

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



MARIA ANGÉLICA GONÇALVES

PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO DE FOSFATASES ÁCIDAS DE FÍGADO DE CAÇÃO (*RIZOPRIONODON LALANDEI*)

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato a) Maria Angélica Gonçalves e aprovada pela Comissão Julgadora.

28/5/00 Hiroshi Aoyama

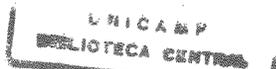
Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular na área de Bioquímica

ORIENTADOR
Prof. Dr. HIROSHI AOYAMA
Depto de Bioquímica

Doc 013554

Campinas - SP
2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



UNIDADE	BC		
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP		
	0586p		
V.	Ex.		
TOMBO BC/	42279		
PROC.	16-278100		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC@	R\$ 11,00		
DATA	22/09/00		
N.º CPD			

CM-00146986-B

31B ID 276914

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Gonçalves, Maria Angélica

G587p

Purificação parcial e caracterização de fosfatases ácidas de fígado de cação (*Rizoprionodon lalandei*)/Maria Angélica Gonçalves. -- Campinas, SP. [s.n.], 2000
77f. ilus.

Orientador: Hiroshi Aoyama

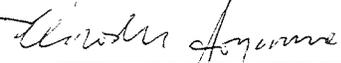
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Fosfatase ácida. 2. Enzimas. 3. Peixes. 4. Cinética. I. Aoyama, Hiroshi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título

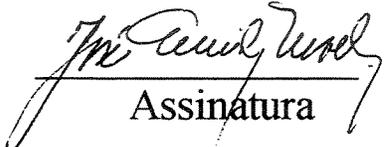
LOCAL E DATA: Campinas, 28 de junho de 2000

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. HIROSHI AOYAMA
Orientador


Assinatura

Prof. Dr. JOSÉ CAMILLO NOVELLO


Assinatura

Prof. Dr. GRACILIANO DE OLIVEIRA NETO


Assinatura

Profª. Dra. NILCE CORREA MEIRELLES

Assinatura

Aos meus pais, *João e Terezinha*, pela educação e incentivo constante para o estudo e crescimento pessoal.

Aos meus irmãos, *Celina, Elza e Dimas*, pelo incentivo, companheirismo e admiração.

A Deus

Dedico este trabalho

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Hiroshi Aoyama, pelo acolhimento em seu laboratório e grande importância nas discussões deste trabalho, bem como pela sua particular riqueza interior e experiência no relacionamento íntegro com as pessoas.

Ao prof. Eulázio M. Taga, pela atenção em que me recebeu no Depto de Bioquímica da Faculdade de Odontologia da USP-Bauru para a realização de parte deste trabalho.

A Carmen Veríssima Ferreira, Nilce Correa Meirelles e José Camillo Novello, pelas discussões e sugestões propostas no Exame de Qualificação.

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE**

Ao Mauro e Carmen, pelo grande incentivo e noites em claro para a realização deste trabalho.

A Marilena, Érika, Ana Cláudia, Marília, Thelma, Isabeli, Paulo, Patrícia, Márcio, Adriana, Paulo, Luciana, Rosiane e Francisco, Alexandre, Ana (Depto de Bioquímica), amigos da pós-graduação pelo convívio.

Aos professores Sanches, Mércia, Edson, Graciliano, Adriana, Mariane, Iara e Carla pelo apoio e sugestões apresentadas.

Aos estudantes de Iniciação Científica do laboratório de Enzimologia, pelo trabalho em grupo.

A todos amigos da Pós-graduação do Depto de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Muito obrigada aos funcionários e técnicos do Depto. de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP e do Depto. de Bioquímica da Faculdade de Odontologia da USP-Bauru.

À Sub-comissão de Pós-graduação do Depto de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Muito obrigado aos colegas e técnicos da Universidade São Francisco – Bragança Paulista.

À USF, pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE

RESUMO	i
SUMMARY	iii
ABREVIATURA	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Mecanismo de Reação	1
1.2. Distribuição das Fosfatases Ácidas	3
1.3. Características Gerais	5
1.4. Fosfatases Ácidas de Peixes	7
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1. Material	11
3.1.1. Reagentes	11
3.2. Métodos	11
3.2.1. Determinação da atividade enzimática	11
3.2.2. Determinação da proteína	13
3.2.3. Concentração da solução proteica	14
3.2.4. Tratamento das resinas	14
3.2.5. Purificação	14
3.2.5.1. Purificação da isoforma AP1	16
3.2.5.2. Purificação da isoforma AP2	17
3.2.5.2.1. Purificação da isoforma AP2A	17
3.2.5.2.2. Purificação da isoforma AP2B	18
3.2.5.6. Armazenamento da enzima	18
3.2.5.7. Determinação da massa molecular da isoforma AP1	19
3.2.6. Estudos Cinéticos	19
a. Efeito do tempo de reação	19
b. Efeito da concentração de proteína	19

c. Efeito do pH na atividade enzimática	19
d. Parâmetros Cinéticos	20
e. Efeito da temperatura na atividade enzimática	20
f. Determinação da Energia de Ativação	20
g. Efeito de alguns compostos na atividade da enzima	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. Purificação	22
4.1.1. Purificação da isoforma AP1	26
4.1.2. Purificação da isoforma AP2	30
4.1.2.1. Purificação da isoforma AP2A	33
4.1.2.2. Purificação da isoforma AP2B	37
4.2. Determinação da massa molecular relativa da isoforma AP1	40
4.3. Estudos Cinéticos da isoforma AP1	42
a. Efeito do tempo de reação	42
b. Efeito da concentração de enzima	42
c. Efeito do pH na atividade enzimática	42
d. Parâmetros Cinéticos	42
e. Efeito da temperatura na atividade enzimática	47
f. Determinação da Energia de Ativação	47
g. Efeito de metais	47
h. Efeito de inibidores	52
i. Estudo da especificidade para substratos	52
5. CONCLUSÕES	55
6. DIFICULDADES ENCONTRADAS	56
7. PERSPECTIVAS	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

RESUMO

Quatro isoformas AP1, AP2A1, AP2A2 e AP2B da fosfatase ácida (E.C. 3.1.3.2.) de fígado de cação (*Rhizoprionodon lalandei*) foram detectadas e parcialmente purificadas através de bath em Hidroxiapatita, cromatografias em colunas de SP-Sephadex, DEAE-Sephadex, Sephacryl S-200 e Concanavalina A-Sepharose 4B.

As isoformas AP2A1, AP2A2 e AP2B foram parcialmente purificadas cerca de 68; 57 e 34 vezes, com atividades específicas de 5,6; 4,7 e 2,8 $\mu\text{mol min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ respectivamente. Neste estágio de purificação, estas isoformas mostraram-se altamente instáveis.

A isoforma AP1 foi parcialmente purificada cerca 20 vezes, com atividade específica de 1,66 $\mu\text{mol min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. A massa molecular relativa da isoforma AP1, determinada por HPLC da Shimadzu (coluna Shim pack diol 150), foi de 58 kDa. Esta isoforma mostrou-se mais estável que as isoformas AP2.

As propriedades cinéticas da fração AP1 foram estudadas. A enzima apresentou alta atividade em pH 4,7 – 5,0; a temperatura ótima obtida foi de 65°C. A hidrólise a 37°C e pH 5,0 foi linear até 45 minutos e a energia de ativação para a hidrólise do pNPP, determinada pela equação de Arrhenius, foi de 39,37 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. Um valor da K_m de 0,97 mM foi obtido utilizando-se p-nitrofenilfosfato como substrato. Dentre os substratos testados, a isoforma AP1 apresentou maior especificidade pelo PPI.

Utilizando-se pNPP como substrato vários compostos foram testados como potenciais inibidores. Molibdato (0,1mM) e NaF (5mM) inibiram 100%, pCMB (1mM) e NaF (1mM) inibiram cerca de 80%, o-vanadato (0,1 mM) e tartarato (5mM) , cerca de 50%.

Baseado no estudo de inibidores a isoforma AP1 da fosfatase ácida de cação apresenta características mais similares as fosfatases ácidas de mamíferos de alta massa molecular.

SUMMARY

Four isoforms AP1, AP2A1, AP2A2 and AP2B of acid phosphatase (E.C. 3.1.3.2.) were detected and partially purified from shark (*Rhizoprionodon lalandei*) liver through bath Hydroxyapatite, chromatography columns of SP-Sephadex, DEAE-Sephadex, Sephacryl S-200 and Concanavalin A-Sepharose 4B.

The fractions AP2A1, AP2A2 and AP2B were purified 68.3; 57.3 and 34.2-fold, with specific activities of 5.6; 4.7 and 2.8 $\mu\text{mol min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ respectively.

The fraction AP1 was partially purified 20-fold, with specific activity of 1,66 $\mu\text{mol min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$. The relative molecular mass of this fraction, determined by HPLC (Shim pack diol 150 column), was 58 kDa. At this stage of purification the fraction AP1 has shown to be more stable than the isoforms AP2.

The kinetic properties of the AP1 fraction were determined using p-nitrophenyl phosphate (pNPP) as substrate. High activities were observed at pH around 4.7 – 5.0, and temperature of 65^o C, at temperature of 37^oC, pH 5.0 the hidrolisis was linear up to 45 minutes. The activation energy value of 39,37 $\text{kJ}.\text{mol}^{-1}$ for the hidrólisis of pNPP, was calculated from the Arrhenius equation. An apparent K_m value of 0.97 mM was determined for pNPP. From the substrates tested, inorganic pyrophosphate was the best substrate, whit a 5-fold lower K_m and 2-fold higher specificity constant, when compared with pNPP.

Several compounds were tested as potential inhibitors, with pNPP as substrate. Molybdate (0.1mM) and fluoride (5mM) inhibited 100%; p-CMB (1mM) and NaF (1mM) inhibited about 80%, and o-vanadate (0.1 mM) and tartrate (5mM), about 50%.

Based on inhibitors studies the AP1 isoform of acid phosphatase purified from shark liver presents more similar characteristics the fosfatases acid of mammals of high molecular mass.

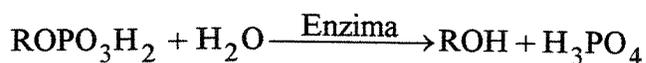
ABREVIATURAS

AMr	Alta Mr
BMr	Baixa Mr
BSA:	Albumina do soro bovino
E:	Enzima
FAc:	Fosfatase ácida
IMr	Intermediária Mr
Km:	Constante de Michaelis-Menten
Mr:	Massa molecular relativa
P ou Pi:	Fosfato inorgânico
pCMB:	p-cloromercúriobenzoato
pNP:	p-nitrofenol
pNPP:	p-nitrofenilfosfato
Vmax:	Velocidade máxima

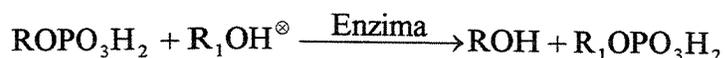
1. INTRODUÇÃO

As fosfatases ácidas ou ortofosfato monoéster fosfohidrolases (E.C. 3.1.3.2.) pertencem a uma classe de enzimas que catalisa reações de hidrólise de uma grande variedade de ésteres ortofosfato e reações de transfosforilação (SAEED et alii, 1990), como esquematizado a seguir:

Hidrólise



Transfosforilação



⊗ Aceptor de fosfato

1.1. Mecanismos de reação

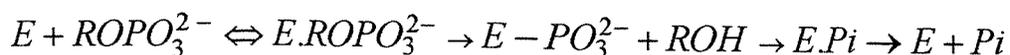
A fosfatase ácida foi inicialmente observada em eritrócitos (ROCHE, 1931), sendo capaz de hidrolisar a ligação éster do fosfato do monofenilfosfato e monoalquilfosfato, com pH ótimo entre 5,0 e 6,0, ao contrário da fosfatase de glóbulos brancos que catalisava esta reação com um pH ótimo de 8,8 a 9,0.

A distinção entre as fosfatases ácidas e fosfatases alcalinas, inicialmente era baseada somente no pH ótimo para atividade enzimática. Posteriormente, outras características relacionadas com o mecanismo de reação ajudaram a diferenciar estas duas classes de enzimas. NEUMAN (1968) observou que as fosfatases alcalinas, além da hidrólise dos substratos usuais, catalisavam também a hidrólise de monoésteres S-substituídos de ácido fosforotióico

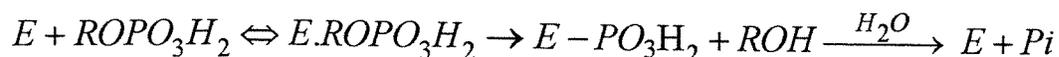
RSPO₃Na₂ do tipo S-P, produzindo ortofosfato e o tio-álcool correspondente. Já as fosfatases ácidas, por sua vez, catalisam a hidrólise de monoésteres O-substituídos de ácido fosforotióico do tipo ROPO₂SKH, produzindo o álcool e o tiofosfato. Estes fatos nos permitem visualizar mecanismos de reação diferentes para as duas enzimas, uma vez que a fosfatase ácida requer para sua atividade um oxigênio entre o radical e o fosfato. CHAIMOVICH & NOME (1970) observaram que a fosfatases ácidas eram insensíveis à presença de cátions mono e bivalentes no meio de reação, ao contrário das fosfatases alcalinas que requerem metais, principalmente o Mg²⁺, para sua atividade (REID & WILSON, 1971).

VINCENT et alii (1992) propuseram outra diferença para estas duas classes de enzimas, sugerindo suas vias catalíticas:

Fosfatase Alcalina



Fosfatase Ácida



No caso da fosfatase alcalina, em pH acima de 7, o complexo E.Pi é limitante da velocidade e a espécie E-PO₃²⁻ contém um grupo fosfoserina que é lábil em meio básico e estável em meio ácido, característica apropriada para esta fosfatase. No entanto, para a fosfatase ácida, o complexo E.Pi não foi observado, mas provavelmente o mesmo possa ser um intermediário, uma vez que o Pi atua como um inibidor competitivo da reação enzimática. Para a

fosfatase ácida de alta massa molecular (vide adiante a classificação) da próstata e gérmen de trigo estes autores sugeriram que o intermediário (E- PO_3H_2) da reação seria a fosfohistidina, que é lábil em meio ácido. Para a fosfatase ácida de baixa massa molecular, embora estudos de modificação química e dependência do pH indiquem que este intermediário também seria a fosfohistidina, relatos na literatura mostram que os grupos sulfidrila apresentam um papel essencial na catálise, pois estas fosfatases são fortemente inibidas por reagentes que se ligam a estes grupos (LAIDLER et alii, 1982).

As fosfatases ácidas apresentam diferentes características físico-químicas, tais como: diferentes valores de massa molecular relativa, de pI, presença ou não de carboidratos nas moléculas, presença de um centro metálico (VICENT et alii, 1992 e DUFF et alii., 1994).

1.2. Distribuição das Fosfatases Ácidas

A distribuição das fosfatases ácidas na natureza é ampla. Vários aspectos destas enzimas foram estudados em microorganismos (LOVELACE et alii, 1986; SCHELL et alii, 1990; GONZÁLEZ et alii, 1993; HAN et alii, 1994). DIBENEDETTO & COZZANI (1975) purificaram e estudaram algumas propriedades da fosfatase ácida de *Schizosaccharomyces pombe* a qual apresentou uma ampla especificidade pelo substrato e uma massa molecular relativa de 383 kDa, sendo que 66% desta massa correspondia a carboidratos. As propriedades cinéticas desta fosfatase foram similares às de outras leveduras. No entanto, a enzima de levedura apresentou um pH ótimo menor (3,0), e uma atividade específica 5 a 6 vezes maior que a fosfatase de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta diferença na atividade específica da mesma enzima de espécies relacionadas pode indicar mecanismos de regulação

diferentes ou a existência de múltiplas formas enzimáticas com diferente eficiência catalítica. Comumente a expressão da fosfatase ácida em microorganismos é controlada por fatores ambientais. Dificilmente é sintetizada na fase de crescimento exponencial mas sim na fase estacionária, sugerindo que sua síntese ocorreria em resposta à limitação de algum nutriente. A privação do fosfato inorgânico extracelular ou a anaerobiose geralmente causa a imediata síntese da enzima (DASSA et alii, 1982).

Esta ampla distribuição também ocorre no reino vegetal (DUFF e alii., 1994). A importância do estudo das fosfatases ácidas em plantas decorre principalmente da sua possível participação no metabolismo do fósforo, bastante importante para o crescimento normal e para o desenvolvimento dos órgãos das plantas (BASHA, 1984) e em resposta a diferentes tipos de “stress”: ferimentos, diminuição da disponibilidade de fosfato, etc. (DUFF e alii., 1994).

Em tecidos animais ocorrem ao menos três tipos de fosfatases ácidas com uma distribuição extremamente variada, podendo ser encontradas em secreções como saliva, sêmen, e em diversos tecidos tais como: próstata, placenta, testículo, cérebro, fígado, coração, baço, glândulas salivares, osso, dente, gengiva, nervos e gânglios nervosos. No sangue, esta enzima pode ser detectada tanto nos eritrócitos, plaquetas e leucócitos quanto no plasma, onde algumas vezes é utilizada como meio de diagnóstico para algumas doenças (TAGA, 1979; GRANJEIRO, 1994, BEN-ARIE, 1999).

1.3. Características gerais

As fosfatases ácidas de tecidos animais podem ser distintas quanto à massa molecular, localização no interior da célula, especificidade quanto ao substrato e sensibilidade a inibidores.

