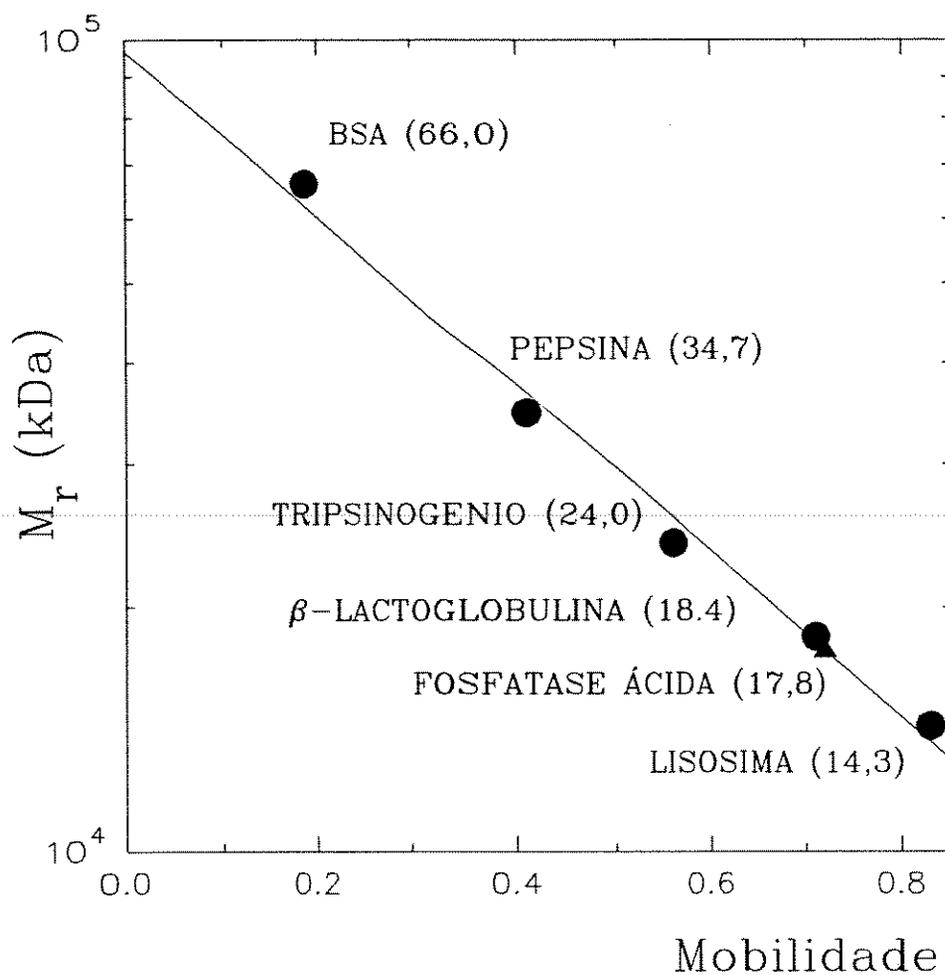
**FIGURA 5. Determinação da  $M_r$  da Fosfatase Ácida por Filtração em Gel.**

A  $M_r$  foi determinado por regressão linear simples através dos pontos obtidos das coordenadas  $M_r$  x  $K_{AV}$ , este último calculado conforme descrito no texto (Resultados), a partir dos dados da Figura 4. Entre parenteses estão indicados as  $M_r$  das proteínas.



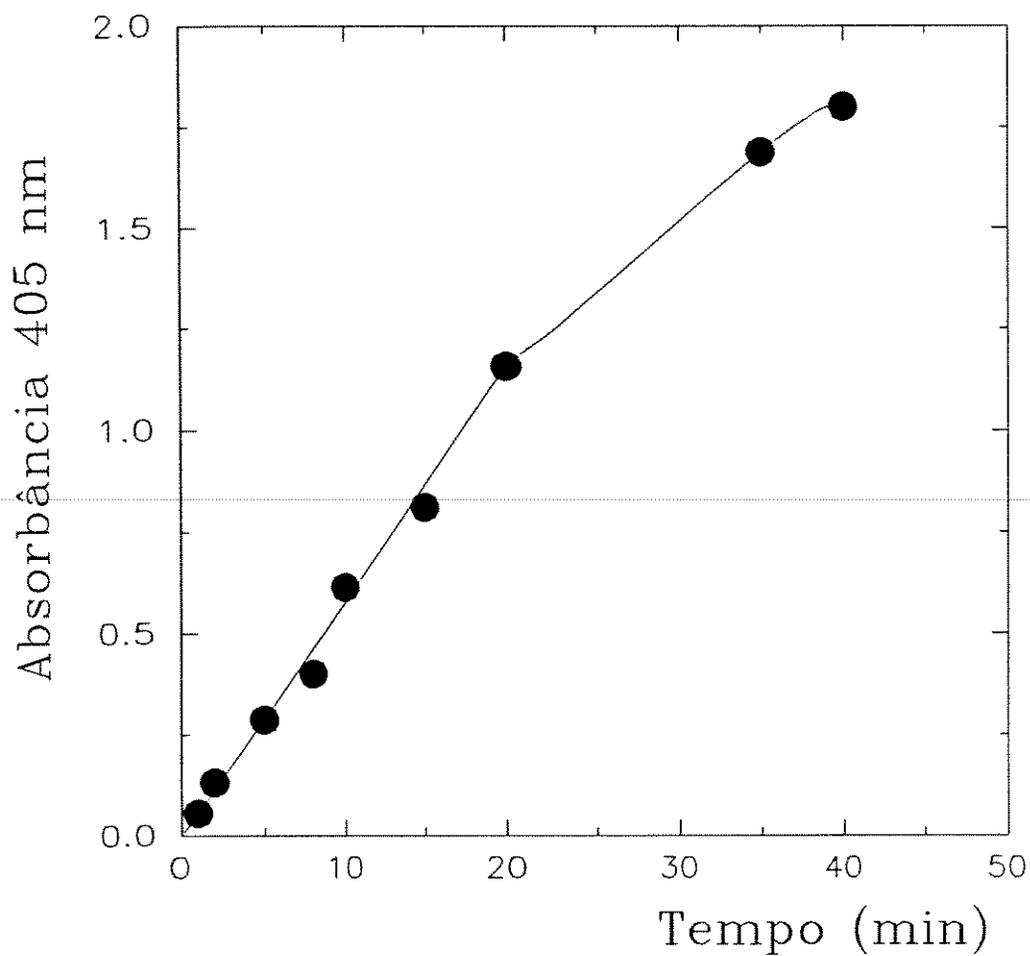
**FIGURA 6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida. Condições Desnaturantes.**

As condições de corrida são descritas no texto (Material e Métodos 3.2.8.b). Os Géis A, B e C foram carregados com quantidades crescentes de proteína, 10, 30 e 50  $\mu\text{g}$ , respectivamente.



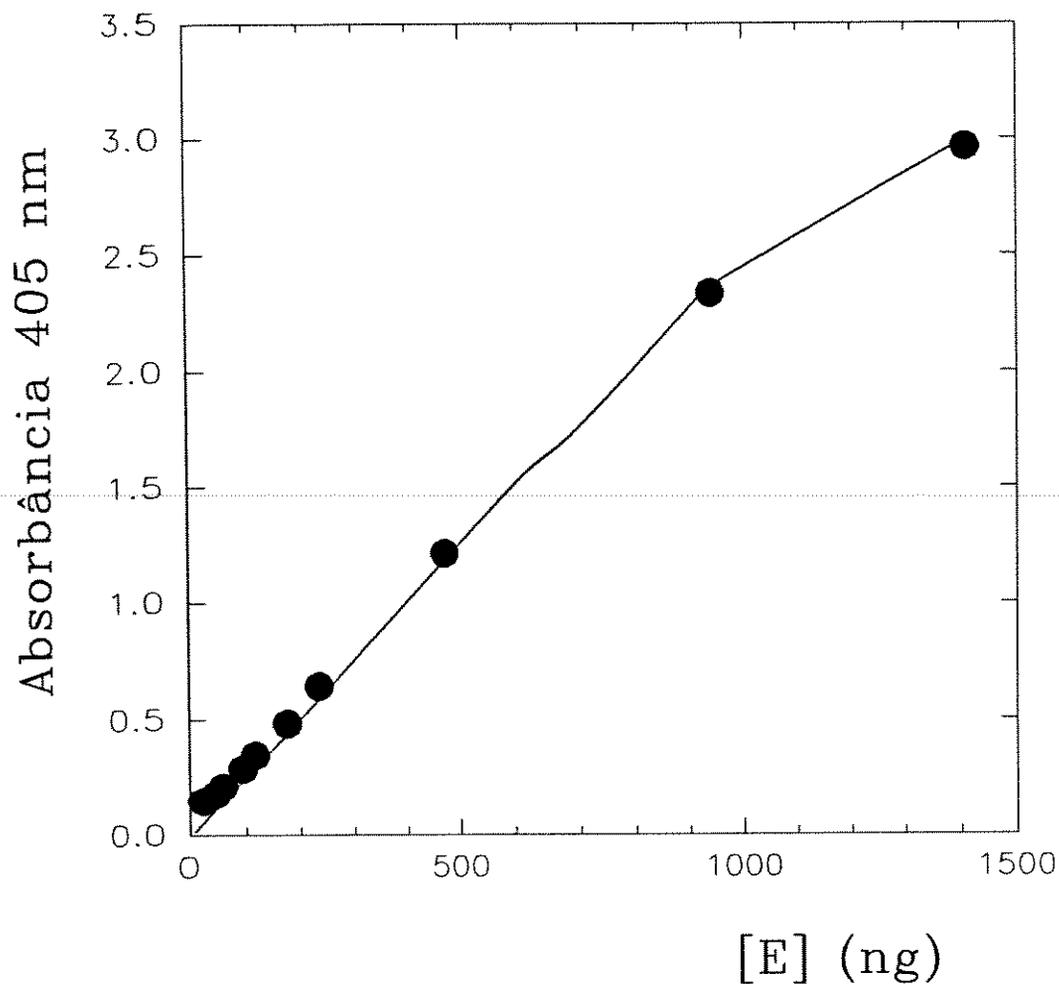
**FIGURA 7. Determinação da  $M_r$  da Fosfatase Ácida por PAGE-SDS.**

A  $M_r$  foi determinado por regressão linear simples através dos pontos obtidos das coordenadas  $M_r$  x Mobilidade, conforme descrito no texto (Resultados). Os padrões de  $M_r$  utilizados foram: Lisozima,  $\beta$ -Lactoglobulina, Tripsinogênio, Pepsina e Albumina de Soro Bovino, cujas  $M_r$  estão indicados entre parenteses.



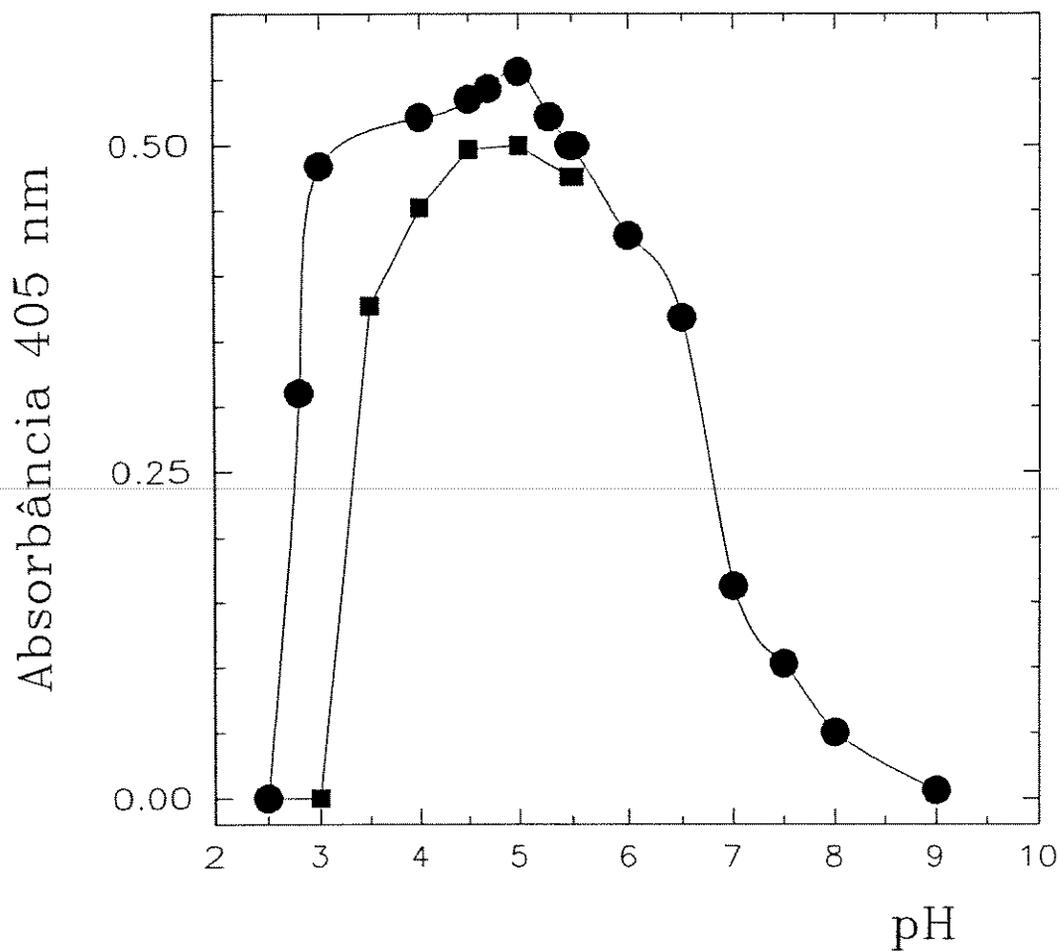
**FIGURA 8. Influência do Tempo de Incubação na Atividade da Fosfatase Ácida.**

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos (3.2.1.a) utilizando o p-NPP como substrato. A reação foi iniciada pela adição de 0,293  $\mu\text{g}$  de enzima.



**FIGURA 9. Influência da Concentração de Enzima na Atividade da Fosfatase Ácida.**

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos (3.2.1.a) utilizando o p-NPP como substrato. A reação foi iniciada pela adição de enzima.



### FIGURA 10. Influência do pH na Atividade da Fosfatase Ácida.

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos (3.2.1.a) utilizando o p-NPP como substrato. A reação foi iniciada pela adição de enzima. Os tampões utilizados na concentração de 100 mM (●) foram: Glicina (pH 2,5-3,0), Acetato (pH 4,0-5,5), bis-Tris (pH 6,0-6,5), Imidazol (pH 7,0-7,5) e Glicil-glicina (pH 9,0); o tampão citrato (100 mM, ■) foi utilizado na faixa de pH entre 2,5 e 5,5.

O efeito da concentração do substrato foi analisado utilizando uma concentração de p-NPP entre 0,01 e 10,0 mM. O gráfico da velocidade contra concentração do substrato (S) apresenta uma curva típica de Michaelis-Menten (hipérbole retangular) e podemos notar que o estado estacionário é atingido com uma concentração de p-NPP de cerca de 2,0 mM, quer medindo-se o p-NF ou o Pi liberados, como esperado (Figura 11). Os parâmetros cinéticos,  $K_M$  e  $V_{max}$ , foram obtidos através do programa Enzfitter e a curva de  $V_{max} \times S$  e  $1/V_{max} \times 1/S$  (gráfico de LINEWEAVER-BURK, 1934) obtidas a partir dos pontos calculados. Um aspecto relevante é a similaridade de resultados independentemente do método de ensaio empregado, seja a medida do p-NFenol ou do fosfato inorgânico liberados, conforme pode ser observado na tabela IV.

A análise do efeito da temperatura na atividade enzimática revelou-se muito interessante. O ensaio foi realizado em pH 5,0 e iniciado pela adição de enzima. O gráfico da velocidade em função da temperatura exibiu um crescimento significativo da atividade até atingir a temperatura ótima de 60°C. A partir deste ponto a queda na velocidade é vertiginosa (Figura 12). Tomando-se como referência a velocidade na temperatura de 37°C (mais próxima do fisiológico), chama a atenção que, a 60°C, esta é cerca de 2,3 vezes maior. A 65°C a velocidade é praticamente igual à da temperatura fisiológica. A 68°C e a 8°C a velocidade corresponde a 40% e 20%, respectivamente (Figura 12).

Estudou-se a seguir a influência do tempo de incubação na temperatura ótima, indicada na Figura 12. O gráfico da velocidade em função do tempo de reação realizado a 60°C (Figura 13) revela que a formação do produto é linear nos primeiros 5 minutos. A partir daí há uma diminuição na velocidade até a formação de um patamar entre 10 e 15 minutos, seguido de uma diminuição na velocidade.

Estudos de inativação térmica da FAc foram realizados pré-incubando-se a enzima, em diferentes valores de pH, a 60°C por diferentes intervalos de tempo. Após a pré-incubação, 0,88 µg de enzima foram utilizadas para medir a atividade residual (Figura 14). Neste estudo verificamos que a desnaturação térmica da enzima ocorre rapidamente, sendo a estabilidade máxima observada no pH 5,5. Neste pH, após 10 minutos de pré-incubação, a atividade residual manteve-se ao redor de 64%. Outro aspecto digno de destaque é a atividade residual verificada no pH 2,8 (tampão glicina), praticamente idêntica àquela observada no pH 5,2 (tampão acetato). Basta verificar que nestes valores de pH, após 10 minutos de pré-

incubação, a atividade residual foi de 36% e 35%. Nas mesmas condições, nos valores de pH 3,2 e 4,2, a atividade residual era de 22% e 3%, respectivamente. No pH 7,5 (tampão imidazol), a atividade residual foi menor que 5% após 10 minutos de pré-incubação (Figura 14).

A Figura 15 mostra o efeito de íons metálicos na atividade da fosfatase ácida. A atividade residual, relativa ao ensaio na ausência de íons, revelou um efeito negativo muito pequeno com relação ao  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ , moderado em presença do  $\text{Zn}^{2+}$  e muito forte em presença do  $\text{Cu}^{2+}$ . Especificamente em relação ao  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , na concentração de 1,0 mM, houve inibição de 40 e 98% da atividade, respectivamente. Destaca-se que o EDTA não promoveu um efeito significativo na atividade da enzima, na concentração utilizada (5 mM).

Com a fosfatase ácida purificada, foram também estudados os efeitos de reagentes redutores de tióis (Figura 16). Observou-se que nenhum dos compostos testados apresentou qualquer efeito na atividade, não havendo diferença estatisticamente significativa entre o controle e os grupos teste.

Estudou-se ainda o efeito de vários outros compostos na atividade da fosfatase ácida. Observando-se a Figura 17 nota-se que, dos diversos compostos testados, apenas o piridoxal-5-fosfato e o SDS apresentaram um efeito significativamente negativo na atividade. Por outro lado, a guanosina promoveu uma incremento de, aproximadamente, 175% na atividade enzimática enquanto o triton X-100 promoveu uma ligeira ativação.

