

CAMILA WIELEWSKI LEME

**“ESTUDO DO EFEITO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NAS
ATIVIDADES DE DUAS FOSFATASES ÁCIDAS”**

**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CAMILA WIELEWSKI LEME

**“ESTUDO DO EFEITO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NAS
ATIVIDADES DE DUAS FOSFATASES ÁCIDAS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Camila Wielewski Leme
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Hiroshi Aoyama

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestra em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

CAMPINAS,

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

L542e

Leme, Camila Wielewski, 1989-
Estudo do efeito do peróxido de hidrogênio nas
atividades de duas fosfatases ácidas / Camila Wielewski
Leme. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Hiroshi Aoyama.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Água oxigenada. 2. Fosfatase ácida. 3.
Oxirredução. 4. Mamona. 5. Rim. 6. Bovino. I.
Aoyama, Hiroshi, 1943-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Study of the effect of hydrogen peroxide in the activities of two acid phosphatases

Palavras-chave em Inglês:

Hydrogen peroxide
Acid phosphatase
Oxidation-reduction
Castor beans
Kidney
Bovine

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Hiroshi Aoyama [Orientador]
Cláudio Chrysostomo Werneck
Melissa Regina Fessel

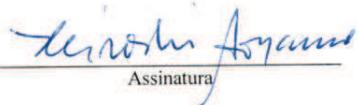
Data da defesa: 14-03-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 14 de março de 2013

BANCA EXAMINADORA

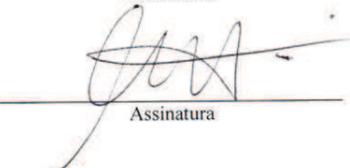
Prof. Dr. Hiroshi Aoyama (Orientador)


Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck


Assinatura

Dra. Melissa Regina Fessel


Assinatura

Prof. Dr. Jose Camillo Novello

Assinatura

Profa. Dra. Helia Harumi Sato

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo apoio, carinho e compreensão;

À minha irmãzinha, por me ensinar o que é amor incondicional;

Ao Eric, meu amigo e companheiro, amor da minha vida, por aliviar as horas de tensão e por todos os momentos felizes, por fazer parte da minha caminhada tornando-a tão deliciosa;

Ao prof. Hiroshi, por me receber em seu laboratório, pelo excelente mestre, professor e conselheiro que é, sempre maravilhoso e dedicado;

À Roberta, em especial, por me ajudar tanto nos momentos que precisei e pela amizade...nunca conseguirei expressar devidamente o quanto sou grata;

Ao dr. Cláudio Jonsson, por todos os conselhos, sugestões e pela compreensão;

Ao prof. Camillo, pelos conselhos, sugestões e pela compreensão;

Ao prof. Cláudio Werneck, por me receber em seu laboratório, pelos conselhos, pela ajuda e pelas conversas, pelo seu jeito tão calmo e receptivo;

À Ariana, minha querida amiga, por sempre estar presente nos momentos mais felizes e mais tristes da minha caminhada, por sempre ouvir meus desabafos e me dar forças para continuar, e pelas traduções para o inglês;

À Erika, pela imensa ajuda nas discussões e nos experimentos, pela ajuda na montagem da dissertação final e pela amizade;

À Cinthia, amiga argentina, pois sem seus conselhos eu não teria tido a coragem e a iniciativa que precisava;

À Viviane, pela amizade, pelas dicas e pela indicação da Dra. Melissa para minha banca;

À profa. Carmen, por me receber em seu laboratório e pela ajuda;

À Thaís, à Karin, à Josélia e à Denise, por sempre me auxiliarem no Laboratório de Transdução de Sinais, e pela amizade. À Thaís especialmente por me ajudar em alguns experimentos e pela amizade;

Ao pessoal dos laboratórios de Transdução de Sinais e de Química das Proteínas, por todos os equipamentos e reagentes emprestados tão prontamente;

Ao pessoal do Bat Lab, em especial, Fernanda, Ricardo e Marcos, por serem exemplos para mim, pelas pessoas maravilhosas que são, pela excelência e dedicação com que fazem seu trabalho e com as quais me ensinaram boa parte do que sei hoje;

À minha primeira orientadora, durante a iniciação científica, Lucile, por ser a pessoa maravilhosa que é, por ter me iniciado na academia e pelo exemplo de seriedade e dedicação que sempre foi;

À Darlene e à Camila, do Laboratório de Enzimologia, pela amizade e pelos conselhos;

A todos os meus amigos que de alguma forma se fizeram presentes durante os momentos de trabalho e de descontração;

Ao Márcio Miranda, pelas discussões tão rápidas e produtivas e pela amizade;

Aos irmãos Granjeiro, que mesmo sem saber me auxiliaram muito realizando um excelente trabalho de purificação e caracterização das fosfatases utilizadas nesse trabalho;

Aos membros da banca, prof. Cláudio, dra. Melissa, profa. Hélia e prof. Camillo, por aceitarem ser parte de um processo tão importante para mim. Em especial, à dra. Melissa e ao prof. Cláudio pelas correções, sugestões e comentários;

À Andréia, secretária da pós, e à Viviane, por sempre me ajudarem a resolver todos os problemas burocráticos, pela personalidade vibrante e pelo bom humor mesmo nas maiores confusões;

Ao pessoal da limpeza, que sempre deixa o laboratório em condições de uso;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro;

Ao Instituto de Biologia, por oferecer as condições necessárias para a realização deste trabalho.

“Nunca nos banhamos duas vezes no mesmo rio.”

Heráclito de Éfeso (544 – 484 a.C.)

ÍNDICE

	Página
Resumo	ix
Abstract	xi
Lista de figuras	xiii
Lista de tabelas	xiv
Abreviaturas	xv
1.Introdução	1
1.1 Fosfatases ácidas	1
1.1.1 Importância das fosfatases	1
1.1.2 Classificação das fosfatases	1
1.1.3 Fosfatases ácidas	2
1.1.4 FAcS de organismos unicelulares	3
1.1.5 FAcS de animais	3
1.1.6 FAcS de vegetais	6
1.1.7 Experiência do laboratório com FAcS	8
1.2 Espécies ativas de oxigênio	8
1.3 Compostos protetores de danos por oxidação	14
1.3.1 Ditioneitol	14
1.3.2 Glutathione reduzida	16
1.4 Importância dos estudos das FAcS	18
1.5 Origem e purificação das FAcS utilizadas	19
2. Objetivos gerais e específicos	20
3. Materiais e métodos	21
3.1 Materiais	21
3.1.1 Enzimas	21
3.1.2 Reagentes	21
3.2 Métodos	22

3.2.1 Determinação da atividade enzimática	22
3.2.1.1 Ensaio enzimático na presença de H ₂ O ₂	23
3.2.1.2 Ensaio com FAc pré-incubada com H ₂ O ₂	23
3.2.1.3 Efeito de compostos protetores na atividade enzimática	23
3.2.1.4 Ensaio com FAc pré-incubada com composto protetor	23
3.2.2 Dosagem de proteína	24
3.2.3 Desglicosilação da FAc de mamona	24
3.2.4 Eletroforese em condições não desnaturantes	24
3.3 Cálculo dos parâmetros cinéticos	25
3.4 Análise estatística	25
4. Resultados e discussão	25
4.1 Ensaio enzimático	25
4.2 Avaliação da conservação das FAc	26
4.3 Efeito do H ₂ O ₂ na atividade das FAc	29
4.4 Efeito de DTT e GSH na atividade enzimática e na inibição por H ₂ O ₂	35
4.5 Efeito protetor de DTT e GSH contra a inibição por H ₂ O ₂	48
4.6 Capacidade de reversão da inibição por H ₂ O ₂ dos compostos DTT e GSH	57
4.7 Efeito do H ₂ O ₂ sobre a FAc de mamona sem carboidrato	62
4.8 Eletroforese em condições não desnaturantes	71
5. Conclusões	72
6. Referências	73

RESUMO

Atualmente, muito tem sido descoberto acerca dos mecanismos de controle do crescimento e coordenação celular, principalmente em células eucarióticas. Dentre tais mecanismos, o balanço entre a fosforilação e a desfosforilação de proteínas é a base para o controle de diversos eventos biológicos. As fosfatases são hidrolases que utilizam como substrato fosfatomonoésteres, e são amplamente distribuídas na natureza. As fosfatases ácidas (FACs) são enzimas que apresentam melhor atividade em meio ácido. O objetivo do presente trabalho é estudar o efeito de peróxido de hidrogênio em duas fosfatases ácidas cujos sítios ativos contêm cisteína.

Para tanto, FAC de sementes de mamona e FAC de rim bovino, ambas obtidas previamente em nosso laboratório, foram utilizadas no estudo. A primeira é uma glicoproteína, ao passo que a segunda não contém carboidrato em sua estrutura. Ensaio enzimáticos utilizando o substrato sintético p-nitrofenilfosfato (pNPP) foram realizados, em diferentes condições de incubação e exposição das enzimas.

A FAC de mamona apresentou grande resistência ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), fato que se mostrou independente da presença de carboidrato em sua estrutura. Ensaio na presença de ditioneitol (DTT) ou glutathione reduzida (GSH) provocaram inibição da enzima, porém a combinação de DTT ou GSH a H_2O_2 foi capaz de recuperar completamente a atividade enzimática. A exposição da FAC de mamona a DTT ou GSH não protegeu totalmente o sítio catalítico contra a oxidação por H_2O_2 , apesar de acarretar em menores taxas de inibição por esse composto. A exposição da enzima a H_2O_2 elevou a sua inibição.

A FAC de rim bovino apresentou grande susceptibilidade ao H_2O_2 . Os compostos DTT e GSH provocaram inibição de sua atividade, assim como observado para a FAC de mamona. A combinação de DTT ou GSH a H_2O_2 não reestabeleceu a atividade enzimática, sugerindo que há diferenças no processo de oxidação por esse composto entre as duas FACs utilizadas nesse trabalho. A

exposição da FAc de rim bovino a DTT ou GSH não foi eficaz na proteção do sítio catalítico, e a exposição dessa enzima a H_2O_2 elevou a inibição da atividade enzimática.

Nossos resultados sugerem que as FAcS, independentemente da presença de carboidrato na estrutura, sofreram oxidação de maneiras diferentes, apresentando comportamentos bastante divergentes entre si. Hipotetizamos que a FAc de mamona atingiu um estado reversível de oxidação, sendo que a cisteína tornou-se ácido sulfênico. Já a FAc de rim bovino deve ter alcançado um estado irreversível de oxidação, com a cisteína na forma de ácido sulfinico ou sulfônico.

ABSTRACT

Currently, much has been discovered about the mechanisms of control of cell growth and coordination, especially in eukaryotic cells. Among such mechanisms, the balance between the phosphorylation and dephosphorylation of proteins is the basis for the control of various biological events. The phosphatases are hydrolases using as substrate phosphate monoesters, and are widely distributed in nature. The acid phosphatases are enzymes that have better activity under acidic conditions. The goal of this work is to study the effect of hydrogen peroxide (H_2O_2) in two acid phosphatases which contains cysteine in their active site.

Therefore, castor bean and bovine kidney acid phosphatases, both previously obtained in our laboratory, were used in this study. The first is a glycoprotein, whereas the second contains no carbohydrate in its structure. Enzyme assays using the synthetic substrate p-nitrophenylphosphate (pNPP) were performed at different incubation conditions and exposure of the enzymes.

The castor bean acid phosphatase showed great resistance to H_2O_2 , a fact that was independent of the presence of carbohydrate in their structure. Assays in the presence of dithiothreitol (DTT) or reduced glutathione (GSH) caused enzyme inhibition, but the combination of the GSH or DTT and H_2O_2 was able to completely recover enzyme activity. Exposure of castor bean acid phosphatase to DTT or GSH did not fully protect the catalytic site against oxidation by H_2O_2 , although result in lower rates of inhibition by this compound. Exposure of the enzyme to H_2O_2 increased its inhibition.

Acid phosphatase from bovine kidney showed high susceptibility to H_2O_2 . The compounds DTT and GSH caused inhibition of its activity, as was observed for castor bean acid phosphatase. For this enzyme, the combination of DTT or GSH to H_2O_2 not reestablished enzyme activity, suggesting that there are differences in the oxidation process for this compound between the two phosphatases used in this work. Exposure of bovine kidney acid phosphatase to DTT or GSH was not effective in protecting the catalytic site, and the exposure of the enzyme to H_2O_2

increased the inhibition of enzyme activity. Our results suggest that the acid phosphatases, regardless of the presence of carbohydrate in the structure, underwent oxidation by different ways, presenting quite divergent behaviors.

We hypothesize that the castor bean acid phosphatase reached a state of reversible oxidation, and cysteine became sulfenic acid. As for acid phosphatase bovine kidney must have reached a state of irreversible oxidation with cysteine as sulfonic or sulfinic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esquema das reações catalisadas por FAcS.	2
2. Reação de Fenton.	10
3. Reação de Haber-Weiss.	11
4. Oxidação de FAc com cisteína no sítio catalítico.	13
5. Estrutura molecular do composto DTT em sua forma reduzida.	15
6. Redução de uma ponte dissulfeto típica pelo DTT.	15
7. Estrutura molecular da glutationa.	16
8. Representação esquemática do ciclo catalítico da glutationa.	17
9. Atividade enzimática das FAcS em presença de diferentes concentrações do substrato.	27
10. Atividade das fosfatases na presença de H_2O_2 .	30
11. Atividade enzimática na presença de H_2O_2 .	33
12. Atividade enzimática em presença de DTT e H_2O_2 .	37
13. Atividade enzimática em presença de GSH e H_2O_2 .	41
14. Efeito de desferoxamina na atividade enzimática das FAcS	44
15. Efeito de desferoxamina na atividade enzimática de FAcS expostas à GSH.	46
16. Efeito do tempo de exposição a DTT ou GSH e a atividade das FAcS.	49
17. Pré-incubação das FAcS com DTT.	51
18. Pré-incubação das FAcS com GSH.	54
19. Efeito do tempo de exposição ao H_2O_2 na atividade das FAcS.	58
20. Atividade enzimática das FAcS expostas à H_2O_2 .	60
21. Atividade enzimática da FAc de mamona desglicosilada.	63
22. Atividade enzimática da FAc de mamona desglicosilada em presença de H_2O_2 .	65
23. Atividade enzimática de FAc de mamona desglicosilada exposta à 1mM de DTT.	67
24. Atividade enzimática de FAc de mamona desglicosilada exposta à 1mM de GSH.	68
25. Atividade enzimática de FAc de mamona desglicosilada exposta à 2,5M de H_2O_2 .	70

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
I. Comparação das três classes de FAc animais.	4
II. Comparação entre as FAc de mamona e de rim bovino.	20
III. Comparação dos parâmetros cinéticos das FAc de mamona e de rim bovino.	28
IV. Valores de IC ₅₀ para H ₂ O ₂ de diferentes FAc.	31
V. Comparação dos parâmetros cinéticos das FAc de mamona e de rim bovino expostas à H ₂ O ₂ .	34
VI. Comparação dos parâmetros cinéticos das FAc de mamona e de rim bovino expostas à DTT e à H ₂ O ₂ .	38
VII. Comparação dos parâmetros cinéticos das FAc de mamona e de rim bovino expostas à GSH e à H ₂ O ₂ .	42

ABREVIATURAS

ADP:	Adenosinadifosfato
AE:	Atividade específica
AM _r :	Alta massa molecular relativa
BM _r :	Baixa massa molecular relativa
ATP:	Adenosinatrifosfato
BM _r :	Baixa massa molecular relativa
BSA:	Albumina do soro bovino
Cu ²⁺ :	Íon cobre
DP:	Desvio padrão
DTT:	Ditiotreitol
EAO:	Espécies ativas de oxigênio
FAc:	Fosfatase ácida
FAlc:	Fosfatase alcalina
Fe ²⁺ :	Íon ferro II
Fe ³⁺ :	Íon ferro III
GO:	Glutaciona oxidase
GR:	Glutaciona redutase
GSH:	Glutaciona reduzida
GSH-PX:	Glutaciona peroxidase
GSSG:	Glutaciona dissulfeto
H ₂ O ₂ :	Peróxido de hidrogênio
IM _r :	Massa relativa intermediária
kDa:	kiloDalton
K _m :	Constante de Michaelis-Menten
K _i :	Constante de inibição
Mg ²⁺ :	Íon magnésio
M _r :	Massa relativa
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
valor p:	Nível de significância

pCMB:	p-cloromercúriobenzoato
<i>pI</i> :	Ponto isoelétrico
PK:	Proteína quinase
pKa:	Constante de acidificação
PMSF:	Fenilmetilsulfonil fluoreto
pNP:	p-nitrofenol
pNPP:	p-nitrofenilfosfato
PP:	Proteína fosfatase
PPI:	Pirofosfato inorgânico
PTP:	Proteína tirosina fosfatase
RNA _m :	RNA mensageiro
-SH:	Grupamento sulfidríla
UE:	Unidade enzimática
V _{máx} :	Velocidade máxima da reação
' :	Minutos

1. Introdução

1.1 Fosfatases ácidas

1.1.1 Importância das fosfatases

Atualmente, muito tem sido descoberto acerca dos mecanismos de controle do crescimento e coordenação celular, principalmente em células eucarióticas. Dentre tais mecanismos, o balanço entre a fosforilação e a desfosforilação de proteínas é a base para o controle de diversos eventos biológicos disparados por efetores extracelulares, como hormônios, mitógenos, oncogenes, citocinas e neurotransmissores (Cohen, 1989a; Cohen, 1989b; Bonnet *et al.*, 2008; Boskey *et al.*, 2008; Rigor *et al.*, 2011; Shao & Diamond, 2012). A fosforilação de proteínas é realizada por um grupo de enzimas denominadas quinases, ao passo que a desfosforilação é realizada por enzimas denominadas genericamente fosfatases. Em termos gerais, fosfatases são hidrolases que utilizam como substratos fosfomonoésteres (Aoyama *et al.*, 2003; Shao & Diamond, 2012).

A atividade de proteínas quinases e fosfatases deve ser rigidamente regulada dentro da célula, garantindo a manutenção e o funcionamento adequado de inúmeras funções vitais. Alterações anormais na atividade de tais enzimas podem resultar em consequências graves, que incluem neoplasias e doenças resultantes de defeitos imunológicos. Vários organismos patogênicos alteram, *in vivo*, o nível de proteínas fosforiladas em células eucarióticas, tanto pela alteração da transcrição e tradução de proteínas quinases e fosfatases, como pela modulação da atividade endógena das mesmas (Jia, 1997; Bonnet *et al.*, 2008; Olson *et al.*, 2012; Robinson *et al.*, 2012; Stanford *et al.*, 2012).

1.1.2 Classificação das fosfatases

A primeira classificação das enzimas fosfatases foi estabelecida no início da década de 1930, quando as fosfatases purificadas de eritrócitos foram divididas em dois grupos principais, de acordo com o pH ótimo de atividade: ácidas e alcalinas (Roche, 1931). Atualmente, as fosfatases são divididas em três grupos principais: fosfatases alcalinas (FAlc), fosfatases ácidas (FAc) e proteínas

fosfatases (Aoyama *et al.*, 2003). As fosfatases ácidas (FAC), estudadas no presente trabalho, são denominadas ortofosfato monoéster fosfohidrolases (E.C. 3.1.3.2). As reações de hidrólise ou de transfosforilação catalisadas por essas enzimas estão ilustradas na figura 1.

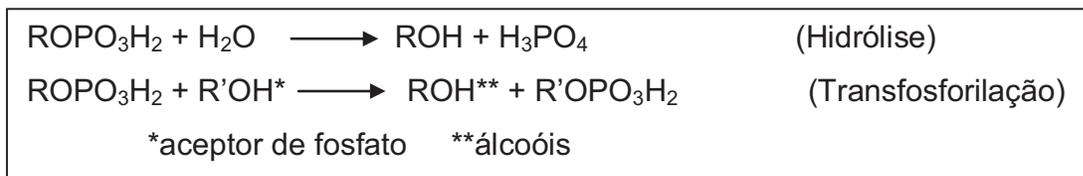


Figura 1. Esquema das reações catalisadas por FAcS. Retirado de Aoyama *et al.*, 2003

Tais enzimas são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas nos cinco grandes reinos dos seres vivos (Murray & Nathan, 1999; Granjeiro, Ferreira *et al.* 2002; Rigor *et al.*, 2011; Robinson *et al.*, 2012; D'Souza *et al.*, 2011).

Além do pH ótimo de reação, os dois grupos de fosfatases divergem em outros aspectos: as FAcS são insensíveis à presença de cátions mono e bivalentes no meio de reação (Chaimovich & Nome, 1970), não necessitando de sua presença para a ocorrência da reação. Já as FAlcs necessitam da presença de metais, principalmente Mg^{2+} , no meio de reação para sua atividade (Duff *et al.*, 1989; Duff *et al.*, 1991; Jonsson & Aoyama, 2010). Além disso, as enzimas possuem vias catalíticas diferentes (Vincent *et al.*, 1992a, b).

1.1.3 Fosfatases ácidas

As FAcS apresentam ampla distribuição na natureza, fato indicativo da importância de sua atividade em diversos processos vitais, em seres unicelulares ou pluricelulares, fotossintetizantes ou não (Granjeiro, Ferreira *et al.*, 2002; Rigor *et al.*, 2011; Robinson *et al.*, 2012; D'Souza *et al.*, 2011).

Além disso, essas enzimas apresentam diversas isoformas em um mesmo tecido, as quais podem ser distintas quanto à massa relativa, especificidades quanto aos substratos, sensibilidade a inibidores, ponto isoelétrico (pI), presença e quantidade de carboidratos ligados à cadeia polipeptídica.

1.1.4 FAcS de organismos unicelulares

Diferentes aspectos das FAcS têm sido estudados em organismos unicelulares (Lovelace *et al.*, 1986; González *et al.*, 1993; Turner *et al.*, 2012). Em tripanossomatídeos, por exemplo, particularmente no gênero *Leishmania sp.*, foi constatada abundante atividade fosfatásica nas formas promastigotas, localizada assimetricamente na membrana externa da célula (Gottlieb, 1981). Para o mesmo organismo, ainda se verificou que tais enzimas eram capazes de impedir a produção de ânion superóxido por neutrófilos humanos, inibindo uma das primeiras reações de defesa do organismo hospedeiro (Iniesta, Gomez-Nieto *et al.*, 2001; Turner *et al.*, 2012). Uma atividade de FAc, dependente de Mg^{2+} , foi detectada na superfície externa de formas procíclicas de *Trypanosoma brucei* (Fernandes *et al.*, 2003a, b).

O agente etiológico da tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*, secreta FAcS durante o processo de infecção, sendo tal enzima um alvo promissor para medicamentos anti-tuberculose (Wong *et al.*, 2012).

Atualmente, muito tem sido descoberto quanto ao papel das FAcS nos processos de invasão e infecção por diversos organismos unicelulares. Assim, esse grupo de enzimas pode ser um alvo bastante promissor no desenvolvimento de fármacos para combater diversas infecções bacterianas e protistas (Wong *et al.*, 2012).

De um modo geral, a expressão de FAc em organismos unicelulares é controlada por fatores ambientais, externos à célula. Dificilmente tal enzima é sintetizada na fase de crescimento exponencial, sendo característica da fase estacionária – o que sugere que sua síntese ocorreria em resposta à limitação de algum nutriente. Prova disso é o fato de que a privação de fosfato inorgânico extracelular ou a anaerobiose geralmente causam a imediata síntese de FAcS em *Escherichia coli* (Dassa *et al.*, 1982).

1.1.5 FAcS de animais

Em animais, as FAcS apresentam uma distribuição extremamente variada, podendo ser encontradas em diversos tecidos e órgãos como próstata, cérebro,

rins, fígado, coração, baço, glândulas salivares, sangue e células nervosas. Ainda é possível encontrar FAc no tecido ósseo, mais especificamente nos osteoclastos, onde está envolvida com a reabsorção da matriz extracelular (Canabarro *et al.*, 2012 ; Lima *et al.*, 2007; Oltramari, Navarro *et al.*, 2007; Cestari, Granjeiro *et al.*, 2009; Zambuzzi, Bruni-Cardoso *et al.*, 2009; Zambuzzi, Yano *et al.*, 2009; Yamada, 2012).

As FAc de tecidos animais podem ser distintas quanto à massa molecular, localização no interior da célula, especificidade quanto ao substrato e sensibilidade a inibidores (Zambuzzi, Granjeiro *et al.*, 2008; Zambuzzi, Yano *et al.*, 2009).

As FAc são classificadas conforme sua massa molecular relativa (M_r). Assim, tais enzimas podem se enquadrar em três classes: as de alta M_r (AM_r), as de baixa M_r (BM_r) e as de M_r intermediária (BM_r). As FAc incluídas na primeira classe, de M_r maior que 100kDa, estão geralmente localizadas na fração lisossomal e microssomal das células (Di Pietro *et al.*, 1967; Di Pietro, 1968; Beck *et al.*, 1986; Mila-Kierzenkowska *et al.*, 2012). Já as FAc de baixa M_r , menor que 20kDa (BM_r), juntamente com as de IM_r , em torno de 40kDa, são encontradas no citossol (De Araújo *et al.*, 1976; Helwig *et al.*, 1977; Galka *et al.* 1980; Fujimoto, 1984). A tabela I mostra uma comparação entre as três classes de fosfatases ácidas animais.

Tabela I. Comparação das três classes de FAc animais.

FAc - M_r	Massa molecular relativa (M_r)	Localização	Inibidores	Especificidade pelo substrato
Alta	> 100kDa	lissosomo, microssomo	tartarato e fluoreto	baixa
Intermediária	em torno de 40kDa	citossol	não há	baixa
Baixa	< 20kDa	citossol	pCMB, íons metálicos	alta

As formas de AM_r são fortemente inibidas por tartarato e fluoreto, enquanto que as de BM_r são relativamente insensíveis a estes inibidores e sensíveis ao p-cloromercúriobenzoato (pCMB), composto que se liga especificamente aos

grupos –SH livres (Shibko, 1963; Di Pietro *et al.*, 1967; Taga *et al.*, 1982). As FAc de IM_r são pouco sensíveis ao tartarato, pCMB e íons metálicos (Hayman, 1989). Essas essas FAc resistentes a pCMB são frequentemente relacionadas a patologias (Takahashi *et al.*, 2000).

As três classes de FAc também divergem quanto à especificidade pelo substrato. As de BM_r são um pouco mais específicas quanto aos substratos, enquanto que as de AM_r e IM_r hidrolisam uma ampla variedade de compostos fosforilados (Saeed *et al.*, 1990). Outra divergência entre as classes de FAc é que as de AM_r e IM_r podem apresentar metais como ferro, magnésio ou manganês ligados à sua estrutura.

As FAc de BM_r, subclasse à qual pertence a FAc de rim bovino utilizada no presente trabalho, constituem uma das classes das fosfotirosina proteínas fosfatases (PTPs), tendo como substratos proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina. Todas as enzimas dessa família são caracterizadas por apresentarem aproximadamente 240 aminoácidos e uma sequência conservada no sítio catalítico, que contém um resíduo de cisteína. Essa característica é responsável pela inibição da atividade das PTPs por pervanadato, pCMB e agentes oxidantes, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Aoyama *et al.*, 2003; Granjeiro, Miranda *et al.* 2004; Boskey *et al.*, 2008; Zambuzzi, Bruni-Cardoso *et al.*, 2009). As PTPs constituem uma grande família de enzimas com analogia às proteínas quinases em sua complexidade e diversidade estrutural. Estudos genéticos e bioquímicos mostraram que essas proteínas exercem efeitos tanto regulando positiva ou negativamente as vias de sinalização quanto no controle fisiológico de uma variedade de tecidos (Aoyama *et al.*, 2003; Granjeiro, Miranda *et al.*, 2004; Boskey *et al.*, 2008; Zambuzzi, Bruni-Cardoso *et al.*, 2009). Ações defeituosas ou inapropriadas das atividades dessas enzimas conduzem para fosforilações inadequadas de resíduos de tirosina, que contribuem para o desenvolvimento de muitas doenças, como câncer, diabetes, osteoporose e aterosclerose (Li, 2000; Souza *et al.*, 2009; Stanford *et al.*, 2012).

No interior da célula, FAc são encontradas não somente nos lisossomos – organela onde foram consideradas marcadores lisossomais - mas também no

citoplasma e em outras organelas como microssomos e aparelho de Golgi, além da membrana celular (De Duve *et al.*, 1955; Jonescu *et al.*, 1970; Himeno *et al.*, 1991; Mila-Kierzenkowska *et al.*, 2012).