As fosfatases ácidas de alta massa molecular relativa, maior que 100 kDa, estão geralmente localizadas na fração lisossomal e microsomal das células (DI PIETRO & ZENGERLE, 1967; BECK et alii, 1986) e são expressas preferencialmente em tecidos que estão em proliferação celular (PANARA et alii, 1992). As fosfatases ácidas de baixa massa molecular, menor que 20 kDa, que parecem ser característica de tecidos altamente diferenciados como músculos, nervos e eritrócitos, juntamente com as de massa molecular intermediária, em torno de 40 kDa, são encontradas no citossol (De ARAÚJO et alii, 1976; HELWING et alii, 1977; GALKA et alii, 1980; FUJIMOTO et alii, 1984; GRANJEIRO et alii, 1997).

Além de diferir quanto à massa molecular, as formas de AMr são fortemente inibidas por tartarato e fluoreto (SHIBKO & TAPPEL, 1963; DI PIETRO & ZENGERLE, 1967) e são insensíveis a agentes bloqueadores de grupos -SH e ao formaldeído, enquanto as de BMr são relativamente insensíveis a estes inibidores e sensíveis ao pCMB, composto que se liga especificamente a grupos -SH livres (TAGA & VAN ETTEN, 1982). As fosfatases ácidas de IMr são pouco sensíveis ao tartarato, pCMB e íons metálicos (HAYMAN et alii, 1989).

Quanto à especificidade pelo substrato, as fosfatases ácidas de BMr massa molecular são mais específicas, enquanto as de AMr e IMr hidrolisam uma ampla variedade de compostos fosforilados (SAEED et alii, 1990). Estas duas últimas podem ainda apresentar metais como ferro, magnésio ou manganês ligados à sua estrutura.

Atualmente as FAcS de BMr são classificadas como fosfotirosina proteína fosfatases, tendo este fato sido inicialmente relatado por LAU et alii (1987).

A existência de diversas formas isoenzimáticas da fosfatase ácida num mesmo tecido tem sido demonstrada, sendo diferenciadas pelas Mr, especificidade quanto aos substratos, sensibilidade a inibidores, pI, pH ótimo, temperatura ótima, presença de mais de uma cadeia polipeptídica, presença de carboidratos ligados à cadeia polipeptídica.

Algumas fosfatases ácidas podem conter carboidratos em suas estruturas, como as de próstata humana (OSTROWSKI et alii, 1976), de tubérculo de batata (KRUZEL & MORAWIECKA, 1982), de fígado de rã (JANSKA et alii, 1989), sendo que variações da enzima podem resultar apenas de modificações na composição de carboidratos de sua estrutura (JANSKA et alii, 1986).

Quanto ao número de cadeias as fosfatases ácidas podem ser monômeros ou apresentar mais de uma cadeia polipeptídica. A enzima purificada da semente de papoula é um dímero (CHUNG & POLYA, 1992) e a de semente de amendoim é composta por 6 dímeros (BASHA, 1984).

Quanto à presença de centros metálicos, foram purificadas fosfatases ácidas de tubérculos de batata doce que possuem ligados à sua estrutura manganês (SUGIURA et alii, 1981), ferro e zinco (SCHENK et alii, 1999).

Determinadas fosfatases ácidas são inibidas por metais e fluoreto.

1.4. Fosfatases Ácidas de Peixes

Em peixes, que estão entre os vertebrados mais inferiores, até o momento, são escassos os relatos sobre fosfatases ácidas, principalmente com relação aos peixes nacionais. Alguns estudos das fosfatases ácidas de peixes concentram-se no relevante papel que as mesmas desempenham no monitoramento do controle de qualidade de águas (GILL et alii, 1990; SIDIK

et alii, 1990), da poluição dos rios por resíduos industriais (BHATTACHARYA et alii, 1989; DREWA et alii, 1992; BUCHER et alii, 1992) e no estudo do efeito do acúmulo de metais pesados (VERMA et alii, 1985; KRALJ-KLOBUCAR, 1994; KOZARIC et alii, 1993; GILL et alii, 1991 e 1992; KOZARIC et alii, 1992; FLEMING et alii, 1987; IKEDA et alii, 1986) e agrotóxicos (MEDDA et alii, 1995; SHAIKILA et alii, 1993; SHAFFI et alii, 1989; CHU et alii, 1986) nos órgãos dos peixes e na água.

Em 1985, KUBICZ et alii relataram o isolamento e caracterização de uma fração homogênea de fosfatase ácida de bagre. Concluíram que a enzima era uma metaloenzima, possuía característica de dímero, consistindo de 2 subunidades com massa molecular total de 82,5 e que a mesma era inibida por tartarato.

JANSKA & KUBICZ (1985) relataram a presença de carboidratos na composição da isoformas I das três fosfatases ácidas separadas da carpa, *Cyprinus carpio*. Um ano mais tarde, em 1986, JANSKA et alii publicaram um relato sobre a presença de carboidratos nas duas formas de fosfatase ácida (AcPase I e II) de bagre, apresentando essas duas formas, diferentes propriedades cinéticas e de constituição de carboidratos. Elevadas concentrações de íons Fe^{3+} inibem a atividade das duas formas de fosfatase ácida encontradas no fígado deste peixe.

PANARA & PASCOLINI (1989) isolaram 2 formas de fosfatases ácidas de carpa: AcPase I apresentando Mr 118,0, inibida por NaF e tartarato, com pH ótimo entre 4,3 e 5,6 e que hidrolisava vários ésteres fosfóricos e, AcPase II que apresentava Mr 16,6, era insensível a NaF e tartarato, mas fortemente inibida por reagentes sulfidrílicos; possuía pH ótimo entre 4,8 e 6,2, sendo que ésteres fosfóricos eram pobres substratos. Os autores

concluíram que as fosfatases ácidas desse peixe apresentavam propriedades similares às fosfatases ácidas relatadas para pássaros e mamíferos.

2. OBJETIVOS

Em nosso laboratório tem sido realizados estudos de purificação e caracterização de fosfatases ácidas de órgãos de mamíferos e de plantas. Neste contexto, foram estudados fosfatases ácidas de BMr de rim bovino (GRANJEIRO et alii, 1997), de sementes de soja (FERREIRA et alii, 1998) e de mamona (GRANJEIRO et alii, 1999).

Um fato que nos chamou a atenção, como já mencionado, foi que a maior parte dos trabalhos sobre fosfatases ácidas de peixes focalizava a relação existente entre atividade enzimática e qualidade da água, com vistas à poluição, principalmente por metais pesados. Consequentemente, existe uma escassez de trabalhos relativos à identificação, purificação e caracterização cinética de fosfatases ácidas em peixes, especialmente com relação a espécies brasileiras.

No levantamento bibliográfico realizado sobre fosfatases ácidas de peixes, constatou-se que a maioria dos trabalhos citados é a esse respeito.

Assim seriam relevantes estudos sobre purificação e caracterização de fosfatases ácidas de peixes.

Trabalhamos com o peixe marinho de nome vulgar cação pertencente ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, classe *Chondrichthyes*, ordem *Elasmobranchii*, família *Carcharhinidae*, gênero *Rhizoprionodan*, espécie *Rhizoprionodan lalandei* (FERREIRA, 1988). Este gênero compreende sete espécies distribuídas pelo Pacífico, Atlântico e Índico; são cações de pequeno a médio porte que ocorrem preferencialmente em águas costeiras de regiões tropicais. Na costa brasileira está registrada a ocorrência de duas espécies *Rhizoprionodan porosus*, em toda a costa, e *Rhizoprionodan lalandei*, com limite Sul em Santa Catarina, tendo sido também observada na costa do Rio Grande do Sul.

Escolheu-se o cação, *Rhizoprionodan lalandei*, como fonte de fosfatase ácida pela inexistência de referências específicas deste peixe, e também pela grande quantidade de material disponível para a purificação enzimática.

Os objetivos deste trabalho foram:

- purificação de fosfatases ácidas de fígado de cação,
- estudos cinéticos de uma fosfatase ácida purificada parcialmente.

Foram determinadas as condições ótimas da reação enzimática; os parâmetros cinéticos, como K_m , $V_{máx}$ e energia de ativação; estudos de especificidade pelo substratos; efeitos de potenciais inibidores e de outros compostos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

O fígado de cação, *Rhizoprionodan lalandei*, foi obtido junto ao Instituto de Pesca de Santos - SP.

3.1.1. Reagentes

Resinas para cromatografia: SP-Sephadex C50-120, DEAE Sephadex, Sephacryl-S200 (Pharmacia), Hidroxiapatita, ConA-Sepharose 4B (Sigma).

Substratos: p-nitrofenil-fosfato, tirosina-P, pirofosfato, flavina mono nucleotídeo (Sigma).

Inibidores: molibdato de amônio, fluoreto de sódio (Merck), o-vanadato, pCMB, piridoxal-P, tartarato, fosfato inorgânico (Sigma).

Reagentes para preparo dos tampões: ácido acético, glicina, tris (Merck); imidazol, bis-tris, citrato (Sigma)

Reagentes redutores de tióis: ditioneitol (Sigma).

Padrões para determinação da massa molecular em filtração em gel (Pharmacia).

Os demais reagentes utilizados possuíam grau analítico. Em todos os experimentos foi utilizada água destilada e deionizada.

3.2. Métodos

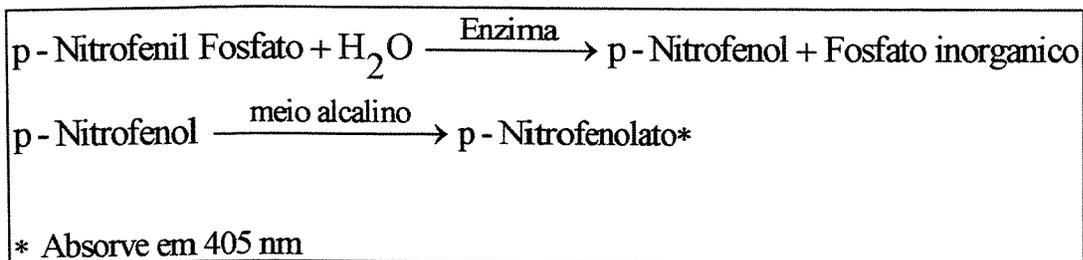
3.2.1. Determinação da atividade enzimática

Para a determinação da atividade, a amostra foi diluída, imediatamente antes do ensaio, em tampão acetato 100 mM, pH 5,0, de modo a proporcionar uma absorbância adequada (geralmente em torno de 0,4), no comprimento de onda de acordo com o método utilizado.

A atividade enzimática foi determinada por dois métodos, dependendo do substrato utilizado:

a) Dosagem do p-nitrofenol

A atividade enzimática foi determinada a 37 °C usando p-nitrofenilfosfato 5,0 mM, como substrato, em tampão acetato 0,1 M (pH 5,0), em um volume final de 1 mL. A reação foi paralisada 20 minutos após a adição da enzima, com 1 mL de hidróxido de sódio 1M. A absorvância do pNP foi mensurada a 405 nm (CHAIMOVICH & NOME, 1970), cujo coeficiente de extinção molar é de $1,83 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), conforme as reações abaixo:



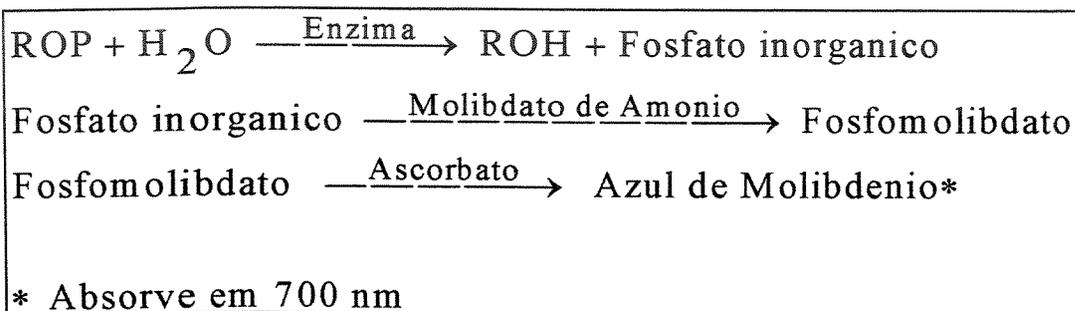
Uma unidade enzimática (UE) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de p-nitrofenol por minuto. A atividade específica (A.E.) é definida como UE por mg de proteína.

Na purificação da enzima, a atividade das frações eluídas nas colunas de cromatografias foi determinada utilizando-se pNPP como substrato e um tempo de reação de 2 minutos.

b) Dosagem do fosfato

Este método foi utilizado no caso de substratos diferentes do pNPP, os quais foram utilizados numa concentração final de 10 mM.

A reação procedeu como descrito em (a), exceto que a paralisação da mesma foi feita pela adição de 1 mL de molibdato de amônio 3% (em tampão acetato 0,2 M, pH 4,0). A coloração do complexo fosfomolibdico foi adquirida pela adição de ácido ascórbico 1% (em tampão acetato 0,2 M, pH 4,0), como redutor, de acordo com o método descrito por LOWRY & LOPEZ (1945). A absorbância foi medida a 700 nm, 30 minutos após a adição do ácido ascórbico. O coeficiente de extinção molar do complexo reduzido é $4.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.



3.2.2. Determinação de proteína

A proteína foi quantificada pelo método de Lowry, como descrito por HARTREE (1972), utilizando a albumina de soro bovino como padrão. A reação foi iniciada pela adição de 2,0 mL do Reagente C a 0,2 mL da amostra. Após 10 min, adicionou-se 0,2 mL do Reagente de Folin-Ciocalteau (1:1). A leitura da absorbância foi realizada a 660 nm, 30 min após a adição do reagente de Folin-Ciocalteau à temperatura ambiente.

- . Reagente A - Carbonato sódio 2% em NaOH 0,1 M
- . Reagente B - $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,5% em Citrato de Sódio 1%
- . Reagente C - 1 mL Reagente B + 50 mL Reagente A
- . Reagente de Folin-Ciocalteau (diluído 1:1 em H_2O)

O perfil proteico das amostras eluídas nas colunas foi estabelecido através da leitura direta da absorbância a 280 nm, de acordo com LAYNE (1957).

3.2.3. Concentração da solução proteica

A concentração de soluções contendo mais de 1mg/ml de proteína foi realizada por precipitação com sulfato de amônio a 90% de saturação. A concentração de soluções proteicas nas das etapas finais da purificação foi realizada por ultrafiltração à pressão positiva de Nitrogênio, em aparelho AMICON R-402, usando-se membrana do tipo PM-10.

3.2.4. Tratamento das resinas

As resinas de troca iônica (SP-Sephadex e DEAE-Sephadex) e de filtração em gel (Sephacryl S-200) foram hidratadas em água, de acordo com FISHER (1969) e, posteriormente, no tampão de equilíbrio, por um período de 24 h.

A resina de ConA Sepharose 4B foi equilibrada com tampão tris-HCl 10 mM pH 7,5.

A resina Hidroxiapatita foi preparada segundo método descrito por LEVIN (1959) e modificada por BERNARDI em 1971.

Antes da montagem das colunas as resinas foram deaeradas a vácuo.

3.2.5. Purificação

A metodologia utilizada para a purificação da fosfatase ácida do fígado de cação foi realizada a partir de 2000 g de fígado.

Todas as etapas que se seguem foram realizadas a 4°C.

a. Obtenção do extrato

O fígado de cação (2000g), após descongelado e cortado em fatias, foi homogeneizado em tampão acetato 100 mM, pH 5,0 (homogeneizador Omni-mixer Sorvall, 3 min, veloc. máx.), na proporção de 1,0 g de tecido para 4,0 mL de tampão. A solução final obtida permaneceu sob agitação por 60 min. Em seguida, centrifugou-se o homogeneizado a 10.000 x g, por 20 min. Desprezado o precipitado, coletou-se o sobrenadante, o qual foi filtrado em gaze dobrada 4 vezes. O filtrado obtido (7800 mL) constituiu o extrato bruto.

b. Precipitação com sulfato de amônio

O homogeneizado obtido foi concentrado overnight, sob agitação, com sulfato de amônio sólido a 90% de saturação (662g por litro); após centrifugou-se a 12.000 x g por 30 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspensão, no menor volume possível, em tampão acetato 100 mM (pH 5,0). Em seguida procedeu-se a diálise contra tampão acetato de sódio 10 mM (pH 5,0). A suspensão resultante foi centrifugada a 12.000 x g por 30 min.

c. Cromatografia em SP-Sephadex

A amostra clarificada (532 mL), obtida na etapa anterior, foi aplicada a uma coluna de SP-Sephadex C - 50 (4,5 x 16,5 cm), previamente equilibrada com tampão acetato 10 mM (pH 5,0). A lavagem da coluna ocorreu com o mesmo tampão até A_{280} praticamente igual a zero. A eluição da atividade se deu aplicando tampão fosfato 300 mM (pH 6,0).

Foram coletadas frações de 20,0 mL por tubo, sob um fluxo de 4,0 mL/min. As amostras contendo atividade enzimática superior a 0,1 UE/ml, obtidas durante a lavagem da coluna com o tampão de equilíbrio, foram reunidas (fração AP1, 670 mL) e a solução resultante foi concentrada com sulfato de amônio a 90% de saturação.

A aplicação do tampão fosfato 300 mM (pH 6,0) proporcionou a eluição da fosfatase ácida retida na coluna, a qual foi reunida na fração AP2 (440 ml), concentrada com sulfato de amônio sólido a 90% de saturação.

A partir desta etapa foram utilizadas as terminologias isoforma *AP1* e isoforma *AP2* para os picos contendo atividade fosfatásica obtidos nos cromatogramas.