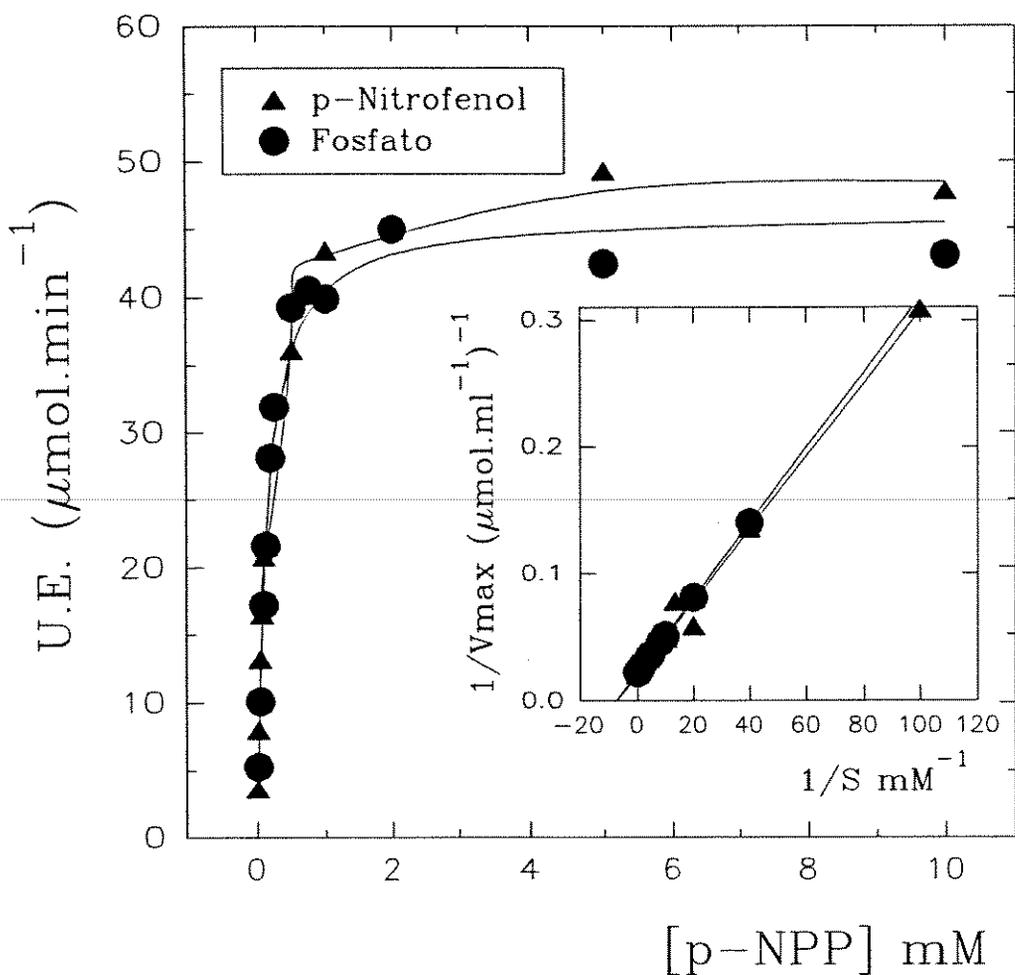
Diversos inibidores em potencial da fosfatase ácida de BPM foram testados (Figura 18). A análise dos resultados revelou um pequeno efeito inibitório de altas concentrações de fluoreto e tartarato na atividade. Concentração micromolar de piridoxal promoveu reduzida inibição da atividade. Por outro lado, nesta mesma faixa de concentração o molibdato de amônio, o- e m-vanadato promoveram sensível inibição da atividade. A maior inibição foi obtida em presença de pCMB, onde 10  $\mu\text{M}$  do composto promoveu inibição total. O fosfato, produto da reação catalisada pela fosfatase ácida, na concentração de 10 mM, promoveu uma inibição da ordem de 60%. Dos compostos mencionados na Figura 18, foram selecionados e estudados com mais detalhes o fosfato inorgânico, piridoxal-5-fosfato e o-vanadato. Com relação ao fosfato inorgânico, o gráfico dos duplos recíprocos mostrou tratar-

se de uma inibição competitiva reversível (Figura 19). A regressão linear dos pontos obtidos no gráfico da inclinação destas retas contra as concentrações do inibidor proporcionaram, na intersecção com o eixo da concentração do inibidor, o valor da constante de inibição,  $K_i$ , de 0,769 mM (Figura 19, B). Este valor corresponde a cerca de 5 vezes a  $K_M$ . O tipo de inibição da fosfatase ácida de BPM por piridoxal-5-fosfato foi classificado de competitivo reversível como demonstrado pelo gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 20). A constante de inibição obtida por meio do gráfico da inclinação das retas contra concentrações de P5P corresponde a 2,18  $\mu$ M (Figura 20, B). O efeito do vanadato foi classificado como competitivo reversível como demonstrado na Figura 21. A constante de inibição foi obtida por meio do gráfico da inclinação das retas a concentração do inibidor (Figura 21, B). O resultado obtido reflete o menor  $K_i$  dentre os inibidores testados, 0,465  $\mu$ M. As constantes de inibição dos compostos acima mencionados estão resumidas na Tabela V. Esta tabela mostra também os valores de  $K_i$  provenientes da equação que pode ser obtida do gráfico de Lineweaver-Burk.

A energia de ativação ( $E_a$ ) da reação catalisada pela fosfatase ácida foi determinada através do gráfico de Arrhenius,  $\log V_{\max} \times \frac{1}{T}$  (Figura 22), utilizando-se os valores obtidos da Figura 12. Da inclinação da reta calculou-se a  $E_a$ , obtendo-se um valor de 43,31 kJ.mol<sup>-1</sup>.

Com a enzima purificada, estudou-se também a sua capacidade de transfosforilação. A capacidade de promover a transferência do fosfato do substrato para outro composto foi verificada medindo-se a velocidade inicial na presença de possíveis aceptores, após a adição da enzima. A transferência do fosfato pode ser evidenciada através da razão entre os produtos formados: p-NFenol/Pi. Quanto maior o valor desta relação, maior a concentração de Pi transferido para o acceptor. Conforme pode-se constatar na Tabela VI, os melhores aceptores são, em ordem decrescente, Glicerol, Metanol, Manitol, Sorbitol e Etanol

A atividade relativa da fosfatase ácida sobre diversos substratos revela uma seletiva especificidade da enzima. Dos substratos testados, esta somente hidrolisou significativamente  $\beta$ -Naftil-P, a FMN e a Tyr-P, sendo que estes dois últimos são potenciais substratos fisiológicos. Os demais substratos testados apresentaram atividade relativa inferior a 10% (Figura 23).



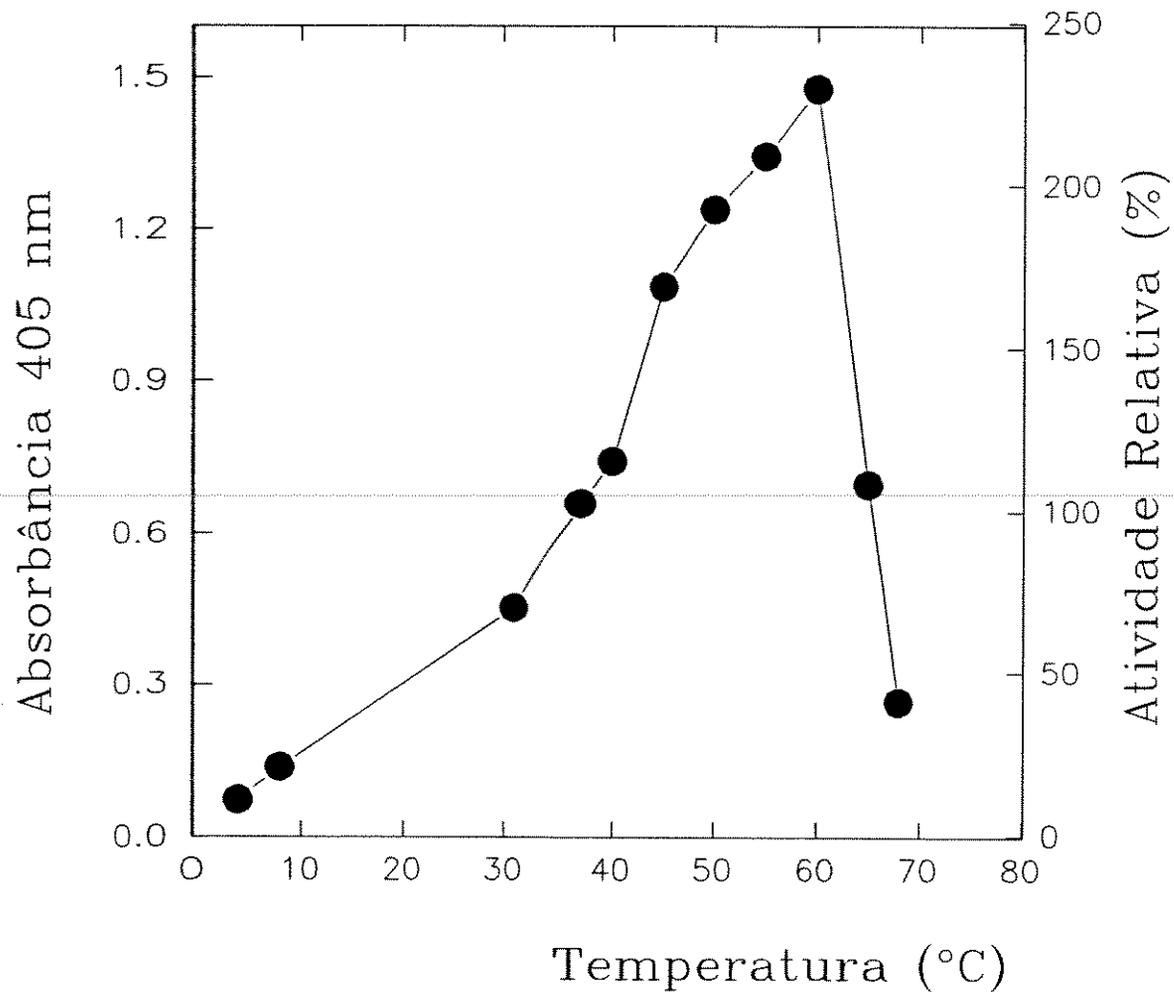
**FIGURA 11. Influência da Concentração do Substrato na Atividade da Fosfatase Ácida.**

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos (3.2.1.a e b) utilizando o p-NPP como substrato. A reação foi iniciada pela adição de 0,176  $\mu\text{g}$  de enzima.

**TABELA IV. Parâmetros Cinéticos da Reação Catalisada pela Fosfatase Ácida.**

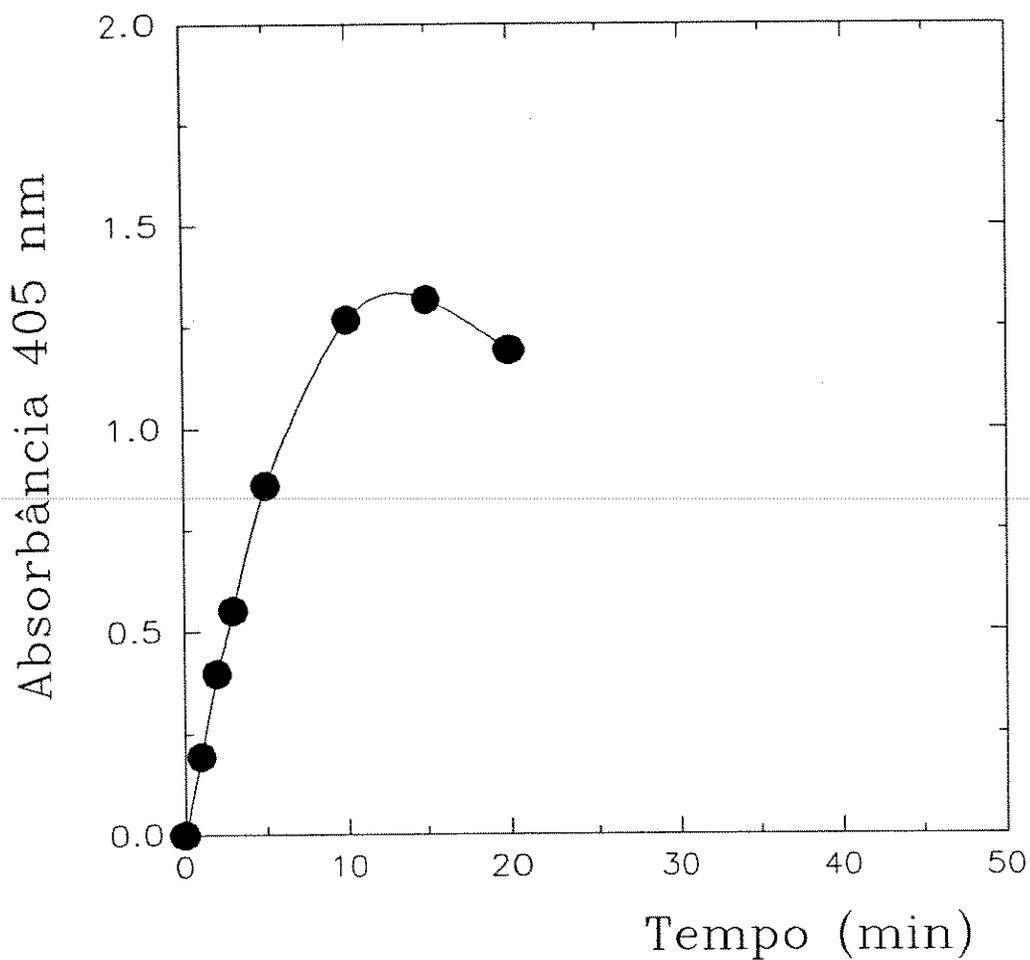
Os parâmetros cinéticos para a formação do produto (p-NFenol ou Fosfato Inorgânico, Pi) foram determinados utilizando-se o programa Enzfitter a partir dos dados da Figura 11.

Produto	$K_M$ (mM)	Vmax ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ )
p-NFenol	0,142 ( $\pm 0,008$ )	49,1 ( $\pm 0,7$ )
Pi	0,137 ( $\pm 0,015$ )	46,1 ( $\pm 1,2$ )



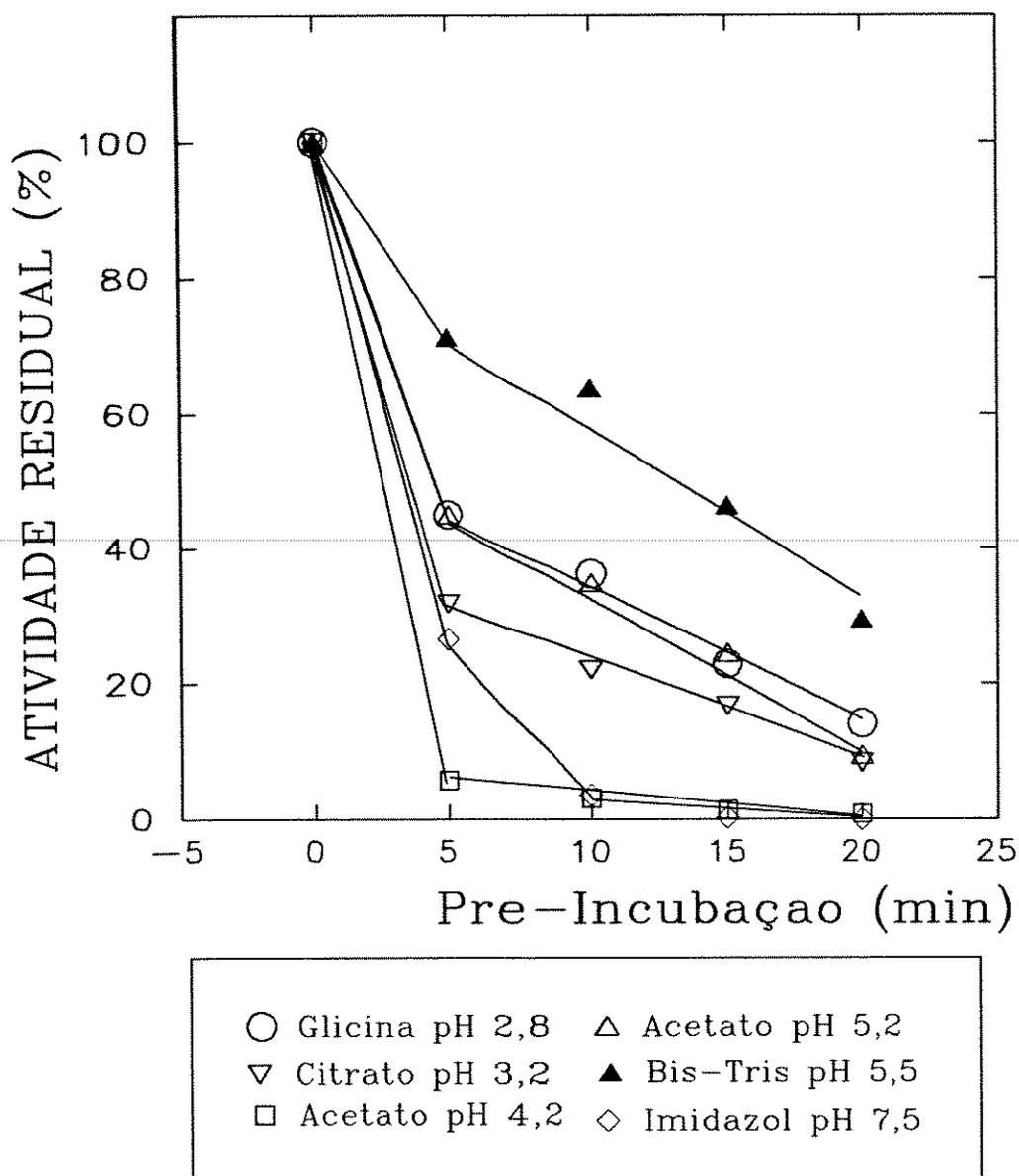
**FIGURA 12. Influência da Temperatura na Atividade da Fosfatase Ácida.**

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos (3.2.1.a) utilizando o p-NPP como substrato. A reação foi iniciada pela adição de 0,22  $\mu\text{g}$  de enzima.



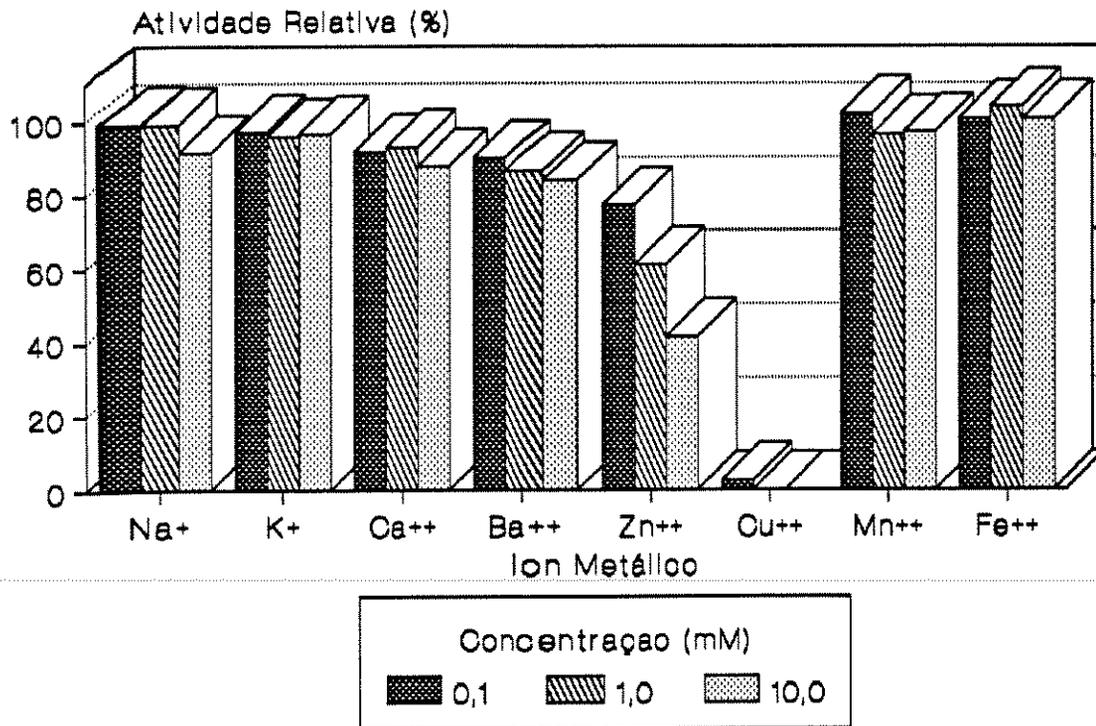
**FIGURA 13. Efeito do Tempo de Incubação na Atividade da Fosfatase Ácida.**

O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos (3.2.1.a) utilizando o p-NPP como substrato porém, a temperatura do ensaio era de 60°C. A reação foi iniciada pela adição de 0,22  $\mu\text{g}$  de enzima.



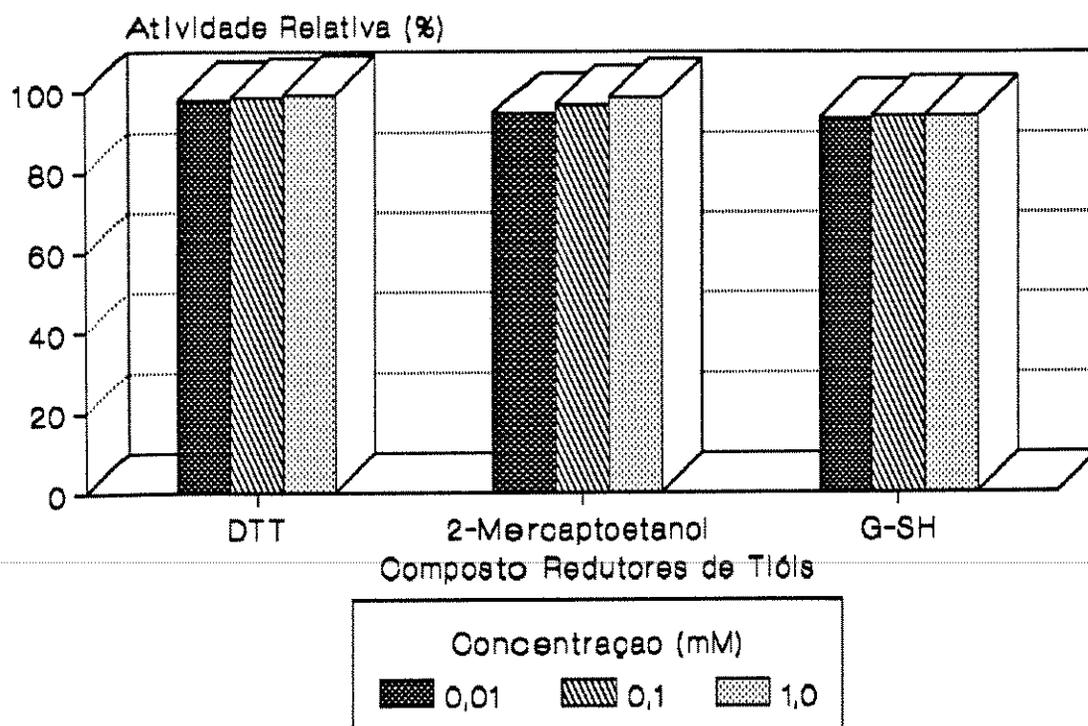
**FIGURA 14. Inativação Térmica da Fosfatase Ácida a Diferentes Valores de pH.**

A enzima (17,6  $\mu\text{g}$ ) foi pré-incubada nos valores de pH acima indicados, a 60°C, por diferentes intervalos de tempo e, em seguida, colocada no gelo. O ensaio foi realizado conforme descrito em Material e Métodos (3.2.1.a) utilizando o p-NPP como substrato, sendo a reação iniciada pela adição de 0,88  $\mu\text{g}$  de enzima.



