

ESTUDOS SOBRE CATEPSINA D DE COELHO:
PURIFICAÇÃO E PREPARAÇÃO DE
ANTI-SORO MONOESPECÍFICO

F.A.M. DAWOOD

FAWZI A. M. DAWOOD

ESTUDOS SOBRE CATEPSINA D DE COELHO: PURIFICAÇÃO
E PREPARAÇÃO DE ANTI-SORO MONOESPECÍFICO

Tese de Mestrado
Apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
Orientador: Prof. H. A. Rangel

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Campinas - São Paulo
(1973)

Aos meus pais,
À Liana Clemente.

AGRADECIMENTOS

A coordenação do curso de pós-graduação em Imunologia, o autor e o orientador externam os seus agradecimentos às seguintes pessoas:

Prof. Zeferino Vaz, magnífico reitor da Universidade Estadual de Campinas, pelo vigoroso apoio dado ao desenvolvimento da pesquisa e do ensino pós-graduado na UNICAMP;

Prof. Walter August Hadler, diretor do Instituto de Biologia, pelo incentivo constante ao desenvolvimento das atividades do departamento de Microbiologia e Imunologia;

Aos professores do curso de pós-graduação que contribuíram para a implantação do espírito científico;

Aos professores Abraham Osler (New York University), Michael Lamm (New York University), Ivan Mota (Organização Mundial de Saúde) pela discussão crítica dos resultados;

Aos colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia e aos do Instituto de Biologia pelo espírito de colaboração;

Aos técnicos do Departamento de Microbiologia e Imunologia.

Este trabalho foi realizado com recursos fornecidos ao curso de pós-graduação em Imunologia da UNICAMP pelas seguintes Instituições:

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
CONSELHO NACIONAL DE PESQUISAS
ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (Divisão de Imunologia)
BIBLIOTECA REGIONAL DE MEDICINA - São Paulo.

ÍNDICE

	Página
INTRODUÇÃO	1
MATERIAL E MÉTODOS	5
RESULTADOS	9
1. PURIFICAÇÃO DA CATEPSINA D	9
1.1 ESTUDO COMPARATIVO DE AÇÃO DA CATEPSINA D SOBRE VÁRIOS SUBSTRATOS	9
1.2 DETERMINAÇÃO DE pH ÓTIMO	10
1.3 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	11
1.4 PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA	12
1.5 PURIFICAÇÃO DA CATEPSINA D A PARTIR DE PÓ ACETÔNICO	13
1.5.1 Extração da catepsina D	13
1.5.2 Eliminação do material inativo a pH 4,5	14
1.5.3 Estudo comparativo da precipitação fracionada da catepsina D com sol- ventes polares e apolares	15
1.6 PURIFICAÇÃO DA CATEPSINA D A PARTIR DE BAÇOS CONGELADOS	21
1.7 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	21
1.8 ANÁLISE ELETROFORÉTICA	26
1.9 CARACTERIZAÇÃO DA CATEPSINA D NA ANÁLISE ELETROFORÉTICA	28
2. OBTENÇÃO DO SORO MONO-ESPECÍFICO	30
2.1 PREPARAÇÃO DE SORO ANTI-CATEPSINA D DE COELHO	30
2.2 ESPECIFICIDADE DO ANTI-SORO	30
DISCUSSÃO	36
RESUMO	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

ABREVIATURAS

As seguintes abreviaturas foram usadas:

DFP - Diisopropil fluoro fosfato

PCMB - Para-cloro metil benzoato

SBI - "soy bean inhibitor"

SAH - soro albumina humana

SAB - soro albumina bovina

CAT ou cat - Catepsina

Prot - Proteína

Ag - Antígeno

Ac - Anticorpo

INTRODUÇÃO

A atividade proteolítica de extratos de tecidos é conhecida de longa data, desde o trabalho de Hedin em 1903 (1). Esta atividade demonstrada em vários órgãos tais como baço, fígado, rim, etc. foi atribuída à ação de enzimas intracelulares que foram denominadas "catepsinas" devido à suposta relação com a decomposição cadavérica dos tecidos (2).

Até 1940 a caracterização das catepsinas foi dificultada pela complexidade dos extratos de tecidos e pelo uso de substratos complexos (caseína, hemoglobina) para avaliação da atividade enzimática.

A introdução por Von Bergman de substratos sintéticos para definir a especificidade enzimática, permitiu a demonstração de várias enzimas proteolíticas nos extratos tissulares (3). Ações hidrolíticas em pH ácido nos substratos sintéticos específicos de pepsina, tripsina, quimotripsina foram evidenciadas (4), e foi possível caracterizar a existência de 3 catepsinas diferentes no extrato do baço bovino, respectivamente as catepsinas A, B e C ao lado de algumas peptidases: Leucinoaminopeptidase, carboxipeptidase e tripeptidase (4,5).

A catepsina A, enzima termolábil capaz de hidrolisar, em pH 5,0 a carboxi-L-glutamil-L-tirosina e outros substratos sintéticos específicos da pepsina. Esta enzima não é ativada ou inibida por compostos sulfidrílicos, DFP, iodoacetamida e PCMB (4).

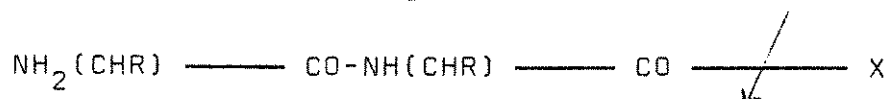
A catepsina B, enzima termolábil, capaz de hidrolisar em pH 5,6 a benzoil-L-argininamida, substrato sintético específico da tripsina, foi purificada cerca de 200 vezes a partir do baço bovino (5). Esta enzima é ativada por compostos sulfidrílicos e completamente inibida pela iodoacetamida, em concentração de 1×10^{-3} M, pela fenilhidrazina e pela hidroxilamina. A ação destes dois últimos inibidores pode ser suprimida pela cisteína (6). O cianeto, DFP e SBI

não tem ação sobre esta enzima.

A especificidade da catepsina B, é semelhante à da tripsina, porém é mais restrita. Ambas as enzimas hidrolisam a benzoil-L-arginina etil éster e benzoil-L-lisina-mida. Contudo, a L-argininamida e a L-arginina-etil-éster, hidrolisáveis pela tripsina, não são hidrolisadas pela catepsina B (6), o que sugere que a acilação da alfa amino grupo é importante para ação da catepsina B. Como a tripsina a catepsina B promove a ativação de tripsinogênio (7).

A catepsina C é uma enzima termostável a 65°C durante 40 min., que hidrolisa em pH 5,0 a glicil-L-tirosinamida, substrato sintético específico da quimotripsina. Purificada cerca de 250 vezes (8), esta enzima cujo peso molecular está em torno de 235.000, é ativada por compostos sulfidrílicos e por cianeto, sendo completamente inibida por iodoacetato e PCMB. O SBI e DFP não têm ação sobre esta enzima.

Estudos sistemáticos (9,10), sobre a especificidade desta enzima mostram que em pH 5,0 a catepsina C hidrolisa dipéptideos conforme o seguinte esquema:



O agrupamento CO ————— X pode ser uma amida ou um éster. A enzima age preferencialmente nos dipéptideos em que o grupo R é um resíduo de fenilalanina ou tirosina, assemelhando-se deste modo à quimotripsina. No entanto, a especificidade da catepsina C é mais restrita: não age sobre a beta-alanil-L-fenilalaninamida, hidrolisável pela quimotripsina. A única diferença entre este substrato e a glicil-fenilalaninamida, substrato da catepsina C é a introdução de um grupo metilênico na espinha dorsal do péptide. Admite-se por esta razão que a espinha dorsal do péptide sensível forme um hexágono, estericamente complementar ao sítio ativo da enzima (10,11), conforme apresentado na figura 1.

A atividade proteolítica de extrato do baço também foi estudada por Anson (12,13) utilizando hemoglobina como substrato, evidenciando-a deste modo uma ação hidrolítica

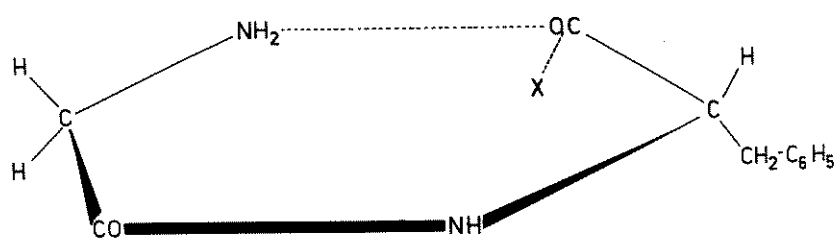


Fig. 1 - Configuração espacial admitida para a glicilfenilalamida.

ca em pH 3,5. Anson denominou as enzimas responsáveis por essa ação "hemoglobin splitting enzymes". Em 1959, Press, Porter e Cebra (14) isolaram uma enzima do baço bovino capaz de hidrolisar a hemoglobina bovina em pH 3,5. Como esta enzima é incapaz de hidrolisar os substratos sintéticos específicos das catepsinas A, B e C, foi denominada catepsina D. Esta enzima é responsável por 2/3 de atividade proteolítica de extrato do baço sobre a hemoglobina em pH 3,5 e se apresenta sob várias formas de diferentes mobilidades eletroforéticas.

Lapresle e Webb (15,19) isolaram a partir do baço de coelho uma enzima capaz de hidrolisar em pH 3,5 a albumina humana. As propriedades físico-químicas dessa enzima eram tão próximas da isolada do baço bovino que se justificou a aplicação da mesma designação, catepsina D de coelho. Contudo, estudos sobre a especificidade da catepsina D humana, a de boi e a de coelho (20,21), utilizando cadeia B de insulina como substrato, mostraram que as catepsinas D exibem uma gama de especificidade própria a cada espécie animal. Esta constatação, aliada ao fato da catepsina D, estar presente num órgão linfóide, formador de anticorpos e responsável pela eliminação dos antígenos sugere a possibilidade de que essa enzima esteja relacionada com o catabolismo dos antígenos proteicos.

As investigações sobre essa hipótese acham-se dificultadas pela falta de informações sobre a identidade das células portadoras da catepsina D e se estas células estão diretamente envolvidas com o catabolismo dos antígenos protei -

cos.

Como premissa fundamental para determinar a identidade das células portadoras da catepsina D torna-se necessário a obtenção de uma catepsina com alto grau de pureza e de um imune soro específico da catepsina.

No presente são estudadas as condições para a obtenção da catepsina D purificada a partir de baço de coelho e do imune-soro de cobaia específico da catepsina D.

MATERIAL E MÉTODOS

BAÇOS DE COELHOS: baços de coelhos, obtidos em matadouro foram congelados a -20°C e remetidos ao laboratório onde eram desembaraçados do tecido adiposo, pesados, distribuídos em porções de 100 g e conservados a -20°C até o momento do uso.

REAGENTES: os reagentes utilizados neste trabalho tinham a especificação de quimicamente puros. A acetona foi redestilada a 56°C , no laboratório. O éter livre de peróxido por lavagens sucessivas com solução saturada de sulfato ferroso e livre de álcoois e de água pela adição de sódio metálico, foi destilado a 35°C em presença de sulfato ferroso seco e conservado a -20°C até o momento do uso.