3.2.5.1. Purificação da isoforma AP1

a - Cromatografia em DEAE-Sephadex

Após a precipitação com sulfato de amônio e posterior diálise o material resultante foi centrifugado a 12.000 x g por 20 min. O sobrenadante (115 ml) foi aplicado a uma coluna de DEAE-Sephadex-A-50 (2,5 x 9,0 cm), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM (pH 7,5). Foram coletadas frações de 24,0 mL, sob um fluxo de 4,0 ml/min. A eluição da atividade enzimática remanescente foi realizada através de tampão Tris HCl 10 mM (pH 7,5) com 200 mM NaCl.

b - Cromatografia em Hidroxiapatita

Ao pool I foi adicionado hidroxiapatita, deixado sob agitação, centrifugado, e determinada atividade enzimática no sobrenadante. O processo foi repetido até não mais detectar-se atividade no sobrenadante. Para a eluição da atividade, a resina foi tratada com tampão fosfato 300 mM pH 7,5, na qual obteve-se um Pool com 328 mL, que foi concentrado com sulfato de amônio a 90% de saturação, dialisado e centrifugado.

c - Cromatografia em Sephacryl S-200

A amostra, proveniente do tratamento com sulfato de amônio (42 mL) foi concentrada por ultrafiltração e a fração obtida (12mL) foi aplicada a uma coluna de Sephacryl S-200 (3,0 x 110 cm) previamente equilibrada com

tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0 contendo 0,5M de NaCl. A enzima foi eluída pela passagem do tampão de equilíbrio, com fluxo de 60 ml/h, coletando-se 12ml/tubo. As amostras contendo atividade foram reunidas (60 ml), concentradas com sulfato de amônio 90%, dialisadas contra tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 contendo 10mM de fosfato e concentradas por ultrafiltração até o volume de 6 mL.

3.2.5.2. Purificação da fração AP2

a - Cromatografia em DEAE-Sephadex

O procedimento foi análogo ao descrito para a fração AP1.

Durante a lavagem da coluna obtivemos um pico de atividade (Fração AP2A, 215 mL). A aplicação de tampão Tris HCl 10 mM (pH 7,5) com 150 mM NaCl proporcionou a eluição da fosfatase ácida retida na coluna, a qual foi reunida na fração AP2B (356 mL) e concentrada com sulfato de amônio.

3.2.5.2.1. Purificação da fração AP2A

a - Cromatografia em ConA Sepharose

A fração AP2A (215 mL) obtida da cromatografia em DEAE-Sephadex foi aplicada a uma coluna de ConA Sepharose 4B (2,0 x 7,5 cm) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM (pH7,5). A coluna foi então exaustivamente lavada com tampão Tris-HCl 10 mM (pH7,5) contendo 1 M de NaCl. Foram coletadas frações de 4,8 mL por tubo. O pico de atividade foi eluído com tampão Tris-HCl 10 mM (pH7,5) contendo 1 M de NaCl, 1M de glicose e 0,2M de α -metilmanopiranosídeo. As amostras coletadas que apresentaram atividade foram reunidas e concentradas por ultrafiltração.

b - Cromatografia em Sephacryl S-200

A fração (7,5 mL) proveniente da cromatografia de ConA-Sepharose foi aplicada a uma coluna de Sephacryl S-200 (3,0 x 110 cm) previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0 contendo 0,25M de NaCl. A enzima foi eluída pela passagem do tampão de equilíbrio com fluxo de 60 mL/h, coletando-se 10,6 mL/tubo. As amostras eluídas *AP2A1* (41 mL) e *AP2A2* (154 mL) contendo atividade foram reunidas, concentradas com sulfato de amônio 90%, dialisadas contra tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 contendo 10mM de fosfato e concentradas por ultrafiltração.

3.2.5.2.2. Purificação da fração AP2B

a - Cromatografia em SP-Sephadex

A fração AP2B obtida na DEAE-Sephadex, após concentração com sulfato de amônio, dialisada e centrifugação (64 mL) foi aplicada a uma coluna de SP-Sephadex C - 50 (4,5 x 16,5 cm), previamente equilibrada com tampão acetato 10 mM (pH 5,0). A eluição da atividade se deu aplicando um gradiente linear constituído de 200 mL de tampão de equilíbrio e 200 mL do mesmo tampão contendo 0,5 M de NaCl.

Foram coletadas frações de 35,0 mL por tubo, sob um fluxo de 4,0 mL/min. As amostras contendo atividade enzimática superior a 0,1 UE/mL (208 mL), foram reunidas e concentradas com sulfato de amônio a 90% de saturação.

b - Cromatografia em ConA-Sepharose

A fração AP2B, proveniente da cromatografia de SP-Sephadex, após tratamento com sulfato de amônio (18,2 mL) foi aplicada a uma coluna de ConA Sepharose 4B, procedendo-se como já descrito para a fração AP2A.

3.2.5.6. Armazenamento da enzima

Após a última cromatografia, cada isoforma foi dialisada contra tampão acetato 0,1M, pH 5,0, 10mM fosfato, concentrada por ultrafiltração e armazenada a -20°C, com 50% de glicerol.

3.2.5.7. Determinação da massa molecular

A massa molecular da isoforma *API* foi determinada por HPLC (Shimadzu), utilizando a coluna Shim Pack Diol-150, equilibrada com tampão acetato 0,1 M, pH 5,0 contendo 0,25 M de NaCl. Os seguintes marcadores de massa molecular foram utilizados: Ribonuclease B (14,7 kDa), Ovalbumina (43 kDa), BSA (67 kDa) e Quimotripsinogênio (25,6 kDa).

3.2.6. Estudos cinéticos

Com a isoforma AP1 parcialmente purificada, realizaram-se alguns estudos cinéticos, sendo que os resultados mostrados foram obtidos a partir das médias de quadruplicatas.

a. Efeito do tempo de reação

A atividade enzimática foi determinada nas condições de ensaio descritas com pNPP como substrato (método a), exceto que o tempo de reação variou de 1 a 45 minutos, utilizando 0,4 µg de proteína por tubo. Para cada tempo foi feito um branco, sendo que neste tubo o hidróxido de sódio foi adicionado antes da enzima.

b. Efeito da concentração da enzima

A concentração da enzima foi variada de maneira a obter-se uma absorbância a 405 nm entre 0,1 e 1,0. A atividade foi determinada como descrito com pNPP como substrato.

c. Efeito do pH na atividade da enzimática

O efeito do pH foi realizado em meios de incubação preparados com diferentes tampões: Glicina, Acetato, Bis-tris e Imidazol 100 mM (pHs 2,5-9,0). A atividade foi determinada como já descrito utilizando 0,4 µg de proteína por tubo, com um controle para cada pH.

d) Parâmetros Cinéticos

A determinação da atividade da isoforma purificada foi realizada variando-se a concentração dos substratos, como já descrito em método a para o pNPP e para outros substratos dosando-se o fosfato liberado no meio de reação como descrito (método b), utilizando-se 0,4 µg de proteína por tubo. A atividade sobre o pNPP foi considerada como 100%.

Os valores da K_m e V_{max} foram calculados pelo ajuste da curva velocidade x concentração de substrato (hipérbole retangular).

e) Efeito da temperatura na atividade enzimática

O estudo do efeito da temperatura na atividade da fração purificada foi realizado com pNPP como substrato, sendo a temperatura variada de 10 a 80°C em vários tempos de reação.

f) Determinação da Energia de Ativação

A energia de ativação (E_a) foi determinada através da equação de Arrhenius:

$$\log \frac{k_2}{k_1} = \frac{E_a}{2,3R} \left(\frac{T_2 - T_1}{T_1 \cdot T_2} \right)$$

Onde:

k_1 = constante de velocidade na temperatura 1

k_2 = constante de velocidade na temperatura 2

E_a = Energia de Ativação

R = Constante Geral dos Gases (8,315 J/mol.K)

T = Temperatura absoluta (K)

As constantes de velocidade k_1 e k_2 foram determinadas experimentalmente, nas temperaturas de 37°C e 47°C variando-se o tempo de reação. As inclinações das retas, em cada caso, forneceram os valores da k_1 e k_2 .

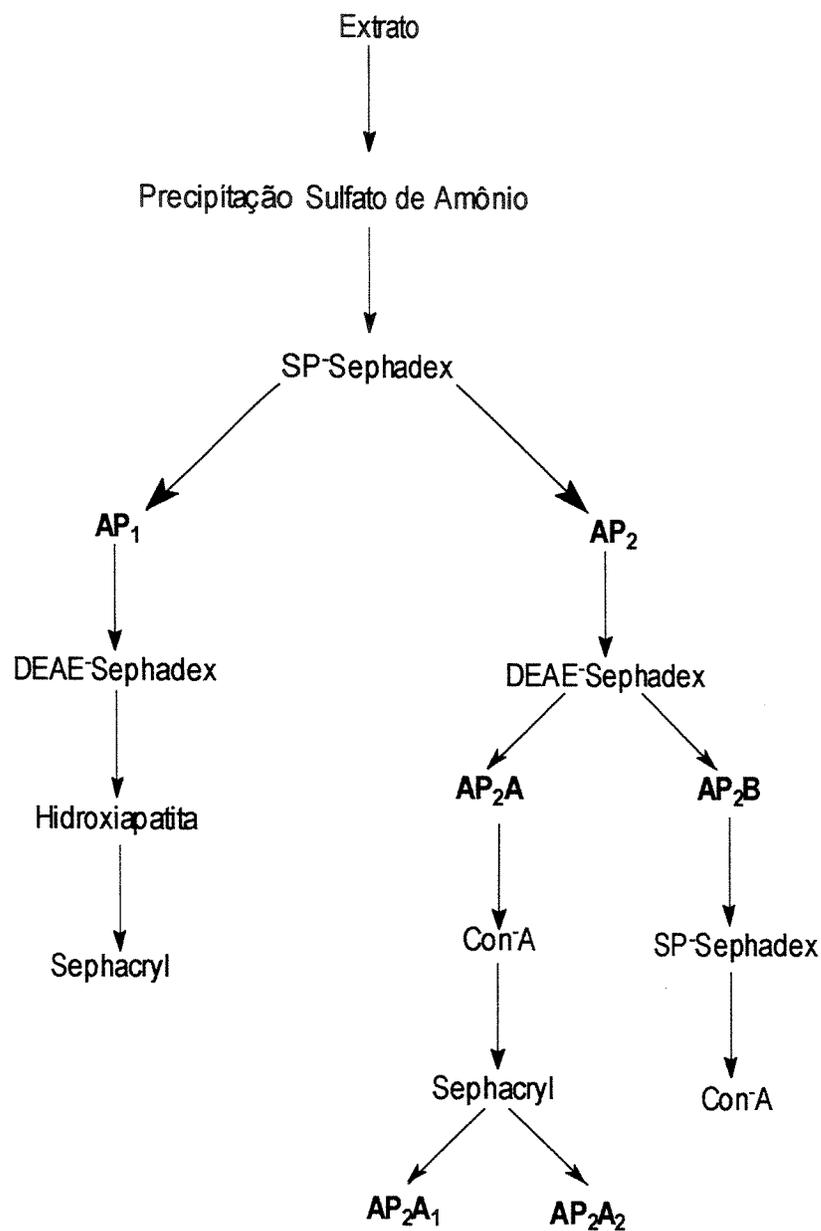
g) Efeito de alguns compostos na atividade

A atividade da isoforma AP1 purificada foi determinada na presença de metais, potenciais inibidores e outros compostos, utilizando-se pNPP como substrato. A atividade na ausência do composto foi considerada como 100%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Purificação

A purificação da fosfatase ácida a partir de fígado de cão foi realizada de acordo com o seguinte esquema:



a. Obtenção do extrato

As condições ótimas para a obtenção do extrato foram previamente determinadas no laboratório. O extrato (7800 mL), contendo a enzima solúvel, apresentou 0,656 UE/ml ou 0,0825 UE/mg (Tabela 1).

b. Precipitação com sulfato de amônio (90%)

O extrato bruto foi tratado com sulfato de amônio a 90% de saturação para garantir que todas as frações contendo atividade enzimática pudessem ser precipitadas. Uma parte de proteína contaminante (cerca de 58%) foi eliminada após diálise contra tampão acetato 0,01M pH 5,0 e centrifugação. A atividade específica foi de 0,138 e aumentou 1,69 vezes.

c. Cromatografia em SP-Sephadex

Através da cromatografia em SP-Sephadex (Figura 1) foi possível separar duas frações contendo atividade (AP1 e AP2), coincidentes com dois picos de proteína. A fração AP1 foi eluída durante a lavagem com o tampão de equilíbrio (tampão acetato 0,01M, pH 5,0) sugerindo portanto, que o pI desta enzima é menor ou igual a 5,0. A fração AP2, foi eluída com tampão fosfato 0,3M, pH 6,0. Normalmente, a eluição de proteínas da coluna de troca iônica é feita pela mudança do pH ou da força iônica. Neste caso, a eluição foi realizada tanto pela mudança de pH, quanto por íon afinidade, utilizando fosfato, de acordo com o método descrito por LAWRENCE & VAN ETTEN (1981), aproveitando-se a afinidade que o mesmo tem pela enzima, uma vez que é um clássico inibidor competitivo das fosfatases ácidas. Isto fez com que as fosfatases presentes na amostra fossem eluídas, possivelmente, por alteração de suas cargas líquidas e, conseqüentemente, das suas conformações. Este tipo de eluição é importante pois muitas outras proteínas contaminantes ficaram retidas na coluna. Após esta cromatografia, as frações *AP1* e *AP2*

apresentaram uma atividade específica de 0,186 UE/mg e 0,302 UE/mg de proteínas respectivamente (Tabela 1).

TABELA 1

Etapas iniciais da purificação da Fosfatase Ácida de fígado de cação.

Etapa	Volume (mL)	UE Totais (μmol PNP)	Proteína Total (mg)	A.E. (UE/mg)	Purificação (X)	Rendimento (%)
Extrato Bruto	7800	5117	62000	0,082	1	100
Precipitação (NH ₄) ₂ SO ₄ (90%)	532	3586	26000	0,138	1,7	70,0
SP-Sephadex <i>API</i>	670	718	3850	0,186	2,3	14
<i>AP2</i>	440	1021	3384	0,302	3,6	20

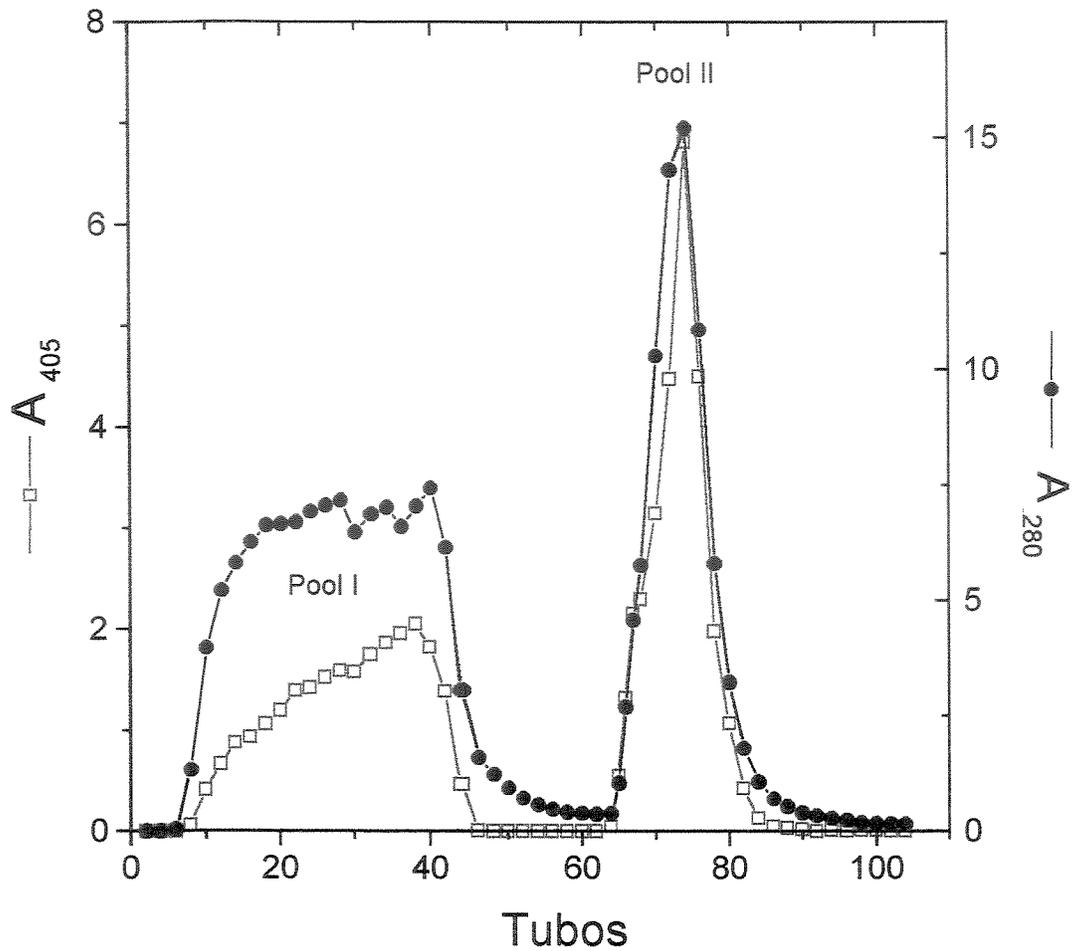


Figura 1. Cromatografia em SP-Sephadex

A coluna de SP-Sephadex (4,5 x 16,5 cm) foi equilibrada com tampão acetato de sódio 0,01 M, pH 5,0. O primeiro pico foi obtido durante a lavagem com o tampão de equilíbrio. A eluição foi realizada através de um gradiente linear contínuo (tampão fosfato 0,3M, pH 6,0) a partir do tubo 61. Foram coletados 12 mL/tubo e o fluxo durante a cromatografia foi mantido em 180mL/h.