1.1.6 FAcS de vegetais

Assim como nos animais, as FAcS de plantas apresentam variada distribuição na célula, podendo ser encontradas tanto na parte extracelular quanto intracelular (Kaneko *et al.*, 1990; Duff *et al.*, 1991b; Miernyk *et al.*, 1992). As FAcS da parede celular têm sido associadas à hidrólise de determinados substratos, oferecidos externamente à célula em tecidos não danificados, para obtenção de fósforo. Esse é um dos minerais mais importantes para o crescimento da planta, uma vez que apresenta um papel vital no equilíbrio energético e na regulação metabólica, além de ser constituinte de muitas biomoléculas. Consequentemente, sua assimilação, estocagem e metabolismo são de crítica importância para o desenvolvimento das plantas (Duff *et al.*, 1994; Robinson *et al.*, 2012).

As FAcS também são amplamente distribuídas entre as ordens de vegetais. Tal enzima pode ser detectada em diversos órgãos de diversas plantas superiores, sendo observada em folhas, tubérculos, nódulos de raízes, bulbos, pólen, coleóptiles, gérmen e sementes (Slack *et al.*, 1969; Uehara *et al.*, 1974; Rengasamy *et al.*, 1981; Pasqualini *et al.*, 1992; Guo & Roux, 1995; Ferreira, Granjeiro *et al.*, 1998a, b; Robinson *et al.*, 2012). Assim como as FAcS de mamíferos, as FAcS vegetais apresentam pH ótimo de reação em torno de 5,0. A temperatura ótima varia de tecido para tecido, mas em geral encontra-se entre 50-60°C. As propriedades cinéticas também variam conforme a fonte e a isoenzima isolada. A inibição por metais e fluoretos, a independência de cátions para a catálise e a inespecificidade para substratos parecem comuns entre tal classe de enzimas. Porém, parece haver predileção por ésteres fosfatados, açúcares fosfatados, nucleotídeos e pirofosfato (Rengasamy *et al.*, 1981; Basha, 1984; Pasqualini *et al.*, 1992).

Vale ressaltar que as FAcS vegetais apresentam algumas propriedades físico-químicas que não são observadas nas enzimas de origem animal, tais como

a presença de carboidrato na estrutura, que pode ser constituído por açúcares como manose, ramnose, glicose, galactose e glicosamina (Kruzel & Morawiecka, 1982).

Em nosso laboratório purificamos FAcS vegetais de soja e de mamona, cujas estruturas contêm carboidratos (Ferreira, 1995; Granjeiro, P., 1998). Em função da natureza glicoprotéica das FAcS de plantas, é possível entender a ligação dessas enzimas com lectinas (proteínas que se ligam reversível e especificamente a carboidratos), particularmente abundantes no gérmen de sementes de gramíneas. A ligação da cadeia de carboidrato da FAc à lectina normalmente altera a atividade hidrolítica da enzima, diminuindo o valor de K_m e aumentando a $V_{máx}$, bem como a estabilidade térmica das FAcS quando em presença de lectinas (Ferens & Morawiecka, 1985). Das quatro isoformas AP1, AP2, AP3A e AP3B purificadas de sementes de soja (Ferreira, 1995), apenas a isoforma AP1 era ativada pela lectina concanavalina A, sendo que a ligação da enzima com a lectina promovia uma estabilidade da enzima e era dependente do substrato utilizado (Aoyama *et al.*, 2001). Estes resultados sugerem que as lectinas podem ter um importante papel regulador na atividade destas enzimas.

Em vegetais, FAcS têm papel fundamental em diferentes estágios do desenvolvimento do indivíduo, devido à grande participação de tais enzimas na assimilação do fosfato, na regulação de proteínas por desfosforilação, na degradação de metabólitos tóxicos e nas vias de desvio (Biswas, 1991; Robinson *et al.*, 2012).

Além disso, foi relatada a participação de FAcS em eventos de desenvolvimento, como germinação, florescimento, frutificação, senescência, e resposta a alterações ambientais às quais a planta pode ser submetida, como cultivo da planta em altas concentrações de sal, baixa concentração de fosfato e água e também em ferimentos causados à planta – que elevam a atividade fosfatásica (Dewald *et al.*, 1993; Tadano *et al.*, 1993; Theodorou & Plaxton, 1993).

Em plantas superiores, assim como nos animais, modificações pós-traducionais, via fosforilação e desfosforilação de proteínas, também se mostraram ser de fundamental importância no controle dos processos metabólicos

(Krebs & Beavo, 1979; Budde & Chollet, 1988; Cohen, 1989a; Chung & Polya, 1992; Pesaresi *et al.*, 2011). Por exemplo, Staswick e colaboradores (Staswick *et al.*, 1994) verificaram que uma FAc das folhas de soja tinha sua atividade aumentada em dez vezes depois da remoção prematura das vagens, quando comparada com a atividade da mesma enzima em folhas de soja que tiveram as vagens retiradas na época normal.

1.1.7 Experiência do laboratório com FAcS

Em nosso laboratório, Granjeiro (Granjeiro, M., 1994) isolou e caracterizou uma FAc de baixa massa molecular de rim bovino, relatando que tal enzima tinha alta afinidade por tirosina fosfatada (Granjeiro, Taga *et al.*, 1997; Granjeiro, Ferreira *et al.*, 2002; Granjeiro, Miranda *et al.*, 2004). Ferreira (Ferreira *et al.*, 1998) purificou quatro isoformas de FAc do citoplasma de sementes quiescentes de soja. Ainda em nosso grupo de estudos, Granjeiro (Granjeiro, P., 1998) purificou e caracterizou uma fração da FAc de sementes de mamona. Foram também realizados estudos com flavonóides (Miranda, 2005) e de óxido-redução (Sousa, 2005) com FAcS purificadas de linfócitos humanos. As fosfatases foram estudadas como biomarcadores de poluição aquática em algas verdes (Jonsson & Aoyama, 2007; Jonsson *et al.*, 2009; Jonsson & Aoyama, 2010) e em *Daphnia similis* (Dantzger, 2010). Foram também realizados estudos referentes à germinação (Prazeres *et al.*, 2004), ao sítio ativo (Granjeiro *et al.*, 2003), efeito de agentes caotrópicos (Cavagis *et al.*, 2004), estabilidade térmica (Ferreira *et al.*, 1998; Granjeiro *et al.*, 2004); inibidores (Ferreira *et al.*, 2000; Granjeiro *et al.*, 2002), especificidade por substrato (Granjeiro *et al.*, 1997; Ferreira *et al.*, 1999) e regulação (Aoyama *et al.*, 2001).

1.2 Espécies ativas de oxigênio

No metabolismo aeróbico, glicose é oxidada a água e dióxido de carbono pela ação do oxigênio molecular, em uma reação envolvendo 24 prótons e 24 elétrons. O oxigênio, entretanto, nem sempre se transforma em água diretamente,

podendo receber um elétron de cada vez, com formação de espécies intermediárias, denominadas espécies ativas de oxigênio (EAOs).

As etapas intermediárias de redução do oxigênio são a formação de radical ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e o radical hidroxila (OH°). Cada molécula corresponde à etapa de redução por um, dois e três elétrons, respectivamente. Posteriormente, o oxigênio molecular no estado normal (tripleto) pode ser eletronicamente excitado ao oxigênio molecular singlete (1O_2). Dessas EAOs, os radicais O_2^- e o OH° constituem os radicais de oxigênio biologicamente mais importantes; H_2O_2 , e 1O_2 não são considerados radicais (Meneghini *et al.*, 1987; Bolin *et al.*, 2012; Lai *et al.*, 2012).

Algumas EAOs aparecem por processos semelhantes a acidentes químicos, uma vez que sua produção não faz parte de nenhuma via metabólica específica. Por exemplo, O_2^- e H_2O_2 são produzidos por reações químicas de O_2 com moléculas como adrenalina, dopamina ou tetrahydrofolato. Radiações eletromagnéticas de baixo comprimento de onda, como raios gama, degradam água para gerar OH° , enquanto luz UV pode clivar a ligação O-O de H_2O_2 para gerar 2 OH° (Darley-Usmar, 1996; Halliwell, 1996a, b, c; O'Neill *et al.*, 1996).

As EAOs são fortes oxidantes. Dentre elas, o radical hidroxila, com uma meia vida de 10^{-9} s, tem um poder oxidante extremamente alto, reagindo com qualquer molécula orgânica de uma maneira quase instantânea, praticamente no momento em que é gerado. Assim, há uma contínua necessidade de inativar essas EAOs através de agentes antioxidantes, através de diferentes mecanismos de proteção (Sies *et al.*, 1993; Darley-Usmar, 1996; Halliwell, 1996).

Um desbalanço em favor de pró-oxidantes, desfavorecendo os antioxidantes, potencialmente conduz a um dano denominado estresse oxidativo. Tais danos podem afetar todos os tipos de moléculas biológicas, incluindo DNA, proteínas, lipídeos e carboidratos. Assim, o estresse oxidativo pode estar envolvido em processos tais como mutagênese, carcinogênese, proliferação celular, morte celular, envelhecimento, dano à membrana citoplasmática, peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e fragmentação das mesmas, além de dano a carboidratos (Fucci *et al.*, 1983; Gutteridge *et al.*, 1984; Halliwell &

Gutteridge, 1984a,b; Trush *et al.*, 1985; Burdon *et al.*, 1996; Halliwell, 1996; McConkey *et al.*, 1996; Wiseman *et al.*, 1996).

Em células de organismos eucarióticos os efeitos deletérios das EAOs são controlados através de agentes antioxidantes (Sies, 1993; Halliwell, 1996). Entre os compostos antioxidantes, encontram-se enzimas, tais como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e outras espécies de baixa massa molecular, como α -tocoferol (vitamina E), ascorbato (vitamina C) e ubiquinol (Sies, 1993; Fridovich *et al.*, 1995; Halliwell, 1996).

A proteção fornecida por antioxidantes da dieta, tais como vitamina E e ascorbato já se encontra bem estabelecida. Estes antioxidantes dietários são importantes na prevenção de certas doenças humanas, especialmente a cardiovascular e alguns tipos de câncer. Alguns compostos possuem atividade antioxidante, atuando como supressores de radicais, como por exemplo, ubiquinol, urato, benzoato, manitol. Outros atuam como quelantes de metais envolvidos no surgimento de EAOs, como por exemplo a desferoxamina, que complexa íons ferro (Sies, 1993; Burdon *et al.*, 1996; Halliwell, 1996; Wiseman *et al.*, 1996).

A formação de radical hidroxila pode ocorrer através da reação de Fe^{2+} (ou Cu^+) com o H_2O_2 , através de uma reação de grande importância biológica, conhecida como reação de Fenton (Fenton, 1894), esquematizada na figura 2.

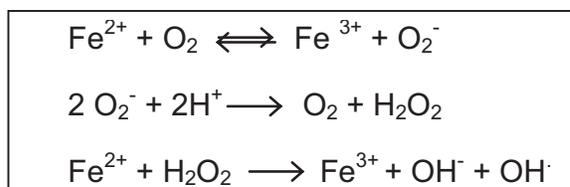


Figura 2. Reação de Fenton. Retirado de Ferreira & Matsubara, 1997.

Na reação de Fenton, um dos produtos é o cátion Fe^{3+} , que pode ser reduzido novamente a Fe^{2+} em presença do radical superóxido. A soma dessas duas reações constitui a chamada reação de Haber-Weiss, esquematizada na figura 3 (Haber & Weiss 1934; Meneghini *et al.*, 1987).

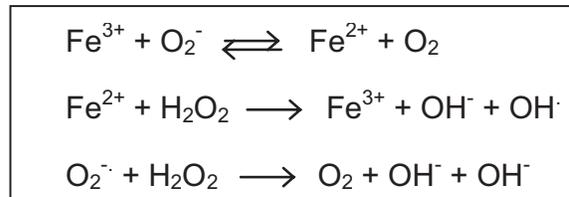


Figura 3. Reação de Haber-Weiss. Retirado de Ferreira & Matsubara, 1997.

É preciso destacar, entretanto, que o potencial destruidor das EAOs pode ser aproveitado pela natureza para a própria proteção do organismo (Augusto, 2006). Assim, por exemplo, quando há contato com organismos invasores, aparecem sinais químicos que orientam as células fagocitárias do sangue a se dirigirem para o sítio atingido. As células fagocitárias matam os organismos invasores ali presentes por meio de grande produção de EAOs. Isto ocorre através de estímulo na membrana da célula fagocitária, que produz o ânion superóxido, através de uma oxidase. A partir de O_2^- formam-se outras EAOs que acabam por matar os invasores. Ao mesmo tempo, estes vão sendo englobados pelas células fagocitárias (Sies, 1993).

Outro exemplo do emprego de EAOs na defesa do organismo é o relacionado a uma classe de glóbulos brancos, ou linfócitos, denominados matadores naturais (“natural killers”). Essas células reconhecem as células do próprio organismo que se tornaram tumorais ou foram infectadas por parasitas, fungos, bactérias ou vírus. Os linfócitos matadores naturais ligam-se às células alvo, provocando sua lise, aparentemente por meio da produção de grande quantidade de EAOs. Vários outros processos degenerativos podem ser provocados ou influenciados por EAOs, tais como artrite, catarata, enfisema, doença de Parkinson, diabete aloxânica, lesão isquêmica, porfiria aguda intermitente (Meneghini *et al.*, 1987; Bolin *et al.*, 2012). A formação de tumores também foi relacionada à ação de EAOs em vias dependentes de fosforilação e desfosforilação (Veeramani *et al.*, 2012).

Entretanto, parasitas possuem mecanismos para combater as EAOs produzidos pelas células imunológicas. Como descrito anteriormente, FAc resistente a tartarato, presente na superfície externa de *Leishmania donovani*,

inibe a produção de ânion superóxido por neutrófilos humanos, efeito este que é dependente da atividade catalítica da enzima e auxilia a invasão de macrófagos (Remaley, Das *et al.*, 1985; Remaley, Glew *et al.*, 1985; Murray & Nathan, 1999).

Proteínas contendo sulfidril (-SH) possuem função antioxidante, tanto por participar na tiolação de proteínas, quanto sendo oxidadas no lugar de macromoléculas essenciais como DNA, por estarem em maior quantidade, e assim protegendo DNA contra dano oxidativo (Sies, 1993; Halliwell, 1996; O'Neill *et al.*, 1996). Resíduos de aminoácidos com grupamentos sulfidrilas são passíveis de oxidação por H₂O₂, gerando pontes dissulfeto (S-S), ácido sulfênico (-SOH), ácido sulfinico (-SO₂H) e ácido sulfônico (-SO₃H), sendo que as duas últimas formas representam formas irreversíveis de oxidação (Aoyama *et al.*, 2003). O esquema da oxidação de FAcS com resíduo de cisteína no sítio ativo está mostrado na figura 4A e mais em detalhes na figura 4B.

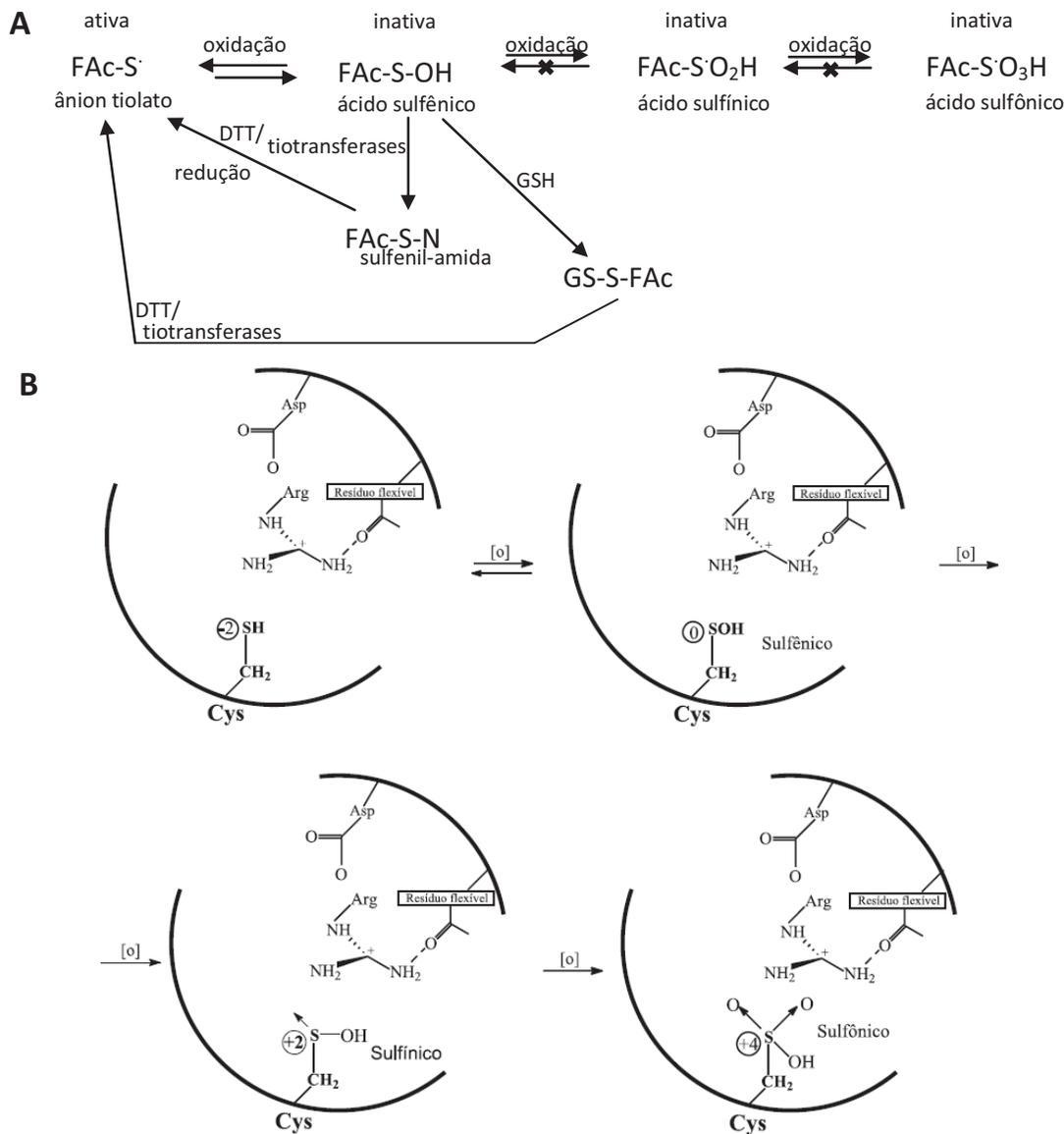


Figura 4. Oxidação de FAc com cisteína no sítio catalítico. A. Esquema da oxidação e da reversão. **B.** Detalhamento da oxidação no sítio catalítico. A cisteína do sítio catalítico está na forma de ânion tiolato sob condições normais devido ao seu baixo valor de pKa. A oxidação leva à formação de ácido sulfênico, e oxidações adicionais levam à formação irreversível de ácido sulfínico e ácido sulfônico. Ácido sulfênico é rapidamente convertido em sulfenilamida, que não pode mais ser oxidada a ácido sulfínico ou sulfônico, mas pode ser reduzida à forma de ânion tiolato, em resposta a tióis como o DTT. A forma de ácido sulfênico pode ainda ser convertida em um intermediário glutationilado na presença de GSH. Na presença de agentes redutores, como DTT ou tiotransferases, a FAc pode ser convertida a forma reduzida. Apenas a forma reduzida é cataliticamente ativa. Retirado de Aoyama *et al.*, 2003 e Hertog *et al.*, 2005.

A oxidação do resíduo de cisteína, causada por EAOs, pode inativar irreversivelmente a atividade das FAcS, como mostra a figura 4. Experimentos com supressores de radicais, substratos, produtos e cofatores metálicos sugerem que EAOs atacam um local próximo ao sítio ativo (Mordente *et al.*, 1987). Aspectos típicos da enzima modificada, como estabilidade térmica diminuída e um perfil bifásico de inativação pelo calor tornam a forma oxidada semelhante a enzimas envelhecidas (Mordente *et al.*, 1988).

Além disso, peroxidação lipídica também é capaz de inibir FAlc de membranas reconstituídas, com aumento na formação de substâncias reativas a ácidos tiobarbitúricos e dienos conjugados. Estudos com antioxidantes sugerem que a inibição da FAlc induzida por ascorbato/ Fe^{2+} estava relacionada com a geração de radicais hidroxila (Ohyashiki *et al.*, 1994).

Monteiro & Stern (Monteiro & Stern, 1996) postulam que o H_2O_2 , em baixas concentrações, é um inibidor transiente da PTP através da oxidação do grupamento sulfidrila da cisteína conservada no sítio catalítico, a qual apresenta atividade máxima na forma reduzida. Assim, a oxidação de FAcS com cisteína no sítio catalítico conduz a mudanças conformacionais e altera a atividade enzimática: o estresse oxidativo pode modulá-la negativamente de forma temporária e reversível. O mecanismo para a inativação transiente envolve a oxidação da cisteína para formar um ácido sulfênico (figura 4). Altos níveis de estresse oxidativo podem conduzir para estados oxidados irreversíveis em ácido sulfínico (Finkel & Holbrook, 2000). Dessa forma, a atividade da fosfatase é significativamente reduzida ou abolida, devido ao estresse oxidativo.

1.3 Compostos protetores de danos por oxidação

1.3.1 Ditioneitol

O ditioneitol (DTT, figura 5) é uma molécula cujo poder redutor concentra-se principalmente em meio alcalino, porém já foi relatado seu uso como redutor em meios ácidos (Baierle *et al.*, 2010).

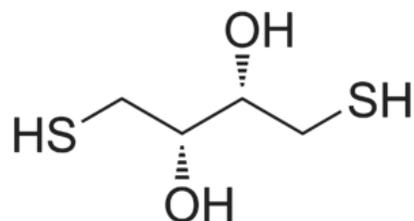


Figura 5. Estrutura molecular do composto DTT em sua forma reduzida.

A redução típica de uma ponte dissulfeto pelo DTT está representada na figura 6.

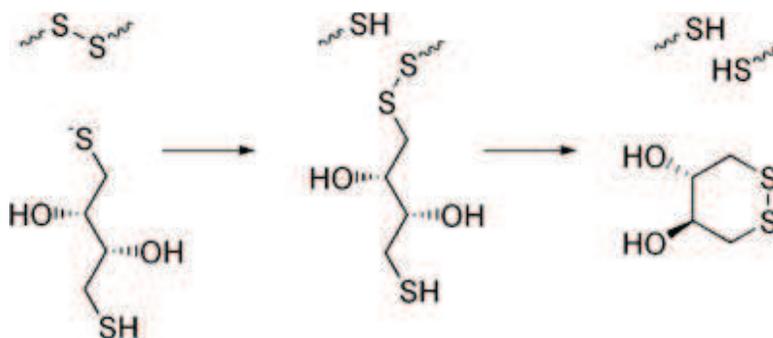


Figura 6. Redução de uma ponte dissulfeto típica pelo DTT.

A figura 6 mostra que, durante a redução de um composto, sua ponte dissulfeto interage com o DTT, o que resulta, ao final do processo, em um anel de DTT mantido por uma ponte dissulfeto, e a redução dos dois átomos de enxofre que formavam a ponte dissulfeto original.

Baierle e colaboradores (Baierle *et al.*, 2010) mostraram que, ao tratar com DTT enzimas com atividade inibida por compostos que atacam exclusivamente grupamento SH, há reativação total da atividade enzimática. Porém, quando a atividade não é totalmente recomposta, os autores inferem que há mais grupamentos, diferentes de SH, importantes na atividade catalítica e que não podem ser recuperados com DTT.

Em presença de DTT e uma quinolinodiona, o grupo comandado por Johnston (Johnston *et al.*, 2008) percebeu que a FAc animal conhecida por cdc25 produz H_2O_2 como um subproduto da reação. Tal fenômeno acaba por inibir a

atividade enzimática, que foi restaurada pela adição de catalase. Frente a tal resultado, os pesquisadores sugeriram que a produção de H_2O_2 , caso ocorra *in vivo*, pode ser um meio de regulação da atividade enzimática dentro da célula. Outro trabalho propõe que diversas EAOs, dentre as quais podemos citar o H_2O_2 , atuam regulando a atividade de proteínas fosfatases, como as PTPs (Meng & Zhang, 2012).

1.3.2 Glutathiona reduzida

Outro composto utilizado no presente trabalho é a glutathiona (figura 7), um tripeptídeo que possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo (Joseph *et al.*, 1997; Huber *et al.*, 2007).

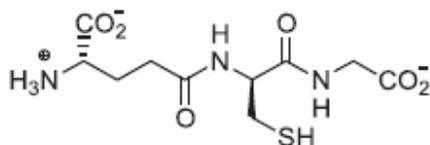


Figura 7. Estrutura molecular da glutathiona.

Em todos os organismos aeróbicos, é possível encontrar altas concentrações intracelulares de glutathiona reduzida (GSH) – cerca de 10mM para eritrócitos e 2mM para hepatócitos. Assim, tal composto é o mais abundante tiol celular de baixa massa molecular (Huber *et al.*, 2007).

Muitas das reações da GSH envolvem o grupo sulfidril (SH), altamente polarizável tornando-o um bom nucleófilo para reações com compostos químicos eletrofílicos. Essa habilidade de doar elétrons a outros compostos faz da glutathiona um bom redutor. Assim, sua abundância, aliada às suas propriedades químicas, suportam a hipótese de que a GSH surgiu na evolução bioquímica como uma proteção contra EAOs e compostos eletrofílicos gerados por processos oxidativos, tanto no organismo quanto no ambiente em que este vive (Huber *et al.*, 2007). A biossíntese desse composto ocorre dentro da célula, por ação de duas enzimas

que ligam os três aminoácidos que constituem a estrutura da glutathiona: ácido glutâmico, cisteína e glicina. Para que a atividade protetora da glutathiona, expressa pela redução de espécies oxidantes, e consequente oxidação da GSH à glutathiona dissulfeto (GSSG) seja mantida, a GSH precisa ser regenerada através de um ciclo catalítico, representado na figura 8 (Huber *et al.*, 2007).

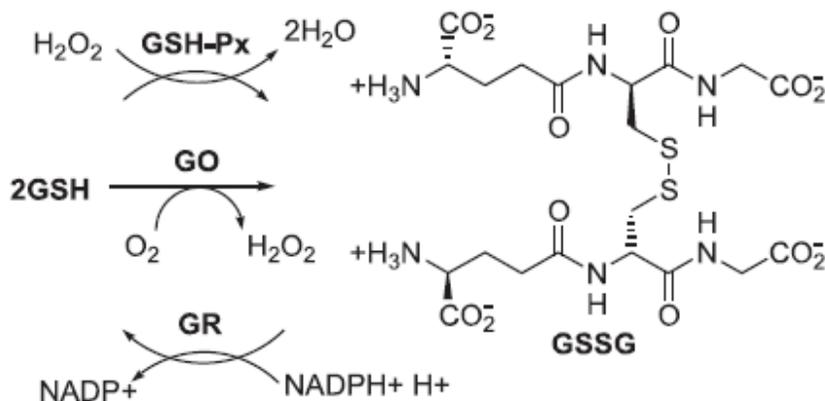


Figura 8. Representação esquemática do ciclo catalítico da glutathiona. GSH: glutathiona reduzida. GO: glutathiona oxidase. GSH-Px: glutathiona peroxidase. GSSG: glutathiona dissulfeto. GR: glutathiona redutase. Retirado de Huber *et al.*, 2007.

A figura 8 descreve o ciclo catalítico que garante a proteção da glutathiona contra danos oxidativos e envolve três grupos de enzimas: a glutathiona oxidase (GO), a glutathiona peroxidase (GSH-Px) e a glutathiona redutase (GR). As duas primeiras enzimas catalisam a oxidação de GSH à GSSG, e a última enzima regenera GSH a partir de GSSG na presença de NADPH (Huber *et al.*, 2007).

Em um contexto do ambiente celular, esse composto pode ser conjugado a compostos endógenos causadores de danos oxidativos, como radicais hidroxila citotóxicos, peróxidos de lipídios de membrana e produtos de degradação oxidativa do DNA, visando a desintoxicação da célula. Tal processo ocorre através da ação de enzimas conhecidas como glutathiona S-transferases, e está associado à resistência de plantas superiores como o milho a vários herbicidas (Cataneo *et al.*, 2003). As glutathiona S-transferases representam, em termos evolutivos, um mecanismo de defesa da célula. Porém, a célula também pode se utilizar dessa maquinaria na inativação de fármacos, como é o caso do fenótipo celular de

resistência a múltiplas drogas, que pode ser observado em células tumorais. Alterações no sistema enzimático glutathiona/glutathiona transferases têm sido apontadas como um importante mecanismo relacionado a esse fenótipo (Huber *et al.*, 2007; O'Connor *et al.*, 2007).