PREPARAÇÃO DE PÓ ACETÔNICO DE BAÇO DE COELHO: porções de 100 g de baços conservados a -20°C , foram homogeneizadas em liquidificador em presença de 1 litro de acetona, a -20°C . A mistura, filtrada em placa porosa, foi sucessivamente suspensa e lavada, a -20°C , com 1 litro de acetona, 1 litro de mistura em partes iguais de éter e acetona e 2 litros de éter. O resíduo obtido, após eliminação do éter foi colocado à temperatura ambiente, sob uma corrente de ar, triturado em gral, tamisado para eliminar grandes partículas e conservado em frascos hermeticamente fechados na geladeira.

SUBSTRATOS PARA CATEPSINA D: a hemoglobina de coelho, a de carneiro e a de boi foram preparadas em laboratório a partir dos glóbulos vermelhos desses animais. Esses glóbulos eram lavados 4 vezes com salina isotônica e recolhidas por centrifugação a 1000 g, 15 min. A papa de glóbulos obtida era diluída a 1/5 (v/v) em água destilada e o estroma era separado por centrifugação a 12100 g, 30 min. e teor de proteínas determinado pelo processo de Microkjeldahl. A hemoglobina ob-

tida foi conservada a -20°C até o momento do uso. SAH cristalizada foi obtida de Armour Laboratories e SAB cristalizada foi obtida de Fluka AG, Buchs, SG.

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS: a concentração de proteínas foi determinada empregando-se o método de Microkjeldahl (22), ou a reação de Biureto, segundo método de Weichselbaum (23).

DOSAGEM DA CATEPSINA D: a catepsina foi dosada segundo método de Lapresle (17), modificado, utilizando-se hemoglobina de coelho ou de carneiro (75 mg/ml). Curvas de referências utilizando albumina humana e hemoglobina foram preparadas e comparadas de modo a permitir a utilização do mesmo conceito de unidade empregado em trabalhos anteriores: Lapresle (17), Rangel e Lapresle (20).

CROMATOGRAFIA EM CELULOSE: Dietilaminoetil-celulose e carboximetil-celulose obtidos de Bio. Rad Laboratories-32^o, Griffin, Richmond, Calif, USA, foram usadas em colunas de 2,5 cm de diâmetro x 60 cm a 4°C . As cromatografias em celulose modificadas (DEAE-celulose e CM-celulose) foram realizadas de acordo com as instruções fornecidas em Sober et al. (24).

Os tampões usados nessas cromatografias consistiam de mistura de fosfato monobásico e dibásico de potássio, nas proporções exigidas para obtenção do pH e força iônica requerida pela experiência. A molaridade de tampão utilizado é calculada em relação de fosfato, e o pH é medido pelo potenciômetro.

CROMATOGRAFIA EM SEPHADEX: foi utilizado Sephadex G100, obtido em Pharmacia UPPSALA, SWEDEN. As indicações de Flodin (25) foram seguidas na realização das cromatografias em Se-

phadex.

PRECIPITAÇÃO EM MEIO GELIFICADO: as técnicas de imunodifusão foram realizadas em gel de agar a 1% em meio salino isotônico de pH 7,2-7,4 conforme instruções de Ouchterlony (26). As imuno-eletroforeses foram realizadas conforme as indicações de Grabar e Burtin (27), em placas de vidro de 12 x 8 cm ou de 6 x 4 cm, contendo uma camada de 3 mm de espessura de agar a 1%, tampão veronal, pH 8,4, $\mu = 0,0025$ com gradiente de potencial de 10 volts/cm, durante uma hora e 20 min.

DETECÇÃO DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA: as experiências de detecção de atividade enzimática foram realizadas em gel de agar segundo método de Uriel et al. (28). As lâminas de agar após a eletroforese simples nas condições acima descritas, foram imersas numa solução de SAB a 0,2% em tampão acetato de sódio HCl pH 3,5, $\mu = 0,4$ em presença de cisteína 5×10^{-3} M. As lâminas foram incubadas a 37°C pelo espaço de 18 h, fixadas numa solução de álcool a 50% contendo 4% de ácido acético, secas e coradas pelo amido Schwartz. Quando a hemoglobina foi utilizada como substrato da catepsina D nessas técnicas, o pH era ajustado a 3,3.

DETECÇÃO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA NOS IMUNE-COMPLEXOS: o método de Uriel (29) foi seguido para realizar essas experiências, com modificações descritas por Weston (30). As lâminas de imuno-eletroforese em gel de agar, contendo as linhas da precipitação a serem examinadas, foram lavadas em NaCl 0,15 M na geladeira por 2 dias, trocando a solução cada 2 h, e em seguida em água destilada 2 vezes por 2 h e secas a 37°C.

Uma segunda lâmina de agar, preparada do mesmo modo como para eletroforese foi imersa em tampão formiato de sódio (pH 3,3, 0,25 M) a 4°C, por 16 horas e em seguida

numa solução de 0,5% hemoglobina no mesmo tampão, à temperatura ambiente por 30 min. Essa lâmina retirada da solução de hemoglobina era colocada em contato com a lâmina seca de eletroforese. Ambas as lâminas eram incubadas juntas a 37°C por 2,5 horas. A lâmina de substrato era desprezada e a lâmina original de eletroforese, fixada por 2 h em etanol-água-ácido acético (50:45:5 v/v), era corada pelo amido Schwartz.

RESULTADOS

1. PURIFICAÇÃO DA CAT D

1.1 ESTUDO COMPARATIVO DE AÇÃO DA CAT D SOBRE VÁRIOS SUBSTRATOS:

Com objetivo de encontrar um substrato adequado capaz de substituir a albumina humana, foram realizadas as experiências indicadas a seguir:

Soluções de hemoglobina de coelho, de carneiro e de boi foram preparadas de modo a conter 25 mg.prot./ml, ajustadas a pH 3,5 com HCl 1 N. Porções de 0,5 ml foram distribuídas em quantidades constantes numa série de tubos. Uma mesma amostra da cat D, previamente dosada pelo método de Lapresle com albumina humana (17) foi utilizada. Porções de 0,5 ml da cat contendo concentrações variáveis da enzima foram adicionadas às soluções de cada substrato, seguindo-se as mesmas etapas da dosagem da cat D, pelo método de Lapresle.

A Fig.2 apresenta os resultados obtidos nesse estudo. Pode-se observar que todas as hemoglobinas estudadas foram degradadas pela cat D e que as curvas referentes à degradação de hemoglobina de coelho e da de carneiro aproximam-se da curva correspondente à degradação de albumina humana. Tais resultados mostram que a hemoglobina de coelho e a de carneiro podem ser empregadas como substratos de cat D, substituindo a albumina humana.

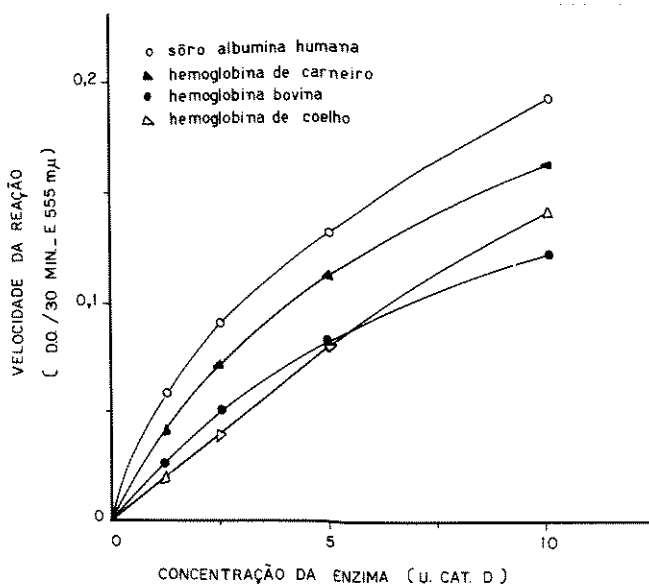


Fig. 2 - Ação da catepsina D sobre vários substratos.

1.2 DETERMINAÇÃO DE pH ÓTIMO

Para determinar o pH ótimo de ação da cat D utilizando hemoglobina de coelho como substrato, foram realizadas as experiências indicadas a seguir:

Diferentes soluções do substrato empregado em concentração 75 mg/ml foram ajustadas com HCl a diferentes pH de 2 a 5. Essas soluções foram misturadas a 12 U. da cat D previamente ajustada ao mesmo pH. A dosagem de atividade foi realizada seguindo-se as indicações de Lapresle para albumina humana.

A Fig.3 apresenta os resultados obtidos. Pode-se verificar que a atividade máxima da cat D foi observada quando o pH estava em torno de 3,3.

Resultados semelhantes foram observados com a hemoglobina de carneiro.

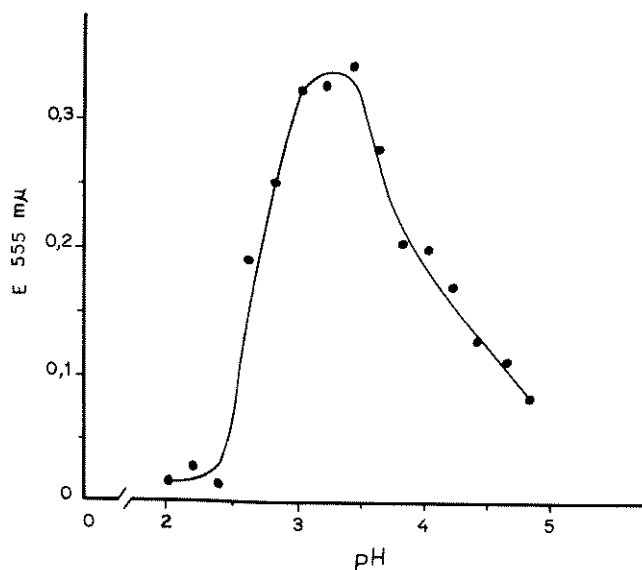


Fig.3 - Ação da cat D sobre hemoglobina de coelho em diferentes pH.

1.3 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA:

Com objetivo de determinar a concentração ótima da hemoglobina de coelho para dosagem da cat, esse substrato foi testado em diferentes concentrações a pH 3,3 frente a 6 U. de cat D. As mesmas etapas da dosagem foram seguidas. Os resultados acham-se apresentados na figura 4. Pode-se verificar que a quantidade de produtos da degradação formados aumenta com acréscimo da quantidade do substrato. Entretanto a inclinação da curva aproxima-se de zero com quantidades crescentes do substrato. Resultados semelhantes foram obtidos com a hemoglobina de carneiro.

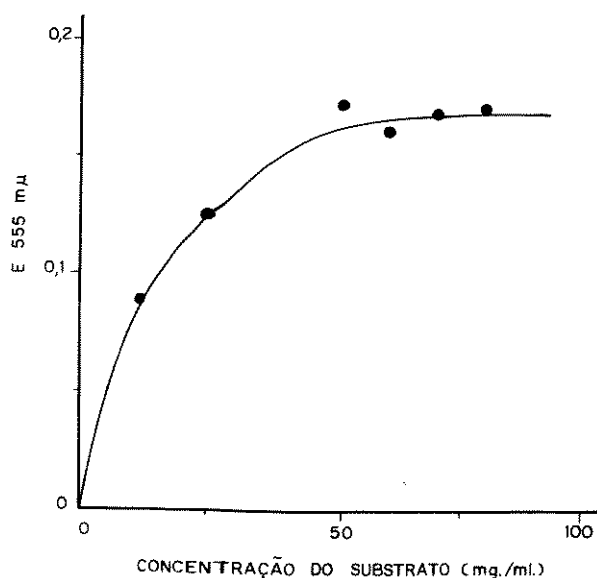


Fig. 4 - Influência da concentração de hemoglobina na atividade enzimática.

