

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ROBERTA REGINA RUELA DE SOUSA

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

ESTUDO POR ÓXIDO-REDUÇÃO DE UMA PROTEÍNA
TIROSINA FOSFATASE (CD45) PURIFICADA DE
MEMBRANA DE LINFÓCITOS HUMANOS

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular na Área de Bioquímica.

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a)
ROBERTA REGINA RUELA DE SOUSA
e aprovada pela Comissão Julgadora.
Hiroshi Aoyama

ORIENTADOR
Prof. Dr. Hiroshi Aoyama
Depto. Bioquímica - IB
UNICAMP

Campinas -SP
2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOLÓGICA
UNICAMP

UNIDADE	IB
Nº CHAMADA	So85e / UNICAMP
V	EX
TOMBO BC	69403
PROC	6.23.06
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	27/11/06

Indicador 380168

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

So85e

Sousa, Roberta Regina Ruela de
Estudo por óxido-redução de uma proteína tirosina fosfatase (CD45) purificada de membrana de linfócitos humanos / Roberta Regina Ruela de Sousa. – Campinas, SP: [s.n.], 2005.

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

1. Linfócitos. 2. Proteína tirosina fosfatase. 3. Proteínas - Purificação. 4. Reação de oxidação-redução. I. Aoyama, Hiroshi. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Oxide-reduction studies of a protein tyroside phosphatase (CD45) purified from human lymphocytes membranes.

Palavras-chave em inglês: Lymphocytes, Protein-tyrosine phosphatase, Proteins – Purification, Oxidation-reduction reaction.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

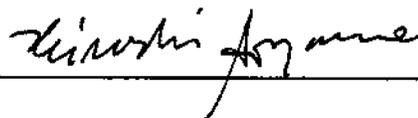
Banca examinadora: Hiroshi Aoyama, Marcio Alberto Torsoni, José Luiz Donato.

Data da defesa: 28/06/2005.

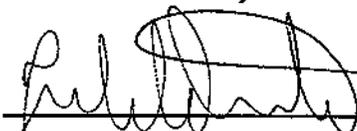
Data da defesa: 12/08/2005

Banca Examinadora

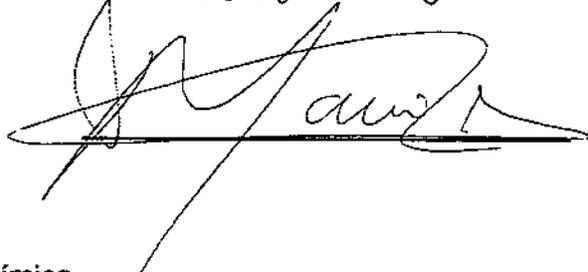
Prof. Dr. Hiroshi Aoyama (Orientador)
UNICAMP - Instituto de Biologia - Dep. Bioquímica



Prof. Dr. José Luiz Donato
UNICAMP - FCM - Dep. Farmacologia



Prof. Dr. Márcio Alberto Torsoni
Universidade Braz Cubas - Moji das Cruzes



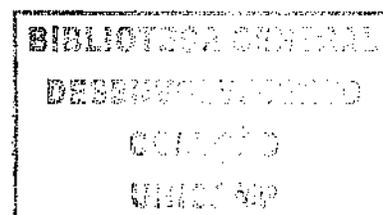
Prof. Dr. José Camillo Novello
UNICAMP - Instituto de Biologia - Dep. Bioquímica



Prof. Dr. Armindo Antonio Alves
UNIARARAS - Centro Univ. Herminio Ometto



200616348



Agradeço a Deus por mais essa vida, uma oportunidade para corrigir meus erros, aprender com eles, crescer e evoluir.

Obrigada pela força, saúde e sabedoria para superar os momentos de tempestades de minha vida. Hoje aprendi que tudo que está fora do meu controle é o melhor para mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Lucelia, por ter permitido que eu viesse a esse mundo e por ter cuidado de mim com todo o carinho e atenção, hoje eu sei que as muitas broncas que levei foi para o meu bem. Ao meu pai, Pedro, por estar comigo, zelado pela minha educação e me ajudado a chegar onde estou. Não posso esquecer de agradecer o sangue que vocês doaram para esse trabalho, e por ter me buscado várias noites no laboratório! Aos meus irmãos, Adriano e Renan, pelas horas de descontração.

Ao Bispo, meu companheiro, confidente, amigo e namorado. Obrigada pelo carinho, atenção, pelas longas horas de conversas, pelos momentos alegres e pela paciência nos meus momentos de crises (olha que não foram poucos!).

Ao Professor Hiroshi Aoyama, uma pessoa maravilhosa, de uma atenção, sabedoria e tranqüilidade que nunca vi igual. Obrigada por ter me orientado desde a iniciação, mesmo ainda fazendo faculdade em Rio Claro, com horários escassos, por ter me ensinado, com toda a paciência e dedicação, as mais diversas dúvidas. Obrigada professor, por tudo que o senhor fez por mim, do fundo do meu coração!

A todos os meus doadores voluntários que sem o sangue de vocês este trabalho não teria saído do papel.

Ao pessoal do Hemocentro da Unicamp que estavam dispostos a me ajudar, nas inúmeras vezes que precisava de mais uma bolsa de sangue.

Ao William Grizolli, meu braço direito no laboratório, que contribui enormemente para realização deste trabalho, me ajudando a fazer extração de linfócitos, purificações, géis e muitas outras coisas.

Ao Márcio André Miranda, por ter me ensinado as muitas técnicas que utilizei neste trabalho, por ter me auxiliado nas discussões e por estar sempre disposto a me auxiliar com o FPLC. Ah, obrigada pelas informações passadas por telefone nas altas horas da madrugada!

As meninas do Laboratório de Enzimologia, Cacá, Dani e Lu minhas amigas do coração que sempre me ajudaram quando precisei! Obrigada pelas risadas, conversas, pelos momentos divertidos no laboratório, nas baladas e nos congressos!

A Érika pela amizade, pelos momentos de descontração, por ter me ajudado quando estava sozinha nas extrações. Obrigada até mesmo pelas brigas, pelos momentos difíceis, pois isso nos ajuda a crescer!

A professora Carmen Veríssima Ferreira, pelos auxílios, sugestões e paciência para me ensinar muitas coisas.

Ao pessoal do Laboratório de Biomembranas que sempre me recebia com um sorriso no rosto, quando muitas vezes precisei usar a centrífuga. Obrigado ao Márcio, sempre prestativo quando precisei dos rotores, chaves e reagentes!

Obrigado os professores que participaram da banca da qualificação, Professores Carlos Bonafé, José Camillo Novello e Paulo Granjeito pelas sugestões e correções.

A Marina e Andréia pelo auxílio e orientações nas questões burocráticas.

Aos meus familiares, que sempre acreditaram em mim e me incentivaram.

A todos os meus amigos, que mesmo longe, sei que torcem por mim. Agradeço a Gleiciani, uma grande amiga, que sempre me ajudou, principalmente no 1º ano de mestrado, quando também estagiávamos nas escolas em Rio Claro.

A Capes, pelo auxílio financeiro concedido.

A todos que fazem parte da minha vida, que auxiliam na minha caminhada!

"Cuide de seus pensamentos, pois eles se tornarão palavras
Cuide de suas palavras, pois elas se tornarão ações
Cuide de suas ações, pois elas se tornarão hábitos
Cuide de seus hábitos pois eles formarão seu caráter
Cuide de seu caráter, pois ele definirá seu destino! "

Dr. Deroni Sabbi
do livro "Sinto, Logo Existo"

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1 Linfócitos	3
1.2 Fosforilação e Desfosforilação de Proteínas	5
1.3 Fosfatases	5
1.3.1 Proteínas Tirosina Fosfatases	6
1.3.2 Modulação da Atividade das PTPs	10
1.3.3 Fosfatase de Linfócitos	11
1.4 Importância do Estado Redox	14
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAIS	17
4. MÉTODOS	17
4.1 Obtenção dos Linfócitos	18
4.2 Obtenção da Fosfatase de Membrana de Linfócitos	18
4.3 Purificação da PTP de Membrana	18
4.4 Eletroforese	19
4.5 Dosagem de proteínas totais	21
4.6 Determinação da Atividade Enzimática	21
4.7 Determinação dos Parâmetros Cinéticos (Km, V _{máx}) na Ausência e na Presença dos Agentes Oxidantes	21

4.8 Efeito de Agentes Oxidantes na Atividade da Enzima	22
4.9 Estudos de Reversibilidade e Proteção dos Antioxidantes	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 Purificação	23
5.2 Caracterização da PTP Purificada	32
5.3 Estudos de óxido-redução da PTP de Linfócitos Humanos <u>parcialmente</u> Purificada	40
5.4 Estudos de óxido-redução da PTP (CD45) de linfócitos humanos <u>purificada</u>	45
6. CONCLUSÃO	55
7. DIFICULDADES ENCONTRADAS	56
8. PERSPECTIVAS	57
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Linfócitos e suas respectivas funções no sistema imunológico	4
Figura 2. Esquema do mecanismo de catálise de uma PTP.....	8
Figura 3. Esquema do sítio catalítico de uma PTP.....	9
Figura 4. Esquema das estruturas de duas isoformas da CD45	13
Figura 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (SDS-PAGE 5%) de proteínas de linfócitos humanos.....	24
Figura 6. Cromatografia de troca iônica da fração de membrana de linfócitos humanos	25
Figura 7. Cromatografia de exclusão molecular do segundo pico de proteínas eluído da cromatografia de troca iônica	28
Figura 8. Eletroforese SDS-PAGE das proteínas eluídas da cromatografia de exclusão molecular	29
Figura 9. Eletroforese SDS-PAGE das frações obtidas na purificação de PTP de membranas de linfócitos humanos	31
Figura 10. Eletroforese bidimensional do extrato bruto de linfócitos	33
Figura 11. Eletroforese bidimensional da fração obtida da cromatografia Superdex S-200	34
Figura 12. Atividade da PTP de linfócitos sobre diferentes substratos	37
Figura 13. Determinação dos parâmetros cinéticos para a PTP de membrana de linfócitos.....	38
Figura 14. Efeito de potenciais inibidores sobre a atividade da PTP de membranas de linfócitos	39
Figura 15. Efeito do tempo de exposição da PTP parcialmente purificada à ação do H ₂ O ₂	41
Figura 16. Efeito do tempo de exposição da enzima parcialmente purificada à ação do t-butil hidroperóxido..	42

Figura 17. Efeito de GSH na atividade da PTP <i>parcialmente</i> purificada	43
Figura 18. Efeito da desferroxamina e GSH na atividade da PTP <i>parcialmente</i> purificada.....	44
Figura 19. Efeito do t-butil hidroperóxido sobre a atividade enzimática da CD45.....	46
Figura 20. Efeito do peróxido de hidrogênio na atividade da CD45	47
Figura 21. Efeito dos agentes antioxidantes, ácido ascórbico e GSH, na atividade enzimática da CD45	50
Figura 22. Efeito da desferroxamina e GSH na atividade enzimática da CD45 tratada com H ₂ O ₂	51
Figura 23. Efeito da desferroxamina e GSH na atividade da tratada com t-butil hidroperóxido	52
Figura 24. Esquema sobre oxidação de PTP.....	53
Figura 25. Estudo da pré-incubação da CD45 com H ₂ O ₂	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito de compostos sobre a atividade fosfatásica dos três picos eluídos na cromatografia de troca iônica DEAE Sepharose	26
Tabela 2. Tabela de purificação da PTP de membranas de linfócitos humanos.....	30
Tabela 3. Características das PTPs de membrana de linfócitos humanos.....	35

RESUMO

As proteínas tirosina fosfatases (PTP) (EC 3.1.3.48) são enzimas regulatórias chaves que participam na transdução de sinal e são essenciais na regulação do crescimento, diferenciação, ciclos celulares, na transcrição gênica, resposta imune e outros processos. Esta classe de enzimas, que contém cisteína no sítio ativo, pode ser inativada por agentes oxidantes. Neste trabalho, estudamos os efeitos de peróxido de hidrogênio e t-butil hidroperóxido, compostos que induzem estresse oxidativo, na atividade de uma PTP purificada de membranas de linfócitos humanos, indicativamente a CD45.

A PTP foi purificada de membranas de linfócitos humanos através de cromatografias de troca iônica (DEAE Sepharose) e exclusão molecular (Sephacryl S-200). A purificação enzimática foi acompanhada por SDS-PAGE e eletroforese bidimensional. A atividade enzimática foi determinada através de incubação a 37°C por 30 min em pH 5,0 em presença de 5 mM de p-nitrofenil fosfato (pNPP) como substrato. A enzima obtida da cromatografia de exclusão molecular apresentou uma massa molecular relativa de aproximadamente 200 kDa, reconheceu mais eficientemente tirosina fosfato (cerca de 3,2 vezes) como substrato quando comparado ao pNPP, e foi inibida por inibidores específicos de PTP, tais como vanadato (40%), pervanadato (100%), p-cloromercuribenzoato (20%) and Cu^{2+} (95%). Ácido okadáico, um inibidor específico de serina e treonina proteína fosfatases, não afetou a atividade da PTP de membranas de linfócitos. Estes resultados de caracterização sugerem fortemente que a PTP purificada de membranas de linfócitos humanos é a CD45. Peróxido de hidrogênio e t-butil hidroperóxido inibiram a atividade dessa proteína com valores de IC_{50} (concentração do composto que produz 50% de inibição enzimática) de 50 μM e 16 mM, respectivamente. Glutathione reduzida (GSH) protegeu parcialmente a enzima contra estes oxidantes, porém proteções totais foram obtidas quando se adicionava 250 μM de desferoxamina ao meio de ensaio. Nossos resultados sugerem que essa proteína pode ser regulada por alteração do estado de oxidação dos grupos funcionais do sítio ativo e que esta regulação poderia fornecer um mecanismo de controle celular através de espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

Protein phosphatases, that dephosphorylate proteins in residues of threonine, serine and tyrosine, are a class of enzymes that can be stressed by compounds present in oxidant or reductant environments. In particular, the protein tyrosine phosphatases (PTP) (EC 3.1.3.48) are key regulatory enzymes that participate in signal transduction and are essential for regulating cellular growth, differentiation, cell cycle, gene transcription, immune response and other processes. This class of enzymes, which contain cysteine in the active site, can be inactivated by oxidant reagents. In this work we have studied the effect of hydrogen peroxide and t-butyl hydroperoxide, compounds that induce oxidative stress, on a purified PTP (CD45) from membrane human lymphocytes.

PTP was purified from human lymphocyte membranes through ion exchange (DEAE Sepharose) and molecular exclusion (Sephacryl S-200) chromatographies. The enzyme purification was followed by SDS-PAGE and 2D electrophoresis. The enzyme activity was determined by incubation at 37°C for 30 minutes at pH 5.0 in presence of 5 mM p-nitrophenylphosphate (pNPP) as substrate. The enzyme obtained from molecular exclusion chromatography had a relative molecular mass of approximately 200 kDa, recognized more efficiently tyrosine phosphate (about 3.2-fold) as substrate when compared with p-NPP, and was inhibited by specific PTP inhibitors, such as, vanadate (40%), pervanadate (100%), p-chloromercuribenzoate (20%) and Cu²⁺ (95%). Okadaic acid, a specific serine and threonine protein phosphatases inhibitor, did not significantly affect the lymphocyte membrane PTP activity. These characterization results strongly suggest that the membrane PTP purified from human lymphocytes was the CD45. Hydrogen peroxide and t-butyl hydroperoxide inhibited the CD45 activities with IC₅₀ (concentration of compound that produces 50% enzyme inhibition) values of 50 μM and 16 mM, respectively. Reduced glutathione (GSH) partially protected the enzyme against these oxidations, but full protections were observed when 250 μM deferoxamine were added to the assay medium. Our results suggest that CD45 can be regulated by altering the oxidation state of active site functional groups, and that this regulation could provide a mechanism of cell control by reactive oxygen species.

1. INTRODUÇÃO

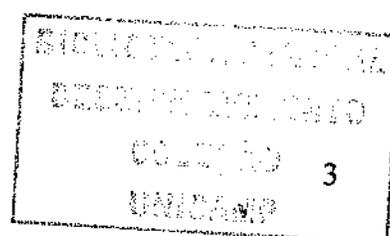
1.1 Linfócitos

Linfócitos são células do sistema imune presentes tanto na circulação sanguínea quanto na linfática, sendo capazes de transitar pelos tecidos. Reconhecem e respondem a uma grande variedade de antígenos e por isso são mediadores da resposta imune.

Os linfócitos consistem de subclasses distintas, que possuem diferentes funções. Os linfócitos B reconhecem antígenos extracelulares tão bem quanto antígenos na superfície da célula e se diferenciam em células secretoras de imunoglobulinas, assim, funcionando como mediadores da resposta imune humoral.

Os linfócitos T são divididos em populações funcionalmente distintas, as células T *helper* e T citotóxico. Ambos reconhecem e respondem a antígenos ligados ao complexo de histocompatibilidade (MHC) na superfície de outras células. Em resposta à estimulação ao antígeno, as células T *helper* secretam citocinas que estimulam a proliferação e diferenciação das células T, células B, macrófagos e outros leucócitos. Linfócitos T citotóxicos lisam células que expressam antígenos, como por exemplo, células infectadas por vírus ou bactérias. Alguns linfócitos, denominados T supressores, têm a função de inibir o sistema imune. Uma terceira classe de linfócitos são as células *Natural Killer* (NK), que estão envolvidas na imunidade inata contra vírus e microrganismos intracelulares.

Os precursores dos linfócitos surgem na medula óssea das mesmas células-tronco pluripotentes que dão origem às demais células sanguíneas. Algumas células da medula óssea se tornam comprometidas a progenitores linfóides que darão origem às células B, T e NK. A maturação das células B acontece no fígado fetal, e após o nascimento, na medula óssea. As células T deixam a medula e vão até o timo onde completam sua maturação. Destes órgãos, os linfócitos, através da circulação sanguínea, migram para os órgãos linfóides periféricos (ou secundários) onde se proliferam e se diferenciam de acordo com antígeno específico. Dentre os principais órgãos linfóides secundários estão o baço, as tonsilas, os linfonodos, as adenóides, o apêndice e as Placas de Peyer.



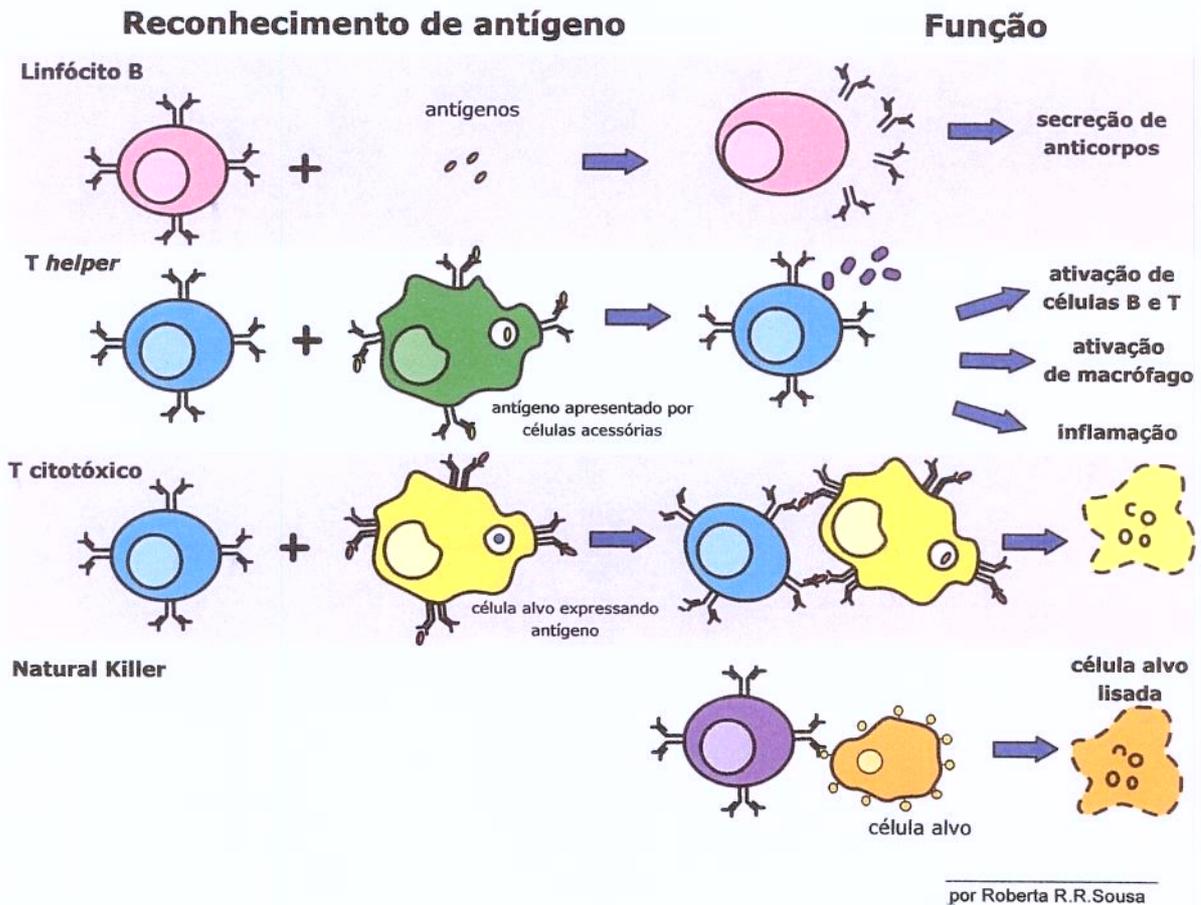


Figura 1. Linfócitos e suas respectivas funções no sistema imunológico.