Assim, foi relatado que um aumento na concentração de H₂O₂ intracelular induz aumento da expressão de RNAm de glutathiona S-transferase em células de soja (Levine *et al.*, 1994).

A combinação de GSH e Fe³⁺ pode ter um efeito pró-oxidante, na presença da ectoenzima γ -glutamyl transferase (GGT), que participa do ciclo da GSH (Paolicch *et al.*, 2002). Em amostras enzimáticas provenientes de tecidos animais, ricos em hemoglobina, pode haver a presença de íons Fe³⁺. Por isso, para estudos para determinar proteção antioxidante do GSH, deve-se garantir que o meio esteja livre de Fe³⁺, utilizando-se, por exemplo, compostos quelantes de ferro com a desferoxamina.

1.4 Importância dos estudos das FAcS

Apesar de já ser sabido que as FAcS de plantas têm participação no metabolismo de fósforo, elemento essencial para o desenvolvimento e crescimento normal dos órgãos da planta, não se sabe a função fisiológica exata dessas enzimas (Budde *et al.*, 1988; Aoyama, Cavagis *et al.*, 2001). A determinação precisa das funções *in vivo* para fosfatases de plantas é dificultada por diversos fatores, como, por exemplo, a heterogeneidade das FAcS dentro de um tipo celular, o que raramente permite a purificação de todas as frações contendo atividade fosfatásica. Além disso, a falta de dados cinéticos para substratos não sintéticos para a maioria das fosfatases estudadas dificulta a interpretação de resultados e elaboração de ensaios. Também o fato de muitas fosfatases serem expressas apenas sob indução não facilita os estudos, uma vez que as condições e mecanismos para esta indução ainda não foram completamente elucidados, já que não se sabe exatamente o papel de cada uma das FAcS já descritas (De Araújo *et al.*, 1976; Cheng *et al.*, 1989; Chung *et al.*, 1992). A isso soma-se o fato de que, quando comparado com FAcS de mamíferos,

existe um número bastante inferior de trabalhos na literatura sobre FAcS de plantas, o que torna mais difícil a pesquisa envolvendo esta classe de enzimas.

Quanto às FAcS de mamíferos, atualmente a maioria dos estudos focam em enzimas envolvidas em processos patogênicos, como o câncer (Bhatt & Nagda, 2012; Olson *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2012). Assim, a maioria das publicações envolvendo FAcS de mamíferos não envolve estudos cinéticos e comparativos de enzimas não relacionadas diretamente a doenças. Dessa maneira, estudos cinéticos, estudos sobre inibição por oxidação, e o estudo comparativo de fosfatases de plantas com fosfatases de mamíferos, aqui representadas respectivamente por FAc de semente de mamona e FAc de rim bovino, é de grande importância para a compreensão futura do papel fisiológico dessas enzimas.

1.5 Origem e purificação das FAcS utilizadas

Granjeiro (Granjeiro, P., 1998) purificou a FAc de sementes de mamona (*Ricinus communis L.*) através de cromatografia de afinidade e de troca iônica. A fração obtida foi a isoforma API, que apresenta uma porção de carboidrato na estrutura protéica, e M_r de 60kDa. Tal fração foi armazenada a -20°C , com 50% de glicerol.

Granjeiro (Granjeiro, M., 1994) purificou a FAc de BM_r de rim bovino, obtendo um rendimento de 7% através de fracionamento com sulfato de amônio, tratamento ácido e cromatografia de troca iônica. A M_r estimada foi de 13,6 e 17,8 kDa, através de filtração em gel e SDS-PAGE, respectivamente (Granjeiro, M., 1994). A atividade máxima da enzima foi observada na temperatura de 60°C . A enzima foi conservada em glicerol 50% e 2-mercaptoetanol 1mM.

A tabela II mostra a comparação de alguns aspectos das duas fosfatases.

Tabela II. Comparação entre as FAcS de mamona e de rim bovino. Para determinação dos parâmetros cinéticos, foram utilizadas 0,03µg de FAc de sementes de mamona e 0,12µg de FAc de rim bovino (Granjeiro, P., 1998 e Granjeiro, M., 1994).

FAc	Mamona	Rim bovino
Massa molecular (kDa)	60	13,6 e 17,8
Purificação (x)	2100	1640
Glicoproteína	Sim	Não
pH ótimo de reação	5,5	5
K _m para pNPP (mM)	0,52	0,142
Temperatura ótima de reação	45°C	60°C
Inibição por tartarato	Não	Pequena
Cisteína no sítio ativo	sim	sim
V _{max} (µmol pNP/min)	95,8	49,1

2. Objetivos gerais e específicos

O objetivo principal do presente trabalho foi estudar o efeito de H₂O₂ em FAcS que contenham cisteína em seu sítio ativo. Para tal finalidade, optamos por realizar um estudo comparativo com duas fosfatases de origens distintas. Assim, selecionamos como modelo de estudo uma FAc de origem vegetal, previamente purificada e caracterizada em nosso laboratório, e uma FAc de origem animal, que passou pelo mesmo processo. A saber, as enzimas foram obtidas a partir de sementes de mamona (Granjeiro, P., 1998) e de rim bovino (Granjeiro, M., 1994), permitindo a exploração dos efeitos do H₂O₂ sobre o grupamento sulfidrila de diferentes FAcS.

A escassez de estudos comparativos entre FAcS de origem vegetal e animal, além do pequeno número de estudos associando agentes oxidantes, como o H₂O₂ com a atividade de enzimas que possuem resíduos de cisteína em seu sítio ativo nos motivou a desenvolver o presente trabalho.

Os objetivos específicos foram os seguintes:

⇒ Avaliar o estado de conservação das enzimas através da determinação do K_m e da V_{máx} para o substrato p-nitrofenilfosfato (pNPP);

⇒ Determinar o valor da concentração de H_2O_2 que inibe 50% da atividade enzimática (IC_{50}) para cada uma das FAcS;

⇒ Avaliar o efeito de compostos usualmente utilizados para evitar danos por oxidação, como DTT e GSH;

⇒ Avaliar os fatores que levam à resistência ou à sensibilidade ao H_2O_2 , em cada FAc.

3. Materiais e métodos

Para atingir os objetivos específicos do presente trabalho, utilizamos os materiais e métodos descritos a seguir. Todos os resultados representam a média de, no mínimo, uma triplicata. Em todos os ensaios, um controle foi realizado.

3.1 Materiais

3.1.1 Enzimas

As FAcS utilizadas foram obtidas e purificadas previamente em nosso laboratório (Granjeiro 1994; Granjeiro 1998). A FAc de semente de mamona estava armazenada a $-20^{\circ}C$, com 50% de glicerol. A FAc de rim bovino estava armazenada a $-20^{\circ}C$, em presença de 50% de glicerol e 1mM de 2-mercaptoetanol.

3.1.2 Reagentes

Substratos: p-nitrofenilfosfato (pNPP).

Agente oxidante: peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Agentes redutores de tióis: ditioneitol (DTT) em solução 1% fenilmetanosulfonil fluoreto (PMSF), glutathiona reduzida (GSH).

Reagentes para preparo dos tampões: ácido acético, glicina.

Reagentes para dosagem de pNP: hidróxido de sódio.

Reagentes para dosagem de proteína: carbonato de sódio, hidróxido de sódio, sulfato de cobre, citrato de sódio e o reagente de Folin-Ciocalteu.

Também foi utilizado tampão acetato 1M em pH 5,0 e pH 4,0.

Enzima para desglicosilação: endoglicosidase H (Sigma).

Todos os reagentes eram de pureza analítica. Em todos os experimentos, foi utilizada água ultrapura.

3.2 Métodos

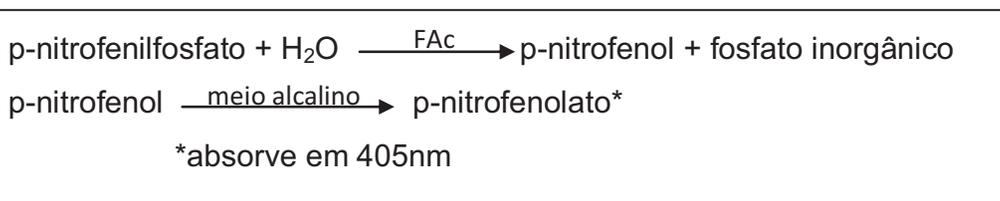
3.2.1 Determinação da atividade enzimática

Para a determinação da atividade enzimática, as amostras foram diluídas em tampão acetato 10mM pH5,0 imediatamente antes do ensaio enzimático ser realizado. O fator de diluição foi determinado previamente de modo que a absorbância final do ensaio ficasse em torno de 0,4, no comprimento de onda adequado para o método utilizado.

A atividade enzimática foi determinada por dosagem do produto de reação p-nitrofenol.

Dosagem de p-nitrofenol (pNP)

A atividade enzimática foi determinada a 37°C. Os ensaios foram realizados em presença de 5mM do substrato pNPP, tampão acetato 0,1M pH 5,0 e enzima em um volume final de 1mL. As reações foram paralisadas 10 minutos após a adição da enzima, com 1mL de hidróxido de sódio 1M. O esquema do ensaio enzimático é mostrado nas reações a seguir.



A leitura da absorbância foi realizada a 405nm, no leitor de placas Eon, através do software Gen 5 2.00[®]. A fim de possibilitar comparações com os trabalhos originais, realizamos leituras no espectrofotômetro Ultrospec 2000 e obtivemos fatores de correção que se comportaram de maneira linear para todo o espectro de absorbância utilizado nos ensaios e nos permitiram calcular a atividade específica para cada enzima. Assim, todos os valores apresentados

estão normalizados para a leitura em espectrofotômetro, da maneira como foram realizadas nos trabalhos originais com as fosfatases. O coeficiente de extinção molar do p-nitrofenolato é de $1,83 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em meio alcalino. Uma Unidade Enzimática (UE) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir $1 \mu\text{mol}$ de p-nitrofenol por minuto. A atividade específica (AE) foi dada pela relação UE/mg de proteína.

3.2.1.1 Ensaios enzimáticos na presença de H_2O_2

Em todos os experimentos em presença de H_2O_2 , tal composto foi adicionado imediatamente antes da adição da enzima. Os ensaios foram realizados sob a proteção de papel alumínio, para que não houvesse degradação do H_2O_2 , que é um composto foto-sensível.

3.2.1.2 Ensaios com FAc pré-incubada com H_2O_2

A pré-incubação das fosfatases com H_2O_2 , nos ensaios de avaliação de reversibilidade de inibição, foi realizada sob a proteção de papel alumínio e em banho de gelo, para preservar a integridade do composto H_2O_2 . O tempo de pré-incubação foi determinado experimentalmente. Após a pré-incubação a FAc foi adicionada ao meio de reação, sem haver retirada do H_2O_2 adicionado à pré-incubação.

3.2.1.3 Efeito de compostos protetores na atividade enzimática

Nos ensaios em presença de DTT e GSH, tais compostos foram adicionados à enzima imediatamente antes da reação, que se iniciou com a adição de pNPP.

3.2.1.4 Ensaios com FAc pré-incubada com composto protetor

A pré-incubação das FAc com DTT ou GSH, para os ensaios de proteção contra inibição por H_2O_2 , ocorreu em banho de gelo e sob a proteção de papel alumínio. O tempo de pré-incubação foi determinado experimentalmente. Após a

pré-incubação a FAc foi adicionada ao meio de reação, sem haver retirada do composto protetor adicionado à pré-incubação.

3.2.2 Dosagem de proteína

O teor protéico das enzimas utilizadas foi quantificado pelo método de Lowry, como descrito por Hartree (Hartree, 1972), utilizando a albumina de soro bovino como padrão. Resumidamente, são utilizados reagente C - preparado por 4 partes de reagente A (carbonato de sódio 2% em hidróxido de sódio 0,1M) e uma parte de reagente B (sulfato de cobre 0,5% em citrato de sódio 1%) - e reagente de Folin-Ciocalteu (diluído 1:1 em água). A reação foi iniciada pela adição de 2mL do reagente C à 0,2mL de amostra. Após 10 minutos, adicionou-se 0,2mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 30 minutos de reação em temperatura ambiente, a leitura da absorbância foi realizada a 660nm.

3.2.3. Desglicosilação da FAc de mamona

A FAc de mamona foi desglicosilada através da reação com a enzima endoglicosidase H. A FAc foi incubada durante 24h a 37°C com 12mU de endoglicosidase H, conforme o descrito por Granjeiro, que confirmou a desglicosilação em seu trabalho (Granjeiro, M., 1994). Os ensaios utilizando a FAc desglicosilada foram realizados imediatamente após o processo.

3.2.4 Eletroforese em condições não desnaturantes

Para avaliar a integridade das FAcS, realizamos eletroforese em condições não desnaturante. A eletroforese em gel de poliacrilamida 10% foi realizada de acordo com a técnica de Weber & Osborne (1969). Os géis de corrida (10%) e de empacotamento (5%) foram preparados em tampão tris-HCl 0,3M (pH 8,8 e 6,8 respectivamente) e colocados para polimerizar em placas de 7,0 x 10,0cm. O compartimento da cuba foi preenchido com tampão de corrida (0,2M de glicina e 0,25mM de tris pH 8,3). As amostras para corrida continham 25µg de proteína e foram preparadas tomando-se um volume de cada amostra e um volume do tampão de amostra (10% glicerol, 0,08% do tampão tris-HCl 1M, pH 6,8 e 200µL

de azul de bromofenol 0,2%). Foi aplicado um padrão de peso de molecular (SM0431, Fermentas) em cada gel, no lugar de uma amostra. Realizou-se uma pré-corrída de 2h utilizando o mesmo tampão de corrida em uma corrente de 60mA e, em seguida, correu-se a amostra por 5h, sob refrigeração. O azul de bromofenol foi utilizado como marcador de corrida. Após a corrida, os géis foram corados durante 12h com uma solução contendo 0,5mg/L de Coomassie Brilliant BlueR, 10% de ácido acético glacial e 40% de metanol. A descoloração foi obtida após lavagens sucessivas em uma solução contendo 10% de ácido acético glacial e 40% de metanol. Os géis foram armazenados em ácido acético 7%.

3.3 Cálculo dos parâmetros cinéticos

O cálculo de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foi realizado no programa GraphPad Prism 5.0 e no programa Origin 8.0, utilizando o modelo de hipérbole retangular.

3.4 Análise estatística

A análise foi realizada no programa GraphPad Prism 5.0, com método do teste de comparação múltipla de Tukey. Resultados significantes foram aqueles com $p < 0.05$.

4. Resultados e discussão

4.1 Ensaio enzimáticos

Em todos os ensaios com FAc de mamona, foi utilizado 0,185 μ g de proteína, valor cerca de 6 vezes maior que aquele utilizado nos ensaios cinéticos imediatamente após a purificação (Granjeiro, P., 1998). O autor utilizou apenas 0,03 μ g de proteína para obter uma absorvância em torno de 0,4. Este aumento na quantidade de proteína pode ser decorrente de alguma mudança estrutural na enzima, que poderia ter levado à desnaturação, causada pelo longo período de armazenamento a -20°C, cerca de 10 anos.

Para a FAc de rim bovino, foram utilizadas 0,12 μ g de proteína, quantidade cerca de 50% menor que aquela utilizada logo após a purificação da enzima por Granjeiro (Granjeiro, M., 1994), que utilizava 0,176 μ g para obter absorvâncias em

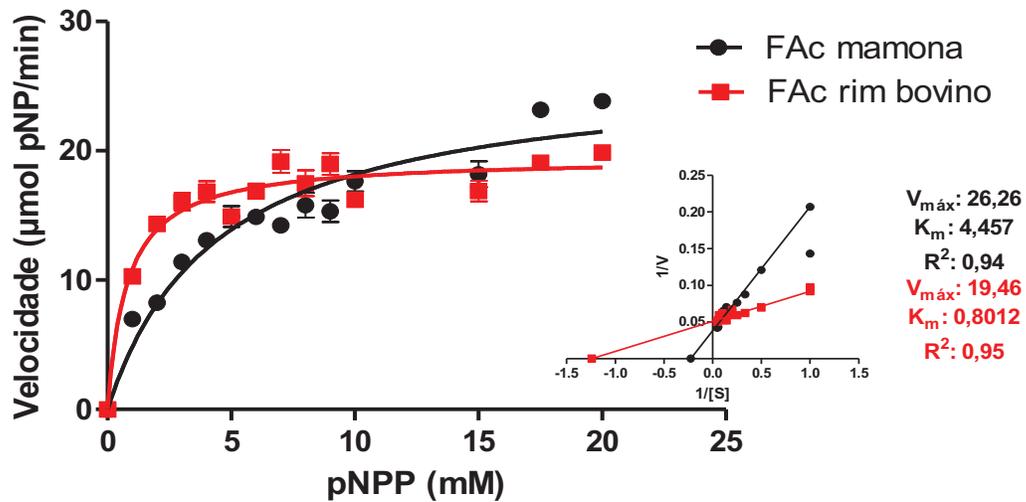
torno de 0,5, o que poderia requerer maior quantidade de proteína do que a utilizada no presente trabalho para obtermos absorvâncias em torno de 0,4.

A semelhança na quantidade de FAc de rim bovino utilizada nos ensaios cinéticos imediatamente após a purificação e no presente trabalho sugerem que a FAc de rim bovino estava bem preservada em termos estruturais.

4.2 Avaliação da conservação das FAc

A fim de avaliar brevemente o estado de conservação das enzimas, optamos por realizar testes cinéticos: obtivemos os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para cada FAc, que seriam comparados aos obtidos logo após a purificação das enzimas. A figura 9 mostra a relação entre a atividade enzimática e a concentração de substrato. A tabela III mostra a comparação dos valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ obtidos para cada FAc.

A



B

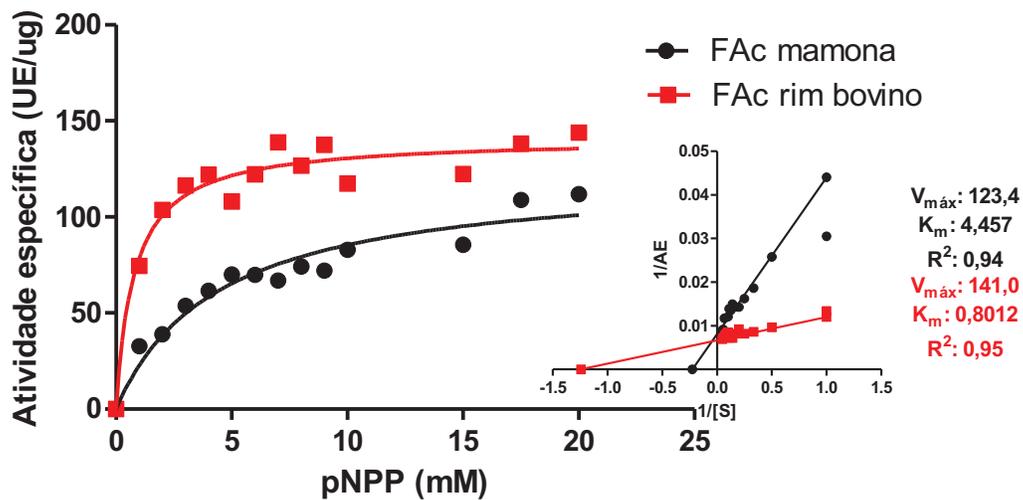


Figura 9. Atividade enzimática das FAc em presença de diferentes concentrações do substrato. A. Velocidade de reação. B. Atividade específica. Os ensaios foram realizados utilizando 0,185µg de FAc de mamona e 0,12µg de FAc de rim bovino, 0,1M de tampão acetato e diferentes concentrações do substrato pNPP. Cada ponto refere-se à média de uma triplicata.

Tabela III. Comparação dos parâmetros cinéticos das FAc de mamona e de rim bovino.

FAc	$V_{m\acute{a}x}$ ($\mu\text{mol pNP}/\text{min}$)	K_m para pNPP
FAc de mamona	26,26	4,457
FAc de rim bovino	19,46	0,8012
FAc de mamona (Granjeiro, P., 1998)	95,8	0,5200
FAc de rim bovino (Granjeiro, M., 1994)	49,1	0,1420

Como é possível observar na figura 9A e na tabela III, a velocidade máxima de reação alcançada pela FAc de mamona foi superior à atingida pela FAc de rim bovino.

Na maior concentração de substrato utilizada, 20mM de pNPP, a atividade específica da FAc de mamona também foi maior do que a da outra enzima. Para FAc de mamona, encontramos o valor de K_m de 4,4mM e $V_{m\acute{a}x}$ de 26 $\mu\text{mol pNP}/\text{min}$. Já para a FAc de origem animal, o valor de K_m determinado foi de 0,8mM e a $V_{m\acute{a}x}$, 19 $\mu\text{mol pNP}/\text{min}$. Essa diferença de valores pode ser explicada pelas quantidades de proteína utilizadas para cada FAc: aplicamos 50% mais proteína para o ensaio de FAc de mamona do que para FAc de rim bovino. No entanto, a tabela III permite realizar comparações com os trabalhos realizados logo após as purificações, para compararmos se houve alteração dos parâmetros cinéticos.

Podemos perceber que o valor de K_m encontrado para a FAc de mamona foi cerca de 9 vezes maior do que o obtido no trabalho realizado logo após sua purificação. A $V_{m\acute{a}x}$ atingida pela enzima também diferiu bastante da calculada originalmente, como mostra a tabela III. Isso sugere uma degradação parcial da enzima, que não estava 100% ativa. No trabalho original, 10mM de pNPP eram suficientes para atingir a $V_{m\acute{a}x}$, sendo que a concentração de substrato variou de 0,1mM a 10mM para a determinação da K_m . No presente trabalho, 10mM do substrato não garantiram um patamar de velocidade de reação, sendo necessário elevar a concentração de pNPP até 20mM.

Para a FAc de rim bovino, apesar de não ter havido necessidade de utilizar maior quantidade de proteína do que a utilizada no trabalho original, observa-se na figura 9A que o valor de K_m obtido foi mais de 6 vezes maior do que o

determinado logo após a purificação da enzima, como pode ser visto na tabela III. A $V_{m\acute{a}x}$ também divergiu bastante. No trabalho original, assim como no caso da FAc de mamona, 10mM de substrato foram suficientes para estabelecer um patamar de atividade enzimática, enquanto que no presente trabalho precisamos utilizar 20mM do mesmo composto para garantir tal condição. A variação de K_m pode sugerir que a enzima encontra-se ao menos parcialmente degradada ou ainda polimerizada, não apresentando 100% da atividade relatada no momento de sua purificação.

Observando a figura 9B, nota-se que, ao levarmos em conta a quantidade de proteína aplicada em cada ensaio, obtém-se uma $V_{m\acute{a}x}$ para FAc de rim bovino cerca de 0,14 vezes maior do que o valor encontrado para a FAc de mamona. Tal diferença era esperada, uma vez que utilizamos 50% mais proteína nos primeiros ensaios do que nos últimos.

Ainda assim, o padrão que pode ser observado na tabela I, onde a FAc de mamona apresenta valores de K_m e de $V_{m\acute{a}x}$ superiores aos obtidos para a FAc de rim bovino, é mantido na figura 9A, apesar de não termos encontrado os valores exatos presentes na tabela III.

Para ambas as fosfatases, se levarmos em conta o tempo de armazenamento, não é inesperado que elas se encontrem parcialmente degradadas. No entanto, consideramos que é possível dar continuidade nos testes, apesar da aparente degradação das enzimas, uma vez que a atividade enzimática detectada era suficiente para possibilitar a realização de um estudo do efeito de H_2O_2 sobre fosfatases com cisteína no sítio ativo.

4.3 Efeito do H_2O_2 na atividade das FAcS

O primeiro passo no estudo do efeito do H_2O_2 na atividade das fosfatases foi a determinação do valor de IC_{50} – concentração de do H_2O_2 que promove 50% de inibição da atividade enzimática – para cada enzima. A figura 10 mostra o efeito do aumento da concentração de H_2O_2 nas atividades enzimáticas da FAc de mamona (Figura 10A) e de rim (Figura 10B).

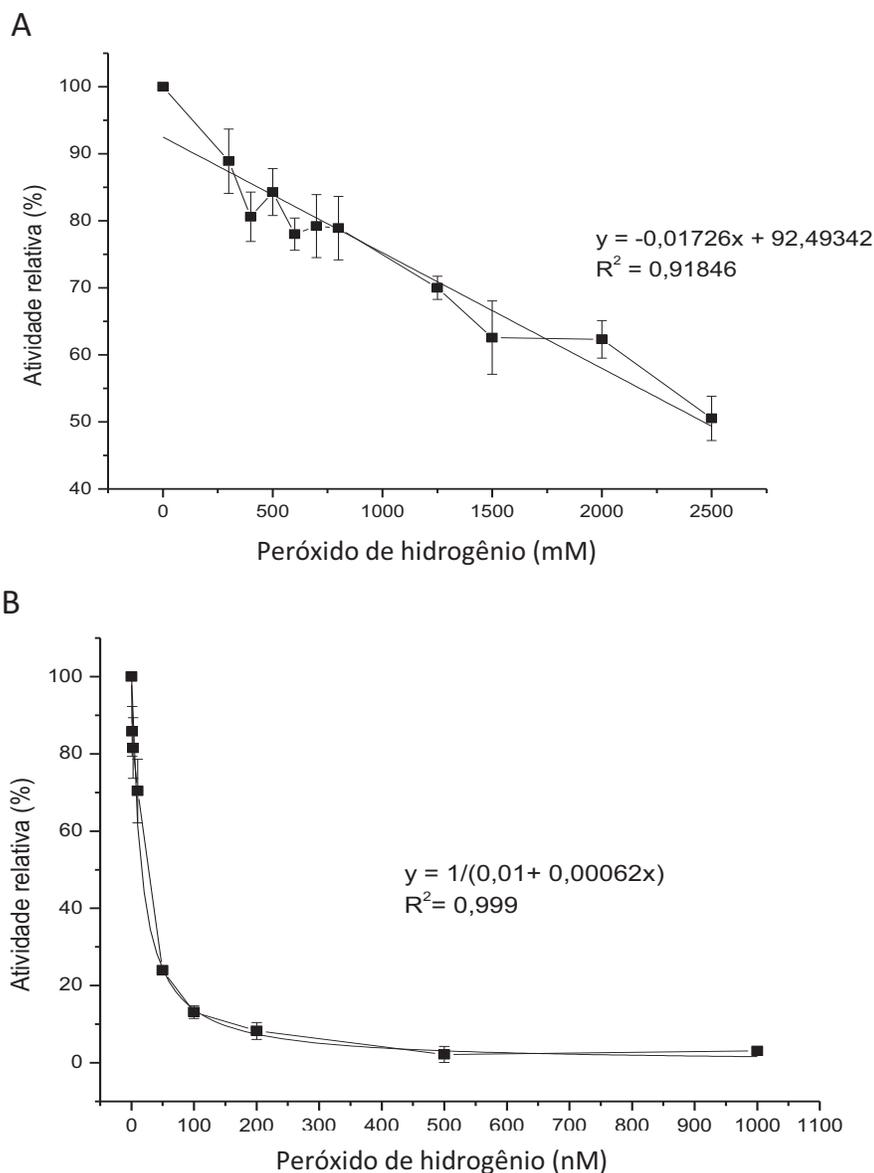


Figura 10. Atividade das fosfatases na presença de H₂O₂. A. FAc de mamona IC₅₀ = 2,45M. B. FAc de rim bovino. IC₅₀ = 16nM. Os ensaios foram realizados utilizando 0,185µg de FAc de mamona e 0,12µg de FAc de rim bovino, 0,1M de tampão acetato e diferentes concentrações de H₂O₂. Cada ponto refere-se à média de uma triplicata.

A equação de cada curva permitiu o cálculo do valor de IC₅₀ para cada fosfatase. Para a FAc de mamona, o valor de IC₅₀ determinado foi de 2,45M, e para a FAc de rim bovino, 16nM, que podem ser observados na figura 10.