1.4 PADRONIZAÇÃO DO TESTE DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA:

Após a determinação das condições ótimas da dose da catepsina D utilizando hemoglobina de coelho foram realizadas as experiências indicadas a seguir com o fito de estabelecer uma curva padrão para testar a atividade enzimática. Quantidades variáveis da catepsina D foram utilizadas para digerir albumina humana em idênticas condições descritas por Lapresle. Idênticas quantidades de uma mesma amostra da catepsina foram utilizadas em experiências paralelas utilizando-se a hemoglobina de coelho e a de carneiro.

Os resultados acham-se expressos nas figuras 5 e 6.

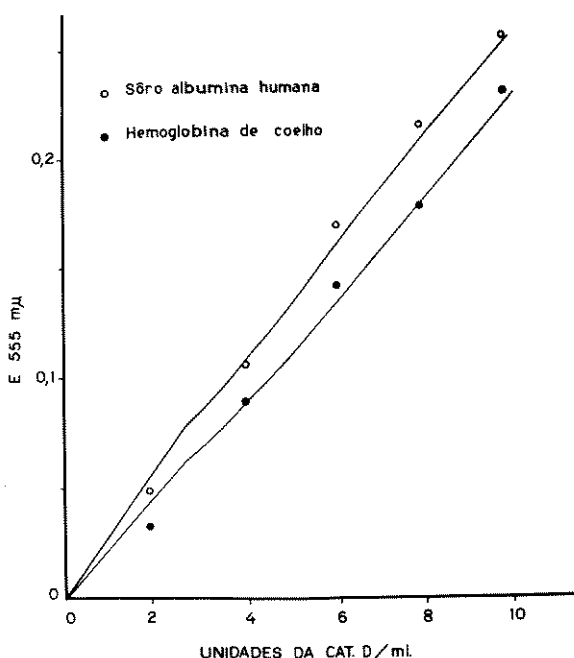


Fig. 5 - Curvas padrão da digestão da hemoglobina de coelho e da albumina humana pela cat D.

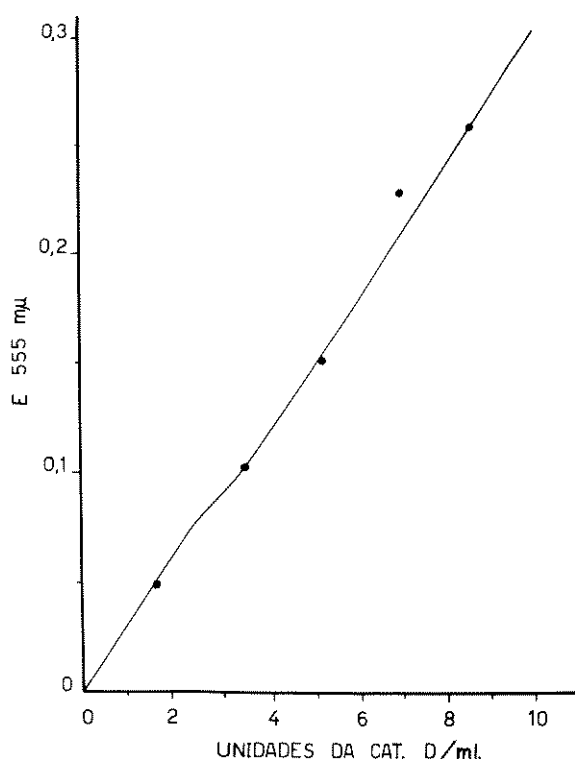


Fig. 6 - Curva padrão da digestão de hemoglobina de carneiro pela cat D.

1.5 PURIFICAÇÃO DA CATEPSINA D A PARTIR DE PÓ ACETÔNICO:

Diferentes partidas de pó acetônico foram preparadas e utilizadas nas experiências indicadas a seguir:

Cada 100 g de baços congelados forneceram, em média, 12,0 g de pó acetônico. Os resultados indicados a seguir representa médias obtidas de diferentes preparações. Em casos específicos, que serão indicados no decorrer da descrição, resultados de uma mesma partida são apresentados.

1.5.1 Extração da catepsina D:

A fim de determinar as condições ótimas para extração da enzima, porções de pó acetônico foram suspensas em diferentes solventes e mantidas a 0°C pelo espaço de 18 h. Essas suspensões eram centrifugadas a 4800 g, 20 min. a 5°C. O teor de proteínas e atividade enzimática dos sobrenadantes ob

tidos eram determinados conforme indicado em material e métodos.

Os resultados obtidos acham-se exemplificados na tabela 1. Pode-se verificar que as preparações feitas em solução fisiológica contendo 3% de pó acetônico foram as que permitiram extrair maior quantidade da enzima por grama de pó e que apresentam maior atividade específica.

Tab. 1 - Extração da cat D por diferentes solventes.

Solventes	Concentração de pó acetônico	Unidades por grama de pó	Atividade específica (U. de cat. mg. prot.)
Tampão fosfato 0,05 M pH 8,0	3 %	966	2,9
Água destilada	3 %	1133	3,4
Salina fisiológica	3 %	1183	3,5
	6	930	2,8
	12	905	2,2

1.5.2 Eliminação do material inativo a pH 4,5:

Com objetivo de uma purificação prévia do extrato bruto da enzima, soluções de catepsina D preparadas a partir de suspensões a 3% de pó acetônico, em salina fisiológica, foram colocadas em banho de gelo. A estas soluções foram adicionadas quantidades suficientes de HCl 0,1 N gelado, gota a gota, com agitação constante, de modo a levar o pH a 4,5. Nessas condições forma-se um precipitado que foi eliminado por centrifugação. O precipitado foi lavado duas vezes em salina e os sobrenadantes reunidos. A atividade proteolítica e o teor proteico da solução antes e após a precipitação a pH 4,5 foram determinados conforme indicado em material e métodos.

Pode-se verificar nos dados apresentados na tabela

la 2 que a precipitação conduz a uma purificação de cerca de 1,6 vezes, sem perda apreciável do número total de unidades.

Tab. 2 - Resultados de precipitação do material inativo a pH 4,5.

Experiência número	EXTRATO BRUTO		APÓS PRECIPITAÇÃO A pH 4,5	
	Unidades totais	Atividade específica (U de cat./mg de prot.)	Porcentagem de rendimento	Grau de purificação
25	3 300	3,8	94%	1,7
26	13 200	4,4	111 %	1,6
27	16 000	4,6	105%	1,6
28	13 000	3,2	111 %	2,1
30	13 600	3,9	102%	1,8
31	11 400	4,5	105%	1,8
41	10 168	7,7	94%	1,4
42	7 930	6,8	103%	1,4
43	10 231	6,0	98%	1,5

1.5.3 Estudo comparativo da precipitação fracionada da cat D com solventes polares e apolares:

Esse estudo foi realizado com o objetivo de encontrar condições ótimas e econômicas para maior purificação e concentração da cat D. Experiências utilizando-se $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (solução concentrada), acetona e álcool metílico para precipitar a cat D foram realizadas.

A) PRECIPITAÇÃO PELO $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:

Porções de 100 ml da cat D após a eliminação do material inativo a pH 4,5 foram ajustadas a pH 7,0 com NaOH 0,1N e precipitadas com solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 35%, 50% e 100%, gota a gota, com agitação constante a 4°C. O precipitado formado em diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi separado por centrifugação a 5°C, 4800 g, 30 min. ressuspenso em água destilada e dialisado contra a mesma, a 4°C até livrar-se de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. O material que permanecia inso-

lúvel após diálise era eliminado por centrifugação a 12000 g, 30 min., a 5°C e o sobrenadante obtido era utilizado para determinação da atividade enzimática e da concentração de proteínas.

Os resultados obtidos acham-se expostos na tabela 3. Pode-se verificar que a atividade específica do material recuperado segundo essa técnica é relativamente baixa. Ademais, experiências de fracionamento por cromatografia em celulose modificada mostraram que o material precipitado contém pigmentos que se fixam de modo irreversível nas colunas da DEAE - celulose e CM - celulose.

Tab. 3 - Precipitação da cat D pelo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a pH 7,0.

ESTÁGIO DE PRECIPITAÇÃO	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	
	UNIDADES TOTAIS	ATIVIDADE ESPECÍFICA (U./mg. PROT.)
Extrato bruto	3 250	3,4
35 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	612	3,8
50 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 564	4,5
100 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	192	5,5

B) PRECIPITAÇÃO PELA ACETONA:

O estudo das condições de precipitação da cat D em misturas água-acetona foi levado a efeito em experiências efetuadas a temperaturas próximas ao ponto de congelamento das misturas, variando-se, em cada experiência, seja a concentração da acetona, seja o pH do meio, conservando-se a força iônica próxima de 0,15.

Porções de 100 ml de cat D, obtidas após a eliminação do material inativo a pH 4,5, foram ajustadas a diferen

tes pH pela adição, gota a gota, com agitação constante, a 0°C, de quantidades adequadas de HCl 0,1N ou NaOH 0,1N. A cada porção, mantida em temperaturas próximas ao ponto de congelamento, adicionaram-se quantidades crescentes de acetona resfriada a -20°C, de modo a obter concentrações de acetona correspondente a 33%, 66% e 80%. O precipitado formado em diferentes concentrações de acetona foi separado por centrifugação a 4800 g, 20 min., a -20°C e a acetona foi eliminada o mais completamente possível. O precipitado obtido, suspenso em 10 ml de tampão fosfato pH 8,0, 0,01 M, foi dialisado durante a noite, na geladeira, contra o mesmo tampão. O material que permaneceu insolúvel após diálise foi eliminado por centrifugação a 12100 g, 20 min., a 5°C e o sobrenadante claro obtido foi utilizado para determinação da atividade enzimática e da concentração de proteínas.

Os resultados, sumariados nas figuras 7 a 11 indicam que a cat D pode ser precipitada quantitativamente do extrato bruto utilizando-se concentrações adequadas de acetona.

De acordo com os resultados apresentados, pode-se prever que, eliminando-se o precipitado formado a pH 5,0 com 33% de acetona e recolhendo-se o precipitado formado com concentração de 66%, deveremos ter, praticamente, a totalidade da enzima. Experiências realizadas nesse sentido, sumariadas na tabela 4, confirmaram esta previsão e indicaram que a enzima obtida acha-se purificada cerca de 2 vezes e concentrada 10 vezes. A cromatografia do material obtido desse modo mostrou a ausência de qualquer pigmento fixado na coluna de DEAE - celulose ou CM - celulose.