Linfócitos T em desenvolvimento não apresentam receptores de célula T (TCRs), nem CD4 ou CD8, proteínas transmembranas que caracterizam o linfócito T *helper* (CD4⁺) e citotóxico (CD8⁺), respectivamente. Os TCRs, juntamente com outras subunidades denominadas CD3, participam da ativação de células T em resposta à presença de um antígeno, hormônio ou qualquer outro efector.

Os linfócitos são responsáveis pela produção de diversas substâncias, dentre elas, mediadores inflamatórios como as citocinas (peptídeos solúveis secretados por uma variedade de células). Estas incluem os interferons (INF- α , β e γ) e interleucinas (IL) (Wallace and Keast, 1992; Yassad *et al.*, 1997).

1.2 Fosforilação e desfosforilação de proteínas

A fosforilação de proteínas, catalisada por proteínas quinases, é uma modificação pós traducional muito comum utilizada para a regulação de diversos processos importantes para a vida celular (Mustelin *et al.*, 2004). O processo antagônico de desfosforilação de proteínas, catalisado por proteína fosfatases, é importante para manter o nível adequado de proteínas fosforiladas. Em particular, a fosforilação e desfosforilação de resíduos de serina, treonina e tirosina em proteínas têm emergido como evento chave na regulação da divisão, diferenciação, desenvolvimento celular e apoptose, regulação do metabolismo e expressão gênica, contração, transporte, locomoção celular, aprendizado e memória (Johnson and Barford, 1993; Trowbridge, 1991; Denu *et al.*, 1996; Harrison *et al.*, 1999; Zhang, 2001). Acredita-se que 30% das proteínas intracelulares sejam fosfoproteínas e que cerca de 4% do genoma eucariótico codifique proteínas quinases e fosfatases, o que confirma a importância destas duas classes de enzimas (Jia, 1997).

As atividades das enzimas quinases e fosfatases são cuidadosa e fortemente reguladas *in vivo*. Níveis inadequados na atividade dessas enzimas podem proporcionar conseqüências graves que incluem neoplasias, diabetes, inflamação e doenças resultantes de defeitos imunológicos (Harrison *et al.*, 1999; Alexander, 2000, Zhang, 2002; Schade and Levine, 2003).

1.3 Fosfatases

As fosfatases (ortofosfato monoéster fosfohidrolases – E.C.3.1.3.2) são enzimas da classe das hidrolases que catalisam a desfosforilação de monoésteres de fosfatos (Hollander, 1971). enzimas podem ser divididas em três grupos: proteínas fosfatases, fosfatases ácidas e fosfatases alcalinas (Jia, 1997; Bernier & Wang, 1995). Estas hidrolases estão amplamente distribuídas nos diferentes tecidos (Duff *et al.*, 1994; Ferreira *et al.*, 1999) e compartimentos celulares (Lee, 1988).

As **fosfatases ácidas** apresentam um pH ótimo para catálise em torno de 5,0 e utilizam como substratos compostos com baixa massa molecular, como por exemplo, açúcares e álcoois fosforilados. Estas enzimas estão amplamente distribuídas em vertebrados (Granjeiro *et al.*, 1997; Buzalaf *et al.*, 1998), plantas (Duff *et al.*, 1994, Ferreira *et al.*, 1998; Granjeiro *et al.*, 1999) e microorganismos (Moulay and Robertgero, 1995; Gonzalez

et al., 1993). Alguns tecidos contêm mais de um tipo de fosfatase ácida, diferindo na massa molecular, localização nas células, especificidade por substratos e sensibilidade a inibidores (Vincent *et al.*, 1992). No sangue, esta enzima pode ser encontrada nos eritrócitos, leucócitos, plasma, onde algumas vezes é utilizada como meio de diagnóstico para algumas doenças (Granjeiro, 1994; Ben-Arie *et al.*, 1999). Estudos citoquímicos revelaram a presença desta enzima em diferentes locais da célula como núcleo, mitocôndrias, membranas, lisossomo, Complexo de Golgi e retículo endoplasmático (Lee, 1988). Alguns tecidos contêm mais de um tipo de fosfatase ácida, diferindo na massa molecular, localização nas células, especificidade por substratos e sensibilidade a inibidores (Vincent *et al.*, 1992). Fosfatases ácidas de mamíferos são classificadas de acordo com sua massa molecular relativa (Mr) em alta Mr (acima de 100 kDa), intermediária Mr (20 a 100 kDa), e baixa Mr (abaixo de 20 kDa), e são inibidas, respectivamente, por tartarato, fluoreto e *p*-cloromercuribenzoato. As fosfatases de alta e intermediária Mr podem apresentar em suas estruturas ferro, zinco ou magnésio e carboidratos (Granjeiro *et al.*, 1997).

As **proteínas fosfatases** (PPs) hidrolisam proteínas fosforiladas em resíduos de serina/treonina e/ou tirosina, sendo denominadas proteína Ser/Thr fosfatases e proteína tirosina fosfatases (PTP), respectivamente (Jia, 1997; Harrison *et al.*, 1999, Wang *et al.*, 1999). As primeiras são inibidas especificamente pelo ácido okadáico, e as últimas pelo vanadato. A importância das proteínas fosfatases se deve a sua participação em processos como arranjo de microtúbulos, crescimento, diferenciação e proliferação celular, uma vez que as mesmas podem regular a atividade de outras enzimas por desfosforilação de resíduos de serina, treonina e tirosina (Garcia *et al.*, 2003; Alonso *et al.*, 2004).

1.3.1 Proteínas Tirosina Fosfatases

As PTPs são uma família estruturalmente diversa, compreendendo receptores com a habilidade de transmitir sinais diretamente através da membrana e enzimas citoplasmáticas que agem tanto positiva como negativamente no controle da função celular (Walton and Dixon, 1993; Harrison *et al.*, 1999; Preneta *et al.*, 2002; Aoyama *et al.*, 2003, Zhang, 2003; Stoker, 2005) como crescimento e diferenciação celular, metabolismo, ciclo celular, comunicação célula-célula, migração celular, reposta imune, transcrição gênica, canais de íons e sobrevivência. Fosforilação anormal de tirosina está associada a muitas doenças humanas, incluindo câncer, diabetes, artrite reumática e hipertensão (Zhang, 2001).

O genoma humano codifica relativamente poucas serina/treonina fosfatases específicas, mas pelo menos 107 genes que codificam enzimas da família das tirosina fosfatases foram identificadas, sendo que 20 são enzimas tipo-receptor com um ou dois domínios catalíticos na porção intracelular (Mustelin *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 2004).

Com base na função, estrutura e seqüência, as proteínas tirosina fosfatases podem ser agrupadas em quatro famílias principais: proteínas tirosina fosfatases específicas, proteínas fosfatases cdc25, proteínas fosfatases de especificidade dual e proteínas fosfatases de baixa massa molecular (Wang *et al.*, 2003; Pills and Schultz, 2004).

A. Proteínas Tirosina Fosfatases Específicas hidrolisam apenas proteínas contendo resíduos de tirosina fosforilados. Apresentam alta massa molecular relativa. Todas apresentam um domínio catalítico de aproximadamente 240 resíduos de aminoácidos, dos quais 71 são altamente conservados. Podem ser divididas em dois grupos: PTPs tipo receptores (RPTPs) e intracelulares (Neel and Tonks, 1997; Li and Dixon, 2000; Zhang, 2001). PTPs tipo receptores, exemplificadas pelas CD45 e PTP α , são enzimas modulares, consistindo geralmente de uma única região transmembrana, um ou dois domínios PTP citoplasmáticos e um domínio extracelular, semelhante à fibronectina, o qual se liga a efetores extracelulares. Portanto, estas fosfatases estão envolvidas na comunicação célula-célula e transdução de sinal (Hertog, 1999; Alexander, 2000).

B. Proteínas Fosfatases com Dupla Especificidade (dual), como por exemplo, tipo VH1, cdc25, MAP-1, são capazes de hidrolisar tanto proteínas com fosfotirosinas como proteínas com fosfoserina ou fosfotreonina, possuindo mais afinidade por fosfotirosina. Esta característica dual parece estar associada à menor profundidade do sítio ativo de aproximadamente 6 Å nas PTPs de especificidade dual e 9 Å nas PTPs específicas (Zhang, 2001).

Algumas ainda hidrolisam outros substratos tais como flavina mononucleotídeo (FMN) e açúcares fosforilados (Granjeiro *et al.*, 1997a), no entanto, a especificidade desta fosfatase por resíduos de aminoácidos é maior (Takagi *et al.*, 1997; Maehama and Dixon, 1998; Zhang, 2001). Estas fosfatases apresentam importante papel na regulação da transdução de sinal mitogênico e controlam o ciclo celular (Wu and Sun, 1999).

C. Fosfatases Cdc25 são enzimas reguladas por fosforilação, exibem especificidade dual e estão relacionadas com o controle da divisão celular. (Zhang *et al.*, 2002; Zhang,

2003). Existem três *cdc25* específicas (A, B e C), que colaboram para o controle de diferentes pontos de checagem no ciclo celular.

Apesar das *cdc25* também apresentarem dupla especificidade, a seqüência de seu sítio ativo é muito diferente da família tipo VH1 e são classificadas numa subfamília separada por serem mais distantemente relacionadas aos demais membros da família das PTPs, tanto com relação à estrutura primária quanto terciária.

D. Proteínas Tirosina Fosfatases de Baixa Massa Molecular Relativa (~20KDa) não compartilham nenhuma homologia com qualquer outra PTP, exceto pelo padrão de resíduos do sítio ativo e pelo mecanismo de catálise. Hidrolisam resíduos de tirosina fosforilados e possuem um importante papel na regulação da proliferação celular (Zhang, 2001; Raugei *et al.*, 2002). A alta expressão destas enzimas inibe a proliferação de células normais e transformadas (Harrison *et al.*, 1999).

Todas as PTPs, incluindo aquelas que desfosforilam inositol D3-fosfolípidos (Maherna and Dixon, 1998) ou RNA, usam o mesmo mecanismo catalítico baseado na cisteína. Um intermediário fosfo-cistenil é formado e hidrolizado com a ajuda de um ácido aspártico que age como uma base geral (Mustelin, 2004) (figura 2). A especificidade restrita para fosfotirosina em PTP é devido à alça catalítica de 9Å de profundidade (Barford *et al.*, 1999) (figura 3).

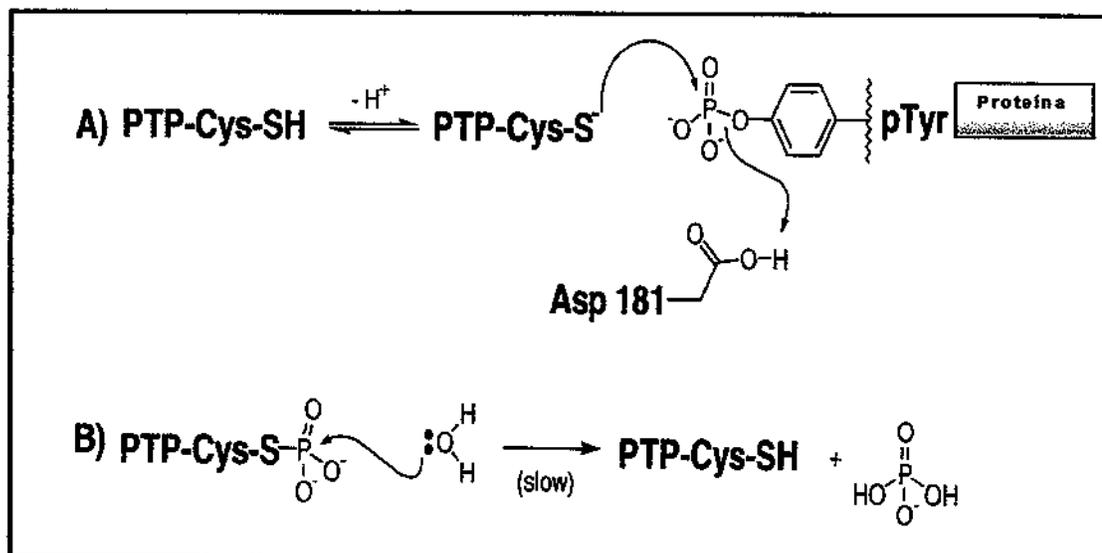


Figura 2. Esquema do mecanismo de catálise de uma PTP.

A presença de cisteína no sítio ativo é responsável pela característica comum das proteínas tirosinas fosfatases de serem inibidas especificamente pelo vanadato, pervanadato, p-cloromercuribenzoato e outros agentes oxidantes (Tonks and Neel, 1996; Tsiani and Fantus, 1997; Jin *et al.*, 2000). Todas PTPs são caracterizadas pela sensibilidade ao vanadato, habilidade de hidrolisar p-nitrofenolfosfato, insensibilidade ao ácido okadáico e não precisar de íons metálicos para catálise.

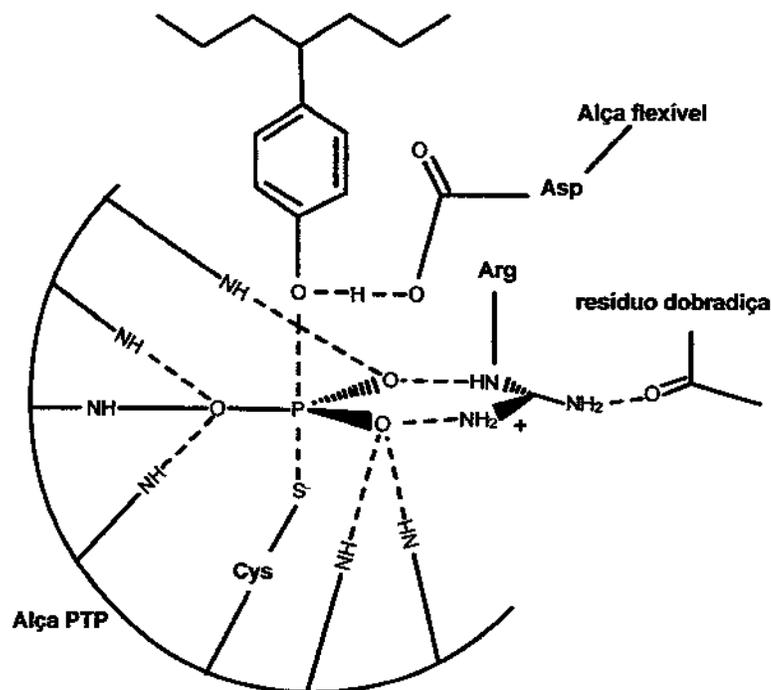


Figura 3. Esquema do sítio catalítico de uma PTP. O loop consiste de resíduos de aminoácidos que compõe a seqüência assinatura [I/V]H[C]XAGXXR[S/T]G onde: I - Ile, V- Val, H- His, C- Cys, A- Ala, G- Gly, R- Arg, S- Ser, T- Thr e X - qualquer aminoácido.

1.3.2 Modulação da atividade das PTPs

Modulação por Fosforilação

Um mecanismo geral da regulação da atividade de PTPs é através da fosforilação. A fosforilação de resíduos de serina/treonina específicos dos domínios não catalíticos podem regular as PTPs de modo negativo ou positivo. Para várias PTPs, incluindo PTP-1B e SHP-1, a ativação pela fosforilação já foi descrita (Östman and Böhmer, 2001).

Modulação por Dimerização

As PTPs tipo receptor (RPTP) podem ser reguladas por dimerização. A primeira evidência de dimerização como um mecanismo regulatório para atividade de RPTP veio de estudos com uma proteína quimérica consistindo de uma porção extracelular de receptor de crescimento epidermal (EGFR) e um domínio intracelular do RPTP, CD45. A dimerização induzida por ligantes EGFR/CD45 levava à inativação funcional da CD45, sugerindo que a dimerização inibe a atividade da CD45 (Desai *et al.*, 1993).

Recentemente, Blanchetot e colaboradores (2002) mostraram que a dimerização de RPTP era regulada por oxidação e os dímeros de RPTPs eram estabilizados por estresse oxidativo.

Modulação Química

No mecanismo de ativação de uma PTP de baixa massa molecular relativa, Wang e colaboradores (2000) mostraram que uma molécula de água participava do sítio ativo da enzima. Em nosso laboratório, realizamos um estudo detalhado com compostos purínicos e observamos efeitos diferenciados de adenina, guanina e ácido úrico na atividade de uma PTP de rim bovino (Granjeiro *et al.*, 2002). Observamos ainda que a inativação desta PTP por surfactantes aniônicos envolvia tanto interações eletrostáticas como hidrofóbicas (Granjeiro *et al.*, 2004). Avaliamos também o efeito dos flavonóides quercetina e morina, que apresentaram efeitos antagônicos sobre a atividade da mesma enzima (Miranda *et al.*, 2005).

Modulação por Óxido-Redução

A oxidação reversível de PTP é um mecanismo de regulação da atividade desta enzima. Oxidação da cisteína do sítio catalítico bloqueia a capacidade dessas enzimas de desfosforilar seus alvos, visto que a catálise é mediada pela transferência de grupos fosfatos

do substrato a cisteína do sítio ativo, seguida pela rápida hidrólise do fosfato. Em geral, oxidação do resíduo de cisteína a ácido sulfênico é reversível, enquanto a oxidação a ácido sulfônico e ácido sulfínico são irreversíveis.

Diferentes PTPs podem ser inibidas através da irradiação UV em células intactas. A geração de espécies reativas de oxigênio induzida por UV e subsequente oxidação reversível de PTPs foi proposta como um mecanismo de regulação da atividade (Östman and Böhmer, 2001).

1.3.3 Fosfatase de Linfócitos

Os leucócitos expressam uma grande variedade de proteínas fosfatásicas citosólicas e transmembrana (Palou *et al.*, 1997). Os linfócitos T apresentam pelo menos dois tipos de proteína fosfatases características: uma PTP tipo receptor presente na membrana, e uma proteína Ser/Thr fosfatase citoplasmática (calcineurina ou PP2B), as quais apresentam importante papel na transdução de sinal culminando com a produção de IL-2, que é uma importante citocina na proliferação dos linfócitos (Yakura, 1997).

Brito e colaboradores (2005) descreveram a importância das proteínas fosfatases CD45 e PP2B nos linfócitos humanos. Alguns autores mostraram que as PTPs presentes na membrana de linfócitos são CD45 e CD148, com as suas respectivas isoformas, sendo a CD45 a mais expressa (Palou *et al.*, 1997 e Sasaki *et al.*, 2001).

CD148

A CD148, também conhecida por DEP-1, foi definida durante o VI Internacional Workshop on Lymphocyte Differentiation Antigens por Schraven e colaboradores (1997). No mesmo ano, Palou e colaboradores identificaram a CD148 como PTP transmembrana do tipo III e Autschbach e colaboradores, em 1999, determinaram a massa molecular entre 200 e 250 kDa. A proteína apresenta uma porção extracelular composta por 8 a 10 domínios de fibronectina III, com 970 resíduos, um segmento transmembrana com 25 resíduos e uma cauda intracelular de 342 resíduos que contém um único domínio PTP. A presença de domínios de fibronectina III na porção extracelular sugere seu possível envolvimento nos processos de adesão célula-célula. Por outro lado, a existência de um domínio PTP intracelular evidencia sua participação na transdução de sinal (Palou *et al.*, 1997).

A CD148 está presente na membrana de todas as linhagens hematopoiéticas humanas, não ativadas, sendo fortemente expressa em granulócitos e monócitos/

macrófagos. É pouco expressa em linfócitos do sangue periférico, incluindo células T CD4⁺ e CD8⁺. Tangye e colaboradores (1998) demonstraram que CD148 está envolvida na ativação de células T *in vitro*, entretanto, a importância da CD148 na resposta imune *in vivo* é ainda desconhecida (Autschbach *et al.*, 1999).

CD45

A CD45, uma proteína tirosina fosfatase tipo receptor, é uma glicoproteína de massa molecular entre 180-230 kDa, expressa exclusivamente em células hematopoiéticas, exceto eritrócitos maduros e plaquetas (Sasaki *et al.*, 2001). Em células T e B ela ocupa cerca de 10% da área da superfície celular. É composta de três porções distintas: um domínio extracelular altamente variável entre as espécies, um único domínio intermembranas e uma grande região citoplasmática, contendo dois domínios, D1 e D2 (figura 4).

A CD45 existe em inúmeras isoformas, resultado de *splicings* alternativos dos éxons 4 a 6 do RNA (Trowbridge, 1991), que são geralmente denominados de A, B, C, o que levou às nomenclaturas usadas para as isoformas de CD45RABC, CD45RB, etc, onde a letra "R" simboliza "Restrito", e a letra que segue refere-se ao produto do éxon na isoforma particular. O termo "CD45R0" refere-se à isoforma em que todos os três éxons foram extraídos.

O primeiro domínio citoplasmático próximo à membrana chamado de D1 tem atividade PTP, enquanto que o segundo domínio D2 não tem atividade fosfatásica significativa devido a uma mudança crítica nos aminoácidos essenciais para a catálise. Entretanto, o domínio D2 é requerido para a propriedade de enovelamento e/ou recrutamento do substrato (Frearson and Alexander, 1996).