Isso revela uma grande divergência quanto à resistência ao H_2O_2 : enquanto que a enzima de origem vegetal se mostrou bastante resistente ao H_2O_2 , a FAc de origem animal foi bastante afetada pelo composto, sendo inibida por concentrações bastante inferiores do mesmo. Em um primeiro momento, sugerimos que uma propriedade da FAc de mamona que pode ter contribuído para a resistência ao H_2O_2 é a presença de uma cadeia de carboidrato em sua estrutura, que está ausente na FAc de origem animal. Tal hipótese será testada no presente trabalho. Outro aspecto que pode auxiliar no entendimento da diferença observada é a condição estrutural da enzima: talvez a FAc de mamona esteja mais degradada (o que já foi sugerido e será verificado posteriormente), o que impede, parcialmente, a interação do H_2O_2 com a enzima, resultando em uma aparente resistência da enzima ao composto em questão. Também deve-se levar em conta que pode haver uma grande diferença na importância do resíduo de cisteína para cada enzima: talvez tal resíduo de aminoácido seja mais importante na atividade da FAc de rim bovino do que na FAc de mamona, e assim, a interação de H_2O_2 nesse local da enzima resulta em inibição mais intensa na enzima de origem animal. A tabela IV resume os resultados obtidos.

Tabela IV. Valores de IC_{50} para H_2O_2 de diferentes FAcS.

Enzima	IC_{50} para H_2O_2
FAc de mamona	2,45M
FAc de rim bovino	16nM
FAc proteína total V79 (Pinheiro, 2002)	10mM
FAc V79 extrato dialisada (Pinheiro, 2002)	25 μ M
FAc CD45 (Sousa, 2005)	50 μ M

O valor de IC_{50} para H_2O_2 encontrado para cada enzima representa extremos em um cenário dos estudos de inibição da atividade de fosfatases por H_2O_2 . Como mostra a tabela IV, Pinheiro (Pinheiro, 2002) observou que para atividade da fosfatase total uma PTP de BMr extraída de células V79, o valor de IC_{50} para H_2O_2 foi de 10mM, uma concentração de ordem de grandeza 100 vezes menor do que o encontrado para FAc de mamona, e mais de 1000 vezes maior do

que o observado para a FAc de rim bovino. Já para a mesma enzima, após diálise do extrato, a autora encontrou um valor de IC_{50} de $25\mu M$, mais semelhante ao encontrado para FAc de rim bovino no presente trabalho, porém, ainda 1000 vezes maior.

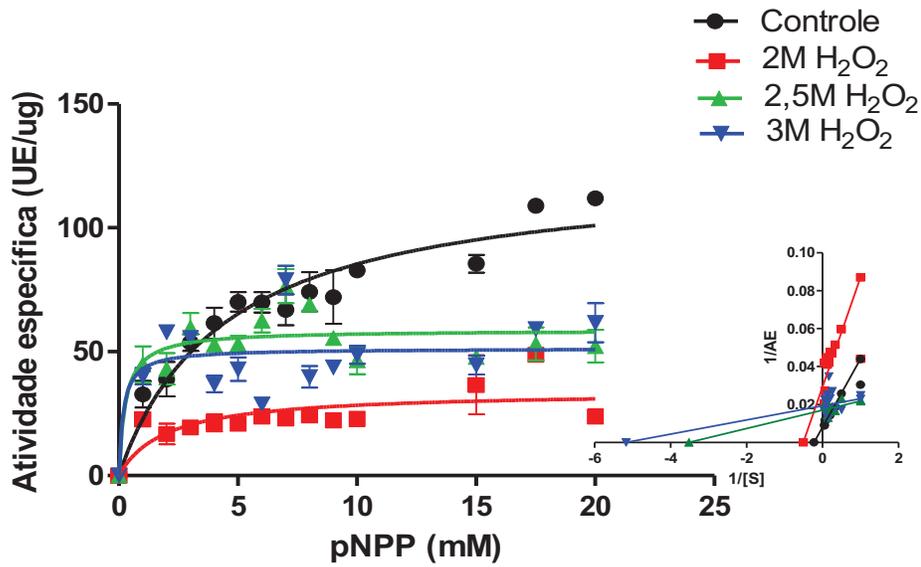
Em seu trabalho, Sousa (Sousa, 2005) relatou que atividade de uma proteína tirosina fosfatase purificada da membrana de linfócitos foi altamente inibida por H_2O_2 . O valor de IC_{50} encontrado pela autora foi de $50\mu M$, mais próximo do valor encontrado para a FAc de rim bovino. Assim, os estudos utilizando fosfatases de origem animal sugerem que estas possuem uma sensibilidade a H_2O_2 mais alta do que a observada para a FAc de mamona.

Vale ressaltar que concentrações de H_2O_2 inferiores a $50mM$, para a FAc de mamona, elevaram a atividade enzimática, atuando como um ativador enzimático. O aumento na atividade enzimática foi de no máximo 15%, em relação ao controle. Isso será discutido mais adiante, juntamente com os ensaios com a enzima desglicosilada.

Após determinarmos o valor de IC_{50} , realizamos ensaios com concentrações de H_2O_2 próximos ao do IC_{50} para cada enzima, a fim de estudar com mais detalhes o tipo de inibição em cada enzima.

A figura 11 mostra as curvas obtidas para diferentes concentrações de H_2O_2 , para ambas as fosfatases (11A para FAc de mamona e 11B para FAc de rim bovino), assim como a transformação de Lineweaver-Burk. A tabela V mostra a comparação dos parâmetros cinéticos obtidos para cada FAc.

A



B

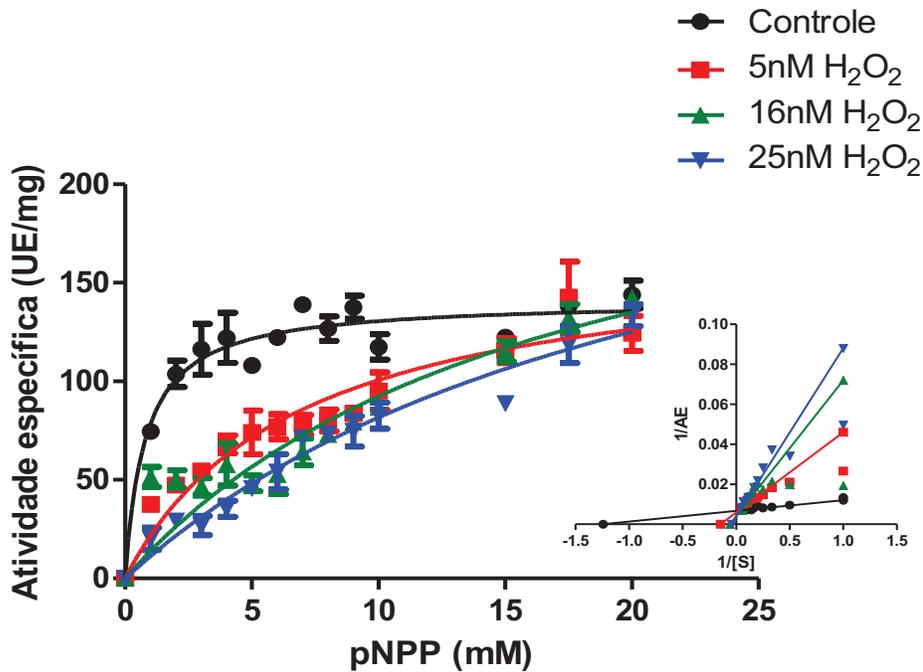


Figura 11. Atividade enzimática na presença de H₂O₂. A. FAc de mamona. B. FAc de rim bovino. Os ensaios foram realizados utilizando 0,185µg de FAc de mamona e 0,12µg de FAc de rim bovino, 0,1M de tampão acetato e diferentes concentrações do substrato pNPP. As concentrações de peróxido de hidrogênio são próximas ao IC₅₀ para cada enzima. Cada ponto refere-se à média de uma triplicata.

Tabela V. Comparação dos parâmetros cinéticos das FAcS de mamona e de rim bovino expostas à H₂O₂. Os ensaios foram realizados conforme descrito na metodologia.

FAc	H ₂ O ₂	V _{máx} (UE/mg)	K _m para pNPP
Mamona	0	123,4	4,45
	2M	33,9	1,98
	2,5M	58,7	0,28
	3M	51,2	0,19
Rim bovino	0	141,0	0,80
	5nM	169,4	6,83
	16nM	250,5	17,12
	25nM	268,4	22,87

Para a FAc de mamona, pode-se observar na figura 11A e na tabela V que, nas concentrações de 2,5M e 3,0M de H₂O₂, houve diminuição da K_m e da V_{máx} da enzima quando comparado com o controle. Já para a concentração de 2,0M a K_m não diferiu tanto, mas a V_{máx} atingida foi a menor observada, sendo cerca de 3 vezes menor do que o controle. Por se tratar de uma concentração tão alta de inibidor, não podemos afirmar que se trata de uma inibição do tipo mista, apesar de todos os parâmetros cinéticos terem sido alterados. Além disso, pode se tratar simplesmente de uma inibição da atividade enzimática devido ao estado oxidado da cisteína do sítio ativo.

Já para a FAc de rim bovino, a observação da figura 11B e da tabela V revela que a V_{máx} da reação não sofreu alteração, mas a K_m da enzima foi bastante alterada: para 25nM de H₂O₂, não atingimos a V_{máx} da reação. Assim, o valor de K_m determinado foi de 22mM, o que significa um aumento de quase 30 vezes para tal parâmetro cinético. Ou seja, a afinidade da enzima por pNPP diminuiu bastante na presença de 25nM de H₂O₂ em comparação com o controle. Para as demais concentrações de H₂O₂ utilizadas também não conseguimos atingir experimentalmente os valores de V_{máx}. No entanto, os cálculos evidenciam que houve, no geral, alteração maior no valor de K_m do que no valor de V_{máx}: o primeiro parâmetro foi alterado quase 30 vezes, enquanto que o segundo teve seu valor aumentado em menos de 2 vezes. Esse tipo de inibição, onde há alteração

de K_m , mas quase não há mudança de $V_{m\acute{a}x}$, sugere uma inibição do tipo competitiva. No entanto, não iremos afirmar que se trata desse tipo de inibição, pois podem estar ocorrendo diferentes tipo de oxidação nos resíduos de cisteína do sítio ativo da fosfatase, conforme foi elucidado na introdução, na figura 4. Acreditamos que a inibição da atividade enzimática pode ser explicada somente se pensarmos em estresse oxidativo, devido à oxidação que pode gerar ácido sulfênico, conforme afirmam Monteiro & Stern, para baixas concentrações de H_2O_2 (Monteiro & Stern, 1996; Finkel & Holbrook, 2000).

Exceto quanto à baixa concentração de H_2O_2 , tal forma de inibição da atividade enzimática pode inclusive se estender ao observado para a FAc de mamona.

Com essas informações, podemos sugerir que ambas as inibições de atividade enzimática ocorreram devido à oxidação do resíduo de cisteína do sítio catalítico das fosfatases, não se tratando de inibições reversíveis clássicas (competitiva, incompetitiva, mista) – um dos motivos que nos levou a não calcular o valor de K_i para as inibições. Porém, a grande diferença de comportamento das FAc na presença de H_2O_2 – incluindo aqui a diferença de sensibilidade observada entre as enzimas – pode talvez ser explicada por dois fatores, já mencionados anteriormente: o estado de conservação das enzimas e a presença de carboidrato na estrutura da FAc de mamona. Ambos os fatores poderiam determinar a acessibilidade do H_2O_2 ao sítio catalítico das enzimas, onde se localiza o resíduo de cisteína. Além disso, a importância desse aminoácido na catálise pode ser diferente entre as fosfatases, implicando respostas diferentes à sua oxidação.

4.4 Efeito de DTT e GSH na atividade enzimática e na inibição por H_2O_2

Para avaliar se compostos como DTT e GSH exibem algum efeito protetor sobre a inibição observada por H_2O_2 , primeiramente avaliamos o efeito de cada um desses compostos sobre a atividade enzimática. Também testamos os efeitos dos compostos quando adicionados ao meio de reação, juntamente com a FAc, na presença da concentração de H_2O_2 correspondente ao IC_{50} .

Para testar o efeito de cada composto nas atividades das fosfatases, realizamos testes na presença de 1mM de DTT ou GSH e concentrações crescentes de pNPP, o que nos permitiu determinar parâmetros cinéticos como K_m e $V_{m\acute{a}x}$ na presença desses compostos. Também testamos o efeito da presença combinada de H_2O_2 à DTT ou GSH. A figura 12A mostra o efeito do DTT sobre a atividade da FAc de mamona e a figura 12B, da FAc de rim bovino. A tabela VI evidencia os parâmetros cinéticos obtidos em cada um dos ensaios realizados.

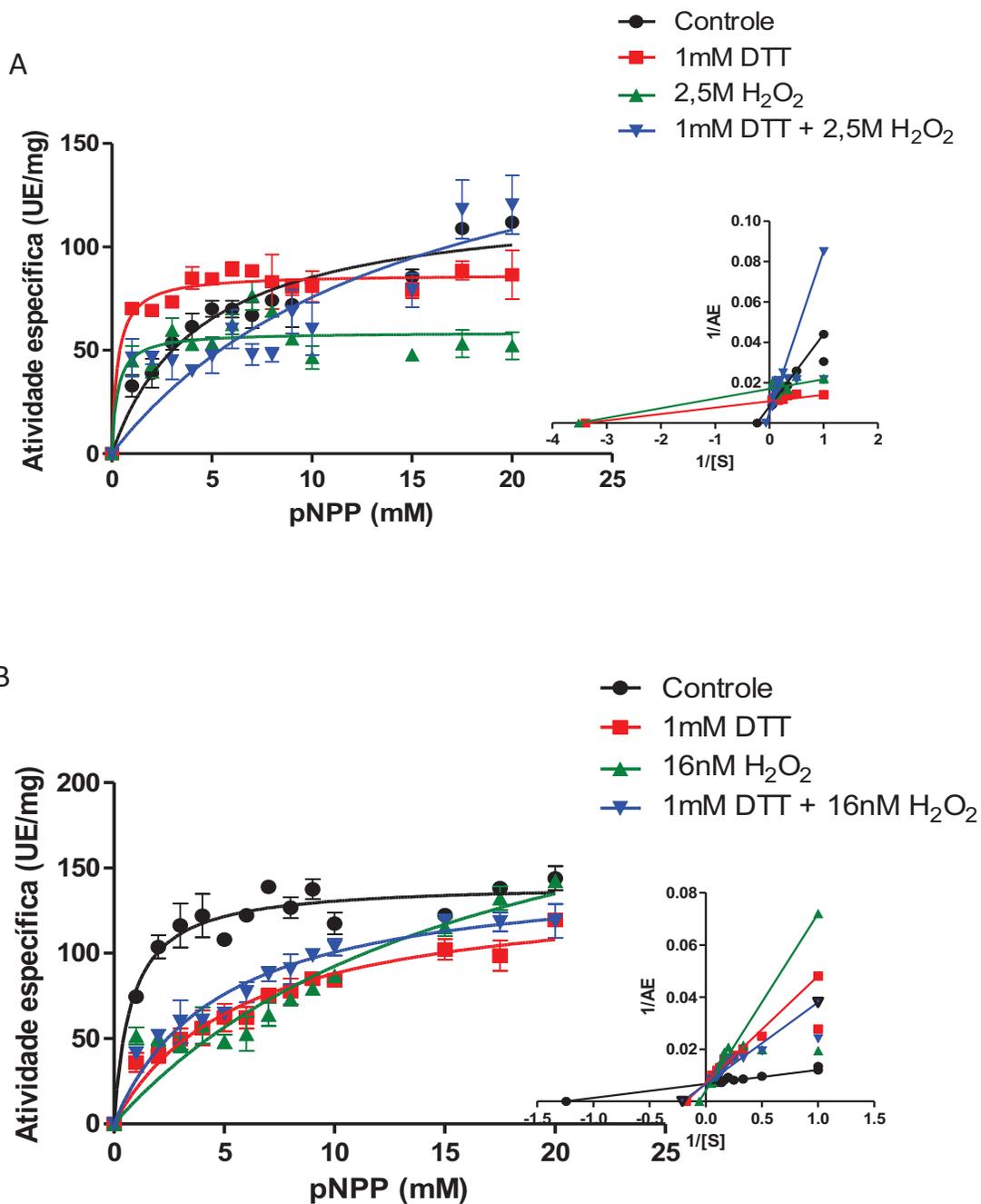


Figura 12. Atividade enzimática em presença de DTT e H₂O₂. A. FAc de mamona. B. FAc de rim bovino. Os ensaios foram realizados utilizando 0,185µg de FAc de mamona e 0,12µg de FAc de rim bovino, 0,1M de tampão acetato e diferentes concentrações do substrato pNPP. As concentrações de H₂O₂ utilizadas para cada enzima correspondem ao IC₅₀ para cada uma. Cada ponto refere-se à média de uma triplicata.

Tabela VI. Comparação dos parâmetros cinéticos das FAc de mamona e de rim bovino expostas à DTT e à H₂O₂. Os ensaios foram realizados conforme descrito na metodologia.

FAc	DTT (mM)	H ₂ O ₂	V _{máx} (UE/mg)	K _m para pNPP
Mamona	0	0	123,4	4,45
	1	0	86,8	0,29
	0	2,5M	58,7	0,28
	1	2,5M	190,6	15,22
Rim bovino	0	0	141,0	0,80
	1	0	139,4	5,81
	0	16nM	250,5	17,12
	1	16nM	149,0	4,80

A observação da figura 12 e da tabela VI mostra que o DTT tem efeito bastante diferente para cada uma das fosfatases utilizadas.

Para a FAc de mamona, 1mM de DTT promoveu a diminuição dos valores de K_m e de V_{máx}, assim como o observado para 2,5M de H₂O₂. Não esperávamos tal fenômeno, uma vez que o trabalho original utilizando essa fosfatase não relatou alteração nenhuma na atividade enzimática na presença da mesma concentração desse composto (Granjeiro, P., 1998). Contudo, a presença combinada de 1mM de DTT e 2,5M de H₂O₂ foi capaz de recuperar os valores de K_m e V_{máx}, sendo observados valores bastante próximos aos do controle. Assim, de alguma maneira, o DTT evitou a inibição da atividade enzimática na presença de H₂O₂, possivelmente por evitar a oxidação do resíduo de cisteína, sendo ele mesmo oxidado por peróxido. Assim, como afirma Baierle (Baierle *et al.*, 2010), podemos pensar que a cisteína do sítio catalítico da FAc de mamona é de grande importância para a catálise, e a adição de DTT reverteu a oxidação desse aminoácido por H₂O₂. A recuperação do estado reduzido da cisteína recuperou a atividade enzimática. Outra possibilidade é que não houve interação direta entre DTT e H₂O₂, mas, como mostrado na figura 4 (introdução), o DTT foi capaz de reverter o estado de oxidação de ácido sulfênico que pode ter sido causado pela presença de H₂O₂.

Para a FAc de rim bovino, a presença de 1mM de DTT teve efeito, em geral, semelhante à presença de 16nM de H₂O₂: um grande aumento no valor de

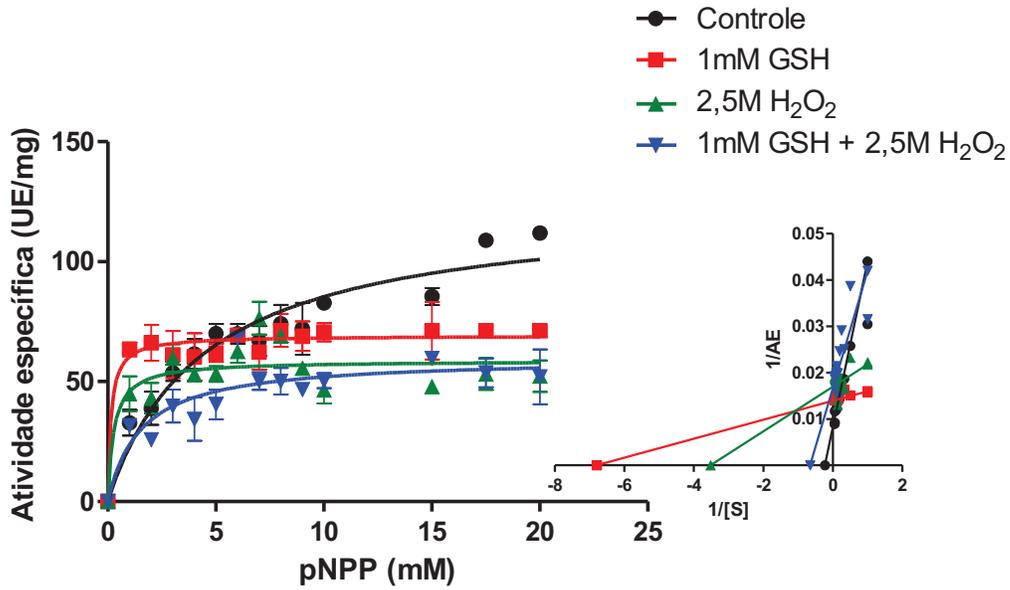
K_m e uma pequena alteração no valor de $V_{m\acute{a}x}$. Esse efeito segue o padr\~ao observado para a FAc de mamona, onde os efeitos de DTT ou H_2O_2 isolados tamb\~em se assemelharam. No trabalho original que utilizou FAc de rim bovino, n\~ao foi observado efeito nenhum de DTT sobre a atividade da enzima (Granjeiro, M., 1994). A combina\~ao de 1mM de DTT a 16nM de H_2O_2 n\~ao foi capaz de recuperar o valor de K_m observado no controle, tampouco de igualar a $V_{m\acute{a}x}$ observada nesse grupo. Acreditamos que isso pode ser um indicativo de que o estado de oxida\~ao da FAc de rim bovino na presen\~ca de 16nM de H_2O_2 n\~ao pode ser revertido. Ou seja, a enzima encontra-se em estado de \c{a}cido sulf\~onico ou sulf\~nico, que, como mostra a figura 4 (introdu\~ao), s\~ao estados de oxida\~ao irrevers\~veis. Isso corroboraria a observa\~ao de que FAc de rim bovino \c{e} mais sens\~vel ao H_2O_2 do que a FAc de mamona, evidenciando que para valores de IC_{50} , a primeira encontra-se em alto estresse oxidativo, exibindo um tipo de inibi\~ao irrevers\~vel, enquanto que a \c{u}ltima tem um estresse oxidativo menor e revers\~vel (Finkel & Holbrook, 2000). Ainda podemos hipotetizar que a n\~ao recupera\~ao da atividade enzim\c{a}tica da FAc de rim bovino na presen\~ca de H_2O_2 e DTT pode ser indicativo de que o res\~duo de ciste\~ina n\~ao \c{e} o \c{u}nico respons\c{a}vel pela cat\c{a}lise no s\~itio ativo, e mesmo ap\~os a recupera\~ao de seu estado reduzido, n\~ao pudemos recuperar a atividade enzim\c{a}tica totalmente.

Pinheiro (Pinheiro, 2002) relata um efeito protetor de DTT na atividade de PTP de c\c{e}lulas V79 em concentra\~oes superiores a 10mM de DTT. A autora chega a utilizar concentra\~oes de 400mM do composto, obtendo um aumento de 80% na atividade enzim\c{a}tica. A autora afirma que o antioxidante ativou a fosfatase por garantir a estabilidade do grupamento sulfidrila. Em nossos estudos, observamos que concentra\~oes de DTT superiores a 1mM inibiram a atividade enzim\c{a}tica de maneira mais intensa que a mostrada na figura 12, chegando a 80% de inibi\~ao. No mesmo trabalho, ainda \c{e} mostrado que 100mM de DTT, combinado a 10mM de H_2O_2 , \c{e} capaz de reverter completamente a inibi\~ao causada pelo per\~oxido isolado (Pinheiro, 2002).

Outro composto utilizado durante o trabalho foi glutatona reduzida (GSH). Esse composto foi empregado na mesma concentra\~ao do DTT, 1mM. Foram

realizados testes na presença de GSH e H_2O_2 isolados e combinados. A figura 13 mostra as curvas obtidas nos testes, sendo a figura 13A referente à FAc de mamona e a 13B referente à FAc de rim bovino. A tabela VII mostra os parâmetros cinéticos encontrados

A



B

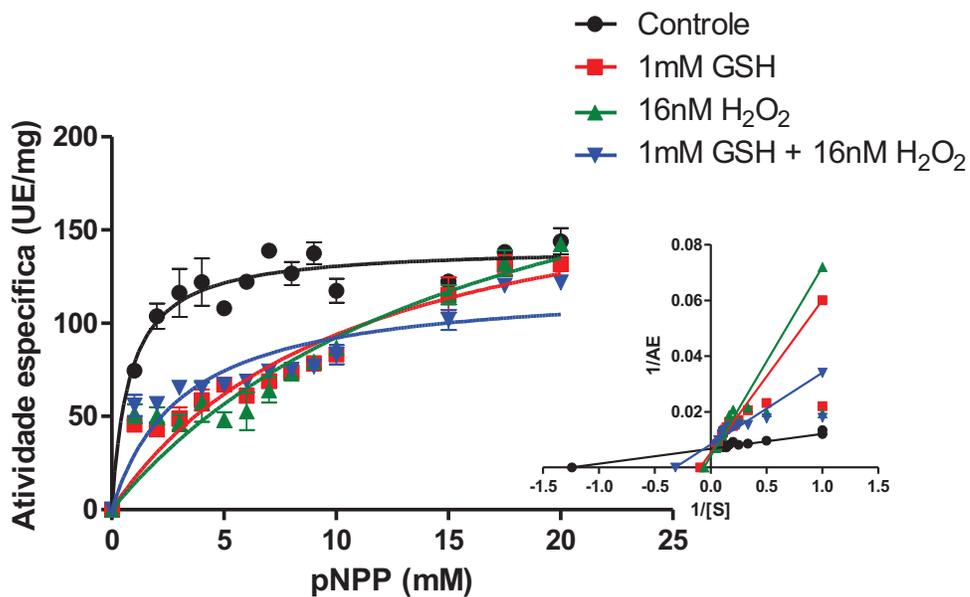


Figura 13. Atividade enzimática em presença de GSH e H₂O₂. A. FAc de mamona. B. FAc de rim bovino. Os ensaios foram realizados utilizando 0,185µg de FAc de mamona e 0,12µg de FAc de rim bovino, 0,1M de tampão acetato e diferentes concentrações do substrato pNPP. As concentrações de H₂O₂ utilizadas para cada enzima correspondem ao IC₅₀ para cada uma. Cada ponto refere-se à média de uma triplicata.

Tabela VII. Comparação dos parâmetros cinéticos das FAcS de mamona e de rim bovino expostas à GSH e à H₂O₂. Os ensaios foram realizados conforme descrito na metodologia.

FAc	GSH (mM)	H ₂ O ₂	V _{máx} (UE/mg)	K _m para pNPP
Mamona	0	0	123,4	4,45
	1	0	69,1	0,14
	0	2,5M	58,7	0,28
	1	2,5M	59,9	1,53
Rim bovino	0	0	141,0	0,80
	1	0	194,4	10,70
	0	16nM	250,5	17,12
	1	16nM	121,3	3,16

A observação da figura 13A e da tabela VII mostra que a resposta da FAc de mamona à presença de GSH foi semelhante à observada para DTT: alteração de V_{máx} e K_m, assim como na presença de H₂O₂ isoladamente. O trabalho realizado logo após a purificação da enzima não relata inibição da atividade enzimática pela mesma concentração de GSH utilizada no presente trabalho (Granjeiro, P., 1998). A combinação de GSH e H₂O₂ foi capaz de recuperar o valor de K_m, aproximando-o do controle. Porém, a V_{máx} da reação continuou diminuída, mostrando que talvez o modo de atuação do GSH sobre a FAc de mamona seja diferente do observado para o DTT. De fato, ao analisarmos a figura 2 (introdução), podemos notar que GSH e DTT atuam de maneira diferente sobre o ácido sulfênico, promovendo sua redução. Assim, não é inesperado que as respostas sejam diferentes para DTT e GSH em presença de H₂O₂.

Para a FAc de rim bovino (figura 13B e tabela VII), nota-se que GSH, assim como DTT e H₂O₂ isoladamente, promoveu uma grande alteração na K_m da enzima, aumentando bastante seu valor. Granjeiro (Granjeiro, M., 1994) não descreveu inibição da atividade enzimática dessa fosfatase na presença de 1mM de GSH em seu trabalho. Assim como o observado para DTT, a combinação de GSH e H₂O₂ não foi capaz de recuperar os valores de K_m e V_{máx} observados no controle. Aliado aos resultados observados para o DTT, esse fato evidencia que

talvez a FAc de rim bovino tenha alcançado um estado irreversível de inativação na presença de H_2O_2 , encontrando-se como ácido sulfônico ou sulfínico.