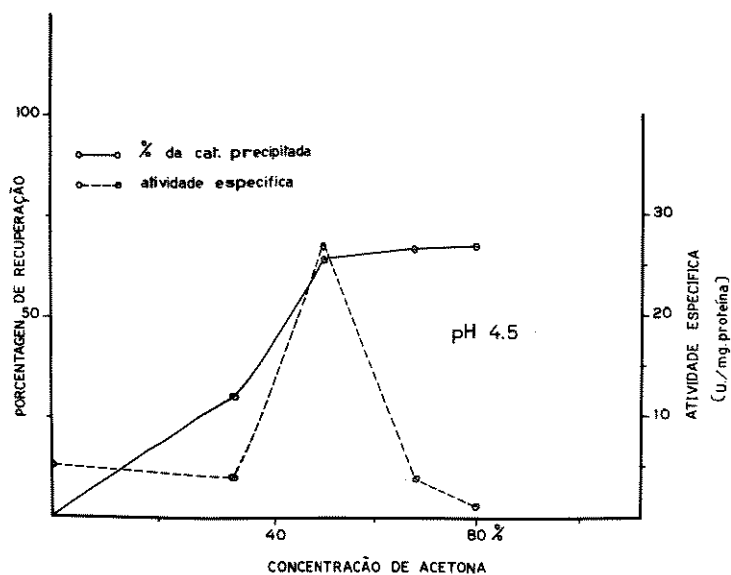


Fig. 7 - Solubilidade da cat D em misturas água-acetona a pH 4,5, $\mu = 0,15$.

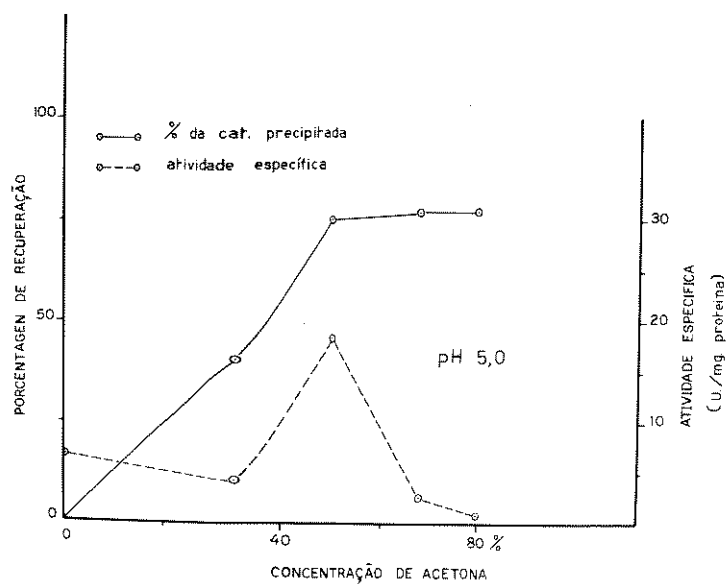


Fig. 8 - Solubilidade da cat D em misturas água-acetona a pH 5,0, $\mu = 0,15$.

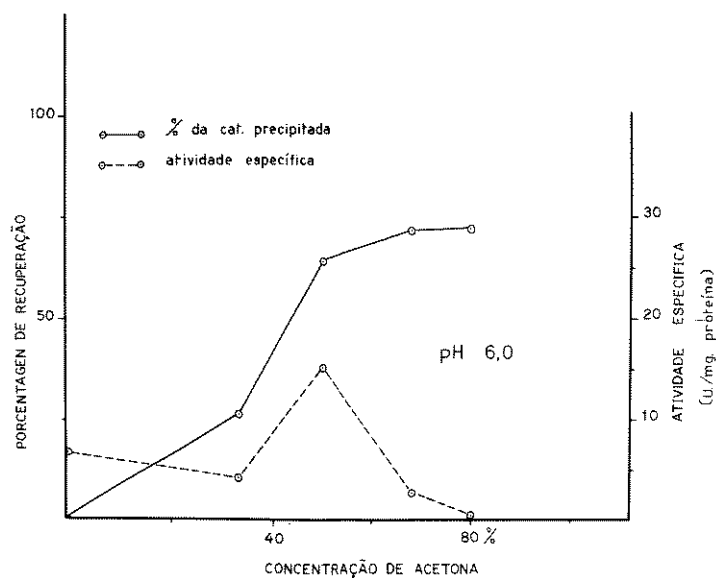


Fig. 9 - Solubilidade da cat D em misturas água-acetona a pH 6,0, $\mu = 0,15$.

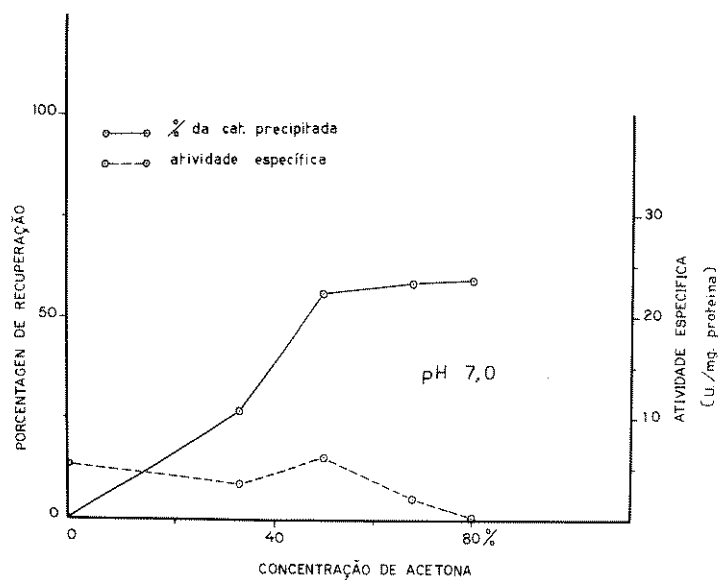


Fig. 10 - Solubilidade da cat D em misturas água-acetona a pH 7,0, $\mu = 0,15$.

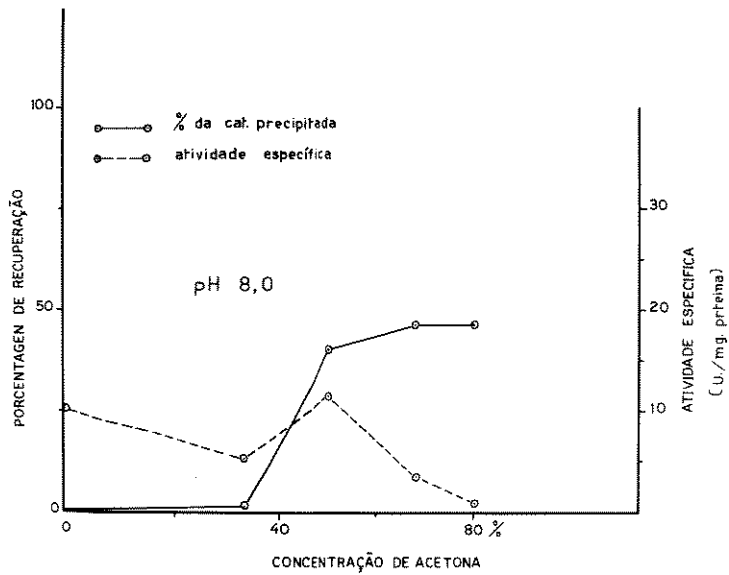


Fig. 11 - Solubilidade da cat D em misturas água-acetona a pH 8,0, $\mu = 0,15$.

Tab. 4 - Precipitação da cat D pela acetona em pH 5,0.

Exp. número	ANTES DA PRECIPITAÇÃO		APÓS PRECIPITAÇÃO COM ACETONA			
	UNIDADES TOTAIS	ATIVIDADE ESP. (U. DE CAT. /mg. PROT.)	33 %		66 %	
			PORCENTAGEM DE RENDIMENTO	GRAU DE PURIFICAÇÃO	PORCENTAGEM DE RENDIMENTO	GRAU DE PURIFICAÇÃO
25	3 100	6,6	6,4%	0,6	77,4%	2,2
26	14 600	7,0	1,3%	0,3	94,5%	1,6
27	17 000	7,8	4,4%	0,3	65,2%	1,9
28	14 500	6,6	4,1%	0,3	75,8%	1,4
30	14 000	7,4	2,1%	0,3	65,0%	2,9
31	12 000	8,3	2,5%	0,4	75,0%	1,4

C) PRECIPITAÇÃO PELO ÁLCOOL METÍLICO:

Experiências da precipitação da cat D com álcool metílico foram realizadas, nas mesmas condições da precipitação com acetona. A tabela 5 apresenta resultados de um estudo comparativo entre a precipitação com acetona e álcool metílico. Pode-se verificar que a cat D precipitada pe la acetona apresenta recuperação e atividade específica maio res em relação à enzima precipitada pelo álcool metílico.

Tab. 5 - Precipitação da cat D pela acetona ou pelo álcool metílico a pH 5,0, $\mu = 0,15$, temperatura próxima ao ponto de congelamento.

	COM ACETONA		COM ÁLCOOL METÍLICO	
	% de rendimento	Ativ. Esp. U/mg. Prot.	% de rendimento	Ativ. Esp. U/mg. Prot.
Após a precipitação com 33% de reagente	6,4%	4,5	33,8%	9,0
Após a precipitação com 66% de reagente	77,4%	15,1	31,6%	11,5

1.6 PURIFICAÇÃO DA CAT D A PARTIR DE BAÇOS CONGELADOS:

A fim de verificar se o preparo do pó acetônico poderia ser omitido, purificando-se a ~~cat~~tepsina diretamente do extrato de baços congelados, foram realizadas as experiências indicadas a seguir:

Porções de 100 g de baços congelados foram homogeneizados em 330 ml de salina gelada e a suspensão, mantida em geladeira durante a noite, foi filtrada em gaze e centrifugada a 4800 g, a 0°C. Após a eliminação do material

inativo a pH 4,5, o teor de proteínas e atividade enzimática desses extratos foram determinados conforme indicado em material e métodos. Com este material, experiências semelhantes às indicadas no ítem anterior foram conduzidas com o fito de verificar a solubilidade da cat D nas diferentes misturas água-acetona. Os resultados obtidos indicaram que apenas parte da cat contida nos extratos pode ser recuperada.

1.7 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA:

Com objetivo de estudar as condições ótimas para maior purificação da cat D, várias experiências de fracionamento por cromatografias em DEAE - celulose e CM - celulose foram realizadas utilizando tampão fosfato de potássio para eluir a enzima. A eluição da cat foi estudada variando-se quer o pH, quer a molaridade do tampão eluente. Algumas experiências realizadas na temperatura do meio ambiente, mostraram a recuperação parcial da enzima. Por esta razão, todas as experiências de cromatografia executadas a seguir foram realizadas em geladeira a 4°C. A utilização de CM-celulose mostrou purificação insignificante da enzima.

Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que as melhores condições para purificação da cat D são as indicadas a seguir:

1a. Cromatografia.

A cat D, obtida pela precipitação com acetona, dialisada contra tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 8,0, foi colocada numa coluna de DEAE - celulose, equilibrada com o mesmo tampão. A enzima foi eluída com tampão fosfato 0,05 M pH 8,0 e as proteínas que permaneceram na coluna foram eluídas com NaCl 0,5 M + KH_2PO_4 0,5 M. A figura 12 e a tabela 6 apresentam os resultados obtidos. Pode-se verificar que a enzima foi recuperada em duas frações: F1 representa a maior atividade enzimática, cerca de 72% da atividade do precipitado com acetona, contendo 30 U./mg.prot. e F2 representa apenas 5% da atividade inicial, contendo 2 U./mg.prot.