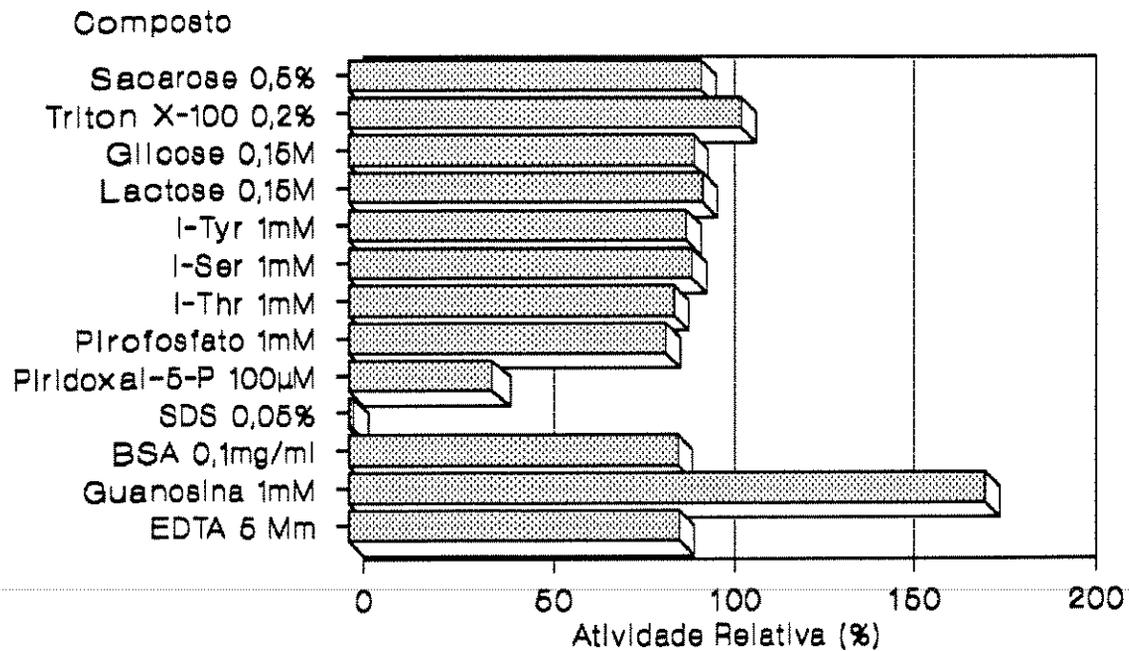
### FIGURA 15. Efeito de Íons Metálicos na Atividade da Fosfatase Ácida.

Os íons metálicos e o EDTA foram acrescentados ao meio de ensaio nas concentrações acima indicadas e a atividade residual foi determinada conforme Material e Métodos (3.2.1.a). A atividade relativa foi calculada como uma percentagem daquela obtida na ausência do íon.



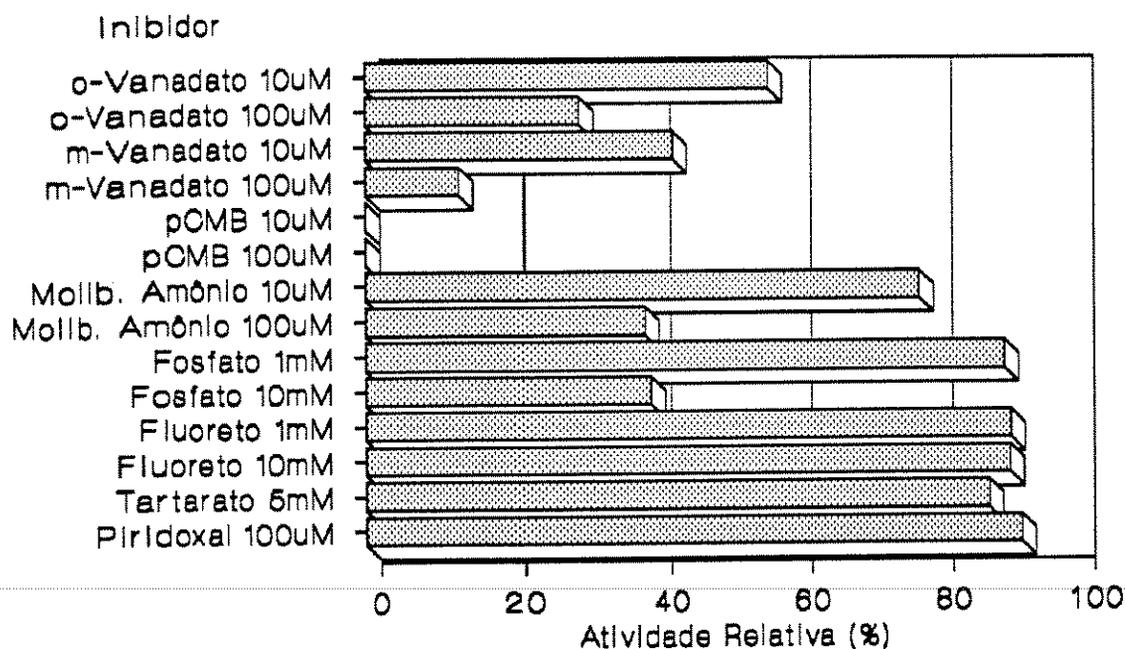
**FIGURA 16. Efeito de Reagentes Redutores de Tióis na Atividade da Fosfatase Ácida.**

Reagentes redutores de tióis, nas concentrações acima indicadas, foram adicionados ao meio de ensaio. A atividade residual em relação ao ensaio na ausência dos compostos foi determinada como descrito em Material e Métodos (3.2.1.a), utilizando o p-NPP como substrato. A reação foi iniciada pela adição de 0,176  $\mu\text{g}$  de enzima.



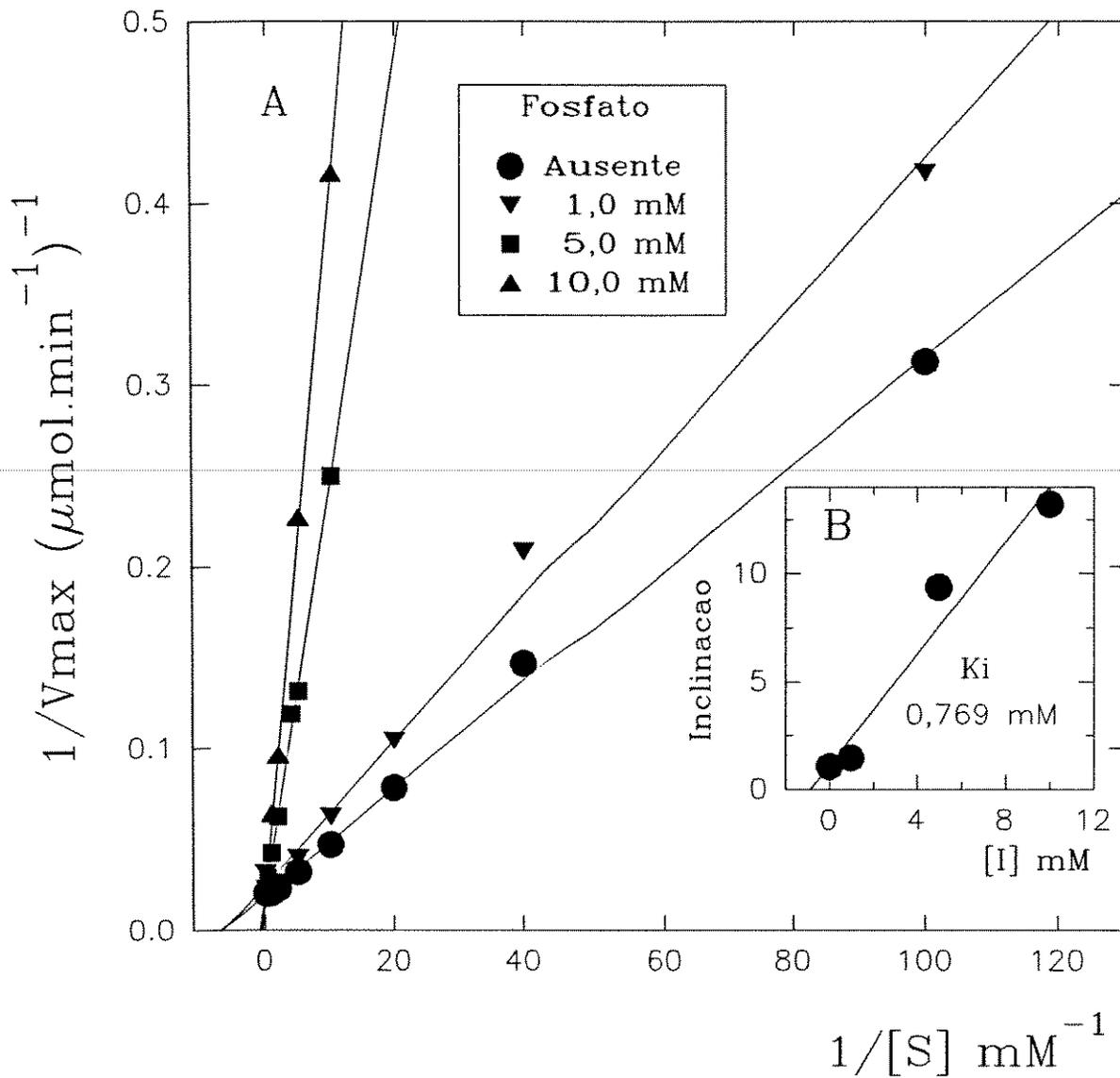
**FIGURA 17. Efeito de Compostos Variados na Atividade da Fosfatase Ácida.**

Diversos compostos foram adicionados ao meio de reação e a atividade residual foi calculada como uma porcentagem daquela obtida na ausência do composto. A reação foi iniciada pela adição da enzima (0,22 µg) e o produto foi quantificado como descrito em Métodos (3.2.1.a).



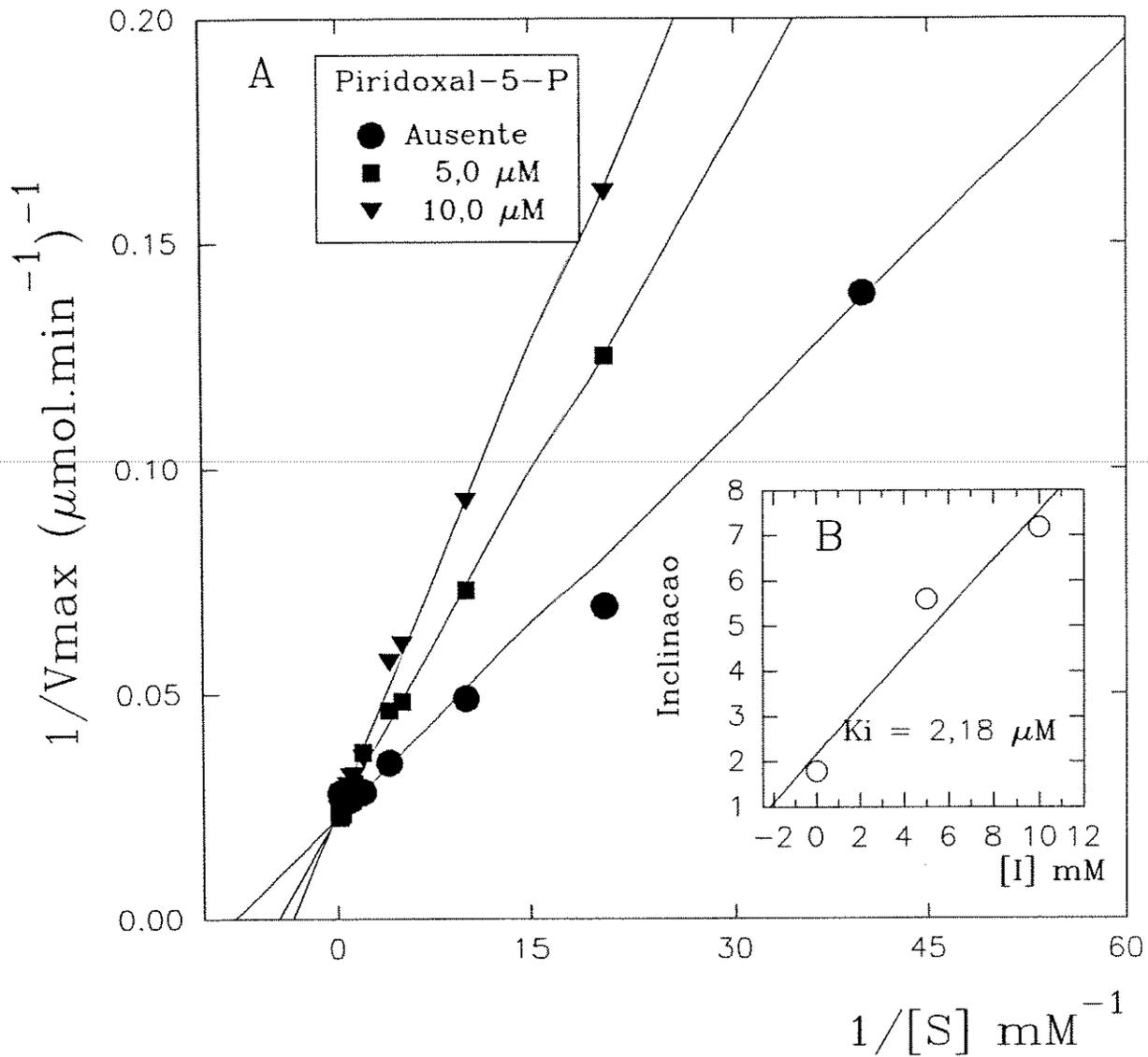
**FIGURA 18. Efeito de Inibidores na Atividade da Fosfatase Ácida.**

Os inibidores em potencial foram adicionados ao meio de reação e a atividade residual foi calculada como uma porcentagem daquela obtida na ausência do composto. A reação foi iniciada pela adição da enzima (0,22  $\mu\text{g}$ ) e o produto foi quantificado como descrito em Métodos (3.2.1.a).



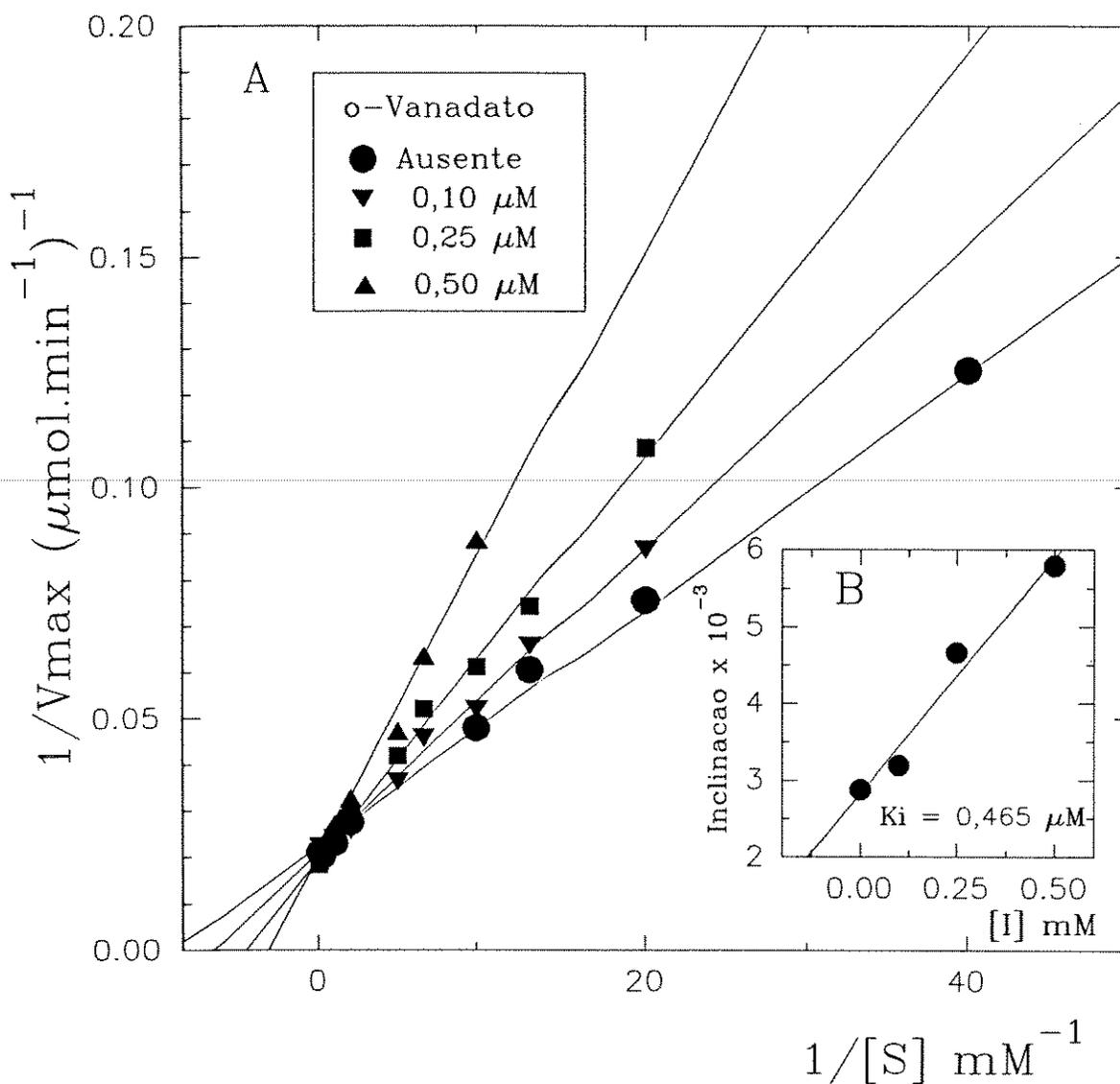
**FIGURA 19. Gráfico dos Duplos Recíprocos da Inibição da Fosfatase Ácida por Fosfato Inorgânico.**

A reação foi realizada na ausência e na presença de concentrações crescentes de fosfato. A atividade foi determinada como no Material e Métodos (3.2.1.a) utilizando 0,22  $\mu\text{g}$  de enzima/tubo e p-NPP como substrato. A  $K_M$  aparente foi calculada através do programa Enzfitter. B: gráfico da inclinação das retas contra a concentração do inibidor.



**FIGURA 20. Gráfico dos Duplos Recíprocos da Inibição da Fosfatase Ácida por Piridoxal-5-fosfato.**

A reação foi realizada na ausência e na presença de concentrações crescentes de piridoxal-5-fosfato. A atividade foi determinada como no Material e Métodos (3.2.1.a) utilizando 0,22  $\mu\text{g}$  de enzima/tubo e p-NPP como substrato. A  $K_M$  aparente foi calculada através do programa Enzfitter. B: gráfico da inclinação das retas contra a concentração do inibidor.



**FIGURA 21. Gráfico dos Duplos Recíprocos da Inibição da Fosfatase Ácida por o-Vanadato.**

A reação foi realizada na ausência e na presença de concentrações crescentes de o-Vanadato. A atividade foi determinada como no Material e Métodos (3.2.1.a) utilizando 0,22  $\mu\text{g}$  de enzima/tubo e p-NPP como substrato. A  $K_M$  aparente foi calculada através do programa Enzfitter. B gráfico da inclinação das retas contra a concentração do inibidor

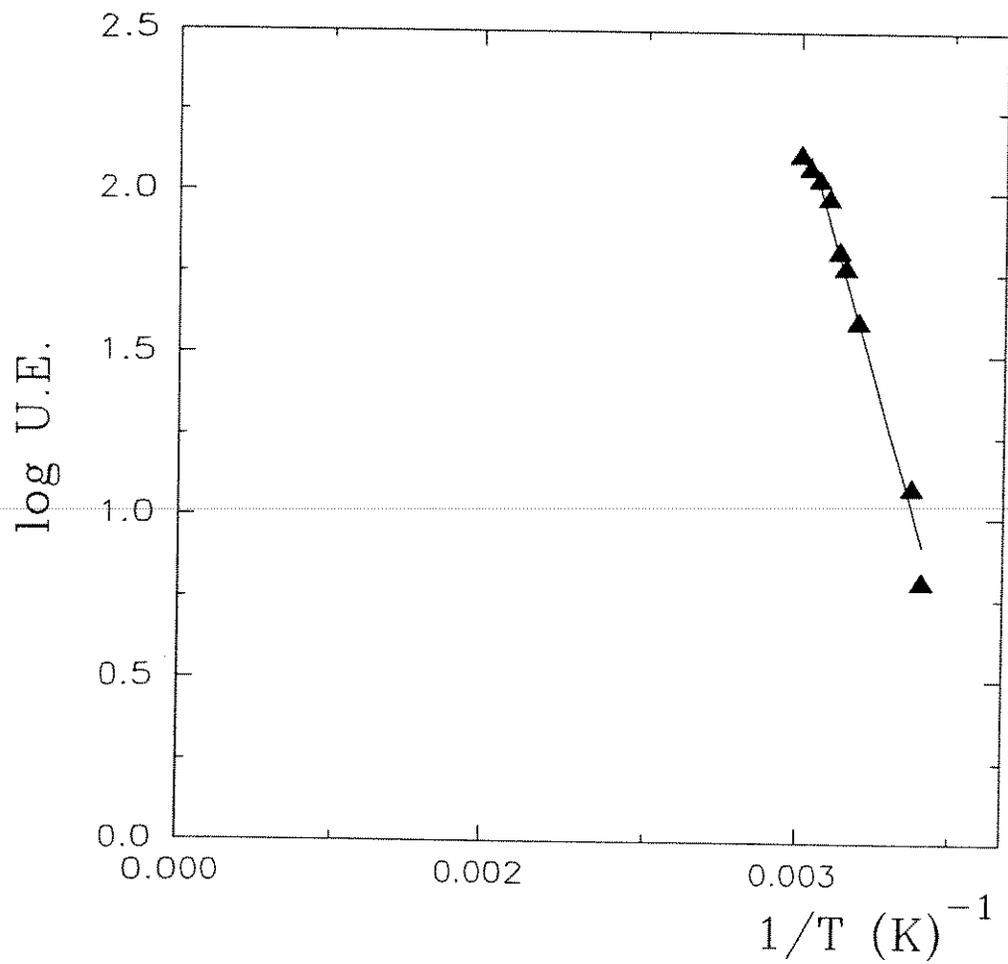
**TABELA V. Constantes de Inibição da Fosfatase Ácida de BPM.**

Inibidor	Ki (M) <sup>1</sup>	Ki (M) <sup>2</sup>
Fosfato	7,69x10 <sup>-4</sup>	7,59 x 10 <sup>-4</sup>
Piridoxal-5-fosfato	2,18x10 <sup>-6</sup>	3,29 x 10 <sup>-6</sup>
o-Vanadato	4,65x10 <sup>-7</sup>	4,40 x 10 <sup>-7</sup>

(1) valores determinados dos gráficos inclinação x [inibidor], Figuras 19, 20 e 21

(2) valores determinados a partir da fórmula  $K_i = \frac{i}{\frac{K_p}{K_m} - 1}$ , onde  $K_i$ ,  $K_p$  e  $K_m$  são,

respectivamente, as constantes de inibição, constante de Michaelis na presença do inibidor e constante de Michaelis.