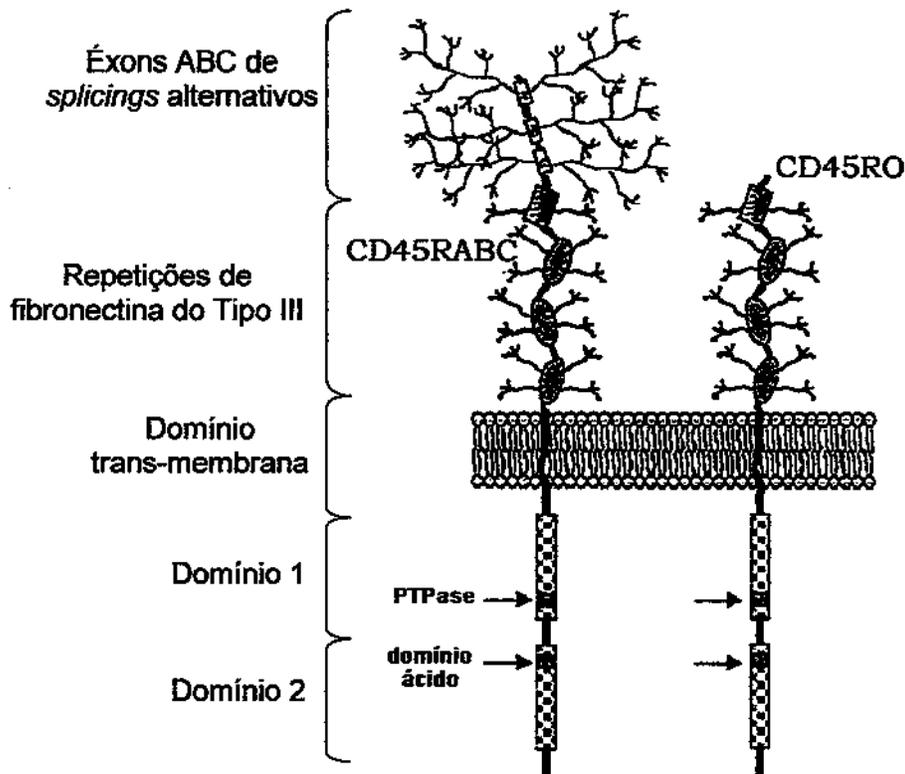


Figura 4. Esquema das estruturas de duas isoformas da CD45.

O papel principal da CD45 é regular positivamente as proteínas da família Src quinase, inicializando a sinalização através do receptor de células T (TCR) (Mustelin and Altman, 1990). Ratos e humanos com deficiência na expressão de CD45 não apresentam habilidade de responder a sinais via TCR-CD3 (Mustelin *et al.*, 2004). Entretanto, existem alguns trabalhos mostrando que a CD45 poderia desfosforilar um sítio regulatório positivo em algumas proteínas da família Src quinases, levando à inativação (D'Oro *et al.*, 1996). A CD45 poderia também ter outros substratos, como proteínas da família Jak (Irie-Sasaki *et al.*, 2001); um papel negativo na adesão mediada por integrinas (Shenoi *et al.*, 1999); e um envolvimento na mielinização do sistema nervoso central (Nakahara *et al.*, 2005).

1.4 Importância do Estado Redox

Uma definição simplificada do estado redox celular é o grau de oxidação (ou redução) de várias espécies redox ativas presentes em uma localização particular em um dado momento (Gilbert *et al.*, 1990). As principais espécies redox ativas intracelulares incluem proteínas que contêm grupos tióis e cisteínas, glutathione, nucleotídeos de pirimidina e outros metabólitos como lactato e piruvato. O estado redox celular é regulado por um grupo complexo de equilíbrio termodinâmico acoplado com reações redox e metabólitos. Realmente, uma célula eucariótica contém numerosos compartimentos com diferentes potenciais redox determinados por uma razão de espécies oxidadas/reduzidas. No contexto da regulação redox na transdução de sinal, estes fatores podem determinar o estado de oxidação dos grupos redox de enzimas de sinalização, mediando a resposta do organismo por mudança do estado redox celular, como por exemplo, anoxia e inibidores respiratórios (Chance *et al.*, 1962), jejum e diabetes (Williamson *et al.*, 1967) (Thannickal and Fanburg, 2000; Forman *et al.*, 2002; Chiarugi and Cirri, 2003; Cho *et al.*, 2004)..

Em uma maneira similar, a atividade de enzimas de sinalização podem ser afetadas por estresse oxidativo causado por elevadas concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio como os superóxidos e radicais hidroperoxil, H_2O_2 , peróxidos orgânicos, radicais hidroxil, ozônio, óxido nítrico, dióxido de nitrogênio, peróxinitrito, oxigênio singlete e ácido hipocloroso (Harvathova *et al.*, 2003; Chiarugi *et al.*, 2005; Tonks, 2005; Buhrman *et al.*, 2005). O estresse oxidativo, ou seja, o desbalanço entre a produção de EROs e defesa antioxidante, pode ser resultante do metabolismo normal (cerca de 2% do oxigênio na mitocôndria se converte em radical livre, da alteração da resposta antioxidante celular ou da ação de xenobióticos) e representa significativo papel na etiologia de pelo menos 50 tipos de doenças, incluindo o câncer. A alteração do estado redox celular provoca aumento da mutagênese e apoptose (Matés and Sánchez-Jiménez, 2000; Fréchet *et al.*, 2001; Carmody and Cotter, 2001). e embora várias macromoléculas estejam sujeitas aos ataques de radicais livres, os nucleotídeos livres e o DNA podem sofrer os efeitos deletérios primários (Allen and Tresini, 2000; Fréchet *et al.*, 2001).

A incidência de doenças relacionadas a processos cancerígenos no organismo envolvendo a formação de EROS, tais como peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil, vem merecendo especial atenção (Rover Júnior *et al.*, 2001).

Em condições fisiológicas existem vários mecanismos de defesa contra a ação dos oxidantes, tais como: enzimas (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e

glutathione redutase), moléculas contendo tióis (GSH e tioredoxina) e vitaminas (Gaté *et al.*, 1999).

Na célula, a glutathione apresenta importante papel na síntese de proteínas, transporte de aminoácidos, síntese de DNA e RNA, balanço do estado redox, controle da permeabilidade de íons na membrana plasmática e detoxificação de xenobióticos pela reação de conjugação catalisada pela glutathione transferase (Paolicchi *et al.*, 2002; Filomeni *et al.*, 2002). A glutathione (γ -L-glutamil-L-cisteína-glicina) é o mais abundante antioxidante intracelular, presente em todas as células metabolicamente ativas. Os níveis normais de glutathione reduzida em células de mamíferos estão na faixa de 0,5 a 10 mM/L (Choin *et al.*, 1997). Este tripeptídeo existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo síntese de proteínas, metabolismo e proteção celular (Meister, 1991).

Grande parte da atenção dada ao H_2O_2 é devida ao seu papel como segundo mensageiro, o que culmina na ativação de várias quinases, incluindo a família das quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e ativação do fator nuclear kappa ($NF\kappa B$) importante no controle da apoptose (Kyriakis *et al.*, 1994; Allen and Tresini, 2000; Lee, and Esselman, 2002; Torres, 2003; Foley *et al.*, 2004). Por outro lado, este agente oxidante atua como inibidor das PTPs, oxidando um resíduo de cisteína no sítio ativo essencial para catálise (figura 2), levando, portanto, a um aumento de proteínas fosforiladas em resíduos de tirosina na célula (Denu and Tanner, 1998; Allen and Tresini, 2000; Thomas and Mallis, 2001). Agentes oxidantes como H_2O_2 podem afetar a fosforilação de resíduos de tirosina pelo efeito direto ou indireto nas proteínas tirosinas quinases e fosfatases, pela ação da concentração de redutores intracelulares e aumento do fluxo através do canal de hexose monofosfato (Sullivan, *et al.*, 1994).

Diferentes PTPs podem ser inibidas através da irradiação UV em células intactas. A geração de EROs induzida por UV e subsequente oxidação reversível de PTPs foi proposta como um mecanismo de regulação da atividade (Östman and Böhmer, 2001).

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve a finalidade de purificar uma PTP de membrana de linfócitos humanos e estudar seu comportamento enzimático *in vitro* na presença de agentes oxidantes, assim como estudar a proteção da enzima por agentes antioxidantes. Assim, a presente dissertação contém os seguintes alvos:

- a) Aprimoramento de uma metodologia para purificação da PTP de membranas de linfócitos humanos;
- b) Caracterização desta enzima por métodos eletroforéticos e cinéticos.
- c) Determinação dos parâmetros cinéticos (K_m , $V_{máx}$) utilizando-se o p-nitrofenilfosfato (pNPP) como substrato;
- d) Estudos do efeito de agentes oxidantes como t-butil hidroperóxido, peróxido de hidrogênio e pervanadato, com determinação da IC_{50} (concentração da substância que inibe 50% a atividade enzimática).
- e) Estudos da possibilidade de reversão do efeito oxidativo, através do uso de agentes antioxidantes, como ácido ascórbico e glutatona reduzida, na presença e ausência de desferroxamina (quelante de ferro).

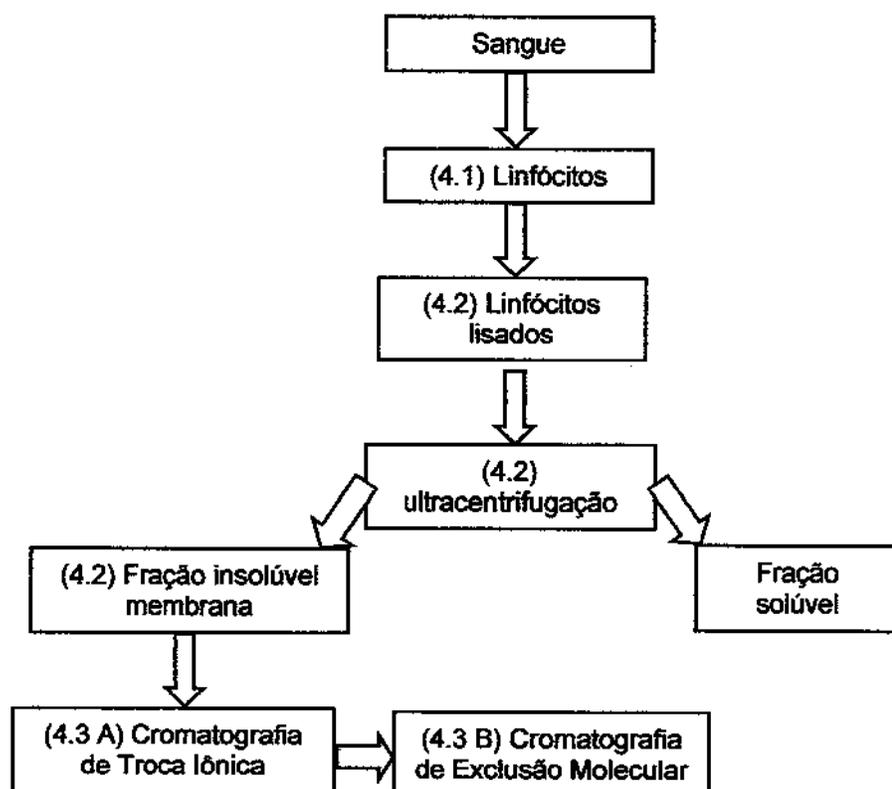
3. MATERIAIS

Os agentes oxidantes (H_2O_2 e t-butil hidroperóxido), antioxidantes (GSH, ácido ascórbico), substratos, resinas cromatográficas, marcadores de massa molecular e outros compostos específicos foram obtidos da Sigma, Merck, Amersham Biosciences e Millipore.

Os linfócitos foram obtidos de sangue de voluntários saudáveis (conforme aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP, nº 219/2000). A coleta de sangue foi realizada pelo Hemocentro da FCM – UNICAMP.

4. MÉTODOS

A obtenção da proteína purificada seguiu o seguinte fluxograma:



A proteína obtida da cromatografia de exclusão molecular foi utilizada para caracterização eletroforética, cinética e para estudos de óxido-redução.

4.1 Obtenção dos linfócitos

Através de centrifugação com gradiente, utilizando o reagente Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Biosciences), os linfócitos foram separados dos demais componentes do sangue. As células foram lavadas 3 vezes com solução salina.

4.2 Obtenção da Fosfatase de Membrana de Linfócitos

Os linfócitos obtidos pela centrifugação com gradiente foram ressuspensos em Tampão Tris-HCl pH 8,4 50 mM contendo 0,1% β -mercaptoetanol, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA e 150mM NaCl. Os linfócitos em suspensão, mantidos sob refrigeração, foram submetidos a sonicação por 3 pulsos constantes, com duração de 30 s, na potência de até 60% (Ultrassom da Sonoplus). A solução de células lisadas foi centrifugadas a 10.000 x g por 10 min, a 4°C. O precipitado, contendo células não lisadas, foi descartado e o sobrenadante resultante foi submetido à ultracentrifugação de 100.000 x g por 1 hora. O precipitado foi ressuspenso em Tampão Tris-HCl pH 8,4 50 mM contendo 0,1% β -mercaptoetanol, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl e 0,5% de Triton X-100, para solubilização das proteínas das membranas. Para auxiliar este processo, a suspensão de membranas foi submetida a uma sonicação, no mesmo equipamento citado anteriormente, com 3 pulsos constantes de 30 s de duração.

4.3 Purificação da PTP de membrana

Para purificação da proteína, foram realizadas cromatografias em sistema FPLC (Pharmacia). Para acompanhar a purificação, foram realizadas a dosagem da atividade fosfatásica, a quantificação de proteínas, por leitura a 280 nm, além de eletroforese SDS-PAGE.

A) Cromatografia de Troca Iônica

Após 12 horas sob refrigeração, o precipitado ressuspenso foi submetido à cromatografia de troca iônica, DEAE Sepharose (6 x 2,6 cm), equilibrada em Tampão Tris-HCl pH 8,4 50 mM contendo 0,1% β -mercaptoetanol, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl e 0,05% triton X-100. O fluxo foi de 1,0 mL/min. O gradiente salino variou de 0,15 - 1,0 M, com *step* em 200 mM por 5 volumes de coluna. Foram coletados 3mL por tubo.

B) Cromatografia de Exclusão Molecular

As frações eluídas da DEAE Sepharose que apresentaram atividade fosfatásica foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular, Superdex S-200 (60 x 1,5 cm), equilibrada com Tampão 50 mM Tris-HCl 50mM pH 8,4 contendo 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM fosfato, 5% glicerol, 0,01% β -mercaptoetanol e 0,05% Triton X-100. O fluxo foi de 0,3 mL/min. Foram coletados 3mL por tubo. O volume de amostra não ultrapassou 5% do volume da coluna.

4.4 Eletroforese

A) Gel SDS-PAGE

A mobilidade eletroforética em condições desnaturantes foi determinada por eletroforese em gel vertical de 5 e 7,5% de poliacrilamida e em gel de gradiente linear variando de 5 a 15% de poliacrilamida. As soluções de poliacrilamida foram preparadas em tampão Tris-HCl 0,375 M (pH 8,8) contendo 0,1% de SDS e polimerizadas em placas (16,0 X 18,0 cm). Para formar o gradiente linear, as soluções de 5 e 15% de acrilamida foram misturadas de maneira a formar o gradiente. Os dois compartimentos da cuba SE 600 (Amersham Biosciences), foram preenchidos com o tampão de corrida (0,192 M de glicina, 25 mM de Tris-HCl (pH 8,3) e 0,1% SDS,).

As amostras para a corrida (50 μ g de proteína) foram preparadas tomando-se 1 volume de cada amostra e 1 volume do tampão de amostra (10% de glicerol, 4% SDS, 0,08% do tampão Tris-HCl 1M (pH 6,8) e 2 gotas do azul de bromofenol 0,2%). A corrida eletroforética foi realizada durante 5h a 120V. O azul de bromofenol foi utilizado como marcador da corrida.

As proteínas utilizadas como marcadores de baixa massa molecular foram fosforilase b (94kDa), soroalbumina bovina (BSA) (67kDa), ovalbumina (42kDa), anidrase carbônica (30kDa), inibidor de tripsina de soja (20kDa) e α -lactalbumina (14,4kDa) e as utilizadas como marcadores de alta massa molecular foram tiroglobulina (669kDa), ferritina (440kDa), catalase (232kDa), lactato desidrogenase (140kDa) e BSA (67kDa).

A coloração do gel foi realizada durante 12 horas com uma solução contendo 0,025% de "Coomassie Brilliant Blue R250" em 40% de metanol e 7% de ácido acético glacial em água. A descoloração foi obtida após lavagens sucessivas em uma solução contendo 7% de ácido acético glacial, 40% de metanol em água deionizada. Os géis foram armazenados em 50% de glicerol em água.

B) Eletroforese de duas dimensões em gel de Poliacrilamida (2D)

Focalização Isoelétrica (Primeira Dimensão)

As amostras de proteínas foram precipitadas em 10% ácido tricloroacético (TCA) em acetona por 30 min a -20°C , e em seguida centrifugadas a 10.000xg por 10 min. As proteínas precipitadas foram solubilizadas em 250 μL de solução de re-hidratação (DeStreak Rehydration Solution) na qual foi adicionado 5 μl dos anfólitos (IPG buffer, pH 3-10).

A solução de re-hidratação contendo a amostra e IPG Buffer foi colocada na canaleta (*strip holder*), juntamente com a fita (*Immobiline strip*), e recoberta com 1,0 mL de óleo mineral (*Fluid Cover*) para evitar a evaporação dos reagentes durante a re-hidratação. As fitas IPG de 13 cm, com gradiente linear de pH 3-10, foram re-hidratadas no equipamento para a focalização isoelétrica (*IPGphor*) durante 12 horas, à temperatura ambiente, sendo que nas 5 horas finais foi aplicado 500V.

No primeiro estágio de focalização isoelétrica foi utilizado 500V até atingir 0,5 kWh; no segundo estágio, 1000V até 1 kWh; no terceiro estágio, 8000V até 14,5 kWh e 500V até atingir 20kWh totais. Depois da focalização isoelétrica as fitas IPG foram equilibradas em duas soluções redutoras de pontes de dissulfeto. A primeira solução de equilíbrio era composta por 50 mM Tris-HCl (pH 8,8), contendo 6 M uréia, 30% (v/v) glicerol, 2% SDS, 2% DTT e 0,002% azul de bromofenol. A segunda solução possuía 2,5% ácido iodoacético no lugar no DTT (Görg *et al.*, 1987). As fitas foram equilibradas por 15 minutos em cada solução.

SDS-PAGE (Segunda Dimensão)

Depois de equilibradas, as fitas IPG foram colocadas sobre o gel da segunda dimensão SDS PAGE (item 4.4 A) e cobertas com uma solução 0,5% de agarose em tampão Tris-glicina (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina e 0,1% SDS) contendo 0,002% de azul de bromofenol.

A separação eletroforética das proteínas foi feita à temperatura ambiente em cuba SE 600 (Amersham Biosciences). Na primeira etapa, foram aplicados 90V fixos durante 30 minutos. Na segunda etapa, 25 mA por gel e 120V durante, aproximadamente 5 horas.

A coloração do gel foi realizada com uma solução 0,025% de "Coomassie Brilliant Blue R250" como descrito anteriormente no item 4.4 A.

4.5 Dosagem de proteínas totais

A proteína foi quantificada pelo método de Bradford (1976), utilizando a albumina de soro bovino como padrão. A reação foi iniciada pela adição de 0,4 mL do reagente de Bradford, adquirido da BioRad, a 0,05 mL da amostra em 1,55 mL de água. Após 5 min, a leitura da absorbância foi feita a 595 nm.

4.6 Determinação da Atividade Enzimática

A) Por formação de p-nitrofenol

A atividade enzimática foi determinada através da formação do p-nitrofenol, utilizando-se p-nitrofenil fosfato (p-NPP) como substrato. Para um volume final de 1,0 mL, a mistura de incubação continha 100 mM de tampão acetato de sódio (pH 5,0) e 5,0 mM de p-NPP. Após adição da enzima, incubou-se por 40 min à 37°C e a reação foi paralisada pela adição de 1,0 mL de NaOH 1,0 M. A formação do p-nitrofenol, que em meio alcalino apresenta coloração amarelada, foi determinada espectrofotometricamente pela leitura da absorbância à 405 nm, tomando-se o valor de $18.400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ como coeficiente de extinção molar do p-nitrofenóxido (Chaimovich and Nome, 1970). Uma unidade enzimática (UE) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de p-nitrofenol por minuto. A atividade específica (AE) é dada pela relação UE/ mg de proteína.

B) Por formação do fosfato inorgânico

Em alguns casos, a atividade enzimática foi determinada através da quantificação do fosfato inorgânico produzido durante a hidrólise do substrato (p-NPP), como descrito por Sumner (1944). A mistura de incubação foi a mesma descrita no item anterior. A paralisação ocorreu pela adição de 0,5 mL de ácido sulfúrico 0,25 M. A coloração foi desenvolvida pela adição de 1,0 mL de molibdato de amônio 2,5% (em ácido sulfúrico 2,0 M) e posterior adição de sulfato ferroso 10%, como redutor. Após 30 min à temperatura ambiente, o produto formado, azul de molibdênio, foi determinado pela medida da absorbância a 700nm (coeficiente de extinção molar de $4.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.7 Determinação dos Parâmetros Cinéticos (K_m , $V_{m\acute{a}x}$) na ausência e na presença dos agentes oxidantes.