As duas frações foram recolhidas separadamente, dialisadas contra água destilada por 2 h, congeladas em nitrogênio líquido e em seguida liofilizadas.

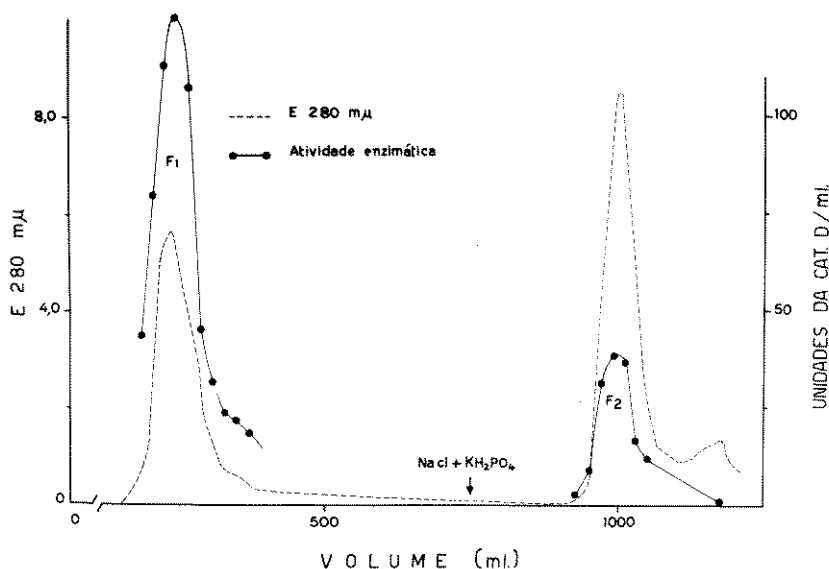


Fig. 12 - Resultados da 1a. cromatografia em DEAE - celulose, equilibrada com tampão fosfato 0,05 M pH 8,0. A cat foi eluída com o mesmo tampão.

2a. Cromatografia.

A fração 1, obtida no ítem anterior, dissolvida em 18 ml de água destilada, dialisada contra tampão fosfato de potássio 0,005 M pH 8,0, foi colocada numa segunda coluna de DEAE - celulose, equilibrada com o mesmo tampão. A eluição foi realizada com tampão fosfato 0,005 M pH 8,0 até o aparecimento do primeiro pico. Em seguida foi utilizado um gradiente linear de 250 ml de tampão fosfato 0,05 M pH 7,0. As proteínas que permaneceram na coluna foram eluídas com NaCl 0,5 M + KH₂PO₄. A figura 13 e a tabela 6 apresentam os resultados obtidos nessa experiência. Pode-se verificar que a cat D foi eluída desse modo em três frações:

F1) com 1% de atividade enzimática inicial, contendo 1,9U/

mg prot.

- F2) com 45% de atividade enzimática inicial, contendo 52,0 U/mg prot.
- F3) com 14% de atividade enzimática inicial, contendo 33,3 U/mg prot.

As três frações foram recolhidas separadamente, dialisadas contra água destilada, congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas e guardadas até o momento da terceira cromatografia.

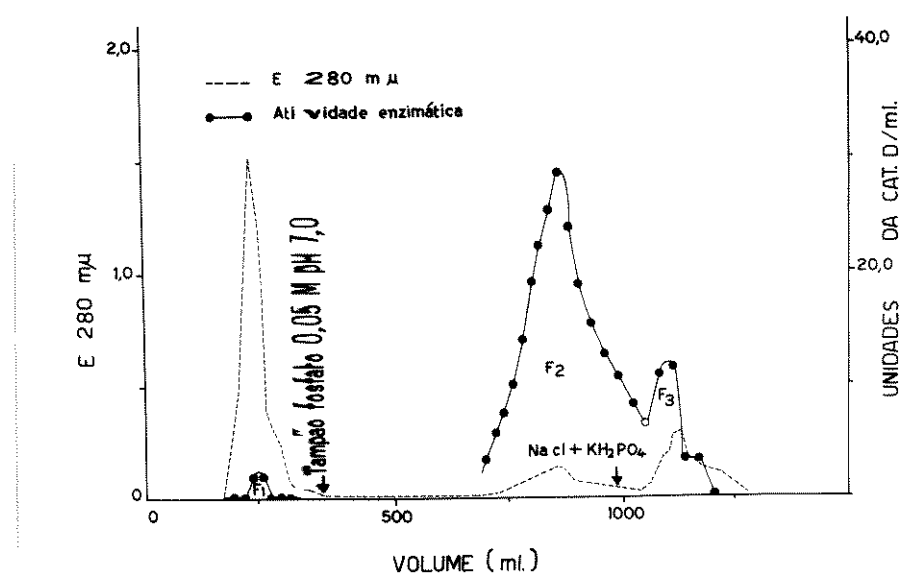


Fig. 13 - Resultados da 2a. cromatografia em DEAE-celulose, equilibrada com tampão fosfato 0,005 M pH 8,0. A cat foi eluída com gradiente de tampão fosfato 0,005 M pH 8,0 e 0,05 M pH 7,0.

3a. Cromatografia.

A fração 2, obtida na segunda cromatografia, dissolvida em 12 ml de água destilada, ajustada a pH 8,0 com K_2HPO_4 1 M, dialisada contra tampão fosfato de potássio 0,03 M pH 8,0, foi colocada numa coluna de DEAE - celulose equilibrada com o mesmo tampão. A cat D foi eluída com tampão fosfato 0,03 M pH 8,0. A figura 14 e a tabela 6 apresentam os resultados obtidos. Pode-se verificar que a cat

D foi eluída em 7 frações de atividade enzimática diferente, F3 é de maior atividade com 100 U/mg prot. Entretanto, a soma das atividades dessas frações representa 65% da atividade inicial da cat D cromatografada.

A cromatografia de filtração foi realizada numa coluna de Sephadex G100, equilibrada com tampão fosfato 0,005 M pH 7,0, contendo NaCl 0,15 M. Essas experiências mostraram purificação parcial da catepsina D.

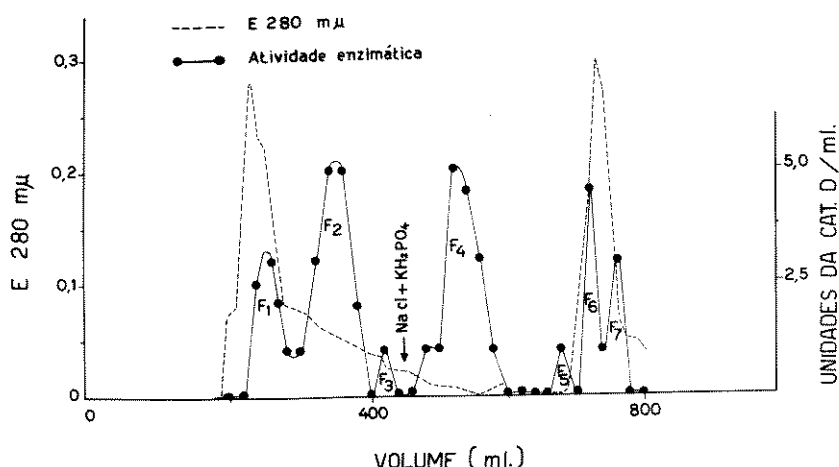


Fig. 14 - Resultados da 3a. cromatografia em DEAE - celulose, equilibrada com tampão fosfato 0,03 M pH 8,0. A cat foi eluída com o mesmo tampão.

Tab. 6 - Resultados de vários estágios da purificação da cat D a partir de pó acetônico.

ESTÁGIOS DE PURIFICAÇÃO	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	
	U. Totais	Ativ. Esp. U./mg prot.
I. Extrato bruto: 3% de pó acetônico em salina fisiológica	9 600	5,2
II. Eliminação do material inativo a pH 4,5	9 200	6,5
III. Precipitado a 65% acetona	7 800	10,7
IV. Cromatografia em DEAE-celulose e eluição da cat. D com tampão fosfato 0,05 M pH 8,0	F ₁ 5 600	30,0
	F ₂ 375	2,0
V. Cromatografia de F ₁ (estágio IV) em DEAE-celulose e eluição da cat. D com gradiente de tampão fosfato 0,005 M pH 8,0 e 0,05 M pH 7,0	F ₁ 50	1,9
	F ₂ 2 500	52,0
	F ₃ 800	33,3
VI. Cromatografia de F ₂ (estágio V) em DEAE-celulose e eluição da cat. D com tampão fosfato 0,03 M pH 8,0	F ₁ 370	60,5
	F ₂ 250	70,0
	F ₃ 180	100,0
	F ₄ 320	87,5
	F ₅ 90	75,0
	F ₆ 200	71,4
	F ₇ 25	25,0

1.8 ANÁLISE ELETROFORÉTICA DA CAT D PURIFICADA:

Com objetivo de obter informações sobre as referentes etapas da purificação da cat D, o material obtido nas diferentes etapas da purificação, indicada na tabela 6, foi submetido à análise eletroforética em gel de ágar, con - forme indicado em material e métodos.

As figuras 15, 16 e 17 apresentam os resultados obtidos. Pode-se verificar que o extrato inicial contém grande número de componentes proteicos que foram sucessivamente eliminados em diversas etapas da purificação. O material obtido no estágio (V) da purificação, apresentou-se, nos testes de eletroforese, como sendo constituído por um componente distribuído nas regiões correspondentes a Alfa e Beta globulinas. Restrições impostas pela baixa concentração proteica e pela pequena quantidade obtida nos estágios finais de purificação, dificultaram a análise eletroforética desse material. Contudo, esse material examinado em 1,2 mg prot/ml, mostrou-se como um componente aparentemente puro situado na região de Beta globulinas.

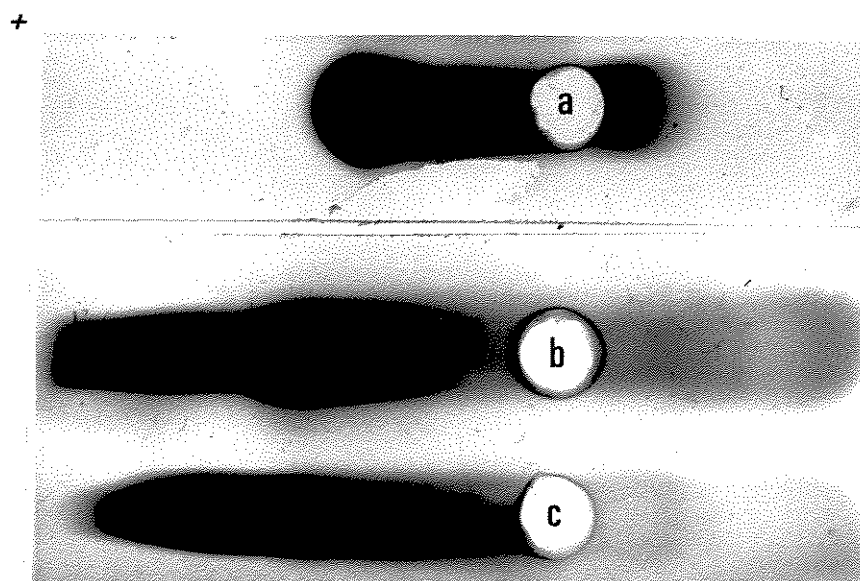


Fig. 15 - Eletroforese em gel de ágar
a) Soro normal de coelho, 3 mg prot/ml
b) Cat D, estágio II da purificação, 6 mg prot/ml.
c) Cat D, purificada pela precipitação com acetona, estágio III, 13,8 mg prot/ml.

