

57
FAWZI A. M. DAWOOD

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA
CATEPSINA D DO BAÇO DE COELHO

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas-UNICAMP-como um dos
requisitos para obtenção do grau
de Doutor em Ciências.

ORIENTADOR

57
Prof.Dr.Humberto de Araújo Rangel

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Campinas - São Paulo
(1979)

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais Ahmed Dawood (in Memoriam)
e Hafiza Kandeel; ã Liana Dawood, minha
espõsa, e ao Tamer Fawzi Dawood, meu
filho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Humberto A. Rangel, pela valiosa orientação, incentivo constante e especial virtude de compreensão, a minha profunda gratidão.

Aos Drs. Walter A. Hadler e Sineli R. Silveira, pelo auxílio na técnica da revelação da reação de imunoperoxidase com a benzidina.

Ao Dr. Antonio C. Corsini, pelo auxílio no isolamento dos macrófagos alveolares.

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.

A Clara Eliza Clemente pela datilografia cuidadosa deste trabalho.

Agradecemos o auxílio prestado ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia pelas seguintes Instituições:

- Universidade Estadual de Campinas.
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.
- Conselho Nacional de Pesquisa.
- Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal do Ensino Superior.
- Organização Mundial de Saúde (Divisão de Imunologia).
- Biblioteca Regional de Medicina - São Paulo.

Í N D I C E

	PÁGINA
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1 - Reagentes	11
2.2 - Pó acetônico de baço de coelho	11
2.3 - Extração e purificação parcial da cat D	11
2.4 - Dosagem da cat D	12
2.5 - Determinação de proteínas	12
2.6 - Imune-soros	12
2.7 - Eletroforese em acetato-celulose	13
2.8 - Eletroforese em gel de agar	13
2.9 - Eletroforese em gel de amido	13
2.10 - Isoeletrofocalização	14
2.11 - Imunodifusão	14
2.12 - Cromatografia em DEAE-Celulose	15
2.13 - Cromatografia em sephadex	15
2.14 - Hidrólise da cadeia B da insulina com a cat D	15
2.15 - Purificação de IgG anti-cat D	15
2.16 - Reações com anticorpos marcados	16
2.16.1 - Reação de imunoperoxidase	16
2.16.2 - Reação de imunofluorescência	17
3 - RESULTADOS	18
3.1 - Purificação da cat D	18
3.2 - Caracterização da cat D purificada	22
3.3 - Localização da cat D no baço de coelho	27
3.3.1 - Purificação dos anticorpos anti-cat D	27
3.3.2 - Estudos citoquímicos	31
4 - DISCUSSÃO	36
5 - CONCLUSÕES	40
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

A B R E V I A T U R A S

- Ac : Anticorpo.
- Ag : Antígeno.
- BSA : Soro albumina bovina.
- CAT ou cat : Catepsina.
- CBZ-Glu-Phe : Carbobenzoxi-Glutamil-Fenilalanina.
- DIP : Diisopropil fluoro fosfato.
- EDTA : Etileno diamino tetra acetato.
- FITC : Isotiocianato de fluoresceína.
- HSA : Soro albumina humana.
- HGG : Gama globulina humana.
- KLH : Hemocianina "Keyhole Limpet".
- LE : Levan.
- PCMB : Para-cloro-metil benzoato.
- PMSF : Fenilmetanosulfonil fluoreto.
- Prot : Proteína.
- SBI : Inibidor de feijão de soja.
- SDS : Dodecil sulfato de sódio.
- SRBC : Hemácias de carneiro.
- TCA : Ácido tricloroacético.
- TSF : Toluenosulfonil fluorofosfato.

1 - INTRODUÇÃO

O extrato do baço possui atividade proteolítica, sobre a fibrina e soro normal em pH ácido e alcalino representada por beta e alfa proteases respectivamente, (Hedin, 1903). Além de baço, esta atividade foi demonstrada em vários órgãos como fígado, rim, útero, etc. e atribuída a ação de enzimas intracelulares que foram denominadas "Catepsinas" em razão da suposta relação com a decomposição cadavérica dos tecidos (Willstatter & Bamann, 1929).

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 (Bergman & Fruton, 1941). Ações hidrolíticas em pH ácido nos substratos sintéticos específicos de pepsina, tripsina, quimotripsina foram evidenciadas (Tallan et al, 1952), e foi possível caracterizar a existência de três catepsinas diferentes no extrato do baço bovino, respectivamente as catepsinas A, B e C ao lado de algumas peptidases: leucinoaminopeptidase, carboxipeptidase e tripeptidase (Tallan et al, 1952 e Greenbaum et al, 1957).

A catepsina A, é uma enzima termolábil que hidrolisa, a 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 (Tallan et al, 1952). Os trabalhos de Matsuda e Misaka (1974 e 1975) demonstraram a existência de formas múltiplas (isoenzimas) da catepsina A: AI, AII e AIII no fígado de rato, de pesos moleculares 100.000, 200.000 e 400.000; pH ótimo 5,6, 5,8 e 5,9; pontos isoelétricos 4,7, 4,8 e 4,9 e Km 10,0, 6,6 e 4,2 M, respectivamente, utilizando CBZ-Glu-Phe como substrato. Entretanto, esta catepsina é inibida por SBI, pepstatina, leupeptina e antipaina. Ag^+ , Au^{3+} , Hg^{2+} , iodo, DFP, PMSF, TSF e SDS não tem ação sobre a catepsina A. As formas múltiplas da enzima não apresentam diferenças frente a seus inibidores apesar de seus diferentes pesos moleculares. Imuno-análise das diferentes formas da enzima sugere que todas são formadas por subunidades imunologicamente idênticas, ligadas entre si por forças hidrofóbicas. Esta catepsina é estável entre pH 3,0 - 5,5 (Matsuda & Misaka, 1975), e completamente inativada em 22 h quando conservada em meios com pH acima de 7,5, mesmo a 7° C

(Bowen et al, 1973), o que explica os achados negativos de Press et al (1960) e Marks e Lajtha (1965), quando investigaram a presença desta enzima no baço e no cérebro.

Como a catepsina A hidrolisa os substratos sintéticos específicos da pepsina foi considerada por muito tempo semelhante a esta enzima, mas estudos recentes demonstraram sua maior semelhança com a carboxipeptidase do que com a pepsina. Esta catepsina é capaz de hidrolisar as ligações peptídicas formadas pelos 5 aminoácidos da extremidade C-terminal do glucagon (Iodice, 1967), da cadeia B da insulina e dipéptides cujos grupamentos amínicos estejam bloqueados, mas é incapaz de hidrolisar dipéptides e tripéptides com grupamentos amínicos livres (Taylor & Tappel, 1974). A presença desta enzima nos lisossomos foi evidenciada no rim, fígado e tireóide do rato (Shibco & Tappel, 1965; Coffey & DeDuve, 1968; Jablonsky & McQuillan, 1967), embora suas propriedades fisiológicas não estejam ainda bem esclarecidas.

O grande aumento da atividade de enzimas lisossômicas, especialmente das catepsinas A e D, foi evidenciado em casos patológicos como encefalite alérgica experimental e esclerose múltipla onde ocorre desmielinização por estas enzimas (Bowen & Davison, 1974; Boehme et al, 1974). O estudo da clivagem sequencial da proteína básica da mielina com estas enzimas demonstrou que a catepsina A, hidrolisa um fragmento liberado pela catepsina D desta proteína, o que sugere a relevância da clivagem por catepsinas ao mecanismo regulador de "turnover" das proteínas e nos processos que envolvem desmielinização como na encefalite alérgica experimental (Marks et al, 1976). O trabalho de Marks confirmou as observações de Iodice et al (1966) que detectaram um aumento das catepsinas A e D na distrofia muscular e admitiram que a catepsina A tem por função degradar péptides liberados pela ação da catepsina D ou por outras proteases.

A catepsina B, enzima termolábil capaz de hidrolisar em pH 5,6 a benzoil-L-argininamida, substrato sintético específico da tripsina, foi purificada do baço bovino (Greenbaum et al, 1957; Etherington, 1972; Otto & Riesen-kong, 1975), tireóide de carneiro (Suominen & Hopsu-Havu, 1971), fígado humano (Barrett, 1973), placenta humana (Swanson et al, 1974), fígado de coelho (Ogino & Nakashina, 1974) e pele de rato (Jarvinen & Hopsu-Havu, 1975). Esta enzima é ativada por compostos sulfidrílicos e EDTA, e inibida por diazometil

cetonas, inibidores da papaína (leupeptina e antipapaína), 4, cloromercúrio benzoato, alfa-2-macroglobina, metais pesados (HgCl_2), iodoacetamida (em concentração de 1×10^{-3} M) e pela fenilhidrazina e hidroxilamina. A ação destes dois últimos inibidores pode ser suprimida pela cisteína (Schales et al, 1949 ; Bayliss & Ali, 1978). O cianeto, DFP e SBI não tem ação sobre esta enzima. Recentemente, foi isolado um inibidor da catepsina B, de natureza polissacarídica de peso molecular 900, a partir de haptoglobina (Snellman & Sylven, 1974) e dois outros inibidores naturais de extrato do músculo, de pesos moleculares 12.500 e 62.000 (Schwartz & Bird, 1977).

Matsuda e Misaka (1974), demonstraram a existência no fígado de rato de duas formas (isoenzimas) da catepsina B: BI e BII, de pesos moleculares 25.000 e 50.000, respectivamente. A existência de duas formas já havia sido demonstrado por Otto (1971) trabalhando com baço bovino e diferentes tecidos de rato.

A especificidade da catepsina B, é semelhante à da tripsina, porém é mais restrita. Ambas as enzimas hidrolisam o benzoil-L-arginina-etil-éster e benzoil-L-lisinamida. Contudo, L-argininamida e L-arginina-etil-éster, hidrolisáveis pela tripsina, não são hidrolisados pela catepsina B (Schales et al, 1949), o que sugere que a acilação de alfa amino grupo é importante para a ação da catepsina B. Como a tripsina, a catepsina B promove a ativação de tripsinogênio (Greenbaun et al, 1959). Entretanto, catepsina B isolada da placenta humana, é capaz de hidrolisar a hemoglobina e mioglobina a pH 5,5 (Swanson et al, 1974).

Como a catepsina B hidrolisa os substratos sintéticos específicos da tripsina, foi considerada por muito tempo semelhante a esta enzima, mas estudos recentes demonstraram uma semelhança maior com a papaína do que com a tripsina, principalmente porque a enzima é inibida pelos mesmos inibidores da papaína: leupeptina e antipapaína (Evans & Etherington, 1978; Schwartz & Bird, 1977) e hidrolisa proteoglicanos de modo semelhante ao da papaína, liberando componentes que contêm apenas uma cadeia polissacarídica (Morrison et al, 1973).

A catepsina B, foi localizada em organelas lisossômicas e vacúolos fagocíticos das células fagocitárias do fígado, rim e epitélio intestinal de camundongo (Sylvén & Snellman, 1974).

A catepsina B bovina é capaz de hidrolisar, em pH 4,5 , 6,0 e 7,4 ,

a IgG humana com produção de fragmentos Fab e Fc, de peso molecular 50.000. A região de hinge é o principal ponto de ataque da enzima com produção de fragmentos tipo Fab₂, Fc₂ em pH 4,6 e fragmentos tipo Fab/c em pH 6,0 e pH 7,4 ao lado de alguns subfragmentos de Fc. Sob ação prolongada da enzima em pH 4,6, os fragmentos Fc e Fab são hidrolisados em péptidos solúveis em TCA (Menninger et al, 1976). Estes dados provavelmente esclarecem o encontro de fragmentos de IgG no plasma, na urina e nos fluídos sinoviais (Bienenstock, 1968; Fehr, 1972). Estudos comparativos sobre a especificidade das catepsinas B e D, demonstraram que a catepsina B é capaz de hidrolisar o colágeno insolúvel em pH 4,0 e o colágeno solúvel em pH entre 4,5 - 5,0, por um mecanismo diferente da collagenase neutra e que a catepsina B não tem ação sobre este substrato em pH 3,0 e sugeriram que a catepsina B tem papel relevante no mecanismo alternativo da degradação do colágeno, tanto em condições fisiológicas quanto em condições patológicas (Burleigh et al, 1974).

Os trabalhos de Schwartz e Bird (1977), demonstraram que as catepsinas B e D hidrolisam as proteínas miofibrilares; a miosina em pH 5,2 e 3,0, respectivamente, e F-actina é hidrolisada em pH 5,0 pelas duas enzimas. A análise dos produtos de degradação pelas duas enzimas, demonstrou que a atividade da catepsina D era muito maior que a da catepsina B sobre os mesmos substratos. O que sugere que as catepsinas B e D estejam envolvidas no "turnover" de proteínas miofibrilares (Dayton et al, 1976).

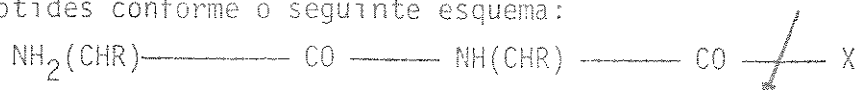
Trabalhos de Bayliss e Ali (1978), demonstraram na cartilagem osteoarterítica humana, maior atividade enzimática da catepsina B em relação da sua atividade em cartilagem normal, entretanto, a taxa desta enzima é maior em jovens e tende a declinar em adultos e indivíduos idosos.

A catepsina C, isolada do baço bovino (DeLaHaba et al, 1959; Planta et al, 1964; Metrione, 1966), do fígado de rato (McDonald et al, 1974; Matsuda et al, 1974) e do rim humano (Schaur et al, 1973), é uma enzima termo-estável (65°C, durante 40 minutos) que hidrolisa em pH 5,0 glicil-L-tirosina, substrato sintético específico da quimotripsina. Purificada cerca de 250 vezes (DeLaHaba et al, 1959) esta enzima, cujo peso molecular está em torno de 235.000, é ativada por compostos sulfrídricos e cianeto, sendo simplesmente inibida por iodoacetato e PCMB. O SBI e DFP não tem ação na ativação da catepsina C, que exige a presença de íons Cl⁻ (Gorer & Gruber, 1970).

Os trabalhos de Matsuda e Misaka (1974), demonstraram a existência

de formas múltiplas (isoenzimas) da catepsina C: CI, CII e CIII no fígado de rato, de peso molecular 150.000 ± 8.000 , que são antígenicamente muito próximas entre si.

Estudos sistemáticos de Wiggans et al (1954) e Izumiya et al (1965) sobre a especificidade desta enzima mostram que em pH 5,0 a catepsina C hidrolisa dipeptídeos conforme o seguinte esquema:



O grupamento CO---X pode ser uma amida ou um éster. A enzima age preferencialmente nos dipeptídeos em que o grupamento R é um resíduo de fenilalanina ou tirosina, assemelhando-se deste modo a 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 peptídeo. Admite-se por esta razão que a espinha dorsal do peptídeo sensível forme um hexágono, estericamente complementar ao sítio ativo da enzima (Izumiya et al, 1965; Fruton, 1957).

Os trabalhos de Fruton (1957) e Nilsson & Fruton (1964), demonstraram que a catepsina C é capaz de catalisar reações de transaminação. Por exemplo, em pH 7,0 o substrato L-alanil-L-fenilalaninamida é convertido em hexapeptídeoamida (Ala-Phe-Ala-Phe-Ala-Phe-NH₂) e em pH 5,0 o peptídeoamida é hidrolisado quantitativamente em alanilfenilalanina e amônia. Outros substratos (glicil-L-fenilalaninamida e glicil-L-triptofanamida) são polimerizados a pH 7,5 em octapeptídeoamida. Na presença de certos grupamentos amida (L-argininamida), a polimerização é inibida, formando-se apenas o tripeptídeo (glicil-L-fenilalanil-L-argininamida). Esses exemplos, mostram que a catepsina C é capaz de catalisar reações nas quais o grupamento dipeptídil é transformado num receptor que pode ser um grupamento amina não protonado ou água. Estes trabalhos levaram Metrione et al (1966) a descrever a catepsina C como dipeptídil transferase.