Outros autores afirmam que GSH protege a fosfatase da inibição causada por H_2O_2 , em concentrações iguais ou superiores às utilizadas nesse trabalho. Pinheiro (Pinheiro, 2002) afirma que GSH ativa a atividade de uma PTP em concentrações superiores a 5mM, e consegue neutralizar o efeito inibitório de H_2O_2 em concentrações superiores a 20mM. A autora observa aumento da atividade em concentrações de até 40mM do composto. No entanto, quando utilizamos concentrações da ordem de 10mM de GSH, a atividade enzimática para ambas as fosfatases foi completamente inibida (figura não mostrada).

Sousa (Sousa, 2005) observou inibição da atividade enzimática de uma PTP parcialmente purificada na presença de 1mM de GSH, assim como o observado no presente trabalho. Concentrações maiores de GSH causaram maior inibição da atividade enzimática, chegando a quase 40% de inibição na presença de 15mM de GSH. A autora conseguiu reverter a inibição adicionando desferoxamina ao meio de reação. Isso foi possível porque GSH, na presença de Fe^{3+} e γ -glutamil transferase, tem efeito pró-oxidante (Paolicch *et al.*, 2002). A adição de um quelante específico de ferro, desferoxamina, ao meio de reação é capaz de bloquear esse fenômeno. Como a enzima utilizada naquele trabalho foi purificada de leucócitos, possivelmente resíduos de ferro continuaram presentes na enzima parcialmente purificada, causando inibição da atividade enzimática.

As fosfatases utilizadas no presente trabalho estavam purificadas, e assim não era esperado que houvesse íons de ferro com a enzima, que poderiam provocar tal efeito pró-oxidante da GSH. Contudo, optamos por testar o efeito de diferentes concentrações de desferoxamina na atividade das FAcS previamente incubadas com GSH, com 5 minutos de exposição a esse composto. Primeiramente, testamos o efeito isolado de desferoxamina na atividade das FAcS. A figura 14 mostra o efeito da adição de diferentes concentrações de desferoxamina na reação enzimática da FAc de mamona (14A) e da FAc de rim bovino (14B).

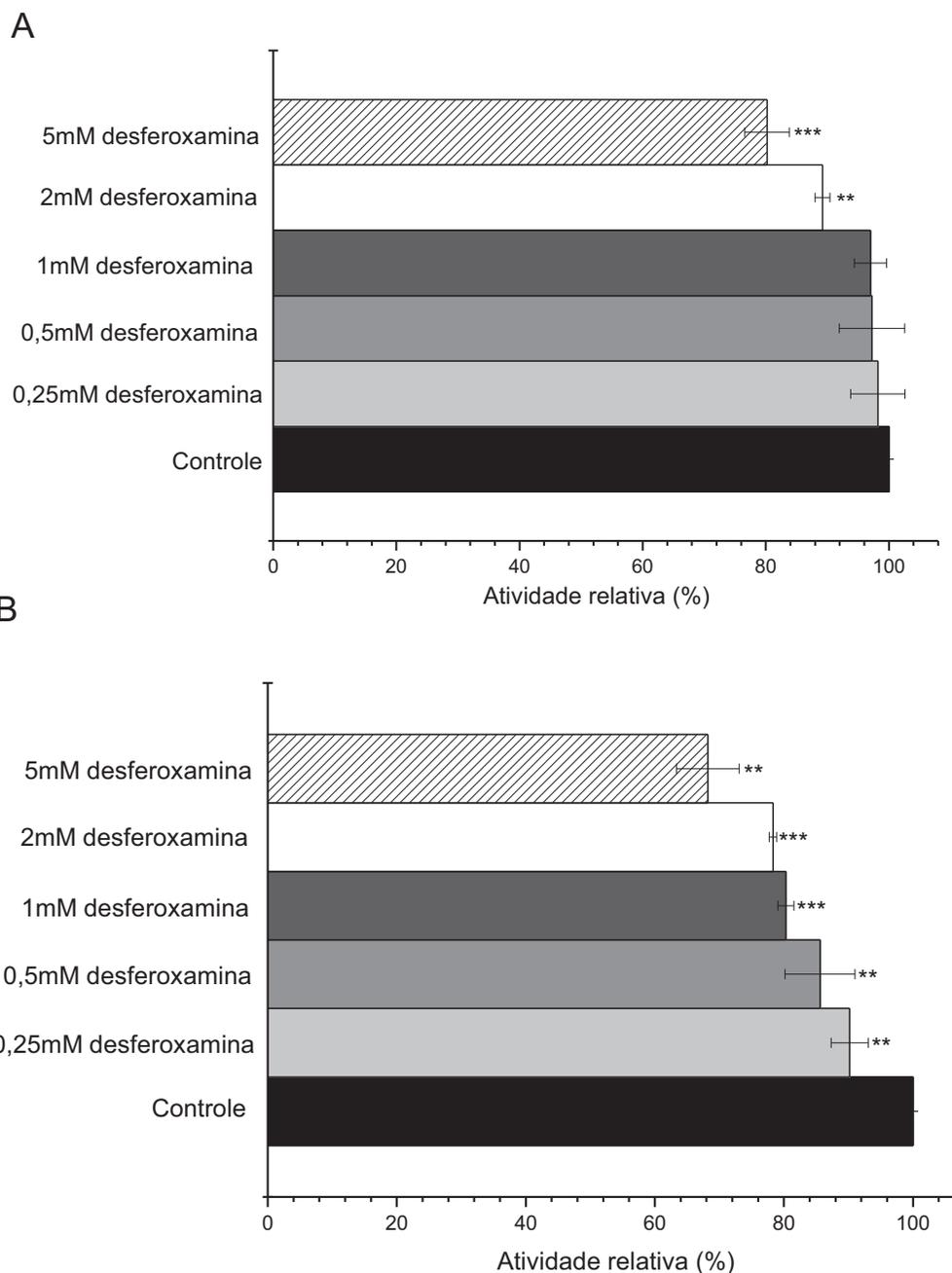


Figura 14. Efeito de desferoxamina na atividade enzimática das FAc. **A.** FAc de mamona. **100%:** 14,9 μ mol pNPP/min. **B.** FAc de rim bovino. **100%:** 14,9 μ mol pNPP/min. Os ensaios foram realizados utilizando 0,185 μ g de FAc de mamona e 0,12 μ g de FAc de rim bovino, 0,1M de tampão acetato e 5mM de pNPP e diferentes concentrações de desferoxamina (desf.). Cada ponto refere-se à média de uma triplicata. **Controle.** Reação sem desferoxamina. Resultados significativos em relação ao controle: $p < 0,05$. **: significativo. ***: muito significativo.

Como é possível observar na figura 14A, a adição de desferoxamina à reação da FAc de mamona não influenciou de maneira significativa a atividade enzimática, exceto quando adicionada em concentração igual ou superior a 2mM. A maior inibição da atividade da FAc foi observada na concentração de 5mM de desferoxamina, o que causou cerca de 20% de inibição.

A baixa sensibilidade da FAc de mamona a concentrações de desferoxamina inferiores a 1mM garante que, ao adicionar tais concentrações em reações utilizando a enzima exposta a GSH, caso seja observada inibição da atividade enzimática, tal inibição não se deve somente ao efeito de desferoxamina. Assim, podemos saber que concentrações inferiores de 1mM de desferoxamina não influenciam, isoladamente, a atividade enzimática, como já havia sido relatado por Sousa (Sousa, 2005).

Para a FAc de rim bovino, a adição de desferoxamina foi capaz de inibir até quase 40% da atividade enzimática quando adicionada na concentração de 5mM. Com isso, podemos saber que, ao adicionar desferoxamina à reação utilizando FAc de rim bovino exposta a GSH, devemos levar em conta a inibição causada isoladamente pela desferoxamina. Sousa (Sousa, 2005) havia relatado inibição da FAc de leucócitos por desferoxamina em concentrações superiores à 2mM, mas aparentemente a FAc de rim bovino é mais sensível a este composto.

Sabendo a sensibilidade de cada FAc à desferoxamina isolada, utilizamos desferoxamina em ensaios com as FAc expostas previamente à GSH, visando verificar se desferoxamina diminui a inibição da atividade enzimática por GSH.

Os resultados encontram-se nas figuras 15A, para a FAc de mamona e 15B, para a FAc de rim bovino.

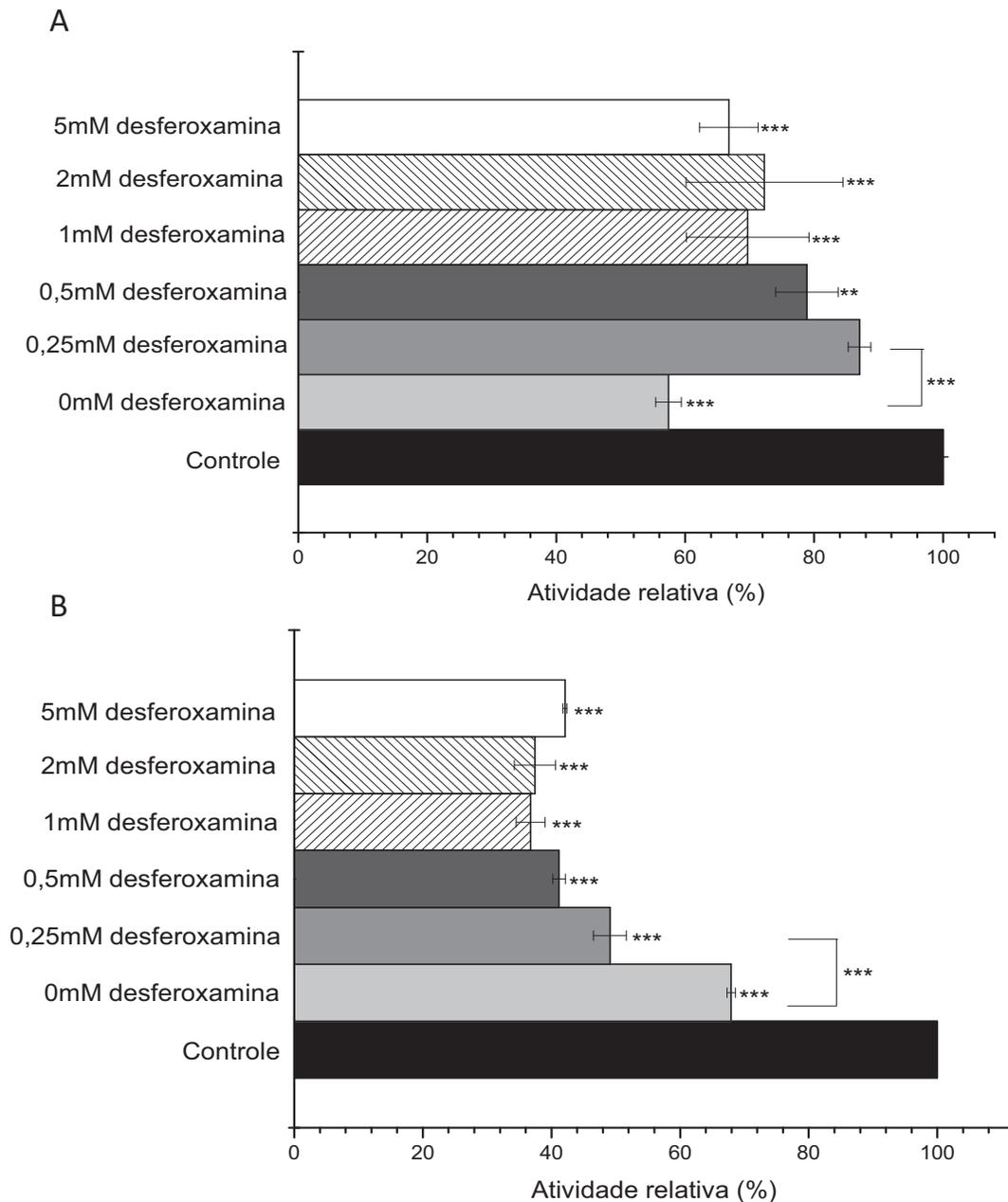


Figura 15. Efeito de desferoxamina na atividade enzimática de FAc expostas à GSH. **A.** FAc de mamona. **100%:** 14,9 μ mol pNPP/min. **B.** FAc de rim bovino. **100%:** 14,9 μ mol pNPP/min. Os ensaios foram realizados utilizando 0,185 μ g de FAc de mamona e 0,12 μ g de FAc de rim bovino, 0,1M de tampão acetato e 5mM de pNPP e diferentes concentrações de desferoxamina. As enzimas foram pré-incubadas com 1mM de GSH durante 5 minutos em banho de gelo, e então adicionadas ao meio de reação. Cada ponto refere-se à média de uma triplicata. **Controle.** FAc não exposta ao GSH, pré-incubada durante 5 minutos. Resultados significativos em relação ao controle: $p < 0,05$. *: pouco significativo. ***: muito significativo.

A figura 15 mostra que, em geral, a presença de desferoxamina não foi capaz de reverter a inibição da atividade enzimática por GSH. Por se tratar de enzimas purificadas, não era esperado que houvesse íons de ferro livres nas amostras, portanto não foi um resultado inesperado.

Para a FAc de mamona, nota-se, ao observar a figura 15A, que 0,25mM de desferoxamina protegeram parcialmente a atividade enzimática contra a exposição a GSH, elevando a atividade enzimática em relação ao ensaio onde a FAc foi pré-incubada com GSH e não houve adição de desferoxamina. Porém, tal proteção não se igualou ao controle, onde não houve exposição da enzima a GSH. Com isso, pode-se dizer que desferoxamina reverteu parcialmente a inibição causada pela pré-incubação da enzima com GSH, mas não foi suficiente para uma reversão completa da inibição, como observou Sousa em seu trabalho (Sousa, 2005), no qual 1mM de desferoxamina combinados a 1mM de GSH aumentaram em 80% a atividade enzimática. Para concentrações maiores de desferoxamina, como já era esperado (uma vez que a própria desferoxamina inibe a atividade enzimática, como visto na figura 14), houve maior inibição da atividade enzimática.

Quanto à FAc de rim bovino, nenhuma concentração de desferoxamina foi capaz de reverter a inibição causada pela pré-incubação com GSH, tampouco proteger parcialmente a enzima. Para todas as concentrações utilizadas de desferoxamina, a atividade enzimática foi inferior do que a observada no controle e no ensaio utilizando FAc exposta a GSH e sem desferoxamina. Dado que a própria desferoxamina se mostrou capaz de inibir significativamente a atividade enzimática em qualquer concentração (figura 14), este não foi um resultado inesperado.

4.5 Efeito protetor de DTT e GSH contra a inibição por H₂O₂

Até o momento, testamos os efeitos de DTT e GSH sendo adicionados no momento da reação. Para avaliar se esses compostos conseguem de algum modo prevenir a oxidação do radical sulfidrila do resíduo de cisteína do sítio catalítico das FAcS, elaboramos ensaios nos quais as enzimas foram previamente

incubadas com DTT ou GSH, sendo utilizadas posteriormente em reações com H_2O_2 .

Primeiramente, avaliamos o efeito do tempo de pré-incubação das FAcS com DTT ou GSH, para estabelecer o tempo de pré-incubação para os ensaios posteriores. A figura 16 mostra a relação do tempo de pré-incubação com a atividade enzimática da FAc de mamona (figura 16A) e da FAc de rim bovino (figura 16B).

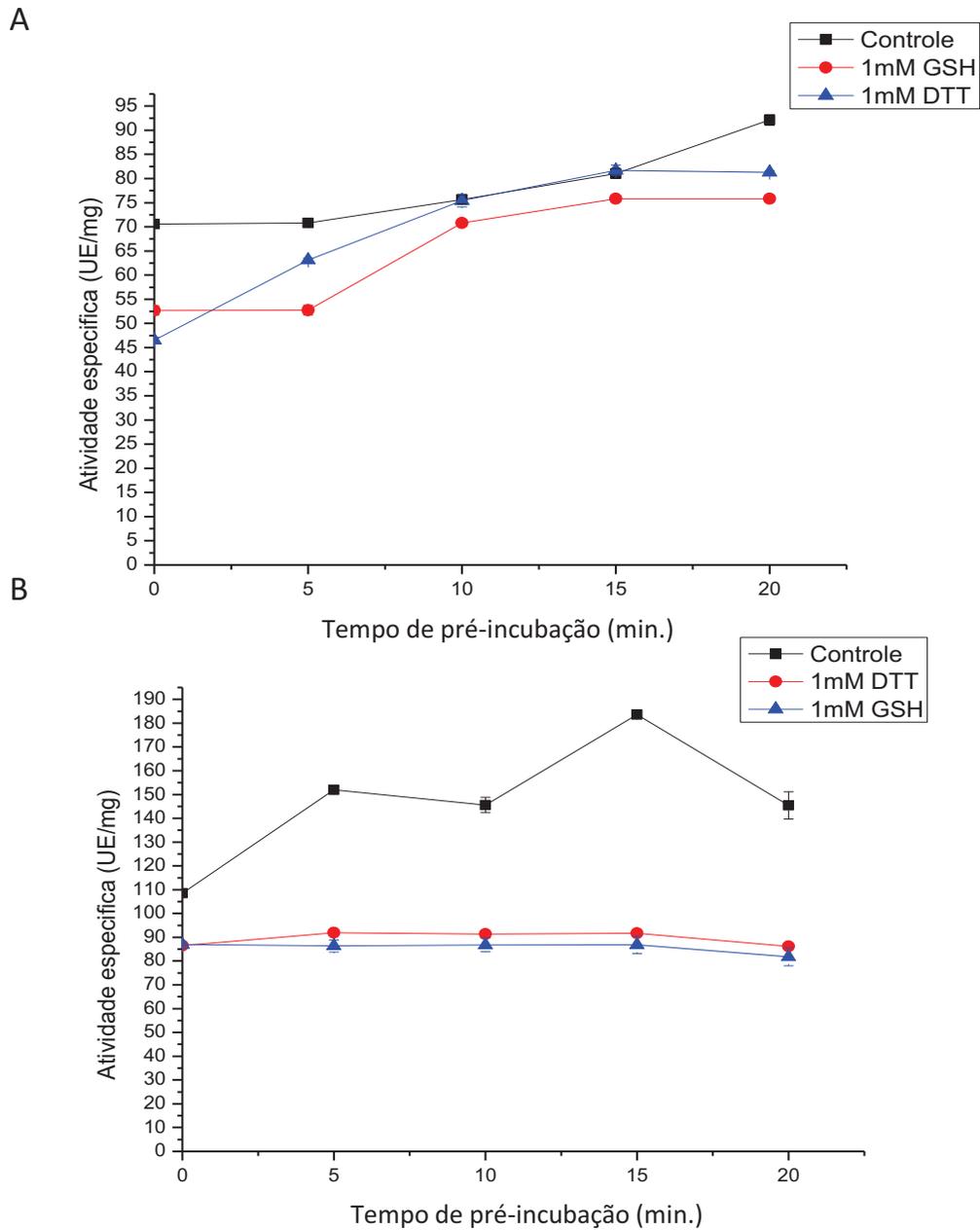


Figura 16. Efeito do tempo de exposição a DTT ou GSH nas atividades das FAc. **A.** FAc de mamona. **B.** FAc de rim bovino. Os ensaios foram realizados utilizando 0,185 μ g de FAc de mamona e 0,12 μ g de FAc de rim bovino, 0,1M de tampão acetato e 5mM de pNPP e 1mM de DTT ou GSH. As enzimas foram pré-incubadas em banho de gelo e no escuro, e então adicionadas ao meio de reação. Cada ponto refere-se à média de uma triplicata. **Controle.** FAc não exposta a DTT ou GSH, pré-incubada nas mesmas condições e durante os mesmos períodos de tempo. **Tempo 0 para DTT e GSH:** FAc retirada logo após a adição de DTT e GSH ao meio de pré-incubação.

A observação da figura 16A revela que, para a FAc de mamona, a atividade enzimática não sofreu alterações devido à permanência da enzima em banho de gelo, na ausência de DTT ou GSH, sofrendo um leve aumento nos tempos finais de pré-incubação. Já na presença de DTT, a atividade enzimática é ligeiramente inibida no tempo zero, mas tem um aumento ao longo do tempo de exposição. Isso não havia sido observado nos ensaios anteriores, onde não houve tempo de exposição da FAc a DTT antes da reação. Nos tempos maiores de exposição, a atividade enzimática se igualou à observada no controle. A exposição a GSH também inibiu a atividade enzimática, principalmente com tempos menores de exposição. Maiores tempos de exposição resultaram em atividade enzimática mais elevada, mas inferior à observada no controle nas mesmas condições. Optamos por pré-incubar a enzima durante 10 minutos com cada um dos compostos para os ensaios seguintes, já que houve um pequeno aumento da atividade após esse tempo de pré-incubação.

Para a FAc de rim bovino, a pré-incubação em banho de gelo praticamente não afetou a atividade enzimática da enzima não exposta a DTT ou a GSH, mantendo-se bastante constante no tempo zero e 20 minutos. A exposição ao DTT inibiu a atividade enzimática, que não chegou em momento algum a se equiparar à observada no controle. A exposição ao GSH obedeceu ao mesmo padrão, inibindo a atividade enzimática, que permaneceu relativamente constante independentemente do tempo de exposição da FAc ao GSH. Optamos por expor a enzima durante 5 minutos aos compostos, uma vez que nesse tempo de exposição obtivemos uma atividade enzimática superior à observada nos demais tempos da figura 16B.

Após determinar o tempo de exposição das FAcS ao DTT ou ao GSH, realizamos ensaios onde expusemos as enzimas a esses compostos durante o tempo determinado e então utilizamos essas enzimas em reações com H_2O_2 . Isso permite avaliar se houve algum tipo de proteção contra a inibição da atividade enzimática por H_2O_2 .

A figura 17 mostra os resultados obtidos com as FAcS expostas a DTT, para a FAc de mamona (figura 17A) e para a FAc de rim bovino (figura 17B).

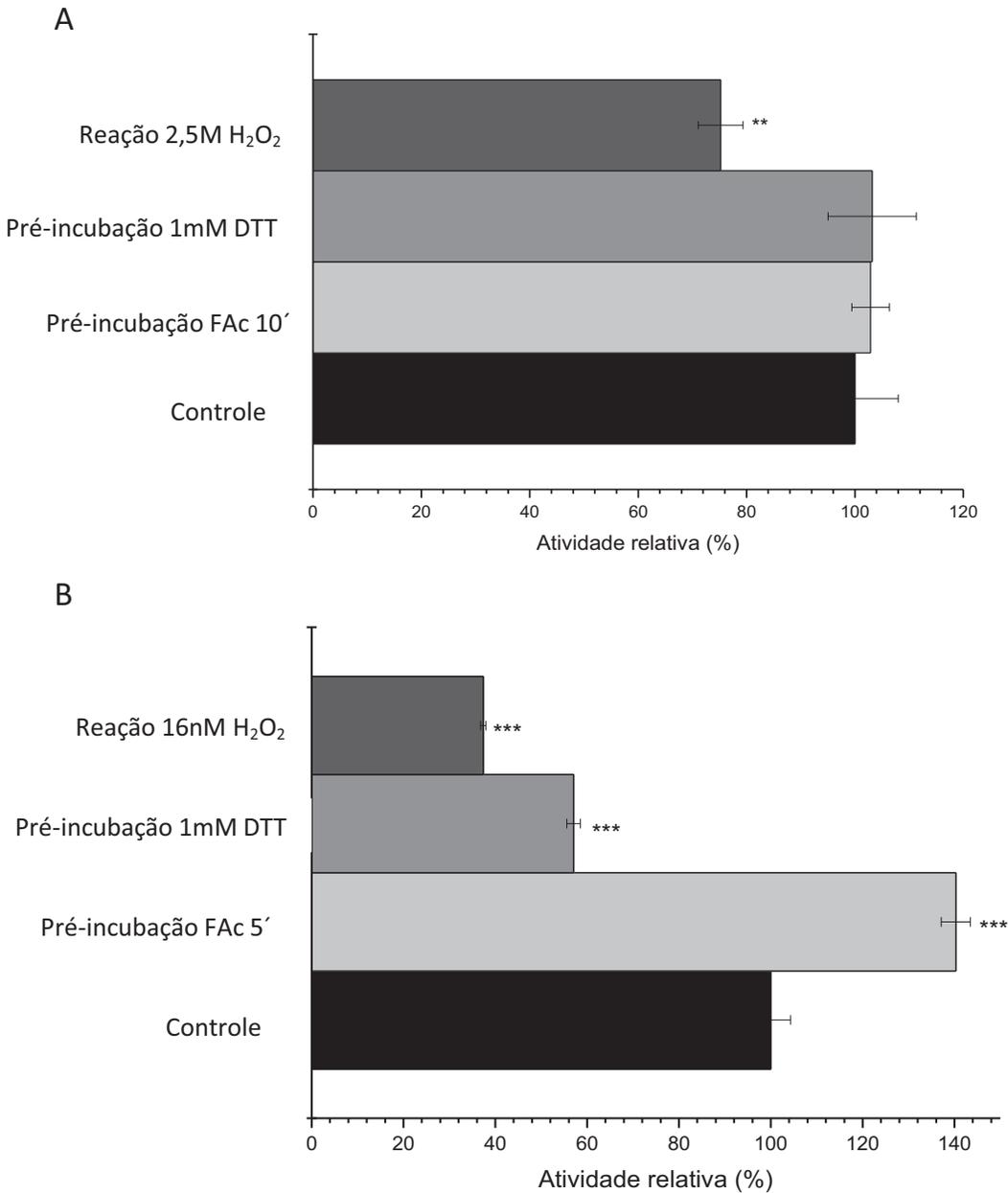


Figura 17. Pré-incubação das FAc com DTT. A. FAc de mamona. **100%:** 14,9 μ mol pNPP/min. **B.** FAc de rim bovino. **100%:** 14,9 μ mol pNPP/min. As FAc foram pré-incubadas (10' FAc mamona e 5' FAc rim bovino) com 1mM de DTT em banho de gelo e no escuro, e então adicionadas ao meio de reação. Os ensaios foram realizados utilizando 0,185 μ g de FAc de mamona e 0,12 μ g de FAc de rim bovino, 0,1M de tampão acetato, 5mM de pNPP e diferentes compostos, adicionados ao meio de reação. Cada ponto refere-se à média de uma triplicata. **Controle.** FAc não pré-incubada. Os compostos que se encontram no eixo das ordenadas foram adicionados logo antes do início da reação ao meio reacional. Resultados significativos em relação ao controle: $p < 0,05$. ** significativo ***: muito significativo.

A observação da figura 17A revela que, para a FAc de mamona, a pré-incubação com DTT não alterou de maneira significativa a atividade enzimática, em comparação com o controle e com a FAc pré-incubada na ausência de DTT. Tal observação é consistente com a figura 13, onde pode-se perceber que após 10 minutos de incubação, o efeito inibitório do DTT é bloqueado e a atividade enzimática se iguala à do controle incubado na ausência de DTT. Também é interessante notar que 2,5M de H_2O_2 causaram menor inibição na enzima previamente tratada com 1mM de DTT do que na enzima que não passou por esse tratamento, onde essa concentração de peróxido foi detectada como o valor de IC_{50} .

Também vale ressaltar que, ao contrário do que foi observado na adição de DTT somente no momento da reação (figura 12), a pré-incubação da FAc de mamona com 1mM de DTT não conseguiu reverter totalmente a inibição causada pela adição de 2,5M de H_2O_2 no momento da reação: H_2O_2 não causou 50% de inibição, mas a atividade enzimática não se assemelhou à do controle ou da FAc pré-incubada 10 minutos, atingindo menos de 80% da atividade do controle e da FAc pré-incubada 10 minutos. Isso talvez reflita a reversibilidade de alguns estados de oxidação do sítio catalítico da FAc, retratada na figura 4. Talvez o tratamento prévio da enzima com DTT facilite a transição do estado de ácido sulfênico ao estado ativo da enzima. Baierle e colaboradores (Baierle *et al.*, 2010) mostraram que algumas enzimas contendo grupamento sulfidril no sítio catalítico e inibidas por compostos que interagem com esse local podem não ter a atividade totalmente recuperada após tratamento com DTT. Isso corrobora o que observamos para a FAc de mamona, e pode sugerir que o grupamento $-SH$ não é o único responsável pela catálise que ocorre no sítio catalítico, como afirma o autor.

Para a FAc de rim bovino, a figura 17B mostra que a pré-incubação durante 5 minutos elevou a atividade enzimática, quando comparamos a atividade da FAc sem sofrer pré-incubação. No entanto, a exposição a DTT diminui bastante a atividade enzimática: é alcançado somente 60% da atividade observada no controle, e cerca de 40% do que foi observado para a enzima pré-incubada.