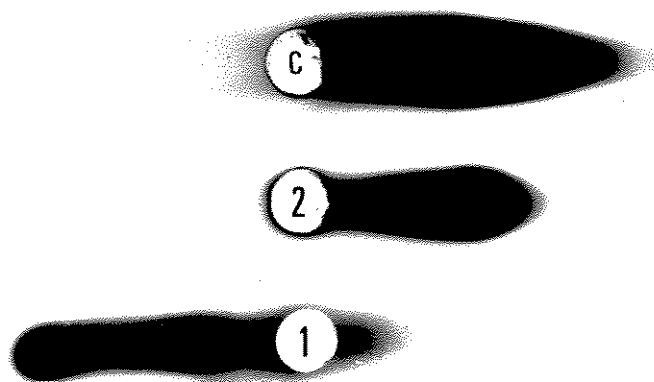


Fig. 16 - Eletroforese em gel de ágar

- 1) Cat D, F1, estágio IV da purificação, 9,5 mg prot/ml.
- 2) Cat D, F2, estágio IV da purificação, 7,5 mg prot/ml.
- c) Cat D, purificada pela precipitação com acetona, estágio III, 13,8 mg prot/ml.

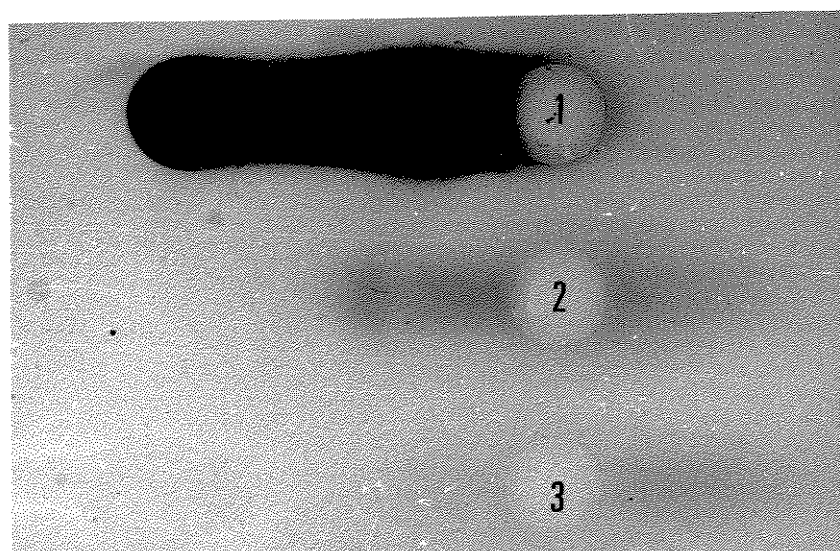


Fig. 17 - Eletroforese em gel de ágar da cat D purificada , estágio V.

- 1) F1, 5,4 mg prot/ml.
- 2) F2, 2,4 mg prot/ml.
- 3) F3, 1,2 mg prot/ml.

1.9 CARACTERIZAÇÃO DA CAT D NA ANÁLISE ELETROFORÉTICA:

Diferentes preparações da cat D em vários estágios de purificação foram examinadas, pelo método de Uriel, conforme indicado em material e métodos, a fim de caracterizar, nas experiências de eletroforese, componente com atividade enzimática.

As figuras 18, 19, 20 e 21 apresentam os resultados obtidos. Pode-se verificar que a atividade enzimática foi observada na região correspondente a Alfa e Beta globulinas e que, aparentemente, esta atividade está ligada a diferentes componentes de mobilidade eletroforética muito próximas entre si (Figs. 19 e 20).

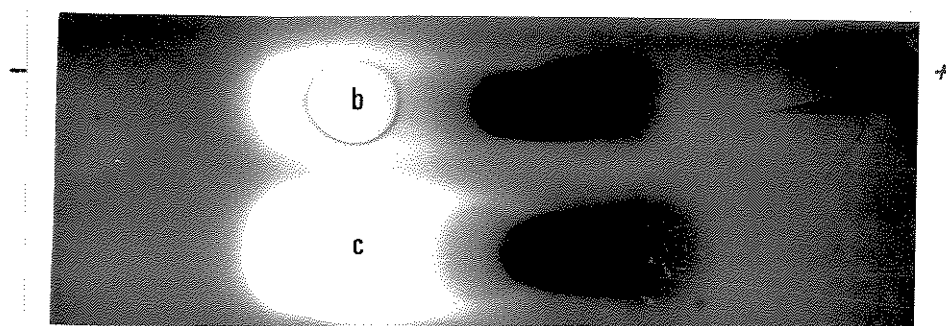


Fig. 18 - Detecção da atividade proteolítica após a eletroforese em gel de ágar.
b) Cat D, estágio II da purificação, 6,5 U/mg prot.
c) Cat D, purificada pela precipitação com acetona, estágio III, 10,7 u/mg prot.



Fig. 19 - Detecção da atividade proteolítica após a eletroforese em gel de ágar da Fl, estágio IV da purificação, 30 U/mg prot.

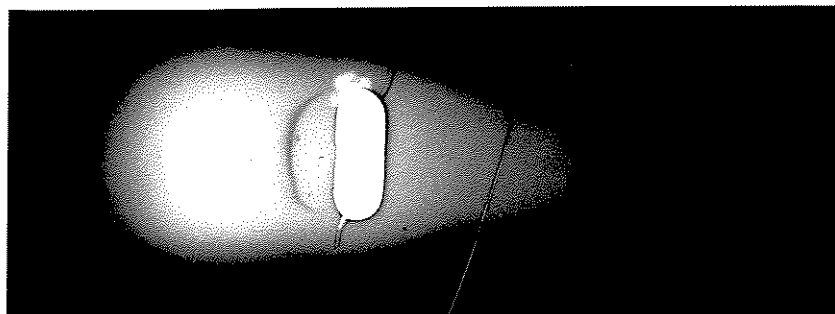


Fig. 20 - Detecção da atividade proteolítica após a eletroforese em gel de ágar da F2, estágio V, 52 U/mg prot.

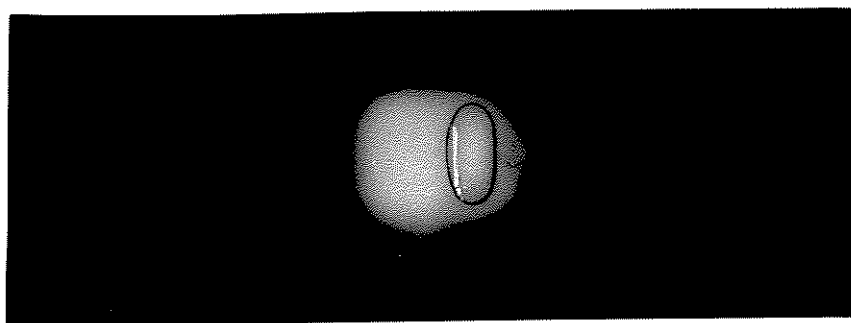


Fig. 21 - Detecção da atividade proteolítica após a eletroforese em gel de ágar da F3, estágio VI, 100 U/mg prot.

2. OBTENÇÃO DO SORO MONO-ESPECÍFICO

2.1 PREPARAÇÃO DE SORO ANTI-CAT D DE COELHO:

A cat D foi isolada a partir de pó acetônico de baço de coelho (a 3% em salina fisiológica), seguindo-se as etapas indicadas na tabela 6.

Uma amostra da fração 3, estágio VI foi utilizada para imunizar 30 cobaias (Cavia cavia) com peso médio de 250 g $\pm$ 20 g. Quantidades iguais da cat D e adjuvante completo de Freund (31) foram emulsionadas de modo a conter 1 mg prot/ml. Porções de 0,25 ml foram inoculadas no coxim plantar, nas quatro patas do animal. Vinte dias após a primeira inoculação, cada animal foi injetado intradermicamente na região do dorso, em dois pontos diferentes, com 1 ml da enzima dissolvida em salina (1 mg prot/ml). Essa inoculação foi repetida cada semana até obter nítido fenômeno de Arthus no local da injeção. Os animais que mostraram esse fenômeno foram sangrados por punção cardíaca, 10 ml de cada animal, e o soro foi separado e conservado a -20°C , até o momento do uso.

2.2 ESPECIFICIDADE DO ANTI-SORO:

I - IMUNO-ELETROFORESE:

A fim de verificar a especificidade imunológica do soro anti-catepsina D, foram realizadas experiências de imuno-difusão (Ouchterlony e imuno-eletroforese), testando-se o anti-soro obtido contra as diferentes preparações da enzima em diferentes estágios da purificação.

Os resultados obtidos e apresentados nas figuras 22, 23, 24 e 25 mostram que apenas uma linha de precipitação foi observada nas reações entre o anti-soro e as várias preparações da enzima em diferentes estágios da purificação.

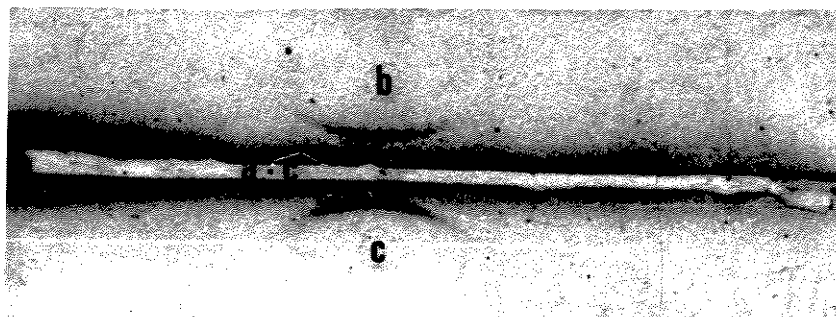


Fig. 22 - Imuno-eletroforese

- a.c) Soro de cobaia anti-cat D de coelho.
- b) Extrato bruto do baço, estágio I da purificação, 5,2 U/mg prot.
- c) Cat D purificada pela precipitação com acetona, estágio III, 10,7 U/mg prot.

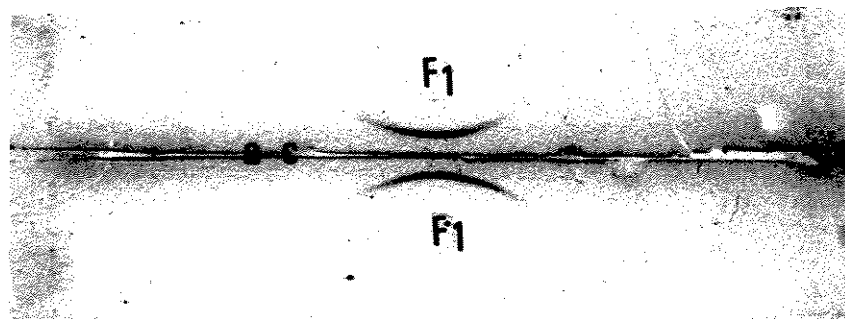


Fig. 23 - Imuno-eletroforese

- a.c) Soro de cobaia anti-cat D de coelho.
- F1) Cat D, fração I, estágio IV da purificação 30 U/mg prot.