Os parâmetros cinéticos, K_m e $V_{m\acute{a}x}$, foram determinados através do ajuste da curva ($V \times [S]$) utilizando o modelo da hipérbole retangular.

4.8 Efeito de agentes oxidantes na atividade da enzima

A atividade enzimática foi determinada utilizando-se p-NPP como substrato, de acordo com os métodos acima descritos. Foram analisados os efeitos dos agentes pervanadato, H₂O₂ e t-butil hidroperóxido.

4.9 Estudos de reversibilidade e proteção dos antioxidantes.

Foram analisados os efeitos reversíveis e de proteção dos agentes antioxidantes glutatona, ácido ascórbico (Método 4.5 A) e flavonóides (Método 4.5 C). A atividade enzimática foi determinada na presença dos agentes oxidantes na concentração de IC₅₀ (concentração do composto que inibe em 50% a atividade enzimática) e em diferentes concentrações dos possíveis agentes antioxidantes.

Para avaliar o efeito protetor dos antioxidantes, a enzima foi pré-incubada durante 5 minutos a 25°C, juntamente o possível agente protetor e a reação foi iniciada pela adição do substrato pNPP com o agente oxidante, e se desenvolveu a 37°C durante 40 minutos. Para verificar se a atividade enzimática poderia ser revertida pela ação de antioxidante, a enzima foi pré-incubada com o oxidante e a reação foi iniciada pela adição do substrato juntamente com antioxidante.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Purificação

A ultracentrifugação a 100.000 x g promoveu a maior separação entre as proteínas solúveis (fração de citosol) das insolúveis (fração de membrana). A figura 5 mostra uma eletroforese das proteínas separadas utilizando-se este processo. É importante observar que algumas proteínas na fração M (membrana) aparecem com maior intensidade que na fração total (P) devido ao processo de concentração da amostra por ultracentrifugação.

A fração de membrana foi submetida à cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose (figura 6). Observa-se uma resolução adequada quando o gradiente salino (NaCl) foi realizado mantendo-se uma concentração constante em 200 mM (figura 6 A) por 5 volumes de coluna (vc), com separação adequada de dois picos de proteínas que saíam unidos quando era aplicado um gradiente contínuo de NaCl (figura 6 B).

Na figura 6 A, o primeiro pico de proteína (linha preta), corresponde às proteínas que não aderiram à resina aniônica, possivelmente por terem um ponto isoelétrico (pI) maior que 8,4, possuindo, portanto, cargas neutras ou positivas. A maior quantidade de proteínas foi eluída neste início e apresentaram baixa atividade fosfatásica (linha em vermelho).

No segundo pico de proteínas, representado pelas frações 66 a 74, que apresenta praticamente toda a atividade fosfatásica, estão presentes as proteínas que eluíram com 200mM de NaCl e que possivelmente possuem cargas negativas em pH 8,4, portanto pI menor que 8,4. A CD45 é uma proteína de membrana com massa molecular relativa que pode variar de 180 kDa a 230 kDa e pI entre 6,3 a 7,1, dependendo das isoformas (Abdul-Salam *et al.*, 2000), assim era esperado que ela eluisse no segundo pico protéico.

O terceiro pico de proteína, representado pelas frações 118 ao 140, eluiu com aproximadamente 650 mM NaCl (50%) e apresentou uma pequena atividade enzimática entre as frações 118 a 124.

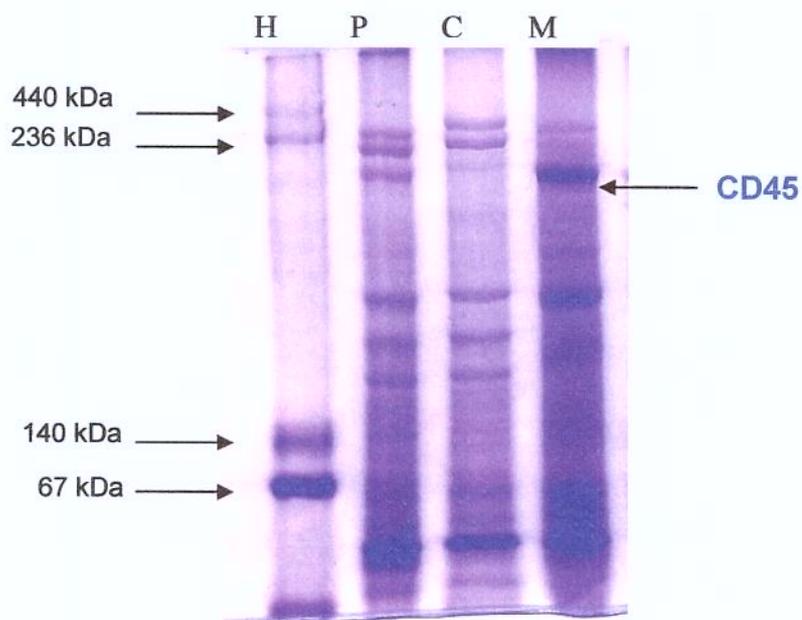


Figura 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (SDS-PAGE 5%) de proteínas de linfócitos humanos. Procedimento realizado conforme descrito em Métodos 4.4 A. H - marcadores de proteínas de alto peso molecular; P - proteínas presentes no extrato de linfócitos; C – proteínas da fração solúvel (citossol); M – proteínas da fração de membranas. Em destaque a posição da proteína de membrana CD45, de massa molecular em torno de 200 kDa.

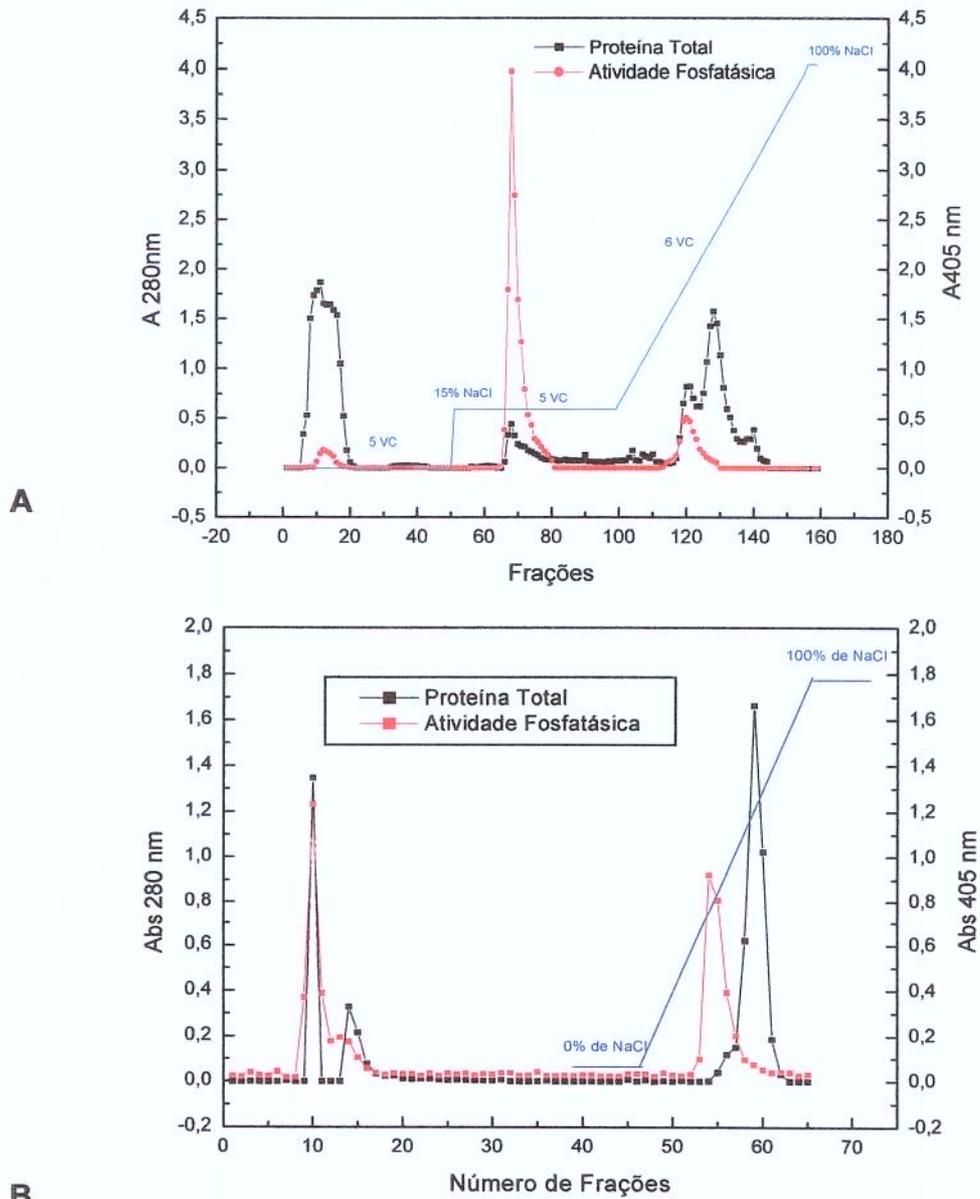


Figura 6. Cromatografia de troca iônica da fração de membrana de Linfócitos Humanos. O procedimento foi realizado em resina DEAE Sepharose equilibrada em tampão tris-HCl pH 8,4 50mM contendo 0,1% β -mercaptoetanol, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 150mM NaCl A e 0,05% triton X-100. O fluxo foi de 1,0 mL/min, conforme descrito em Métodos 4.3 A. **A** – Cromatografia com uma etapa de eluição com concentração de NaCl constante de 200mM, precedendo o gradiente contínuo até 1,0 M. **B** – Eluição com gradiente contínuo de NaCl. A linha em preto representa a quantidade de proteínas medida a 280 nm e a linha em vermelho, a atividade enzimática, medindo-se p-nitrofenol liberado, conforme Métodos 4.5 A.

Como primeira análise qualitativa foi feito um estudo de inibição enzimática, uma ferramenta útil para se determinar o principal tipo de fosfatase presente em um meio (Mackintosh and Mackintosh, 1994; Bernier and Wang, 1996). Foi realizado um estudo de inibição para cada pico eluído da cromatografia de troca iônica (tabela 1).

Tabela 1. Efeito de compostos sobre a atividade fosfatásica dos três picos eluídos na cromatografia de troca iônica DEAE Sepharose. As condições de ensaio são as mesmas descritas em Métodos 4.5 A, utilizando-se pNPP como substrato, na ausência (controle) e em presença dos compostos nas concentrações indicadas.

Compostos	Atividade enzimática (%)		
	Pico 1	Pico 2	Pico 3
Controle	100	100	100
Vanadato 1mM	14	0	26
pCMB 0,1mM	95	36	100
Ácido okadáico 0,2mM	98	106	103
Ca ²⁺ 1mM	110	66	106
Mg ²⁺ 1mM	110	69	102
Cu ²⁺ 1mM	36	4	7
Fosfato 10mM	107	54	99
DTT 10mM	107	79	107
Peróxido 0,1mM	23	5	3
Pervanadato 0,05mM	18	3	1
Fluoreto 10mM	106	57	98

Sabendo-se que as PTPs são inibidas especificamente pelo vanadato, p-cloromercuribenzoato (pCMB), pervanadato, H₂O₂ e Cu²⁺, o pico 2 foi escolhido para prosseguir com a purificação, pois estes compostos apresentaram praticamente inibição total de atividade neste pico. Ausência de inibição por ácido okadáico, a alta inibição por pCMB e ausência de ativação por Mg⁺² e Ca⁺² sugerem que a principal fosfatase no pico 2 não se trata de uma proteína serina/treonina fosfatase como PP1, PP2A e PP2B (Bialojan and Takai, 1988) e sim de uma PTP.

As frações correspondentes ao segundo pico protéico da cromatografia de troca iônica foram concentradas em membrana com poros de 10 kDa, em centrífuga refrigerada por 4.000 x g e submetidas à cromatografia de exclusão molecular (Superdex S-200). A finalidade dessa cromatografia foi, além de obter um grau de pureza maior, efetuar a substituição do tampão de alta concentração salina por outro que possuísse menos interferentes químicos. Assim, as quantidades de β -mercaptoetanol e NaCl foram diminuídas e componentes protetores da atividade fosfatásica foram acrescentados, como fosfato inorgânico e glicerol.

O cromatograma de exclusão molecular (figura 7) mostra um primeiro pico de proteína cuja atividade fosfatásica se encontra em sua porção ascendente e dois picos seguintes sem atividade fosfatásica. O limite de exclusão da resina Superdex S-200 é de 20 a 200 kDa, assim já era esperado que a CD45, cuja massa molecular varia de 180 a 230 kDa, estivesse presente no primeiro pico de proteína.

A eletroforese SDS-PAGE corada com prata (figura 8) mostrou que a fração com atividade fosfatásica que eluiu da Superdex S200 possui uma banda de proteína bastante intensa na faixa de 180 kDa e uma menos intensa de aproximadamente 220 kDa, sugerindo que estas duas proteínas possam ser duas isoformas da CD45.

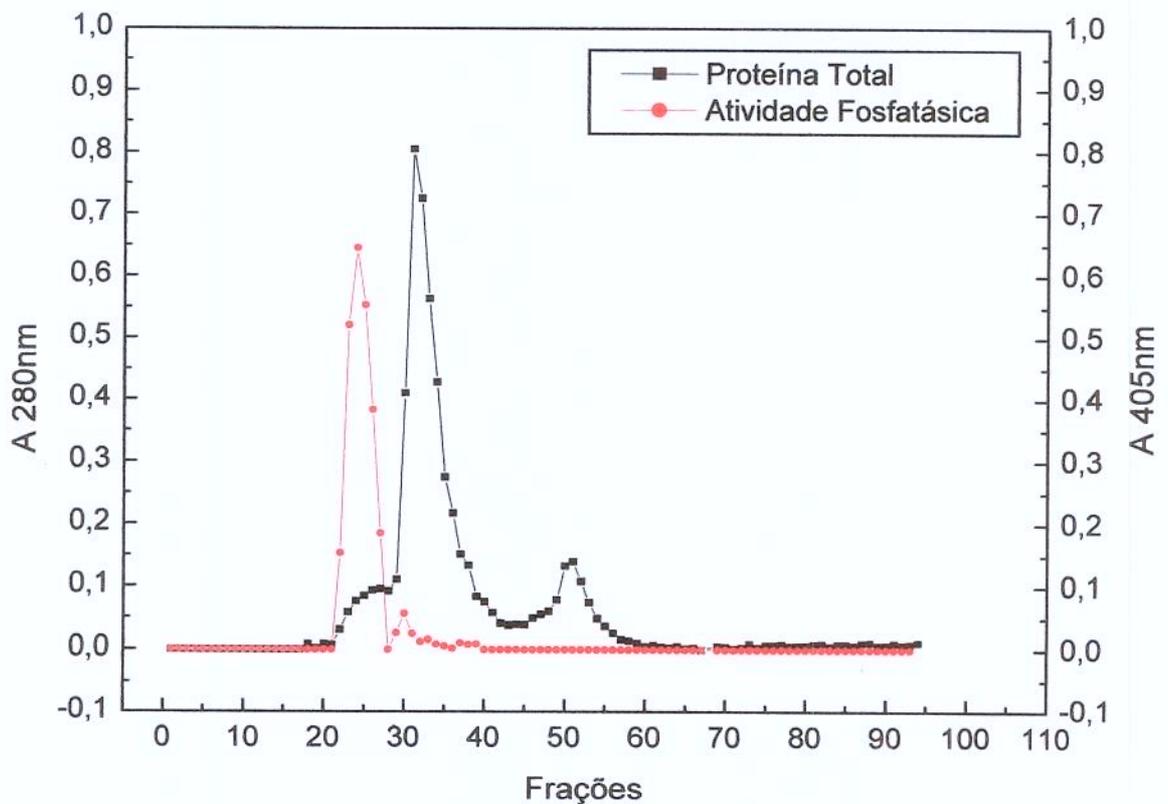


Figura 7. Cromatografia de exclusão molecular do segundo pico de proteínas eluído da cromatografia de troca iônica. O procedimento foi realizado em resina Superdex S-200 (60 x 1,5 cm), equilibrada com Tampão 50mM Tris-HCl 50mM pH 8,4 contendo 50mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM fosfato, 5% glicerol, 0,01% β -mercaptoetanol e 0,05% Triton X-100. O fluxo da corrida foi de 0,3 mL/min, conforme descrito em Métodos 4.3 B. A linha em preto representa a quantidade de proteínas medida a 280 nm e a linha em vermelho, a atividade enzimática, medida pela liberação de p-nitrofenol.

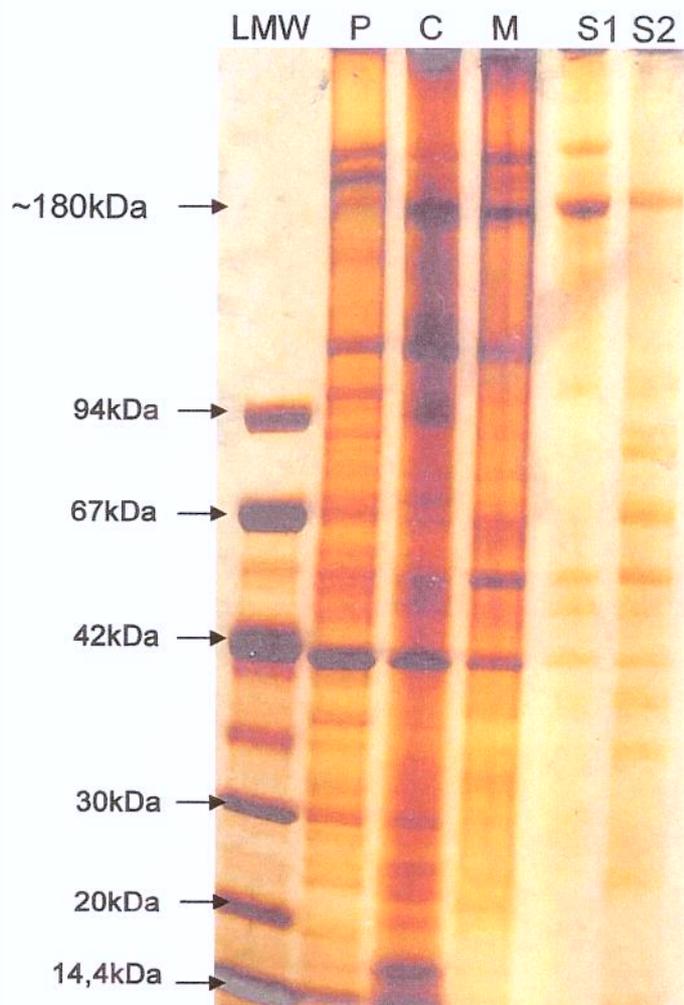


Figura 8. Eletroforese SDS PAGE das proteínas eluídas da cromatografia de exclusão molecular. Procedimento realizado conforme descrito em Métodos 4.4 A, utilizando-se gel de poliacrilamida 5 - 15 %, corado com prata (Switzer *et al.*, 1979), onde P - extrato bruto (pool de linfócitos), C - fração solúvel (citossol), M - fração de membrana, S1 - primeiro fração da cromatografia de exclusão molecular com atividade fosfatásica, S2 - segunda fração da cromatografia de exclusão molecular com atividade fosfatásica. A posição da massa molecular em torno de 180kDa foi determinada por regressão linear $y = 2,45694 - 0,10554 \cdot x$, onde $y = \log Mr \cdot 10^3$ e $x =$ caminho percorrido pelos marcadores (cm).

A tabela de purificação (Tabela 2) mostra que a etapa da cromatografia de troca iônica foi muito importante para purificação da PTP de membrana de linfócitos humanos, visto que a quantidade de proteínas diminuiu com concomitante aumento da atividade específica. A purificação foi cerca de 3,5 vezes com relação à etapa de membrana. A etapa de gel filtração não se mostrou tão eficiente, apesar de ter diminuído a quantidade de proteínas, pois a atividade enzimática total também diminuiu provavelmente devido à diminuição de β -mercaptoetanol presente no tampão de corrida utilizado na cromatografia de gel filtração. A diminuição de proteínas nesta etapa foi evidenciada na eletroforese (figura 8). A purificação desta etapa com relação à anterior, de cromatografia de troca iônica foi de cerca de 1,5 vezes. No final, a enzima foi purificada 8,6 vezes, com um rendimento de 34% e uma atividade específica de 55 unidades.

A eletroforese SDS-PAGE corada com *Coomassie Blue* (figura 9) mostra as frações constantes da Tabela 2.