Semelhante ao que foi mostrado na figura 12, a adição de DTT à enzima exposta a H_2O_2 não foi capaz de recuperar a atividade enzimática, inibindo ainda mais a mesma. Assim, foi observado uma atividade residual de menos de 40% em relação ao controle, caracterizando uma inibição superior ao esperado, uma vez que 16nM de H_2O_2 correspondem ao IC_{50} para essa enzima. Isso pode ser uma evidência de que há dois fatores inibindo a atividade enzimática, e que se somaram nesse caso: a presença de DTT e a presença de H_2O_2 .

Como já mencionado anteriormente, talvez a FAc de rim bovino atinja estados de oxidação irreversíveis (figura 4) quando na presença de H_2O_2 , ainda que na concentração de IC_{50} . Somando-se a isso o fato de que o DTT isoladamente é capaz de alterar os parâmetros cinéticos da reação e inibir a atividade enzimática, é possível compreender a inibição observada na figura 15. Pinheiro (Pinheiro, 2002) relatou que há proteção contra a inibição causada por H_2O_2 quando se utiliza concentrações bastante superiores de DTT, na casa de 20mM. No entanto, para nossas enzimas, percebemos que essas concentrações, por si só, já são capazes de inibir significativamente a atividade enzimática.

Após expor as enzimas a DTT, realizamos um ensaio de exposição das FAc à GSH, realizando reações na presença da concentração de IC_{50} de H_2O_2 , 0,25mM de desferoxamina, 1mM de DTT e combinações desses compostos. O DTT foi adicionado visando verificar se a inibição da atividade enzimática por GSH era reversível por adição de DTT (figura 4). A figura 18 mostra os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos utilizando FAc de mamona (figura 18A) e FAc de rim bovino (figura 18B) expostas a GSH.

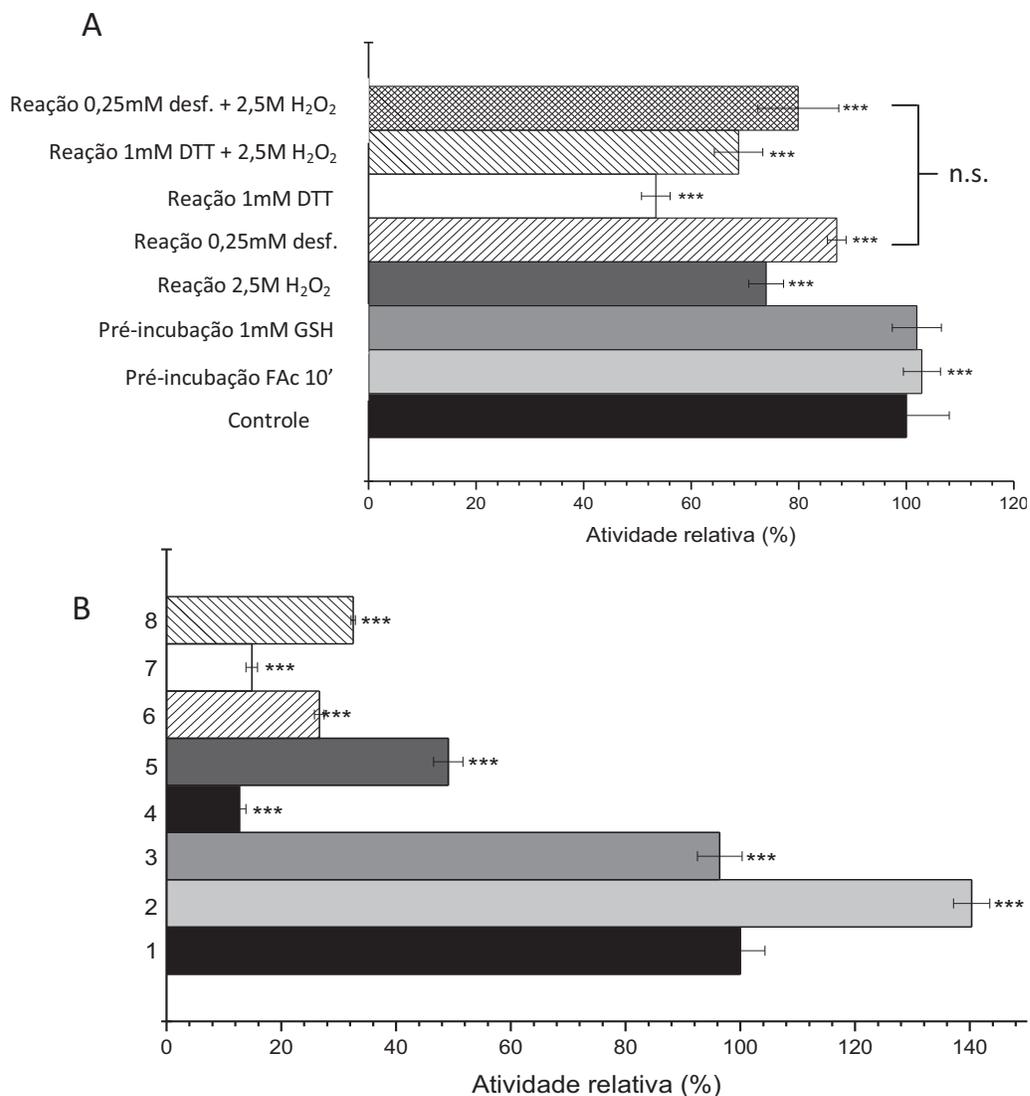


Figura 18. Pré-incubação das FAc com GSH. A. FAc de mamona. **100%:** 14,9 μ mol pNPP/min. **B.** FAc de rim bovino. **100%:** 14,9 μ mol pNPP/min. **1.** Controle. **2.** Pré-incubação FAc 5'. **3.** Pré-incubação 1mM GSH. **4.** Reação 16nM H₂O₂. **5.** Reação 0,25mM desf. **6.** Reação 1mM DTT. **7.** Reação 1mM DTT + 16nM H₂O₂. **8.** Reação 0,25mM desf. + 16nM H₂O₂. As FAc foram pré-incubadas (10' FAc mamona e 5' FAc rim bovino) com 1mM de GSH em banho de gelo e no escuro, e então adicionadas ao meio de reação. Os ensaios foram realizados utilizando 0,185 μ g de FAc de mamona e 0,12 μ g de FAc de rim bovino, 0,1M de tampão acetato, 5mM de pNPP e diferentes compostos, adicionados ao meio de reação. Cada ponto refere-se à média de uma triplicata. **Controle.** FAc não pré-incubada. Os compostos que se encontram no eixo das ordenadas foram adicionados logo antes do início da reação ao meio reacional. **Desf.** = desferoxamina. Resultados significativos em relação ao controle: p<0,05. *****:** muito significativo, **n.s.:** não significativo.

Para a FAc de mamona, a figura 18A mostra que a exposição de 10 minutos a GSH não interferiu na atividade enzimática, como foi mostrado na figura 13. A reação com 2,5M de H_2O_2 utilizando a enzima exposta à GSH, assim como ocorreu com a enzima exposta a DTT (figura 17), não inibiu 50% da atividade enzimática, sendo responsável redução de apenas 25% da atividade enzimática. Assim, tal concentração de peróxido não atuou como sendo o IC_{50} , mostrando que houve algum tipo de proteção. Novamente, a presença de GSH deve ter auxiliado na conversão do estado de ácido sulfênico ao estado ativo (figura 4), processo esse que deve ter ocorrido mais rapidamente devido à exposição prévia da enzima ao GSH.

Ainda observando a figura 18A, podemos ver que a adição de desferoxamina inibiu um pouco a atividade enzimática em relação ao controle. Não esperávamos tal inibição, e testamos a presença de desferoxamina para tentar reverter uma inibição por GSH caso houvesse alguma. Assim, não sabemos ao certo o porquê desse fenômeno. A reação com 1mM de DTT utilizando FAc de mamona exposta a GSH causou a maior inibição detectada: cerca de 45%. Testamos a presença de DTT no meio de reação para reverter uma possível inibição por GSH na presença de H_2O_2 (figura 4). Porém, a presença de DTT interferiu bastante na atividade enzimática. A combinação de DTT e H_2O_2 acarretou na mesma atividade relativa em presença de H_2O_2 isoladamente, evidenciando que o DTT não influenciou na atividade. A desferoxamina, na presença de H_2O_2 , causou maior inibição da atividade do que quando foi acrescida isoladamente. Isso pode sugerir que de alguma forma esse composto favorece a inibição por peróxido.

Quanto a FAc de rim bovino, a figura 18B mostra que a pré-incubação da enzima sem aditivos favorece a atividade enzimática. Não sabemos ao certo explicar o aumento de 40% na atividade enzimática, mas especulamos que pode se dever a uma estabilização da atividade da enzima, que estava em temperatura superior à de armazenagem. No entanto, a exposição ao GSH bloqueia esse efeito, fazendo com que a atividade enzimática retorne ao patamar do ensaio controle. Assim, aparentemente a exposição ao GSH não interferiu na atividade

enzimática, corroborando o que foi visto na figura 13. No entanto, a pré-incubação elevou tanto a atividade enzimática que se tomamos por referência o ensaio realizado com a enzima pré-incubada, observamos uma diminuição de 40% da atividade enzimática, mostrando que a exposição prolongada ao GSH pode causar alguma efeito na atividade enzimática. A reação com H_2O_2 utilizando a enzima exposta a GSH resultou em uma grande inibição da atividade enzimática, muito maior do que a esperada por se tratar da concentração referente ao IC_{50} : houve uma inibição de mais de 80% da atividade. Assim, acreditamos que de alguma forma o GSH interage com a enzima, deixando-a mais susceptível à oxidação causada pelo H_2O_2 . Ainda na figura 18B, observamos que desferoxamina causou uma inibição de cerca de 50% da atividade, sugerindo que esse composto é capaz de interagir com GSH e de alguma forma dificultar a catálise. O mesmo resultado ocorreu com a reação utilizando DTT, porém com inibição ainda maior: cerca de 70%. Na presença de DTT e H_2O_2 , ao contrário do que ocorre com a FAc de mamona, houve aumento da inibição, mostrando que não houve proteção alguma. O mesmo se observa para reações contendo desferoxamina e H_2O_2 .

Assim, após analisarmos cuidadosamente as figuras 17 e 18, podemos concluir que, para a FAc de mamona, a exposição ao DTT apresentou efeito protetor contra a oxidação do sítio catalítico por H_2O_2 , ou facilitou a recuperação da enzima na forma ativa. No entanto, para a FAc de rim bovino, tal efeito protetor não pôde ser observado, sendo que a inibição da enzima exposta ao DTT na presença de H_2O_2 foi superior à causada na FAc não exposta a DTT.

De maneira semelhante, GSH apresentou efeito protetor para a FAc de mamona, enquanto que para FAc de rim bovino tal proteção não foi observada. A presença de desferoxamina, em nenhum dos casos, elevou a atividade enzimática, confirmando os dados apresentados na figura 15. A fim de garantir que todas as possibilidades de recuperação da forma ativa da enzima, expostas na figura 2, fossem atendidas, realizamos reações na presença de H_2O_2 e DTT, mas não houve reversão significativa da inibição da atividade enzimática, talvez porque nenhuma das enzimas atingiu o estado que pode interagir com DTT.

Após essa análise, suspeitamos que os estados de oxidação alcançados por cada uma das FAc, na presença da concentração referente ao IC₅₀ de H₂O₂ para cada enzima, é bastante diferente. Um fator que sustenta nossa hipótese é a resposta bastante diferenciada a DTT e GSH observada. A presença de carboidrato da estrutura da FAc de origem vegetal pode influenciar essa resposta, e isso será testado mais adiante. Outros trabalhos utilizando DTT não relataram inibição por esse composto, chegando a utilizar concentrações 100 vezes maiores do que as utilizadas no presente trabalho (Granjeiro, M., 1994; Granjeiro, P., 1998; Pinheiro, 2002; Sousa, 2005). Com GSH, Sousa (Sousa, 2005) relatou inibição da atividade enzimática, que foi revertida pela adição de desferoxamina. Já outros trabalhos não mostram nenhuma evidência de inibição (Granjeiro, M., 1994; Granjeiro, P., 1998), inclusive relatando grande ativação da fosfatase na presença de tal composto (Pinheiro, 2002). A inibição por DTT observada pode estar relacionada ao estado de oxidação de cada FAc, isolada ou na presença de outros compostos.

4.6 Capacidade de reversão da inibição por H₂O₂ dos compostos DTT e GSH

Após testarmos a capacidade de proteger o sítio catalítico dos compostos DTT e GSH, resolvemos testar se esses compostos são capazes de reverter a inibição da atividade enzimática causada a uma FAc por H₂O₂.

Para tanto, realizamos a exposição das FAc ao H₂O₂, utilizando depois essas enzimas em reações em presença de DTT ou GSH.

Primeiramente, determinamos experimentalmente o melhor tempo de exposição ao H₂O₂ para cada enzima. A figura 19 mostra os resultados de atividade enzimática obtidos para FAc de mamona (figura 19A) e FAc de rim bovino (figura 19B) expostas durante diferentes tempos à concentração de H₂O₂ semelhante ao IC₅₀.

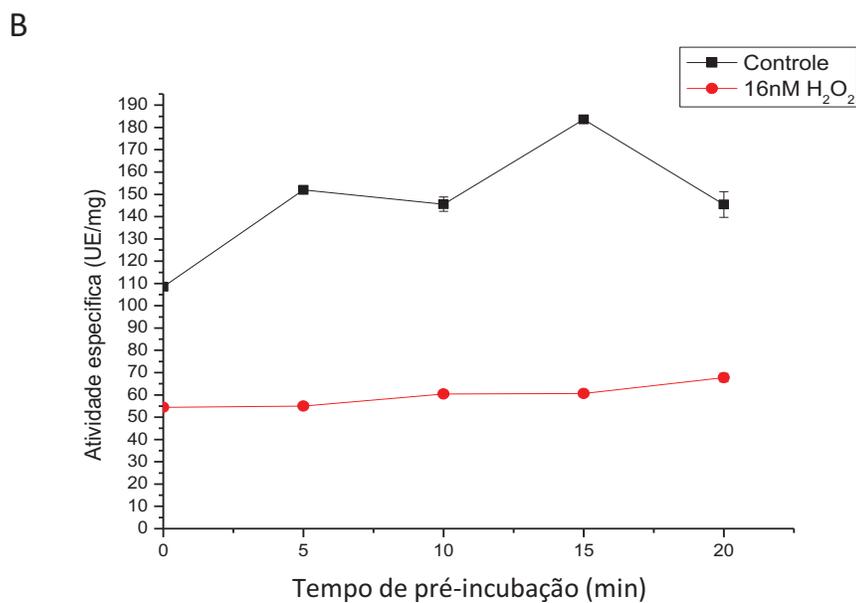
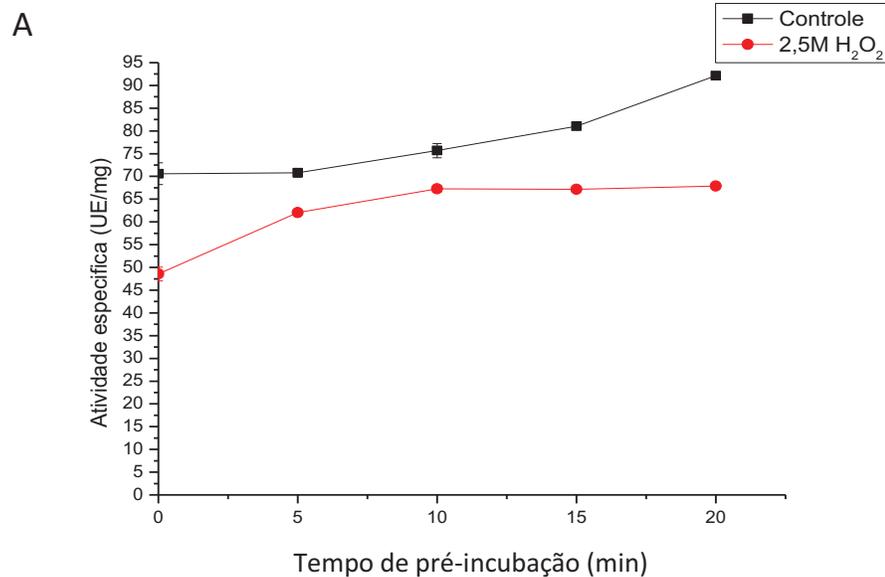


Figura 19. Efeito do tempo de exposição ao H₂O₂ na atividade das FAc. **A.** FAc de mamona. **B.** FAc de rim bovino. Os ensaios foram realizados utilizando 0,185µg de FAc de mamona e 0,12µg de FAc de rim bovino, 0,1M de tampão acetato e 5mM de pNPP e a concentração de H₂O₂ referente ao IC₅₀ de cada enzima. As FAc foram pré-incubadas em banho de gelo e no escuro, e então adicionadas ao meio de reação. Cada ponto refere-se à média de uma triplicata. **Controle.** FAc não exposta a H₂O₂, pré-incubada nas mesmas condições e durante os mesmos períodos de tempo. **Tempo 0 para H₂O₂:** FAc retirada logo após a adição de DTT e GSH ao meio de pré-incubação.

A observação da figura 19A mostra que a FAc de mamona não sofreu muitas alterações em sua atividade, mesmo em presença de H_2O_2 , entre os tempos de exposição de 5 a 15 minutos. Houve um aumento de atividade enzimática com 5 minutos de exposição, em relação ao tempo zero. Isso pode se dever a uma estabilização da enzima, ou ainda de uma reversão do estado de ácido sulfênico da enzima. Não sabemos explicar exatamente os fatores que levaram a esse aumento, que pode inclusive se dever a um erro experimental.

Ainda assim, optamos por expor a enzima durante 10 minutos ao H_2O_2 , pois já foi constatado que a enzima tem sua atividade aumentada quando é pré-incubada antes de ser utilizada na reação (figura 16), e as atividades obtidas com FAc exposta a H_2O_2 segue o mesmo padrão.

Já para a FAc de rim bovino, percebemos na figura 19B que há um grande aumento da atividade enzimática do controle após 5 minutos de pré-incubação. A enzima exposta a H_2O_2 tem sua atividade inibida em cerca de 50%, e ela é mantida relativamente constante, independentemente do tempo de exposição. Assim, acabamos optando por expor a FAc de rim bovino durante 5 minutos ao H_2O_2 , para que a atividade enzimática pudesse ser aumentada. Como o tempo de exposição aparentemente não influencia na atividade enzimática, somente a presença de H_2O_2 , esse pode ser mais um indício de que a FAc de rim bovino sofre oxidação por H_2O_2 até atingir estados irreversíveis de inativação, como ácido sulfônico ou sulfínico (figura 4). Pinheiro (Pinheiro, 2002) relata inibição enzimática quando realizou ensaio expondo a FAc de células V79 ao H_2O_2 . A inibição da atividade chega a 20%, menor do que o observado no presente trabalho.

Estabelecidos os tempos de exposição para cada FAc, seguimos com ensaios em presença de DTT ou GSH utilizando a enzima exposta a H_2O_2 , a fim de avaliar se há reversão da inibição causada pela oxidação do sítio catalítico na presença de compostos como DTT ou GSH.

A figura 20 mostra os resultados obtidos utilizando FAc de mamona (figura 20A) e FAc de rim bovino (figura 20B) expostas a H_2O_2 em ensaios na presença de DTT ou GSH.

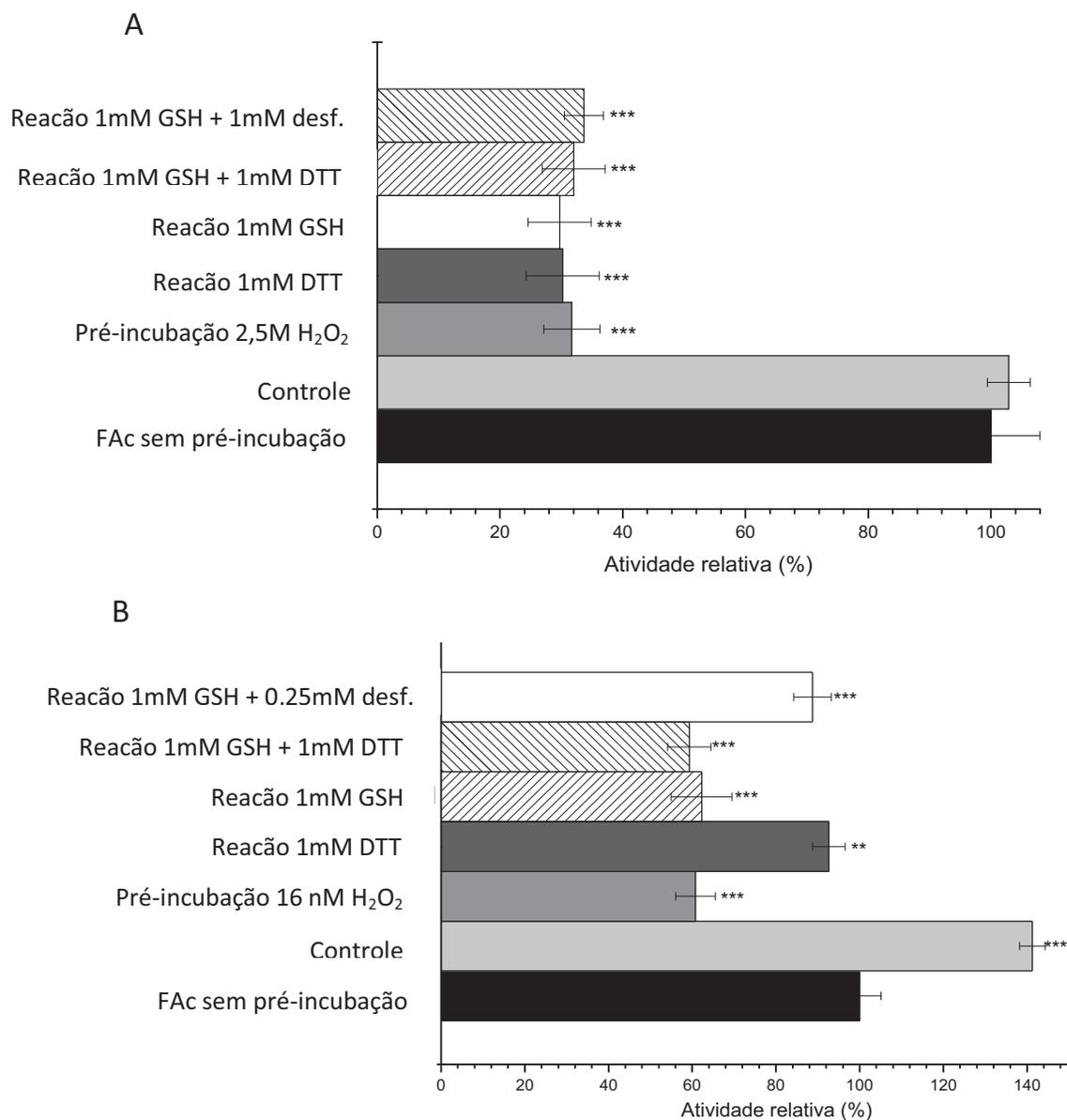


Figura 20. Atividade enzimática das FAc expostas à H₂O₂. **A.** FAc de mamona. **100%:** 14,9µmol pNPP/min. **B.** FAc de rim bovino. **100%:** 14,9µmol pNPP/min. As FAc foram pré-incubadas (10' FAc mamona e 5' FAc rim bovino) com a concentração de H₂O₂ referente ao IC₅₀ em banho de gelo e no escuro, e então adicionadas ao meio de reação. Os ensaios foram realizados utilizando 0,185µg de FAc de mamona e 0,12µg de FAc de rim bovino, 0,1M de tampão acetato, 5mM de pNPP e diferentes compostos, adicionados ao meio de reação. Cada ponto refere-se à média de uma triplicata. **Controle.** FAc pré-incubada na ausência de H₂O₂. Os compostos que se encontram no eixo das ordenadas foram adicionados logo antes do início da reação ao meio reacional. **Desf.:** desferoxamina. Resultados significativos em relação ao controle: p<0,05. ** significativo.***: muito significativo.

A observação da figura 20A mostra que, para a FAc de mamona, a exposição prolongada ao H_2O_2 acarreta uma inibição da atividade enzimática maior do que os 50% esperados por se tratar da concentração de IC_{50} . Assim, podemos especular que a enzima pré-incubada com H_2O_2 tem maior dificuldade em reverter a inibição, voltando ao estado ativo. Ou ainda, as moléculas que sofrem reativação são novamente oxidadas pelo H_2O_2 presente no microambiente. É interessante notar que a adição de DTT, GSH ou ambos ao meio de reação não é capaz de recuperar a atividade enzimática, não apresentando diferença significativa da atividade enzimática na ausência desses compostos e com a enzima exposta a H_2O_2 . Com isso, pode-se pensar que a exposição ao peróxido desencadeia uma oxidação irreversível, levando a FAc ao estado de ácido sulfônico ou sulfínico (figura 4). Tampouco, a presença de desferoxamina combinada a GSH na reação foi capaz de elevar a atividade enzimática. Assim, suspeitamos que a exposição da enzima ao H_2O_2 leva a estados de oxidação irreversíveis, inibindo com maior intensidade a atividade enzimática.

Para a FAc de rim bovino, a figura 20B revela que a exposição prolongada ao H_2O_2 não teve grandes efeitos sobre a atividade enzimática, que foi inclusive inibida em níveis inferiores a 50%, como era esperado. A presença de DTT na reação utilizando a FAc exposta ao H_2O_2 conseguiu recuperar totalmente a atividade enzimática, tomando-se o controle sem pré-incubação como referência. Contudo, essa atividade ainda foi menor do que a observada para a enzima pré-incubada na ausência de H_2O_2 . Já a adição de GSH não foi capaz de recuperar a atividade enzimática, o que sugere que os mecanismos de atuação e interação do DTT e do GSH diferem bastante para a FAc de rim bovino. A combinação de DTT e GSH no meio de reação também não surtiu efeitos na retomada da atividade enzimática, sendo que a atividade observada foi muito semelhante à apresentada pela enzima exposta ao peróxido na ausência desses compostos.

Ao contrário do que mostraram os ensaios com desferoxamina (figura 15), a adição de desferoxamina e GSH ao meio de reação apresentaram resultados bastante satisfatórios, praticamente recuperando a atividade enzimática, com o controle sem pré-incubação como referência. Talvez íons de ferro presentes na

amostra contendo a FAc sejam responsáveis por essa recuperação, ou ainda pode se tratar de outro mecanismo que garante que, para uma enzima previamente oxidada por H_2O_2 , a incubação com GSH e desferoxamina consegue reverter tal oxidação.

Assim, pudemos ver que para a FAc de mamona, DTT e GSH não conseguem reverter a oxidação da enzima exposta por tempos mais prolongados ao H_2O_2 (figura 20). Apesar disso, para a enzima combinada a H_2O_2 no momento da reação, tanto DTT quanto GSH conseguiram recuperar os parâmetros cinéticos dessa FAc (figuras 11 e 12). Já para a FAc de rim bovino, DTT se mostrou capaz de reverter a oxidação, recuperando praticamente 100% da atividade enzimática. GSH isoladamente não foi capaz de causar esse efeito, mas combinado a desferoxamina, teve os mesmos resultados. Pinheiro (Pinheiro, 2002) relata que a exposição da FAc de células V79 ao H_2O_2 , seguida de reação com DTT, é capaz de recuperar a atividade enzimática, o que é consistente com os dados apresentados para a FAc de origem animal utilizada no presente trabalho.

4.7 Efeito do H_2O_2 sobre a FAc de mamona sem carboidrato

Uma das grandes suspeitas para entender a grande resistência da FAc de mamona ao H_2O_2 , ainda mais quando comparada à FAc de rim bovino, é a presença de carboidrato em sua estrutura. Acreditamos que de alguma maneira a cadeia de açúcar dificulte o acesso do H_2O_2 ao sítio catalítico, ou a oxidação desse por H_2O_2 .

Assim, utilizamos uma endoglicosidase para remover a cadeia de carboidrato da FAc de mamona, e primeiramente determinamos a K_m e a $V_{máx}$ da enzima nessas condições, para avaliar se existiam diferenças cinéticas em relação à enzima nativa.

A figura 21 mostra a atividade enzimática em função da concentração de substrato.