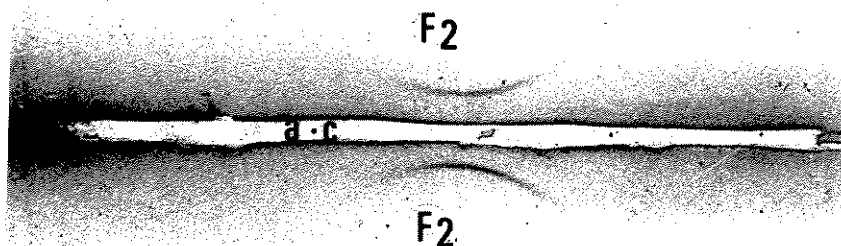


Fig. 24 - Imuno-eletroforese
a.c) Soro de cobaia anti-cat D de coelho.
F2) Cat D, fração 2, estágio V da purificação, 52 U/mg prot.

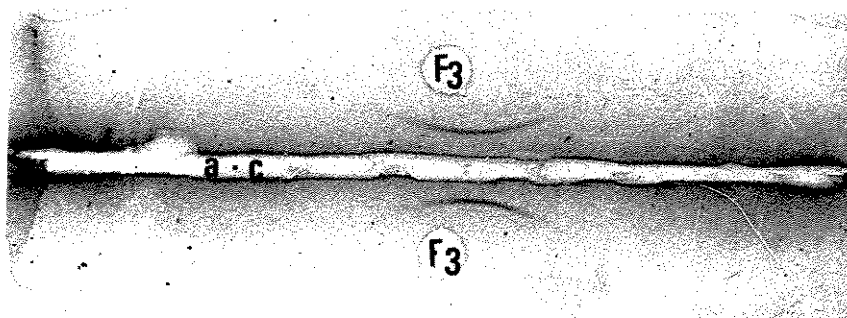


Fig. 25 - Imuno-eletroforese
a.c) Soro de cobaia anti-cat D de coelho.
F3) Cat D, fração 3, estágio VI da purificação, 100 U/mg prot.

II - DEMONSTRAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA NOS IMUNO-COMPLEXOS:

Com a finalidade de verificar se os imuno-complexos nas experiências de imuno-difusão possuíam uma atividade enzimática, as técnicas de Uriel (1963) e de Weston (1969) foram utilizadas.

Os resultados obtidos e apresentados nas figuras 26 e 27, mostram que os imuno-complexos desenvolvidos na experiência anterior (item I) apresentam atividade enzimática.

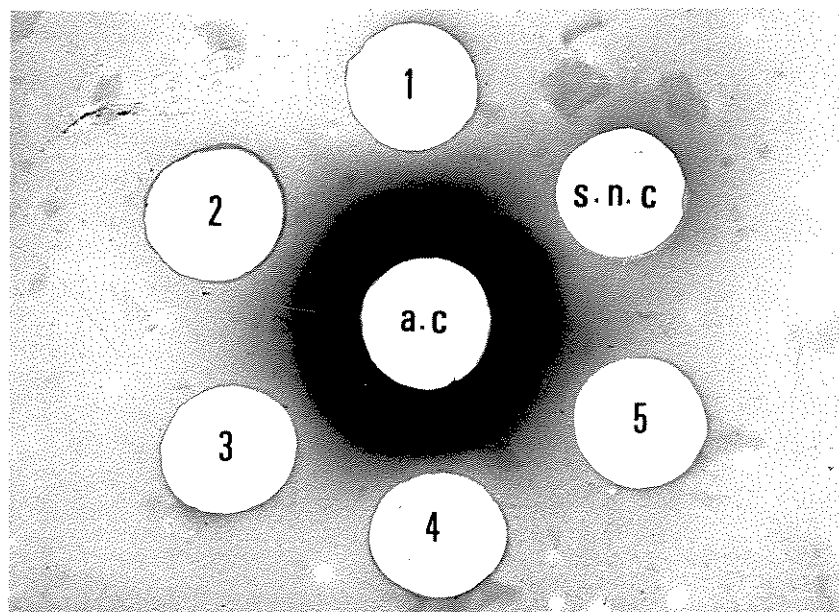


Fig. 26 - Atividade proteolítica nos imuno-complexos das experiências de imuno-difusão.

s.n.c.) Soro normal de coelho, 3 mg prot/ml.

1) Cat D, 1,5 mg prot/ml

2) Cat D, 1,0 mg prot/ml

3) Cat D, 500 µg prot/ml

4) Cat D, 250 µg prot/ml

5) Cat D, 150 µg prot/ml

a.c) Soro de coelho anti-cat D de coelho.

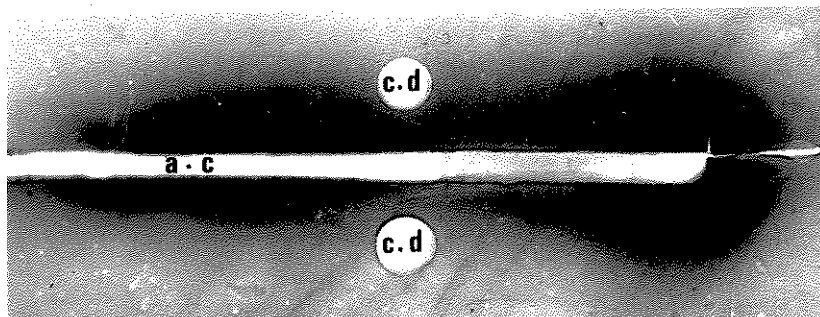


Fig. 27 - Atividade proteolítica nos imuno-complexos das experiências de imuno eletroforese.
c.d) Cat D, 52/U mg prot.
a.c) Soro de cobaia anti-cat D de coelho.

III - PRECIPITAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA PELO ANTI-SORO:

Com o objetivo de comprovar a especificidade do soro anti-cat D, foram realizadas as experiências indicadas a seguir:

Uma amostra da cat D não purificada (5,2 U/mg prot.) previamente dosada, foi diluída em tampão fosfato (0,02 M pH 7,1) de modo a obter 40 U/ml. Porções de 0,5 ml desta cat, foram misturadas a diferentes soros conforme abaixo indicados:

- 1a. reação: soro de cobaia anti-cat D (0,5 ml)
- 2a. reação: soro de cobaia normal (0,5 ml)
- 3a. reação: soro de cobaia anti-gama-globulina de coelho (0,4 ml).

Aos tubos correspondentes à terceira reação, após a adição da cat D, foi adicionado 0,1 ml de uma solução de gama-globulina de coelho (4 mg prot/ml) de modo a precipitar na equivalência, todos os anticorpos anti-gama-globulina

presentes. As misturas realizadas em triplicata, foram incubadas a 37°C, por uma hora, a seguir incubadas a 0°C, durante 16 horas. Após a centrifugação a 1000 g, por 15 min., para eliminar o precipitado, a atividade enzimática dos sobrenadantes foi determinada conforme indicado em material e métodos. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 7. Pode-se verificar que o anti-soro na primeira reação, foi capaz de precipitar a totalidade da enzima adicionada, enquanto que nas reações de controle não houve alteração da atividade enzimática.

Tab. 7 - Precipitação da cat D pelo anti-soro.

	1ª Reação	2ª Reação (Controle)	3ª Reação (Controle)
Dosagem da cathepsina D	0 U/ml	20 U/ml	20 U/ml

DISCUSSÃO

A atividade proteolítica do extrato do baço de coelho foi investigada por Lapresle, a partir de 1955, (16,17) utilizando albumina humana como substrato. A demonstração de que esta enzima era diferente das catepsinas A, B e C (18) levou Lapresle e Webb a designarem essa enzima de cat D, em concordância com idêntica denominação utilizada por Press et al. (14) para designar uma enzima com características semelhantes, isolada do baço bovino.

Os dados apresentados no presente trabalho mostram que a cat D de coelho é capaz de degradar hemoglobina de coelho, de carneiro e de boi (item 1.1). O pH ótimo de atividade para as hemoglobinas de coelho e de carneiro se situa em torno de 3,3, enquanto que o pH ótimo para degradação de albumina humana está em torno de 3,5 (16,17 e 18). Este fato está de acordo com observações anteriores de Press et al., segundo os quais o pH ótimo para atividade enzimática pode variar de acordo com o substrato utilizado.

A determinação das condições de ação da cat D sobre hemoglobina de coelho e de carneiro (itens 1.2, 1.3 e 1.4) permitiram estabelecer curvas padrão comparáveis com a curva estabelecida por Lapresle. A possibilidade de utilizar o conceito original da unidade empregando um substrato menos custoso e de fácil obtenção, representa uma evidente vantagem.

Os métodos de purificação da cat D descritos por Lapresle e por Press, utilizam cromatografia em DEAE-celulose nos estágios iniciais de purificação. A existência, nos extratos de baço, de um pigmento que se fixa irreversivelmente a DEAE-celulose, apresenta a principal desvantagem desses métodos. As experiências relatadas no presente trabalho mostram que este inconveniente pode ser contornado.

A partir de preparações de pó acetônico é possível extrair a cat utilizando água destilada, salina fisiológica ou tampão fosfato 0,05 M pH 8,0 (item 5.1). As

extrações feitas com salina fisiológica, quando comparadas com as realizadas com tampão fosfato e água destilada, apresentam maior quantidade da enzima com maior atividade específica. Esses extratos contêm o material inativo que pode ser eliminado a pH 4,5 (ítem 5.2) sem perda apreciável do número total de unidades conduzindo uma purificação cerca de 1,6 vezes. Esses resultados estão em concordância com observações anteriores (17 e 18).

As experiências de precipitação com sulfato de amônia, utilizando diferentes concentrações desse reagente, mostraram que o grau de purificação obtido é relativamente desprezível. Ademais, o emprego desse método não permitiu afastar inconveniente da presença dos pigmentos que se fixam de modo irreversível ao DEAE-celulose.