O trabalho de McDonald et al (1974), demonstrou que a catepsina C (dipeptídil aminopeptidase I), possui atividade angiotensinase no fígado pela sua capacidade de catalisar a remoção de dois dipeptídeos sucessivos a partir do grupamento NH₂-terminal de uma variedade de angiotensina II. Contudo, as catepsinas C e D hidrolisam a hemoglobina (Huang & Tappel, 1971). A análise da degradação da hemoglobina por estas enzimas, mostrou que os oligopeptídeos produzidos pela ação da catepsina D são hidrolisados por catepsina C em pequenos oligopeptídeos, dipeptídeos e aminoácidos livres.

A atividade proteolítica de extrato do baço também foi estudada por Anson (1938 e 1939) utilizando hemoglobina como substrato, evidenciando-se deste modo uma ação hidrolítica em pH 3,5. Anson denominou as enzimas responsáveis por essa ação "hemoglobin splitting enzymes".

Press et al (1960), isolaram uma enzima do baço bovino capaz de hidrolisar a hemoglobina 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 de baço, sobre a hemoglobina em pH 3,5, e se apresenta sob várias formas de diferentes mobilidades eletroforéticas.

Lapresle e Webb (1960 e 1962) isolaram de baço de coelho uma enzima capaz de hidrolisar em pH 3,5 HSA. As propriedades físico-químicas dessa enzima eram tão próximas da isolada do baço bovino que se justificou a aplicação da mesma designação a saber, catepsina D de coelho.

A catepsina D, é uma carboxilprotease (Barrett, 1975), cuja distribuição foi amplamente estudada numa grande variedade de tecidos animais, tais como, em bovinos: no baço (Press et al, 1960), músculo (Groninger, 1964), tireóide (Balasubramanian & Dias, 1965), útero (Woessner & Shamberger, 1971; Woessner, 1973) e pulmão (Rogas-Espinosa et al, 1973); em suínos: no baço (Cunningham & Tang, 1976) e tireóide (Kress et al, 1966); em coelho: no baço (Lapresle & Webb, 1960; Rangel, 1968; Dawood, 1973), fígado (Barret, 1967), cartilagem (Woessner, 1973) e pulmão (Rogas-Espinosa, 1973); em aves: no músculo (Iodice, 1966), cartilagem (Woessner, 1973) e fígado (Barrett, 1970); em cavalo no baço (Ducastaing et al, 1976); e no fígado humano (Barrett, 1970). A catepsina D do fígado de galinha, foi cristalizada por Kasakova e Orekhovich (1976).

Estudos sobre a especificidade da catepsina D demonstraram que esta enzima tem uma ação fraca ou nula sobre pequenos peptídeos e uma ação pronunciada sobre substratos protéicos de alto peso molecular, como BSA, HSA e hemoglobina (revisão de Barrett, 1972a). A comparação da catepsina D com a pepsina e uma protease ácida de Rhizopus chinensis, mostrou que a catepsina requer para sua ação, substratos de maior peso molecular do que os exigidos pela pepsina (Ferguson et al, 1973; Sampath-Kumar & Fruton, 1974).

Semelhantemente às endopeptidases (pepsina, quimosina e renina) que dependem do grupamento carboxila, a catepsina D é inibida por uma variedade de compostos que reagem covalentemente com o grupamento carboxila; por exemplo: diazoacetil-

norleucina metil éster na presença de Cu^{2+} (Takahashi et al, 1972) e 1,2-epoxi-3-(4-nitrofenoxi)propano (Tang, 1971). Outros dois inibidores naturais, foram relatados a saber, inibidor da pepsina de Ascaris lumbricoides (Abu-Erreish & Peanasky, 1974), que não inibe a catepsina D (Keilová & Tomasek, 1972) e pepstatina (ácido isovaleril-L-valil-4-amino-3-hidro-6-metilheptanoil-L-alanil-4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico), obtida de filtrados de culturas de Streptomyces (Umezawa, 1972), que inibe a pepsina com constantes de dissociação em torno de 10^{-10} M em pH 4,0 (Kunimoto et al, 1974) e a catepsina D com constante de dissociação em torno de 5×10^{-10} M em pH 3,5 (Knight & Barrett, 1976). Entretanto, a inibição da catepsina D com pepstatina é dependente do pH e a constante de dissociação aumenta de 5×10^{-10} M para 2×10^{-10} M com aumento de pH de 5,0 para 6,4 (Knight & Barrett, 1976).

Muitos estudos, demonstraram a existência de isoenzimas da catepsina D em vários tecidos animais (Press et al, 1960; Barrett, 1970; Sapolsky & Woessner, 1972), o que dificultou a compreensão do papel fisiológico desta enzima.

Curiosamente, Yago e Bowers (1975), detectaram dois tipos novos de catepsina D em linfócitos de ducto torácico, baço, timo, linfonodos de rato e no baço de camundongo, que foram denominadas catepsinas H e L, de acordo com seus pesos moleculares de 95.000 e 45.000 respectivamente. Estas duas enzimas não foram encontradas em outros tecidos tais como fígado, rim e adrenal de rato; baço e fígado de coelho; baço e timo de bezerro ou nas amídalas do homem. Não foram encontradas diferenças entre H e L, seja do ponto de vista antigênico ou de ponto de vista de inibição por pepstatina. O tipo H pode ser convertido no tipo L pelo tratamento com mercaptoetanol, sem nenhuma ^{Perda} de sua atividade enzimática, o que sugere que a catepsina H é formada por duas unidades L ligadas entre si por pontes disulfeto. A comparação das catepsinas H e L com a catepsina D, mostrou a existência de algumas diferenças. Não são inibidas com antisoros anti-catepsina D, tem uma atividade proteolítica cinco vezes maior frente a hemoglobina e são mais sensíveis a inibição por pepstatina.

Estudos da distribuição subcelular das enzimas H e L após a ultracentrifugação realizados anteriormente por Bowers (1972) e Bowers et al (1973), demonstraram que estas enzimas são diferentes das outras enzimas lisossômicas e não correspondem às catepsinas A, B e C. Estes autores concluíram que as proteases H e L, não correspondem às catepsinas bem conhecidas A, B, C e E.

O trabalho de Moryama e Takahashi (1978), mostrou no pulmão de maca

co japonês (*Macaca Fuscata Fuscata*) a existência de dois tipos de catepsina D, um tipo denominado DI, correspondente a catepsina D comumente encontrada em vários tecidos e o segundo tipo denominado DII, que só foi encontrado no pulmão deste animal e que apresenta composição de aminoácidos diferente da da catepsina D.

O papel da catepsina D é ainda desconhecido, embora muitos trabalhos sugiram a sua participação no catabolismo das proteínas porquanto há um aumento da atividade desta enzima em processos patológicos envolvendo degeneração tecidual como por exemplo na osteoartrite (Woessner, 1967; Weston, 1969; Fehr et al, 1976), na distrofia muscular (Iodice, 1976), na artrite reumatóide (Artmann et al, 1977) e na isquemia do miocárdio (Decker et al, 1977; Araki & Takenaka, 1975). Por outro lado, Reich et al (1965) demonstraram uma significativa relação entre o aumento das catepsinas no soro e a mortalidade por choque hemorrágico e evidenciaram a proteção de coelhos sujeitos a choque hemorrágico experimental após o tratamento com antisoro anti-catepsina D.

A catepsina E, uma carboxilprotease, foi isolada da medula óssea de coelho (Laprele, 1971), e provavelmente ocorre nos grânulos de neutrófilos, plaquetas ou ambos (Barrett, 1975). Esta enzima é capaz de hidrolisar HSA, BSA e hemoglobina em pH 2,5, mais ativa na medula óssea do que no baço, e de peso molecular 100.000 estimado em sephadex (Lapresle, 1962).

Ghetie e Mihaescu (1972), demonstraram que a catepsina E da medula óssea de coelho é capaz de hidrolisar em pH 2,5 a IgG do coelho produzindo fragmentos tipo $F(a\bar{b})_2$ que é mais resistente a ação prolongada da enzima, e um outro fragmento $F\bar{c}$ que pode ser hidrolisado em fragmentos menores pela ação prolongada da enzima.

A destruição de proteoglicânio de cartilagem articular na artrite, foi reconhecida como um fator importante na perda irreversível da função das juntas e atribuída a ação de várias enzimas proteolíticas. A idéia de que as catepsinas tem participação especial neste processo, foi aceita por muitos pesquisadores (Dingle, 1962; Barrett, 1975). Dingle et al (1977), detectaram atividade proteolítica na cartilagem de orelha do coelho sobre o proteoglicânio em pH 4,5, que foi anteriormente descrita por Barrett (1975), e como esta atividade não é inibida por pepstatina; inibidor da catepsina D, estes autores denominaram a enzima responsável pela hidrólise de

proteoglicânio em pH 4,5 como catepsina F. Esta enzima é completamente inibida por alfa-2-macroglobina; inibidor específico das endopeptidases. Os estudos realizados sobre esta enzima ainda são insuficientes para justificar a sua nova denominação.

Catepsina G, uma serinaprotease (Barrett, 1975), que foi detectada em grânulos de neutrófilos humanos (Rindler & Braunsteiner, 1973). Starkey e Barrett (1976), isolaram a catepsina G do baço humano e demonstraram a sua capacidade de hidrolisar alguns substratos sintéticos hidrolisáveis pela quimotripsina, mas com constantes cinéticas diferentes. A atividade máxima da catepsina G sobre benzoil-DL-Phe-2-naftol éster e azo-caseína está em torno de pH 7,5 - 8,0. Embora esta enzima possua características de um serinaprotease, apresenta-se menos sensível a inibição por clorometil cetona de tosilfenilalanina do que a quimotripsina. A catepsina G mostrou-se antigenicamente idêntica às enzimas quimotrípticas dos grânulos azurofílicos dos neutrófilos.

Blow e Barrett (1977), estudaram a ação da catepsina G isolada dos neutrófilos humanos sobre a cadeia B da insulina e demonstraram a hidrólise das ligações Phe.24-Phe.25, Leu.15-Tyr.16 e Tyr.16-Leu.17. Outras ligações hidrolisáveis pela enzima são: Leu.6-Cys.(O₃H).7, Leu.11-Val.12, Leu.17-Tyr.18 e Phe.25-Tyr.26. Tais dados sugerem que a catepsina G é mais semelhante a quimotripsina C de porco do que a quimotripsina A de boi.

O conjunto de dados existentes na literatura, sugere fortemente que essas catepsinas estão envolvidas no catabolismo das proteínas e muito provavelmente dos antígenos proteicos.

O baço, principal órgão linfóide, que retem uma ponderável parcela dos antígenos introduzidos na circulação, é rico em catepsina D. Essa enzima tem sido encontrada em macrófagos alveolares de coelho (Dingle et al, 1973), e a importância dos macrófagos na indução da resposta imune tem sido acentuada (Askonas et al, 1965, 1968 e 1971; Unanue, 1970). Contudo, o papel que essas células desempenham no mecanismo da resposta imune não está esclarecido. É possível que elas desempenhem importante papel na degradação dos antígenos proteicos através da ação da catepsina D, a endopeptidase que se acha em maior concentração no baço (Press et al, 1960). Esta hipótese merece investigação. Porém, essa investigação só será possível quando a catepsina D tiver sido caracterizada e as células que a sintetizam sejam determinadas no baço.

A catepsina D do baço de boi, foi purificada e caracterizada por Press et al (1960). Mas a enzima homóloga do baço de animais de laboratório (coelho, cobaia e camundongo) não foi caracterizada. A catepsina D de coelho foi purificada por Lapresle e Webb (1960), que obtiveram preparações com atividade específica de 55 U/mg proteína. A enzima assim purificada, testada sobre a cadeia B da insulina, mostrou uma especificidade diferente da de boi (Rangel & Lapresle, 1966), sugerindo desse modo que as catepsinas D de diferentes espécies possuem diferentes especificidades.

O presente trabalho, foi realizado com objetivo de purificar e caracterizar a cat D do baço de coelho, e para determinar as células que sintetizam no baço, a fim de se poder relatar uma posterior investigação sobre o possível papel desta enzima na resposta imune.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - 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 de uso.

2.2 - PÓ ACETÔNICO DE BAÇO DE COELHO.

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 100g e conservados a -20°C até o momento de uso. Cada porção, foi homogeneizada em liquidificador em presença de um litro de acetona, a -20°C . A mistura, filtrada em placa porosa, foi sucessivamente suspensa e lavada, a -20°C , com um litro de acetona, um litro de mistura em partes iguais de éter e acetona e dois 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.

2.3 - EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DA CAT D.

A cat D de baço de coelho foi obtida segundo o método original de Toledo et al (1972) e Dawood (1973) com estas modificações: 96g de pó acetônico foram suspensas em 3200 ml de NaCl 0,15 M e mantidos a 0°C durante 18 horas. Essa suspensão foi centrifugada a $4800 \times g$, 20 minutos a 5°C e filtrada em papel de filtro (Extrato bruto). O filtrado foi ajustado a pH 4,5, adicionando HCl 0,1 N gota a gota a 4°C , e o material inativo precipitado foi eliminado por centrifugação. O sobrenadante obtido, ajustado a pH 5,0 com NaOH 0,1 N, foi precipitado a 33% de acetona a -20°C para eliminar o material inativo separado por centrifugação. O sobrenadante tratado novamente com acetona até 66% foi mantido a -20°C por 18 h e o precipitado separado por centrifugação. O pre-

precipitado contendo o material ativo, suspenso em tampão fosfato 0,1 M pH 8,0, foi dialisado durante a noite a 4°C contra o mesmo tampão. O material que permaneceu insolúvel após a diálise foi eliminado por centrifugação a 12100 x g, 20 minutos, a 4°C e o sobrenadante claro obtido, dialisado contra água destilada por 5 h, foi congelado em nitrogênio líquido e em seguida liofilizado e guardado na geladeira até o momento de uso.

2.4 - DOSAGEM DA CAT D

A cat D foi dosada segundo método de Lapresle (1960), modificado, utilizando-se hemoglobina 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 de Lapresle (1960) e Rangel & Lapresle (1966).

2.5 - DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Micro Kjeldahl (Kabat & Mayer, 1971), ou a reação do Biureto, segundo método de Weichselbaum (1946).

2.6 - IMUNE-SORO.

ANTI-CAT D: preparações da cat D, cuja atividade específica é de 130 U/mg prot, purificada conforme trabalho de Dawood (1973), sem modificações, foi utilizada na preparação deste antisoro. Quantidades iguais da cat D e adjuvante completo de Freund seguindo instruções de Freund et al (1948), foram emulsionadas de modo a conter 1 mg/ml de prot. Quantidade de 1 ml foi inoculada subcutaneamente num carneiro adulto de 6 meses de idade. Trinta dias após a primeira dose, o animal foi inoculado por via intramuscular com 1 ml da cat D em salina contendo 1 mg de prot/ml. Essa dose foi repetida nos dias: 30, 60, 67 e 74. Como o animal não mostrava um título alto de anticorpos precipitantes, a dose foi aumentada a 2 mg/ml no dia 81 e 5 mg/ml nos dias: 88, 95, 102 e 109 e, 10 mg/ml no dia 116. Uma semana depois o animal mostrou um título de anticorpos séricos de 1/64, testado pela técnica de dupladifusão com 100 e 500 µg de antígeno/ml. O animal foi sangrado, 400 ml, por via venosa e o soro, separado e conservado a -20°C até o momento de uso.