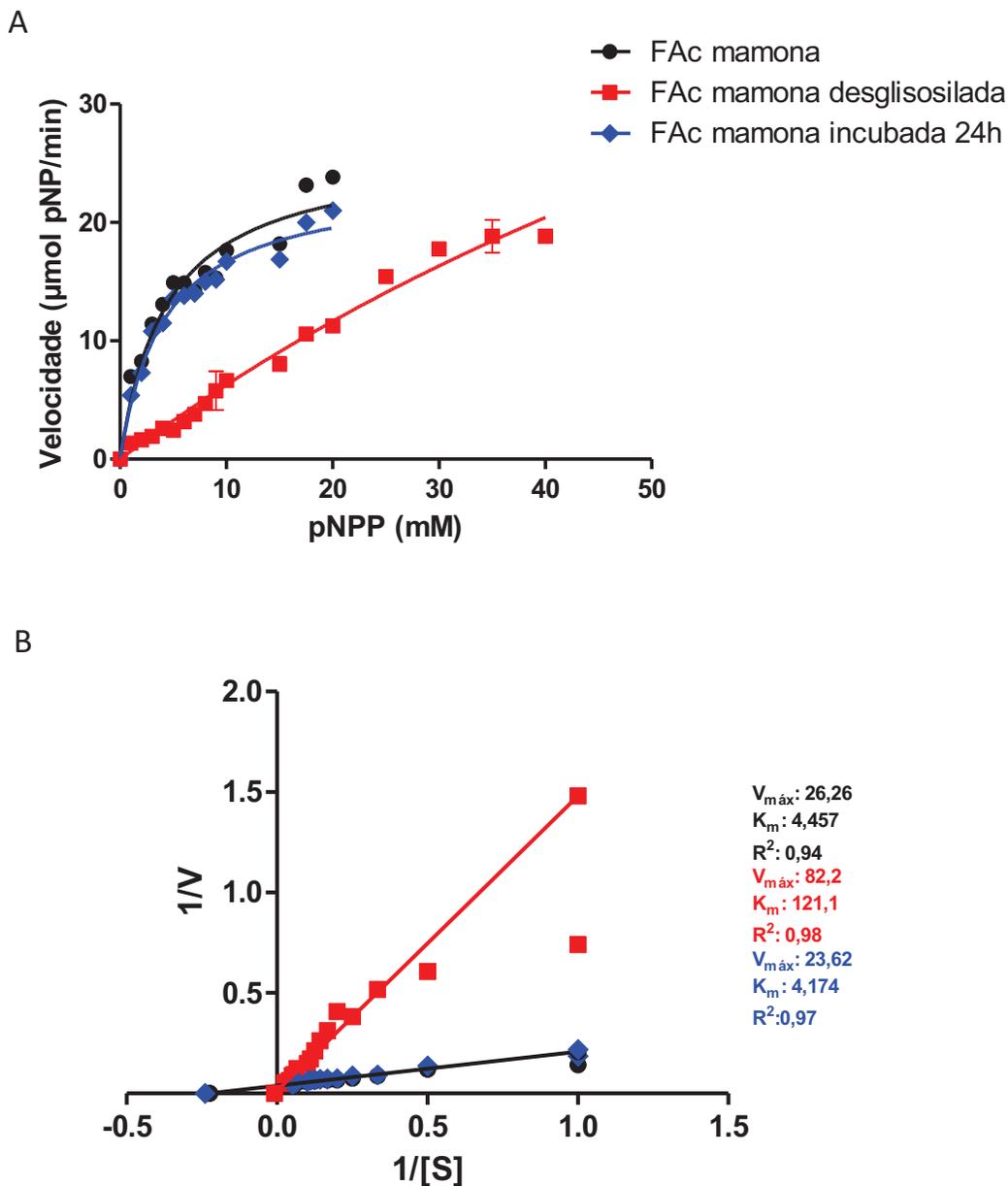


Figura 21. Atividade enzimática da FAc de mamona desglisilada. **A.** Modelo da Hipérbole-retangular. **B.** Modelo de Lineweaver-Burk. Para os ensaios, foram utilizados 0,185µg de FAc de mamona, 0,1M de tampão acetato e concentrações crescente de pNPP. A FAc deglicosilada foi submetida a incubação de 24h a 37°C com endoglicosidase H, como descrito na metodologia. Cada ponto se refere à média de uma triplicata. **FAc mamona incubada 24h:** FAc de mamona submetida ao mesmo tratamento para desglisilação, porém sem a adição de endoglicosidase H.

A observação da figura 21 mostra que a cadeia de carboidratos é fundamental para a atividade enzimática, como já havia constatado Granjeiro (Granjeiro, P., 1998). Podemos notar que a ausência da cadeia de açúcar faz com que a afinidade da enzima pelo substrato diminua muito, elevando bastante o valor da K_m . Experimentalmente, não conseguimos atingir a $V_{m\acute{a}x}$ para a FAc desglicosilada, mesmo em concentrações de substrato de 40mM: a enzima nativa atingiu a $V_{m\acute{a}x}$ em concentrações 4 vezes menores.

Assim, a grande diferença no valor da $V_{m\acute{a}x}$ e no do K_m da FAc nativa e desglicosilada sugere que o processo de remoção da cadeia de carboidrato foi realizado, e isso influenciou bastante na atividade enzimática, mostrando que existe alguma relação dessa cadeia com o sítio catalítico e com a conformação ideal da enzima. Um ensaio utilizando a FAc de mamona submetida a 24h de incubação a 37°C sem endoglicosidase garantiu que as diferenças observadas nos parâmetros cinéticos se devem à ausência de carboidrato, e não à incubação prolongada da FAc. Assim, seguimos para ensaios com H_2O_2 , esperando que houvesse maior sensibilidade ao H_2O_2 na enzima desglicosilada em relação à nativa. Esperávamos que a ordem de grandeza do IC_{50} fosse de mM.

A figura 22 mostra a atividade enzimática em presença de concentrações crescentes de H_2O_2 .

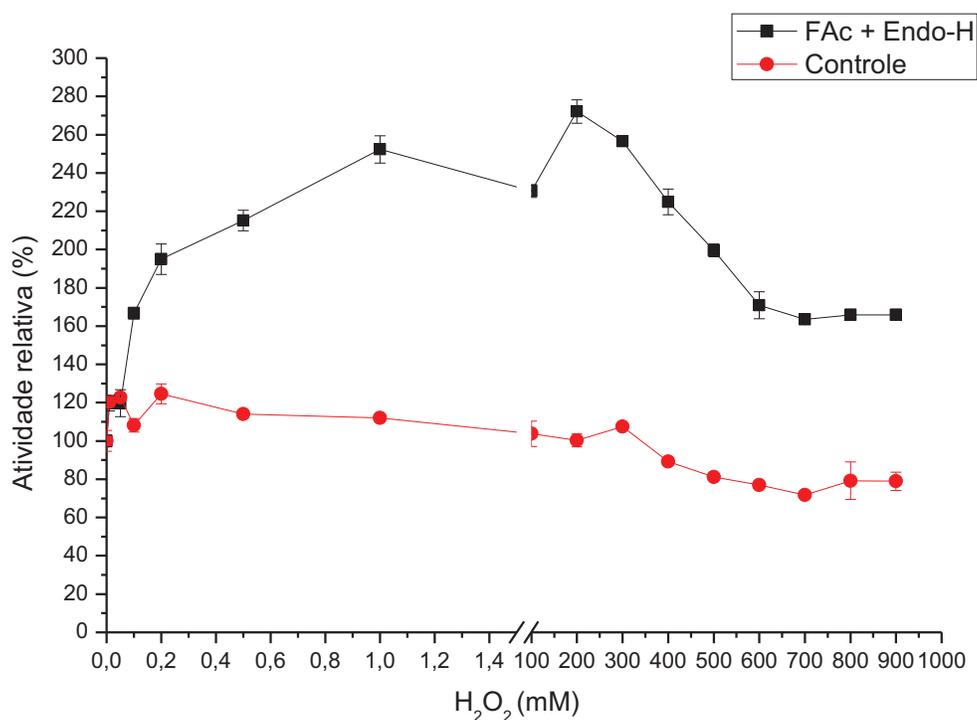


Figura 22. Atividade enzimática da FAc de mamona desglicosilada em presença de H₂O₂. Os ensaios utilizaram 0,185µg de FAc de mamona, 0,1M de tampão acetato e 5mM de pNPP. A desglicosilação da FAc de mamona foi realizada conforme descrito na metodologia. Cada ponto representa a média de uma triplicata.

A figura 22 mostra um efeito comentado anteriormente para a FAc de mamona nativa: em concentrações de H₂O₂ inferiores a 50mM, há aumento da atividade enzimática. Não sabemos explicar ao certo os mecanismos que levam a essa ativação, pois a oxidação deve ocorrer de maneira mais branda, mas não era esperado que isso ativasse a enzima. Trabalhos em elaboração no nosso laboratório, utilizando outras FAcS vegetais com carboidrato na estrutura, relataram ativação da enzima na presença de concentrações de até 0,5M de H₂O₂. Hipotetizamos que isso possa se dever à modificações estruturais da enzima promovidas pela presença de H₂O₂, que de alguma forma facilitam o mecanismo de catálise.

Ainda observando a figura 22, podemos observar que a FAc de mamona desglicosilada também sofre ativação na presença de concentrações de até 1M de H_2O_2 , mas não sabemos explicar como isso ocorre. No entanto, a ausência de cadeia de carboidrato tornou a enzima mais resistente à oxidação por H_2O_2 , destruindo nossa hipótese de que a resistência da FAc de mamona ao H_2O_2 se devia à presença de carboidrato em sua estrutura. A figura 22 mostra que, pelo contrário, a enzima torna-se mais resistente quando é isenta de carboidrato. Assim, o valor de IC_{50} não pôde ao menos ser calculado.

Assim, podemos supor que a cisteína do sítio catalítico da FAc de mamona não é essencial para a catálise, ou a oxidação não é irreversível, atingindo apenas o estado de ácido sulfênico, e sendo rapidamente recuperada a forma ativa da enzima. Entretanto, Granjeiro (Granjeiro, P., 1998) já havia observado que a cisteína presente no sítio ativo da fosfatase ácida de mamona era essencial para a catálise, uma vez que compostos que reagem com grupamentos SH, como Cu^{2+} e p-cloromercuribenzoato (pCMB) inibiam completamente a atividade da enzima. Pelo mesmo motivo, a cisteína presente no sítio catalítico da FAc de rim bovino é fundamental para a atividade enzimática, sendo que a presença de tais compostos ou a oxidação da cisteína impedem a catálise. Ou ainda a oxidação desse resíduo ocorre de maneira irreversível, levando rapidamente ao estado de ácido sulfônico ou sulfinico.

Para podermos analisar se a perda de carboidrato eleva a sensibilidade da FAc de mamona à exposição a DTT, GSH ou H_2O_2 , realizamos ensaios da mesma maneira descrita para a FAc nativa, expondo a enzima desglicosilada pelo mesmo intervalo de tempo a cada um desses compostos.

A figura 23 mostra os resultados obtidos em reações utilizando FAc de mamona desglicosilada exposta à 1mM de DTT.

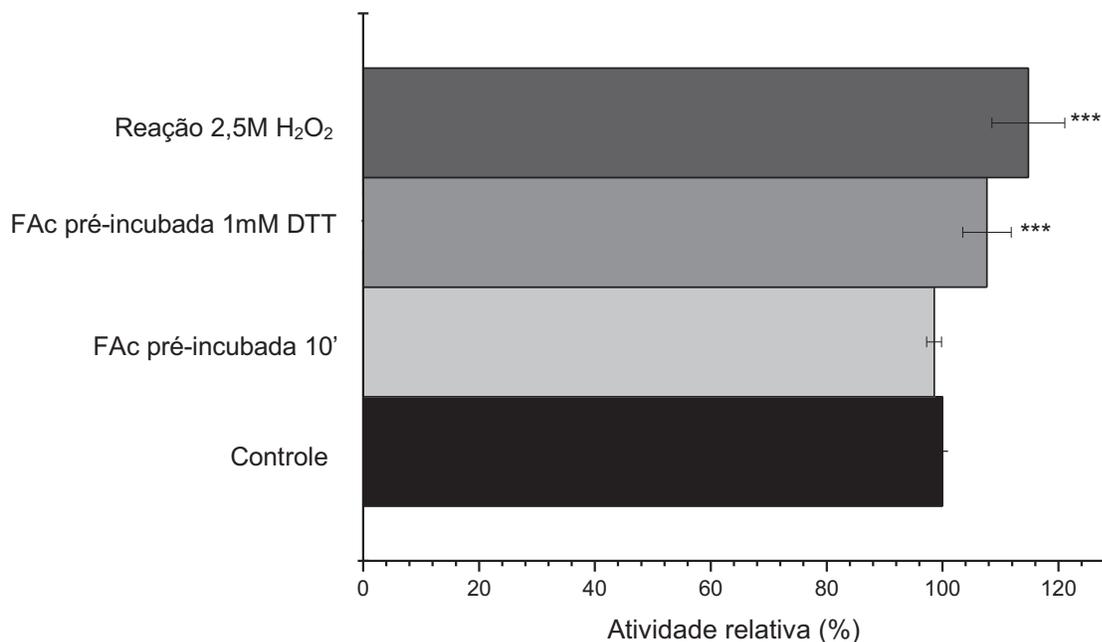


Figura 23. Atividade enzimática de FAc de mamona desglucosilada exposta à 1mM de DTT. Os ensaios utilizaram 0,185 μ g de FAc de mamona, 0,1M de tampão acetato e 5mM de pNPP. A deglicosilação da FAc de mamona foi realizada conforme descrito na metodologia. A exposição da FAc a DTT foi realizada em banho de gelo no escuro durante 10 minutos. Cada ponto representa a média de uma triplicata. Resultados significativos em relação ao controle: p<0,05. ** significativo. ***: muito significativo. 100%: 2,4 μ mol pNPP/min.

A observação da figura 23 revela que a pré-incubação da enzima não teve efeito significativo sobre sua atividade. A exposição ao DTT elevou a atividade enzimática em torno de 5%, o que não variou muito do padrão exibido pela FAc nativa, onde a exposição ao DTT não influenciou na atividade enzimática. Assim, podemos perceber que não houve redução de nenhum componente do sítio ativo, mesmo na ausência da cadeia de açúcar da enzima. Ao contrário do que foi observado para a FAc de mamona nativa, a reação em presença 2,5M de H₂O₂ utilizando FAc desglucosilada exposta ao DTT elevou a atividade enzimática em quase 20%, enquanto que para a enzima nativa, as mesmas condições de ensaio resultaram em uma redução de cerca de 20% da atividade enzimática. Isso era esperado, dado que a ausência de carboidrato mostrou ser um fator que eleva a resistência da enzima a H₂O₂, sendo que sua atividade é aumentada em concentrações desse composto da ordem de 1M. Ainda não sabemos ao certo os

mecanismos que permitem que a redução do sítio catalítico eleve a atividade na ausência de carboidrato na estrutura dessa enzima.

Também realizamos ensaios utilizando FAc de mamona desglicosilada exposta a GSH, e a figura 24 mostra os resultados obtidos.

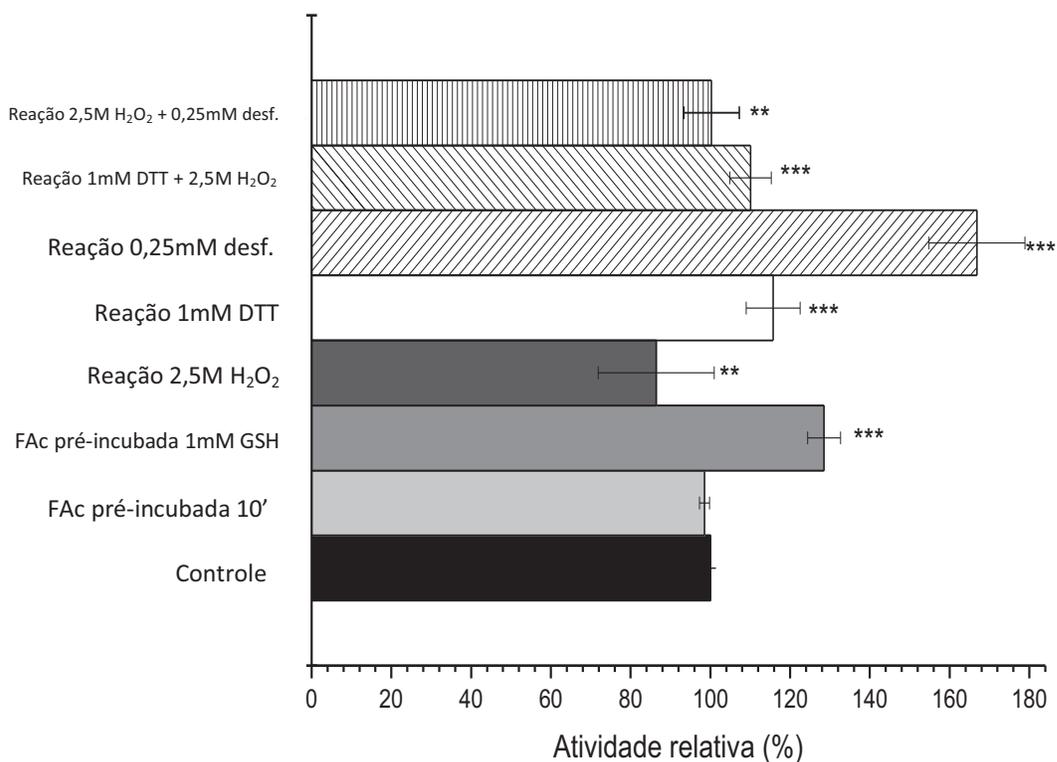


Figura 24. Atividade enzimática de FAc de mamona desglicosilada exposta à 1mM de GSH.

Os ensaios utilizaram 0,185µg de FAc de mamona, 0,1M de tampão acetato e 5mM de pNPP. A desglicosilação da FAc de mamona foi realizada conforme descrito na metodologia. A exposição da FAc a GSH foi realizada em banho de gelo no escuro durante 10 minutos. Cada ponto representa a média de uma triplicata. **Controle:** FAc desglicosilada não pré-incubada. **Desf. =** Desferoxamina. Resultados significativos em relação ao controle: $p < 0,05$. ** significativo. ***: muito significativo. **100%:** 2,4µmol pNPP/min.

A observação da figura 24 mostra que, ao contrário do observado para a FAc de mamona nativa (figura 17), a exposição da enzima desglicosilada a 1mM de GSH eleva a atividade enzimática. Isso pode ser uma evidência de alguma alteração conformacional, que permite maior proteção do sítio catalítico por GSH. A atividade enzimática em presença de H₂O₂ também foi superior à observada

para a enzima nativa, atingindo cerca de 85% da atividade observada para o controle. Aqui não observamos o padrão de ativação da FAc desglicosilada por H_2O_2 , e a inibição da atividade enzimática não foi significativa, quando se leva em conta o desvio padrão desse ensaio em especial.

Ainda observando-se a figura 24, pode-se notar que a presença de DTT no meio de reação utilizando a FAc desglicosilada exposta a GSH elevou bastante a atividade enzimática, sendo quase 30% maior do que a observada no controle. Esse fenômeno vai de encontro ao observado na figura 15, onde a exposição a GSH seguida da presença de DTT na reação inibiu cerca de 40% da atividade enzimática. A adição de H_2O_2 , combinada a DTT, gerou uma atividade relativa cerca de 10% maior do que o controle, mostrando que houve uma pequena inibição por oxidação do sítio catalítico.

A presença de desferoxamina também aumentou bastante a atividade enzimática: em torno de 70%. Para a FAc nativa, não observamos grandes diferenças em relação ao controle, mas a perda da cadeia de carboidrato parece favorecer o efeito já esperado de desferoxamina na enzima exposta a GSH. Ensaio na presença de desferoxamina e H_2O_2 recuperaram a atividade enzimática ao nível do controle, diminuindo bastante a atividade em relação ao ensaio na presença de desferoxamina isoladamente. Isso pode ser evidência de que a desferoxamina favorece a inibição por H_2O_2 , ou ao menos não protege o sítio catalítico da FAc desglicosilada contra a oxidação por H_2O_2 .

Após a exposição da FAc de mamona desglicosilada a DTT e GSH, realizamos ensaios de exposição dessa enzima à H_2O_2 , a fim de avaliar se DTT e GSH são capazes de reverter a eventual inibição causada por oxidação do sítio catalítico. A figura 25 mostra os resultados obtidos.

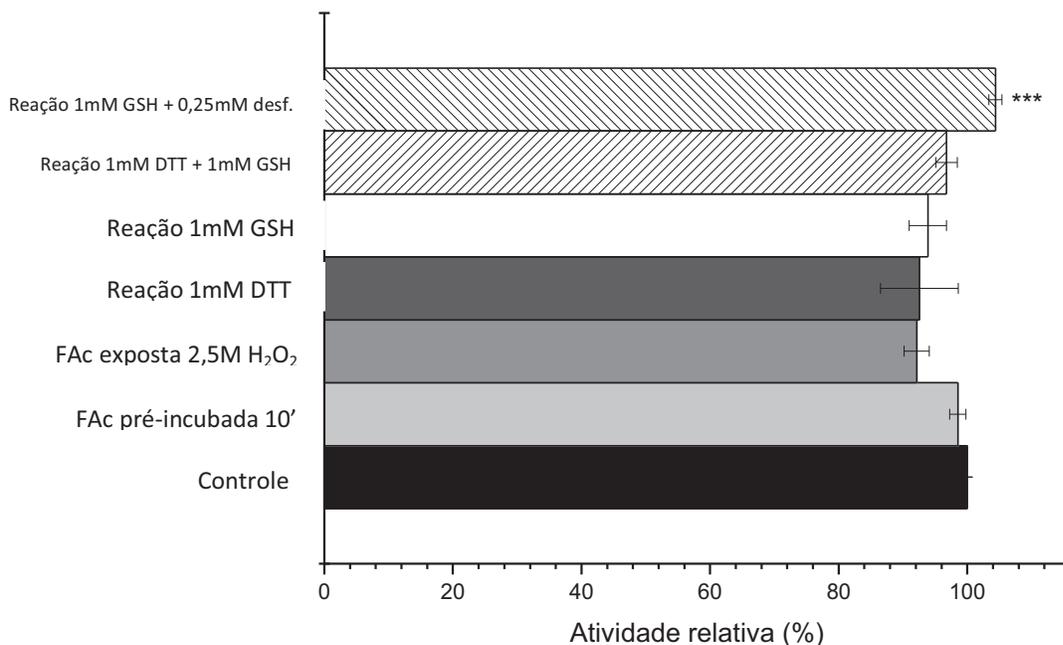


Figura 25. Atividade enzimática de FAc de mamona desglicosilada exposta à 2,5M de H₂O₂. Os ensaios utilizaram 0,185µg de FAc de mamona, 0,1M de tampão acetato e 5mM de pNPP. A deglicosilação da FAc de mamona foi realizada conforme descrito na metodologia. A exposição da FAc a H₂O₂ foi realizada em banho de gelo no escuro durante 10 minutos. Cada ponto representa a média de uma triplicata. **Controle:** FAc desglicosilada não pré-incubada. **Desf.=** Desferoxamina. Resultados significativos em relação ao controle: p<0,05. ** significativo. ***: muito significativo. **100%:** 2,4µmol pNPP/min.

A figura 25 mostra que a exposição da FAc de mamona desglicosilada a 2,5M de H₂O₂ praticamente não afetou a atividade enzimática, inibindo-a cerca de 5%, ao contrário do que foi observado para a enzima nativa (figura 19). Isso era esperado, uma vez que já havíamos constatado uma resistência ao H₂O₂ maior para a enzima desglicosilada do que para a nativa. A adição de DTT ou GSH ao meio de reação quase não alterou a atividade enzimática, em relação ao ensaio utilizando apenas a enzima exposta a H₂O₂. Contudo, a combinação desses dois compostos foi capaz de reverter, ainda que cerca de apenas 5%, a inibição da atividade enzimática causada por exposição ao H₂O₂.

Ainda observando a figura 25, podemos notar que a combinação de GSH e desferoxamina elevou cerca de 10% a atividade enzimática, evidenciando que houve uma pequena proteção.

4.8 Eletroforese em condições não desnaturantes

A fim de avaliar o estado das FAc e confirmar a desglicosilação da FAc de mamona, realizamos eletroforese em condições não desnaturantes. Aplicamos amostras das FAc de mamona nativa e de rim bovino nativas e fervidas, a fim de comparar a movimentação da enzima nativa e sabidamente desnaturada por calor no gel. Esperávamos que tal comparação permitisse inferir o estado de cada FAc nativa, uma vez que caso a movimentação da enzima coincidissem com a da FAc desnaturada, poderíamos afirmar que a FAc estava desnaturada, mesmo sendo armazenada a -20°C . Também aplicamos amostra da FAc de mamona desglicosilada, sendo que em um poço não fervemos a amostra antes de aplicar e em outro realizamos tal procedimento. Além disso, utilizamos a FAc de mamona submetida a 24h de incubação a 37°C , como controle do processo de desglicosilação. Esperávamos confirmar a desglicosilação através da movimentação diferencial da FAc de mamona incubada com endoglicosidase H em relação à enzima nativa.

Nossos resultados (figura não mostrada) não permitiram ampliar as informações sobre o estado das FAc, uma vez que não houve coloração alguma no gel, exceto a obtida para o marcador de peso molecular, em todas as triplicatas. Assim, a coloração do marcador de peso molecular garantiu que a eletroforese foi bem sucedida, uma vez que sempre conseguimos repetir tal resultado. Porém, nenhum sinal de proteína foi possível ser detectado no gel, em nenhum dos poços.

O aumento da quantidade de proteína aplicada a cada poço (50 ou $100\mu\text{g}$) tampouco foi suficiente para obtermos bandas de proteína. Tentamos diminuir o percentual de poliacrilamida do gel de corrida, realizando a eletroforese em gel de corrida a 7,5% de poliacrilamida. Contudo, para ambas as FAc, os trabalhos

realizados logo após sua purificação utilizaram eletroforese em condições não desnaturantes com gel de corrida a 10% (Granjeiro, M., 1994; Granjeiro, P., 1998).

Assim, hipotetizamos que a eletroforese teve sucesso, porém as FAcS não conseguiram atravessar o gel de empacotamento ou o gel de corrida, permanecendo no local de aplicação da amostra. Evidências de que as enzimas estavam parcialmente polimerizadas e desnaturadas sugerem que talvez as FAcS estivessem em um estado de agregação das moléculas que impediu que estas atravessassem a malha do gel, resultando na ausência de coloração do gel após a corrida.

5. Conclusões

A observação de nossos resultados permitem uma série de conclusões a respeito do efeito de H_2O_2 sobre a atividade de duas FAcS com cisteína no sítio catalítico:

⇒ As FAcS utilizadas não estavam totalmente ativas, apresentand valores de K_m e de $V_{máx}$ diferentes dos obtidos nos trabalhos logo após a purificação;

⇒ Em presença de H_2O_2 , detectamos duas respostas bastante diferentes: a FAc de mamona mostrou-se muito resistente a esse composto, enquanto que a FAc de rim bovino foi bastante sensível;

⇒ A presença de carboidrato na FAc de mamona não é suficiente para explicar a resistência, já que a retirada da cadeia de açúcar elevou ainda mais a resistência da enzima;

⇒ Hipotetizamos que a diferença de comportamento na presença de H_2O_2 se deve a diferenças no estado de oxidação da cisteína de cada uma das enzimas na presença desse composto;

⇒ O sítio catalítico da FAc de mamona provavelmente atinge um estado de ácido sulfênico, enquanto que o da FAc de rim bovino talvez chegue a estado de ácido sulfínico ou sulfônico;

⇒ Compostos protetores de danos por oxidação, como DTT e GSH, têm efeitos diferenciados em cada uma das FAcS;

⇒ Desferoxamina não se mostrou eficaz na recuperação da atividade enzimática;

Assim, nossos resultados, em conjunto, sugerem que pode haver mecanismos diferentes de oxidação do sítio catalítico de cada uma das FAcS, mecanismo esse que não parece estar diretamente relacionado à presença de carboidrato na estrutura da enzima. Esses diferentes processos de oxidação podem levar a estados reversíveis ou irreversíveis de oxidação da cisteína do sítio ativo, resultando talvez em diferentes sensibilidades das enzimas ao H₂O₂.