4.1.1. Purificação da isoforma AP1

a -Cromatografia em DEAE-Sephadex

Este passo (Figura 2), proporcionou uma redução de cerca de 50% de proteínas contaminantes, com um aumento da atividade específica de 1,46 vezes. Durante a lavagem da coluna obtivemos um pico de atividade (Pool I, 194 ml). A utilização de tampão Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 com 200 mM NaCl proporcionou a eluição de outro pico que devido à baixa atividade específica foi descartado (Tabela 2).

b - Cromatografia em Hidroxiapatita

A cromatografia em Hidroxiapatita permitiu a eliminação de cerca de 48% de proteínas acarretando em uma perda de 22% da atividade específica.

c - Cromatografia em Sephacryl S-200

A principal função da cromatografia em Sephacryl S-200 foi eliminar uma grande quantidade de proteínas, cerca de 90% (Figura 3), resultando em um aumento de cerca 8 vezes da atividade específica (Tabela 2).

Após esta última cromatografia, a amostra resultante foi dialisada contra tampão acetato 0,1M, pH 5,0, 10mM fosfato, concentrada por ultrafiltração e armazenada a -20°C, com 50% de glicerol, para posterior determinação de sua cinética.

Nestas condições a enzima perdeu 75 % de atividade ao longo de 7 meses.

TABELA 2
Purificação da fração AP1

Etapa	Volume (mL)	UE Totais (μ mol PNP)	Proteína Total (mg)	A.E. (UE/mg)	Purificação (X)	Rendimento (%)
Extrato Bruto	7800	5117	62000	0,082	1	100
Precipitação (NH ₄) ₂ SO ₄ (90%)	532	3586	26000	0,138	1,7	70,0
SP-Sephadex <i>API</i>	670	718	3850	0,186	2,3	14,0
DEAE-Sephadex	194	527	1960	0,27	3,3	10,0
<i>Pool I</i>						
Hidroxiapatita	328	218	1012	0,21	2,5	4,0
Sephacryl S-200	6	160	96,3	1,66	20	3,1

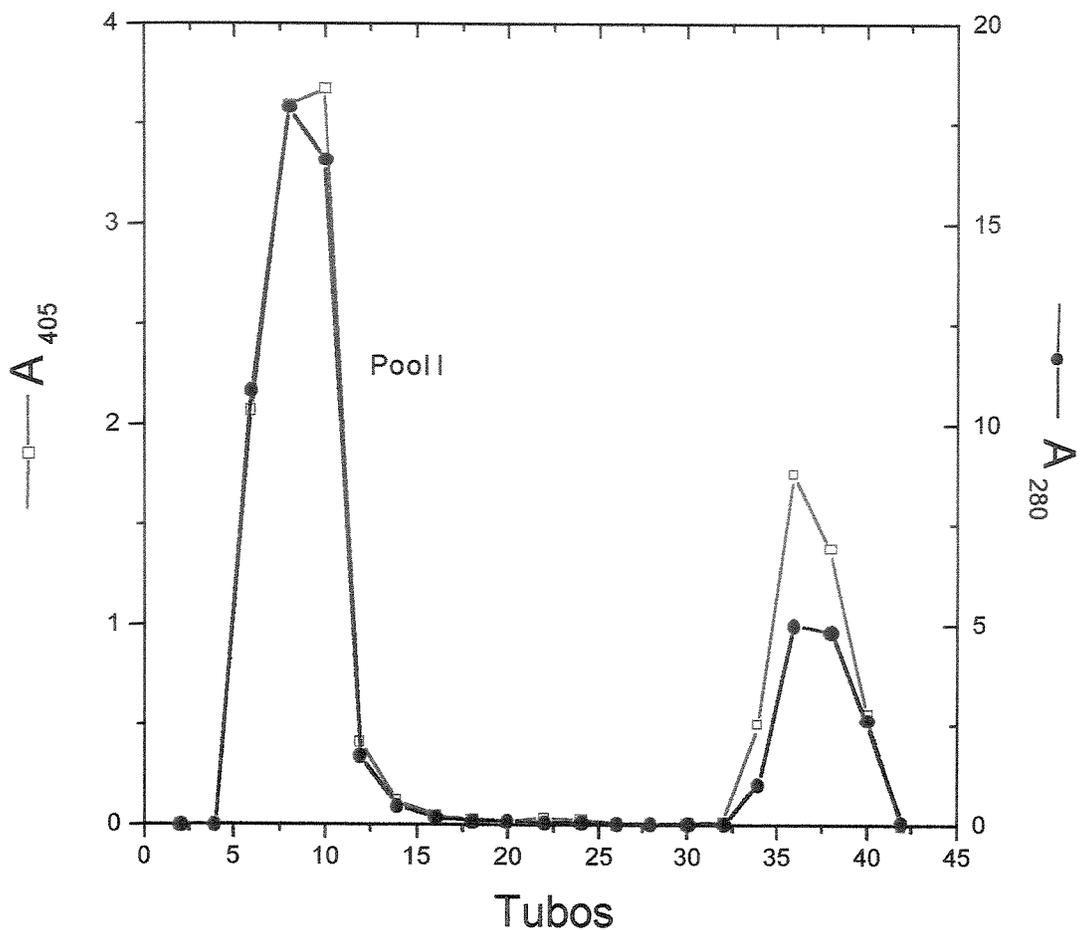


Figura 2. Cromatografia da fração AP1 em DEAE-Sephadex

A coluna de DEAE-Sephadex (3,0 x 110 cm) foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 7,5. A eluição foi realizada aplicando-se tampão Tris-HCl 0,01 M pH 7,5 com 200 mM NaCl a partir do tubo 30 coletando-se 12 mL/tubo. Durante a cromatografia, o fluxo da corrida foi mantido em 180 mL/h.

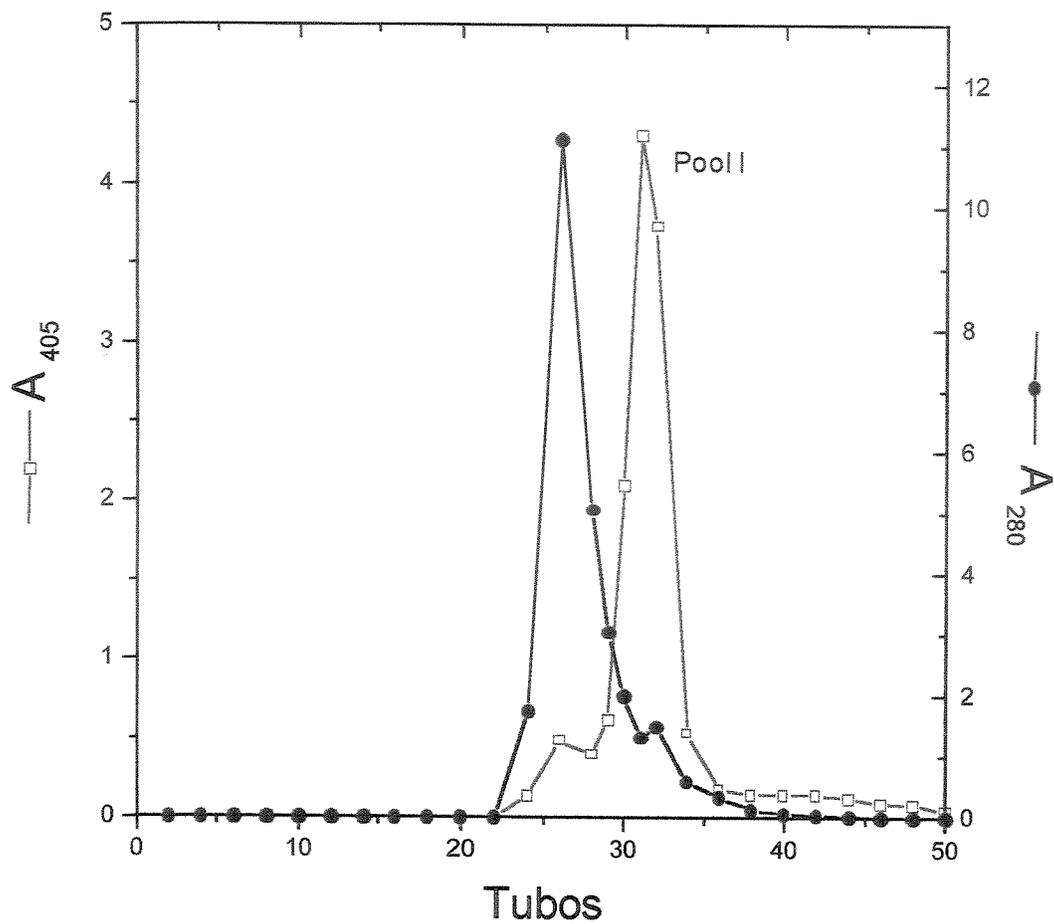


Figura 3. Cromatografia da fração AP1 em Sephacryl S-200

A coluna de Sephacryl S-200 (3,0 x 110 cm) foi equilibrada com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 contendo NaCl 0,5 M. A eluição foi realizada com tampão de equilíbrio, coletando-se 12mL/tubo e, durante a cromatografia, o fluxo da corrida foi mantido em 60 mL/h.

4.1.2. Purificação da fração AP2

a -Cromatografia em DEAE-Sephadex

Através da cromatografia em DEAE-Sephadex (Figura 4) foi possível separar duas frações contendo atividade (AP2A e AP2B), coincidentes com dois picos de proteína. A fração AP2A foi eluída durante a lavagem com o tampão de equilíbrio (tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,5) sugerindo portanto, que o pI desta enzima é igual ou maior que 7,5. A fração AP2B, foi eluída com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 com 150 mM NaCl. Após esta cromatografia, as frações *AP2A* e *AP2B* apresentaram atividades específicas de 0,76 UE/mg e 0,36 UE/mg, respectivamente (Tabela 3).

TABELA 3
Purificação da fração AP2

Etapa	Volume (mL)	UE Totais (μ mol PNP)	Proteína Total (mg)	A.E. (UE/mg)	Purificação (X)	Rendimento (%)
Extrato Bruto	7800	5117	62000	0,082	1	100
Precipitação						
(NH ₄) ₂ SO ₄ (90%)	532	3586	26000	0,138	1,7	70,0
SP-Sephadex <i>AP2</i>	440	1021	3384	0,302	3,7	20
DEAE-Sephadex	215	520	685	0,76	9,3	10,2
AP2A						
ConA Sepharose	139	247,5	83,4	3,0	36,5	4,8
Sephacryl S-200						
<i>AP2A1</i>	41	77,5	13,9	5,6	68	1,5
<i>AP2A2</i>	154	46,0	9,8	4,7	57	0,9
DEAE-Sephadex	356	484	1335,0	0,36	4,4	9,5
AP2B						
SP-Sephadex	208	366,0	640,6	0,572	7,0	7,1
ConA-Sepharose	206	111,2	39,1	2,8	34,2	2,2

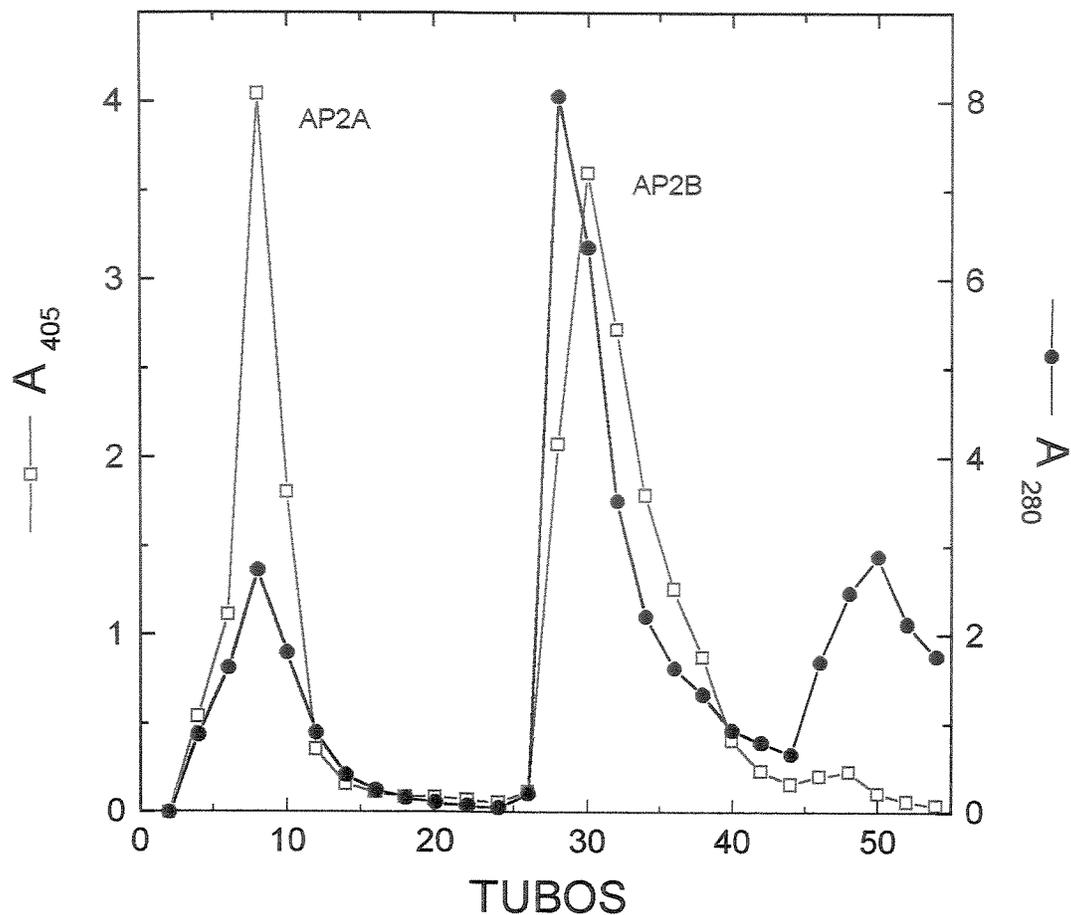


Figura 4: Cromatografia da fração AP2 em DEAE-Sephadex

A coluna de DEAE-Sephadex (2,5 x 9,0 cm) foi equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. O primeiro pico foi obtido durante a lavagem com o tampão de equilíbrio. A eluição foi realizada com tampão tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 com 150mM NaCl, a partir do tubo 22. Foram coletados 21,0 mL/tubo e o fluxo durante a cromatografia foi mantido em 240 mL/h.

4.1.2.1. Purificação da fração AP2A

a – Cromatografia em ConA-Sepharose

Pelo perfil cromatográfico obtido, pode se constatar que a fração AP2A se ligou à coluna de Con-A Sepharose podendo-se também afirmar que esta fosfatase é uma glicoproteína e tem na sua porção de carboidrato, manose ou glicose, uma vez que a concanavalina se liga especificamente a estes açúcares.

A etapa de cromatografia nesta coluna (Fig. 5) foi eficaz pois o fator de purificação passou de 9,1 para 36,5 vezes e a atividade específica de 0,76 para 3,0 UE/mg.

Devido a utilização da alta força iônica, uma grande quantidade de proteína (cerca de 88 %) ligada fracamente à coluna foi eluída com tampão Tris-HCl 10 mM (pH7,5) contendo 1 M de NaCl, juntamente com um pequeno pico de atividade. Este pico foi descartado devido à baixa atividade específica.

A fração contendo atividade foi eluída juntamente com uma pequena quantidade de proteína, após adição de α -metilmanopiranosídeo, reagente amplamente utilizado neste tipo de cromatografia.

A cromatografia de concanavalina A-Sepharose tem sido largamente utilizada na purificação de fosfatases ácidas em geral, pois quando a enzima que está sendo purificada se liga à esta resina normalmente se consegue um aumento significativo no fator de purificação e da atividade específica (KRUZEL & MORAWIECKA, 1982; PARK & VAN ETTEN, 1986; HEFLER & AVERILL, 1987; BHARGAVA & SACHAR, 1987; DUFF et alii, 1989).

b - Cromatografia em Sephacryl S-200

Através da cromatografia em Sephacryl S-200 (Figura 6) foi possível separar duas frações contendo atividade (AP2A1 e AP2A2), coincidentes com dois picos de proteína. Após esta cromatografia, as frações obtidas *AP2A1* e *AP2A2* apresentaram atividades específicas de 5,6 UE/mg e 4,7 UE/mg, respectivamente (Tabela 3).

Pelo perfil cromatográfico (Fig. 6) pode se ver que foi eliminado uma grande quantidade de proteínas (71 %) enquanto que se perdeu cerca de 50% de atividade.