2.7 - ELETROFORESE EM ACETATO-CELULOSE.

As experiências de eletroforese em acetato-celulose foram realizadas segundo instruções descritas por Kabat et al (1971), em aparelho Boskamp Gerartbau, KG, utilizando tampão veronal sódico 0,05 M pH 8,5 e uma corrente de 2 mA/fita durante 45 minutos (algumas fitas foram utilizadas para detecção da atividade enzimática). As proteínas coradas pelo amido Schwartz, e as membranas diafanizadas pelo tratamento com dioxana, foram adaptadas ao densitômetro a fim de construir o perfil da eletroforese e calcular a concentração relativa das proteínas.

As experiências de detecção de atividade enzimática foram realizadas segundo método de Uriel et al (1960), modificado por nós. Lâminas de agar, preparadas do mesmo modo para eletroforese, foram imersas em tampão formiato de sódio 0,25 M, pH 3,3, a 4°C, durante 16 h e em seguida numa solução de 0,5% hemoglobina no mesmo tampão, à temperatura ambiente durante 30 minutos. Essas lâminas eram chamadas de placas de substrato. BSA e HSA também foram utilizadas, para preparar placas de substrato, mas em pH 3,5.

As membranas de acetato-celulose, não coradas após eletroforese nas condições acima descritas, colocadas em contato com as placas de substrato (HSA ou BSA), foram incubadas juntas por tempo variável a 37°C. As membranas de acetato-celulose eram desprezadas e as placas de substrato, fixadas por 2 h em etanol-água-ácido acético (50:45:5 v/v/v), eram coradas pelo amido Schwartz.

2.8 - ELETROFORESE EM GEL DE AGAR.

As experiências de eletroforese em gel de agar foram realizadas, conforme indicações de Grabar e Burtin (1964), em placas de vidro 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 um potencial de 4 volts/cm, durante 1 h e 20 minutos.

2.9 - ELETROFORESE EM GEL DE AMIDO.

Essas experiências foram realizadas conforme descrito por Poulik (1968) e Press et al (1960). Quantidade de 0,02 ml da cat D, de 315 U/mg prot e 13.500 U/ml, embebida em disco de papel Whattman nº 3 (0,5 x 1,0 cm), foi colocada numa fenda do mesmo tamanho do disco próxima ao polo negativo. Um potencial de 5 volts/cm foi aplicado numa placa de gel 0,6 x 20 x 6 cm, durante 7 h. Tampões tris em pH 8,5 de 35 e 105 mM foram utilizados na preparação de gel e na cuba respectivamente. Soro normal de coelho ou de carneiro foram utilizados como controle, nas mesmas condições e o gel foi corado pelo amido

Schwartz.

2.10 - ISOELETROFOCALIZAÇÃO.

PREPARATIVA: as experiências de isoeletrofocalização preparativa foram realizadas, em coluna de amfólitos LKB (LKB-Produkter AB S-16125 Bromma 1 Sweden), seguindo instruções descritas por Vesterberg et al (1971). Quantidade de 40 mg da cat D (315 U/mg prot.) foi dissolvida em 120 ml de água, contendo 1,5 g (3,7 ml) de amfólitos nos limites de pH 3 - 10 e 56 g de sacarose. Uma solução leve, também de 120 ml de água contendo 0,05 g (1,5 ml) de amfólitos com os mesmos limites de pH, foi preparada. As duas soluções foram colocadas separadamente em cilindros de um misturador de gradiente LKB, e o cilindro contendo a solução densa foi conectado na coluna através de um tubo capilar. Após a aplicação da mistura na coluna a 4°C, uma fonte elétrica que fornece 1200 volts foi ligada a coluna. Após a estabilização da corrente elétrica (de 10 mA a 2 mA), um potencial de 700 volts foi aplicado na coluna durante 24 h, a 4°C. Com auxílio de coletor de frações LKB, amostras de 1 ml foram coletadas e as leituras de pH e da absorbância a 280 nm foram efetuadas.

ANALÍTICA: as experiências de isoeletrofocalização analítica foram realizadas a 4°C em camada delgada de gel de poliacrilamida, obtida de BDH Chemicals Ltd, Poole, Dorset, England, conforme descrito por Awdeh et al (1968). Amfólitos LKB, nos limites de pH 5 a 8, foram utilizados na preparação de gel em placas de vidro 12 x 12 cm siliconizadas e persulfato de amônio em concentração final de 0,66 mg/ml para polimerizar o gel. Amostras da cat D de 0,01 e 0,005 ml, de 315 U/mg prot e 13.500 U/ml, foram aplicadas em discos de papel Whattman nº 3 (0,5 x 0,5 cm) e colocadas na superfície do gel, próximas ao polo positivo. Dois bastões de carbono previamente mergulhados por 2 h em ácido fosfórico a 5% e trietanolamina a 5%, foram colocados na superfície do gel nas extremidades da placa e conectadas ao polo positivo e negativo respectivamente de uma fonte elétrica LKB que fornece 600 volts. Após a estabilização da corrente elétrica (de 10 mA a 2 mA), um potencial de 200 volts foi aplicado por 18 h, a 4°C. Amostras do gel (1 x 1 cm) foram cortadas e eluídas em água para medir o pH, e as proteínas precipitadas em TCA 25% durante 18 h, foram coradas pelo amido Schwartz.

2.11 - IMUNODIFUSÃO.

DUPLADIFUSÃO: foi realizada segundo método de Ouchterlony

(1958).

IMUNOELETROFORESE: foi realizada segundo método de Grabar e Burtin (1964), nas mesmas condições de eletroforese em gel de agar anteriormente descritas. As experiências de detecção de atividade enzimática nos imunocomplexos foram realizadas seguindo o método de Uriel (1963), modificado por Weston (1969).

2.12 - CROMATOGRAFIA EM DEAE-CELULOSE.

As cromatografias em DEAE-Celulose (de Bio. Rad. Laboratories - 329, Griffin, Calif. U.S.A.), foram realizadas conforme descrito por Sober et al (1956).

2.13 - CROMATOGRAFIA EM SEPHADEX.

As indicações de Flodin (1962) foram seguidas na realização das experiências em sephadex G-100 ou G-200, obtidos de Pharmacia, Upsala, Sweden.

2.14 - HIDRÓLISE DA CADEIA B DA INSULINA COM A CAT D.

A cadeia B da insulina e a revelação dos produtos da degradação foram realizadas conforme descrito por Rangel e Lapresle (1966). Cinco miligramas da cadeia B da insulina bovina oxidada, obtida de chez Mann Research Laboratories, New York, USA e 0,05 mg da cat D, contendo 10 a 15 U, foram utilizadas em cada experiência. Este material foi dissolvido em ácido acético 0,04 M, de modo a obter um pH final de 3,5 e a solução incubada a 37°C durante 24 h e depois liofilizada.

Para identificar os produtos da degradação, a cromatoeletroforese de 1 mg de hidrolisado enzimático da cadeia B da insulina foi efetuada nas seguintes condições: papel Whattman nº 3, tampão piridina-ácido acético-água (10 : 0,4 : 90 v/v/v), pH 6,5, 40 volts/cm durante 2 h. O papel depois de seco numa estufa a 40°C, foi submetido à cromatografia descendente numa posição perpendicular à da eletroforese, utilizando como solvente butano-ácido acético-água (4 : 1 : 5 v/v/v). Os produtos da degradação foram corados com ninhidrina (0,25 g% em acetona).

2.15 - PURIFICAÇÃO DE IgG ANTI-CAT D.

O imunoadsorvente de soro normal de coelho foi preparado pelo

método de Avrameas e Ternynck (1969). Uma quantidade de 50 ml de soro de coelho anti-cat D de coelho foi precipitada a 50% de sulfato de amônio (Kabat & Mayer, 1971), e a fração globulina dialisada contra solução fisiológica até o teste de Nessler negativo. Quantidade de 15 ml das imunoglobulinas assim preparadas, contendo 35 mg de prot/ml, foi misturada com o imunoadsorvente anteriormente preparado sob agitação magnética, durante 1 h, a temperatura ambiente e as imunoglobulinas anti-cat D, foram separadas por centrifugação. Este material, testado por eletroforese e imunoeletroforese, foi cromatografado em sephadex G-200 de modo a isolar a fração 7S.

2.16 - REAÇÕES COM ANTICORPOS MARCADOS.

A conjugação de IgG anti-cat D com fluoresceína e com peroxidase foi realizada conforme descrito por The & Feltkamp (1970) e Avrameas & Ternynck (1971) respectivamente. Macrófagos alveolares isolados de coelho normal, conforme descrito por Dingle et al (1973), e cortes do baço de coelho de 4 - 5 u de espessura preparados em criostato, foram usados nas experiências das reações com anticorpos marcados, conforme descrito a seguir:

2.16.1 - REAÇÃO DE IMUNOPEROXIDASE

Macrófagos alveolares ou cortes do baço preparados em lâminas de vidro, foram fixados em formaldeído durante 30 minutos e incubados com o conjugado (imunoperoxidase) diluído 1:20 durante 3 h, a temperatura ambiente, conforme trabalho de Avrameas e Ternynck (1971). Lâminas controle foram incubadas do mesmo modo com o conjugado, após a incubação prévia com IgG anti-cat D durante 1 h ou apenas uma incubação com o conjugado absorvido com a cat D. Todas as lâminas foram lavadas três vezes em salina fosfatada pH 7,4 durante 5 minutos. Essas reações foram reveladas com diaminobenzidina (coloração marron) ou com benzidina (coloração azul).

A revelação com diaminobenzidina, foi realizada, recobrimdo as lâminas durante 10 minutos com mistura contendo 10 ml de tampão tris-HCl 0,1 M pH 7,6 ; 0,5 mg de diaminobenzidina e 10 ul de H_2O_2 a 30% e em seguida lavando-as com água.

A revelação com benzidina foi realizada, seguindo instruções descritas por Silveira (1978), recobrimdo as lâminas durante 10 - 15 seg com sulfato de amônio a 20% e em seguida durante 10 - 15 seg com uma mistura de volumes iguais de 1,4 % benzidina (recentemente dissolvida em etanol absoluto) e H_2O_2 $3,5 \times 10^{-3}$ M em salina fosfatada. Após o escoamento da mistura, as lâminas foram lavadas com etanol a 95%, e secadas ao ar e montadas em bálsamo de Canadá.

2.16.2 - REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os macrófagos preparados em lâminas de vidro foram incubados com o conjugado de IgG-anti-cat D-FITC a 37°C, durante 1 h em câmara úmida. As lâminas, lavadas em salina fosfatada pH 7,4 durante 2 h, trocando esta solução cada 30 minutos, foram montadas em glicerina tamponada a pH 8,6 com tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,5 M. Os controles desta reação foram preparados de modo semelhante aos controles da reação da imunoperoxidase.

3 - RESULTADOS

3.1 - PURIFICAÇÃO DA CAT D.

Os resultados obtidos durante a extração da cat D, a partir de pó acetônico de baço de coelho, acham-se exemplificados na tabela 1, onde se pode verificar que o método empregado permite obter 76% da atividade proteolítica inicial com atividade específica em torno de 34 U/mg prot.

As 4 partidas desse material, parcialmente purificado, foram liofilizadas e conservadas a 4°C até serem cromatografadas.

Tab. 1 - Extração e purificação parcial da cat D, pelo método de Dawood (1973).

Exp. nº	Atividade enzimática do extrato bruto.		Atividade enzimática após a purificação.	
	U.T	A.E	U.T	A.E
1	205	13	150	37
2	200	11	158	34
3	208	14	148	35
4	210	12	167	37

U.T, número total de unidades x 1000.

A.E, atividade específica (U/mg prot).

Cada partida do material obtido nessas experiências, dissolvida em tampão fosfato de potássio 0,05 M pH 8,0 e dialisada a 4°C contra mesmo tampão durante 18 h, foi cromatografada em coluna de DEAE-Celulose (5,5 x 50 cm) equilibrada com mesmo tampão. Um volume de 50 ml, contendo 250 - 260 mg de prot/ml, foi colocado na coluna. A cat D foi eluída com o tampão de equilíbrio e as proteínas que permaneceram adsorvidas na coluna foram eluídas utilizando uma mistura de NaCl 0,5 M e KH_2PO_4 0,5 M (v/v). Utilizou-se um fluxo constante de 20 ml/h durante a eluição. Amostras de 10 ml foram coletadas.

Nessas condições, foram obtidas duas frações (Figura 1). A primeira fração (F1)

representa em média 55% da atividade enzimática inicial com atividade específica de 75,2 U/mg proteína (tabela 2).

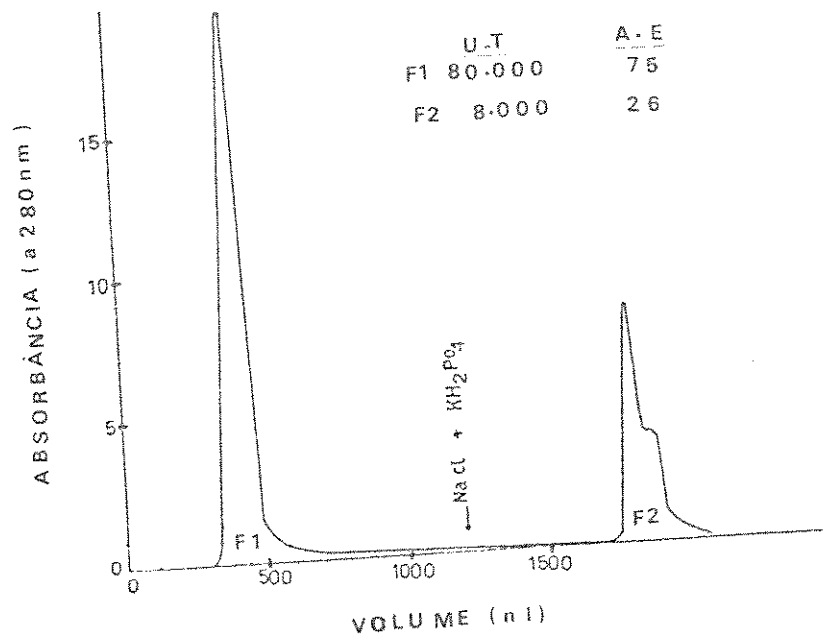


Fig. 1 - Cromatografia em DEAE-Celulose, e eluição da cat D com tampão fosfato 0,05 M pH 8,0.

Tab. 2 - Resultados da cromatografia da cat D em DEAE-Celulose equilibrada com tampão fosfato 0,05 M pH 8,0.

Exp. nº	Atividade enzimática antes da cromatografia.		Atividade enzimática após a cromatografia.			
			F1		F2	
	U.T.	A.E.	U.T.	A.E.	U.T.	A.E.
1	146	38	80	75	8	26
2	152	36	81	78	9	26
3	139	37	75	73	11	23
4	152	39	85	75	8	28

U.T, número total de unidades x 1000.
A.E, atividade específica (U/mg prot).

As frações F1 assim obtidas foram dialisadas contra água, durante 5 h, liofilizadas e conservadas até serem filtradas em sephadex G-100.

Quantidades variáveis desta fração (F1), dissolvidas em 5 ml de tampão fosfato 0,03 M pH 8,0, foram cromatografadas em coluna de sephadex (3 x 60 cm), equilibrada com mesmo tampão. Com um fluxo constante de 15 ml/h, foram coletadas amostras de 5 ml.

Quatro diferentes frações foram coletadas nessas experiências (figura 2). A segunda fração (FS2) continha em média 85% da atividade enzimática inicial com atividade específica de 255 U/mg prot (tabela 3).