Tabela 2. Tabela de purificação da PTP de membranas de linfócitos humanos

Fração	Volume (mL)	Proteína total (mg)	Atividade total (U)	Atividade específica (U/mg) x 10 ⁻³	Purificação (vezes)	Rendimento (%)
Extrato de linfócitos	60	145	0,93	6,4	1	100
Fração solúvel	57	114	0,40	3,5	-	-
Membranas	20	54,6	0,60	11	1,7	65
DEAE-Sepharose	39	23,4	0,87	37	5,8	-
Superdex S-200	16	5,76	0,32	55	8,6	34

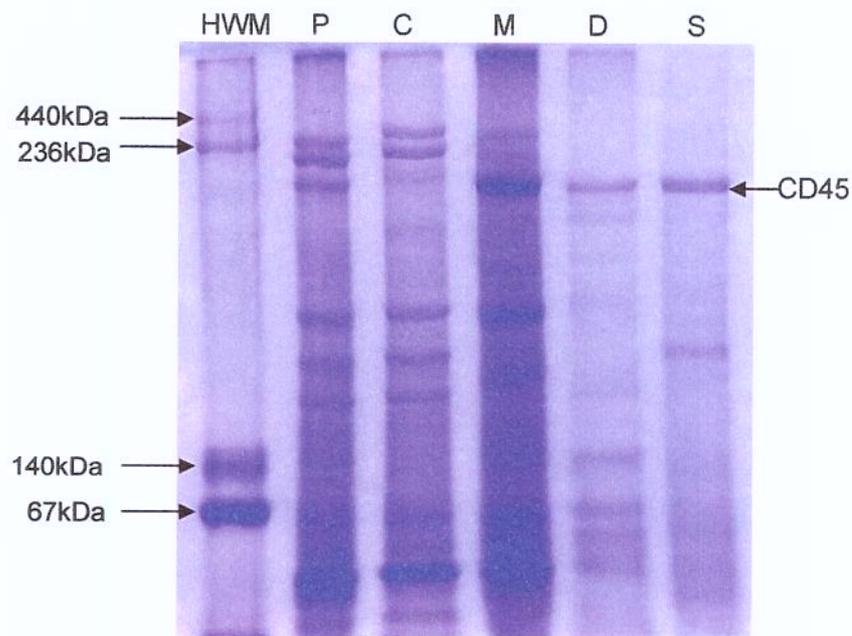


Figura 9. Eletroforese SDS-PAGE das frações obtidas na purificação de PTP de membranas de linfócitos humanos. As condições são as descritas em Métodos 4.4 A, com gel de acrilamida 5% corado com *Coomassie Blue*. Etapa da purificação: P - extrato bruto (pool de linfócitos); C - fração solúvel (citossol); M - fração de membrana; D - fração de DEAE Sepharose; S - segundo pico de proteína da cromatografia Superdex S-200, que mostrou atividade fosfatásica.

5.2 Caracterização da PTP purificada

As frações eluídas da Superdex S-200 que apresentaram atividade fosfatásica foram unidas numa única fração e caracterizadas. Foram utilizados diferentes métodos de caracterização: eletroforese 2D, capacidade de hidrolisar determinados substratos e efeitos de inibidores específicos.

Na figura 10 observar-se uma eletroforese bidimensional das proteínas do extrato de linfócitos, com enfoque em uma proteína de ponto isoelétrico entre 6 e 7 e uma massa molecular relativa em torno de 200 kDa.

Apesar da baixa concentração de proteínas das frações eluídas da Superdex S-200, foi possível realizar uma eletroforese bidimensional, onde se destaca *spots* arrastados de mesma massa molecular, com *pI* variando de 6 a 7 (figura 11). Essa é uma característica de proteína que pode sofrer fosforilação. Quanto mais resíduos fosforilados, mais negativa é sua carga líquida e mais a proteína se move para pH ácido durante a isoeletrofocalização. Como já foi mencionado, a CD45 possui uma massa molecular relativa que pode variar de 180 kDa a 230 kDa e um *pI* entre 6,3 a 7,1, dependendo das isoformas (Abdul-Salam *et al.*, 2000). A CD45 pode ser fosforilada nos resíduos de ser-995, ser-1003 e ser-1007 (Beausoleil *et al.*, 2004), desta maneira, a proteína destacada em ambas as eletroforeses bidimensionais certamente se trata da CD45.

Nenhuma referência foi encontrada sobre o *pI* da PTP transmembrana CD148 funcional, apenas foi determinado, o *pI* teórico em pH fisiológico, através da sequência de aminoácidos, sem as porções glicosiladas, através do site <http://ca.expasy.org/uniprot/Q12913> e <http://ca.expasy.org/uniprot/Q12913>. A tabela 3 mostra as características obtidas através da sequência de aminoácidos, das duas PTPs de membrana, a CD45 e CD148.

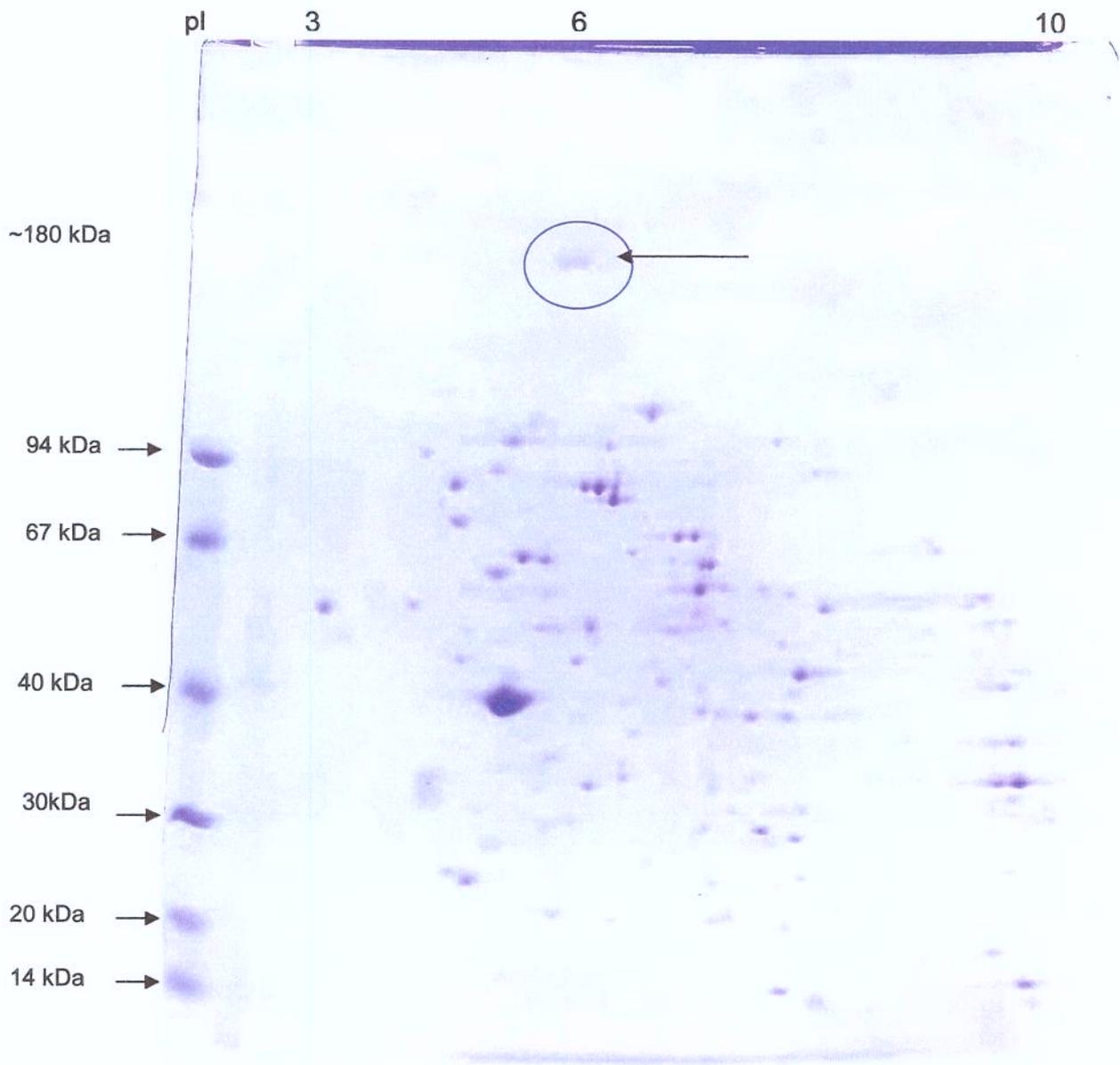


Figura 10. Eletroforese bidimensional do extrato bruto de linfócitos. Procedimento realizado conforme descrito em Métodos 4.4 B, em gel de 5-15% de poliacrilamida. Em destaque uma possível isoforma da CD45, com pI de aproximadamente 7 e massa molecular em torno de 200kDa. A quantidade de proteína aplicada foi pequena, não mostrando todos os *spots* do pool de linfócitos, no entanto, foi suficiente para mostrar os *spots* de interesse. Em destaque (seta) vários *spots* de mesma massa molecular (200kDa aproximadamente) e pI entre 6 e 7. A posição da massa molecular em torno de 180kDa foi determinada por regressão linear $y = 2,57857 - 0,09862 \cdot x$, onde $y = \log Mr \cdot 10^3$ e $x =$ caminho percorrido pelos marcadores (cm).

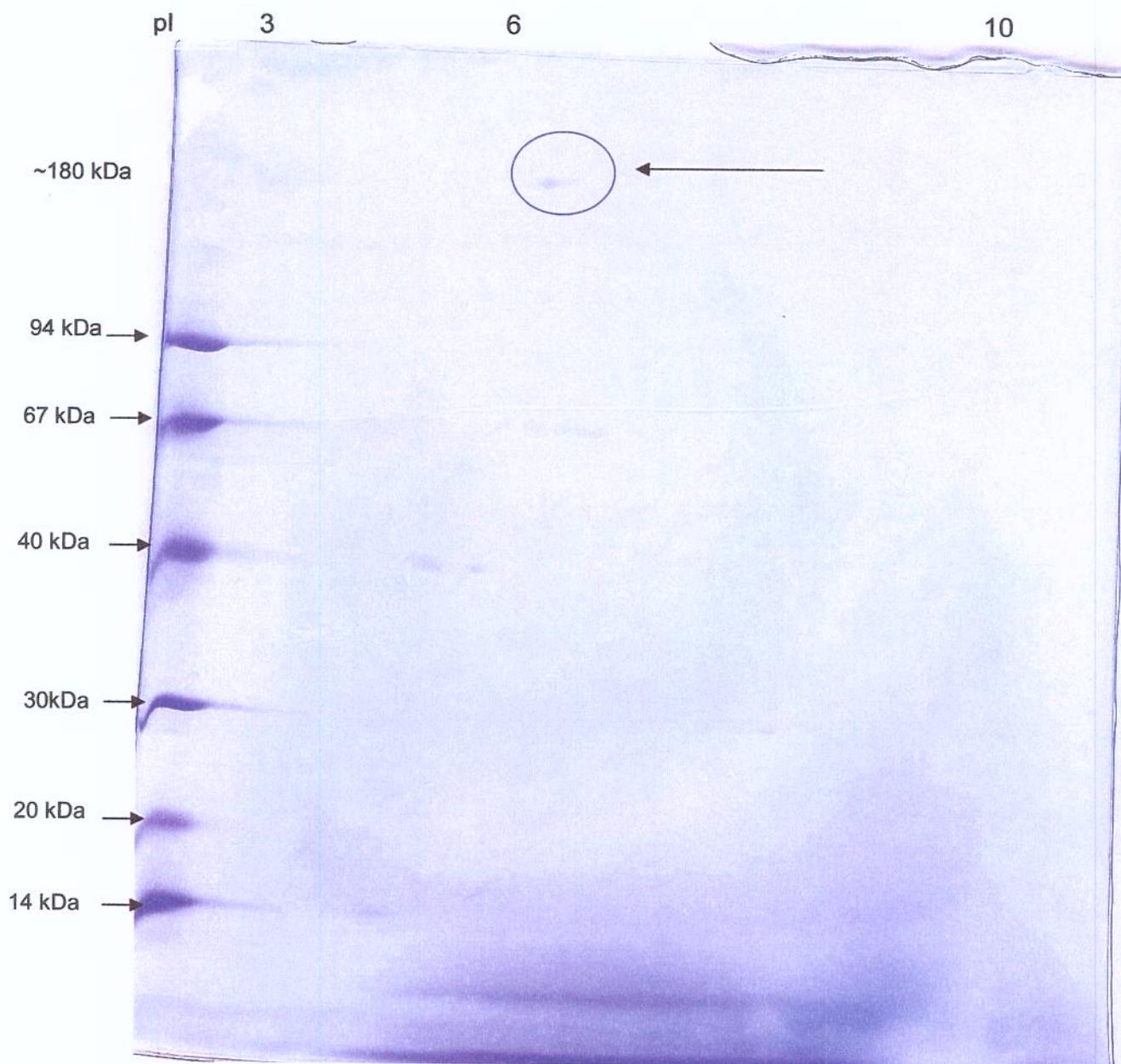


Figura 11. Eletroforese bidimensional da fração obtida da cromatografia Superdex S-200. Procedimento realizado conforme descrito em Métodos 4.4 B em gel de 5-15%, com destaque para *spots* de uma proteína com pI entre 6 e 7, devido a fosforilações diferenciais e uma massa molecular em torno de 180kDa. A posição da massa molecular em torno de 180kDa foi determinada por regressão linear $y = 2,57857 - 0,09862 \cdot x$, onde $y = \log \text{Mr} \cdot 10^3$ e $x =$ caminho percorrido pelos marcadores (cm).

Tabela 3. Características das PTPs de membrana de linfócitos humanos

	CD45	CD148
isoformas	Pelo menos 8 isoformas	-
Tamanho (precursor não processado)	1304 aminoácidos	1337 aminoácidos
Massa molecular (precursor não processado)	147.254 Da	145.927 Da
Massa molecular observada	180-230 kDa *	200-250 kDa **
pl teórico	5,94 (do resíduo 1 ao 1226)	5,34 (do resíduo 1 ao 1298)
pl observado	6,3 a 7,1 *	-

*Abdul-Salam *et al.*, 2000

**Austschbach *et al.*, 1999

A figura 12 mostra a especificidade por substratos da enzima obtida. A atividade enzimática utilizando pNPP como substrato foi considerada 100% porque todas as fosfatases podem hidrolisar de maneira eficiente este substrato sintético (Tsuchiya *et al.*, 1997; Kawada *et al.*, 1999). Pode-se observar que a enzima foi capaz de hidrolisar tirosina fosfato com uma especificidade muito maior que os demais substratos (320% aproximadamente), indicando a presença de PTPs (Cunic *et al.*, 1999). Quando comparado com pNPP, as hidrólises dos substratos serina e treonina fosfatos foram da ordem de 50 - 70%, porém foram bastante reduzidas com relação à hidrólise de tirosina fosfato. Apesar das enzimas terem hidrolisado eficientemente a tirosina fosfato, o resultado deve ser criteriosamente analisado, pois recentemente Vetter e colaboradores (2000) relataram que algumas fosfatases podem atuar sobre aminoácidos isoladamente e, no entanto, eram incapazes de atuar sobre um resíduo de aminoácidos em um peptídeo. Além disto, estes pesquisadores demonstraram que aminoácidos vizinhos ao resíduo de tirosina poderiam determinar a especificidade da enzima. Estes resultados reforçam que a fosfatase de membranas de linfócitos é uma proteína tirosina fosfatase, sendo a CD45 uma forte candidata pelas propriedades descritas acima.

Utilizando-se pNPP como substrato foram determinados os valores dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$. Através do gráfico de Michaelis-Menten (figura 13) pode-se obter os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, sendo de 0,26 mM e 180 mol.min⁻¹.mg⁻¹, respectivamente. Este valor de K_m é da mesma ordem de grandeza da PTP de baixa massa molecular de rim bovino, obtida em nosso laboratório, 0,14 mM (Granjeiro *et al.*, 1997).

O efeito dos potenciais inibidores foi extremamente importante para se determinar qual era a fosfatase predominante após a purificação. Na figura 14, observa-se que a enzima foi inibida por vanadato 0,1 mM (40%), pervanadato 0,1 mM (100%), peróxido de hidrogênio 0,1 mM (90%) e pCMB e pHMB 0,1 mM (aproximadamente 20%).

A enzima não apresentou dependência por cátions divalentes para catálise. Como discutido anteriormente, a alta inibição pelo vanadato se deve a sua analogia estrutural com o fosfato, uma vez que este inibidor é específico para classe das tirosinas fosfatases. O pCMB ligou-se especificamente aos grupamentos -SH livres no sítio ativo da enzima, essenciais para a catálise enzimática (Laidler *et al.*, 1982; Tracey, 2000). O peróxido também atua em resíduos específicos de -SH provocando a sua oxidação o que pode gerar pontes de dissulfeto (-S-S), ácido sulfênico (-SOH), ácido sulfinico (-SO₂H) e ácido sulfônico (-SO₃H) que podem ser formas irreversíveis de oxidação (Aoyama *et al.*, 2003).

O ácido okadáico não apresentou efeito sobre a atividade enzimática, indicando que a presença de proteínas Ser/Thr fosfatases é muito pequena, apesar de ter ocorrido hidrólise dos substratos sintéticos.

De acordo com os resultados cinéticos preliminares é possível sugerir que a fosfatase presente na fração purificada de membranas de linfócitos trata-se de uma proteína tirosina fosfatase (PTP), tartarato resistente e que não requer íons Mg²⁺ para sua catálise.

As PTPs são inibidas competitivamente por vanadato (Zhang and Etten, 1990; Granjeiro *et al.*, 1997) e irreversivelmente por pervanadato (complexo do vanadato com o H₂O₂), através da oxidação da Cys-12. O íon vanadato forma uma ligação covalente com a Cys-12 no sítio ativo, e desta forma, inibe a atividade PTP por atuar como um análogo do estado de transição (Zhang, *et al.*, 1997). Vanadato induz a fosforilação em tirosina resíduos de diversas proteínas como os receptores para o fator de crescimento epidermal, insulina e fator de crescimento do hepatócito (Ruff *et al.*, 1997).

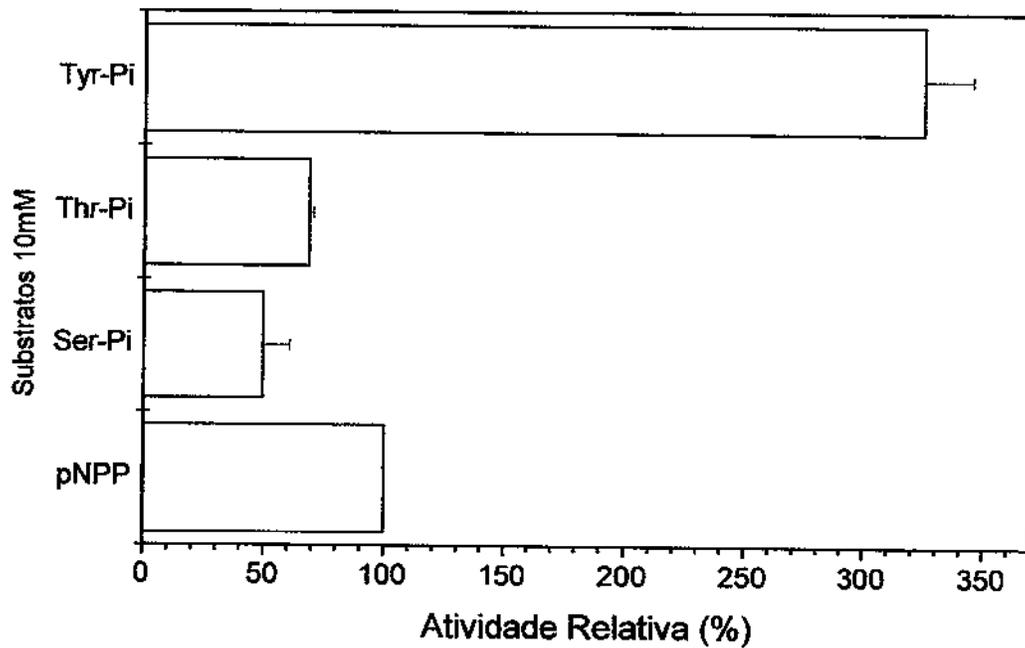


Figura 12. Atividade da PTP de linfócitos sobre diferentes substratos. Os substratos serina fosfato (Ser-Pi), treonina fosfato (Thr-Pi), e tirosina fosfato (Tyr-Pi) foram utilizados na concentração final de 10 mM. A atividade foi determinada como descrito em Métodos 4.6 B, medindo-se o fosfato (Pi) liberado. A atividade com p-NPP como substrato foi considerada como 100%.

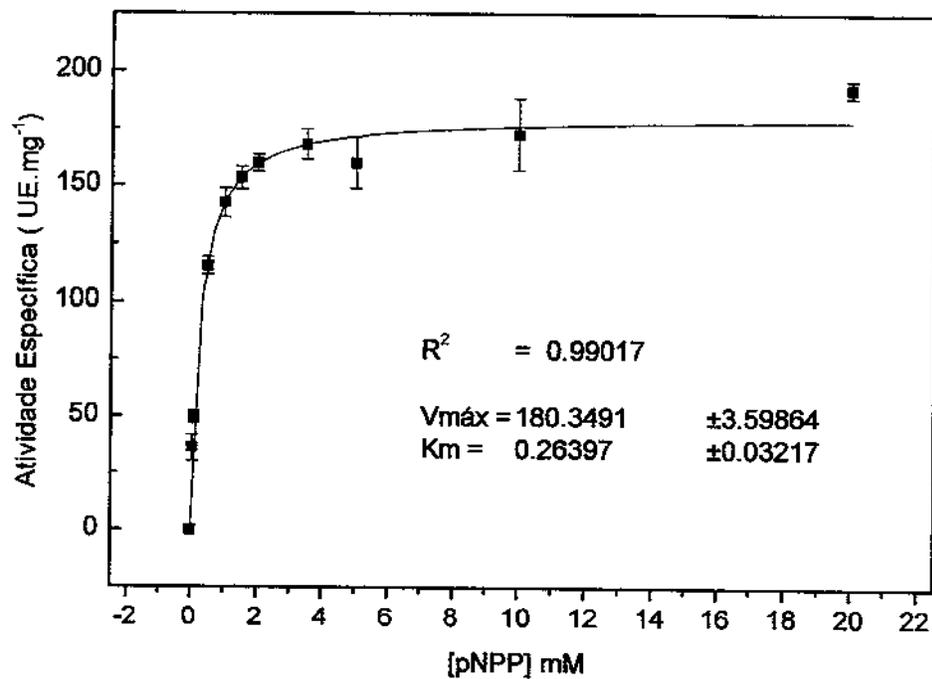


Figura 13. Determinação dos parâmetros cinéticos para a PTP de membrana de linfócitos. A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos 4.7, variando-se a concentração de pNPP. Os parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$ foram determinados através do ajuste da curva ($V \times [S]$) utilizando o modelo da hipérbole retangular. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrão (SD).