6. Referências

- Aoyama, H., Cavagis, A.D.; Taga, E.M.; Ferreira, C.V. (2001). "Endogenous lectin as a possible regulator of the hydrolysis of physiological substrates by soybean seed acid phosphatase." Phytochemistry **58**: 221-225.
- Aoyama, H.; Silva, T.M.A.; Miranda, M.A.; Ferreira, C.V. (2003). "Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas." Quím. Nova **26**: 896-900.
- Arino J.P.-C.; Cunillera, N.; Camps, M.; Posas, F. & Ferrer, A. (1993). "Protein phosphatases in higher plants: multiplicity of type 2A phosphatases in *Arabidopsis thaliana*." Plant Mol. Biol. **21**: 475-485.
- Augusto, O. (2006) "Radicais Livres, Bons Maus e Naturais". Editora Oficina de Textos. Baierle, M. V., J.; Paniz, C.; Moro, A.; Barbosa, F.J.; Garcia, S.C. (2010). "Possíveis efeitos do cobre sanguíneo sobre parâmetros hematológicos em idosas." Bras. Patol. Med. Lab. **46**: 463-470.
- Baierle, M. V., J.; Paniz, C.; Moro, A.; Barbosa, F.J.; Garcia, S.C. (2010). "Possíveis efeitos do cobre sanguíneo sobre parâmetros hematológicos em idosas." Bras Patol Med Lab **46**: 463-470.
- Basha, S. M. (1984). "Purification and characterization of an acid phosphatase from peanut (*Rachis hypogaea*) seed." Can. J. Bot. **62**: 335-346.
- 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.
- Bhatt, D. K. & Nagda, G. (2012). "Modulation of acid phosphatase and lactic dehydrogenase in hexachlorocyclohexane-induced hepatocarcinogenesis in mice." J Biochem Mol Toxicol. **26**: 439-444.
- Biswas, T. K. & Cundiff C., C. (1991). "Multiple forms of acid phosphatase in germinating seeds of *Vigna sinensis*." Phytochemistry **30**: 2119-2125.
- Bolin, A.P.; Guerra, B.A.; Nascimento, S.J.; Otton, R. (2012). "Changes in lymphocyte oxidant/antioxidant parameters after carbonyl and antioxidant exposure." Int. Immunopharmacol. **14**: 690-697.
- Bonnet, J.; Mayonove, P.; Morris, M.C. (2008). "Differential phosphorylation of Cdc25C phosphatase in mitosis." Biochem Biophys Res Commun **370**: 483-488.

- Boskey, A.L.; Doty, S.B.; Kudryashov, V.; Mayer-Kuckuk, P.; Roy, R.; Binderman, I. (2008). "Modulation of extracellular matrix protein phosphorylation alters mineralization in differentiating chick limb-bud mesenchymal cell micromass cultures." Bone. **42**: 1061-1071.
- Budde, R.J.A. & Chollet, R. (1988). "Regulation of enzyme activity in plants by reversible phosphorylation." Physiol. Plant. **72**: 435-439.
- Burdon, R. H. (1996). "Control of cell proliferation by reactive oxygen species." Biochem. Soc. Trans. **24**: 1028-1032.
- Canabarro, A.; Paiva, C. G.; Ferreira, H.T.; Tholt-de-Vasconcellos, B.; De-Deus, G.; Prioli, R. L.; Adriana, B.R.; Alves, G.G ; Granjeiro, J. M. (2012) "Short-Term Response of Human Osteoblast-Like Cells on Titanium Surfaces With Micro- and Nano-Sized Features." Scanning **34**: 378-386.
- Cataneo, A.C.; Destro, G.F.G.; Ferreira, L.C.; Chamma, K.L.; Sousa, D.C.F. (2003). "Atividade de glutationa S-transferase na degradação do herbicida glyphosate em pantas de milho (*Zea mays*)" Planta Daninha **21**: 307-312.
- Cavagis, A.D.M., Granjeiro, P.A., Ferreira, C.V. & Aoyama, H. (2004). " Effect of chaotropic agents on the reversible unfolding of a soybean (*Glycine max*) seed acid phosphatase". Phytochemistry, **65**: 831-836.
- Cestari, T.M., Granjeiro, J.M et al. (2009). "Bone repair and augmentation using block of sintered bovine-derived anorganic bone graft in cranial bone defect model." Clin Oral Implants Res **20** 340-350.
- Chaimovich, H. & Nome, F. (1970). "Purification and properties of an acid phosphatase from bovine brain." Arch. Biochem. Biophys. **139**: 9-16.
- Cheng, H.-F & Tao, M. (1989). "Purification and characterization of a phosphotyrosyl-protein phosphatase from wheat seedlings." Biochim. Biophys. Acta **998**: 271-276.
- Chung, R. P.-T. & Polya, G.M. (1992). "Copurification and characterization of poppy seed phosphatase and phosphoprotein phosphatase activities." Plant Sci. **84**: 153-162.
- Cohen, P. (1989a). "The structure and regulation of protein phosphatases." Ann. Rev. Biochem. **58**: 453-508.
- Cohen, P. (1989b). "Protein phosphatases come of age." J.f Biol. Chem. **264**: 21435-21438.
- D'Souza, B.; Parthasarathy, R.; Sreekantha, D'Souza, V. (2011). "Acid phosphatase as a marker in malaria." Indian J. CLin. Biochem. **26**: 396-399.
- Dantzger, M. (2010) "Fosfatases de *Daphnia similis* como biomarcadores da ecotoxicidade de agroquímicos" Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, UNICAMP.
- Darley-Usmar, V.; Halliwell, B. (1996). "Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system." Pharm. Res. **13**: 649-662.
- Dassa, E.; Cahu, M.; Desjoyaus-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). "Subcellular distribution of low-molecular-weight acid phosphatases." Biochim. Biophys. Acta **452**: 121-130.
- De Duve, C. et al. (1955). "Tissue fractionation studies. VI - intracellular distribution patterns of enzyme in rat liver tissue." Biochem. J. **60**: 604-617.
- Dewald, D. B.; Mason, H.S. & Mullet, J.E. (1993). "The soybean vegetative storage proteins VSPa and VSPb are acid phosphatases active on polyphosphates." J. Biol. Chem. **267**: 15958-15964.
- Di Pietro, D. L. (1968). "17-B-extradiol-3-posphatase phosphohydrolase activity of human placental acid phosphatase." J. Biol. Chem. **243**: 1303-1305.

- Di Pietro, D. L. & Zenderle, F.S. (1967). "Separation and properties of three acid phosphatases from human placenta" J. Biol. Chem. **242**: 1303-1305.
- Duff, S.M.; Lefebvre, D.D.; Plaxton W.C. (1989). "Purification and characterization of a phosphoenolpyruvate phosphatase from *Brassica nigra* suspension cells." Plant Physiol. **90**: 734-741.
- Duff, S.M., Plaxton, W.C.; Lefebvre, D.D. (1991). "Phosphate-starvation response in plant cells: de novo synthesis and degradation of acid phosphatases." Proc.he Nat. Acad. Sci.e U. S.f A.a **88**: 9538-9542.
- Duff, S.M.G.; Lefebvre, D.D.; Plaxton, W.C. (1991b). "Purification, characterization and subcellular localization of an acid phosphatase from *Brassica nigra* suspension cells. Comparison with phosphoenolpyruvate phosphatase." Arch Biochem Biophys. **286**: 226-232.
- Duff, S.M.G.; Sarath, G.; Plaxton, W.C. (1994). "The role of acid phosphatases in plant phosphorous metabolism." Physiol. Plantarum **90**: 791-800.
- Fenton, H.J.H. (1894). "Oxidation of tartaric acid in presence of iron." J Chem Soc. **65**: 899-911.
- Ferens, M. & Morawiecka, B. (1985). "Ryue germ acid phosphatase: properties of the enzyme and its activation by lectins." Phytochemistry **24**: 2839-2842.
- Fernandes, E.C., Granjeiro, J.M., Taga, E.M., Meyer-Fernandes, J.R. & Aoyama, H. (2003) "Phosphatase activity characterization on the surface of intact bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*". FEMS Microbiol. Lett. **220**: 197-206.
- Fernandes, E.C., Granjeiro, J.M., Aoyama, H., Fonseca, F.V., Fernandes, J.R. & Vercesi, A.E. (2003). "A metallo phosphatase activity on the surface of *Trypanosoma brucei* procyclic forms". Vet. Parasitol. **118**: 19-28.
- Ferreira, A.L.A. & Matsubara, L.S. (1997). " Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo". Rev Ass Med Brasil. **43**: 61-68.
- Ferreira, C. V. (1995). "Purificação e caracterização das fosfatases ácidas das sementes de soja quiescentes." Dissertação de Mestrado.Instituto de Biologia - UNICAMP.
- Ferreira, C.V., Granjeiro, J.M., Taga, E.M. & Aoyama, H. (1998a). "Multiple forms of soybean seed acid phosphatases. Purification and characterization". Plant Physiol. Biochem., **36**: 487-494.
- Ferreira, C. V., Granjeiro, J.M. et al. (1998b). "Soybean seed acid phosphatases: unusual optimum temperature and thermal stability studies." Biochem Biophys Res Commun **242** 282-286.
- Ferreira, C. V., G. Z. Justo, et al. (2006). "Natural compounds as a source of protein tyrosine phosphatase inhibitors: application to the rational design of small-molecule derivatives." Biochimie **88**: 1859-1873.
- Ferreira, C.V., Taga, E.M. & Aoyama, H. (1999). "Glycolytic intermediates as substrates of soybean acid phosphatase isoforms". Plant Sci. **147**: 49-54.
- Ferreira, C.V., Taga, E.M. & Aoyama, H. (2000). "Inhibition of acid phosphatase isoforms purified from mature soybean (*Glycine max*) seeds". J. Enz. Inhib. : 403-410.
- Finkel, T.; Holbrook, N.J. (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature **408**: 239-247.
- Fridovich, I. (1995). "Superoxide radical and superoxide dismutases." Ann. Rev. Biochem. **64**: 97-112.
- Fucci, L.; Oliver, C.N.; Coon, M.J.; Stadtman, E.R. (1983). "Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: possible implication in protein turnover and ageing." Proc. Nat. Acad. Sci. USA **80**: 1521-1525.
- Fujimoto, I. (1984). "Characterization of intermediate-molecular-weight acid phosphatase from bovine kidney cortex." J. Biochem. **96**: 1079-1088.

- Galka, M. et al. (1980). "Properties of low-molecular-weight acid phosphatases isolated from cytosol and chromatin of rat liver." Acta Biochim. Pol. **27**: 281-293.
- 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.
- Gottlieb, M.D. & Dwyer, M. (1981). "*Leishmania donovani*: surface membrane acid phosphatase activity of promastigotes." Exper. Parasitol. **52**: 117-128.
- Granjeiro, J. M. (1994). "Purificação e caracterização da fosfatase ácida do rim bovino." Tese de mestrado, Instituto de Biologia - UNICAMP.
- Granjeiro, J.M., Ferreira, C.V., Jucá, M.B., Taga, E.M. & Aoyama, H. (1997). "Bovine kidney low molecular weight acid phosphatase: FMN-dependent kinetics". Biochem. Mol. Biol. Int.; 1201-1208.
- Granjeiro, J.M., C. V. Ferreira, et al. (2002). "Inhibition of bovine kidney low molecular mass phosphotyrosine protein phosphatase by uric acid." J. Enzyme Inhib. Med. Chem. **17**: 345-350.
- Granjeiro, J.M., M. A. Miranda, et al. (2004). "Effect of homologous series of n-alkyl sulfates and n-alkyl trimethylammonium bromides on low molecular mass protein tyrosine phosphatase activity." Mol Cell Biochem **265**: 133-140.
- Granjeiro, J.M., Taga, E.M. et al. (1997). "Purification and characterization of a low-molecular-weight bovine kidney acid phosphatase." An Acad Bras Cienc **69**: 451-460.
- Granjeiro, P. A. (1998). "Purificação e caracterização de fosfatase ácida da semente de mamona (*Ricinus communis*)." Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia - UNICAMP.
- Granjeiro, P. A., A. D. Cavagis, et al. (2004). "The thermal stability of a castor bean seed acid phosphatase." Mol Cell Biochem **266**: 11-15.
- Granjeiro, P.A., Ferreira, C.V., Cavagis, A.D.M., Granjeiro, J.M. and Aoyama, H. (2003) "Essential sulfhydryl groups in the active site of castor bean (*Ricinus communis*) seed acid phosphatase". Plant Sci. **164**: 629-633.
- Granjeiro, P.A., Ferreira, C.V., Granjeiro, J.M., Taga, E.M. & Aoyama, H. (1999). "Purification and kinetic properties of a castor bean seed acid phosphatase containing sulfhydryl groups". Physiol. Plant. **107**: 151-158.
- Guo, Y.L. & Roux, S.J. (1995). "Partial purification and characterization of an enzyme from pea nuclei with protein tyrosine phosphatase activity." Plant Physiol. **107**: 167-175.
- Gutteridge, J.M. (1984). "Lipid peroxidation initiated by superoxide-dependent hydroxyl radicals using complexed iron and hydrogen peroxide." FEBS Lett.s **172**: 245-249.
- Haber, F. & Weiss, J. (1934). "The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts". Proceedings of the Royal Society. **147**: 332-351.
- Halliwell, B. (1996a). "Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation." Biochem. Soc. Trans. **24**: 1023-1027.
- Halliwell, B. (1996b). "Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans." Free Radic. Res. **25**: 57-74.
- Halliwell, B. (1996c). "Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant *in vivo*?" Free Radic. Res. **25**: 439-454.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M. (1984a). "Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage." Lancet. **2**: 1095.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M. (1984b). "Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy." Lancet. **1**: 1396-1397.

- Hartree, E. F. (1972). "Determination of protein: a modification of the Lowry method that give a linear photometric response." Anal. Biochem. **48**: 422-427.
- 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.
- Hertog, J.; Groen, A.; Wijk, T. van der. (2005). "Redox regulation of protein-tyrosine phosphatases." Arch Biochem Biophys. **434**: 11-15.
- Himeno, M. et. al. (1991). "Mechanism of a conversion from membrane associated lysosomal acid phosphatase to cytosolic forms." Biochem Biophys Res Commun **180**: 1483-1489.
- Huber, P.C.; Almeida, W.P.; de Fátima, A. (2007). "Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos." Quím. Nova **31**: 1170-1179.
- Iniesta, V., Gomez-Nieto, L.C. et al. (2001). "The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of Leishmania inside macrophages." J Exp Med **193**: 777-784.
- Jia, Z. (1997). "Protein phosphatases: structures and implications." Biochem. Cell Biol. **75**: 17-26.
- Johnston, P.A.; Soares, K.M.; Shinde, S.N.; Foster, C.A.; Shun, T.Y.; Takyi, H.K.; Wipf, P.; Lazo, J.S. (2008). "Development of a 384-well colorimetric assay to quantify hydrogen peroxide generated by the redox cycling of compounds in the presence of reducing agents." Assay Drug Dev. Technol. **6**: 505-518.
- Jonescu, M.D. & Jinescu, V.M. (1970). "Submicroscopic localization of acid phosphomonoesterase in the Golgi apparatus of multifid glands of *Helix - Pomatia*." Stud. Cerat. Biol. **22**: 489-491.
- Jonsson, C.M. & Aoyama, H. (2007) "*In vitro* effect of agriculture pollutants and their joint action on *Pseudokirchneriella subcapitata* acid phosphatase". Chemosphere, **69**: 849-855.
- Jonsson, C.M. and H. Aoyama (2010). "Effect of copper on the activation of the acid phosphatase from the green algae *Pseudokirchneriella subcapitata*." Biomaterials **23**: 93-98.
- Jonsson, C.M., Paraíba, L.C. & Aoyama, H. (2009) "Metals and linear alkylbenzene sulphonate as inhibitors of the algae *Pseudokirchneriella subcapitata* acid phosphatase activity". Ecotoxicology **18**: 610-619.
- Joseph, P. D.; Mannervik, B.; Ortiz de Montellano, P. (1997). Molecular Toxicology, 1st. Oxford University Press, N.Y. 152-186.
- Kaneko, T.S.; Kikuti, R. & Kubota, K. (1990). "Purification and properties of native cell wall acid phosphatase from cultured tobacco cells." Phytochemistry. **29**: 2883-2887.
- Krebs, E.G. & Beavo, J.A. (1979). "Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes." Ann. Rev. Biochem. **48**: 923-959.
- Kruzel, M. & Morawiecka, B. (1982). "Acid phosphatase of potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). Purification, properties, sugar and amino acid composition." Acta Biochim. Pol. **29**: 321-330.
- Lai, A.G.; Doherty, C.J.; Mueller-Roeber, B.; Kay, S.A.; Schippers, J.H.; Dijkwel, P.P. (2012). "CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 regulates ROS homeostasis and oxidative stress responses. ." Proc. Nat. Acad. Sci. USA **109**: 17129-17134.
- Levine, A.; Tenhaken, R.; Dixon, R.; Lamb, C. (1994). "H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response." Cell **79**: 583-593.

- Li, L. & Dixon, J.E. (2000). "Form, function, and regulation of protein tyrosine phosphatases and their involvement in human diseases." Semin. Immunol. **12**: 75-84.
- Lima, A.F.; Rahal, S.C.; VOlpi Rdos, S.; Granjeiro, J.M.; Taga, R.; Cestaria, T.M. (2007). "Effect of bovine bone morphogenetic proteins on radius fracture healing in rabbits." Acta Cir. Bras. **22**: 260-265.
- 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.
- McConkey, D.J.; Orrenius, S. (1996). "Signal transduction pathways in apoptosis." Stem Cells **14**: 619-631.
- Meneghini, C.L.; Angelini, G.; Vena, G.A. (1987). "Contact allergy to Kathon CG." Contact Derm. **17**: 247-249.
- Meng, F.G. & Zhang, Z.Y. (2013). "Redox regulation of protein tyrosine phosphatase activity by hydroxyl radical." Biochim. Biophys. Acta. **1834**: 464-469.
- Miernyk, J. A. (1992). "Purification and characterization of the major acid phosphatase isozyme by maize endosperm cultures. ." Phytochemistry. **31**: 2613-2616.
- Mila-Kierzenkowska, C.; Wozniak, A.; Szpinda, M.; Boraczynski, T.; Wozniak, B.; Rajewski, P.; Sutkowy, P. (2012). "Effects of thermal stress on the activity of selected lysosomal enzymes in blood of experienced and novice winter swimmers." Scand. J. Clin. Lab. Invest. **72**: 635-641.
- Monteiro, H.P. & Stern, A. (1996). "Redox modulation of tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways." Free Radic Biol Med **21**: 323-333.
- Mordente, A.; Miggiano, G.A.; Martorana, G.E.; Meucci, E.; Santini, S.A.; CAstelli, A. (1987). "Alkaline phosphatase inactivation by mixed function oxidation systems." Arch Biochem Biophys. **258**: 176-185.
- Mordente, A. M., G.E.; Miggiano, G.A.; Meucci, E.; Santini, S.A.; CAstelli, A. (1988). "Mixed function oxidation and enzymes: kinetic and structural properties of an oxidatively modified alkaline phosphatase." Arch Biochem Biophys. **264**: 502-509.
- Murray, H.W. & Nathan, C.F. (1999). "Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*." J. Exp. Med. **189**:741-746.
- O'Neill, C.A.; Stebbins, C.L.; Boniquit, S.; Halliwell, B.; Longhurst, J.C. (1996). "Production of hydroxyl radicals in contracting skeletal muscle of cats." J. Appl. Physiol. **81**: 1197-1206.
- Ohyashiki, T.; Kumada, Y.; Hatanaka, N.; Matsui, K. (1994). "Oxygen radical-induced inhibition of alkaline phosphatase activity in reconstituted membranes." Arch Biochem Biophys. **313**: 310-317.
- Olson, B.M.; Jankowska-Gan, E.; Becker, J.T.; Vignali, D.A.; Burlingham, W.J., McNeel, D.G. (2012). "Human prostate tumor antigen-specific CD8+ regulatory T cells are inhibited by CTLA-4 or IL-35 blockade." J. Immunol. **189**: 5590-5601.
- Oltramari, P.V.; de Lima Navarro, R.; Henriques, J.F.; Taga, R.; Cestari, T.M.; Ceolin, D.S.; Janson, G.; Granjeiro, J.M. (2007). "Dental and skeletal characterization of the BR-1 minipig." Vet J **173**: 399-407.
- Paolicch, A.; Dominici, S.; Piere, L.; Maellaro, E.; Pompella, A. (2002). "Glutathione catabolism as a signaling mechanism." Biochem Pharmacol. **64**: 1027-1035.
- Pasqualini, S. et. al. (1992). "High molecular weight acid phosphatases from barley coleoptiles." Phytochemistry **31**: 3703-3706.
- Pesaresi, P.; Pribil, M.; Wunder, T.; Leister, D. (2011). "Dynamics of reversible protein phosphorylation in thylakoids of flowering plants: the roles of STN7, STN8 and TAP38." Biochim. Biophys. Acta **1807**: 887-896.

- Pinheiro, K.C.S. (2002). "Papel da proteína tirosina fosfatase de células V79 na resposta ao estresse causado pelo peróxido de hidrogênio." Dissertação de mestrado - Instituto de Biologia - UNICAMP.
- Prazeres, J.N., Ferreira, C. & Aoyama, H. (2004). "Acid phosphatase activities during the germination of soybean (*Glycine max*) seeds". Plant Physiol. Biochem. **42**: 15-20.
- Remaley, A.T.; Das, S.; Campbell, P.I.; LaRocca, G.M.; Pope, M.T.; Glew, R.H. (1985). "Characterization of *Leishmania donovani* acid phosphatases." J.f Biol. Chem. **260**: 880-886.
- Remaley, A.T.; Glew, R.H.; Kuhns, D.B.; Basford, R.E.; Waggoner, A.S.; Ernst, L.A.; Pope, M. (1985). "*Leishmania donovani*: surface membrane acid phosphatase blocks neutrophil oxidative metabolite production." Exper.l Parasitol. **60**: 331-341.
- Rengasamy, A.; Selvan, R. & Gnanam, A. (1981). "Isolation and properties of an acid phosphatase from thylakoid membranes from *Sorghum vulgare*." Arch Biochem Biophys. **209**: 230-236.
- Rigor, R.R.; Damoc, C.; Phinney, B.S.; Cala, P.M. (2011). "Phosphorylation and activation of the plasma membrane Na⁺/H⁺ exchanger (NHE1) during osmotic cell shrinkage." PLoS One **6**(12), e29210.
- Robinson, W.D.; Carson, I.; Ying, S.; Ellis, K.; Plaxton, W.C. (2012). "Eliminating the purple acid phosphatase AtAP26 in *Arabidopsis thaliana* delays leaf senescence and impairs phosphorus remobilization." New Phytol. **196**: 1024-1029.
- Saeed, A. et al. (1990). "Bovine brain low M_r acid phosphatase: Purification and properties." Physiol. Chem. Phys. Med. NMR. **22**: 81-94.
- Shao, J. & Diamond, M.I. (2012). "Protein phosphatase 1 dephosphorylates profilin-1 at Ser-137 " PLoS One **7**(3) e32802..
- Shibko, S. & Tappel, A.L. (1963). "Acid phosphatase of the lysosomal and soluble fraction of rat liver." Biochim. Biophys. Acta **73**: 76-86.
- Sies, H. (1993). "Strategies of antioxidant defense." Eur. J. Biochem. **215**: 213-219.
- Slack, C.R.; Hatch, M.D.; Goodchild, D.J. (1969). "Distribution of enzymes in mesophyll and parenchyma-sheath chloroplasts of maize leaves in relation to the C₄-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis." Biochem. J. **114**: 489-498.
- Sousa, R.R.R. (2005). "Estudo por óxido-redução de uma proteína tirosina fosfatase (CD45) purificada de membrana de linfócitos humanos." Dissertação de mestrado - Instituto de Biologia - UNICAMP
- Souza, A.C.; Azoubel, S.; Queiroz, K.C.; Peppelenbosh, M.P.; Ferreira, C.V. (2009). "From immune response to cancer: a spot on the low molecular weight protein tyrosine phosphatase." Cell. Mol. Life Sci. **66**: 1140-1153.
- Stanford, S. M. Rapini, N.; Bottini, N. (2012). "Regulation of TCR signalling by tyrosine phosphatases: from immune homeostasis to autoimmunity." Immunology **137**:1-19.
- Staswick, P.E.; Papa, C.; Huang, J. & Rhee, Y. (1994). "Purification of the major soybean leaf acid phosphatase that is increased by seed-pod removal." Plant Physiol. **104**: 49-57.
- Tadano, T.; Ozawa, K.; Sakai, H.; Osaki, M.; Matsui, H. (1993). "Secretion of acid phosphatase by the roots of crop plants under phosphorus-deficient conditions and some properties of the enzyme secreted by lupin roots." Plant Soil **95**:95-98.
- Taga, E.M. & Van Etten, R.L (1982). "Human liver acid phosphatase: purification and properties of a low molecular weight isoenzymes." Acta Biochim. Biophys. **214**:505-515.
- Takahashi, K.; Janckila, A.J.; Sun, S.Z.; Lederer, E.D.; Ray, P.C.; Yam, L.T. (2000). "Electrophoretic study of tatrare-resistant acid phosphatase soforms in endstage renal disease and rheumatoid arthritis." Clin Chim Acta **301**: 147-158.

- Theodorou, M.E. & Plaxton, W.C. (1993). "Metabolic adaptations of respiration to nutritional phosphate deprivation." Plant Physiol. **101**: 339-344.
- Tonks, N. K. (2005). "Redox redux: revisiting PTPs and the control " Cell **121**: 667-670.
- Trush, M.A.; Seed, J.L.; Kensler, T.W. (1985). "Reactive oxygen dependent activation of polycyclic hydrocarbons by phorbol ester-stimulated human polymorphonuclear leukocytes." Carcinog. Compr. Surv. **8**: 293-303.
- Turner, T. L.; Nguyen, V.H.; McLauchlan, C.C.; Dymon, Z.; Dorsey, B.M.; Hooker, J.D.; Jones, M.A. (2012). "Inhibitory effects of decavanadate on several enzymes and *Leishmania tarentolae* in vitro." J Inorg Biochem.**108**: 96-104.
- Uehara, K.; Fujimoto, S. & Taniguchi, T. (1974). "Studies on violet-colored acid phosphatases of sweet potato I. Purification and some physical properties. ." J. Biochem. **75**: 627-638.
- Ullah, A.H. and Gibson, D.M. (1988). "Purification and characterization of acid phosphatase from cotyledons of germinating soybean seeds." Arch. Biochem. Biophys. **260**: 514-520.
- Veeramani, S.; Chou, Y.W.; Lin, F.C.; Muniyan, S.; Lin, F.F.; Kumar, S.; Xie, Y.; Lele, S.M.; Tu, Y.; Lin, M.F. (2012). "Reactive oxygen species induced by p66Shc longevity protein mediate nongenomic androgen action via tyrosine phosphorylation signaling to enhance tumorigenicity of prostate cancer cells." Free Radic Biol Med **53**: 95-108.
- Vincent, J.B.; Crowder, M.W.; Averill, B.A. (1992a). "Multiple binding sites for tetrahedral oxyanion inhibitors of bovine spleen purple acid phosphatase." Biochemistry **31**: 3033-3037.
- Vincent, J.B.; Crowder, M.W. & Averill, B.A. (1992b). "Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions." Trends Biochem. Sci. **17**: 105-110.
- Wiseman, H. & Halliwell, B. (1996). "Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer." Biochem J. **313**: 17-29.
- Wong, D.; Chao, J.D.; Av-Gay, Y. (2012). "*Mycobacterium tuberculosis*-secreted phosphatases: from pathogenesis to targets for TB drug development." Trends Microbiol.**21**: 100-109.
- Yamada, S.; Tsuruya, K.; Yoshida, H.; Taniguchi, M.; Haruyama, N.; Tanaka, S.; Eriguchi, M.; Nakano, T.; Kitazono, T. (2012). "The clinical utility of serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b in the assessment of bone resorption in patients on peritoneal dialysis." Clin Endocrinol. October 18.
- Zambuzzi, W.F.; Bruni-Cardoso, A.; Granjeiro, J.M.; Peppelenbosh, M.P.; de Carvalho, H.F.; Aoyama, H.; Ferreira, C.V. (2009). "On the road to understanding of the osteoblast adhesion: cytoskeleton organization is rearranged by distinct signaling pathways." J Cell Biochem **108**: 134-144.
- Zambuzzi, W. F., Granjeiro, J.M.; Parikh K.; Yuvaraj, S.; Peppelenbosch, M.P.; Ferreira, C.V. (2008). "Modulation of Src activity by low molecular weight protein tyrosine phosphatase during osteoblast differentiation." Cell Physiol Biochem **22**: 497-506.
- Zambuzzi, W. F., Yano, C.L.; Cavagis, A.D.; Peppelenbosch, M.P.; Granjeiro, J.M. ; Ferreira, C.V. (2009). "Ascorbate-induced osteoblast differentiation recruits distinct MMP-inhibitors: RECK and TIMP-2." Mol. Cell. Biochem. **322**: 143-150.