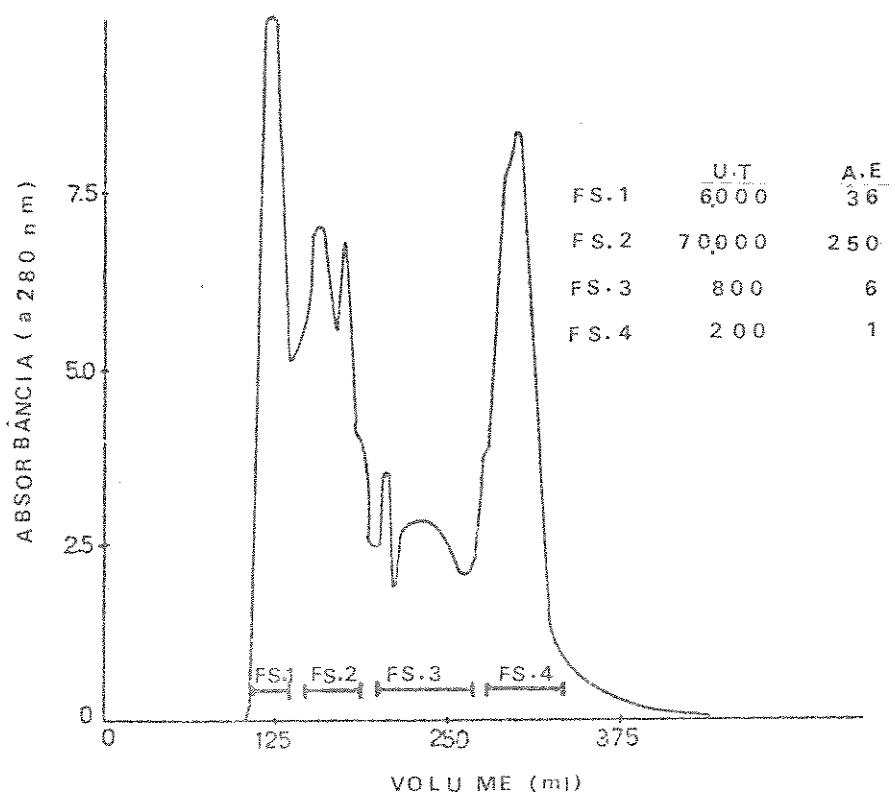


Fig. 2 - Cromatografia de filtração em sephadex G-100.

Tab. 3 - Cat D purificada por filtração em sephadex G-100.

Exp. nº	Atividade enzimática antes da cromatografia .		Atividade enzimática após a cromatografia.							
			FS.1		FS.2		FS.3		FS.4	
	U.T	A.E	U.T	A.E	U.T	A.E	U.T	A.E	U.T	A.E
1	37	70	6	38	29	250	0,7	5	0,5	6,0
2	72	85	6	36	70	250	0,8	6	0,2	1,0
3	184	85	11	39	152	285	0,8	2	0,3	0,5

U.T, número total de unidades x 1000.

A.E, atividade específica (U/mg prot).

A fração FS.2, após concentração por liofilização, foi cromatografada em DEAE-Celulose (coluna de 3 x 60 cm) equilibrada com tampão fosfato 0,03 M pH 8,0. A eluição com mesmo tampão, com um fluxo de 20 ml/h, permitiu a separação de 3 frações (figura 3). A segunda fração (FS.2.2) contém cerca de 95% de atividade enzimática inicial com atividade específica de 310 - 315 U/mg prot (tabela 4).

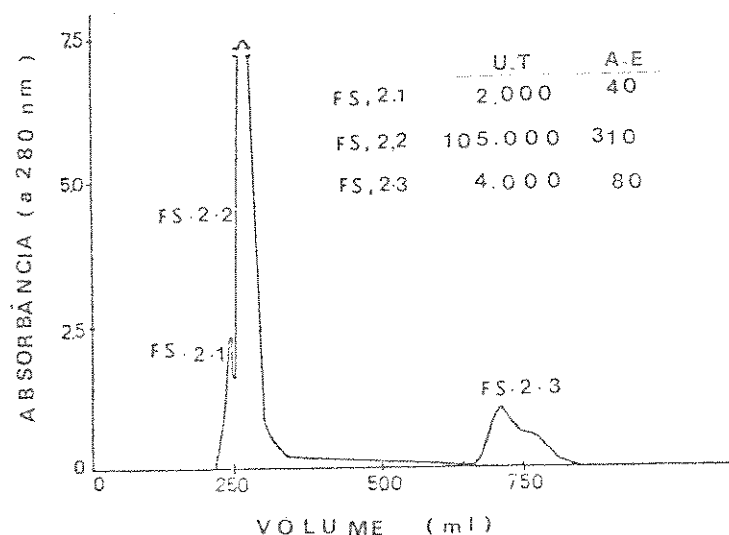


Fig. 3 - Cromatografia da fração (FS.2) em DEAE-Celulose, equilibrada com tampão fosfato 0,03 M pH 8,0.

Tab. 4 - Cat D purificada em DEAE-Celulose, equilibrada com tampão fosfato 0,03 M pH 8,0.

Exp. nº	Atividade enzimática antes da cromatografia .		Atividade enzimática após a cromatografia.					
			FS.2.1		FS.2.2		FS.2.3	
	U.T	A.E	U.T	A.E	U.T	A.E	U.T	A.E
1	116	250	2,0	45	105	310	4,0	80
2	149	285	2,8	38	140	315	2,5	60

U.T, número total de unidades x 1000.

A.E, atividade específica (U/mg prot).

3.2 - CARACTERIZAÇÃO DA CAT D PURIFICADA

A cat D purificada (FS.2.2), tendo atividade específica de 315 U/mg prot, foi submetida a análise eletroforética em acetato-celulose e detecção da atividade enzimática em lâminas de substrato (BSA e HSA), conforme descrito em material e métodos.

A enzima, assim testada, apresentou um perfil de eletroforese (figura 4) que sugere a presença de pelo menos 5 componentes. No entanto, as experiências de detecção da atividade enzimática, após eletroforese e incubação por diferentes períodos de tempo com BSA ou HSA, demonstrou a presença de uma única enzima (figura 5). A cat D purificada, apresentou apenas um arco de precipitação, quando foi examinada por imuno-eletroforese simples ou cruzada, utilizando-se imunesoros preparados contra frações parcialmente purificadas da enzima.

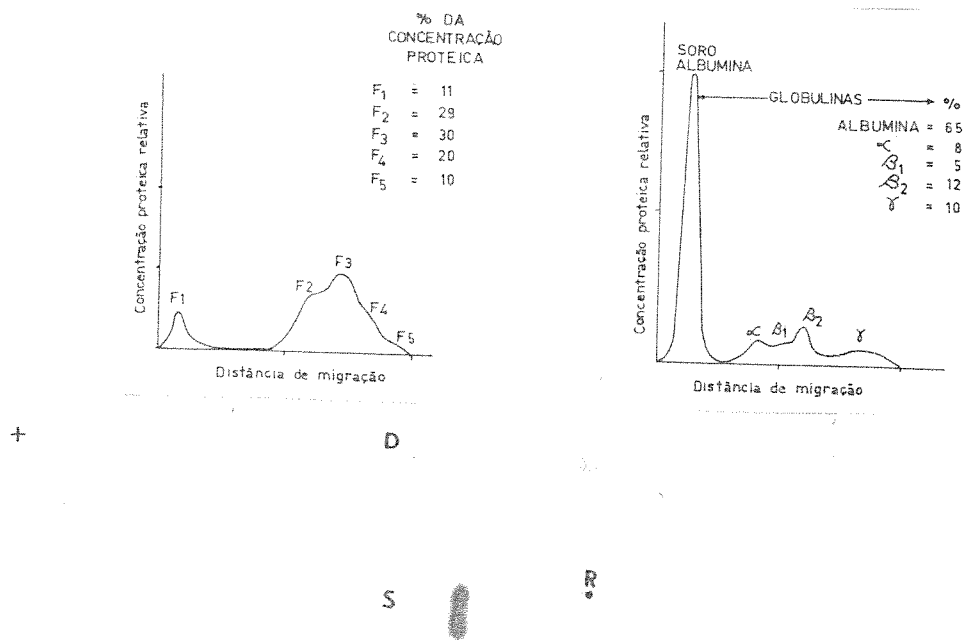


Fig. 4 - Eletroforese da cat D (D) e sôro normal de coelho (S) em acetato-celulose (2 mA/fita, 45 min.).

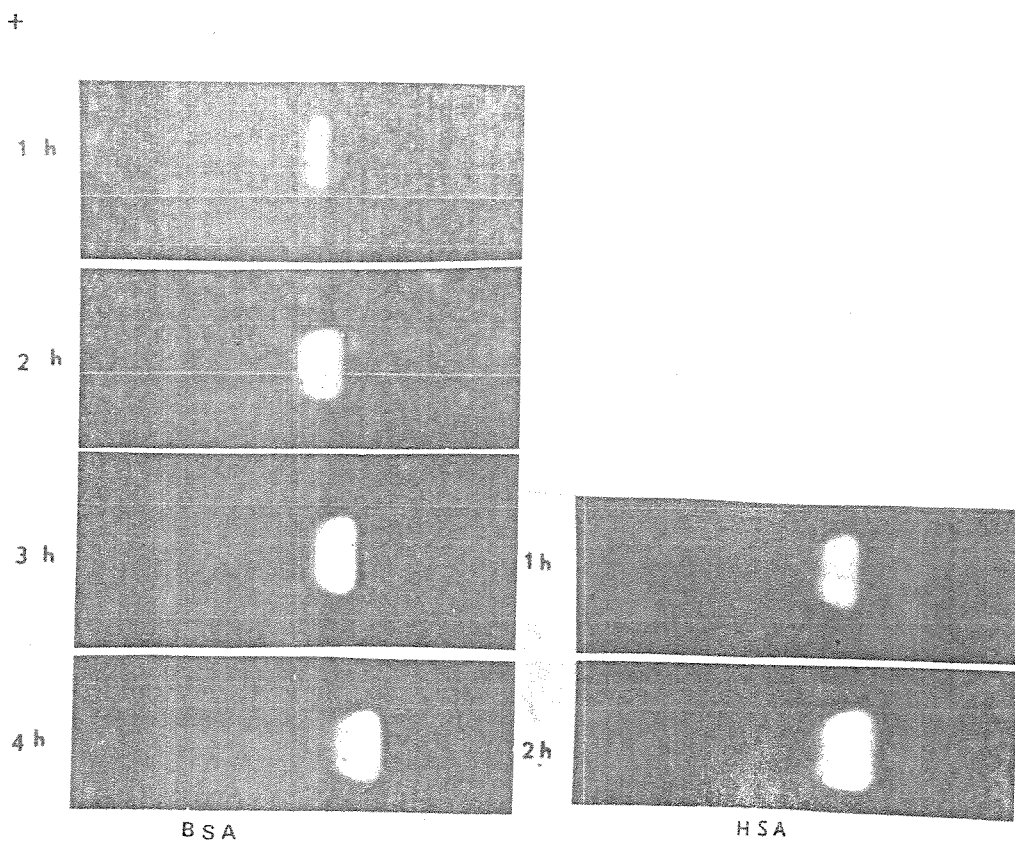


Fig. 5 - Detecção da atividade enzimática da cat D em lâminas de substrato (BSA e HSA), incubadas com fitas de acetato-celulose por tempo variável.

Este mesmo material (FS.2.2) submetido a eletroforese em gel de amido, mostrou a presença de 6 componentes (figura 6). Em experiências paralelas, com gel de amido sem coloração, esses componentes foram eluídos e sua atividade enzimática testada, utilizando hemoglobina de carneiro como substrato. Todos os seis componentes apresentaram atividade proteolítica da cat D. Estes componentes, testados por imunodifusão contra anti-cat D, apresentaram identidade antigênica.

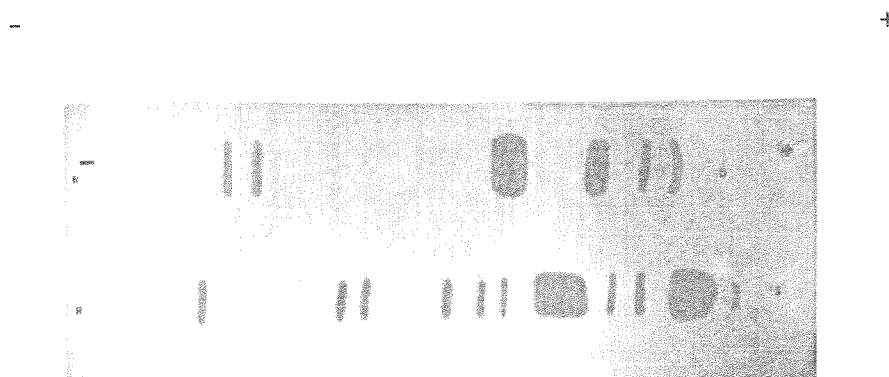


Fig. 6 - Eletroforese da cat D (315 U/mg prot) em gel de amido
D = cat D, S = soro normal de coelho.

Os resultados de isoeletrofocalização analítica, realizada com a cat D purificada, mostraram 11 componentes (figura 7).



Fig. 7 - Isoeletrofocalização analítica da cat D (315 U/mg prot) em gel de poliacrilamida.

Tendo em vista estes resultados que sugerem a presença da cat D em diferentes formas, quantidades de 40 mg de enzima purificada (315 U/mg prot) , foi submetida a isoeletrofocalização preparativa, a fim de isolar as várias formas de enzima.

Os resultados obtidos e apresentados na figura 8, indicam a presença de 11 componentes. Atividade proteinásica foi detectada em todos os componentes, sobre a hemoglobina de carneiro. Contudo, 77% desta atividade se encontra concentrada apenas em 3 componentes: FI.7, FI.8 e FI.9 (tabela 5), com atividade específica de: 740, 640 e 300 U/mg prot e pontos isoelétricos de: 5,9 , 5,2 e 4,5 respectivamente.

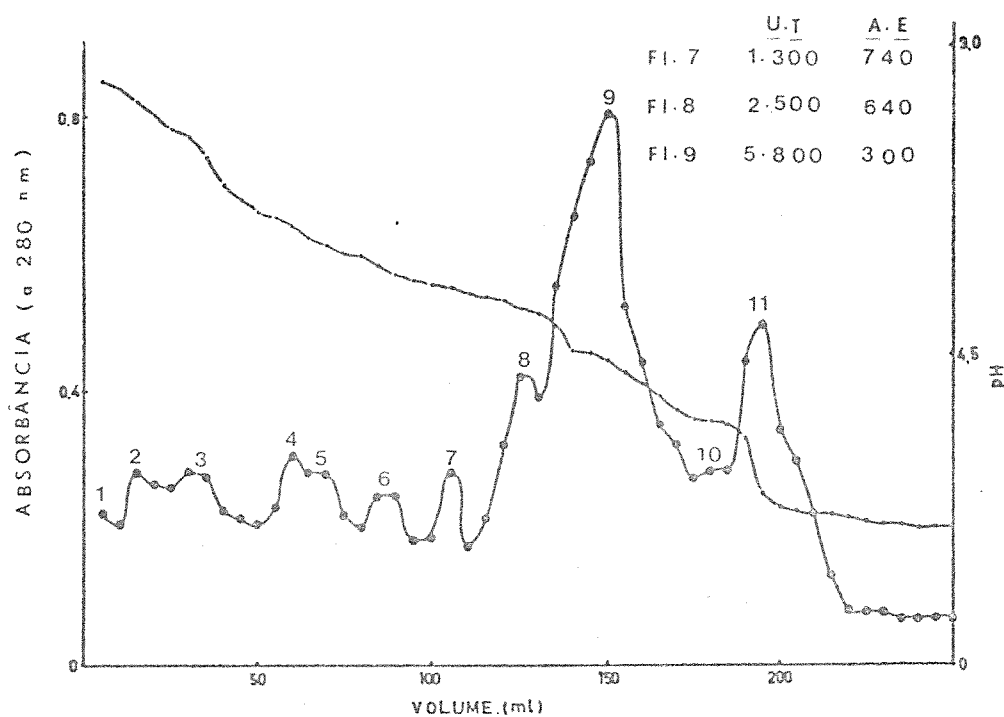


Fig. 8 - Isoeletrofocalização preparativa em coluna de amfólitos em limites de pH 3 - 10.