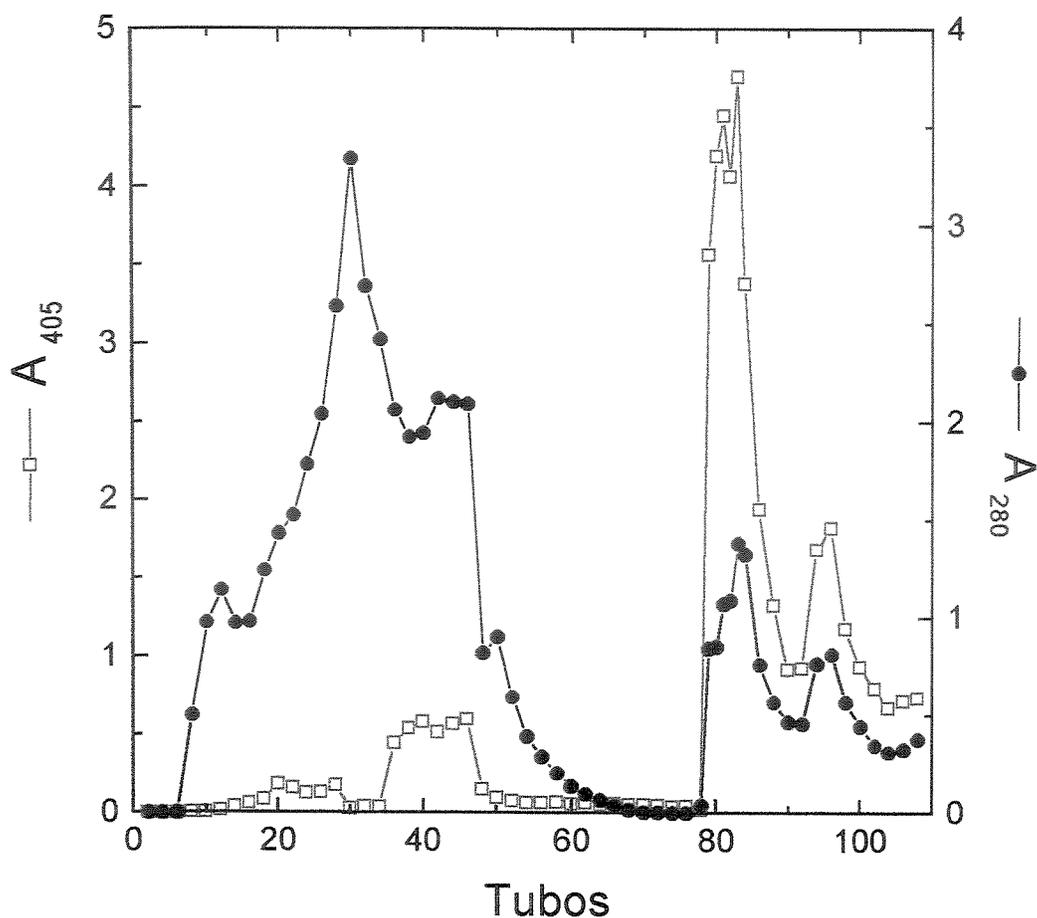


Figura 5: Cromatografia da fração AP2A em ConA Sepharose

A coluna de Concanavalina A (2,0 x 7,5 cm) foi equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. Logo após, foi passado na coluna, o mesmo tampão contendo 1M de NaCl. A eluição foi realizada a partir do tubo 76 com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, 1M de NaCl contendo 0,2 M de α -Metilmanopiranosídeo. Foram coletados 4,8 mL/tubo, sem auxílio de bomba peristáltica.

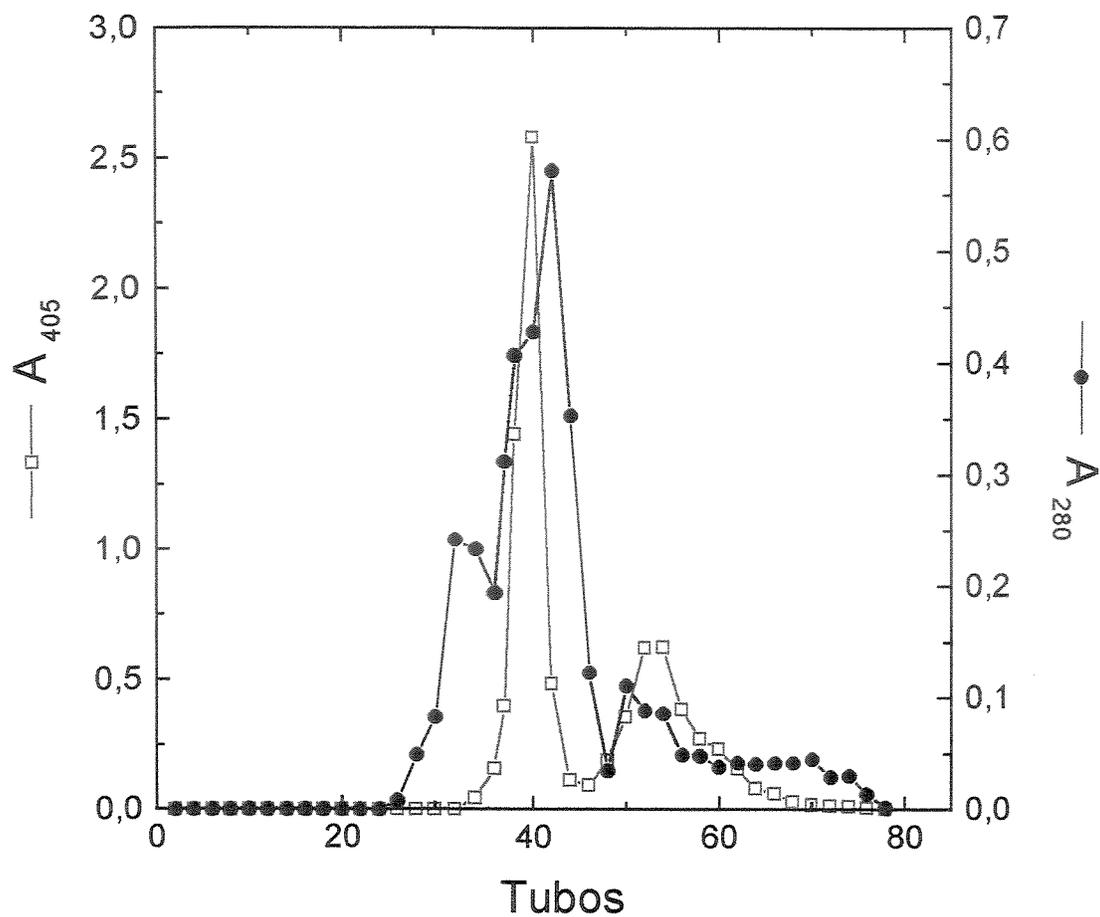


Figura 6: Cromatografia da fração AP2A em Sephacryl

A coluna de Sephacryl S-200 (3,0 x 110 cm) foi equilibrada com tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 contendo NaCl 0,25 M. A eluição foi realizada com tampão de equilíbrio, coletando-se 10,6 mL/tubo e durante a cromatografia, o fluxo da corrida foi mantido em 60 mL/h.

4.1.2.2. Purificação da fração AP2B

a - Cromatografia em SP-Sephadex

A cromatografia em SP-Sephadex (Figura 7) proporcionou a eliminação de cerca de 50% das proteínas contaminantes em relação a etapa anterior, havendo entretanto perda de cerca de 24 % de atividade (Tabela 3).

b - Cromatografia em ConA-Sepharose

Esta foi a última cromatografia no processo de purificação desta fração (Figura 8). A enzima eluída apresentou uma atividade específica cerca de 5 vezes maior que a fase anterior e o fator de purificação passou de 7,0 para 34,2 vezes.

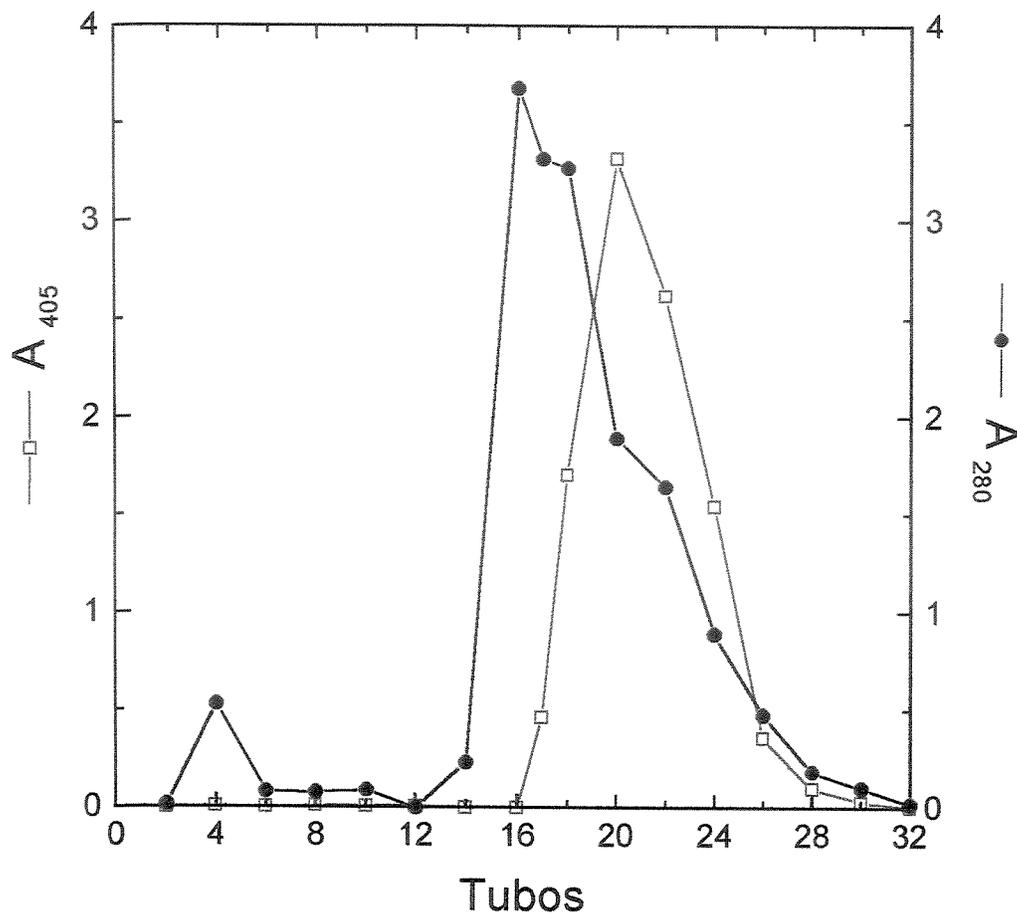


Figura 7: Cromatografia da fração AP2B em SP-Sephadex

A coluna de SP-Sephadex (4,5 x 16,5 cm) foi equilibrada com tampão acetato de sódio 0,01 M, pH 5,0. O primeiro pico foi obtido durante a lavagem com o tampão de equilíbrio. A eluição foi realizada através de um gradiente linear contínuo do mesmo tampão com NaCl 0,5 M, a partir do tubo 12. Foram coletados 23 mL/tubo e o fluxo durante a cromatografia foi mantido em 240 mL/h.

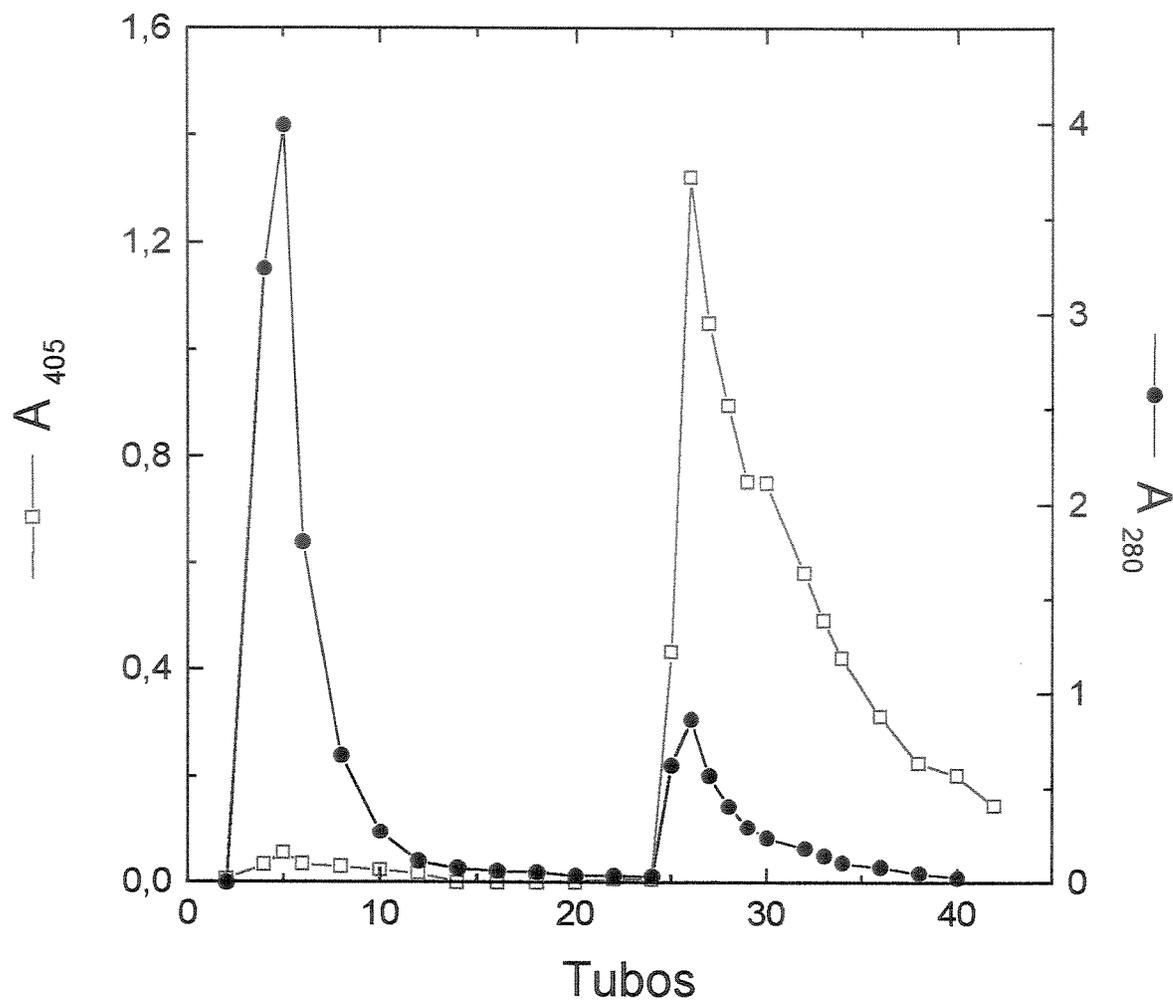


Figura 8: Cromatografia da fração AP2B em ConA Sepharose

A coluna de Concanavalina A (2,0 x 7,5 cm) foi equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. Logo após, foi passado na coluna, o mesmo tampão contendo 1M de NaCl. A eluição foi realizada a partir do tubo 21 com tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, 1M de NaCl contendo 0,2 M de α -Metilmanopiranosídeo. Foram coletados 13,0 mL/tubo e o fluxo da corrida foi mantido em 60 mL/h.

Devido a instabilidade e conseqüente perda de atividade das frações AP2, somente foi possível aprofundar e desenvolver alguns estudos sobre a fração AP1, tais como: determinação de peso molecular e de alguns parâmetros cinéticos, aqui apresentados.

4.2. Determinação da massa molecular da isoforma AP1

O cálculo da massa molecular relativa, utilizando a coluna Superdex^R 75 HR 10/30 - Pharmacia para HPLC (Shimadzu), foi realizado através do gráfico de $\log M_r \times Tr/Tr_0$, onde Tr é o tempo de retenção e Tr_0 é o tempo de retenção do Azul de Dextrano (Figura 9), resultando em uma massa relativa de aproximadamente 58 kDa.

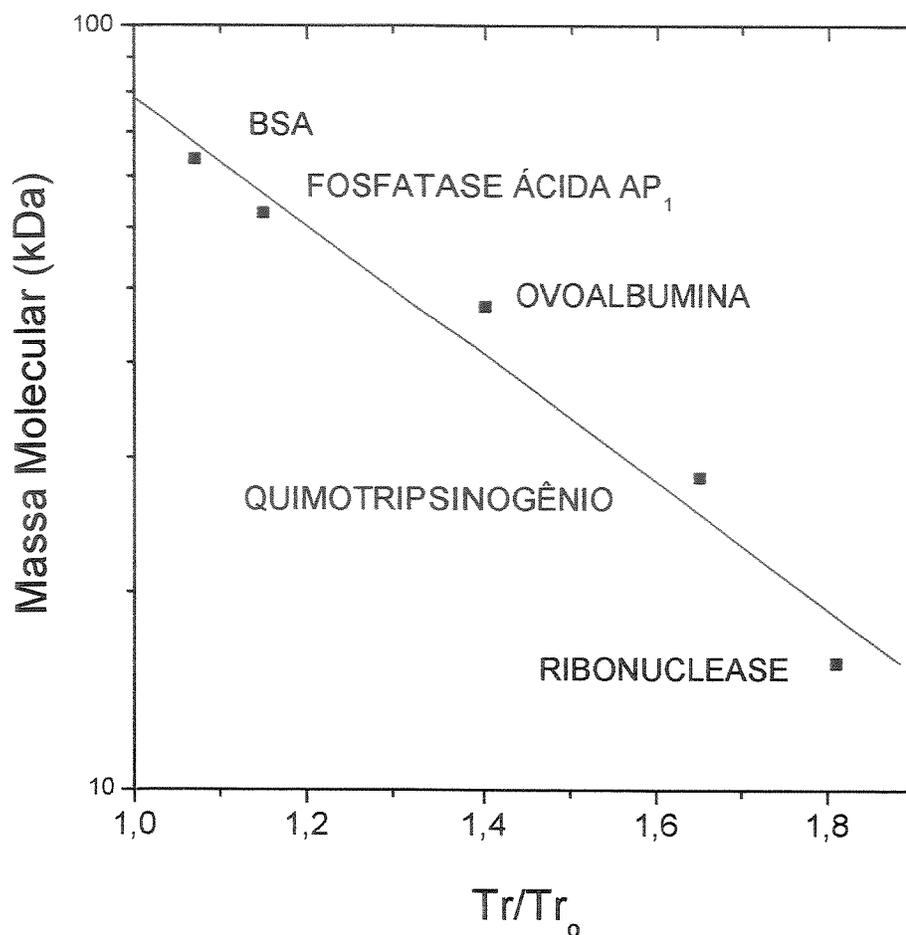


Figura 9. Determinação da Massa Molecular da fração AP1.