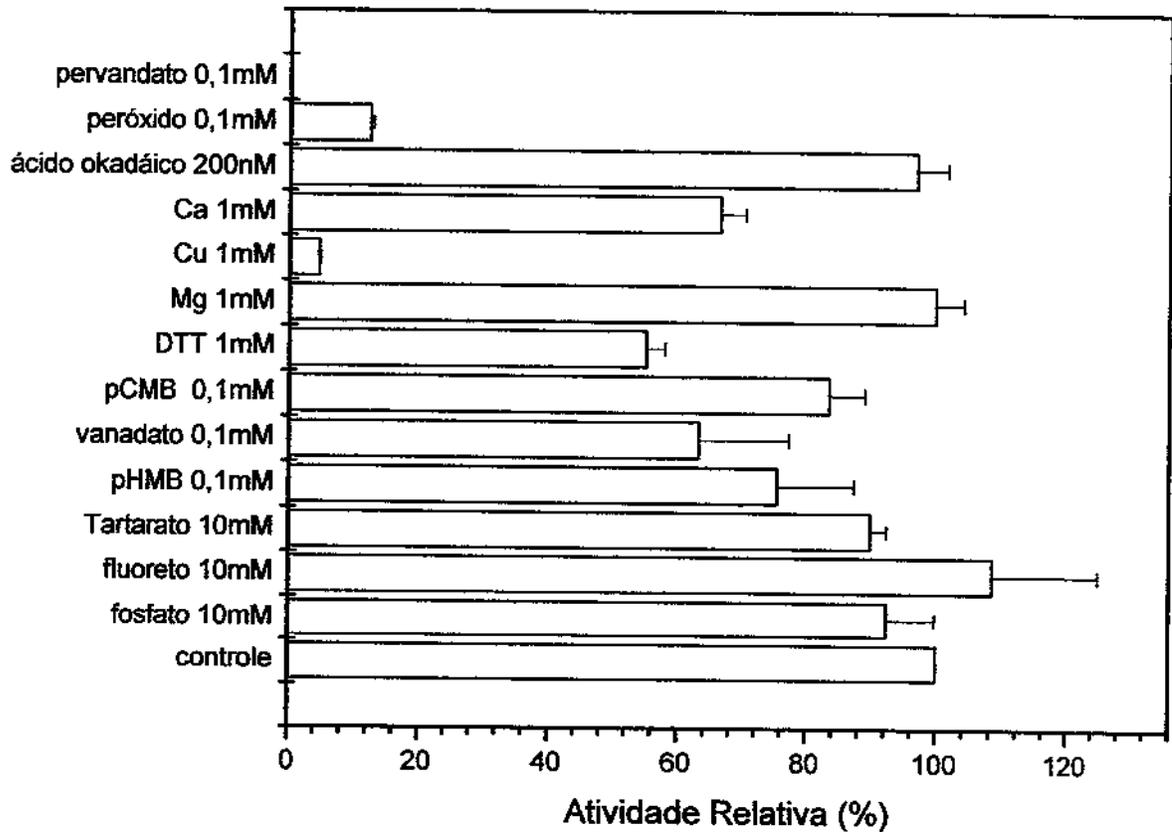


Figura 14. Efeito de potenciais inibidores sobre a atividade da PTP de membranas de linfócitos. Procedimento realizado conforme descrito em Métodos 4.6 A, onde os inibidores foram adicionados diretamente ao meio de reação, nas concentrações indicadas. A atividade na ausência de compostos foi considerada como 100%.

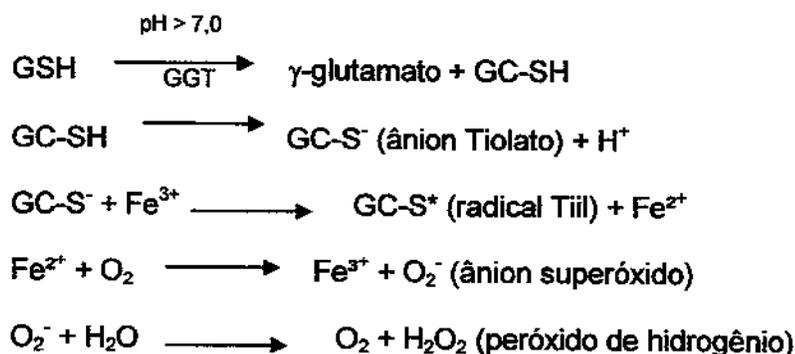
5.3 Estudos de óxido-redução da PTP de linfócitos humanos parcialmente purificada

Com a enzima obtida através da cromatografia de troca iônica, foram realizados estudos para avaliar o efeito de agentes oxidantes sobre a atividade fosfatásica. Na figura 15 pode-se observar que o efeito do peróxido de hidrogênio sobre a atividade enzimática é tempo dependente, visto que atividade enzimática diminui a medida que aumenta o tempo de exposição da enzima ao H_2O_2 ($1\mu\text{M}$), que é capaz de promover 50% de inibição com apenas 5 minutos de exposição da enzima. Após 15 minutos, a atividade enzimática é inibida em 70%, chegando a inibição de 90% em 60 minutos.

Para a concentração de $1\mu\text{M}$ o t-butil hidroperóxido (figura 16) promove uma inibição de 50% em 10 minutos. Em 20 minutos a inibição é de 70%, a atividade enzimática é reduzida a 10% em 60 minutos de exposição ao t-butil hidroperóxido.

Estudos com agentes antioxidante GSH realizados com a fração eluída da cromatografia de troca iônica (figura 17) mostraram que quanto maior a concentração de GSH, maior a inibição da atividade fosfatásica.

Paolicchi e colaboradores (2002) observaram um efeito pró-oxidante quando GSH estava presente juntamente com Fe^{3+} e γ -glutamil transferase (GGT), uma ectoenzima transmembrana, presente em linfócitos inativos (Grisk *et al.*, 1993), responsável pelo ciclo da GSH. A presença de Fe^{+3} é possível, uma vez que, durante a sonicação, as hemácias presentes poderiam ter liberado Fe^{+2} que em meio aquoso rapidamente se oxida a Fe^{+3} . O metabolismo do GSH por esta enzima produz espécies reativas de oxigênio (EROs), conforme as reações:



Para verificar se as reações acima poderiam estar ocorrendo, utilizou-se desferroxamina, um quelante específico de ferro, no meio de reação. Na presença de

desferroxamina (figura 18) esse efeito não era observado, pelo contrário, ocorria uma ativação.

Esses dados mostram que há interferentes no meio enzimático após a troca iônica. Foi necessária uma nova etapa para eliminação de interferentes. A cromatografia de exclusão molecular utilizada com etapa seguinte, foi muito importante para a eliminação desses interferentes.

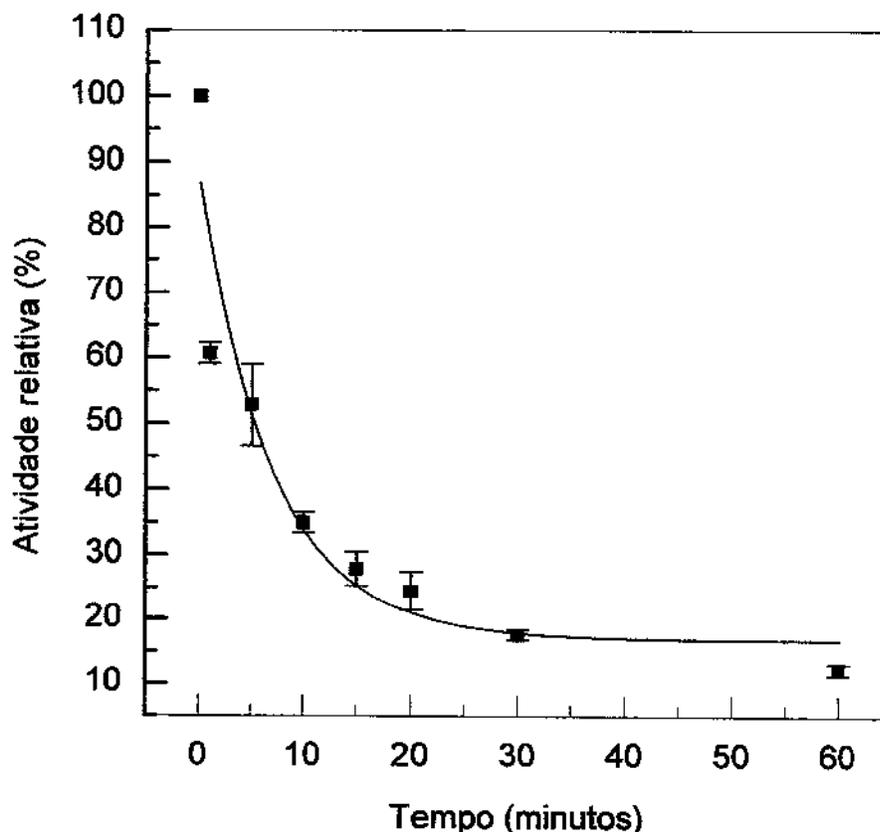


Figura 15. Efeito do tempo de exposição da PTP parcialmente purificada à ação do H_2O_2 . A enzima foi pré-incubada a temperatura ambiente em presença de $1\mu M$ de H_2O_2 nos tempos indicados. Após estes tempos, a atividade enzimática remanescente foi determinada conforme descrito em Métodos 4.6 A. A atividade na ausência de H_2O_2 foi considerada como 100%.

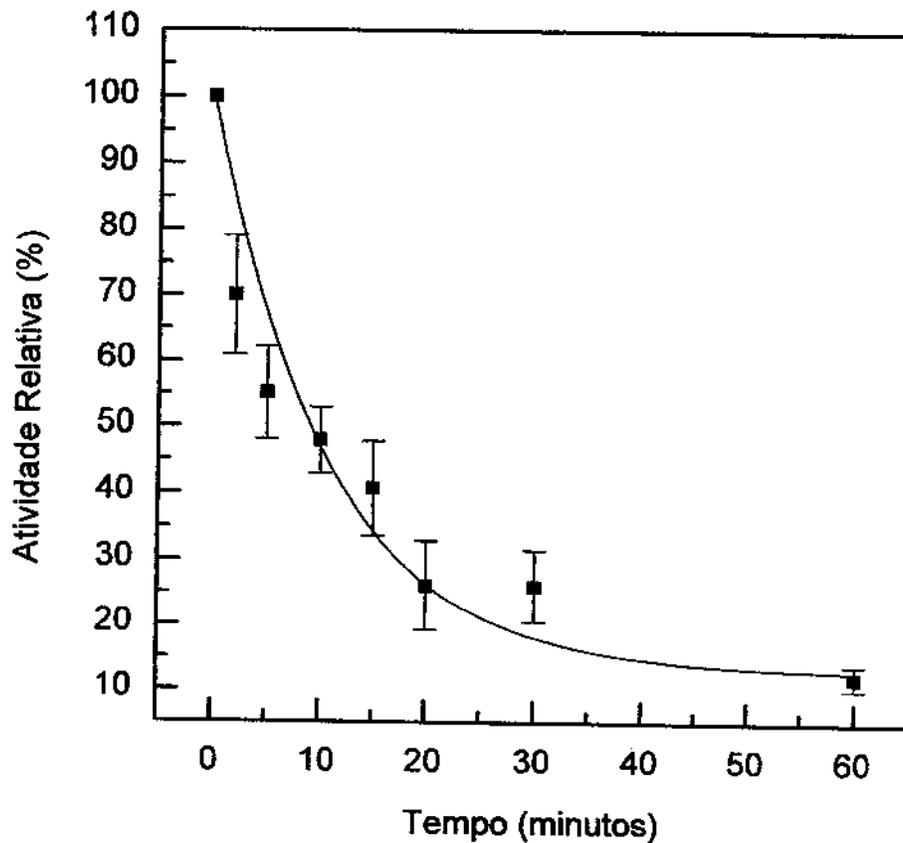


Figura 16. Efeito do tempo de exposição da enzima parcialmente purificada à ação do t-butil hidroperóxido. A enzima foi pré-incubada a temperatura ambiente em presença de $1\mu\text{M}$ de t-butil hidroperóxido nos tempos indicados. Após estes tempos, a atividade enzimática remanescente foi determinada conforme descrito em Métodos 4.6 A. A atividade na ausência de t-butil hidroperóxido foi considerada como 100%.

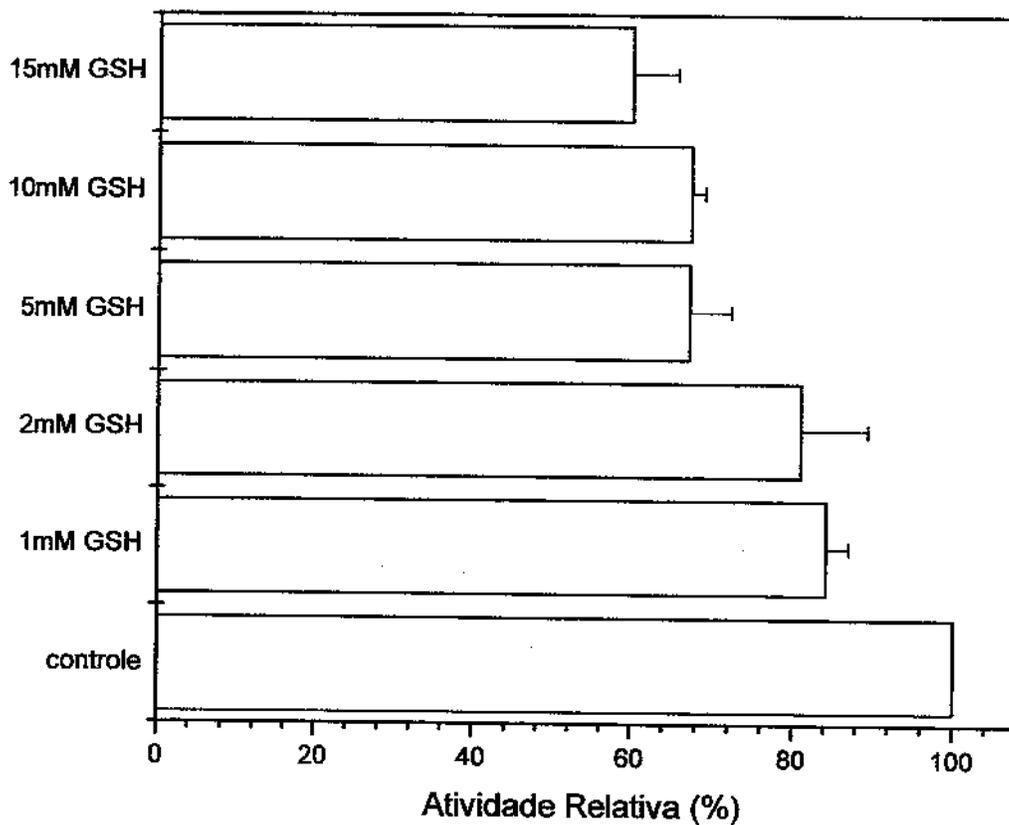


Figura 17. Efeito de GSH na atividade da PTP *parcialmente* purificada. Procedimento realizado conforme descrito em Métodos 4.9 em presença de GSH. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrões (SD).

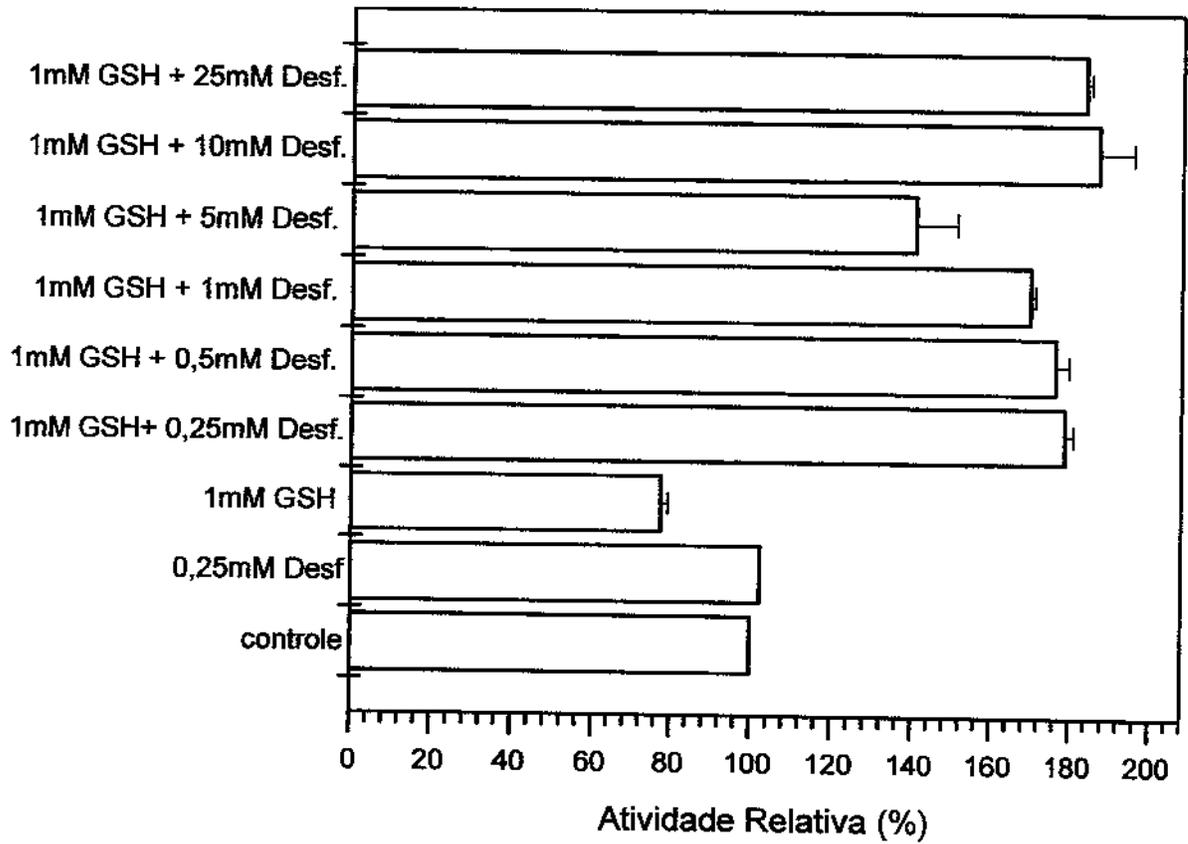


Figura 18. Efeito da desferroxamina e GSH na atividade da PTP *parcialmente purificada*. Procedimento realizado conforme descrito em Métodos 4.9 em presença de GSH e/ou desferoxamina (Desf). Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrão (SD).

5.4 Estudos de óxido-redução da PTP (CD45) de linfócitos humanos purificada

Foram realizados estudos para avaliar os efeitos de agentes oxidantes sobre a atividade fosfatásica da enzima purificada. Não foi possível determinar a IC_{50} do pervanadato devido sua enorme especificidade pelo sítio catalítico do domínio enzimático. Em concentrações na ordem de nanomolar, o pervanadato inibiu 100% a atividade enzimática (figura 14). O pervanadato é produzido pela reação de vanadato, que possui inibição específica para PTP, funcionando como o fosfato inorgânico, um inibidor competitivo, e pelo peróxido de hidrogênio, também um inibidor de PTPs, por oxidar o resíduo de cisteína essencial para catálise enzimática.

Como agentes oxidantes foram utilizados o peróxido de hidrogênio e o t-butil hidroperóxido. Na figura 19, observa-se que t-butil hidroperóxido apresentou um valor de IC_{50} de 16 mM quando se utilizou p-NPP como substrato. Na figura 20, observa-se um forte efeito inibitório que o peróxido de hidrogênio tem sobre a atividade enzimática; o valor de IC_{50} obtido foi de 50 μ M. É relatado na literatura que a atuação do H_2O_2 é irreversível (Tracey, 2000). O maior efeito promovido pelo H_2O_2 em relação ao t-butil hidroperóxido pode estar associado ao tamanho das moléculas (impedimento estérico) e, conseqüentemente, à acessibilidade aos grupos -SH da enzima.