Tab. 5 - Resultados de isoeletrofocalização preparativa.

		Atividade enzimática	
		U.T	A.E
Cat D purificada	(FS.2.2)	12.400	315
Cat D obtida por	FI.7	1.300	740
isoeletrofocali-	FI.8	2.500	640
zação.	FI.9	5.800	300

Com objetivo de verificar se as diferentes formas da cat D, obtidas por isoeletrofocalização preparativa, tinham a mesma especificidade bioquímica, várias experiências da degradação da cadeia B da insulina foram realizadas, utilizando frações FI.7, FI.8 e FI.9, respectivamente.

Idênticos resultados foram obtidos com as 3 frações. Os produtos da degradação, analisados por cromatoeletroforese (figura 9), foram representados por 22 peptídeos ou aminoácidos cujas posições no eletrocromatograma correspondiam exatamente às indicadas por Rangel e Lapresle (1966) indicando assim, que as 3 diferentes formas da cat D hidrolisam as seguintes ligações: Leu.11-Val.12 , Glu.13 - Ala.14 , Ala.14-Leu.15 , Leu.15-Tyr.16, Tyr.16-Leu.17 , Leu.17-Val.18 , Phe.24-Phe.25 , Phe.25-Tyr.26 , Tyr.26-Thr.27 e uma das ligações: His.5-Leu.6 ou Leu.6-Cys.7 ou ambas.

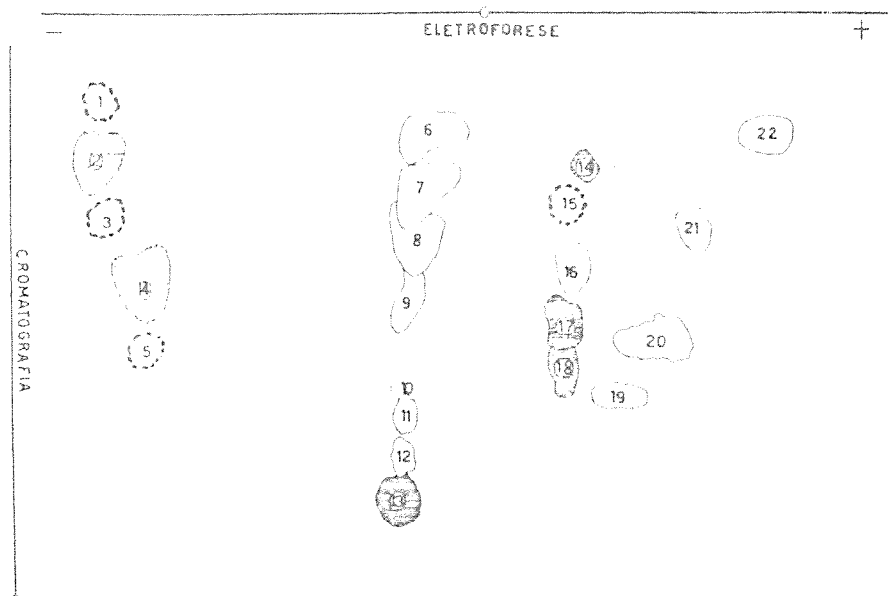


Fig. 9 - Esquema de cromatoeletroforese dos produtos da degradação da cadeia B da insulina com diferentes formas de cat D.

3.3 - LOCALIZAÇÃO DA CAT D NO BAÇO DE COELHO.

Os métodos histoquímicos da localização intracelular dos antígenos são muito sensíveis e exigem que os anticorpos utilizados sejam específicos contra o antígeno a ser pesquisado.

3.3.1 - PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS ANTI-CAT D

Com objetivo de verificar o grau de especificidade do soro de carneiro anti-cat D de coelho, foram realizadas estas experiências: Uma amostra da cat D parcialmente purificada, contendo 130 U/mg prot, previamente dosada, foi diluída em salina 0,15 M de modo a obter 107,0 , 53,5 , 26,7 e 13,3 U/ml. Quantidades de 1 ml de várias concentrações da enzima foram misturadas com 1 ml de soro de carneiro anti-cat D, de soro normal de carneiro ou de soro normal de coelho. As misturas realizadas em triplicata, foram incubadas a 4°C durante 48 h. Após a centrifugação a 1000 x g, 15 minutos para separar o precipitado, a atividade enzimática foi determinada nos sobrenadantes e nos precipitados dissolvidos em tampão acetato-HCl 0,05 M pH 3,3 , conforme indicado

em material e métodos.

Os resultados obtidos e apresentados na tabela 6, demonstram que o antisoro anti-cat D é capaz de precipitar uma média de 85% da enzima adicionada, enquanto nas reações controle com soro normal de carneiro ou de coelho, não houve alteração da atividade enzimática no sobrenadante.

Tab. 6 - Precipitação quantitativa da atividade enzimática por antisoro.

Cat D antes da precipitação.		Cat D no sobrenadante.		Cat D precipitada.	
U.T		U.T		U.T	%
com anti-cat D	107,0	11,0		95,0	88,8
	53,5	10,0		42,0	78,5
	26,7	5,0		21,5	80,5
	13,3	1,5		12,0	90,2
com soro normal	107,0	107,0		0,0	0,0
	53,5	54,0		0,0	0,0
	26,7	27,0		0,0	0,0
	13,3	13,2		0,0	0,0

Os testes de imunodifusão mostraram que a preparação da cat D (130 U/mg prot), reage com os antisoros anti-cat D e anti-soro normal de coelho, apresentando várias linhas de precipitação, das quais apenas uma linha apresentava atividade enzimática (figura 10.1). O antisoro anti-cat D reage com soro normal de coelho, formando pelo menos 2 sistemas precipitantes, que no entanto não apresentam atividade enzimática (figura 10.2), mostrando que esses anticorpos são dirigidos contra antígenos que não são cat D. A comparação da prepara -

ção da cat D (a) e soro normal de coelho (b), mostrou a existência de uma identidade entre alguns antígenos séricos e os antígenos contaminantes dessas preparações da enzima (figura 10.3).

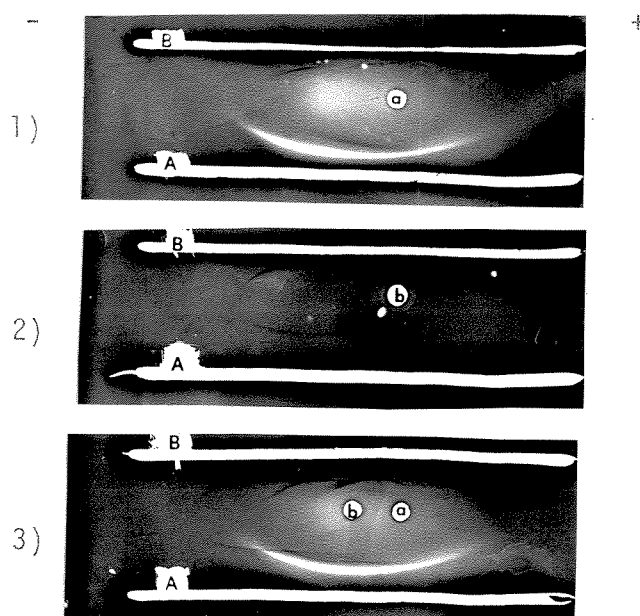


Fig. 10 - Detecção da atividade enzimática da cat D em imunocomplexos:
A, soro de carneiro anti-cat D de coelho.
B, soro de carneiro anti-soro de coelho.
a, cat D (130 U/mg prot, 7 mg prot/ml).
b, soro normal de coelho (7 mg prot/ml).

Os resultados anteriormente obtidos, demonstraram que o antisoro anti-cat D é poliespecífico, precipitando outros componentes presentes no soro normal de coelho. Com objetivo de obter anticorpos da classe IgG, específicos contra cat D, experiências de purificação foram realizadas, conforme descrito em material e métodos. Nessas experiências a fração globulínica do soro anti-cat D, obtida por precipitação com sulfato de amônio, era absorvida com soro normal de coelho polimerizado com glutaraldeído e em seguida cromatografada em sephadex G-200.

Os resultados obtidos mostraram que a fração imunoglobulina dos soros anti-cat D, após absorção com polímero de soro normal de coelho, não mais

precipitava, quando testada com este soro, mas continuava a formar imunocomplexos com atividade proteolítica, quando testada com cat D parcialmente purificada (figura 11).

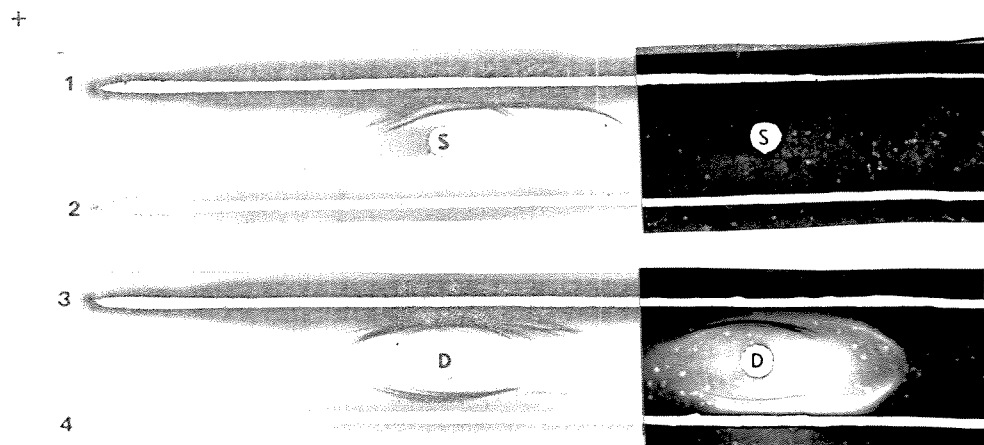


Fig. 11 - Imunoeletroforese e detecção da atividade enzimática em imunocomplexos 1 e 3, imunoglobulina anti-cat D não absorvida. 2 e 4, imunoglobulina anti-cat D absorvida. S, soro normal de coelho (7 mg prot/ml). D, cat D (130 U/mg prot, 7 mg prot/ml).

A cromatografia em sephadex G-200, da fração imunoglobulina absorvida, permitiu isolar 3 frações coletadas conforme indicado na figura 12. A segunda fração (F2), caracterizada por eletroforese e imunoeletroforese como IgG de carneiro, foi utilizada após conjugação com peroxidase ou fluorescina, para detecção das células produtoras da cat D.

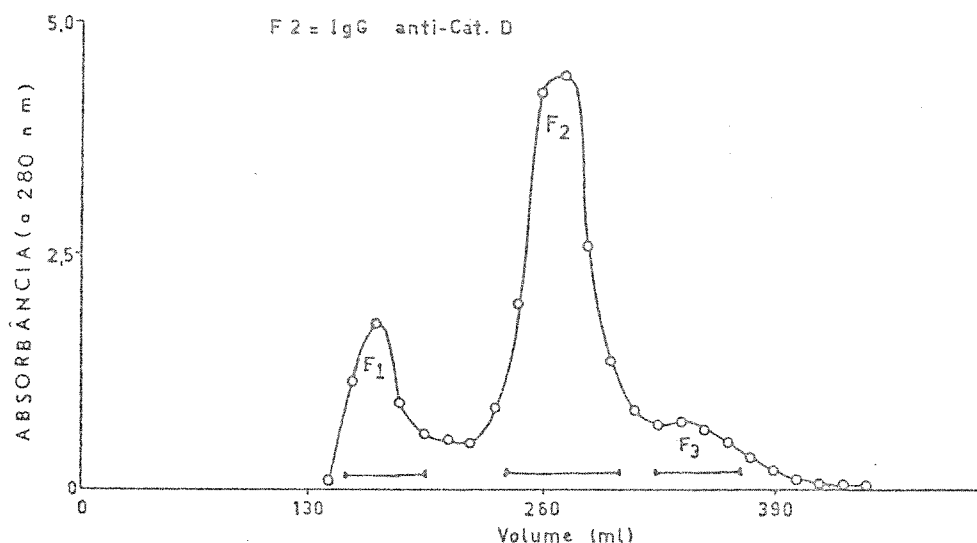


Fig. 12 - Cromatografia de filtração de IgG anti-cat D em sephadex G-200.

3.3.2 - ESTUDOS CITOQUÍMICOS.

Os macrófagos alveolares, isolados de coelhos normais, foram identificados pela reação de vermelho neutro (Cohn & Wiener, 1963). A contagem das células foi realizada com hemocitômetro de Neubaur. A viabilidade celular foi estimada pela técnica de exclusão das células coradas, utilizando diluições em mistura de 1 ml azul-tripán (2 mg/ml) e 0,25 ml de NaCl 4,25%. O número total das células obtidas era 5×10^8 /coelho, apresentando 85% de células viáveis. Destas células cerca de 95% eram macrófagos e 5% de morfologia de pequenas células arredondadas.

Reações citoquímicas diretas de imunoperoxidase ou de imunofluorescência foram realizadas, utilizando a IgG anti-cat D conjugada com peroxidase ou FITC (relação molar F : P = 3,5). Reações positivas foram obtidas (figuras 13 e 14). Os controles em que as células foram previamente tratadas com soro anti-cat D não marcado (figura 15), ou em que o conjugado (IgG anti-cat D) foi previamente misturado com a cat D purificada (315 U/mg prot), mostram resultados negativos.

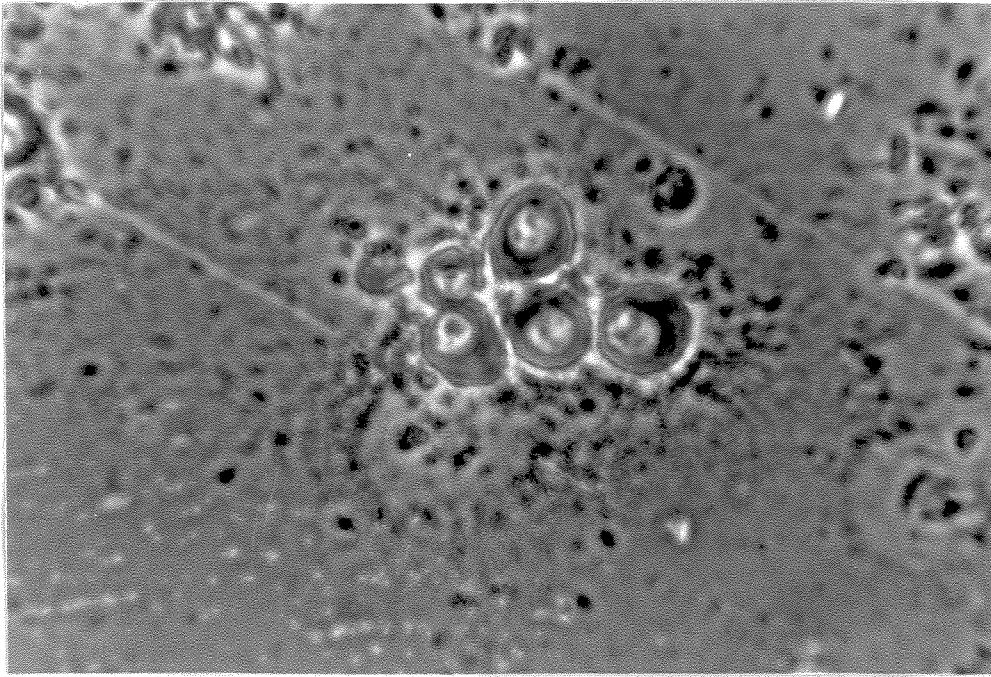


Fig. 13 - Reação positiva da peroxidase em macrófagos alveolares de coelho.