A Mr foi determinada pela filtração em gel na coluna Superdex^r 75 HR 10/30 - Pharmacia acoplada a um sistema HPLC (Shimadzu). Foram utilizados os seguintes marcadores de Mr: BSA (67 kDa), Ovoalbumina (43 kDa), Quimotripsinogênio (25,7 kDa), e Ribonuclease B (14,7 kDa).

4.3. Estudos Cinéticos da Isoforma API

a. Efeito do tempo de reação

O estudo do tempo de incubação (Figura 10) nos mostra que a reação é linear até pelo menos 45 min. Este resultado torna-se importante, pois nos mostra que a FAc mantém uma atividade proporcional em larga faixa de tempo de reação. Nos experimentos cinéticos, manteve-se o tempo de reação em 20 min, resultando na hidrólise de cerca de 10% do pNPP utilizado.

b. Efeito da concentração da enzima

Houve grande proporcionalidade entre as concentrações de enzima utilizadas no experimento e a velocidade da reação, mostrando-nos que as condições do ensaio foram adequadas, com relação à concentração de substrato e tempo de incubação, para as concentrações de enzima testadas (Figura 11).

c. Efeito do pH na atividade enzimática

Estudando-se o efeito do pH (Figura 12), constatamos que o pH ótimo esta em torno de 4,7, compatível aos encontrados na literatura para fosfatase ácida de fígado de bagre (JANSKA et alli, 1986) e de carpa (PANARA & PASCOLINI, 1989).

d. Determinação da K_m e V_{max}

Variando-se a concentração de substrato (pNPP) de 0,050 a 40 mM, obteve-se uma hipérbole retangular, compatível com a equação de Michaelis-Menten (Figura 13). A K_m para o pNPP foi de 0,97 mM, da mesma ordem de grandeza de outras FAc de peixes relatadas na literatura: 0,18 mM e 0,22 mM respectivamente para a fração I e II da FAc de fígado de carpa (PANARA & PASCOLINI, 1989). A V_{max} para o pNPP foi de $2,94 \mu\text{mol min}^{-1}$.

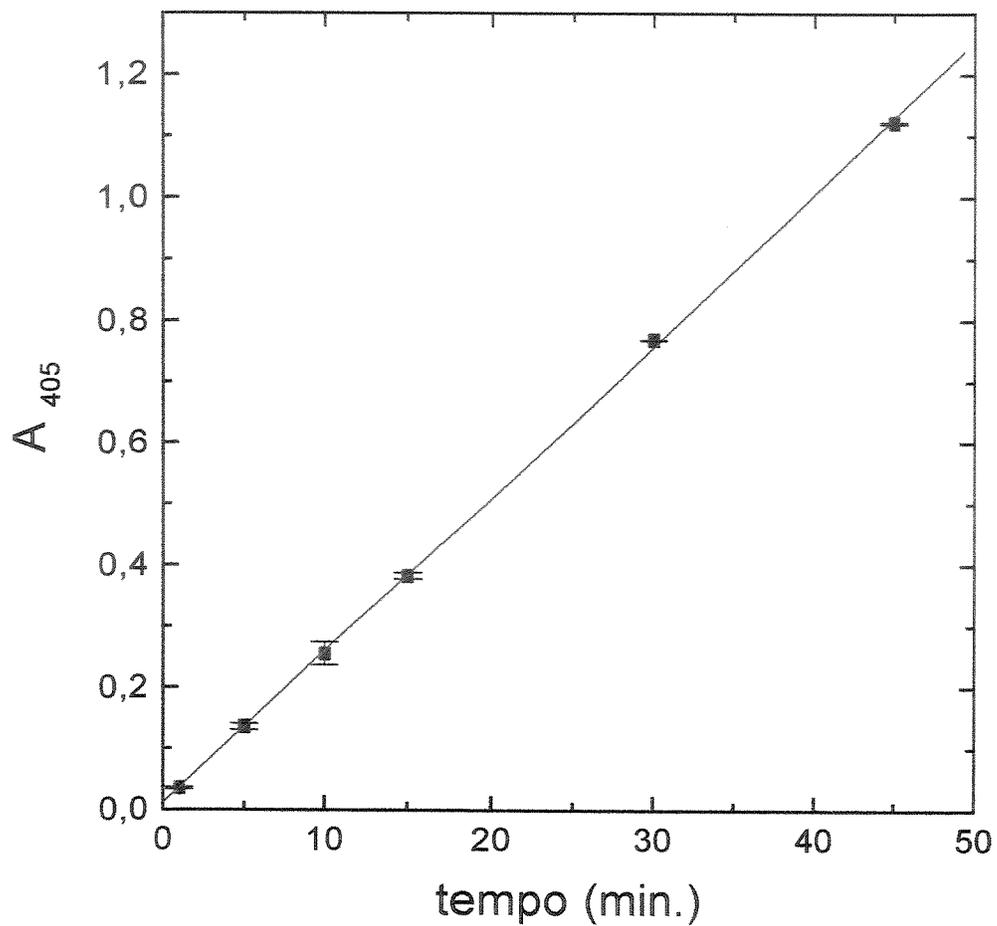


Figura 10. Efeito do tempo de incubação na atividade da fração AP1.

O ensaio foi realizado conforme descrito em Métodos, utilizando o pNPP (5 mM) como substrato. A reação foi iniciada pela adição da proteína (0,4 µg).

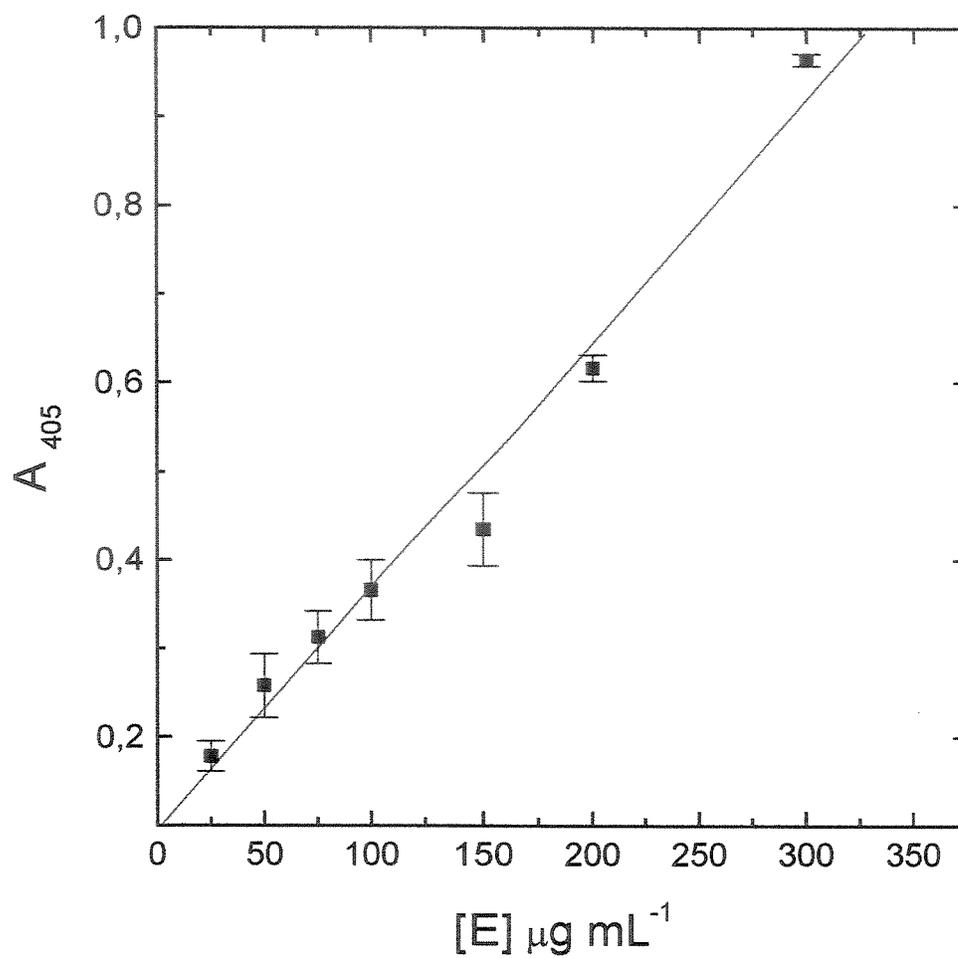


Figura 11. Efeito da concentração da enzima na velocidade de reação da fração AP1. O ensaio foi realizado conforme descrito em Métodos utilizando o pNPP como substrato (5 mM) e tempo de reação de 20 min. A reação foi iniciada pela adição do substrato.

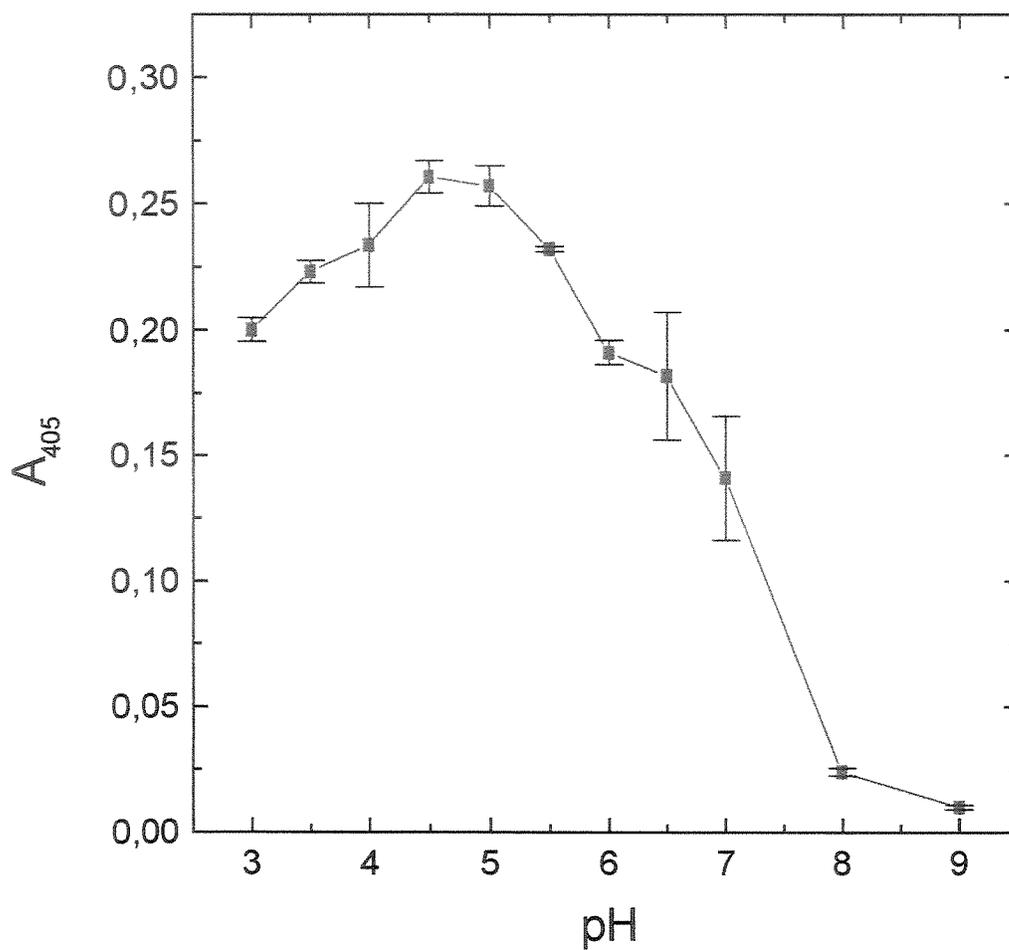


Figura 12. Efeito do pH na atividade da enzima.

O ensaio foi realizado conforme descrito em Método, utilizando o pNPP (5 mM) como substrato e tempo de reação de 20 min. Os tampões utilizados na concentração de 100 mM, foram: Glicina (pH 2,5 e 9,0), Acetato (pH 3,0 a 5,5), Bis-Tris (pH 6,0) e Imidazol (pH 7,0 e 8,0).

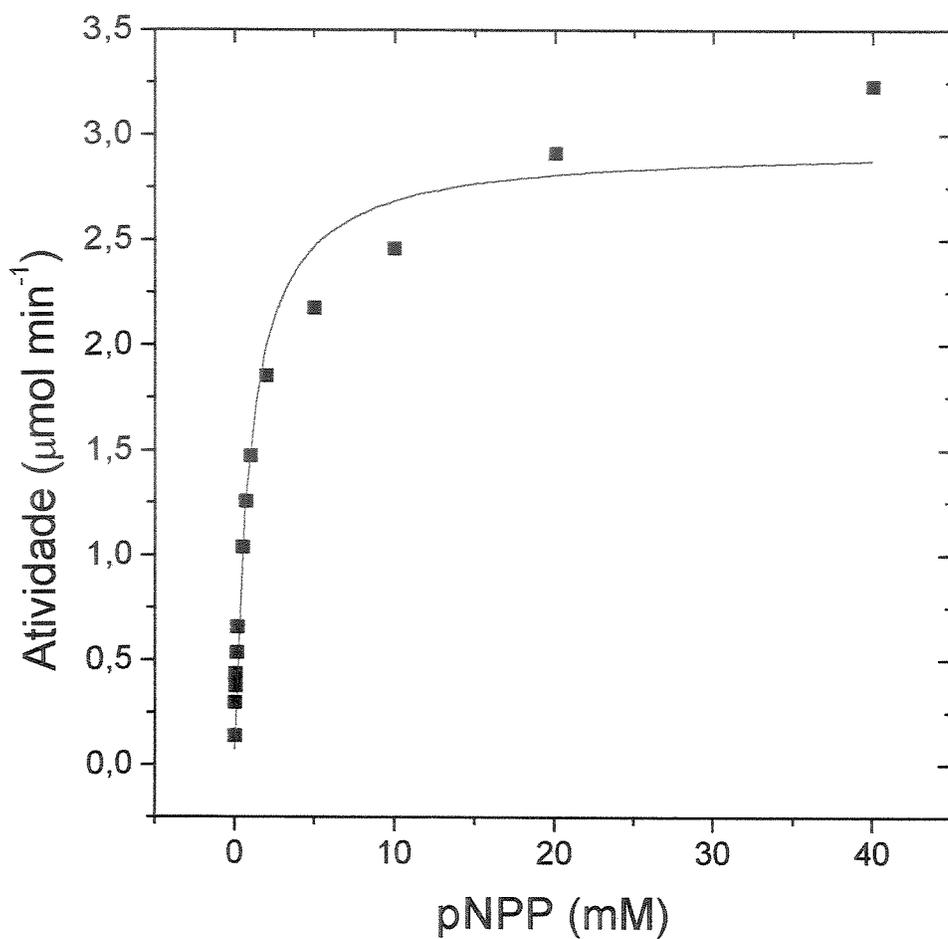


Figura 13. Determinação dos parâmetros cinéticos K_m e V_{max} .

O ensaio foi realizado como descrito em Métodos utilizando-se diferentes concentrações de pNPP. A reação foi iniciada pela adição de $0,4 \mu\text{g}$ de proteína. A K_m e a V_{max} foram calculadas pelo ajuste da curva (Hiperbole retangular).

e. Efeito da temperatura na atividade

O efeito da temperatura na atividade da FAc de fígado de cação foi avaliada medindo-se a velocidade, em diferentes temperaturas (37 a 80°C). Na figura 14, podemos observar que a velocidade é diretamente proporcional à temperatura de 37 a 47°C, apresentando uma grande diminuição na velocidade a partir de 75°C. Isto nos dá uma temperatura ótima em torno de 65°C, maior que a obtida para as FAc purificadas de fígado de carpa (PANARA et alii, 1989), em torno de 50°C e 45°C, respectivamente, para a fração I e II.

f. Determinação da Energia de Ativação

Substituindo-se na equação de Arrhenius os valores da inclinação da reta (k_1 e k_2), calculadas graficamente através de regressão linear para temperaturas 37°C e 47°C (figura 15), determinamos a energia de ativação para a hidrólise do pNPP como sendo de 39,37 kJ.mol⁻¹. Este valor é compatível ao relatado por PANARA et alii (1989), para as formas AP-I e AP-II de fígado de carpa, que encontraram os valores de 53,55 e 39,75 kJ.mol⁻¹, respectivamente para as frações I e II.

g. Efeito de metais na atividade

A análise da Figura 16 nos permite verificar que na presença de metais (1 mM), a atividade enzimática foi bastante baixa em presença de Cu⁺², com uma inibição de cerca de 80%. Observou-se também inibição em presença de Fe⁺² (60%), e Zn⁺² (40%). A inibição na presença desses metais indica que a enzima deve possuir grupamentos SH importantes para a reação catalítica.