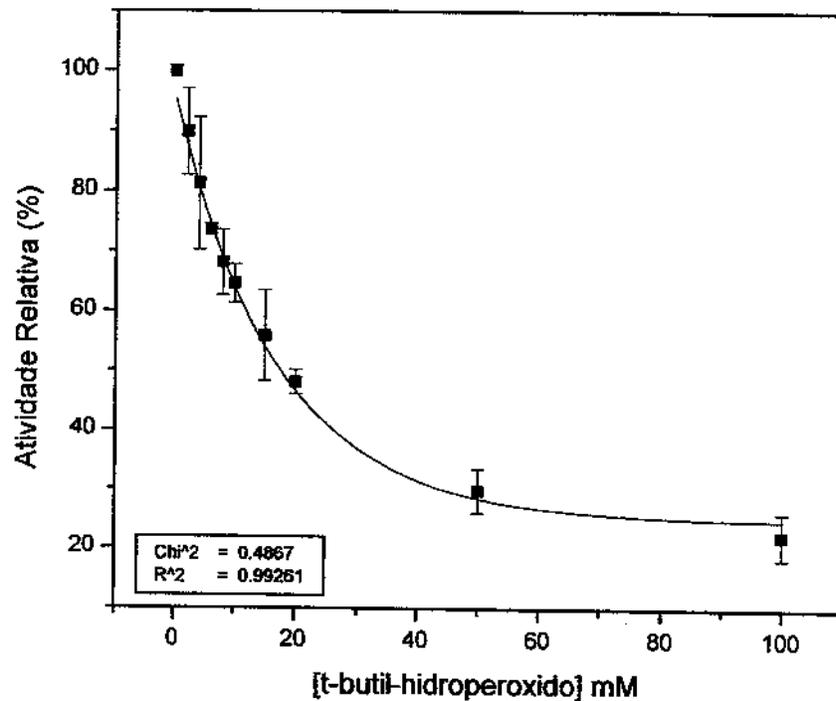


Figura 19. Efeito do t-butil hidroperóxido sobre a atividade enzimática da CD45. A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos 4.8, em presença de concentrações variadas de t-butil hidroperóxido. Foi considerada 100% a atividade na ausência do peróxido. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrão (SD).

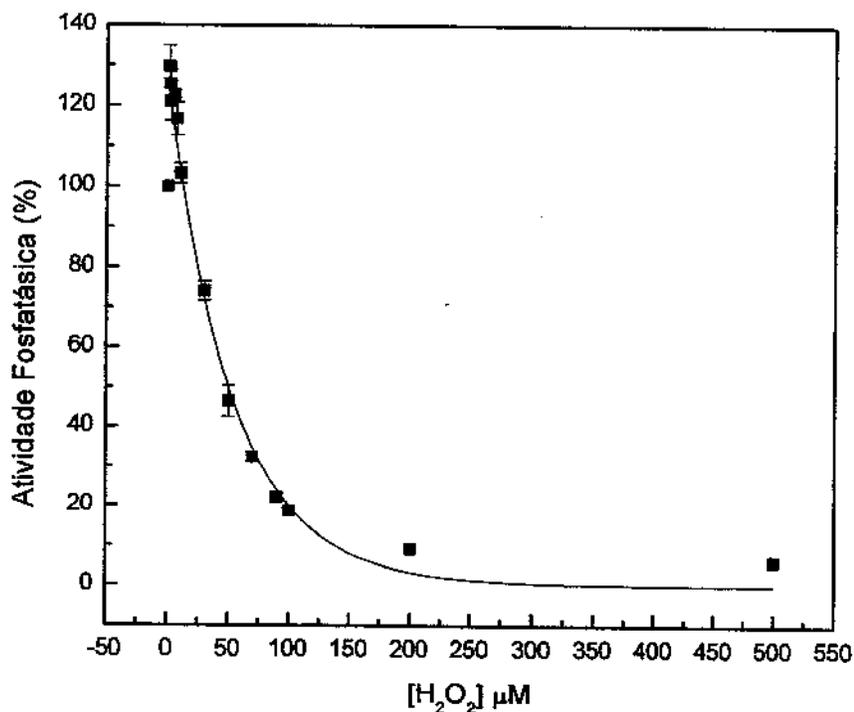
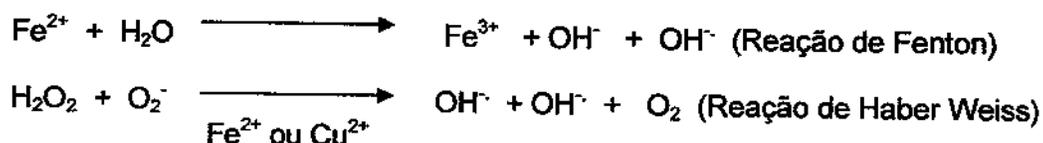


Figura 20. Efeito do peróxido de hidrogênio na atividade da CD45. A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos 4.8, em presença de concentrações variadas de peróxido de hidrogênio. Foi considerada 100% a atividade na ausência do peróxido. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrão (SD).

Efeitos de GSH e ácido ascórbico como antioxidantes

Para entender o mecanismo de atuação dos agentes oxidantes, foram feitos estudos com agentes antioxidantes GSH e ácido ascórbico. Na figura 21 observa-se que o ácido ascórbico 10 mM inibe a atividade fosfatásica à medida que sua concentração aumenta, na ordem de 20%. O ácido ascórbico está presente no plasma sanguíneo numa concentração de 24-85 μM . A ingestão de 72 mg/dia apresenta efeito antioxidante, porém em quantidade acima de 500 mg/dia há um possível efeito pró-oxidante (Song *et al.*, 2001). O ácido ascórbico é o principal antioxidante solúvel, pois reduz o ânion superóxido e radicais hidroxilas, com a formação de um composto intermediário, que é reduzido sucessivamente pela GSH. No entanto o ácido ascórbico não é considerado um antioxidante potente, pois em concentrações elevadas pode atuar como pró-oxidante (Podmore *et al.*, 1998).

Segundo Hininger e colaboradores (2005), na presença de metais de transição, o ascorbato pode promover a formação de espécies reativas de oxigênio como, por exemplo, O_2 a $\text{O}_2^{\cdot-}$, reduzindo Fe^{3+} ou Cu^{2+} a Fe^{2+} e Cu^+ , respectivamente, e estimular a reação de Fenton.



Enquanto o ácido ascórbico inibiu a atividade enzimática em 20% na concentração de 10 mM, GSH apresentou a mesma inibição na concentração duas vezes maior, 20mM.

Essa inibição pelo ácido ascórbico e pela GSH pode, portanto, estar associada à presença de metais de transição como Fe^{2+} no meio (Hininger *et al.*, 2005) além da enzima GGT que promove o efeito pró-oxidante da GSH (Paolicchi *et al.*, 2002)

No entanto, ensaios feitos com GSH na presença de desferoxamina, um quelante de ferro e alumínio, não apresentou efeito sobre atividade enzimática, podendo concluir que durante a purificação a enzima GGT foi eliminada, porém não eliminou o Fe^{2+} .

Na figura 22, observa-se que isoladamente, GSH e desferoxamina não apresentavam efeito na atividade enzimática. A inibição causada pela presença de H_2O_2 (60%) foi parcialmente protegida por GSH (cerca de 85% de atividade), e totalmente pela presença conjunta de GSH e desferoxamina. O H_2O_2 na presença de desferoxamina teve seu efeito diminuído, apresentando inibição de apenas 20% da atividade enzimática. A reversibilidade

total em presença de GSH e desferoxamina sugere que possa ter ocorrido complexação do ferro do meio, impedindo a formação de radical hidroxil, a partir do peróxido de hidrogênio, através da reação de Fenton. O radical hidroxil é um radical livre, e seu efeito oxidante é muito mais acentuado e rápido, pois possui elétrons desemparelhados; já o peróxido de hidrogênio não é considerado radical livre, apesar de ser um agente oxidante, pois não apresenta elétrons desemparelhados.

Na figura 23 observa-se o efeito de outro agente oxidante, o t-butil hidroperóxido. A GSH 5 mM e desferoxamina 0,25 mM não apresentaram efeito sobre a atividade fosfatásica. O t-butil hidroperóxido na concentração de 15 mM promoveu uma inibição de 40% da atividade enzimática. Na presença de GSH, a atividade enzimática foi revertida para 95%, indicando que GSH protegeu a enzima contra oxidação causada pelo t-butil hidroperóxido. GSH e desferoxamina juntos também protegeram a enzima contra oxidação, mas com a mesma intensidade que GSH sozinha. No estudo com t-butil hidroperóxido não houve proteção mais efetiva da atividade enzimática pela GSH juntamente com desferoxamina, comparado ao peróxido de hidrogênio, sugerindo que t-butil hidroperóxido não deve formar radicais livres.

Na célula, o maior número de espécies redox reativas consiste de proteína com resíduos de cisteína (~25mM), seguido pela glutathiona reduzida (1-10mM) (Rusnak and Reiter, 2000). A glutathiona reduzida é mais susceptível à oxidação que a PTP presente no meio, pois está em maior concentração que as proteínas com grupos tióis.

Meng e colaboradores (2002) verificaram que as PTPs são reguladas por espécies reativas de oxigênio no meio celular, e que muitas são reversivelmente oxidadas e inativadas. Recentemente, Monfort e colaboradores (2003) identificaram uma espécie sulfenilamida que é formada através da oxidação da cisteína do sítio catalítico da PTP1B. Sulfenilamida ou sulfenamida é caracterizada pela ligação do enxofre da cisteína ao nitrogênio do resíduo de serina vizinho da cadeia principal. A conversão do ácido sulfênico a sulfenamida é rápida, e pode ser novamente reduzida por tióis, incluindo glutathiona. As formas de ácido sulfênico e sulfenamida cíclica da PTP1B são rapidamente convertidas, na presença de glutathiona, a uma forma mais estável, a PTP1B s-glutationiladas, que pode ser reduzida por DTT ou tioltransferases (figura 24). A formação de sulfenamida cíclicas, assim como s-glutationilação, protege a PTP contra oxidação irreversível (Hertog *et al.*, 2005).

Outro mecanismo de proteção contra oxidação é a formação de pontes dissulfeto entre a cisteína do sítio ativo e um resíduo de cisteína adjacente. Foi observado tal mecanismo em LMW - PTP, cdc25 e PTEN, PTP não clássicas (Hertog *et al.*, 2005).

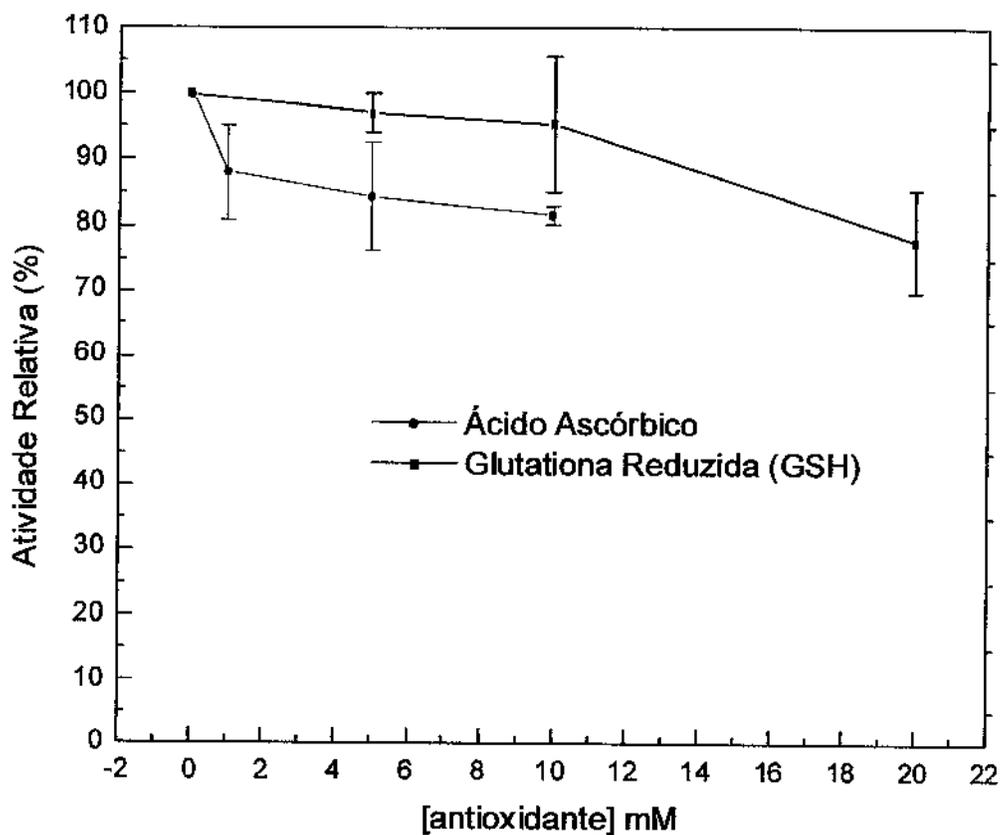


Figura 21. Efeito dos agentes antioxidantes, ácido ascórbico e GSH na atividade enzimática da CD45. A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos 4.8, em presença de glutathiona reduzida ou de ácido ascórbico. Foi considerada 100% a atividade na ausência dos compostos. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrão (SD).

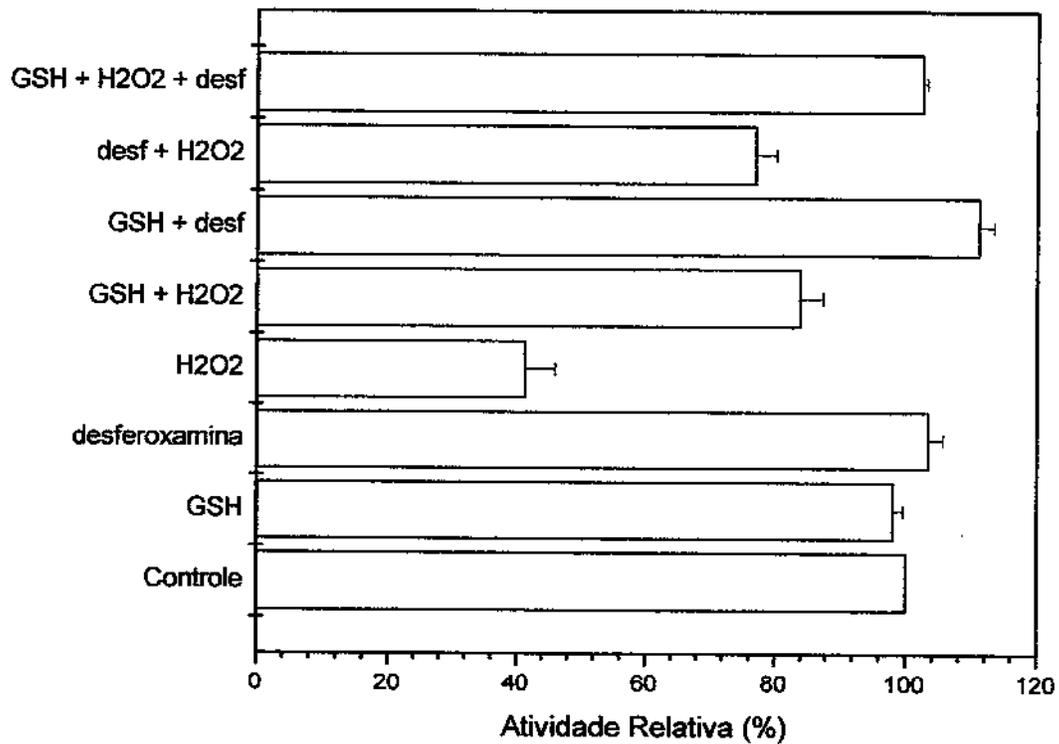


Figura 22. Efeito da desferroxamina e GSH na atividade enzimática da CD45 tratada com H₂O₂. As condições utilizadas foram as descritas em Métodos 4.9 em presença de 5 mM de GSH, 250 μ M de desferroxamina e 50 μ M de H₂O₂. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrão (SD).

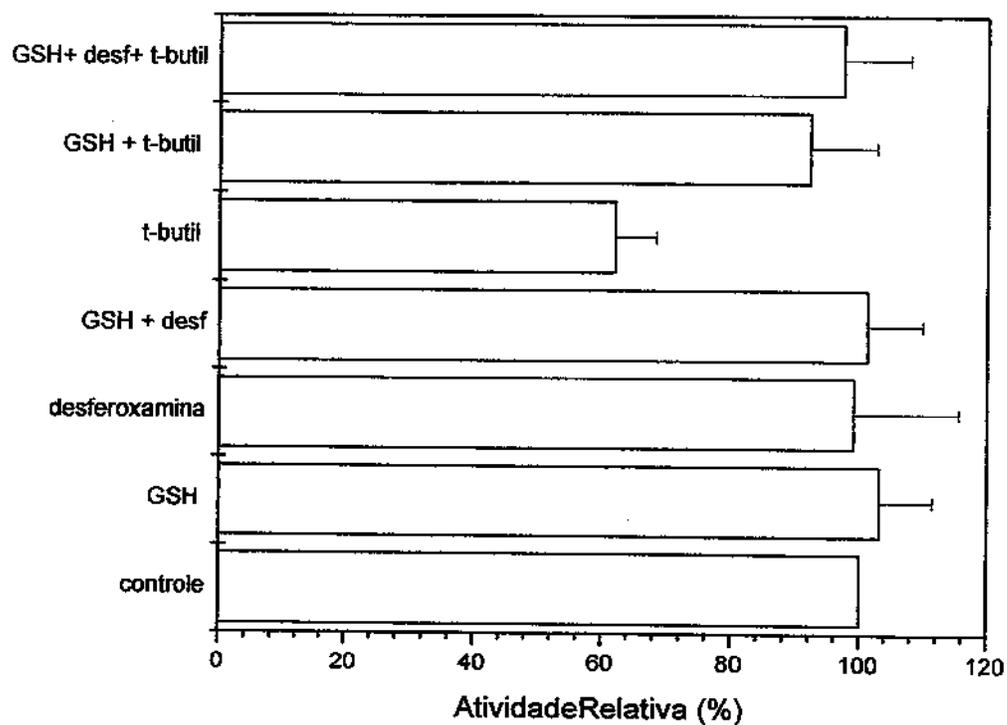


Figura 23. Efeito da desferroxamina e GSH na atividade da CD45 tratada com t-butil hidroperóxido. A atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos 4.9, utilizando-se 5 mM de GSH, 250 μ M de desferroxamina e 15 mM de t-butil hidroperóxido. Os experimentos foram realizados em triplicata e as barras representam os desvios padrão (SD).

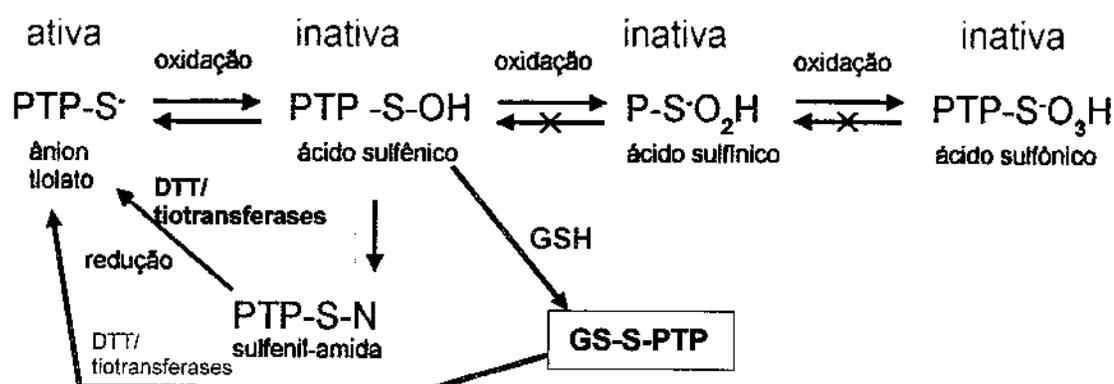


Figura 24. Esquema sobre oxidação de PTP. A cisteína do sítio catalítico está na forma de ânion tiolato sob condições normais devido ao seu baixo valor de pKa. A oxidação leva à formação de ácido sulfênico, e oxidações adicionais levam à formação irreversível de ácido sulfínico e sulfônico. Ácido sulfênico 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 DTT). A forma de ácido sulfênico pode ainda ser convertida em um intermediário glutationilada na presença de GSH. Na presença de agentes redutores, como DTT ou ainda tiotransferases, a enzima pode ser convertida a forma reduzida. Apenas a forma reduzida é cataliticamente ativa (Hertog *et al.*, 2005).

Com a finalidade de verificar se a CD45 apresenta esse mesmo mecanismo de proteção contra oxidação mostrado na figura 24, foi feito um estudo de pré-incubação com H₂O₂ durante 5 minutos a 25° C (figura 25). A pré-incubação da enzima com H₂O₂ inibiu em 100% a atividade enzimática, enquanto que a pré-incubação com GSH elevou a atividade enzimática em 70%. Quando se acrescentou H₂O₂ após a incubação com GSH, a atividade enzimática foi elevada em 20%.

Como a oxidação do ácido sulfênico da cisteína a ácido sulfínico e sulfônico é muito rápida, a GSH deve estar presente no meio de reação antes, ou juntamente com o agente oxidante para que, assim que oxidasse a cisteína a ácido sulfênico, formasse o intermediário sulfenilamida ou glutationilada, ambas formas inativas. Para que esses intermediários retornem a forma ativa, é necessária a presença de DTT ou tiotransferases. Os resultados sugerem que a CD45 pode formar um intermediário glutationilada ou sulfenilamida, que é

rapidamente reduzido a forma ativa, visto que não houve inibição da atividade enzimática, quando a mesma foi pré-incubada com GSH. Provavelmente a presença de pequenas quantidades de β -mercaptoetanol, um agente redutor, no tampão da enzima foi suficiente para retornar o cisteína para sua forma ativa, já que não foi acrescentado DDT no meio.