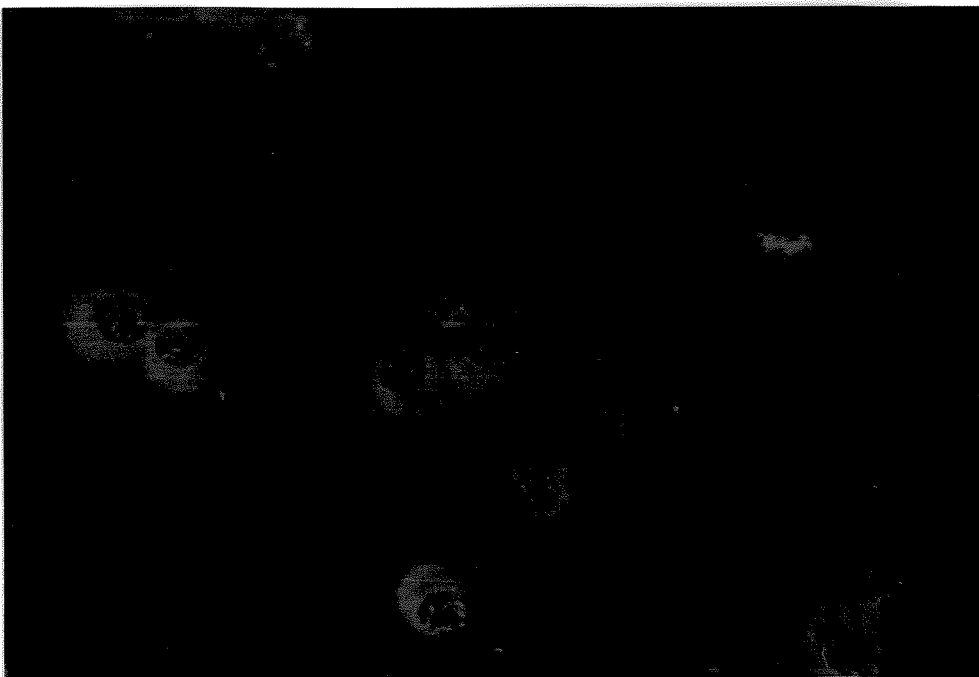


Fig. 14 - Reação positiva da imunofluorescência em macrófagos alveolares de coelho.

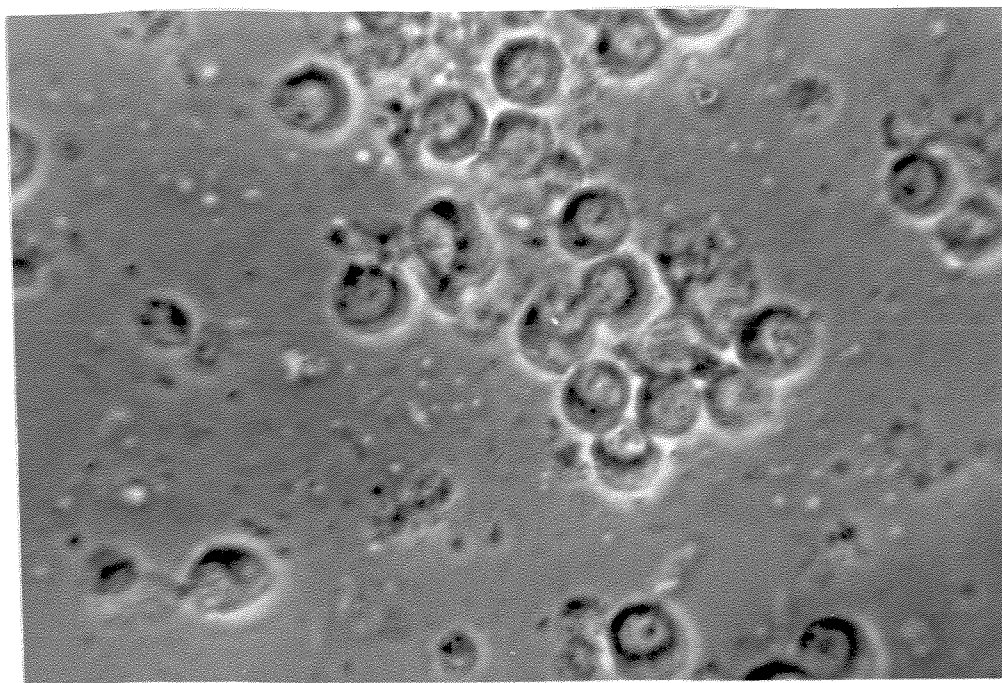


Fig. 15 - Resultados controles de uma reação negativa: macrófagos nos quais a cat D foi bloqueada com anticorpos não marcados.

Reações da imunoperoxidase realizadas em cortes do baço de coelho, demonstradas nas figuras 16, 17 e 18, mostraram que a cat D está presente apenas em células que foram caracterizadas como macrófagos. Reações controles realizadas em cortes do baço, de modo idêntico às reações controle realizadas em macrófagos alveolares, mostraram resultados negativos.

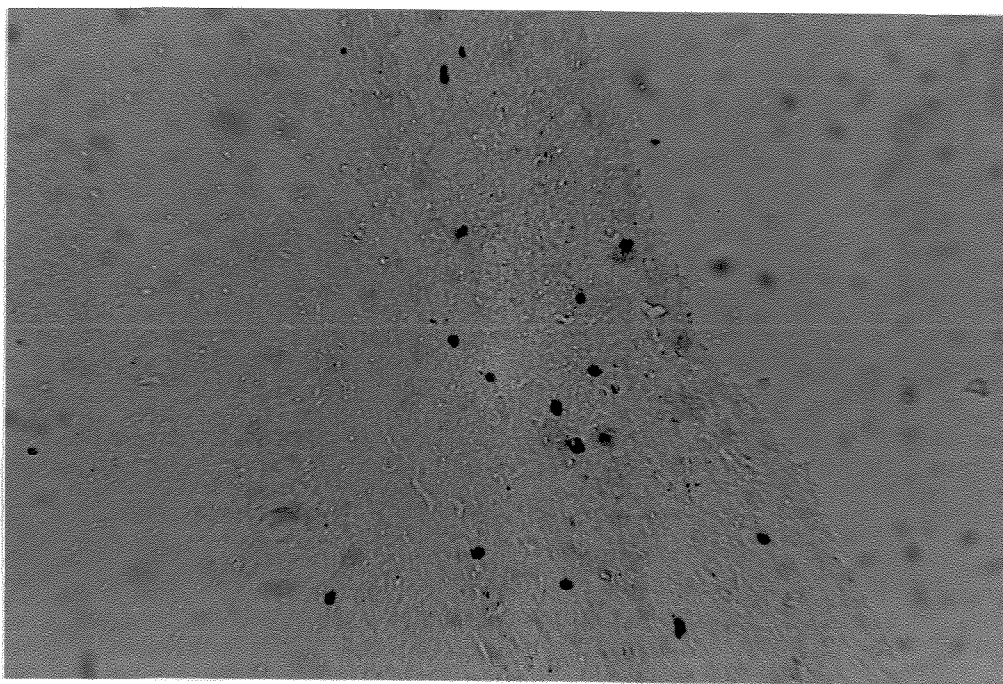


Fig. 16 - Reação positiva de imunoperoxidase no baço de coelho x 120.

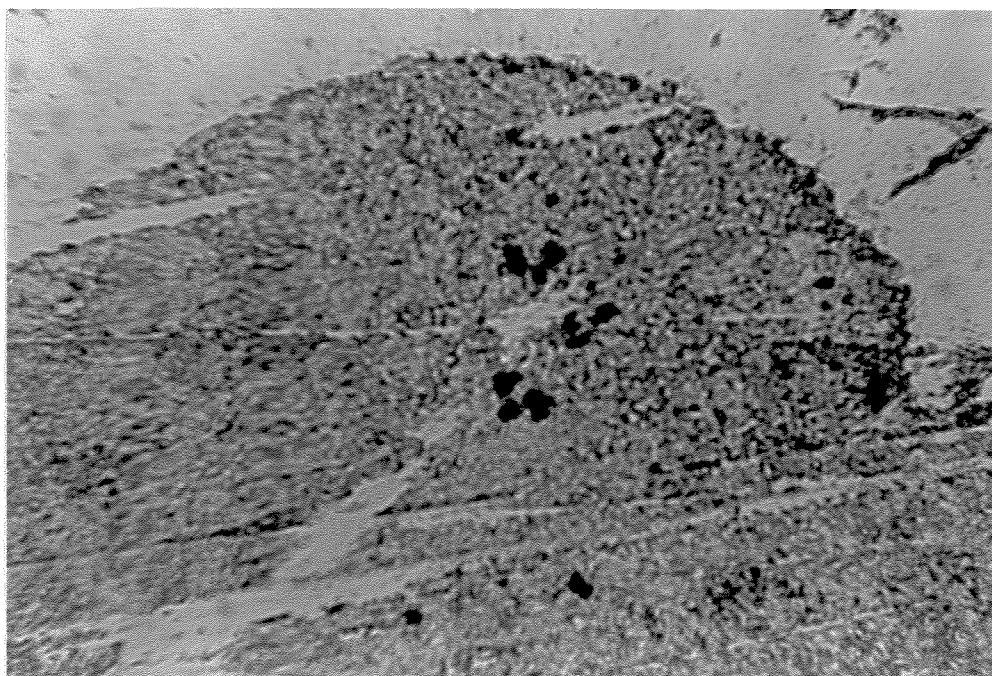


Fig. 17 - Reação positiva de imunoperoxidase no baço de coelho x 480.

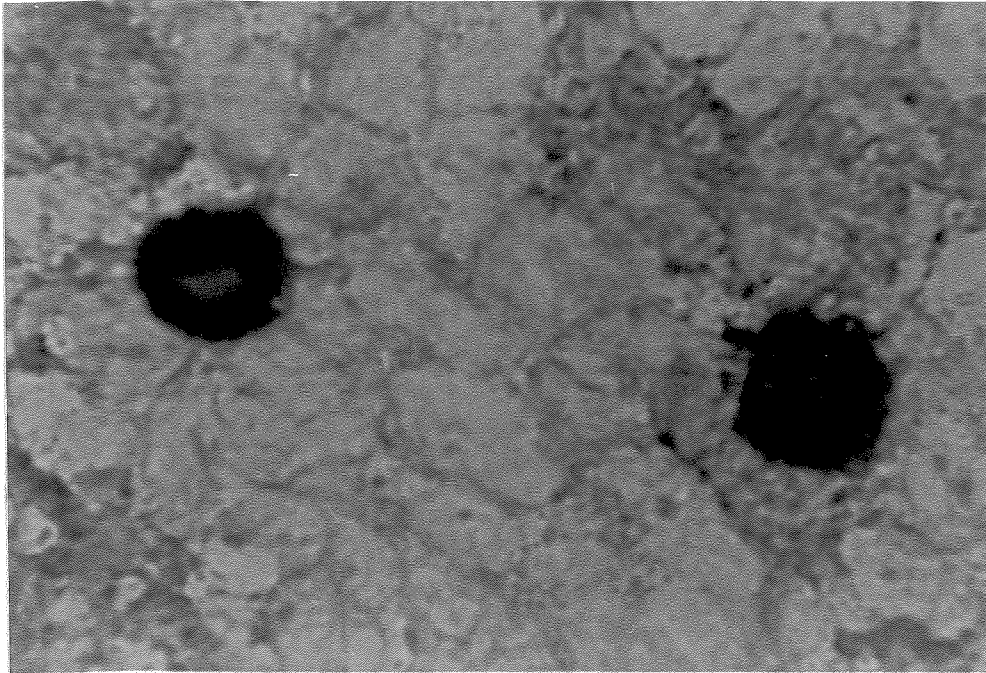


Fig. 18 - Reação positiva de imunoperoxidase no baço de coelho x 1200.

4 - DISCUSSÃO

A cat D do baço de coelho foi isolada por Lapresle e Webb (1960) , tendo atividade específica de 55 U/mg prot, utilizando métodos de precipitação com sulfato de amônio e cromatografia em DEAE-Celulose. A existência, nos extra^{tos} do baço, de um pigmento que se fixa irreversivelmente a DEAE-Celulose, apresenta a principal desvantagem deste método. Esta enzima também foi isolada por Dawood (1973), tendo atividade específica de 100 U/mg prot, utilizando métodos de precipitação com acetona e cromatografia em DEAE-Celulose. Nossos dados de precipitação com acetona demonstraram a obtenção de preparações da cat D, dez vezes mais concentrada, cerca de três vezes mais purificada, com 76% de rendimento e livre do pigmento que se fixa a DEAE-Celulose.

Contudo, as preparações da enzima obtidas por Lapresle e Webb (1960) e Dawood (1973) não são puras, porquanto produziram um imune-soro em carneiro que reage com a enzima assim purificada e soro normal de coelho, apresentando várias linhas de precipitação, não se podendo portanto excluir a possibilidade que essas preparações contivessem mais que uma enzima.

Dados apresentados neste trabalho mostraram que a cat D foi purificada, utilizando sequência de métodos como precipitação a 66% de acetona, cromatografia em sephadex e em DEAE-Celulose. Nessas condições, foi possível obter preparações da enzima com atividade específica de 315 U/mg prot, cerca de três vezes mais purificada que a enzima isolada por Dawood e seis vezes mais purificada que a mesma enzima obtida por Lapresle.

A análise da cat D purificada (315 U/mg prot), por dupladifusão e imunoeletroforese, revelou uma só linha de precipitação, utilizando antisoro poliespecífico, sugerindo fortemente que essas preparações são apenas cat D.

De fato, quando a eletroforese em acetato-celulose foi realizada , embora o perfil densitométrico de proteínas tivesse indicando a presença de pelo menos cinco componentes, que não poderiam ser individualizados mesmo após eletroforese prolongada, só foi possível detectar uma única atividade proteínica sobre BSA e HSA.

Em concordância com esses dados, a eletroforese em gel de amido permitiu demonstrar seis componentes, os quais no entanto, apresentaram atividade

proteínásica e identidade imunológica por dupla difusão, sugerindo desse modo que a cat D de coelho apresenta-se em diferentes formas de mobilidades eletroforéticas diferentes. Esta sugestão foi confirmada pelos dados de isoeletoforesis em gel de poliacrilamida, quando foram encontrados onze componentes. Esses componentes podem representar polímeros de uma unidade básica ou componentes com diferentes cargas elétricas. O fato de se ter obtido igual número em coluna de anfólitos na ausência de poliacrilamida, sugere que esses componentes diferem apenas em sua carga elétrica. Todos os onze componentes isolados apresentaram atividade proteínásica. No entanto, 77% desta atividade estava concentrada em apenas três componentes com atividade específica de: 740, 640 e 300 U/mg prot e pontos isoelétricos de: 5,9, 5,2 e 4,5 respectivamente.