A técnica de isolamento de proteínas a partir de misturas complexas através do uso de solventes apolares (32) tem sido utilizada em numerosos casos. Utilizando-se condições controladas (concentração da proteína, pH, força iônica, temperatura e concentração de solvente), é possível isolar-se proteínas com alto grau de pureza, obtendo-se, algumas vezes, a cristalização do produto com alto grau de recuperação (32 e 33). Embora, esse método do ponto de vista teórico possa ser aplicado a qualquer caso, do ponto de vista prático apresenta limitações sérias, como por exemplo, o controle estrito da temperatura que deve ser mantida, em todas as etapas da experiência, sempre próxima ao ponto de congelamento da mistura. Temperaturas levemente superiores a este ponto, levam, frequentemente, à desnaturação irreversível da proteína. O estudo da solubilidade da cat D em misturas água-acetona (ítem 1.5.3), confirmando dados anteriores deste laboratório (34), permitiu determinar as condições apropriadas para purificação dessa enzima. As experiências feitas com extratos preparados a partir de pó acetônico do baço mostraram que, ã semelhança do que ocorre com outros sistemas, existe uma correlação estreita entre a solubilidade da cat D e uma determinada concentração de acetona e o pH dessas soluções. Utilizando-se uma concentração de acetona igual a 33% a pH

5,0, força iônica 0,15 a -20°C é possível eliminar o material inativo com pequena perda de enzima (cerca de 5%). Aumentando-se a concentração de acetona a 66%, nas mesmas condições de pH, temperatura e força iônica, pode-se recuperar cerca de 80% da enzima originalmente presente, com atividade específica cerca de duas vezes maior. As experiências de cromatografia em DEAE-celulose mostraram que a enzima purificada por esse método, não mais contém o pigmento que se fixa irreversivelmente ao DEAE. Nas condições das experiências, a cat D foi menos solúvel entre os pH 4,5 e 5,0 do que em outros pH. O ponto isoelétrico da cat D de coelho ainda não foi determinado. Entretanto, experiências de eletroforese em gel de ágar, onde a cat D bovina e a cat D de coelho foram comparadas utilizando-se o método de Uriel (29) para detecção enzimática, evidenciaram que as duas enzimas têm mobilidade eletroforética muito próxima, o que sugere uma proximidade muito grande dos pontos isoelétricos das duas proteínas. Admitindo-se, com base nessas observações, que o ponto isoelétrico da cat D de coelho esteja situado em torno de pH 6,0 e tendo em vista o fato de que a menor solubilidade de uma proteína ocorre quando a próxima ao seu ponto isoelétrico, observa-se uma discrepância entre o provável ponto isoelétrico da cat D e o seu ponto de menor solubilidade nas misturas água e acetona. Esta aparente discrepância pode ser explicada pela complexidade da mistura inicial, onde diferentes componentes podem estar em interação. Explicação semelhante foi aventada para fato semelhante observado com a toxina tetânica (33).

As experiências utilizando álcool metílico como solvente apolar não permitiram a recuperação apreciável da enzima, provavelmente devido a desnaturação da enzima em presença desse solvente.

As experiências de cromatografia em DEAE-celulose mostraram que se pode obter uma preparação da cat D com atividade específica de 100 U/mg prot., utilizando-se condições descritas no item 1.7. Em concordância com dados anteriores deste laboratório (35), essas experiências mostraram que a cat D é eluída em diferentes frações cromatográficas.

cas sugerindo que esta enzima é composta por componentes com diferentes cargas elétricas. O material purificado nas experiências de eletroforese (ítem 1.8) mostrou-se constituído por componentes com mobilidade eletroforética correspondente a Alfa e Beta globulinas. O estudo de atividade enzimática de material submetido a eletroforese (ítem 1.9) mostrou que esta atividade está em concordância com mobilidade eletroforética dos componentes do material purificado e os padrões de atividade obtidas (Figs. 19, 20 e 21) sugerem fortemente, que a cat D de coelho é constituída por diferentes componentes de mobilidade eletroforética próximas entre si.

Press et al. (14) mostraram através de estudos de cromatografia e eletroforese da cat D bovina, que esta enzima se apresenta sob várias formas de diferentes mobilidades eletroforéticas. Os dados atualmente obtidos sobre a cat D de coelho sugere que muito provavelmente, esta enzima também se apresenta formas moleculares diferentes.

Os soros de cobaias imunizadas com preparações da cat D purificada (100 U/mg prot.), quando examinados por diferentes métodos (ítem 2.2), mostraram que este soro é específico para a enzima. A especificidade do anti-soro foi demonstrada pela análise da difusão em gel de ágar contra extrato bruto do baço e outras preparações da cat D. Nesse tipo de análise, observou-se apenas uma linha de precipitação, na qual foi demonstrado a existência da atividade proteolítica. Algumas vezes foram demonstradas linhas duplas de precipitação, mas essas linhas foram observadas apenas na presença de altas concentrações de antígeno. Esse fenômeno, provavelmente, é o mesmo observado por Weston (30) e descrito por Burtin (1954) que demonstrou a existência de linhas duplas e até quatro linhas quando um excesso de antígeno era utilizado. Em nossas observações, quando as duas linhas da precipitação eram aparentes, ambas exibiam atividade proteolítica.

As experiências em meio líquido mostraram que o soro anti-cat D precipita quando misturado nas preparações de enzima eliminando totalmente a atividade proteolítica. O controle da reação utilizando um complexo Ag-Ac não

relacionado (gama globulina, anti-gama globulina) formado na presença de cat.D mostra que esta enzima não é adsorvida pelo complexo Ag-Ac nas condições da experiência.

Os dados obtidos com o soro anti-cat D, falam em favor de que as preparações de cat D, utilizadas na imunização contém um baixo teor de contaminantes eventualmente presentes.

O conjunto de dados apresentados no presente trabalho indica que se pode obter preparações da cat D purificada que permitam a obtenção de soros mono-específicos, tornando possível, desta maneira, o desenvolvimento de estudos sobre a presença desta enzima em diferentes células.

RESUMO

Os estudos apresentados nesse trabalho mostraram que:

1. A cat D, extraída a partir de baço de coelho, pode ser obtida em alto grau de pureza, utilizando-se as técnicas de precipitação ao ponto isoeletrico e cromatografia em celulose modificada.
2. A imunização de cobaias com a cat D purificada permitiu a obtenção de um soro monoespecifico anti-cat D de coelho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - Hedin, S.G. (1903). Investigations on the proteolytic enzymes of the spleen of the ox. J. Physiol., 30: 155.
- 2 - Willstätter, R. und Bamann, E. (1929). Über die proteasen der Magenschleimhaut. Erste abhandlung über die enzyme der leukocyten. Hoppe-seyl. Z., 180: 127.
- 3 - Bergmann, M. and Fruton, J.S. (1941). The specificity of proteinases. Advances in Enzymology, 1: 63.
- 4 - Tallan, H.H.; Jones, H.E. and Fruton, J.S. (1952). On the proteolytic enzymes of animal tissues.X. Beef spleen cathepsin C. J. Biol. Chem., 194: 793.
- 5 - Greenbaum, L.M. and Fruton, J.S. (1957). Purification and properties of beef spleen cathepsin B. J. Biol. Chem., 226: 173.
- 6 - Schales, O.S. and Hill, B.R. (1949). Inhibition of enzymatic proteolysis. Effect of carbonyl group reagents on the activity of kidney cathepsins. Arch. Biol. Biophys., 22: 366.
- 7 - Greenbaum, L.M.; Hirshkowitz, A. and Shoichet, I. (1959). The activation of trypsinogen by cathepsin B. J. Biol. Chem., 234: 2885.
- 8 - De La Haba, G.; Cammarata, P.S. and Timasheff, S.N. (1959). The partial purification and some physical properties of cathepsin C from beef spleen. J. Biol. Chem., 234: 316.
- 9 - Wiggans, D.S.; Winitz, M. and Fruton, J.S. (1954). Action of cathepsin C on dipeptide esters. Yale J. Biol. Med., 27: 11.

- 10 - Izumiya, N. and Fruton, J.S. (1965). Specificity of cathepsin C. Biol. Chem., 218: 59.
- 11 - Fruton, J.S. (1957). Enzymic hydrolysis and synthesis of peptide bonds. Harvey Lectures Ser., 51: 64.
- 12 - Anson, M.L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. J. Gen. Physiol., 22: 79.
- 13 - Anson, M.L. (1939). The purification of cathepsin. J. Gen. Physiol., 23: 695.
- 14 - Press, E.M., Porter, R.R. and Cebra, J. (1959). The isolation and properties of a proteolytic enzyme cathepsin D, from bovine spleen. Biol. J., 74: 501.
- 15 - Lapresle, C. (1955). Étude de la dégradation de la sérum albumine humaine par un extrait de rate de lapin.I. Conditions optimum d'activité et mode d'action des protéases de la rate du lapin. Bull. Soc. Chem. Biol., Paris, 37: 969.
- 16 - Lapresle, C. (1955). Étude de la dégradation de la sérum albumine humaine par un extrait de rate de lapin.II. Mise en evidence de trois groupements spécifiques différents dans le motif antigénique de l'albumine humaine et de trois anticorpos correspondants dans le sérum de lapin anti-albumine humaine. Ann. Inst. Pasteur, 89: 654.
- 17 - Lapresle, C. and Webb, T. (1960). Study of proteolytic enzyme from rabbit spleen. Biochem. J., 76: 538.
- 18 - Lapresle, C. and Webb, T. (1960). Action on some synthetic peptides of protease from rabbit spleen. Nature, 188: 66.

- 19 - Lapresle, C. and Webb, T. (1962). The purification and properties of a proteolytic enzyme, rabbit cathepsin E, and further studies on rabbit cathepsin D. *Biochem. J.*, 84: 455.
- 20 - Rangel, H. et Lapresle, C. (1966). Étude de la spécificité sur la chaîne B de l'insuline des cathepsines D et E de lapin. *Biochem. Biophys. Acta*, 128: 372.
- 21 - Rangel, H. (1968). Estudo comparativo da catepsina D de diferentes espécies animais. *Ciência e Cultura*, 20: 633.
- 22 - Kabat, E.A. and Mayer, M.M. (1970). Experimental Immunology. 2a. ed., Charles C. Thomas Publisher Springfield, Illinois, U.S.A.
- 23 - Weichselbaum, T.E. (1946). An accurate and rapid method for the determination of protein in small amount of blood serum and plasma. *Amer. J. Clin. Path. Tech.*, Suppl., 10: 40.
- 24 - Sober, H.A.; Gutter, F.J.; Wickof, M.M. and Peterson, E.A. (1956). Chromatography of proteins. Cellulose ion exchange adsorbents. *J. Am. Chem. Soc.*, 78: 751.
- 25 - Flodin, P. (1962). Dextran gels and their application in gel filtration, Uppsala.
- 26 - Ouchterlony, O. (1958). Diffusion-in-Gel Methods for immunological analysis. *Progress in Allergy*, 5: 1.
- 27 - Grabar, P. and Burtin, P. (1964). Imunoelektrophoretische Analyse. Elsevier, Amsterdam.
- 28 - Uriel, J., Webb, T. and Lapresle, C. (1960). Étude par électrophorèse en gélose des activités protéolytique et estérases d'un extrait de rate de lapin. Tome XIII, 11: 1285.

- 29 - Uriel, J. (1963). Characterization of enzymes in specific immune-precipitates. Ann. N. Y. Acad. Sci., 103: 956.
- 30 - Weston, P.D. (1969). A specific anti-serum to lysosomal cathepsin D. Immunol., 17: 421.
- 31 - Freund, J.; Thomson, K.J.; Hough, H.B.; Sommer, H.E. and Pisant, T.M. (1948). Antibody formation and sensitization with the aid of adjuvants. J. Immunol., 60: 383.
- 32 - Cohn, S. (1959). A simple method for the concentration of fluids containing proteins. Nature, 183: 1055.
- 33 - Pillemer, L. (1946). The solubility and precipitation of tetanal toxin and toxoid in methanol-water mixture under controlled conditions of pH, ionic strength and temperature. J. Immunol., 53: 237.
- 34 - Toledo, M.R.F.; Dawood, F.A.M.; e Rangel, H.A. (1972). Solubilidade da catepsina D de coelho em misturas água-acetona. Rev. Bras. Tecnol., 3: 161.
- 35 - Rangel, H.A.; Dawood, F.A.M. e Toledo, M.R.F. (1970). Heterogeneidade molecular da catepsina D de baço de coelho. XXII Reunião da S.B.P.C., Resumos, pp. 413.