Por outro lado, Mg⁺², Mn⁺² e Ca⁺² não mostraram efeito, observando-se mesmo uma pequena ativação (algo em torno de 12%) na atividade da enzima. Isto nos mostra que a enzima depende muito pouco destes metais para sua atividade, ao contrário do que ocorre com diversas pirofosfatases e

fosfatases alcalinas (KRISHAN & GNANAM, 1988; MAYER et alii, 1961), que necessitam preferencialmente de Mg^{2+} para suas reações, sendo este um dos fatores que permite distinguí-las das fosfatases ácidas.

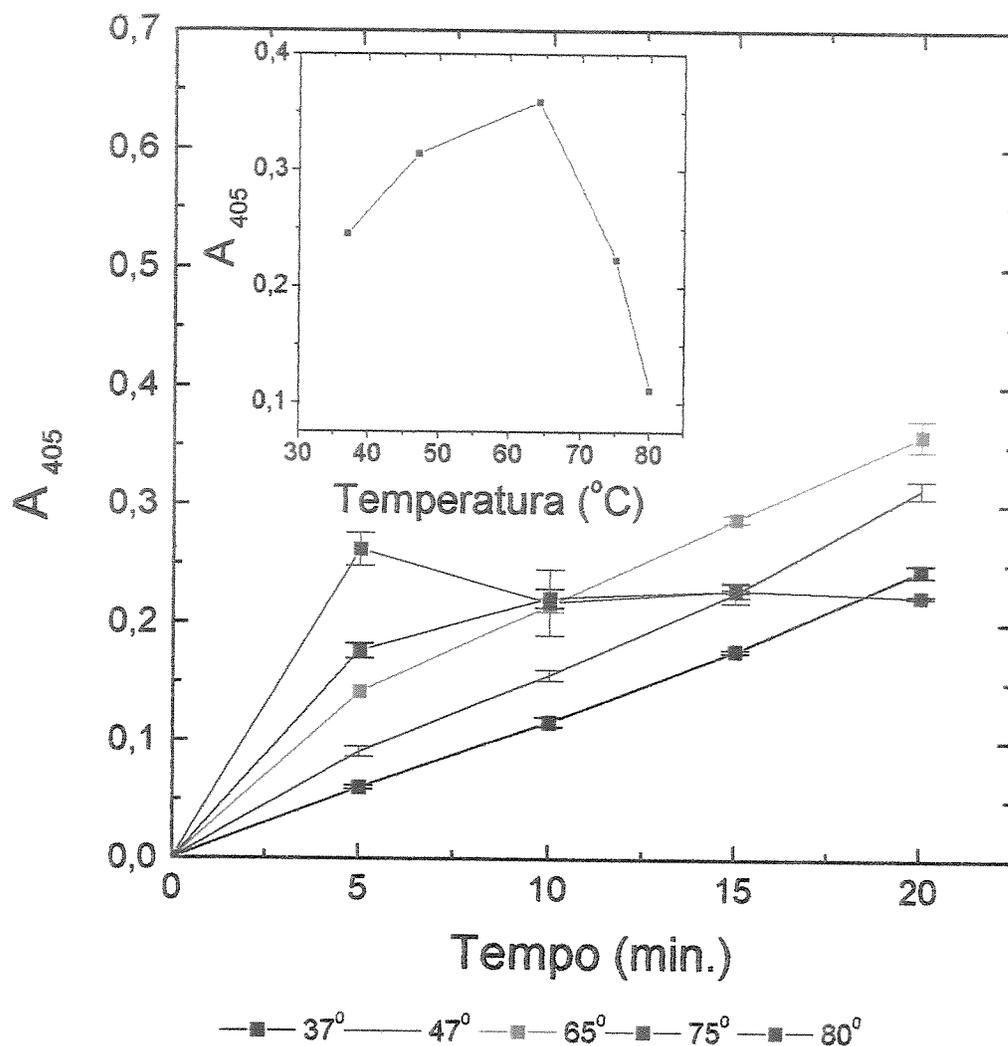


Figura 14. Efeito da temperatura na atividade fosfatásica.

A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos, em diferentes temperaturas, variando-se o tempo de incubação. A reação foi iniciada pela adição de 0,4 μg de enzima.

Gráfico interno: Velocidade em função da temperatura por incubação por 20 minutos. Os dados foram obtidos da figura principal.

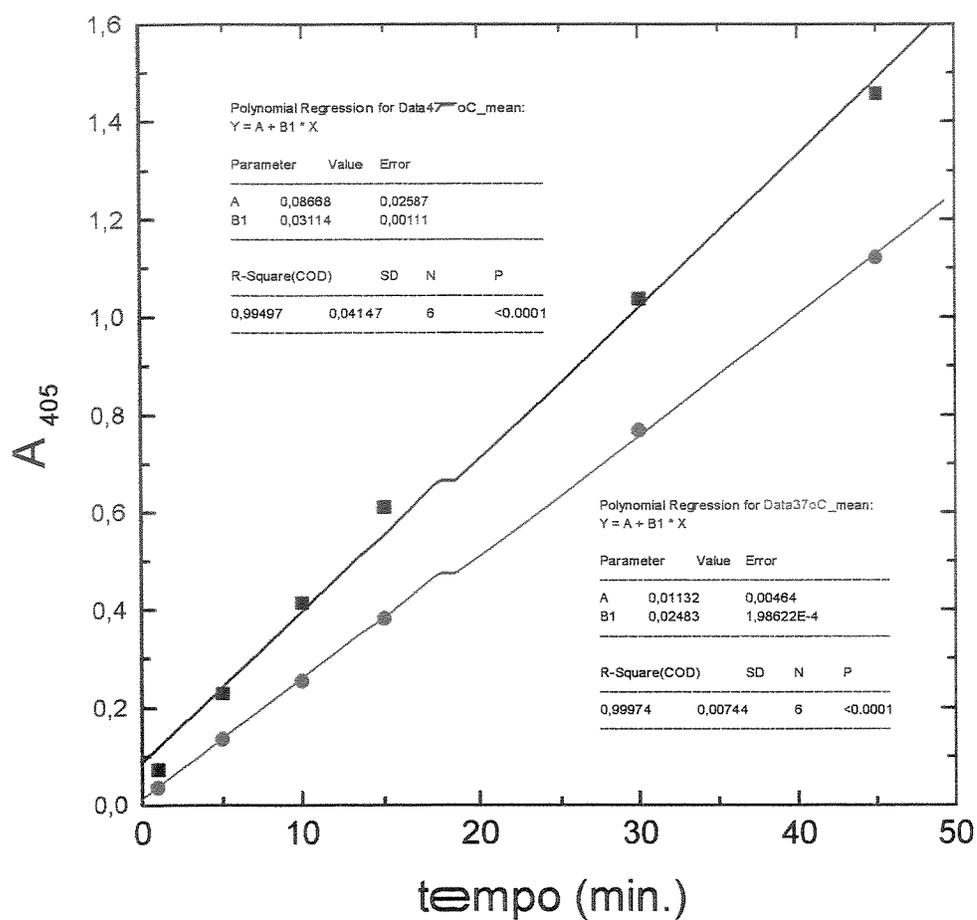


Figura 15. Efeito da temperatura na atividade fosfatásica.

A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos, variando-se o tempo de incubação, nas temperaturas 37°C e 47°C. A reação foi iniciada pela adição de 0,4 µg de enzima.

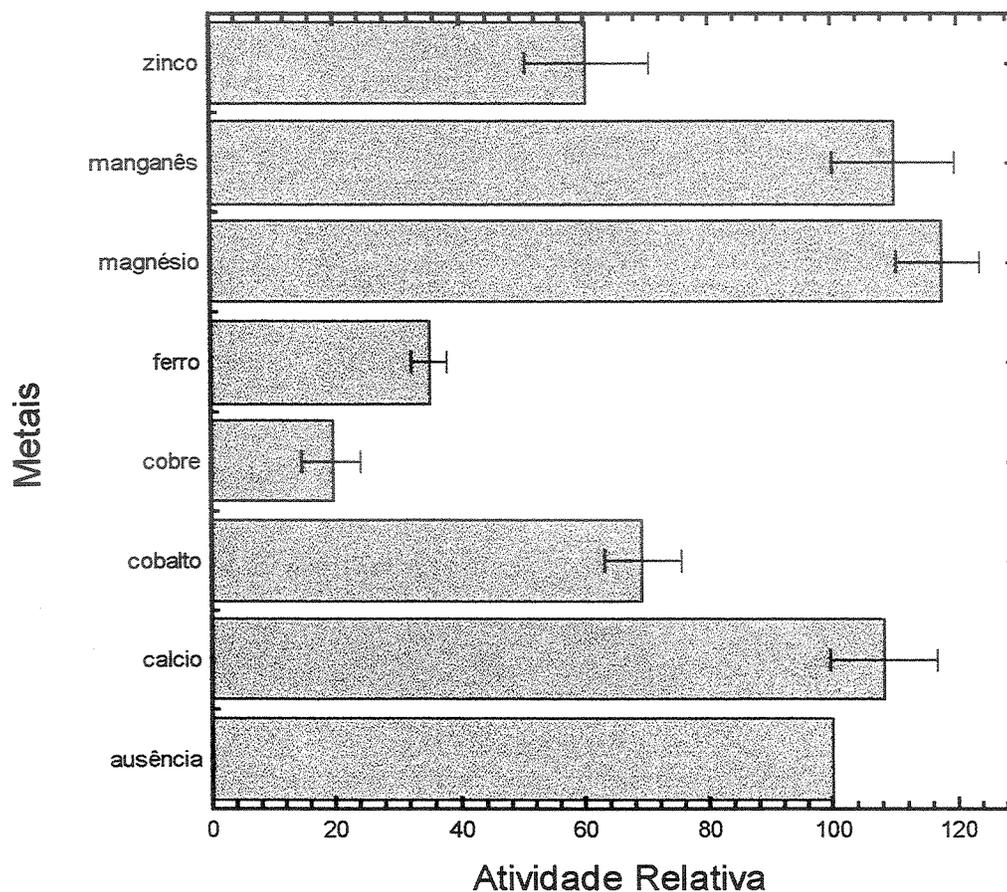


Figura 16. Efeito de metais na atividade de fosfatase ácida.

A atividade enzimática foi determinada na ausência ou na presença dos metais indicados, na concentração de 1mM. A atividade foi determinada como descrito em Métodos 3.2.1.b para todos os metais. A atividade na ausência de metais foi tomada como 100%.

h. Efeito de inibidores

O inibidor mais potente foi o molibdato (Figura 17) como ocorre para as fosfatases ácidas, de um modo geral.

A inibição por fluoreto (5 mM) foi da ordem de 90%, semelhante ao resultado apresentado para a ACPase I de fígado de carpa (PANARA et alii, 1989).

O tartarato (5 mM) inibiu a atividade enzimática em 50%. Esse inibidor juntamente com o fluoreto são típicos para fosfatases ácidas de alta Mr de mamíferos.

A inibição por pCMB (1 mM) que se liga especificamente a grupos -SH livres, enzimática reforça os resultados de inibição por Cu^{2+} e Fe^{2+} (Figura 17).

A não inibição da atividade pelo piridoxal (0,1 mM) mostra que a enzima não apresenta resíduo de lisina essencial para a catálise, pois piridoxal forma base de Schiff com estes resíduos, impedindo a reação. O fosfato (10 mM) inibiu 25% da atividade na concentração de 10 mM, o que é comum para as FAc, pois, o fosfato, é um dos produtos da reação e atua como um clássico inibidor competitivo.

Quanto ao vanadato (0,1 mM), inibidor competitivo, análogo ao Pi, apresentou uma inibição considerável, na ordem de 40%.

i. Estudo da especificidade para substratos

Comparou-se os valores de K_m para o pNPP (substrato sintético) e para possíveis substratos fisiológicos como Tyr-P, FMN e PPI (Tabela 4).

Os valores de K_m e das constantes de especificidade (V_{max}/K_m) indicaram que o melhor substrato é o PPI. Quando comparado com o pNPP, o PPI apresentou uma K_m 5 vezes menor, e uma constante de especificidade 2 vezes maior.

Apesar da atividade alta sobre pirofosfato, a hipótese de se tratar de uma pirofosfatase foi descartada uma vez que estas são muito específicas para o PPi e, normalmente, não são inibidas pelo fluoreto, o que as distingue das fosfatases.

Tabela 4. Especificidade enzimática

Os valores dos parâmetros Km e Vmax foram determinados dos ajustes das curvas V X [S] (não mostrados). A atividade enzimática para os substratos FMN, Tyr-P e PPi foi determinada como descrito em Métodos

SUBSTRATO	Km (mM)	Vmax ($\mu\text{mol min}^{-1}$)	Vmax/Km
p-NPP	0,97	2,94	3,0
FMN	0,62	0,86	1,39
Tyr-P	1,50	2,21	1,47
PPi	0,20	1,32	6,6

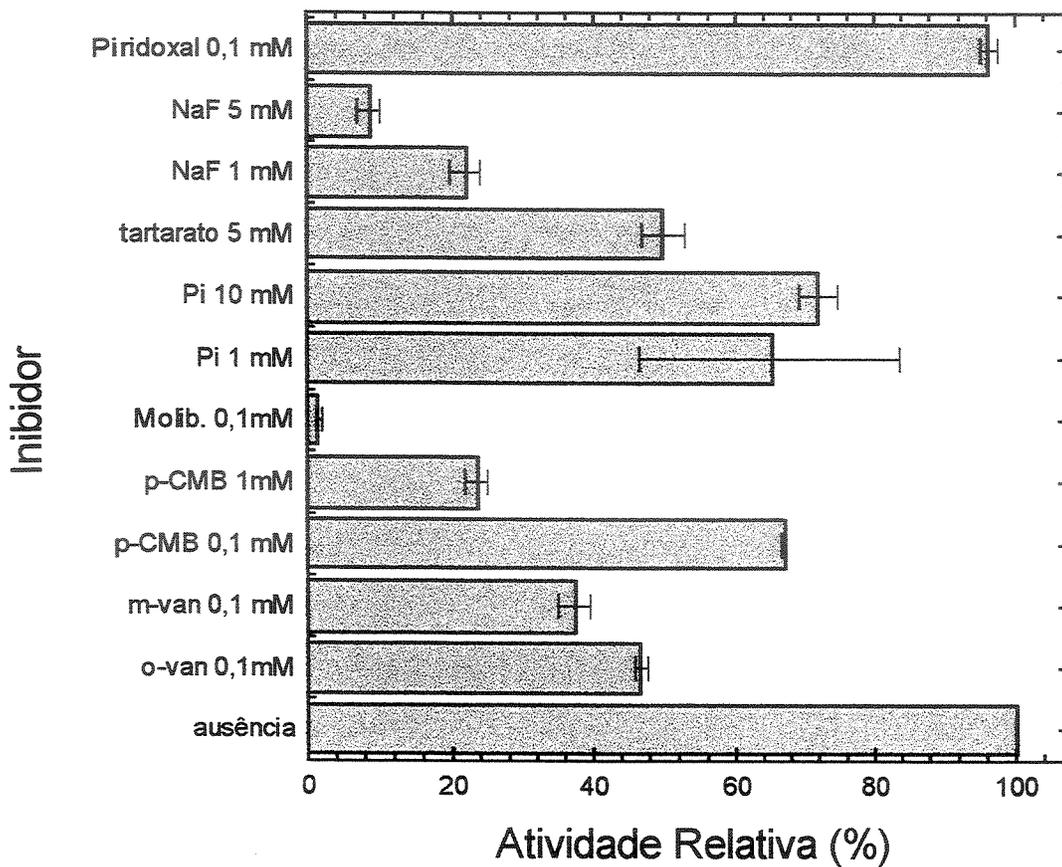


Figura 17. Efeito de inibidores na atividade.

A atividade foi determinada como descrito em Métodos, na ausência (100%) ou em presença de potenciais inibidores, nas concentrações indicadas. A reação foi iniciada pela adição de 0,4 μ g de proteína.

5. CONCLUSÕES

No presente trabalho apresentamos as características cinéticas apenas da isoforma AP1, uma vez que a isoforma AP2 (duas a três vezes mais pura que a AP1), perdeu a atividade, não sendo possível executar sua caracterização cinética.

Dessa maneira concluímos que a isoforma AP1 apresenta:

- Mr de 58 kDa e foi purificada cerca de 20 vezes;
- Alta atividade em pH 4,7 – 5,0; temperatura ótima de 65⁰C; sendo a a hidrólise linear até 45 minutos à 37⁰C e em pH 5,0;
- Um valor da Km de 0,97 mM para o substrato pNPP, apresentando dentre os substratos testados maior especificidade pelo PPi;
- Dentre os potenciais inibidores testados o Molibdato (0,1 mM) e NaF (5mM) inibiram 100%, pCMB (1mM) e NaF (1mM) inibiram cerca de 80%, o-vanadato (0,1 mM) e tartarato, cerca de 50%.
- De acordo com os resultados obtidos no estudo de inibidores a isoforma AP1 da fosfatase ácida de cação apresenta características mais similares as fosfatases ácidas de mamíferos de alta massa molecular.

6. DIFICULDADES ENCONTRADAS

A dificuldade na obtenção do material e a grande instabilidade apresentada pela enzima constituíram-se nas maiores dificuldades na realização do presente trabalho.

7. PERSPECTIVAS

As perspectivas mais diretas e importantes surgidas do presente trabalho certamente referem-se à futuros estudos sobre condições de manutenção da atividade enzimática durante a purificação.