O conjunto de dados, obtidos na análise das preparações purificadas pelo método atual, sugere a presença de uma única enzima, que se apresenta sob várias formas moleculares que diferem entre si pela carga elétrica, mas seriam praticamente indistinguíveis de ponto de vista imunológico ou bioquímico. De fato, a análise dos digestos da cadeia B da insulina por diferentes formas obtidas na isoeletoforesis (FI.7, FI.8 e FI.9), não mostraram diferenças. As três diferentes formas ou a cat D purificada (315 U/mg prot) hidrolisam as mesmas ligações da cadeia B da insulina. Resultados semelhantes foram obtidos por Press et al (1960) com a cat D do baço bovino e por Sabolsky & Woessner Jr (1972) com a cat D de útero bovino. Estes autores isolaram as diferentes formas da enzima e mostraram que todas elas hidrolisam as mesmas ligações da cadeia B da insulina.

O termo catepsina D foi utilizado pela primeira vez por Press et al (1960), quando isolaram do baço bovino uma proteinase ácida incapaz de hidrolisar os substratos sintéticos específicos das catepsinas A, B e C. Esta enzima hidrolisa as seguintes ligações da cadeia B da insulina: Glu.13-Ala.14, Leu.15-Tyr.16, Tyr.16-Leu.17, Phe.24-Phe.25 e Phe.25-Tyr.26. O mesmo termo foi utilizado por Lapresle & Webb (1960), para definir uma proteinase ácida isolada do baço de coelho, que apresentava várias características da cat D bovina. A determinação da especificidade desta enzima, sobre a cadeia B da insulina (Rangel & Lapresle, 1966), utilizando preparações com 55 U/mg prot, mostrou que estas preparações hidrolisavam as mesmas ligações hidrolisadas pela cat D bovina e mais as seguintes ligações: Leu.11-Val.12, Ala.14-Leu.15, Leu.17-Val.18 e Tyr.26-Thr.27 e uma das ligações: His.5-Leu.6, Leu.6-Cys.7 ou ambas. Pode-se admitir, desse modo, a presença de pelo menos 2 proteases nas preparações utilizadas por Rangel e Lapresle.

No presente trabalho, os dados atualmente apresentados, mostram que as preparações da cat D com grau de pureza semelhante àquela utilizada por Rangel e Lapresle, embora estejam contaminadas com diferentes antígenos, não contêm diferentes proteases. De fato, as preparações purificadas (315 U/mg prot) bem como as diferentes formas isoladas por isoeletrofocalização (FI.7, FI.8 e FI.9), mostraram uma especificidade idêntica àquela anteriormente indicada por Rangel e Lapresle. Esses achados sugerem a presença de diferenças nas especificidades das catepsinas D de diferentes espécies. O que sugere que são adaptadas ao catabolismo das proteínas.

As experiências de precipitação quantitativa da atividade enzimática em meio líquido pelo antisoro anti-cat D, demonstraram que os anticorpos dirigidos contra cat D, são capazes de precipitar 85% da atividade enzimática. Estes dados estão de acordo com dados obtidos por Weston (1969), nos quais o antisoro anti-cat D do fígado de galinha preparado em coelho, foi capaz de precipitar 88% da atividade enzimática e por Dingle *et al* (1971), nos quais a imunoinibição da enzima era 90%. A precipitação ou inibição incompletas da cat D, mesmo com excesso de anticorpos, relatada neste trabalho e nos trabalhos de Weston e de Dingle, provavelmente ocorre pela presença de anticorpos não precipitantes que interferem na combinação dos anticorpos precipitantes. A precipitação de 85% da enzima com anti-cat D, não significa que os antisoros contêm somente anticorpos anti-cat D. De fato, a análise imunoquímica mostrou que os antisoros anti-cat D possuem anticorpos contra antígenos séricos. Contudo, a purificação desses antisoros permitiu obter uma fração de IgG específica apenas para cat D.

Com este material, conjugado a peroxidase ou fluoresceína, foi possível demonstrar que os macrófagos contêm cat D, confirmando os achados de Dingle *et al* (1973). A utilização deste conjugado em cortes do baço permitiu demonstrar que a cat D está presente apenas em células bem isoladas, cuja morfologia e distribuição correspondem às descritas para os macrófagos (Hadler, 1962).

O fato da cat D de diferentes espécies possuírem especificidades bioquímicas diferentes, favorece a hipótese de que esta enzima está envolvida no catabolismo dos antígenos proteicos. Esta hipótese também é favorecida pelo fato de que a cat D está presente nos macrófagos dos órgãos linfóides como baço, que fagocitam os antígenos introduzidos na circulação e que contribuem significativamente na indução da resposta imune. Esta hipótese deverá ser investigada procurando saber se o bloqueio da atividade da cat D, conduz ou não a uma alteração da resposta imune. Em experiências preliminares não relatadas, observou-

se que a inoculação com pepstatina ou anti-cat D em camundongos provoca alterações da resposta imune, tanto aos glóbulos de carneiro quanto aos antígenos proteicos (BSA, HSA e HGG). No caso do antígeno particulado houve uma ligeira, embora significativa, diminuição da resposta imune, medida através de determinação das células formadoras de placas de lise ou de rosetas. No segundo caso, houve um ligeiro aumento dos níveis séricos de anticorpos, medido pela hemólise passiva.

Com base nessas experiências pode-se supor que a maior ou menor permanência do Ag sob a forma imunogênica no macrófago, influencie os níveis da resposta. Em apoio a essa suposição podemos citar o fato de que os macrófagos dos camundongos Biozzi: Ab/L, maus produtores de anticorpos, possuem uma alta atividade da cat D enquanto que os macrófagos de camundongos Ab/H, bons produtores de anticorpos possuem baixa atividade da cat D (Wiener & Bandieri, 1974). Embora esta hipótese seja estimulante e existam a seu favor muitos argumentos, deve-se ter cautela na interpretação dos dados existentes, porquanto numerosos fatores que podem estar interferindo na resposta imune não estão sendo avaliados. Demonstrou-se por exemplo, que os macrófagos da linhagem Ab/L consomem, degradam e eliminam mais rapidamente do que os macrófagos da linhagem Ab/H, tanto o Ag proteico ^{14}C -KLH quanto um polissacarídeo ^{14}C -LE, embora este último Ag induza o mesmo nível da resposta nas duas linhagens (Wiener & Bandieri, 1974). Por outro lado, a eliminação de SRBC pelos macrófagos das duas linhagens é realizada com a mesma velocidade, embora essas duas linhagens apresentem níveis da resposta totalmente diferentes (Biozzi et al., 1974).

5 - RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho foi realizado com a finalidade de purificar e caracterizar a cat D do baço de coelho e determinar as células que a sintetizam no baço. Os estudos apresentados mostraram que:

- 1 - Com técnicas de precipitação com acetona, cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose e filtração em sephadex G-100, foi possível obter a cat D do baço de coelho com alto grau de pureza (315 U/mg prot). Com dupladifusão e imunoeletroforese, a enzima purificada apresenta apenas um arco de precipitação, contra imune-soro polivalente preparado com cat parcialmente purificada.
- 2 - Com eletroforese em acetato-celulose e em gel de amido, a cat D purificada se apresenta em 6 componentes que tem a mesma atividade proteinásica sobre BSA, HSA e hemoglobina.
- 3 - Com a isoeletrofocalização, esta enzima apresentou 11 componentes de diferentes pontos isoeletricos, que mostram a mesma atividade proteinásica da cat D sobre a hemoglobina. 77% desta atividade se encontra concentrada em apenas 3 componentes, com atividade específica de: 740, 640 e 300 U/mg prot e pontos isoeletricos de: 5,9 , 5,2 e 4,5 respectivamente.
- 4 - Os componentes isolados por isoeletrofocalização preparativa, apresentam a mesma identidade antigênica, quando testados com antisoro polivalente preparado contra enzima parcialmente purificada e hidrolisam as mesmas ligações da cad B da insulina, hidrolisáveis pela cat purificada, indicando que são isoenzimas.
- 5 - Os cromatoeletrogramas dos produtos da degradação da cadeia B da insulina , com a cat D de coelho e suas isoenzimas, mostram que a especificidade bio -

química desta enzima é mais ampla do que a indicada para cat D de boi e hidrolisa as seguintes ligações:

Leu.11-Val.12, Glu.13-Ala.14, Ala.14-Leu.15, Leu.15-Tyr.16, Tyr.16-Leu.17 ,
Leu.17-Val.18, Phe.24-Phe.25, Phe.25-Tyr.26 e uma das ligações: His.5 -
Leu.6, Leu.6-Cys.7 ou ambas, indicando que as catepsinas D de diferentes espécies animais podem ter especificidades diferentes.

- 6 - Os anticorpos anti-cat D, da classe IgG, purificados a partir de soro de carneiro anti-cat D de coelho, conjugados com peroxidase reagem apenas com as células do baço cuja morfologia e distribuição correspondem às descritas para os macrófagos.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-Erreich, G.M. and Peanasky, R.G. (1974). Pepsin inhibitors from *Ascaris lumbricoides*. Isolation, purification and some properties. *J. Biol. Chem.*, 249: 1558.
- Anson, M.L. (1938). The estimation of pepsin, tripsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J.Gen. Physiol.*, 22: 79.
- Anson, M.L. (1939). The purification of cathepsin. *J.Gen. Physiol.*, 23: 695.
- Araki, H. and Takenaka, F. (1975). An increase of cathepsin D activity in cardiac lymph and pericardial fluid induced by experimental myocardial ischemia in the dog. *Life Sci.*, 17: 613.
- Artmann, G. ; Fehr, K. and Boni, A. (1977). Cathepsin D agglutinators in rheumatoid arthritis. I - Increased CDA titers in serum and synovial fluid of patients with seropositive RA. *Arthritis Rheum.*, 20: 1105.
- Askonas, B.A. and Jaroskova, L. (1971). Macrophages as helper cells in antibody induction. in "Developmental aspects of antibody formation and structure" (J.Sterzl and M. Riha, eds.), Vol.2 Publ. House Czech. Acad. Sci. Prague.
- Askonas, B.A. and Rhodes, J.M. (1965). Immunogenicity of antigen containing ribonucleic acid preparations from macrophages. *Nature (London)*, 205: 470.
- Askonas, B.A. ; Auzins, I. and Unanue, E.R. (1968). Role of macrophages in the immune response. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50: 1113.
- Avrameas, S. (1970). Immunoenzyme techniques. Enzymes as markers for the localization of antigens and antibodies. *Int. Riv. Cytol.*, 27: 349.
- Avrameas, S. and Ternynck, T. (1969). The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparation of immunoadsorbents. *Immunochemistry*, 6: 53.

- Avrameas, S. and Ternynck, T. (1971). Peroxidase labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochemistry*, 8: 1175.
- Awdeh, Z.L. ; Askonas, B.A. and Williamson, A.R. (1968). Isoelectric focusing in polyacrilamide gel and its application to immunoglobulins. *Nature*, 219:66.
- Balasubramanian, K. and Dias, W.P. (1965). Characteristics of thyroid lysosomal cathepsin. *Biochim. Biophys. Acta*, 110: 564.
- Barrett, A.J. (1967). Lysosomal acid proteinase of rabbit liver. *Biochem. J.*, 104: 601.
- Barrett, A.J. (1970). Cathepsin D. Purification of isoenzymes from human and chicken liver. *Biochem. J.*, 117: 601.
- Barrett, A.J. (1972). Lysosomal enzymes. in "Lysosomes, a laboratory hand book" (J.T. Dingle ed.), pp. 46. North Holland, Amsterdam.
- Barrett, A.J. (1973). Human cathepsin B1. purification and some properties of the enzyme. *Biochem. J.*, 131: 809.
- Barrett, A.J. (1975). in "Dynamics of connective tissue macromolecules" (P.M.C. Burleigh and A.R. Poole, eds.), pp. 189. North Holland, Amsterdam.
- Barrett, A.J. (1975). Lysosomal and related proteinases. in "Proteases and biological control" (E. Reich ; D.B. Rifkin and E. Shaw, eds.), pp. 471. Cold spring harbor laboratory. Cold spring harbor, U.S.A.
- Bayliss, M.T. and Ali, S.Y. (1978). Studies on cathepsin B in human articular cartilage. *Biochem. J.*, 171: 149.
- Bergman, M. and Fruton, J.S. (1941). The specificity of proteinases. *Advances in Enzymology*, 1: 63.
- Bienenstock, J. (1968). Urinary Fc and F'c fragments. *J. Immunol.*, 100: 280.

- Biozzi, G. ; Stiffel, C. ; Mouton, D. ; Bouthillier, Y et Decreusefond, C (1974)
La régulation génétique de la synthèse des immunoglobulines au cours de la
réponse immunologique. *Ann. Immunol. (Ins.Pasteur)*, 125: 107.
- Blow, M.J.A. and Barrett, A.J. (1977). Action of human cathepsin G on oxidized B
chain of insulin. *Biochem. J.*, 161: 17.
- Boehme, D.H. ; Fordice, M.W. and Marks, N. (1974). Proteolytic activity in brain
and spinal cord in sensitive and resistant strains of rat and mouse subjected
to experimental allergic encephalomyelitis. *Brain res.*, 75: 153.
- Bowen, D.M. and Davison, A.N. (1973). Cathepsin A in human brain and spleen.
Biochem. J., 131: 417.
- Bowen, D.M. and Davison, A.N. (1974). Carboxipeptidase of human brain.
Hydrolysis of Z-Gly-Tyr in normal and diseased tissue. *J. Neurochem.*, 22: 607.
- Bowers, W.E. (1972). Lysosomes in rat thoracic duct lymphocytes.
J. Exp. Med., 136: 1394.
- Bowers, W.E. ; Panagides, J. and Yago, N. (1973). Lysosomes and unusual
localization for cathepsin D in rat thoracic duct lymphocytes.
J. Cell Biol., 59: 33 a.
- Burleigh, M.C. ; Barrett, A.J. and Gerald, S.L. (1974). A lysosomal enzyme that
degrades native collagen. *Biochem. J.*, 137: 387.
- Coffey, J.W. and DeDuve, C. (1968). Digestive activity of lysosomes. I - The
digestion of proteins by extracts of liver lysosomes. *J.Biol.Chem.*, 243: 3255.
- Cohn, Z.A. and Wiener, E. (1963). The particulate hydrolases of macrophages.
II - Biochemical and morphological response to particulate ingestion.
J. Exp. Med., 118: 991.
- Cunningham, M. and Tang, J. (1976). Purification and properties of cathepsin D
from porcine spleen. *J. Biol. Chem.*, 251: 4528.

Dawood, F.A.M. (1973). Estudos sobre catepsina D de coelho:

Purificação e preparação de antisoro monoespecífico. Tese de mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Brasil.

Dayton, W.R. ; Reville, W.J. ; Goll, D.E. and Stromer, M. H. (1976).

A Ca^{2+} -activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme. *Biochemistry*, 15: 2159.

Decker, R.S. ; Poole, A.R. ; Griffin, E.E. ; Dingle, J.T. and Willenthal, K. (1977).

Altered distribution of lysosomal cathepsin D in ischemic myocardium. *J. Clin. Invest.*, 59: 911.

DeLaHaba, 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.*, 243: 316.

Dingle, J.T. (1962). Lysosomal enzymes and degradation of cartilage matrix.

Proc. R. Soc. Med., 55: 109.

Dingle, J.T. ; Blow, A.M.J. ; Barrett, A.J. and Martin, P.E.N. (1977).

Proteoglycan-degrading enzymes. A radiochemical assay method and the detection of a new enzyme cathepsin F. *Biochem. J.*, 167: 775.

Dingle, J.T. ; Barrett, A.J. and Weston, P.D. (1971). Characterization of

immunoinhibition and the confirmation of a role in cartilage breakdown. *Biochem. J.*, 123: 1.

Dingle, J.T. ; Poole, A.R. ; Lazarus, G.S. and Barrett, A.J. (1973).