**FIGURA 22. Determinação da Energia de Ativação pelo Gráfico de Arrhenius.**

O gráfico de Arrhenius foi construído utilizando os dados obtidos na Figura 12.

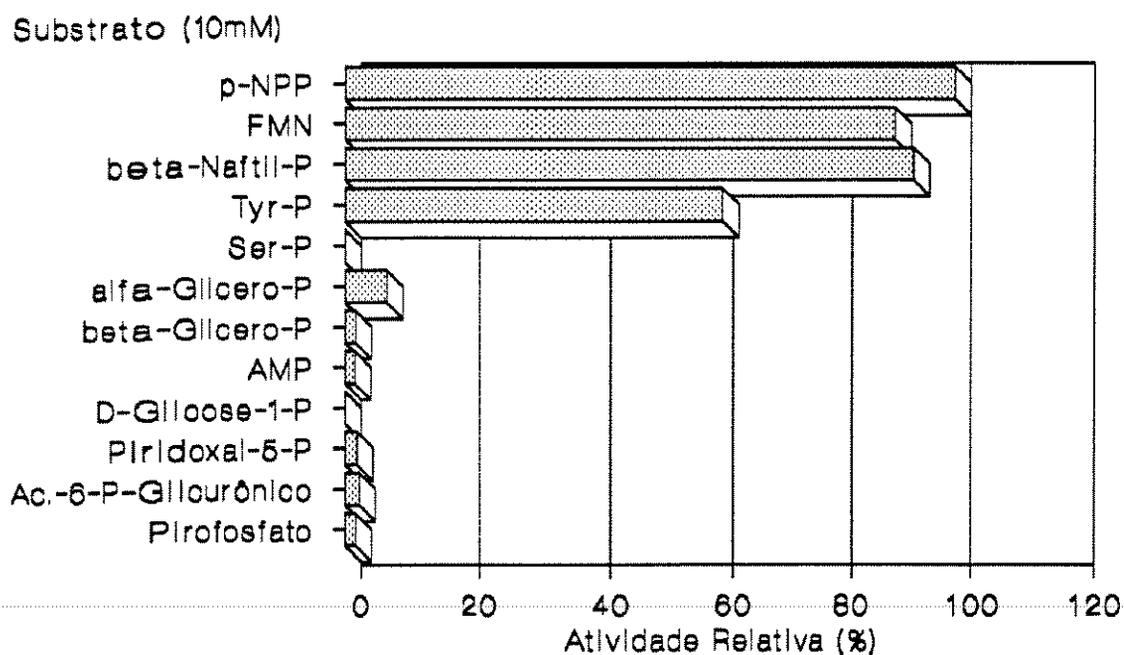
**TABELA VI. Avaliação da Capacidade da Fosfatase Ácida de Catalisar Reações de Transfosforilação em Presença de Álcoois.**

A transferência do fosfato foi medida através da razão entre a concentração do p-Nitrofenol (p-NF) no meio de ensaio, após paralisada a reação, e a concentração do Fosfato Inorgânico (Pi) nas mesmas condições. A quantificação do p-NFenol foi realizada conforme Material e Métodos (3.2.1.a) e a do Pi (3.2.1.b). A reação foi iniciada pela adição de 0,44 µg de enzima.

Composto	p-NF (UE)	Pi (UE)	p-NF/Pi	Ativid. Rel. (%)
AUSENTE	40,9	37,0	1,105	100
Metanol 10%	72,2	27,4	2,635	177
Etanol 10%	48,0	38,9	1,234	117
Glicerol 0,15 M	46,8	37,5	1,311	114
Glicerol 2,0 M	84,3	17,0	4,956	206
Sorbitol 0,15 M	46,4	36,6	1,261	113
Manitol 0,15 M	48,9	34,6	1,413	120

Contudo, ao analisarmos a relação  $V_{max}/K_M$ , instrumento mais preciso para se determinar a especificidade de uma enzima pelo substrato, notamos que a afinidade para a FMN e Tyr-P não é tão grande como para o p-NPP, especialmente no caso da Tyr-P, mas foram os únicos substratos fisiológicos testados pelos quais a enzima demonstrou afinidade significativa (Tabela VII).

Considerando-se que a FMN e a Tyr-P são dois possíveis substratos fisiológicos da FAc de BPM do rim bovino, estudou-se a atividade enzimática destes substratos a diferentes valores de pH. A Figura 24 permite visualizar o efeito do pH na velocidade de hidrólise da FMN, Tyr-P e compara-lo com o descrito para o p-NPP (Figura 10). Destaca-se que o patamar de atividade sobre a FMN e Tyr-P estende-se de 5,0 a 5,5, enquanto que o relativo à hidrólise do p-NPP se estende de 4,5 a 5,5. Outro aspecto interessante é que o produto formado pela hidrólise do p-NPP e da Tyr-P no pH 3,0 (tampão glicina) corresponde a aproximadamente 80% daquele formado no pH 5,0 (tampão acetato) para a hidrólise desses mesmos substratos, fato este não observado quando se utiliza a FMN como substrato.



### FIGURA 23. Especificidade da Fosfatase Ácida.

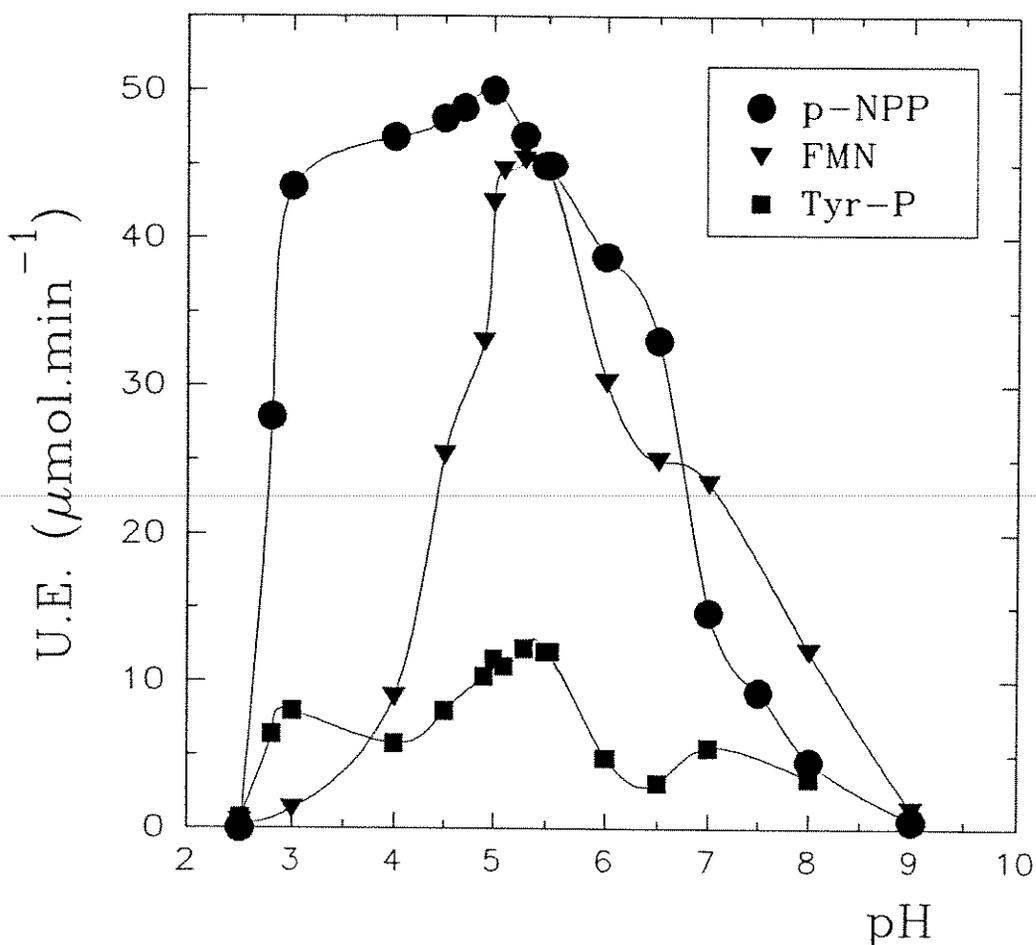
A formação do produto foi quantificada através da liberação do Pi, como descrito em Material e Métodos (3.2.1.b). A reação foi iniciada pela adição de 1,76  $\mu\text{g}$  de enzima, e a concentração final dos substratos era de 5,0 mM.

**TABELA VII. Especificidade para Substratos (pH 5,0).**

A  $K_M$  e a  $V_{max}$  foram calculadas através do gráfico dos Duplos Recíprocos utilizando o programa Enzfitter. As atividades sobre o p-NPP e FMN foi quantificada como descrito em Material e Métodos (3.2.1.b). A atividade sobre Tyr-P e  $\beta$ -Naftil-P foram detectadas pela leitura direta a 293 e 346 nm utilizando um Coeficiente de Extinção Molar de 2.411 e 2.780  $M^{-1} cm^{-1}$ , respectivamente (ZHANG & VAN ETTEN, 1991). As reações sobre p-NPP,  $\beta$ -Naftil-P, FMN e Tyr-P foram iniciadas pela adição de 0,44, 0,44, 0,88 e 7,0  $\mu g$  de enzima, respectivamente.

Substrato	$K_M$ (mM)	$V_{max}$ (UE/mg)	$V_{max}/K_M$
p-NPP	0,142	27,92	196,6
$\beta$ -Naftil-P	0,401	24,92	62,1
FMN	0,302	31,16	103,2
Tyr-P	7,891	17,69	2,2

Obs.: outros substratos testados como o  $\alpha$ -Glicero-P,  $\beta$ -Glicero-P, AMP, D-Glicose-P, Piridoxal-5-P, Ácido 6-fosfoglicurônico, Pirofosfato, não apresentaram atividade significante.



**FIGURA 24. Efeito do pH na Atividade da Fosfatase Ácida sobre o p-NPP, FMN e Tyr-P.**

As atividades sobre o p-NPP e FMN foi quantificada como descrito em Material e Métodos (3.2.1.a) e (3.2.1.b) respectivamente. A atividade sobre Tyr-P foi detectada pela leitura direta a 293 nm utilizando um Coeficiente de Extinção Molar de  $2.411 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (ZHANG & VAN ETEN, 1991). As reações sobre p-NPP, FMN e Tyr-P foram iniciadas pela adição de 0,44, 0,88 e 7,0  $\mu\text{g}$  de enzima, respectivamente.

## 5. DISCUSSÃO

Como amplamente destacado na introdução, o estudo da fosfatase ácida reveste-se de grande importância, especialmente a de BPM, uma vez que está relacionada a diversos eventos celulares (proliferação, crescimento, diferenciação e controle do metabolismo) e ainda não se conhece seu substrato fisiológico. A fim de que seja possível qualquer tipo de estudo mais profundo sobre a atividade desta enzima, sua purificação até a homogeneidade é crucial. Desta forma, neste trabalho, realizamos a purificação da fosfatase ácida de BPM do rim bovino e a caracterização de algumas propriedades físico-químicas e cinéticas. A fim de obter a quantidade de material necessária ao estudo, 1,5 kg de rim bovino foram processados gerando grande volume de solução proteica. A purificação da enzima pode ser realizado em 7 dias de trabalho ininterrupto e os resultados mostraram-se bastante repetitivos nas diversas preparações realizadas tanto quando utilizávamos o rim fresco como o congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A metodologia empregada resultou na obtenção de uma proteína purificada cerca de 1600 vezes e uma A.E. de 100 UE/mg de proteína. O rendimento deste processo foi de 7% em relação ao extrato cru (Tabela II), similar ao de outros trabalhos de purificação envolvendo a fosfatase ácida de BPM e é bastante significativo quando se considera a utilização de técnicas clássicas e de custo reduzido ao invés de cromatografias de afinidade as quais apresentam um rendimento maior porém, a um custo também maior. Uma exceção é o relato de SAEED et alii (1990) o qual, mesmo utilizando um passo de cromatografia de afinidade (ácido p-aminobenzilfosfônico-agarose) conseguiram um rendimento de 15%. Este rendimento é pequeno quando comparado à técnica empregada nos últimos anos pelo grupo de VAN ETTEN e que se resume à precipitações sucessivas com sulfato de amônio, cromatografia em SP-Sephadex (com eluição por íon-afinidade) e duas cromatografias de exclusão molecular sucessivas. O rendimento médio deste procedimento é da ordem de 30 a 40%, contudo, necessita de um tempo de processamento cerca de 3 vezes maior do que o gasto por nós. Embora o rendimento por nós obtido tenha sido menor, deve-se ainda considerar que a atividade da fosfatase ácida de BPM corresponde a cerca de 40-50% da atividade total no extrato (FUJIMOTO et alii, 1984). Assim, a recuperação da fosfatase ácida de BPM em relação àquela existente no extrato seria, aproximadamente, de 15%.

A etapa onde ocorreu a maior perda da atividade enzimática foi a seqüência precipitação ácida-concentração com sulfato de amônio (Tabela II). Porém, apesar da grande perda da atividade registrada na fase de Precipitação Ácida, este passo mostrou-se extremamente importante por evitar a deposição de proteínas insolúveis na resina. Outros procedimentos, como a precipitação com acetona ou álcool, bem como a eliminação pura e simples deste passo, produziram resultados insatisfatórios e com recuperação da atividade ainda menores que o obtido com a precipitação isoelétrica. Esta perda já havia sido relatada anteriormente (LAWRENCE & VAN ETTEN, 1981; TAGA & VAN ETTEN, 1982) sendo, inclusive, da mesma ordem (50%). Contudo, a solução proteica clarificada após esta etapa permitiu a obtenção de um comportamento repetitivo e adequado na cromatografia de troca-iônica no passo seguinte, além de reduzir em cerca de 70% o conteúdo proteico indesejável da solução em relação ao extrato (Tabela II).

Entretanto, é durante a cromatografia em coluna de troca catiônica que realmente conseguimos aumentos significativos na A.E.. Sem dúvida alguma, o principal responsável por este aumento foi a eluição da enzima, adsorvida a uma resina de troca catiônica, com fosfato (inibidor competitivo das FAc). Esta técnica permitiu que uma grande quantidade de proteína não ficasse retida na coluna e que outras, fracamente ligadas, fossem eluídas durante a lavagem da coluna com o próprio tampão de equilíbrio. Normalmente as FAc são eluídas de colunas de troca iônica através de mudanças no pH ou na força iônica porém, não há como tornar este tipo de procedimento seletivo para a FAc de BPM. Assim, para eluir a enzima sem soltar também outras proteínas indesejáveis, lançou-se mão da utilização de um tampão contendo uma concentração saturante de um inibidor competitivo. A ligação do inibidor competitivo, no caso o fosfato, altera a carga líquida da enzima (e possivelmente sua estrutura conformacional) a qual não fica mais retida à coluna. Presumivelmente esta troca no tampão tem pequeno ou nenhum efeito em outras proteínas (LAWRENCE & VAN ETTEN, 1981). Além disso, é possível utilizar condições que são mais favoráveis à estabilidade da enzima, evitando a diálise e aplicando facilmente as frações ativas de uma coluna à outra. Quando a enzima ativa é eluída da coluna, usualmente está em presença de concentração saturante do inibidor competitivo, condição onde a instabilidade da enzima é minimizada. Este efeito protetor do fosfato é amplamente citado, tendo diversos autores mostrado que o fosfato minimiza o efeito inibitório de iodoacetato e iodoacetamida (TAGA & VAN ETTEN, 1982; SAEED et alii, 1990).

O perfil cromatográfico obtido na cromatografia em SP-Sephadex I (Figura 1) evidenciou a existência de dois picos de atividade fosfatásica. O primeiro pico (Pool I) correspondente à proteína não retida na coluna foi guardado para estudo posterior. Possivelmente trata-se de uma fosfatase ácida de APM (TAGA, 1979) em função da sensibilidade ao inibidor tartarato e insensibilidade ao pCMB (não mostrado), característica desta classe de fosfatase ácida (FUJIMOTO, 1984). A eluição com o tampão fosfato permitiu a obtenção de outro pico (Pool II) altamente definido e coincidente com o pico de proteína. Um estudo preliminar com os inibidores tartarato e pCMB (resultados não apresentados) nos revelaram que a atividade do Pool II era resistente ao tartarato e sensível ao pCMB (atividade residual de 93,9% e 6,1%, respectivamente), reforçando que o Pool II consistiria, em sua maior parte, de uma fosfatase ácida de BPM. Este passo mostrou-se bastante repetitivo durante as preparações realizadas e com um rendimento aproximado de 10% em relação à atividade total no extrato e de 30% em relação à fase anterior. Outro ponto de destaque deste procedimento foi a significativa eliminação de proteínas, da ordem de 99,9%, bem como um aumento de 100 vezes na A.E., a qual passou para 6,1 UE/mg de proteína (Tabela II).

A recromatografia do Pool II em SP-Sephadex (Figura 2) mostrou-se bastante efetiva, proporcionando um grande aumento na atividade específica da enzima, em função da grande redução na concentração proteica (95% em relação à fase anterior) em relação à menor redução na atividade total. A grande diferença entre a primeira e a segunda cromatografia é o equilíbrio da última com uma tampão com maior força iônica (tampão acetato contendo sulfato de amônio 100 mM). Nesta condição grande parte da proteína aplicada, bem como a porção de FAc contaminante que não era de BPM, não ficam retidas na coluna e saem na lavagem com o tampão de equilíbrio. Isto pode ser facilmente verificado pelo estudo de inibição onde a atividade do Pool II foi 100% inibida pelo pCMB e totalmente insensível ao tartarato. Obtivemos nesta cromatografia um perfil simétrico muito similar ao de uma enzima pura e homogênea. A enzima apresentou uma A.E. de cerca de 100 UE/mg de proteína e, dentro dos valores obtidos por outros autores, ela se assemelha em muito à enzima purificada por TAGA & VAN ETTEN, 1982; WAHEED et alii, 1988; ZHANG & VAN ETTEN, 1990; SAEED et alii, 1990, todas consideradas homogêneas por diversos métodos como SDS-PAGE, filtração em gel, reação cruzada com anticorpo de outras FAc de BPM purificadas, determinação da composição de aminoácidos e sequenciamento da proteína.

Contudo, dois extremos na literatura são notáveis: a pequena A.E. obtida por BAXTER & SUELTER (1985), ao redor de 7,0 UE/mg de proteína para as formas A e B da FAc de BPM do músculo peitoral de aves; e, ao contrário, a elevada A.E. relatada por CHERNOFF & LI (1985), os quais obtiveram um valor de 34.309 e 47.491 UE/mg de proteína para a hidrólise do p-NPP e Tyr-P pela FAc de BPM (também uma PTPP) do coração bovino..

Analisando a eletroforese em pH 7,5 com coloração para proteína e atividade, verificamos apenas uma banda proteica coincidente com a de atividade (Figura 3). Na SDS-PAGE obtivemos uma única banda proteica mesmo com concentrações crescentes de proteína e, através da mobilidade eletroforética relativa, calculamos a  $M_r$  em 17,8 kDa (Figuras 6 e 7). A pequena mobilidade eletroforética no pH 7,5 é um forte indício de que a proteína possua um  $pI$  ao redor de 7,0 ou ligeiramente básico como o relatado por WAHEED et alii, 1988, de 7,2, e por ZHANG & VAN ETTEN, 1990, de 7,0. De forma semelhante, a filtração em gel proporcionou um perfil onde o pico de proteína foi eluído simultaneamente ao de atividade de forma simétrica (Figura 4), semelhante ao relatado por WAHEED et alii (1988). A  $M_r$  foi estimada em 13,6 kDa. A análise em conjunto destes resultados revelam que a proteína consiste de uma única cadeia polipeptídica e reforça o alto grau de homogeneidade da proteína purificada. A diferença entre as  $M_r$  obtidas através da SDS-PAGE e filtração em gel também foi relatada por ZHANG & VAN ETTEN (1990) e pode se dever simplesmente ao fato de que estes métodos não são extremamente precisos para a determinação da  $M_r$  (LAUE & RHODES, 1990).