O presente estudo também tem uma potencial importância porque a partir da purificação parcial e caracterização da fração AP1 da fosfatase ácida desse peixe nacional, obtivemos os parâmetros normais, que podem gerar estudos sobre a correlação da atividade enzimática com alterações ambientais.

Num momento em que há tanta preocupação com a ecologia, equilíbrio ambiental, poluição, qualidade de vida da população, acreditamos que esse trabalho também propiciará o início de estudos relativos à correlações do tipo:

- qualidade da água x atividade enzimática,
- contaminação industrial x atividade enzimática,
- pesticidas, agrotóxicos x atividade enzimática.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASHA, S.M. (1984) - Purification and characterization of an acid phosphatase from peanut (*Arachis hypogaea*) seed, *Can. J. Bot.*, 62:385-391.
- BECK, J. L., McCONCHIE, L. A., SUMMORS, A. C., ARNOLD, W, N., De JERSEY & ZERNER, B, (1986) - Properties of a purple phosphatase from red kidney bean: a zinc-iron metalloenzyme, *Biochim. Biophys. Acta*, 869: 61-68.
- BEN-ARIE, A., HAGAY, Z., BEN-HURT,H., OPEN, M., AND DGANI, R. (1999) - Elevated serum alkaline phosphatase may enable early diagnosis of ovarian cancer. *European. J.of Obst. Gyn. and Reprod. Biol.*, 86: 69-71.
- BERNARDI, G. (1971) – Chromatography of Proteins on Hydroxyapatite, *Methods in Enzymology*, XXII:325-339
- BHARGAVA, R. & SACHAR, R.C. (1987) - Induction of acid phosphatase in cotton seedlings enzyme purification, subunit structure and kinetic properties, *Phytochemistry*, 26:1293-1297.
- BHATTACHARYA, T., BHATTACHARYA, S. & RAY, A.K. & DEY, S. (1989) - Influence of industrial pollutants on thyroid function in *Channa punctatus* (Bloch), *Indian J. Exp. Biol.* 27:65-68
- BUCHER, F., HOFER, R. & SALVENMOSER, W. (1992) - Effects of treated paper mill effluents on hepatic morphology in male bullhead (*Cottus gobio* L.), *Arch. Environ. Contamin. and Toxicol.*, 23:410-419
- CHAIMOVICH, H. & NOME, F. (1970) - Purification and properties of an acid phosphatase from bovine brain, *Arch. Biochem. Biophys.*, 139: 9-16.
- CHU, I., VILLENEUVE, D., SUN, C, W., SECCOURS, V., PROCTER, B.,

- ARNOLD, E. CLEGG, D., REYNOLDS, L. & VALLI, V. E. (1986) - **Toxicity of toxaphene in the rat and beagle dog**, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 7:406-418
- CHUNG, R. P-T. & POLYA, G. M. (1992) - **Copurification and characterization of poppy seed phosphatase and phosphoprotein phosphatase activities**, *Plant Sci.*, 84: 153-162.
- DASSA, E. CAHU, M., DESJOYAUX-CHEREL B. & BOQUET, P. L. (1982) -**The acid phosphatase with optimum pH of 2.5 of *Escherichia coli***, *J. Biol. Chem.*, 257:6669-6676.
- De ARAÚJO, P.S.; MIES, V. & MIRANDA, O. (1976) - **Subcelular distribution of low-molecular-weight acid phosphatases**, *Biochim. Biophys. Acta*, 452:121-30.
- DI PIETRO, D. L. & ZENGERLE, F. S. (1967) - **Separation and properties of three acid phosphatases from human placenta**, *J. Biol. Chem.* 242:3391-3396
- DIBENEDETO, G & COZZANI, I (1975) - **Nonspecific acid phosphatase from *Schizosaccharomyces pombe***, *Biochemistry*, 14: 2847-2852
- DREWA, G., ANDRUSZCZAD, D., CHESY, M & KOZICA RASZEJA, L., PALGAN, K. & ZBYTNIEWSKI, Z. (1992) - **The influence of anionic detergent and diesel fuel oil on arylsulphatase and acid phosphatase activity in *Gasterosteus aculeatus* L. and *Dreissena polymorpha* Pall**, *Polskie Archiw. Hydrobiol.*, 39:161-170
- DUFF, S. M. G., LEFEBVRE, D.D. & PLAXTON, W. C. (1989) - **Purification and characterization of a phosphoenolpyruvate phosphatases from *Brassica nigra* suspension cells**, *Physiol. Plant.*, 90:734-741.

- DUFF, S. M. G., SARATH, G. & PLAXTON, W. C. (1994) - **The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism**, *Physiol. Plant.*, 90:791-800.
- FERREIRA, B F. (1988) – **Ciclo reprodutivo de *Rhizoprionodan lalandei* (Valenciennes) e *Rhizoprionodan porosus* (Poey), (Selachii, Carcharinidae) na Região de Barra de Guaratiba, RJ**, *An. Acad. Brasil. Ciências*, 60:91-101
- FERREIRA, C. V., GRANJEIRO, J.M., TAGA, E. M. & AOYAMA, H. (1998) - **Purification and characterization of multiple forms of soybean seed acid phosphatases**, *Plant Physiol. Biochem.*, 36:487-494
- FISHER, L. (1969) - **An introduction to gel chromatography**. In Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol. I. Edited by T. S. Work and E. Work.
- FLEMING, W. J., GRUE, C E., SCHULER, C. A. & BUNCK, C.M. (1987) - **Effects of oral doses of fluoride on nestling European starlings**, *Arch. Environ. Contamin. and Toxicol.*, 16:483-490
- FUJIMOTO, S., URATA, Y., NAKAGAWA, T. & OHARA, A. (1984) - **Characterization of intermediate-molecular-weight acid phosphatase from bovine kidney cortex**, *J. Biochem.*, 96:1079-1088.
- GALKA, M. DZIEMBOR-GRYSZKIEWICZ, D., KOS, S. & OSTROWSKI, W. (1980) - **Properties of low-molecular-weight acid phosphatases isolated from cytosol and chromatin of rat liver**, *Acta Biochim. Polon.*, 27:281-293.
- GILL, T. S., TEWARI, H. & PANDE, J. (1990) – **Use of the fish enzyme system in monitoring water quality: Effects of mercury on tissue enzymes**, *Comp. Biochem. Physiol. C Comp. Pharmacol. and Toxicol.*,

92(C)287-292

GILL, T. S., TEWARI, H. & PANDE, J. (1991) - **In vivo and in vitro effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish *Barbus conchoni* Ham. (Rosy Barb)**, *Comp. Biochem. Physiol. C Compar. Pharmacol. and Toxicol.*, 100(C)501-506

GILL-T-S; TEWARI-H; PANDE-J PY (1992) - **Short and long-term effects of copper on the rosy barb (*Puntius conchoni* Ham.)**, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 23: 294-306

GONZÁLEZ, F. J., FAUSTE, C., BURGUILLO, F. J. & DOMINGUEZ A. (1993) - **Kinetic behaviour of a repressible acid phosphatase from the yeast *Yarrowia lipolytica*: a comparative study between the solubilized enzyme, the enzyme bound to cell-wall fragments and the enzyme bound to intact cells**, *Biochim. Biophys. Acta*, 1162: 17-27.

GRANJEIRO, J. M. (1994) – **Purificação e Caracterização da Fosfatase Ácida de Rim Bovino**, *Tese de Mestrado*, Instituto de Biologia, UNICAMP

GRANJEIRO, J. M., TAGA, E. M. & AOYAMA, H. (1997) - **Purification and characterization of a low-molecular-weight bovine kidney acids phosphatase**, *An. Acad.Bras. Ci.*, 69: 451-460

GRANJEIRO, P. A., FERREIRA, C. V., GRANJEIRO, J. M., TAGA, E. M. & AOYAMA, H. (1999) - **Purification and kinect properties of a castor bean sead acid phosphatase containing sulfhydryl groups**, *Physiol. Plant.*, 107:151-158.

HAN, S. W., MICHELIN, M. A., BARBOSA, J. E. & ROSSI, A. (1994) - **Purification and constitutive excretion of acid phosphatase in *Neurospora crassa***, *Phytochemistry*, 30: 1131-1135.

HARTREE, E.F. (1972) - **Determination of proteins: a modification of the**

- Lowry method that give a linear photometric response, *Anal. Biochem.* 48:422-427.
- HAYMAN, A.R. WARBURTON, M. J., PRINGLE, J. A. S., COLES, B. & CHAMBERS T. J. (1989) - **Purification and characterization of a tartrate-resistant acid phosphatase from human osteoclasts**, *Biochem. J.* 261:601-609.
- HEFLER, S.K. & AVERILL, B.A. (1987) - **The “manganese(III) containing” purple acid phosphatase from sweet potatoes is an iron enzyme**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 146:1173-1177.
- HELWIG, J.J., FAROOQUI, A. A., BOLLACK, C. & MANDEL, P. (1977) - **Distribution of lysosomal hydrolases in glomerular and tubular fractions of rabbit kidney cortex**, *Int. J. Biochem.*, 8:323-327.
- IKEDA, Y., KOYAMA, J. & OZAKI, H. (1986) - **Heavy metal levels in tissues of fish exposed to cadmium**, *Bull. Japan. Soc. Scient. Fish.*, 52:2055-2060
- JANSKA, H. & KUBICZ, A. (1985) - **Studies on the heterogeneity of carp (*Cyprinus carpio*) liver acid phosphatases: Acid phosphatase: I. Subunit structure and carbohydrate composition**, *Comp. Biochem. Physiol.*, 82(B):563-568
- JANSKA, H., KUBICZ, A., BEM, M. & VAN-ETTEN, R.L. (1986) - **Catfish liver acid phosphatases: Differently glycosylated enzyme molecules with altered kinetic properties**, *Comp. Biochem. Physiol.*, 85(B):753-758
- JANSKA, H., KUBICZ, A. & SZALEWICZ, A. (1989) - **The lower molecular weight acid phosphatases from frog liver: isolation of homogeneous AcPase III and IV representing glycoforms with**

- different bioactivity, *Comp. Biochem. Physiol.*, 92(B):341-346**
- KOZARIC, Z., NOVAK, R. & SREBOCAN, E. (1992) - **Effect of cadmium on histological and histochemical characteristics of skin in the carp (*Cyprinus carpio* L.), *Veterinarski Arhiv.*, 62:179-186**
- KOZARIC, Z., NOVAK, R. & SREBOCAN, E. (1993) - **Histochemical activity of some enzymes in the hepatopancreas of the carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to the effect of food-added methoxyethylmercuric acetate, *Veterinarski Arhiv.*, 63:85-94**
- KRALJ KLOBUCAR, N. & STUNJA, A. (1994) – **Effects of selenium, lead and magnesium on the activity of hydrolytic enzymes in kidneys of the carp (*Cyprinus carpio* L.), *Period. Biologorum* 96:496-498**
- KRISHNAN, V. A. & GNANAM, A. (1988) – **Properties and regulation of Mg²⁺-dependent chloroplast inorganic pyrophosphatase from *Sorghum vulgare* leaves, *Arch. Biochem. Biophys.*, 260:277-284.**
- KRUZEL, M. & MORAWIECKA, B. (1982) - **Acid phosphatase of potato tubers (*Solanum tuberosum* L). Purification, properties, sugar and amino acid composition, *Acta Biochim. Polon.*, 29:321-330.**
- KUBICZ, A., WAHEED, A. & VAN ETTEN, R.L. (1985) - **Isolation and characterization of a homogeneous acid phosphatase (EC 3.1.3.2) from catfish (*Ictalurus punctatus*) liver, *Comp. Biochem. Physiol.*, 81(B):177-184**
- LAIDLER, P. M., TAGA, E. M. & VAN ETTEN, R. L. (1982) - **Human liver acid phosphatases: Cysteine residues of the low-molecular-weight enzyme, *Arch. Biochem. Biophys.*, 216: 512-521.**
- LAU, K.-H.W.; FARLEY, J.R. & BAYLINK, D.J. (1987) - **Bone acid phosphatase is a neutral pH phosphotyrosyl protein phosphatase, *Adv.***

Prot. Phosphatases, 4:165-198.

- LAWRENCE, G. L. & VAN ETTEN, R. L. (1981) - **The low molecular weight acid phosphatase from bovine liver: isolation, amino acid composition and chemical modifications studies**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 206:122-131.
- LAYNE, E. (1957) - **Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins**, *Meth. Enzymol.* III:447-454.
- LEVIN, O. (1962) - **Column Chromatography of Proteins: Calcium Phosphate**, *Methods in Enzymology*, V:27-32
- LOVELACE, J.K.; DWYER, D.M. & GOTTLIEB, M. (1986) - **Purification and characterization of the extracellular acid phosphatase of *Leishmania donovani***, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 20:243-251.
- LOWRY O. H. & LOPEZ J. A. (1945) - **The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters**, *J. Biol. Chem.*, 162:421-424.
- MAYER F. C., CAMPBELL, R. E., SMITH, A. K. & MCKINNEY, L. L. (1961) - **Soybean phosphatase. Purification and properties**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 94: 301-307.
- MEDDA, C., BHATTACHARYYA. B., SARKAR.S.K., GANGULY, S. & BASU, T K. (1995) - **Effect of rotenone on activity of some enzymes and their recovery in freshwater carp fingerlings of *Labeo rohita***, *J. Environm. Biol.*, 16:55-60
- NEUMAN, H. (1968) - **Substrat selectivity in the action of alkaline and acid phosphatase**. *J. Biol. Chem*, 243:4671-6, 1968.
- OSTROWSKI. W. et alii, (1976) - **Acid phosphomonoesterase of human prostate, carbohydrate contend and optical properties**, *Biochem.*

- Biophys. Acta*, 453:262-269-1623
- PANARA, F. & PASCOLINI, R. (1989) - **Acid phosphatases from liver of *Cyprinus carpio***, *Comp. Biochem. Physiol.*, 92(B):751-754
- PANARA, F., et alii., (1992) - **Acid phosphatases in mammalian tissues. Evidence for the existence of a 57 kDa - Zn²⁺ dependent acid phosphatase form.**, *Int. J. Biochem.*, 24:1619-1623
- PARK, H.-S.C. & VAN ETTEN, R.L. (1986) - **Purification and characterization of homogeneous sunflower seed acid phosphatase**, *Phytochemistry*, 25:351-357.
- REID, T. W. & WILSON, I. B. (1971) - ***E. coli* alkaline phosphatase**. In *The Enzymes*, 2nd, IV:375-415. edited by Boyer, P. D. Academic Press., N. Y.
- ROCHE, M. J. (1931) - **Sur les phosphatases du sang.**, *Bull. Soc. Chem. Biol.*, 13:841-856.
- SAEED, A., TREMORI, E., MANAO, G., CAMICI, G., CAPPUGI, G. & RAMPONI, G. (1990) - **Bovine brain Low M_r acid phosphatase: Purification and properties**, *Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR*, 22: 81-94.
- SCHELL, D., STIERHOF, Y.-D. & OVERATH, P. (1990) - **Purification and characterization of tartrate-sensitive acid phosphatase of *Trypanosoma brucei***, *FEBS Lett.*, 271:67-70.
- SCHENK, G., CARRINGTON, L.E. WYNNE C.J., SEARLE I.R., CARROL B. J., HAMILTON S., De JERSEY J. (1999) - **Binuclear metal centers in plant purple acid phosphatases: Fe-Zn in sweet potato and Fe-Zn in soybean**, *Arch. Biochem. Biophys.*, 370:183-189.
- SHAFFI, S.A. & DUBEY, R. P. (1989) - **DDT toxicity: Variations in tissue non-specific phosphomonoesterases and gluconeogenic enzymes in**

three teleosts, *Acta Physiol. Hung.*, 74:57-62

SHAIKILA, I. B., THANGAVEL, P. & RAMASWAMY, M. (1993) - **Adaptive trends in tissue acid and alkaline phosphatases of *Sarotherodon mossambicus* (Peters) under sevin toxicity, *Indian Journal of Environ. Health*, 35:36-39**

SHIBKO, S. & TAPPEL, A.L. (1963) - **Acid phosphatase of the lysosomal and soluble fraction of rat liver, *Biochim. Biophys. Acta* 73:76-86.**

SIDIK, A. S., SUGITA, H. PAAT, S. & DEGUCHI, Y. (1990) - **Alkaline and acid phosphatases in a tank water rearing carp (*Cyprinus carpio*), *Bulletin of the College of Agriculture and Veterinary Medicine Nihon University*, 0(47):32-37**

SUGIURA, Y. KAWABE, H., TANAKA, H., FUJIMOTO, S. & OHARA, A. (1981) - **Purification, enzymatic properties and active site environment of a novel manganese (III)-containing acid phosphatase, *J. Biol. Chem.* 256: 10664-10670.**

TAGA, E.M. & VAN ETTEN R.L. (1982) - **Human liver acid phosphatase: purification and properties of a low molecular weight isoenzymes, *Arch. Biochem. Biophys.*, 214:505-515.**

TAGA, E.M. (1979) - **Fosfatase ácida de fígado de cobaia: purificação, estudos eletroforéticos e algumas propriedades. Tese de Doutorado, Instituto de Química, USP.**

VERMA, S.R., TONK, I. P., CHAND, R. (1985) - ***In vivo* accumulation and effects of mercuric chloride on tissue phosphatases of *Notopterus notopterus*, *Clin. Physiol. Biochem.*, 3:199-203**

VINCENT, J. B., CROWDER, M. W. & AVERILL B. A. (1992) - **Hydrolysis of phosphate monoesters; a biological problem with multiple chemical**

solutions, *Trends Biochem. Sci.*, 17: 105-110.