Immunoinhibition of intracellular protein digestion in macrophage. *J. Exp. Med.*, 137: 1124.

Ducastaing, A. ; Aznza, J. ; Robin, J. ; Raymond, J. et Creac'h, P. (1976).

La cathepsine D de rate de cheval. I - Purification et étude de quelques propriétés physico-chimiques. *Biochimie*, 58: 771.

Ducastaing, A. ; Aznza, J. ; Raymond, J. ; Robin, J. et Creac'h, P. (1976).

La cathepsine D de rate de cheval. II - Étude de quelques propriétés enzymatiques. *Biochimie*, 58: 783.

- Etherington, D.J. (1972). The purification of bovine cathepsin B1 and its mode of action on bovine collagens. *Biochem. J.*, 137: 547.
- Evans, P. and Etherington, D.G. (1978). Characterization of cathepsin B and collagenolytic cathepsin from human placenta. *Eur. J. Biochem.*, 83: 87.
- Fehr, K. (1972). Pathogenese der progredient chronischen polyarthritits (PCP). Berne-Stuttgart-Vienna, Verlag Hans Huber, pp. 84.
- Fehr, K.; Velvert, M.; Boni, A.; Watanabe, H.; Spycher, M.A. and Buttner, J.R. (1976). Experimental arthritis of rabbit caused by intra-articular injection of autologous Fab2 produced by digestion of IgG with cathepsin D. 1 - Microscopical and immunohistochemical findings in short-term experiments. *Ann Rheum. Dis.*, 35: 85.
- Ferguson, J.B.; Andrews, J.R.; Voynick, I.M. and Fruton, J.S. (1973). The specificity of cathepsin D. *J. Biol. Chem.*, 248: 6701.
- Flodin, P. (1962). Dextran gels and their application in gel filtration, Uppsala, Sweden.
- 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.
- Fruton, J.S. (1957). Enzymic hydrolysis and synthesis of peptide bonds. *Harvey Lectures Ser.*, 51: 64.
- Ghetie, V. and Mihaescu, S. (1973). The Hydrolysis of rabbit immunoglobulin G with purified cathepsins D and E. *Immunochemistry*, 10: 251.
- Gorer, J. and Gruber, M. (1970). Cathepsin C: an allosteric enzyme. *Biochim. Biophys. Acta.*, 198: 546.
- Grabar, P. and Burtin, P. (1964). Imunoelektrophoretische analyse. Elsevier, Amsterdam.
- Greenbaum, L.M. and Fruton, J.S. (1957). Purification and properties of beef spleen cathepsin B. *J. Biol. Chem.*, 226: 173.

- Greenbaum, L.M. ; Hirshowitz, A. and Shoichet, I. (1959). The activation of trypsinogen by cathepsin B. *J. Biol. Chem.*, 234: 2885.
- Groninger, H.S., Jr. (1964). Partial purification and some properties of a proteinase from albacore (Germo alalunga) muscle. *Arch. Biochem. Biophys.*, 108: 175.
- Hadler, W.A. (1962). Morfologia e distribuição das células reticulares do baço normal. Estudo efetuado mediante técnica de impregnação argênica. Tese apresentada ao concurso de habilitação à docência-livre da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- Hedin, S.G. (1903). Investigations on the proteolytic enzymes of the spleen of the ox. *J. Physiol.*, 30: 155.
- Huang, F.L. and Tappel, A.L. (1971). Action of cathepsins C and D in protein hydrolysis. *Biochim. Biophys. Acta.*, 236: 739.
- Iodice, A.A. (1967). The carboxypeptidase nature of cathepsin A. *Arch. Biochem. Biophys.*, 121: 241.
- Iodice, A.A. (1976). The inhibition by pepstatin of cathepsin D and autolysis of dystrophic muscle. *Life Sci.*, 19: 1351.
- Iodice, A.A. ; Leong, V. and Weinstock, I.M. (1966). Separation of cathepsins A and D of skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.*, 117: 477.
- Izumiya, N. and Fruton, J.S. (1965). Specificity of cathepsin C. *J. Biol. Chem.*, 218: 59.
- Jablonsky, A.I. and McQuillan, M.T. (1967). The distribution of proteolytic enzymes in the thyroid gland. *Biochim. Biophys. Acta.*, 132: 454.
- Jarvinen, M. and Hopsu-Havu, V.K. (1975). α -N-Benzoylarginine-2-naphthylamide hydrolase (cathepsin B1 ?) from rat skin. II - Purification of the enzyme and demonstration of two inhibitors in the skin. *Acta. Chem. Scand. B.*, 29: 772.

- Kabat, E.A. and Mayer, M.M. (1971). Experimental immunochemistry. Charles, C. Thomas Publ., Springfield, Ill., U.S.A.
- Kasakova, O.V. and Orekhovich, V.N. (1976). Crystallization of cathepsin D. Biochem. Biophys. Res. Commun., 72: 747.
- Keilová, H. and Tomasek, V. (1972). Effect of pepsin inhibitor from *Ascaris lumbricoides* on cathepsin D and E. Biochim. Biophys. Acta., 284: 461.
- Knight, C.G. and Barrett, A.J. (1976). Interaction of human cathepsin D with the inhibitor pepstatin. Biochem. J., 155: 117.
- Kress, L.F. ; Peanasky, R.J. and Klitgaard, H.M. (1966). Purification, properties and specificity of hog thyroid proteinase. Biochim. Biophys. Acta., 113: 375.
- Kunimoto, S. ; Aoyagi, T. ; Morishima, H. ; Takeuchi, T. and Umezawa, H. (1974) Mechanism of inhibition of pepsin by pepstatin. J. Antibiotics, 25: 251.
- Lapresle, C. (1971). Rabbit cathepsins D and E. in "Tissue proteinases" (A.J. Barrett and J.T. Dingle, eds), pp.135. North Holland, Amsterdam.
- Lapresle, C. and Webb, T. (1960). Study of proteolytic enzyme from rabbit spleen. Biochem. J., 76: 538.
- Lapresle, C. and Webb, T. (1960). Action on some synthetic peptides of protease from rabbit spleen. Nature, 188: 66.
- 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.
- Marks, N. and Lajtha, A. (1965). Separation of acid and neutral proteinases of brain. Biochem. J., 97: 74.
- Marks, N. ; Grynbaum, A. and Benuck, M. (1976). On the sequential cleavage of myelin basic protein by cathepsins A and D. J. Neurochem., 27: 765.

- Matsuda, K. and Misaka, E. (1974). Studies on cathepsins of rat liver lysosomes. I - Purification and multiple formes. J. Biochem., 76: 639.
- Matsuda, K. and Misaka, E. (1975). Studies on cathepsins of rat liver lysosomes. II - Comparative studies on multiple formes of cathepsin A. J. Biochem., 78: 31.
- McDonald, J.K. ; Zeitman, B.B. ; Callahan, P. and Ellis, S. (1974). Angiotensinase activity of dipeptidyl aminopeptidase I (cathepsin C) of rat liver. J. Biol. Chem., 249: 234.
- Menninger, H. ; Fehr, K. ; Boni, A. and Otto, K. (1976). Digestion of human immunoglobulin G by bovine cathepsin B1. Immunochemistry, 13: 633.
- Metrione, R.M. ; Neves, A.G. and Fruton, J.S. (1966). Purification and properties of dipeptidyl transferase (cathepsin C). Biochemistry, 5: 1597.
- Morrison, R.I.G. ; Barrett, A.J. ; Dingle, J.T. and Prior, D. (1973). Cathepsins B1 and D. Action on human cartilage proteoglycans. Biochim. Biophys. Acta., 302: 411.
- Moriyama, A. and Takahashi, K. (1978). The structure and function of acid proteases. VIII - Purification and characterization of cathepsin D from Japanese monkey lung. J. Biochem., 83: 441.
- Nilsson, K.K. and Fruton, J.S. (1964). Polymerization reactions catalyzed by intracellular proteinases. IV - Factors influencing the polymerization of dipeptide amides by cathepsin C. Biochemistry, 3: 1220.
- Ogino, K. and Nakashima, K. (1974). Purification of rabbit liver cathepsin B1. J. Biochem., 75: 723.
- Otto, K. (1971). Cathepsin B1 and B2. in "Tissue proteinases". (A.J. Barret and J.T. Dingle, eds.), pp.1. North Holland, Amesterdam.
- Otto, K. and Riesenkong, T. (1975). Improved purification of cathepsin B1 and cathepsin B2. Biochim. Biophys. Acta., 379: 462.
- Ouchterlony, O. (1958). Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. Progress in Allergy, 5: 1.

- Planta, R.J. ; Corter, J. and Gruber, M. (1964). The catalytic properties of cathepsin C. *Biochim. Biophys. Acta.*, 89: 511.
- Poulik, M.D. (1968). Starch gel electrophoresis. in "Methods in Immunology and Immunochemistry" (C.A. Williams and M.W. Chase, eds.), Vol.2, pp. 25. Academic press, New York and London.
- Press, E.M. ; Porter, R.R. and Cebra, J. (1960). The isolation and properties of a proteolytic enzyme cathepsin D, from bovine spleen. *Biol. J.*, 74: 501.
- Rangel, H. (1968). Estudo comparativo da catepsina D de diferentes espécies animais. *Ciência e Cultura*, 20: 633.
- Rangel, H. et Lapresle, C. (1966). Étude de la specificite sur la chain B de l'insuline des cathepsines D et E de lapin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 128: 372.
- Reich, T. ; Dierolf, B. and Reynolds, B. (1965). Plasma cathepsin-like proteinase activity during hemorrhagic shock. *J. Surg.Res.*, 5: 116.
- Rindler, R. and Braunsteiner, H. (1973). Soluble proteins from human lucocyte granules. Esterase activity of cationic proteins. *Blut.*, 27: 26.
- Rindler, R. ; Hortnagl, H. ; Schmalzl, and Braunsteiner, H. (1973). Hydrolysis of a chymotrypsin substrate and naphthol AS-D chloroacetate by human leucocyte granules. *Blut.*, 26: 239.
- Rogas-Espinosa, R. ; Dannenberg, A.M., Jr. ; Murphy, P.A.; Straat, P.A.; Huang, P.C. and James, S.P. (1973). Purification and properties of the cathepsin D type proteinase from beef and rabbit lung, its identification in macrophage *Infect. Immun.*, 8: 1000.
- Sampath-Kumar, P.S. and Fruton, J.S. (1974). Studies on the extended active sites of acid proteinases. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 71: 1071.
- Sapolsky, A.I. and Woessner, J.F., Jr (1972). Multiple formes of cathepsin D from bovine uterus. *J. Biol. Chem.*, 247: 2069.

- 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.
- Schauer, P. ; Hren-Vencelj, H. and Likar, M. (1973). On the activity of cathepsin C in human embryonic kidney cell cultures infected with Herpesvirus hominis (Herpes simplex). Experientia, 30: 232.
- Schwartz, W.N. and Bird, J.W.C. (1977). Degradation of myofibrillar protein by cathepsin B and D. Biochem. J., 167: 811.
- Shibco, S. and Tappel, A.L. (1965). Rat-Kidney lysosomes: Isolation and properties. Biochem. J., 95: 731.
- Silveira, S.R. and Hadler, W.A. (1978). Catalases and peroxidases histochemical detection; techniques suitable to discriminate these enzymes. Acta. Histochem., Bd. 63, S.1: 10.
- Sylvén, B and Snellman, O. (1974). The immunofluorescent demonstration of cathepsin B1 in tissue sections. Histochemistry, 38: 35.
- Snellman, O. and Sylvén, B. (1974). A carbohydrate inhibitor of cathepsin B activity associated with haptoglobin. Experimentia, 30: 1114.
- Sober, H.A. ; Gutter, F.J. ; Wickof, M.M. and Peterson, E.A. (1956). Chromatography of proteins. Cellulose ion exchange absorbents. J. Am. Chem. Soc., 78: 751.
- Starky, P.M. and Barrett, A.J. (1976). Neutral proteinases of human spleen. Purification and criteria for homogeneity of elastase and cathepsin G. Biochem. J., 155: 255.
- Starky, P.M. and Barrett, A.J. (1976). Human cathepsin G. Catalytic and immunological properties. Biochem. J., 155: 273.
- Suominen, J. and Hopsu-Havu, V.K. (1971). Cathepsin B in the thyroid gland. Acta. Chem. Scand., 25: 2531.

- Swanson, A.A. ; Martin, B.J. and Spicer, S.S. (1974). Human placental cathepsin B1. Isolation and some physical properties. *Biochem. J.*, 137: 223.
- Takahashi, K. ; Mizobe, F. and Chang, W.J. (1972). Inactivation of acid proteases from *Rhizopus chinensis*, *Aspergillus saitoi* and *Mucor pusillus*, and calf renin by diazoacetyl norleucine methyl ester. *J. Biochem.*, 71: 161.
- 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.
- Tang, J. (1971). Specific and irreversible inactivation of pepsin by substrate-like oxopiperazines. *J. Biol. Chem.*, 246: 4510.
- Taylor, S.L. and Tappel, A.L. (1974). Characterization of rat liver lysosomal cathepsin A1. *Biochim. Biophys. Acta.*, 341: 112.
- The, T.H. and Feltkamp, T.E.W. (1970). Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. I - Experiments on the conditions of the conjugation. *Immunology*, 18: 865.
- The, T.H. and Feltkamp, T.E.W. (1970). Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies. II - A reproducible method. *Immunology*, 18: 875.
- Umezawa, H.T. (1972). Enzyme inhibitors of microbial origin. pp.34. University park press, Baltimore, London and Tokyo.
- Umezawa, H.T.; Aoyagi, T. ; Morishima, H. ; Matsuzaki, M. ; Hamada, M. and Takauchi, T. (1970). Pepstatin, a new pepsin inhibitor produced by actinomycetes. *J. Antibiotics*, 23: 259.
- Unanue, E.R. and Cerottini, J.C. (1970). The immunogenicity of antigen bound to the plasma membrane of macrophages. *J. Exp. Med.*, 131: 711.
- Uriel, J. (1963). Characterization of enzymes in immune-precipitates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 103: 956.

- 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.
- Vesterberg, O. (1971). Isoelectric focusing of proteins. in "Methods in Enzymology" (W.B. Jakoby, ed.), Vol.22, pp. 389, Academic press, New York.
- Weichselbaun, 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.
- Weston, P.D. ; Barrett, A.J. and Dingle, J.T. (1969). Specific inhibition of cartilage breakdown. Nature, 222: 285.
- Wiener, E. and Bandieri, A. (1974). Differences in antigen handling by peritoneal macrophages from the Biozzi high and low responder lines of mice. Eur. J. Immunol., 4: 457.
- Wiggans, D.S. ; Winitz, M. and Fruton, J.S. (1954). Action of cathepsin C on dipeptide esters. Yale J. Biol. and Med., 27: 11.
- Willstatter, R. Und Bamann, E. (1929). Über die proteasen der leukocyten. Hoppe-Seyl. Z., 180: 127.
- Woessner, J.F., Jr. (1967). Cartilage: degradation and repair. (C.A.L. Bassett, ed.), pp. 99. National Academy of Science, Washington, D.C.
- Woessner, J.F., Jr. (1973). Purification of cathepsin D from cartilage and uterus and its action on the protein-polysaccharide complex of cartilage. J. Biol. Chem., 248: 1634.
- Woessner, J.F., Jr. and Shamberger, R.J.S., Jr. (1971). Purification and properties of cathepsin D from bovine uterus. J. Biol. Chem., 246: 1951.
- Yago, N. and Bowers, W.E. (1975). Unique cathepsin D type proteases in rat thoracic duct lymphocytes and in rat lymphoid tissues. J. Biol. Chem., 250: 4749.