A análise comparativa da composição de aminoácidos de outras FAcS anteriormente purificadas nos permite verificar uma grande semelhança com a enzima do rim bovino, apesar da não determinação dos resíduos de Cys e Trp (Tabela VIII, A). Esta homologia pode ser melhor notada na Tabela VIII.B onde os aminoácidos foram agrupados em função de suas características. É clara a preservação do número de resíduos dentro da classificação de não-polares, polares não-carregados, ácidos e básicos nas diversas fosfatases purificadas. Um estudo mais acurado da composição de aminoácidos pode nos dar uma idéia geral de algumas propriedades da enzima. A preponderância de aminoácidos ácidos sobre os básicos pode ser relacionado ao fato da fosfatase ser ativa em meio ácido (pH 4,0 a 5,5). A razão entre o número de aminoácidos polares e não-polares, de 1,6, revela

um maior conteúdo de aminoácidos polares, muito embora cerca de 40% de todos os resíduos de aminoácidos sejam não-polares, sugerindo um número significativo de estrutura em hélice, além de uma forte hidrofobicidade da molécula (PRICE & STEVENS, 1989). O estudo da composição de aminoácidos da FAc de placenta humana realizada por WAHEED et alii (1988) revelou um conteúdo de cerca de 20% de resíduos com caráter hidrofóbico. Este dado somado à medida experimental da hidrofobicidade, permitiu que concluíssem que a enzima é uma proteína hidrofóbica. Segundo os autores, este resultado também explicava a razão da agregação observada quando a enzima estava em presença de moderadas ou altas concentrações de sal, a qual levava à perda da atividade. A utilização de glicerol 50% e 2-mercaptoetanol para a conservação da atividade proteica da FAc de BPM do rim bovino visa minimizar o processo de agregação, uma vez que também possui um conteúdo relativamente alto de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos.

O número de resíduos de Cys não foi determinado devido à suscetibilidade à oxidação. Igualmente, o Trp não foi quantificado por ser destruído durante a hidrólise ácida. Assim, a  $M_r$  mínima (devido à não determinação do n° dos resíduos Trp e Cys) é de 16,7 kDa. Porém, em função da grande homologia com outras FAc de BPM, podemos sugerir a existência de, ao menos 2 resíduos de Trp e cerca de 7 resíduos de Cys, o que perfaz uma  $M_r$  aproximada de 17,4 kDa, muito próximo do obtido na SDS-PAGE, 17,8 kDa (Figura 7).

Iniciando o estudo cinético da fosfatase ácida do rim bovino verificamos que ela apresentou linearidade quando os ensaios eram realizados por um tempo de incubação de até 20 minutos e com uma concentração de enzima de 0,1 até 1  $\mu$ g por ensaio. Adequando as condições de ensaio a estes parâmetros, adotamos um tempo de reação de 10 minutos a 37°C para concentrações de enzima entre 0,1 e 0,44  $\mu$ g de enzima/tubo, o que nos permitia obter leituras de absorbância a 405 nm entre 0,2 e 0,8 nestas condições, com um consumo de 2 a 9% do substrato, garantindo que a reação acontecesse em condições saturantes do substrato.

Através do estudo da influência do pH na atividade enzimática sob as condições padrão de ensaio, verificamos que a atividade ótima ocorre em uma faixa relativamente larga de pH, entre 4,0 e 5,5, com um ponto ótimo no pH 5,0 (Figura 10). Este aspecto é similar ao referido para as fosfatases ácidas do fígado (HEINRIKSON, 1969), cérebro (CHAIMOVICH & NOME, 1970; SAEED et alii, 1990) e coração bovinos (CHERNOFF & LI, 1985) quanto à larga faixa de pH

ótimo para a enzima. Entretanto, nos casos acima relatados, a faixa ótima está um pouco mais deslocada para o meio neutro (pH de 5,0 a 6,0). Outro fato observado é a alta atividade da enzima nos valores de pH 2,8 e 3,0 em tampão glicina. No pH 3,0 a atividade correspondeu a 87% daquela obtida no pH 5,0, o que não ocorre quando utilizamos o tampão citrato nestes valores de pH (Figura 10). TAGA, em 1979, também relatou este comportamento para a fosfatase ácida de APM do fígado de cobaia e, recentemente, detectamos o mesmo comportamento para a FAc de BPM da glândula parótida de bovinos (não mostrado).

O estudo da influência do pH na inativação térmica a 60°C (Figura 14) também revelou dois aspectos curiosos. Primeiro, o pH em que a enzima apresentou a maior estabilidade foi o pH 5,5 (tampão bis-tris), por outro lado, nos valores de pH 4,2 e 7,5 (tampão acetato e imidazol, respectivamente) ocorreram as maiores perdas na atividade enzimática. Nestas condições, após 10 minutos de pré-incubação, a atividade residual era menor do que 10%. Um estudo semelhante foi realizado por JANSKA et alii (1988) onde os autores analisaram a termoestabilidade da fosfatase ácida de maior (140,5 kDa) e menor (38,2 kDa)  $M_r$ . Seus resultados revelaram que após 5 minutos de pré-incubação das enzimas a 56°C houve uma perda drástica da atividade da enzima de maior  $M_r$ ; por outro lado, a isoenzima de menor  $M_r$  demonstrou um crescimento constante na atividade até os 30 minutos de pré-incubação. O segundo destaque neste experimento refere-se à estabilidade apresentada pela enzima quando em tampão glicina (pH 2,8) que foi praticamente igual à atividade residual apresentada pela enzima no tampão acetato pH 5,2. Estes resultados analisados em conjunto reforçam a indicação de algum tipo de efeito causado pela glicina no meio de reação. Podemos especular que o caráter anfótero da glicina possa interferir de alguma maneira na atividade enzimática uma vez que o acetato e o citrato, em pH menor que 4,0, se comportariam como um íon negativo e, à maneira do fluoreto, molibdato, vanadato e tartarato, inibindo a atividade da enzima (VAN ETTEN; WAYMACK & REHKOP, 1974). É preciso lembrar que, como tampões, estes íons atingem a concentração de 100 mM. A glicina poderia estar interagindo com o substrato uma vez que podemos notar na Figura 24 que o efeito ativador ocorre apenas na presença do p-NPP e Tyr-P (com estruturas químicas muito semelhantes) e não quando a FMN é utilizada; estudos mais detalhados serão fundamentais para a compreensão desta ativação.

**Tabela VIII.A. Composição de Aminoácidos - Análise Comparativa Entre Fosfatases Ácidas de Diferentes Tecidos.**

Aminoácidos/ Fonte	Fígado Bovino <sup>a</sup>	Fígado Bovino <sup>b</sup>	Fígado Bovino <sup>c</sup>	Cérebro Bovino <sup>d</sup>	Coração Bovino <sup>e</sup>	Rim Bovino	Placenta Humana <sup>f</sup>	Eritrócito Humano - B/g	Eritrócito Humano - B <sub>s</sub> h
Asp + Asn	15		23					19	21
Asp		21	24			20		18	
Thr	7	6	6		6	7		8	7
Ser	6	10	10		9	7		11	11
Glu + Gln	16		16		16			20	18
Glu		15	16			17		18	
Pro	9	5	5		5	8		8	6
Gly	10	6	6		6	12		14	8
Ala	10	9	10		10	10		13	12
Cys	2	7	8		7	ND		4	7
Val	13	13	15		14	13		14	10
Met	4	1	1		1	3		1	1
Ile	8	8	9		8	7		5	8
Leu	11	10	11		11	12		14	12
Tyr	4	5	5		5	5		4	5
Phe	6	5	6		6	5		5	6
His	2	2	2		2	5		1	4
Lys	13	8	9		9	10		4	10
Arg	7	11	12		11	11		6	10
Trp	2	2	2		2	ND		3	ND
TOTAL:	145	144	157	162	151	152	151	154	157

(a) HEINRIKSON, 1969;

(b) LAWRENCE & VAN ETTEN, 1981;

(c) CAMICI et alii, 1989;

(d) SAEED et alii, 1990;

(e) ZHANG & VAN ETTEN, 1990;

(f) WAHEED et alii, 1988;

(g) DISSING & SVENSMARK, 1990;

(h) DISSING & SVENSMARK, 1990.

**Tabela VIII.B. Composição de Aminoácidos. Análise Comparativa da Homologia em Função das Cadeias Laterais.**

aminoácidos\ Fonte	Fígado Bovino <sup>a</sup>	Fígado Bovino <sup>b</sup>	Fígado Bovino <sup>c</sup>	Cérebro Bovino <sup>d</sup>	Coração Bovino <sup>e</sup>	Rim Bovino	Placenta Humana <sup>f</sup>	Eritrócito Humano - B/β	Eritrócito Humano - B <sub>s</sub> <sup>h</sup>
Ácidos	36	36	40	40		37	36		
Básicos	22	21	23	23	22	26	11	23	24
Neutros	29	34	35	36	33	31*	41	38	38
Não-Polares	63	53	59	61	57	58**	63	55**	55**
Glu + Gln	16				16			18	17
Asp + Asn	15				23			19	21

\* Cys não determinada;

\*\* Trp não determinado;

(a) HEINRIKSON, 1969;

(b) LAWRENCE & VAN ETTEN, 1981;

(c) CAMICI et alii, 1989;

(d) SAEED et alii, 1990;

(e) ZHANG & VAN ETTEN, 1990;

(f) WAHEED et alii, 1988;

(g) DISSING & SVENSMARK, 1990;

(h) DISSING & SVENSMARK, 1990.

A avaliação do efeito da concentração do substrato (p-NPP) na atividade enzimática foi medido através da quantificação do p-Nitrofenol e fosfato liberados. Os parâmetros cinéticos obtidos e os gráficos de Michaelis-Menten e de Lineweaver-Burk (Figura 11) demonstram cabalmente que ambos os métodos refletem corretamente o comportamento da enzima frente ao substrato. A afinidade da fosfatase ácida de BPM do rim pelo p-NPP ( $K_M = 1,42 \times 10^{-4}M$ ), no pH 5,0, é de uma ordem de grandeza similar a de diversas outras fosfatases ácidas de BPM, como pode ser observado na Tabela IX.

**TABELA IX.  $K_M$  do p-NPP para Diversas Fosfatases Ácidas Purificadas**

REFERÊNCIA	FONTE	$K_M^*$ ( $10^{-4}M$ )
TAGA & VAN ETTEN, 1982	Fígado Humano	2,20
CHAIMOVICH & NOME, 1970	Cérebro Bovino	0,75
HEINRIKSON, 1969	Fígado Bovino	7,50**
WAHEED et alii, 1988	Placenta Humana	1,69
ZHANG & VAN ETTEN, 1990	Coração Bovino	3,80
SAEED et alii, 1990	Coração Bovino	2,00
DISSING & SVENSMARK, 1990	Eritrócito Humano	
	Isoenzima Bf	0,37
	Isoenzima Bs	5,30

\* - o p-NPP foi utilizado como substrato, no pH 5,0.

\*\* - ensaio a pH 5,5.

O efeito da temperatura foi estudado sob dois pontos de vista: *i*) determinação de temperatura ótima, medindo-se a formação do produto (p-NFenol) após 10 minutos de incubação a diferentes temperaturas (de 4 a 68 °C); *ii*) estudos de inativação térmica: após diferentes períodos de pré-incubação a 60°C, alíquotas da enzima foram colocadas em gelo e a atividade residual foi medida a 37°C, após 10 minutos de incubação. No primeiro caso, pudemos verificar que a formação do produto aumenta consideravelmente com a temperatura. Alguns fatores podem

explicar este comportamento como a influência da temperatura na quebra do complexo *E-P*; pelo efeito na afinidade enzima-substrato; devido a alguma alteração nos pKs, os quais são determinados por suas energias de ativação (DIXON & WEBB, 1967). Entretanto, a determinação de qual ou quais fatores estão influenciando neste caso não pode ser realizada através deste estudo. A grande complexidade das variáveis envolvidas exige a determinação de constantes termodinâmicas a partir das constantes de velocidade implicando em diversos experimentos e tratamentos matemáticos dos resultados, o que foge ao nosso objetivo. Apenas para exemplificar, analisemos a temperatura ótima obtida. A 60°C ocorre a maior liberação do produto (Figura 12) apesar de podermos verificar que após 5 minutos de reação nesta temperatura a velocidade atinge um platô (Figura 13). Isto pode ter dois significados: ou ocorre inativação da enzima após 5 minutos de reação ou o substrato deixou de ser saturante após este período uma vez que ocorre hidrólise espontânea do substrato a 60°C, dependente do tempo. Neste segundo caso, poderá ainda estar ocorrendo inibição pelo produto da hidrólise, o fosfato, característico inibidor da atividade da fosfatase ácida. Uma forte indicação de inativação da enzima pode ser obtida no estudo de inativação térmica onde observamos a perda de cerca de 50% da atividade após 10 minutos de pré-incubação a 60°C no pH 5,2 (Figura 14), resultado semelhante ao relatado por DISSING & SVENSMARK (1990) para a isoenzima *s* da fosfatase ácida de BPM de eritrócito humano. Neste experimento podemos observar novamente o efeito da glicina.

A análise do efeito da temperatura na atividade da fosfatase ácida em mamíferos não é freqüente, especialmente com relação à enzima de BPM. Uma rara exceção é o relato de DISSING & SVENSMARK (1990), onde verificaram que as isoenzimas *f* e *s* de eritrócitos humanos sofreram inativação térmica a 63 e 66°C, respectivamente. Relataram ainda que a atividade residual após a pré-incubação a 60°C sofreu uma elevação considerável (quase 2 vezes) nos instantes iniciais do tratamento. Esta ativação foi explicada como um rearranjo transitório das moléculas da enzima, a qual foi sucedida por uma inativação dependente do tempo que eliminou praticamente toda atividade após 20 minutos de pré-incubação. LAU, FARLEY & BAYLINK (1987), analisando a fosfatase ácida de PMI (34,6 kDa) de matriz óssea de bovino, observaram uma grande estabilidade térmica, mantendo cerca de 80% da atividade residual após 30 minutos de incubação a 60°C. Resultado similar foi obtido por KANAI & KONDO (1991) trabalhando com

suspensão de *Pseudomonas pseudomallei* e *P. cepacia*, onde verificaram a retenção de grande parte da atividade após 20 minutos de pré-incubação a 60°C. Os estudos de estabilidade térmica e, principalmente, temperatura ótima e cálculo da energia de ativação tem sido realizado com maior frequência em fosfatase ácida de plantas. Diversos trabalhos tem relatado uma temperatura ótima de 60°C como ULLAH & GIBSON, 1988 (cotilédone de soja); DE-KUNDU & BANERJEE, 1990 (caule em germinação de *Vigna radiata*); BISWAS & CUNDIFF, 1991 (semente em germinação de *Vigna sinensis*). Apresentando temperaturas ótimas menores há os relatos de PANARA; PASQUALINI & ANTONIELLI (1990) e MIERNYK (1992) que determinaram a temperatura ótima de 30°C (cevada) e 50°C (endosperma de milho), respectivamente.

Com relação à  $E_a$ , também poucos são os relatos na literatura, especialmente quanto às fosfatases ácidas de BPM. O valor da energia de ativação por nós obtido (43,31 kJ.mol<sup>-1</sup>) é superior à obtida para as formas AP-I e AP-II do caule em germinação de *Vigna radiata* (DE-KUNDO & BANERJEE, 1990). BISWAS & CUNDIFF (1991), calcularam as energias de ativação de múltiplas formas de fosfatase ácida da semente de *Vigna radiata* em germinação (AP-I, AP-II, AP-III e AP-IV), para a hidrólise do p-NPP, como sendo 12,4; 11,2; 6,0; 8,0 kcal.mol<sup>-1</sup>, respectivamente. ZHANG & VAN ETEN (1991) realizaram estudos de dependência da temperatura para a FAc de BPM do coração bovino nos valores de pH 5,0 e 7,0 e revelaram energias de ativação praticamente idênticas para o passo limitante da reação (56,9 e 58,9 kJ.mol<sup>-1</sup>, respectivamente).

Assim, este conjunto de experimentos serviu, principalmente, para determinar as condições padrão de ensaio a serem empregadas durante a análise das outras características cinéticas da fosfatase ácida de BPM do rim bovino. Os ensaios posteriores foram realizados por um período de incubação de 10 minutos, com uma concentração de enzima variando entre 0,1 e 0,8 µg por tubo, no pH 5,0, a 37°C. Esta temperatura foi a escolhida por ser mais próxima do fisiológico, para efeito de comparação com a literatura, pelo fato da FAc apresentar uma estabilidade térmica nesta temperatura maior que a 60°C (resultado não mostrado) e por não promover a hidrólise térmica espontânea do substrato em níveis significativos.

O estudo do efeito de compostos na atividade da FAc é de suma importância pois permite a detecção de possíveis efetores, tanto positivos quanto negativos, da

atividade enzimática. Estas informações são fundamentais para a otimização do processo de purificação bem como para a execução dos estudos cinéticos e para a efeito de comparação com outras FAcS, especialmente as de BPM de mamíferos as quais possuem padrões de comportamento muito precisos frente aos compostos testados.

Através da análise do efeito de diferentes íons metálicos na atividade (Figura 15) pudemos notar três comportamentos básicos:

- a) de mínima sensibilidade frente aos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$ .
- b) de sensibilidade moderada em presença de  $\text{Zn}^{2+}$ .
- c) de extrema sensibilidade ao  $\text{Cu}^{2+}$ .

O efeito inibitório obtido com zinco e cobre se deve à formação de complexos com a proteína através dos grupos -SH. Da mesma maneira, estes complexos podem ser formados entre a proteína e o ferro ou molibdênio. A independência de íons metálicos para a atividade desta FAc pode ser confirmada pelo mínimo efeito causado pela alta concentração de EDTA utilizada no ensaio (Figura 17).

De maneira geral estes resultados são similares aos relatados para outras FAc de BPM (CHAIMOVICH & NOME, 1970; GALKA et alii, 1980; CHERNOFF & LI, 1985; SAEED et alii, 1990). Entretanto, algumas diferenças foram observadas como a maior sensibilidade ao  $\text{Mn}^{2+}$  apresentada pela FAc de BPM da cauda de *Xenopus laevis* (FILBURN, 1973). Também há divergência com relação à FAc de rim bovino, purificada anteriormente por FUJIMOTO et alii (1984), onde os autores relataram uma inibição de 50% em presença de  $\text{FeSO}_4$  (1 mM) enquanto obtivemos uma atividade relativa de 95%. FUJIMOTO et alii relataram ainda que o  $\text{FeCl}_3$  em uma concentração 10 vezes menor produz uma inibição ainda mais intensa. Uma possível explicação para esta diferença pode residir no fato de que, no trabalho de FUJIMOTO, a enzima foi pré-incubada por 20 minutos com o íon antes de ser submetida ao ensaio da atividade. Contudo, apesar de não termos pré-incubado a enzima com o íon, acreditamos que, havendo suscetibilidade da enzima pelo  $\text{Fe}^{2+}$ , esta seria notada, uma vez que nosso ensaio ocorreu em presença de 10 mM de  $\text{Fe}^{2+}$ . Outras diferenças também são notadas quando analisamos o

comportamento de FAc purificadas de plantas. Algumas isoenzimas sofrem uma pequena ativação em presença do  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  que varia de 13 a 40% (DE-KUNDO & BANERJEE, 1990; BISWAS & CUNDIFF, 1991; PASQUALINI et alii, 1992). Outro aspecto é o menor poder de inibição exibido pelo  $\text{Cu}^{2+}$  (DE-KUNDO & BANERJEE, 1990; PASQUALINI et alii, 1992). O efeito de íons metálicos deve ser analisado como um aspecto característico e específico da enzima em estudo. A análise da literatura, bem como de nossos resultados não sustentam a hipótese de que grupos de isoenzimas possuam comportamentos idênticos frente a determinado íon. Um exemplo claro é o do  $\text{Zn}^{2+}$  que, na concentração de 1 mM, ativa em 20% a FAc de APM do coleóptilo de cevada (PASQUALINI et alii, 1992) e inibe em 80% a atividade da FAc de APM da semente de *Vigna sinensis* em germinação (BISWAS & CUNDIFF, 1991). Similarmente, SOTIROUDIS & GELADOPOULUS (1990) mostraram que 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  promoveu uma inibição maior que 95% na FAc do músculo esquelético de coelho.

Uma vez que é bem conhecida a importância de grupos -SH para a atividade da FAc de BPM (BITTENCOURT & CHAIMOVICH, 1976; LAIDLER; TAGA & VAN ETEN, 1982; CHIARUGI et alii, 1992; ZHANG; DAVIS & VAN ETEN, 1992), o efeito de compostos sulfidrílicos que protejam estes grupos também foram investigados. Contudo, a FAc de rim bovino não revelou qualquer tipo de efeito em presença dos agentes protetores de grupos -SH em nenhuma das três concentrações testadas (0,01, 0,1 e 1 mM) (Figura 16). Este tipo de comportamento foi relatado por CHAIMOVICH & NOME (1970) onde, mesmo após 60 minutos de pré-incubação da FAc de BPM do cérebro bovino com 10 mM de 2-mercaptoetanol, a atividade relativa foi de 96%. Por outro lado é comum encontrarmos na literatura relatos de ativação da enzima em presença destes compostos. GALKA et alii (1980) relata uma atividade relativa de 138% e 105% para a fosfatase citossólica do fígado de rato em presença de 50 mM de 2-mercaptoetanol e 10 mM de DTT, respectivamente. Estímulo significativo foi relatado por FUJIMOTO et alii para a FAc de BPM do rim bovino purificada em 1984. Os autores obtiveram uma atividade relativa de 208% em presença de 6-Etilmercaptipurina (1 mM); os compostos sulfidrílicos convencionais não foram testados. Similarmente, JANSKA et alii (1988) obtiveram uma ativação de 204% e 158% na atividade da FAc de PMI do fígado de sapo tanto para a hidrólise do p-NPP e Tyr-P, respectivamente, na presença de DTT 10 mM. Em fosfatase ácida de plantas, DE-KUNDO & BANERJEE (1990) relataram um pequeno efeito positivo, da ordem de 13%, na

atividade da FAc de *Vigna radiata* em presença de 10 mM de 2-mercaptoetanol. Em contrapartida, HAYMAN et alii (1989) observaram um efeito inibidor da FAc de osteoclastoma humano (30,0 kDa) em presença de 200 mM de 2-mercaptoetanol. No caso específico das FAc de BPM, cuja atividade é claramente dependente de um ou mais grupos -SH localizados no ou próximo do sítio ativo, seria mais lógico esperar que o efeito de compostos protetores de -SH, como o nome já diz, seria mais importante na proteção dos grupos tiólicos da enzima do que propriamente ativar a enzima em condições normais.

O efeito fortemente ativador apresentado pelo 6-etilmercaptipurina está relacionado com a ativação causada por purinas, descrito por TANIZAKI; BITTENCOURT & CHAIMOVICH (1977). O estudo do efeito de outros compostos na atividade da fosfatase por nós purificada também evidenciou a ativação da enzima em presença de derivados purínicos, a guanosina. Esta promoveu um aumento de 74% na atividade da enzima quando acrescentada no meio de ensaio na concentração de 1 mM (Figura 17). TANIZAKI et alii relataram que a ativação das fosfatases ácidas de BPM por purinas parece ser geral para esta classe de fosfatase ácida e específica com relação à estrutura do ativador. Baseados na variação do nível de ativação em função de mudanças no núcleo purínico e pela fosforilação do nucleosídeo, juntamente com os dados cinéticos, os autores sugerem que deva existir um sítio específico na enzima capaz de ligar a purina. Esta ligação, ocorrendo após a formação do complexo *E-S*, resultaria em um aumento na atividade catalítica. Um relato extremamente interessante foi o de BAXTER & SUELTER (1985) que isolaram duas formas de FAc de BPM distintas (A e B) do músculo peitoral de aves, as quais estão elevadas no músculo distrófico. As duas formas somente foram completamente separadas por focalização isoelétrica e apresentaram algumas características cinéticas específicas, entre elas o fato de que a forma A não foi ativada por guanosina enquanto que a forma B apresentou um  $K_a$  (constante de associação) de 2,02 mM.

Recentemente, DISSING; RANGAARD & CHRISTENSEN (1993) relataram a modulação da atividade das isoenzimas "lenta" *s* e "rápida" *f* da FAc de BPM citossólica de eritrócitos humanos por purinas. Verificaram efeitos distintos da adenina e hipoxantina sobre as isoenzimas. A atividade catalítica da isoenzima *f* foi aumentada em 5,1 vezes pela hipoxantina e diminuída em 40% pela adenina enquanto que a forma *s* não foi afetada pela hipoxantina mas aumentada em 4,6 vezes pela adenina. Os autores concordam com a existência de um sítio específico

para a ligação do efetor mas discordam quanto à sugestão de que o efetor somente se ligue ao complexo enzima-substrato, como proposto por TANIZAKI et alii (1977). Os autores propuseram um mecanismo no qual o efetor poderia se ligar à enzima livre tanto quanto ao complexo enzima-substrato. Relataram que a afinidade dos efetores positivos (adenina para *s* e hipoxantina para *f*) pela enzima foi maior que para o complexo *E-S*. Em contraste, a afinidade do inibidor adenina para a forma livre da isoenzima *f* foi menor do que para o complexo *E-S*. Sugerem a existência de um sítio de ligação adjacente paraestéreo que permite o contato químico entre o efetor e o substrato devido às profundas diferenças dos efeitos causados pelas moléculas de hipoxantina e adenina, quimicamente similares. Os estudos cinéticos neste trabalho indicaram que a ligação de efetores positivos à enzima resultaria em uma modificação do sítio ativo que provocaria um decréscimo na energia do estado de transição do passo limitante da reação. Em contraste, a ligação do efetor negativo, a adenina para a forma *f*, provavelmente aumentaria a energia necessária para superar o estado de transição.

Dos outros compostos testados, chama a atenção a inibição causada pelo Piridoxal-5-P (Figura 17) uma vez que pudemos notar nos estudos de especificidade de substrato que a enzima não atua significativamente sobre o mesmo (Tabela VII), muito embora este composto seja um substrato para a localização histoquímica específica da FAc do complexo de Golgi no tecido ósseo (COLEMAN, SCHOFIELD & McDONALD, 1980). Corroborando os achados de SAEED et alii (1990), este composto mostrou-se um inibidor com alta afinidade pela enzima como será discutido mais à frente. Interessante notar o comportamento contrário do Triton X-100 e o SDS, detergentes não-iônico e catiônico, respectivamente (Figura 17). A ativação apresentada pela enzima em presença do Triton X-100 é comumente relatada para a FAc de BPM chegando, em alguns casos promover um aumento na atividade de cerca de 40-50% (FILBURN, 1973; SAEED et alii, 1990). Da mesma maneira, também é comum a inibição pelo SDS que promove o desenovelamento da proteína com a conseqüente perda da sua atividade catalítica (BISWAS & CUNDIFF, 1991). A fim de determinar se a inibição pelo SDS ocorre devido somente às interações de cargas, seria importante analisar o efeito de detergentes catiônicos na atividade da enzima.

Estudando o efeito de inibidores em potencial na atividade desta enzima (Figura 18) pudemos, de maneira indubitável, classificá-la como uma fosfatase ácida de BPM. O comportamento frente a inibidores clássicos como tartarato,

fluoreto, pCMB e fosfato corresponde ao citado nos diversos relatos acerca desta proteína o que permite diferenciá-las entre fosfatases de alto, intermediário e BPM (FILBURN, 1973; DE ARAÚJO; MIES & MIRANDA, 1976; TAGA & VAN ETTEN, 1982; FUJIMOTO et alii, 1984; WAHEED et alii, 1988; SOTIROUDIS & GELADOPOULOS, 1990; PANARA et alii, 1992). O aspecto de maior especulação neste conjunto de experimentos é a inibição pelo íon vanadato, reconhecidamente relacionado com a inibição de fosfatases envolvidas no processo de proliferação, crescimento e diferenciação celular em especial as PTPP. O efeito inibitório do vanadato deve-se fundamentalmente por ser um análogo do fosfato inorgânico (Pi), o qual é o produto da reação catalisada pela fosfatase ácida e tem a capacidade de inibir competitivamente a atividade enzimática (Figura 21). A  $K_i$  obtida para o o-Vanadato  $0,465 \mu\text{M}$  (Tabela V) foi cerca de uma ordem de grandeza menor que o relatado por SAEED et alii em 1990 ( $3,0 \mu\text{M}$ ) e duas ordens de grandeza daquela relatada por ZHANG & VAN ETTEN em 1990 ( $29,0 \mu\text{M}$ ) e semelhante ao referido por WAHEED et alii em 1988 ( $0,13 \mu\text{M}$ ). Os dois últimos trabalhos relatavam uma FAc de BPM com atividade fosfo-tirosina proteína fosfatase. Apesar de os dados da literatura indicarem que a inibição específica por vanadato possa não ser universal entre as PTPP (LAU; FARLEY & BAYLINK, 1989), estes dados sustentam a necessidade de um estudo mais detalhado acerca deste comportamento.

Com relação à inibição pelo fosfato obtivemos uma  $K_i$  de aproximadamente  $0,8 \text{ mM}$  (Tabela V), resultado este similar ao relatado em outros trabalhos: CHAIMOVICH & NOME ( $0,7 \text{ mM}$ ); TAGA & VAN ETTEN ( $1 \text{ mM}$ ); ZHANG & VAN ETTEN ( $2 \text{ mM}$ ). O fosfato assume ainda um importante papel durante o processo de purificação da fosfatase ácida de BPM, atua como um ligante específico que interage com a enzima e desempenha um tipo de eluição por afinidade para liberá-la da resina de SP-Sephadex (LAWRENCE & VAN ETTEN, 1981). A capacidade de proteger a FAc BPM da inativação pelo iodoacetato devido a sua capacidade de se ligar ao sítio ativo, sugere a existência de um resíduo de cisteína essencial para a atividade (TAGA & VAN ETTEN, 1982; ZHANG; DAVIS & VAN ETTEN, 1992).

A inibição por piridoxal-5-P não tem sido muito descrita, possivelmente pela atenção estar mais especificamente voltada para a possibilidade de atuar como um substrato fisiológico, similarmente ao que ocorre com a FAc de PMI (FUJIMOTO et alii, 1984). Contudo, a  $K_i$  de  $2,6 \mu\text{M}$ , ligeiramente menor que o relatado por

SAEED em 1990, pode significar algum tipo de regulação fisiológica dada à importância deste metabólito, além do fato de permitir o estudo quanto à participação da lisina no sítio ativo. O grupo de Ramponi demonstrou que o piridoxal-5-P interage com a enzima tanto pelo grupo fosfato como pelo aldeído e que a Cys-17, essencial para a atividade da FAc de BPM do fígado bovino (uma PTPP), interage com o fosfato do piridoxal-5-P. Sugere que as PTPP de BPM, com baixa afinidade pelo inibidor piridoxal-5-P, sejam chamadas de Tipo 1, enquanto aquelas com alta afinidade pelo inibidor sejam designadas como tipo 2 (CIRRI, 1993).

Vários álcoois têm a capacidade de funcionar como aceptores de fosfato em reações de transfosforilação (Tabela VI). A capacidade de realizar a transfosforilação do fosfato liberado do substrato para álcoois é hoje bem conhecida como uma das características da FAc de BPM. Está bem estabelecido que o mecanismo de hidrólise do substrato pela enzima é o de deslocamento nucleofílico, formando um intermediário fosfo-enzima. Ocorre que a velocidade de hidrólise do p-NPP em presença de um aceptor nucleofílico (álcool) aumenta consideravelmente em relação ao controle que possui apenas água. Isto ocorre de tal maneira que aumentando a concentração do aceptor, aumenta também a velocidade de hidrólise (BALDIJÃO, 1972; KANEKO & KATOH, 1990; ZHANG & VAN ETTEN, 1990). É importante relatar que a taxa de Pi produzido mantém-se relativamente constante nos experimentos de transfosforilação (Tabela VI), o que está em concordância com a existência de um intermediário fosfo-enzima covalente, com a quebra deste intermediário sendo o passo limitante da velocidade de reação (VAN ETTEN & ZHANG, 1990). A atividade relativa em presença destes efetores é muito semelhante ao relatado pela literatura, independente da fonte de que foi purificada a enzima (TAGA & VAN ETTEN, 1982; SAEED et alii, 1990). O papel fisiológico desta ativação ainda é obscuro uma vez que as concentrações usadas não são fisiológicas e os estudos detalhados deste comportamento são escassos, o que evidencia uma promissora linha de investigação.

Uma outra característica peculiar das FAc de BPM foi também observada para a enzima purificada do rim bovino, qual seja, a sua grande especificidade com relação aos substratos (Figura 23). Dos diversos substratos testados, apenas o  $\beta$ -Naftil-P, a FMN e a Tyr-P foram hidrolisados a níveis significativos. Porém, apenas a FMN e a Tyr-P são substratos fisiológicos em potencial. Esta

especificidade reforça a hipótese de que há necessidade do substrato possuir uma estrutura aromática ligada à molécula do substrato bem como uma estrutura orgânica específica como no caso da FMN (ZHANG & VAN ETTEN, 1990; WO et alii, 1992). Assumindo a relação  $V_{max}/K_M$  como uma medida da especificidade, podemos notar que a Tyr-P apresenta-se como um substrato pobre muito embora tenha sido capaz de sofrer a hidrólise enzimática em uma velocidade cerca de 60% da hidrólise do p-NPP (Tabela VII). O que ocorre aqui é a baixa afinidade da enzima por este substrato,  $K_M$  de 7,9 mM, fato também observado para a FAc de placenta humana,  $K_M$  de 1,6 mM, (WAHEED et alii, 1988); para a do coração bovino,  $K_M$  de 14,0 mM, (ZHANG & VAN ETTEN, 1990); para a do cérebro bovino,  $K_M$  de 5,3 mM, (SAEED et alii, 1990), todas determinadas no pH 5,0. De maneira geral, estas fosfatases apresentam uma atividade sobre a Tyr-P da ordem de 35 a 60% em relação ao p-NPP.

Embora estes dados não sejam de maneira alguma excludentes quanto a uma atividade PTPP desta enzima, merece destaque uma vez que várias PTPP apresentam um  $K_M$  submicromolar, algo em torno de 100 a 500 nM (TONKS; DILTZ & FISCHER, 1988b). É claro que existe um fator fundamental que precisa ser levado em conta: ainda não se descobriu o(s) substrato(s) fisiológico(s) específico para estas FAc de BPM. Não podemos deixar de lado o fato de que no pH 5,0 o amino grupo da Tyr-P está protonado e, uma carga positiva muito próxima, poderia bloquear o processo de ligação com o sítio ativo da enzima, promovendo um aumento na  $K_M$ . A utilização de polipeptídeos fosforilados em tirosina poderia favorecer o estudo desta classe de substratos uma vez que o amino grupo estaria mais distante, minimizando seu efeito durante a hidrólise.

A atividade sobre a FMN assume uma característica ímpar. Desde o trabalho de HEINRIKSON, em 1969, vem sendo avaliada a capacidade das diversas FAc de BPM de hidrolisar este substrato fisiológico sem, contudo, estabelecer-se sua função. São tantos relatos que praticamente tornou-se mais uma referência para a classificação de alguma fosfatase ácida com sendo de BPM. Nos diversos trabalhos podemos observar que a atividade relativa sobre a FMN, tomando-se o p-NPP como referência, na maioria das vezes gira em torno de 70 a 100% (HEINRIKSON, 1969; FILBURN, 1973; FUJIMOTO et alii, 1984), sendo uma exceção o relato de BAXTER & SUELTER, 1985, onde mostraram que a atividade das isoenzima A e B do músculo peitoral de aves hidrolisavam a FMN numa extensão de cerca de 50%. Também é importante notar que as outras isoenzimas da FAc, as de APM e

PMI, ou não atuam sobre a FMN ou o fazem em uma taxa significativamente menor que a fosfatase de BPM (FILBURN, 1973; FUJIMOTO et alii, 1984; JANSKA et alii, 1986).

TAGA & VAN ETTEN publicaram em 1982 um relato instigante onde mostram que a atividade da FAc de BPM do fígado humano sobre a FMN foi maior que a do p-NPP cerca de 3 vezes no pH 5,0, e mais de 7 vezes no pH 7,0. Estes dados são ainda mais interessantes quando calculamos a especificidade através da relação  $V_{max}/K_M$ , exibida na Tabela X, onde podemos notar claramente a maior especificidade pela FMN no pH 7,0 não relatado para outras FAc de BPM. Somando-se a esta observação, ZHANG & VAN ETTEN demonstraram em 1990 que a atividade sobre a FMN é extremamente específica, não sendo obtida com a utilização de análogos de FMN.

**TABELA X. Especificidade para o Substrato da Fosfatase Ácida do Fígado Humano (TAGA & VAN ETTEN, 1982).**

Substrato	$\frac{V_{max}}{K_m}$	
	pH 5,0	pH 7,0
p-NPP	500	27,3
FMN	395	92,7

Como pode ser verificado no gráfico da curva da atividade em função do pH para a Tyr-P e FMN como substratos (Figura 24), a FAc de BPM do rim bovino não apresentou uma atividade maior no pH 7,0 porém, esta corresponde a cerca de 50% daquela obtida no pH 5,0. Seria interessante verificar se este fato é inerente à enzima ou se a espécie química do tampão estaria interferindo, semelhante ao que ocorre na faixa entre os valores de pH 2,5 e 4,0 com tampão glicina. Ainda analisando este gráfico, dois detalhes despertam a atenção. Primeiro, para os três substratos podemos verificar um platô de atividade porém, no caso da FMN e Tyr-P, ele está deslocado em direção ao pH 7,0 em relação ao p-NPP, o que pode ser mais um indício do efeito da espécie química do tampão sobre a interação enzima-

substrato. Segundo, podemos perceber que entre o pH 6,5 e 7,5 temos um pequeno patamar que, no caso da Tyr-P, lembra um pequeno pico de atividade no pH 7,0. Estas observações tornam-se mais interessantes uma vez que possíveis substratos fisiológicos poderiam ser hidrolisados em valores de pH mais próximos da neutralidade. Cabe ressaltar que o efeito "ativador" do tampão glicina entre os pH 2,5-3,0 não foram notados quando utilizamos a FMN como substrato.

Analisando o efeito do pH sobre a hidrólise da Tyr-P, WAHEED et alii (1988) demonstraram que a FAc de placenta humana apresentava um patamar de atividade entre os valores de pH 5,0 e 6,0 porém, quando utilizaram a banda 3 de eritrócitos humanos fosforilada em Tyr, esta faixa de atividade máxima se estendeu até o pH 7,0. Desta forma fica claro a importância de se encontrar o substrato natural desta enzima. Recentemente, FUCHS; SHEKELS & BERNLOHR (1992), publicaram um artigo onde, em função da maior especificidade apresentada pelo produto do gene ACP1 (fosfatase ácida de 18 kDa) sobre FMN em detrimento da Tyr-P, propõem que o produto deste gene em células de hamster chinês seja considerado uma FMN fosfatase. Os autores citam um relato interessante acerca da baixa atividade de uma variante do alelo ACP1 humano observada em indivíduos com elevada atividade da enzima glutathione redutase. Como é uma flavina-enzima a glutathione redutase serve como um conveniente marcador para os níveis celulares de flavina. A aparente relação inversa entre a atividade da FAc e a atividade glutathione redutase sugere que o produto do gene ACP1 atua, *in vivo*, utilizando o FMN como substrato. Reforçando a proposição, os autores relataram a existência de uma região da cadeia polipeptídica da FAc de BPM de eritrócitos humanos semelhante à região de ligação para flavina das flavodoxinas (DISSING, JOHNSEN & SENSABAUGH, 1991).

A literatura contém ainda muitas questões quanto ao papel fisiológico e, por conseguinte, quanto ao(s) substrato(s) natural(is). Uma indicação promissora foi o relato recente do grupo de Ramponi (RUGGIERO et alii, 1993) estudando o controle da proliferação celular. Utilizando fibroblastos NIH/3T3, normais e transformados, transfectados com um gene sintético da FAc citossólica de BPM do fígado bovino, verificaram que a proliferação celular era inibida. A inibição da proliferação correlacionava-se com a concentração de PTPP transfectada. Os autores concluíram que esta fosfatase é ativa sobre substratos sinalizadores específicos deste tipo de células que controlam a proliferação de fibroblastos normais e transformados. Sugeriram que o estudo comparativo de substratos

proteicos desta PTPP pudesse ser útil na identificação de reguladores chave da proliferação celular em resposta aos estímulos normais ou aberrantes. Contudo, estudos ainda são necessários para responder questões cruciais sobre substratos fisiológicos, como a FMN e os reguladores da atividade desta enzima.

## 6. PERSPECTIVAS

A purificação da fosfatase ácida de BPM do rim bovino, ao nosso ver, abre um campo de pesquisa extremamente vasto. A importância desta enzima no contexto dos processos de proliferação e crescimento celular estão fortemente indicados. A purificação de outras FAc de BPM associada à investigação de seus substratos e inibidores fisiológicos será de relevância crucial na determinação de seu papel no processo da vida celular. Neste aspecto, o estudo da capacidade de hidrólise da enzima sobre polipeptídeos fosforilados em Tyr, Thr e Ser além de proteínas fosforiladas nestes resíduos, será de grande valia.

Com relação às suas características físico-químicas e cinéticas, a obtenção desta proteína na forma pura e homogênea, abre caminho para a complementação dos dados da composição de aminoácidos, para a sequência de aminoácidos na sua estrutura primária o que permitirá a comparação estrutural com as outras fosfatases ácidas de BPM, bem como a homologia com alguma região das proteínas fosfo-tirosina fosfatases e a determinação da estrutura terciária.

Um dado por nós obtido e que merece um estudo profundo e completo é a "ativação" da enzima em presença da glicina, mesmo em pH abaixo de 4,0. Esta observação já havia sido feita anteriormente mas nenhum trabalho analisou de que maneira este efeito ocorre. Pelo mesmo caminho passa a ativação por guanosina. Embora um estudo recente tenha confirmado a ativação das FAc de BPM por compostos purínicos, a possibilidade de estarmos diante de um regulador fisiológico da fosfatase nos inclina a investigar de que maneira isto ocorre com a fosfatase ácida do rim bovino, além de incitar à busca de um composto que atue em concentração fisiológica.

A discussão entre o grupo de VAN ETTEN e de RAMPONI acerca dos resíduos de aminoácidos essenciais à catálise abre espaço para a investigação dos resíduos essenciais presentes na fosfatase do rim bovino. A modificação covalente de determinados resíduos provê informações relevantes para o mapeamento do sítio ativo e é exequível em nossas condições laboratoriais. A titulação dos grupos -SH é um item fundamental neste processo. Também será de interesse um estudo detalhado sobre o efeito de detergentes na atividade enzimática, bem como uma análise da enzima do ponto de vista de fluorescência.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKISAKA, T. et alii - Different tartrate sensitivity and pH optimum for two isoenzymes of acid phosphatase in osteoclasts. An electron-microscopic enzyme-cytochemical study. *Cell. Tissue Res.*, 255:69-76, 1989.
- ALLEN, J.M. & GOCKERMAN J. - Electrophoretic separation of multiple forms of particle associated acid phosphatase. *Ann. N.Y. Acad. Sci. USA*, 121: 616-33, 1964.
- ANDERSON, T.R. & TOVERUD, S.U. - Purification and partial characterization of two acid phosphatases from rat bone. *Calcif. Tissue Int.*, 27:219-26, 1979.
- ANDERSON, T.R. et alii - Separation and partial purification of acid phosphatase of the enamel organ of rat molars. *Arch. Oral Biol.*, 27:129-32, 1982.
- ANDERSON, T.R. & TOVERUD, S.U. - Effect of  $Fe^{2+}$  and ascorbic acid on acid phosphatases from rat bone. *Calcif. Tissue Int.*, 34:54-8, 1982.
- ANDREWS, A.T. & PALLAVICINI, C. - Bovine milk acid phosphatase. I. Some kinetics studies and other properties using a partially purified preparation. *Biochim. Biophys. Acta*, 321:197-209, 1973.
- BALDIJÃO, C.E.M. - Fosfatase ácida de cérebro de boi. Mecanismo de catálise. Tese de Doutorado, Inst. de Química/USP, 1972.
- BALDIJÃO, C.E.M. et alii - Steady state kinetics and effects of inhibitors on acid phosphatase from bovine brain. *Biochim. Biophys. Acta*, 391:316-25, 1975.
- BÁO, S.N. & DOLDER, H. - Ultrastructural localization of acid phosphatase in spermatid cells of *Ceratitis capitata* (Diptera). *Histochemistry*, 93:439-42, 1990.
- BARBER, G.R. et alii - Acid phosphatase and ribonuclease in the cotyledons of germinating peas. *Biochem. J.*, 124:11P-15P, 1971.
- BASHA, S.M. - Purification and characterization of an acid phosphatase from peanut (*rachis hypogaea*) seed. *Can. J. Bot.*, 62:385-91, 1984.
- BATES, P.A.; HERMES, I. & DWYER, D.M. - *Leishmania donovani*: immunochemical localization and secretory mechanism of soluble acid phosphatase. *Exper. Parasitol.*, 68:335-46, 1989.
- BAXTER, J.H. & SUELTER, C.H. - Multiple acid phosphatases in avian pectoral muscle. The postmicrosomal supernatant acid phosphatase is elevated in avian dystrophic muscle. *Arch. Biochem. Biophys.*, 228:397-406, 1984.
- BAXTER, J.H. & SUELTER, C.H. - Resolution of the low-molecular-weight acid phosphatase in avian pectoral muscle into distinct enzyme forms. *Arch. Biochem. Biophys.*, 239:29-37, 1985.

- BECKMAN, G. et alii - Acid phosphatase activity in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and other joint disorders. *Acta Rheumatol. Scand.*, 17:47-56, 1971.
- BENEDEK-SPAT, E. - Composition of unstimulated human parotid saliva. *Arch. Oral Biol.*, 18:39-47, 1973.
- BENSON, D.G.Jr - Metamorphic competence in urodeles. Observations on the induction of resorption and its relation to acid phosphatase. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 19:129-32, 1972.
- BHARGAVA, R. & SACHAR, R.C. - Induction of acid phosphatase in cotton seedlings: enzyme purification, subunit structure and kinetic properties. *Phytochemistry*, 26:1293-7, 1987.
- BINGHAM E. & GARVER K. - Purification and properties of an acid phosphatase from lactating bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.*, 73:964-9, 1990.
- BISHOP, J.M. - Trends in Oncogenes. *Trends. Genet.*, 1:245-50, 1985.
- BISWAS, T.K. & CUNDIFF, C. - Multiple forms of acid phosphatase in germinating seeds of *Vigna sinensis*. *Phytochemistry*, 30:2119-25, 1991.
- BITTENCOURT, H.M.S. & CHAIMOVICH, H. - Importance of SH groups in catalysis by bovine brain acid phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 438:153-8, 1976.
- BOER, P & STEIN-PARVÉ, E.P. - Isolation and purification of an acid phosphatase from baker's yeast. *Biochim. Biophys. Acta*, 128:400-2, 1966.
- BOROUGHES, H. - Studies on the acid phosphatases of green leaves. *Arch. Biochem. Biophys.*, 49:30-42, 1954.
- BUDDE, R.J.A. & CHOLLET, R. - Regulation of enzyme activity in plants by reversible phosphorylation. *Physiol. Plant.*, 72:435-9, 1988.
- BURMAN, S. et alii - The interaction of phosphate with the purple acid phosphatase from beef spleen: evidence that binding is accompanied by oxidation of the iron chromophore. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 136:490-7, 1986.
- CAMICI, G. et alii - The complete amino acid sequence of the low molecular weight cytosolic acid phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 264:2560-7, 1989.
- CARPENTER, G. - Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu. Rev. Biochem.*, 56:881-914, 1987.
- CHAIMOVICH, H. & NOME, F. - Purification and properties of an acid phosphatase from bovine brain. *Arch. Biochem. Biophys.*, 139:9-16, 1970.

- CHARBONNEAU, H. et alii - The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85:7182-6, 1988.
- CHARBONNEAU, H. et alii - Human placenta protein-tyrosine-phosphatase: amino acid sequence and relationship to a family of receptor-like proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86:5252-6, 1989.
- CHENG, H.-F. & TAO, M. - Purification and characterization of a phosphotyrosyl-protein phosphatase from wheat seedlings. *Biochim. Biophys. Acta.*, 998:271-6, 1989.
- CHERNOFF, J. & LI, H.-C. - Multiple forms of phosphotyrosyl - and phosphoseryl - protein phosphatases from cardiac muscle: partial purification and characterization of an EDTA-stimulated phosphotyrosyl-protein phosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 226:517-30, 1983.
- CHERNOFF, J. & LI, H.-C. - A major phosphotyrosyl-protein phosphatase from bovine heart is associated with a low-molecular-weight acid phosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 240:135-45, 1985.
- CHIARUGI, P. et alii - Differential role of four cysteines residues on the activity of a low  $M_r$  phosphotyrosine protein phosphatase. *FEBS Lett.*, 310:9-12, 1992.
- CIRRI, P. et alii - The role of Cys-17 in the pyridoxal-5'-phosphate inhibition of the bovine liver low  $M_r$  phosphotyrosine protein phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1161: 216-22, 1993.
- CLARI, G.; BRUNATI, A.M. & MORET, V. - Partial purification and characterization of phosphotyrosyl-protein phosphatase(s) from human erythrocyte cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 137:566-72, 1986.
- COHEN, P. - The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity. *Nature*, 296:613-9, 1982.
- COHEN, P. - The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.*, 58:453-508, 1989.
- COHEN, P. - Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. *Trends Biochem. Sci.*, 17:408-13, 1992.
- COLE, A.A. & WALTERS, L.M. - Tartrate-resistant acid phosphatase in bone and cartilage following decalcification and cold-embedding in plastic. *J. Histochem. Cytochem.*, 35:203-6, 1987.
- COLEMAN, R.A.; SCHOFIELD, B.H. & McDONALD, D.F. - Selective localization of a Golgi apparatus acid phosphatase isoenzyme in bone using pyridoxal-5'-phosphate. *J. Histochem. Cytochem.*, 28:115-23, 1980.

- COOL, D.E. et alii - cDNA isolated from a human T-cell library encodes a member of the protein-tyrosine-phosphatase family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86:5257-61, 1989.
- DAS, S. et alii - Hydrolysis of phosphoproteins and inositolphosphates by cell surface phosphatase of *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 20:143-53, 1986.
- DAVIS, J.C.; LIN, S.S. & AVERILL, B.A. - Kinetics and optical spectroscopic studies on the purple acid phosphatase from beef spleen. *Biochemistry*, 20:4062-7, 1981.
- DE ARAÚJO, P.S.; MIES, V. & MIRANDA, O. - Subcelular distribution of low-molecular-weight acid phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta.*, 452:121-30, 1976.
- DE DUVE, C. et alii - Tissue fractionation studies. VI - Intracellular distribution patterns of enzyme in rat liver tissue. *Biochem. J.*, 60:604-17, 1955.
- DE DUVE, C.; WATTIAUX, R. & BAUDHUIN, P. - Distribution of enzyme between subcellular fractions in animal tissues. *Adv. Enzymol.*, 24:329, 1962.
- DE-KUNDU, P. & BANERJEE, A.C. - Multiple forms of acid phosphatase from seedlings axes of *Vigna radiata*. *Phytochemistry*, 29:2825-8, 1990.
- DEANA, A.D. et alii - Dephosphorylation of syntetic phosphopeptides by protein phosphatase-T, a phosphothreonyl protein phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 257:8565-8, 1982.
- DENTAY, J.T. & RAE, J.J. - Phosphatase in saliva. *J. Dent. Res.*, 28:68-71, 1949.
- DI PIETRO, D.L. & ZENGERLE, F.S. - Separation and properties of three acid phosphatases from human placenta. *J. Biol. Chem.*, 242:3391-6, 1967.
- DI PIETRO, D.L. - 17- $\beta$ -estradiol-3-phosphatase phosphohydrolase activity of human placental acid phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 243:1303-5, 1968.
- DIBENEDETTO, G. & COZZANI, I. - Nonspecific acid phosphatase from *Schizosaccharomyces pombe*. Purification and physical chemical properties. *Biochemistry*, 14:2847-52, 1975.
- DISSING, J.; DAHL, O. & SVENSMARK, O. - Phosphonic and arsonic acids as inhibitors of human red cell acid phosphatase and their use in affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta.*, 569:159-76, 1979.
- DISSING, J. & SVENSMARK, O. - Human red cell acid phosphatase: purification and properties of the A, B e C isoenzymes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1041:232-42, 1990.

- DISSING, J., JOHNSEN, A.H. & SENSABAUGH, G.F. - Human red cell acid phosphatase (ACP1). The amino acid sequence of the two isozymes Bf and Bs encoded by the ACP1\*B allele. **J. Biol. Chem.**, 266:20619-25, 1991.
- DISSING, J.; RANGAARD, B. & CHRISTENSEN, U. - Activity modulation of the fast and slow isoenzymes of human cytosolic low-molecular-weight acid phosphatase (ACP1) by purines. **Biochim. Biophys. Acta**, 1162: 275-82, 1993.
- DIXON, M. & WEBB, E.C. - **Enzymes**, 2<sup>nd</sup> Edn, Longmans, London, 1967.
- EGGERT, F.M. & GERMAIN, J.P. - Stable acid phosphatase: I demonstration and distribution. **Histochemistry**, 66:307-17, 1980.
- ELIAKIS, E. & COUTSELINIS, A. - Identification of meconium by examination of acid phosphatase and by spectrophotometric examination. **Med. Heg. Sonm. Corp.**, 4:163-8, 1971.
- FILBURN, C.R. - Acid phosphatase of *Xenopus laevis* tadpole tails. I. Separation and partial characterization. **Arch. Biochem. Biophys.**, 159:683-93, 1973.
- FILBURN, C.R. & VANABLE Jr, J.W. - Acid phosphatase isoenzymes of *Xenopus laevis* tadpole tails. II. Changes in activity during tail regression. **Arch. Biochem. Biophys.**, 159:694-703, 1973.
- FISHER, L. - An introduction to gel chromatography. In **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology**, Vol. I. Edited by T. S. Work and E. Work, 1969.
- FITZGERALD, R.J. - Preliminary studies on the presence of acid phosphatase in certain oral microorganisms. **J. Dent. Res.**, 31:189-94, 1952.
- FRANK, D.A. & SARTORELLI, A.C. - Regulation of protein phosphotyrosine content by changes in tyrosine kinase and protein phosphotyrosine phosphatase activities during induced granulocytic and monocytic differentiation of HL-60 leukemia cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 140:440-7, 1986.
- FREILICH, L.S. - Ultrastructure and acid phosphatase cytochemistry of odontoblast. Effect of parathyroid extract. **J. Dent. Res.**, 50:1047-55, 1971.
- FUCHS, K.R.; SHEKELS, L.L. & BERNLOHR, D.A. - Analysis of the ACP1 product: classification as an FMN phosphatase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 189:1598-605, 1992.
- FUJIMOTO et alii - Characterization of intermediate-molecular-weight acid phosphatase from bovine kidney cortex. **J. Biochem.**, 96:1079-88, 1984.
- GABARD, K.A. & JONES, R.L. - Localization of phytase and acid phosphatase isoenzymes in aleurone layers of barley. **Physiol. Plant.**, 67:182-92, 1986.
- GALKA, M. et alii - Properties of low-molecular-weight acid phosphatases isolated from cytosol and chromatin of rat liver. **Acta Biochim. Pol.**, 27:281-93, 1980.

- GOMES, P.B. - Caracterização e comparação de fosfatases ácidas. Dissertação de Mestrado - I.Q./USP.
- GONZALES, L.W. & NEISEL, S. - Acid phosphatase of rabbit spermatozoa. II. Partial purification and biochemistry characterization of the multiple forms of rabbit spermatozoa acid phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 321:184-94, 1973.
- GORDON, J.A. - Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Meth. Enzymol.*, 201:477-82, 1991.
- GOTTLIEB, M. & DWYER, D.M. - *Leishmania donovani*: surface membrane acid phosphatase activity of promastigotes. *Exper. Parasitol.*, 52:117-28, 1981.
- HARA, A. et alii - Purification and characterization of a purple acid phosphatase from rat spleen. *J. Biochem.*, 95:67-74, 1984.
- HARRISON, J.D.; AUGER, D.W. & BADIR, M.S. - Ultrastructural phosphatase histochemistry of submandibular and parotid salivary glands of man. *Histochem. J.*, 20:117-21, 1988
- HARTREE, E.F. - Determination of proteins: a modification of the Lowry method that give a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, 48:422-7, 1972.
- HASEGAWA, Y.; LYNN, K.R. & BROCKBANK, W.J. - Isolation and partial characterization of cytoplasmic and wall-bound acid phosphatases from wheat roots. *Can. J. Bot.*, 54:1163-9, 1987.
- HASSAN, H.F. & COOMBS, G.H. - Phosphomonoesterases of *Leishmania mexicana mexicana* and other flagellates. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 23:285-96, 1987.
- HAYMAN, A.R. et alii - Purification and characterization of a tartrate-resistant acid phosphatase from human osteoclastomas. *Biochem. J.*, 261:601-9, 1989.
- HEFLER, S.K. & AVERILL, B.A. - The "manganese (III)-containing" purple acid phosphatase from sweet potatoes is an iron enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 146: 1173-7, 1987.
- HEINRIKSON, R.L. - Purification and characterization of a low molecular weight acid phosphatase from bovine liver. *J. Biol. Chem.*, 244:299-307, 1969.
- HERAK, M. et alii - Changes in the activity of alkaline phosphatase in fetal fluids of cattle during gravidity. *Ioguslav. Physiol. Pharmacol. Acta*, 6:421-5, 1970.
- HERMANN, W. - Identification of osteoclasts and their differentiation from mononuclear phagocytes by enzyme histochemistry. *Histochemistry*, 86:225-7, 1987.

- HICKEY, M.E. & VAN ETTEN, R.L. - Stoichiometric trapping of a covalent phosphoryl-enzyme intermediate occurring in reactions catalyzed by an acid phosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 152: 423-25, 1972.
- HIMENO, M. et alii - Acid phosphatase in rat liver lysosomal membranes: purification and characterization. *J. Biochem.*, 105:449-56, 1989.
- HIMENO, M. et alii - Mechanism of a conversion from membrane associated lysosomal acid phosphatase to content forms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 180:1483-9, 1991.
- HOEHN, P. et alii - Dix electrophoresys differentiation of various acid phosphatases. *Z. Reichto. Medizin.*, 68:129-37, 1971.
- HOFFMAN, L.M. & DI PIETRO, D.L. - Subcellular localization of human placental acid phosphatase. *Amer. J. Obstret. Gynecol.*, 114:1087-96, 1972.
- HOLLANDER, P.V. - Acid phosphatases. In *The Enzymes*, 2<sup>nd</sup> ed, IV:449. Edited by Boyer P.D.N.Y. Academic Press, 1971.
- HSU, R.Y.; CLELAND, W.W. & ANDERSON, L. - Mechanism of action of the nonspecific phosphomonoesterase from potatoes. *Biochemistry*, 5:799-807, 1966.
- HUDSON, P.B.; TSUBOI, K.K. & MITTELMAN, A. - Prostatic cancer: extremely elevated serum acid phosphatase associated with altered liver function. *Americ. J. Med.*, 19: 895-901, 1955.
- HUNTER, T. & SEFTON, B.M. -Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylate tyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77:1311-5, 1980.
- HUNTER, T. & COOPER, J.A. - Protein-tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.*, 54:897-930, 1985.
- HUNTER, T. - Protein-tyrosine phosphatase:the other side of the coin. *Cell*, 22:1013-6, 1989.
- ISACSSON, G. - A histochemical study of rat salivary gland acid phosphatase. *Arch. Oral Biol.*, 31:95-9, 1986.
- JACOB, J.L. & SONTAG, N. - Purification et etude de la phosphatase acide lutoideque du latex d'*Heuca brasiliensis*. *Biochimie*, 56:1315-22, 1974.
- JANSKA, H. & KUBICZ, A. - Studies on the heterogeneity of carp liver acid phosphatases: acid phosphatase. I. Subunit structure and carbohydrate composition. *Comp. Biochem. Physiol.*, 82B:563-7, 1985.
- JANSKA, A. et alii - Catfish liver acid phosphatase differently glycosylated enzyme molecules with altered kinetic properties. *Comp. Biochem. Physiol.*, 85B:753-8, 1986.

- JANSKA, H. et alii - The high molecular weight and the low molecular weight acid phosphatases of the frog liver and their phosphotyrosine activity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 90B:173-8, 1988.
- JANSKA, H ; KUBICZ, A. & SZALEWICZ, A. - The lower molecular weight acid phosphatase from the frog liver: isolation of homogeneous AcPase III and IV representing glycoforms with different bioactivity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 92B:341-6, 1989.
- JONESCU, M.D. & JONESCU, V.M. - Submicroscopic localization of acid phosphomonoesterase in the Golgi apparatus of multifid glands of *Helix - Pomatia*. *Stud. Cerat. Biol., Sew. Zoo.*, 22:489-91, 1970.
- KANAI, K. & KONDO, E. - Substrate response in acid phosphatase activity of *Pseudomonas pseudomallei* and *Pseudomonas cepacia*, with special reference to tyrosine phosphatase. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 44:225-37, 1991.
- KANEKO, T. & KATOH, Y. - Transphosphorylation activity of acid phosphatase of *Physarum polycephalum* kh 25. *Phytochemistry*, 29: 59-61, 1990.
- KANEKO, T.S. & KIKUTI, R. & KUBOTA, K. - Purification and properties of native cell wall acid phosphatase from cultured tobacco cells. *Phytochemistry*, 29:2883-7, 1990.
- KATO, T. et alii - Purification and characterization of purple acid phosphatase from rat bone. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83B:813-7, 1986.
- KELLY, B.M. et alii - Heterogeneity of lysosomes in human fibroblasts. *Mol. Cel. Biochem.*, 87:171-83, 1989.
- KETCHAM, C.M. et alii - The type 5, acid phosphatase from spleen of humans with hairy cell leukemia. *J. Biol. Chem.*, 260: 5768-76, 1985.
- KINA, J.R. - Periodontopatias: Alterações no nível da fosfatase ácida, da  $\beta$ -hexosaminidase e arilsulfatase com a progressão da doença. Tese de Mestrado, Departamento de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, USP, 1987.
- KLARLUND, J.K. - Transformation of cells by an inhibitor of phosphatases acting on phosphotyrosine in proteins. *Cell*, 41:707-17, 1985.
- KNOX, R.B. & HESLOP, M.J. - Pollen-wall proteins electron microscopic localization of acid phosphatase in the intine of cocus verms. *J. Cell. Sci.*, 8:727-33, 1971.
- KREBS, E.G. & BEAVO, J.A. - Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*, 48:923-59, 1979.

- KREMERSKOTHEN, J. & BARNEKOW, A. - Determination of phosphotyrosine phosphatase (MPTPase) activity in normal and transformed cells. *Moll. Cell. Biochem.*, 125:1-9, 1993.
- KRUZEL, M. & MORAWIECKA, B. - Acid phosphatase from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). Purification, properties, sugar and aminoacid composition. *Acta Biochim. Pol.*, 29:321-30, 1982.
- KUBICZ, A. - Acid phosphatase III from potato tuber molecular weight and subunit structure. *Acta Biochim. Pol.*, 20:223-9, 1973.
- KUBICZ, A.; MORAWIECKA, B. & KRUZEL, M. - Heterogeneity of acid phosphatase from potato tubers. *Acta Biochim. Pol.*, 21:113-7, 1974.
- KUBICZ, A.; WAHEED, A. & VAN ETTEN, R.L. - Isolation and characterization of a homogeneous acid phosphatase from catfish liver. *Comp. Biochem. Physiol.*, 81B:177-83, 1985.
- KUBICZ, A. et alii - Electrofocusing of acid phosphatases from frog liver using a immobilized pH gradient. *Electrophoresis*, 11:147-51, 1990.
- KUBICZ, A.; SZALEWICZ, A. & CHRAMBACH, A. - Studies on the oligosaccharide heterogeneity of the isoelectric forms of the lower molecular weight acid phosphatases from frog liver. *Int. J. Biochem.*, 23:413-9, 1991.
- KUMAR, M. & GUPTA, R.K. - Evaluation of serum acid phosphatase activity in kidney diseases. *J. Indian Med. Assoc.*, 56: 89-94, 1971.
- LAILER, P.M.; TAGA, E.M. & VAN ETTEN, R.L. - Human liver acid phosphatases: cysteine residues of low molecular weight enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.*, 216:512-21, 1982.
- LAU, W.K.-H; FARLEY, J.R. & BAYLINK, D.J. - Bone acid phosphatase is a neutral pH phosphotyrosyl protein phosphatase. *Adv. Prot. Phosphatases*, 4:165-98, 1987.
- LAU, K.-H.W.; FARLEY, J.R. & BAYLINK, D.J. - Phosphotyrosyl protein phosphatases. *Biochem. J.*, 257:23-36, 1989.
- LAUE, T.M. & RHODES, D.G. - Determination of size, molecular weight, and presence of subunits. *Methods Enzymol.*, 182:566-87, 1990.
- LAWRENCE, G.L. & VAN ETTEN, R.L. - The low-molecular-weight acid phosphatase from bovine liver: isolation, amino acid composition, and chemical modifications studies. *Arch. Biochem. Biophys.*, 206:122-31, 1981.
- LAYNE, E. - Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods Enzymol.*, III:447-54, 1957.
- LEDBETTER, J.A. et alii - Tyrosine phosphorylation regulates phospholipase C activation in human T-cells. *Biochem. Soc. Trans.*, 19:269-72, 1991.

- LEE, R.B. - Phosphate influx and extracellular phosphatase activity in barley roots and rose cells. *New Phytol.*, 109:141-8, 1988.
- LEIS, J.F. & KAPLAN, N.O. - An acid phosphatase in the plasma membranes of human astrocytoma showing marked specificity toward phosphotyrosine protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:6507-11, 1982.
- LILJA, E.; LINDSKOG, S. & HAMMARSTRÖM, L. - Histochemistry of enzymes associated with tissue degradation incident to orthodontic tooth movement. *Am. J. Orthod.*, 83:62-75, 1983.
- LIN, C.W. & FISHMAN, W.H. - Microsomal and lysosomal acid phosphatase isoenzymes of mouse kidney. Characterization and separation. *J. Histochem. Cytochem.*, 20:487-98, 1972.
- LIN, P.P.-C. - Phosphoprotein phosphatase of soybean hypocotyls. Purification, properties, and substrate specificities. *Plant. Physiol.*, 66:368-74, 1980.
- LINEWEAVER, H. & BURK, D. - The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.*, 56: 658-66, 1934.
- LORD, J.M. et alii - Protein phosphorylation events and changes in inositol metabolism during HL60 cell differentiation. *Biochem. Soc. Trans.*, 19:315-20, 1991.
- LOVELACE, J.K.; DWYER, D.M. & GOTTLIEB, M. - Purification and characterization of the extracellular acid phosphatase of *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 20:243-51, 1986.
- LOWRY, O.H. & LOPEZ, J. - The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. *J. Biol. Chem.*, 162:421-24, 1945.
- LURA, H.E. - Investigations of the salivary phosphatase and phosphates. *J. Dent. Res.*, 26:203-24, 1947.
- MacKINTOSH, C. & COHEN, P. - Identification of high levels of type 1 and type 2A protein phosphatases in higher plants. *Biochem. J.*, 262:335-9, 1989
- MacKINTOSH, C.; COGGINS, J. & COHEN, P. - Plant protein phosphatases. Subcellular distribution, detection of protein phosphatase 2C and identification of protein phosphatase 2A as the major quinase dehydrogenase phosphatase. *Biochem. J.*, 273:733-8, 1991.
- MATSUMURA, M. - Phosphatase of *Lactobacillus acidophilus* isolated from human saliva. *Shika Igaku*, 31:303-26, 1968.
- McLAUGHLIN, J. - The association of distinct acid phosphatases with flagella pocket and surface membrane fractions obtained from bloodstream forms of *Trypanosoma rhodesiense*. *Mol. Cell. Biochem.*, 70:177-84, 1986.

- McTIGUE, J.J. & VAN ETTEN, R.L. - Isolation, characterization and spontaneous interconversion of two forms of human prostatic acid phosphatase. *The Prostate*, 3:165-81, 1982.
- MEYER, H. et alii - Acid phosphatase in germinating lettuce-evidence for partial activation. *Physiol. Plant.*, 24:95-101, 1971.
- MIERNYK, J.A. - Purification and characterization of the major acid phosphatase isozyme by maize endosperm cultures. *Phytochemistry*, 31:2613-6, 1992.
- MILLAR, J.B.A. & RUSSEL, P. -The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell*, 68:407-10, 1992.
- MILLER, M.S.; BENOIRE-PARSONS, M. & WHITE, H.B. - Dephosphorylation of chicken riboflavin-binding protein and phosphovitin decreases their uptake by oocytes. *J. Biol. Chem.*, 257:6818-24, 1982.
- MRSA, V. et alii - Influence of glycosylation on the oligomeric structure of yeast acid phosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 273:121-7, 1989.
- NAKAMURA, R. et alii - Purifications and properties of acid phosphatase from human parotid saliva. *J. Dent. Res.*, 49:561-6, 1970.
- NEUMAN, H. - Substrat selectivity in the action of alkaline and acid phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 243:4671-6, 1968.
- NG, T.B.; CHAN, W.Y. & TAM, P.P.L. - Correlation of acid phosphatase but not alkaline phosphatase activity with myelination in the developing mouse brain. *Int. J. Biochem.*, 25:247-51, 1993.
- NGUYEN, L.; CHAPDELAINE, A. & CHEVALLER, S. - Prostatic acid phosphatase in serum of patients with prostatic cancer is a specific phosphotyrosine acid phosphatase. *Clin. Chem.*, 36:1450-5, 1990.
- NYQUIST, S.E. & NOLLENHAUER, H.H. - Golgi apparatus acid phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 315:103-12, 1973.
- OSTROWSKI, W. & BARNARD, E.A. - Evidence for a phosphoryl enzyme intermediate in the catalytic reactions of prostatic acid phosphatase. *Biochemistry*, 12:3893-8, 1973.
- OSTROWSKI, W. et alii - Acid phosphomonoesterase of human prostate, carbohydrate content and optical properties. *Biochim. Biophys. Acta.*, 453:262-9, 1976.
- PANARA, F.; ANGIOLILLO, A. & PASCOLINI, R. - Acid phosphatases from liver of *Rana esculenta*. Subcellular localization and partial characterization of multiple forms. *Comp. Biochem. Physiol.*, 93B:877-82, 1989.

- PANARA, F.; PASQUALINI, S. & ANTONIELLI, M. - Multiple forms of barley root acid phosphatase: purification and some characteristics of the major cytoplasmic isoenzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, 1037:73-80, 1990.
- PANARA, F. et alii - Acid phosphatases in mammalian tissues. Evidence for the existence of a 57 kDa Zn<sup>2+</sup>-dependent acid phosphatase form. *Int. J. Biochem.*, 24:1619-23, 1992.
- PARK, H.-S.C. & VAN ETEN, R.L. - Purification and characterization of homogeneous sunflower seed acid phosphatase. *Phytochemistry*, 25:351-7, 1986.
- PASQUALINI, S. et alii - High molecular weight acid phosphatases from barley coleoptiles. *Phytochemistry*, 31:3703-6, 1992.
- PIMENTA, P.F.P. & De SOUZA, W. - Cytochemical localization of acid phosphatase in *Leishmania mexicana amazonensis*. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 18:127-32, 1986.
- POLGAR, L. & HALASZ, P. - Current problems in mechanistic studies of serine and cysteine proteinases. *Biochem. J.*, 207:1-10, 1982.
- POLICE, P. & D'ALISE, L. - Acid and alkaline phosphatase activity in saliva of humans with cancerous lesions of the mouth. *Arch. Estomatol.*, 2: 407-13, 1961.
- POLYA, G.M. & HARITOU, M. - Purification and characterization of two wheat-embryo protein phosphatases. *Biochem. J.*, 251:357-63, 1988.
- POT, D.A. & DIXON, J.E. - A thousand and two protein tyrosine phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1136:35-43, 1992.
- PRICE, N.C. & STEVENS, L. - *Fundamentals of Enzymology*, 2<sup>nd</sup> edition, Oxford University Press, New York, 1989.
- RAMPONI, G. et alii - The 18 kDa cytosolic acid phosphatase from bovine liver has phosphotyrosine activity on the autophosphorylated epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett.*, 250:469-73, 1989.
- REID, T.W. & WILSON, I.B. - *E. coli* alkaline phosphatase. In *The Enzymes*, 2<sup>rd</sup>, IV:375-415. Edited by Boyer P.D.N.Y. Academic Press, 1971.
- REISFELD, R.A.; LEWIS, V.J. & WILLIAMS, D.E. - Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. *Nature*, 195: 281-3, 1962.
- REMALEY, A.T. et alii - Leishmanial phosphatase blocks neutrophil O<sub>2</sub><sup>-</sup> production. *J. Biol. Chem.*, 259:11173-5, 1984.
- REMALEY, A.T. et alii - Characterization of *Leishmania donovani* acid phosphatases. *J. Biol. Chem.*, 260:880-6, 1985a.

- REMALEY, A.T. et alii - *Leishmania donovani*: Surface membrane acid phosphatase blocks neutrophils oxidative metabolite production. *Exper. Parasitol.*, 60:331-41, 1985b.
- RENGASAMY, A.; SELVAN, R. & GNANAM, A. - Isolation and properties of an acid phosphatase from thylakoid membranes from *Sorghum vulgare*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 209:230-6, 1981.
- ROBERTS, D.W.A. - The wheat leaf phosphatases. II. Pathways of hydrolysis of some nucleotides at pH 5.5. *J. Biol. Chem.*, 222:259-70, 1956.
- ROBINSON, H. - Eletrophoretic and biochemical analysis of acid phosphatase in the tail of *Xenopus laevis* during development and metamorphosis. *J. Exp. Zool.*, 180:127-39, 1972.
- ROBINSON, D.B. & GLEW, R.H. - A tartrate-resistant acid phosphatase from Gaucher spleen. Purification and properties. *J. Biol. Chem.*, 255:5864-70, 1980.
- ROCHE, M.J. - Sur les phosphatases du sang. *Bull. Soc. Chem. Biol.*, 13:841-56, 1931.
- ROSENBLIT, P.D. et alii - Effect of streptozotocin diabetes on acid phosphatase and select glycosidase activities of serum and various rat organs. *Proc. Soc. Biol. Med.*, 145:244-8, 1974.
- ROSSI, A. et alii - Properties of acid phosphatase from scutella of germinating maize seeds. *Phytochemistry*, 20:1823-6, 1981.
- RUGGIERO, M. et alii - Negative growth control by a novel low  $M_r$  phosphotyrosine protein phosphatase in normal and transformed cells. *FEBS Lett.*, 326:294-8, 1993.
- RUSCIANO, D. et alii - One-step, high-yield purification of human prostatic acid phosphatase from seminal fluid by gel-filtration HPLC under non-denaturing conditions. *Clin. Chem.*, 34:984-6, 1988.
- SAEED, A. et alii - Bovine brain low  $M_r$  acid phosphatase: Purification and properties. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR*, 22:81-94, 1990.
- SAINI, M.S. & VAN ETTEN, R.L. - Dimeric nature and amino acid compositions of homogeneous canine prostatic, human liver and rat liver phosphatase isoenzymes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 526:468-78, 1978.
- SCHELL, D., STIERHOF, Y.-D. & OVERATH, P. - Purification and characterization of tartrate-sensitive acid phosphatase of *Trypanosoma brucei*. *FEBS Lett.*, 271:67-70, 1990.
- SCHINDELMEISER, J.; GULLOTTA, F. & MÜNSTERMANN, D. - Purple acid phosphatase of human brain macrophages in AIDS encephalopathy. *Path. Res. Pract.*, 185:184-6, 1989.

- SCHMIDT, G. - Nonspecific acid phosphomonoesterases. In *The Enzymes*, 2<sup>rd</sup>, 5:37-47. Edited by Boyer P.D.N.Y., Academic Press, 1961.
- SEFTON, B.M. et alii - Vinculin: a cytoskeletal target of the transforming protein of Rous sarcoma virus. *Cell*, 24:165-74, 1981.
- SHAW, J.G. - Acid phosphatase from tobacco leaves. *Arch. Biochem. Biophys.*, 117:1-9, 1966.
- SHIBKO, S. & TAPPEL, A.L. - Acid phosphatase of the lysosomal and soluble fraction of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 73:76-86, 1963.
- SHIMADA, Y.; SHINMYO, A. & ENATSU, T. - Purification and properties of one component of acid phosphatase produced by *Aspergillus niger*. *Biochim. Biophys. Acta*, 480:417-27, 1977.
- SHRINER, C.L. & BRAUTIGAN, D.L. - Cytosolic protein phosphotyrosine phosphatases from rabbit kidney. Purification of two distinct enzymes that bind to Zn<sup>2+</sup> - iminodiacetate agarose. *J. Biol. Chem.*, 259:11383-90, 1984.
- SINGH, V.N. - Acid phosphatase activity in human uterine fluid in relation to infertility. *Horm. Metab. Res.*, 23:615-6, 1991.
- SINGLA, N.; KHULLER, G.K. & VINAYAK, V.K. - Acid phosphatase activity of promastigotes of *Leishmania donovani*: a marker of virulence. *FEMS Microbiol. Lett.*, 94: 221-6, 1992.
- SKINNINGSRUD, A. & NUSTAD, K. - Prostatic acid phosphatase, purification and iodination using Iodogen. *Clin. Chim. Acta*, 120:29-40, 1982.
- SLACK, C.R.; HATCH, M.D. & GOODCHILD, D.J. - Distribution of enzymes in mesophyll and parenchyma-sheath chloroplasts of maize leaves in relation to the C<sub>4</sub>-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis. *Biochem. J.*, 114:489-98, 1969.
- SOTIROUDIS, T.G. & GELADOPOULUS, T.P. - A low molecular weight acid phosphatase present in crystalline preparation of rabbit skeletal muscle glycogen phosphorylase b. *FEBS Lett.*, 271:76-8, 1990.
- STANKIEWICZ, P.J. & GRESSER, M.J. - Inhibition of phosphatase and sulfatase by transition-state analogues. *Biochemistry*, 27:206-12, 1988.
- STEPÁN, J.J. et alii - The application of plasma tartrate-resistant acid phosphatase to assess changes in bone resorption in response to artificial menopause and its treatment with estrogen or norethisterone. *Calcif. Tissue Int.*, 45:273-80, 1989.
- STROTHER, S. et alii - Phosphates from pollens of *Brassica campestris* e *Lilium regale*. *Phytochemistry*, 24:1447-9, 1985.

- SUGIURA, Y. et alii - Purification, enzymatic properties and active site environment of a novel manganese (III)-containing acid phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 256:10664-70, 1981.
- SZALEWICZ, A. et alii - Amino acid composition and immunochemical properties of AcPase III and AcPase IV representing glycoforms of the lower molecular weight, tartrate-resistant acid phosphatase of the frog liver. *Inter. J. Biochem.*, 24:975-9, 1992.
- TAGA, E.M. - Fosfatase ácida de fígado de cobaia: purificação, estudos eletroforéticos e algumas propriedades. Tese de Doutorado, Instituto de Química/USP, 1979.
- TAGA, E.M. & VAN ETEN, R.L. - Human liver acid phosphatase: purification and properties of a low molecular weight isoenzymes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 214:505-15, 1982.
- TANIZAKI, M.M.; BITTENCOURT, H.M.S. & CHAIMOVICH, H. - Activation of low molecular weight acid phosphatase from bovine brain by purines and glycerol. *Biochim. Biophys. Acta.*, 485:116-23, 1977.
- TONKS, N.K. et alii - Demonstration that the leukocyte common antigen CD45 is a protein tyrosine phosphatase. *Biochemistry*, 27:8695-701, 1988.
- TONKS, N.K.; DILTZ, C.D. & FISCHER, E.H. - Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem.*, 263:6722-30, 1988a.
- TONKS, N.K.; DILTZ, C.D. & FISCHER, E.H. - Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta. *J. Biol. Chem.*, 263:6731-7, 1988b.
- TROWBRIDGE, I.S. - CD45. A prototype for a transmembrane protein tyrosine phosphatases. *J. Biol. Chem.*, 266:23517-20, 1991.
- TRUDEL, S.; PÂQUET, M.R. & GRINSTEIN, S. - Mechanism of vanadate-induced activation of tyrosine phosphorylation and of the respiratory burst in HL60 cell. Role of reduced oxygen metabolites. *Biochem. J.*, 276:611-9, 1991.
- TSUBOI, K.K. et alii - Acid phosphatase VII. Yeast phosphomonoesterase: isolation procedure and stability characteristics. *J. Biol. Chem.*, 224:621-35, 1957.
- UEHARA, K.; FUJIMOTO, S. & TANIGUCHI, T. - Studies on violet-colored acid phosphatases of sweet potato. I. Purification and some physical properties. *J. Biochem.*, 75:627-38, 1974.
- ULLAH, A.H.J. & GIBSON D.M. - Purification and characterization of acid phosphatase from cotyledons of germinating soybean seeds. *Arch. Biochem. Biophys.*, 260:514-20, 1988.

- USHIRO, H. & COHEN, S. - Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J. Biol. Chem.*, 255:8363-5, 1980.
- VALLANCE, S.J. & WHETTON, A.D. - Control of proliferation by myeloid growth factors. *Biochem. Soc. Trans.*, 19:307-15, 1991.
- VAN ETTEN, R.L.; WAYMACK, P.P. & REHKOP, D.M. - Transition metal ion inhibition of Enzyme-catalyzed phosphate ester displacement reactions. *J. Amer. Chem. Soc.*, 96: 6782-85, 1974.
- VAN ETTEN, R.L. & McTIGUE, J.J. - pH dependence and solvent isotope effects in the hydrolysis of phosphomonoesters by human prostatic acid phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 484: 386-97, 1977.
- VESTERBERG, O. - Isoelectric focusing of proteins in polyacrylamide gels. *Biochim. Biophys. Acta*, 257: 11-19, 1972.
- VINCENT, J.B. & AVERILL, B.A. - An enzyme with a double identity: purple acid phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase. *FASEB J.*, 4:3009-14, 1990a.
- VINCENT, J.B. & AVERILL, B.A. - Sequence homology between purple acid phosphatases and phosphoprotein phosphatases. Are phosphoprotein phosphatases metalloproteins containing oxid-bridged dinuclear metal centers? *FEBS Lett.*, 263:265-8, 1990b.
- WAHEED, A. et alii - Purification and physicochemical characterization of a human placental acid phosphatase activity. *Biochemistry*, 27:4265-73, 1988.
- WALTON, K.M. & DIXON, J.E. - Protein tyrosine phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.*, 62:101-20, 1993.
- WEBER, K. & OSBORN, M. - The reability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresys. *J. Biol. Chem.*, 244:4406-12, 1969.
- WHITE, I.N.H. & BUTTERWORTH, P.J. - Isoenzymes of human erythrocytes acid phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, 229:193-201, 1971.
- WO, Y.-Y.P. et alii - Sequencing, cloning, and expression of human red cell-type acid phosphatase, a cytoplasmic phosphotyrosyl protein phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 267:10856-65, 1992.
- YAJIMA, T. - Localization of acid phosphatase activity in collagen-secreting and collagen-resorbing fibroblasts. *Histochemistry*, 90:245-53, 1988.
- YANG, C.-M.; DANKO, S.J. & MARKWELL, J.P. - Thylakoid acid phosphatase and protein phosphatase activities in wheat (*Triticum aestivum* l.). *Plant. Science*, 48:17-22, 1987.

- YOSHIDA, H. & TAMIYA, N. - Acid phosphatases from *Fusarium moniliforme* (*Cyberella fujikuroi*). Purification and enzymic properties. **J. Biochem.**, 69:925-935, 1971.
- YUPSANIS, T. et alii - Multiplicity of metal-independent protein phosphatases of germinated alfafa seeds. **J. Plant. Physiol.**, 141:257-62, 1993.
- ZHANG, Z.-Y. & VAN ETTEN, R.L. - Purification and characterization a low-molecular-weight acid phosphatase - a phosphotyrosyl-protein phosphatase from bovine heart. **Arch. Biochem. Biophys.**, 282:39-49, 1990.
- ZHANG, Z.-Y. & VAN ETTEN, R.L. - Leaving group dependence and proton inventory studies of the phosphorylation of a cytoplasmic phosphotyrosyl protein phosphatase from bovine heart. **Biochemistry**, 30:8954-9, 1991.
- ZHANG, Z.-Y., DAVIS, J.P. & VAN ETTEN, R.L. - Covalent modification and active site-directed inactivation of low molecular weight phosphotyrosyl protein phosphatase. **Biochemistry**, 31:1701-11, 1992.