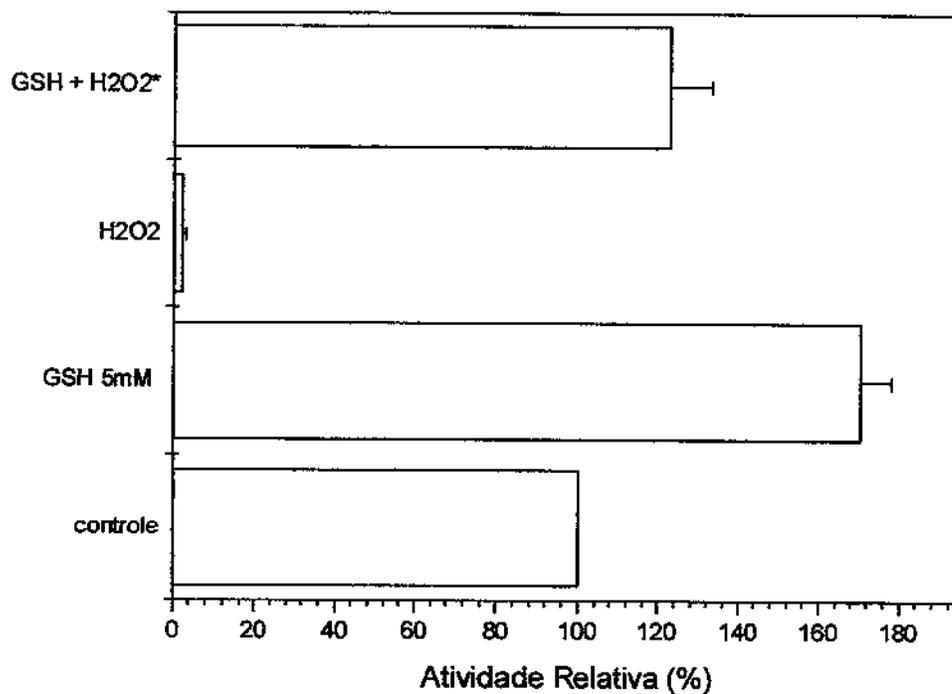


Figura 25. Estudo da pré-incubação da CD45 com H₂O₂. A enzima foi pré-incubada com H₂O₂ ou GSH durante 5 minutos a 25°C. Após este tempo, a atividade enzimática foi determinada como descrito em Métodos 4.8. *H₂O₂ foi adicionado ao meio de reação após a incubação da enzima com GSH.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como material de estudo a proteína tirosina fosfatase tipo receptor, CD45, de linfócitos humanos. A CD45 apresenta importante papel na proliferação e função linfocitária, sendo que um dos fatores que define a atividade dessa enzima é o estado redox celular. Assim, o objetivo geral desse trabalho foi avaliar a modulação redox da CD45 purificada. Utilizando-se de 2 etapas cromatográficas (troca iônica e exclusão molecular) a CD45 foi purificada 8,6 vezes com um rendimento de 34% e a atividade específica foi de 55 UE. A enzima obtida foi caracterizada através de estudos com inibidores e adicionalmente pela eletroforese bidimensional.

Os estudos de oxido-redução permitiram concluir que a atividade enzimática CD45 é inibida por agentes oxidantes, sendo que radicais livres como radical hidroxil tem efeito inibitório mais acentuado. Essa inibição é tempo dependente e não pode ser revertida por agentes redutores como GSH.

GSH apresenta proteção da enzima contra agentes oxidantes. O efeito protetor da GSH pode se dar de 3 formas:

- 1- O fato de a GSH estar em maior concentração que a enzima, e, portanto, ser mais susceptível a oxidação;
- 2- A GSH pode induzir a formação de um intermediário sulfenilamida, um intermediário inativo que, na presença de tióis, pode voltar para sua forma ativa;
- 3- A GSH pode formar um intermediário glutationilado com a enzima (GSH ligada à enzima pela cisteína catalítica) também uma forma inativa que na presença de tióis como DTT poderia retornar para sua forma ativa.

O presente trabalho apresentou contribuição na área científica, principalmente por propor uma metodologia para purificação rápida e de baixo custo da CD45, quando comparada com a CD45 recombinante, além de demonstrar que o estado redox celular é um dos fatores que determinará a atividade da CD45 e, conseqüentemente, a velocidade de ocorrências da via desencadeada pela CD45 que culmina na produção de IL-2.

7. DIFICULDADES ENCONTRADAS

Provavelmente a maior dificuldade encontrada no presente trabalho tenha sido encontrar uma condição ótima para manutenção da atividade enzimática por um tempo mais longo.

Utilizamos um anticorpo anti-CD45 com a finalidade de comprovar sua identidade, através de *imunoblotting*. Entretanto, anticorpo apresentou problemas, o que impossibilitou a obtenção desta informação.

Estudou-se também efeitos de flavonóides como agentes antioxidantes. Entretanto, problemas como o método de determinação da atividade enzimática e instabilidade da enzima, tornaram estes estudos pouco conclusivos.

8. PERSPECTIVAS

Entre as perspectivas provenientes do presente trabalho podemos mencionar:

- a) Necessidade de estudar com mais detalhes as condições para manter a estabilidade enzimática, principalmente após a coluna de filtração em gel. Isto permitiria realizar uma purificação até a homogeneidade, e trabalhar mais adequadamente com a enzima pura, sem necessidades de purificações frequentes.
- b) Com uma enzima mais estável seria possível a realização de um estudo cinético mais detalhado, por exemplo, com relação a inibidores, e com relação a possíveis substratos fisiológicos.
- c) Utilização de um anticorpo anti CD45 para definição de sua identidade.
- d) Retomada dos estudos de flavonóides como agentes antioxidantes, ou pró-oxidantes.

Estudos de envolvimento de radicais livres na regulação por óxido-redução da PTP de linfócitos humanos.

9. REFERÊNCIAS

- Abbas, A.K., Lichtmann A. H., Pober, J.S. (2000) Cellular and molecular immunology 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders.
- Abdul-Salam, F., Moulana, M.G.R and Mansour, M.H. (2000). **Age-related structural modulation of T lymphocyte-associated CD45 isoforms.** *Mech Ageing Devel.* 114: 21-35.
- Alexander, A. (2000) **The CD45 tyrosine phosphatase: a positive and negative regulator of immune cell function.** *Sem. Immunol.* 12: 349-359.
- Allen, R.G. and Tresini, M. (2000) **Oxidative stress and gene regulation.** *Free Rad. Biol. Med.* 28: 463-499.
- Alonso, A., Sasin, J.; Bottini, N., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., Mustelin, T. (2004) **Protein tyrosine phosphatases in the human genome.** *Cell.* 117: 699-711.
- 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.
- Autschbach, F., Palou, E., Mechttersheimer, G., Rohr, C., Piroto, F., Gassler, N., Otto, H.F., Schraven, B., Gaya, A. (1999) **Expression of the membrane protein tyrosine phosphatase CD148 in human tissues.** *Tissue Antigens.* 54: 485-98.
- Barford, D. (1996) **Molecular mechanism of the protein serine/threonine phosphatase.** *Trends Biochem. Sci.*, 21: 407-412
- Barrett, W.C., DeGnore, J.P., Keng, Y.J., Keng, Y.F., Zhang, Z.Y., Yim, M.B., Chock, P.B. (1999) **Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B.** *J. Biol. Chem.* 274: 34543-34546.
- Beausoleil S.A., Jedrychowski M., Schwartz D., Elias J.E., Villen J., Li J., Cohn M.A., Cantley L.C., Gygi S.P.(2004) **Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:12130-12135.
- Ben-Arie, A., Hagay, Z., Bem-Hurt, H., Open, M., Dgani, R. (1999) **Elevated serum alkaline phosphatase may enable early diagnosis of ovarian cancer.** *Eur. J. Obst. Gynecol. Reprod. Biol.* 86: 69-71.
- Bernier, L. and Wang, E. (1996) **A prospective view on phosphatases and replicative senescence.** *Exp. Gerontol.* 31: 13-19.

- Bialojan, C. and Takai, A. (1988) **Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases.** *Biochem. J.* 256: 283-290.
- Blanchetot, C., Tertoolen, L.G., Hertog J. den (2002) **Regulation of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha by oxidative stress.** *EMBO J.* 21: 493-503.
- Bradford, M. (1976) **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brito, A.N.M., Andrade, M.O., Pereira, T.M.M., Pereira, N.M.L., Silva, T.M.A. (2005) **A importância das proteínas fosfatases nos linfócitos humanos.** *NewsLab*, edição 69: 102-108.
- Budde, R.J.A. and Chollet, R. (1988) **Regulation of enzyme activity in plants by reversible phosphorylation.** *Physiol. Plant.* 72: 435-439.
- Buhrman, G., Parker, B., Sohn, J., Rudolph, J., Mattos, C. (2005) **Structural mechanism of oxidative regulation of the phosphatase Cdc25B via an intramolecular disulfide bond.** *Biochemistry* 44: 5307-5316.
- Burdon, R.H. (1995) **Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation.** *Free Rad. Biol. Med.* 18: 775-794.
- Buzalaf, M.A.R., Taga, E.M., Granjeiro, J.M., Ferreira, C.V., Lourenção, V.A., Ortega, M.M., Poletto, D.W., Aoyama, H. (1998). **Kinetic characterization of bovine lung low-molecular-weight acid phosphatase.** *Exper. Lung Res.*, 24: 269-272.
- Carmody, R.J. and Cotter, T.G. (2001) **Signalling apoptosis: a radical approach.** *Redox Rep.* 6: 77-90.
- Chiarugi, P. and Cirri, P. (2003) **Redox regulation of protein tyrosine phosphatase during receptor tyrosine kinase signal transduction.** *Trends Biochem. Sci.* 28: 509-514.
- Ferreira, C.V., Granjeiro, J.M., Taga, E.M., Aoyama, H. (1998). **Multiple forms of soybean seed acid phosphatases. Purification and characterization.** *Plant Physiol. Biochem.*, 36: 487-494.
- Foley, T.D., Armstrong, J.J., Kupchak, B.R. (2004) **Identification and H₂O₂ sensitivity of the major constitutive MAPK phosphatase from rat brain.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315:568-574.
- Forman, H.J., Torres, M., Fukuto, J. (2002) **Redox signaling.** *Mol. Cell. Biochem.* 234: 49-62.

- Frearson, J.A. and Alexander, D.R. (1996) **Protein tyrosine phosphatase in T-cell development, apoptosis and signaling.** *Immunol. Today*, 17: 385-390.
- Fréchet, M., Canitrot, Y., Czaux, C., Hoffmann, J. (2001) **DNA polymerase beta imbalance increases apoptosis and mutagenesis induced by oxidative stress.** *FEBS Lett.*, 505: 229-232.
- Garcia, A., Cayla, X., Guergnon, J., Dessauge, F., Hospital, V., Rebollo, M. P., Fleischer, A., Rebollo, A. (2003) **Serine/threonine phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis.** *Biochimie* 85: 721-6.
- Gaté, L., Paul, J., Nguyen BA, G., Tew, K.D. and Tapiero, H. (1999) **Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants.** *Biomed. Pharmacother.*, 53: 169-180.
- Gaté, L., Paul, J., Nguyen BA, G., Tew, K.D., Tapiero, H. (1999) **Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants.** *Biomed. Pharmacother.*, 53: 169-180.
- Gilbert, H. F., Mclearn V., Mclearn, M. (1990) **Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange.** *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 63: 69-172.
- González, F.J., Fauste, C., Burguillo, F.J., Dominguez, A. (1993) **Kinetic behaviour of a repressible acid phosphatase from the yeast *Yarrowia lipolytica*: a comparative study between the solubilized enzyme, the enzyme bound to cell-wall fragments and the enzyme bound to intact cells** *Biochim. Biophys. Acta* 1162:17- 27.
- Granjeiro, J.M., Ferreira, C.V., Granjeiro, P.A., Silva, C.C., Taga, E.M., Volpe, P.L.O., Aoyama, H. (2002) **Inhibition of bovine kidney low molecular mass phosphotyrosine protein phosphatase by uric acid.** *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 5: 345-350.
- Granjeiro, J.M., Ferreira, C.V., Jucá, M.B., Taga, E.M., Aoyama, H. (1997b) **Bovine kidney low molecular weight acid phosphatase: FMN-dependent kinetics.** *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 41:1201-1208.
- Granjeiro, J.M., Miranda, M.A., Maia, M.G.S.T., Ferreira, C.V., Taga, E.M., Aoyama, H. and Volpe, P.L.O. (2004) **Effect of Homologous Series of n-Alkyl Sulfates and n-Alkyl Trimethylammonium Bromides on Low Molecular Mass Phosphotyrosine Protein Phosphatase Activity.** *Mol. Cell. Biochem.*, 265:133-140.

- Granjeiro, J.M., Taga, E.M., Aoyama, H. (1997a). **Purification and Characterization of a Low-Molecular-Weight Bovine Kidney Acid Phosphatase.** *An. Acad. Bras. Ci.* 69: 451-460.
- Granjeiro, P.A., Ferreira, C.V., Granjeiro, J.M., Taga, E.M., Aoyama, H. (1999). **Purification and kinetic properties of a castor bean seed acid phosphatase containing sulfhydryl groups.** *Physiol. Plant.* 107: 151-158.
- Harrison, S., Page, C.P., Spina, D. (1999) **Airway nerves and protein phosphatases.** *Gen. Pharmacol.*, 32: 287-298.
- Hertog, J. den (1999) **Protein-tyrosine phosphatases in development.** *Mecham. Development*, 85: 3-14
- Hertog, J. den, Groen, A and Wijk, T van der. (2005) **Redox regulation of protein-tyrosine phosphatases.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 434: 11-15
- Hininger, I., Waters, R., Osman, M., Garrel, C., Fernholz, K., Anne Marie Roussel A.M., Anderson, R.A. (2005) **Acute prooxidant effects of vitamin C in EDTA chelation therapy and long-term antioxidant benefits of therapy.** *Free Rad. Biol. Med.*, 38: 1565-1570
- Hollander, P.V. (1971) **Acid phosphatases.** In *The Enzymes*, vol IV, 2nd ed. Edited by Boyer P.D.N.Y. Academic Press, NY.
- <http://ca.expasy.org/uniprot/Q12913>, acessado em 6 de julho 2005
- <http://ca.expasy.org/uniprot/P0857>, acessado em 6 de julho 2005
- Huntington, N.D. and Talinton, D.M. **CD45: direct and indirect government of immune regulation.** *Immunol. Lett.* 94:167-174.
- Irie-Sasaki, J., Sasaki, T., Matsumoto, W., Opavsky, A., Cheng, M., Welstead, G., Griffiths, E., Krawczyk, C., Richardson, C.D., Aitken, K., Iscove, N., Koretzky, G., Johnson, P., Liu, P., Rothstein, D.M., Penninger, J.M., 2001. **CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling.** *Nature*, 409: 349-354.
- Jia, Z. (1997) **Protein phosphatase: structure and implications.** *Biochem. Cell. Biol.*, 75: 17-26.
- Jin, N., Hatton, N.D., Harrington, M.A., Xia, X., Larsen, S.H., Rhoades, R.A. (2000) **H₂O₂-induced egr-1, fra-1, and c-jun gene expression is mediated by tyrosine kinase in aortic smooth muscle cells.** *Free Rad. Biol. Med.*, 29: 736-746.
- Jonhson, L. N. and Barford, D. (1993) **The effects of phosphorylation on the**

- structure and function of proteins** *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 22:199-232.
- Kawada, M., Amemiya, M., Ishizuka, M., Takeuchi, T. (1999) **Cytostatin, an inhibitor of cell adhesion to extracellular matrix, selectively inhibits protein phosphatase 2A.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1452: 209-217.
- Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J., Woodgett, J.R. (1994) **The stress-activated protein kinase subfamily of c-jun kinases.** *Nature*, 369: 156-160.
- Laemmli, U.K. (1970) **Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*, 227: 680-685.
- Laidler, P.M., Taga, E.M., Etten, R.L. van (1982) **Human liver acid phosphatases: Cysteine residues of the low-molecular-weight enzyme.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 216: 512-521.
- Lee, K, Esselman, W. J. (2002) **Inhibition of PTPs by H₂O₂ regulates the activation of distinct MAPK pathways.** *Free Rad. Biol. Med.* 33: 1121-1132.
- Lee, R.B. (1988) **Phosphate influx and extracellular phosphatase activity in barley roots and rose cells.** *New Phytol.* 109:141-148.
- Li, L. and Dixon, J.E (2000) **Form, function, and regulation of protein tyrosine phosphatases and their involvement in human diseases.** *Seminars Immunol.*, 12: 75-84.
- Mackintosh, C. and Mackintosh, R.W. (1994) **Inhibition of protein kinases and phosphatases.** *Trends Biochem. Sci.*, 19: 444-448.
- Maehama, T. and Dixon, J.E. (1998) **The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate.** *J. Biol. Chem.*, 273: 13375-13378.
- Matés, J.M. and Sánchez-Jiménez, F.M. (2000) **Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy** *Inter. J. Biochem. Cell Biol.*, 32: 157-170.
- Mccullough K. C., Basta, S., Knotig, S., Gerber, H., Schaffner, R., Kim, Y.B., Saalmuller, A. (1999) **Intermediate stages in monocyte-macrophage differentiation modulate phenotype and susceptibility to virus infection.** *Immunol.*, 98: 203-212.

- McNeill, L., Cassady, R.L., Sarkardei, S., Cooper, J.C., Morgan, G., Alexander, D.R. (2004) **CD45 isoforms in T cell signalling and development.** *Immunol. Lett.* 92: 125-134.
- Meister, A. (1991) **Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal-applications in research and therapy** *Pharmacol Therap*, 51: 155-194.
- Meng, T.C., Fukada, T. and Tonks, N.K. (2002) **Reversible Oxidation and Inactivation of Protein Tyrosine Phosphatases In Vivo.** *Mol. Cell.* 9: 387-399.
- Miranda, M.A., Okamoto, A.K., Ferreira, C.V., Silva, T.L., Granjeiro, J.M. and Aoyama, H. (2005) **Differential effects of flavonoids on bovine kidney low molecular mass protein tyrosine phosphatase.** *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, Aceito para publicação.
- Montfort, R.L.M. van, Congreve, M., Tisi, D., Carr, R., Jhoti, H. (2003) **Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B.** *Nature*, 423: 773-777.
- Moulay, L. and Robertgero, M. (1995) **Leishmania donovani: Enhanced Expression of Soluble Acid Phosphatase in the Presence of Sinefungin, an Antiparasitic Agent.** *Exp. Parasitol.* 80: 8-14.
- Mustelin, T. and Altman, A., 1990. **Dephosphorylation and activation of the T cell tyrosine kinase pp56lck by the leukocyte common antigen (CD45).** *Oncogene*, 5: 809-813.
- Grisk, O., Küster, U., Ansorge, S. (1993). **The activity of γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT) in populations of mononuclear cells from human peripheral blood.** *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* 374:287.
- Mustelin., T., Alonso, A., Bottini, N., Huynh, H., Rahmouni, S., Nika, K., Louis-dit-Sully, C., Tautz, L., Togo, S.H., Bruckner, S., Mena-Duran, A.V., al-Khoury A.M. (2004) **Protein tyrosine phosphatases in T cell physiology.** *Mol. Immunol.*, 41: 687-700.

- Nakahara, J., Seiwa, C., Tan-Takeuchi, K., Gotoh, M., Kishihara, K., Ogawa, M., Asou, H., Aiso, S. **Involvement of CD45 in central nervous system myelination.** *Neurosc. Lett.* 379: 116-121.
- Neel, B.G. and Tonks, N.K. (1997) **Protein tyrosine phosphatases in signal transduction.** *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 9:193-204.
- Östman, A and Böhmer, D.F. (2001) **Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases.** *Trends Cell Biol.*, 11: 258-266.
- Palou, E, Fluente-Garcia, M.A., Nicolas, J.M., Villardell, C., Vives, J., Gayá, A. (1997) **CD148, a membrane protein tyrosine phosphatase, is able to induce tyrosine phosphorylation on human lymphocytes.** *Immunol. Lett.*, 57: 101-103.
- Paolicch, A., Dominici, S., Piere, L., Maellaro, E., Pompella, A. (2002) **Glutathione catabolism as a signaling mechanism.** *Biochem. Pharmacol.*, 64: 1027-1035.
- Pills, B. and Schultz, J. (2004) **Evolution of the multifunctional protein tyrosine phosphatase family.** *Mol. Biol. Evol.* 21: 625-631.
- Podmore I.D., Griffiths, H.R., Herbert, K.E., Mistry, N., Mistry, P., Lunec, J. (1998) **Vitamin C exhibits pro-oxidant properties.** *Nature.* 392: 559.
- Preneta, R., Jarraud, S., Vincent, C., Doublet, P., Duclos, B., Etienne, J., Cozzone, A.J. (2002) **Isolation and characterization of a protein-tyrosine kinase and a phosphotyrosine-protein phosphatase from *Klebsiella pneumoniae*.** *Comp. Biochem. Physiol. (B)*, 131: 103-112.
- Raugei, G., Ramponi, G., Chiarugi, P. (2002). **Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart.** *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 941-949.
- Rober Júnior, R.L, Hoer, N.F., Vellasco, A. P. Kubota, L.T. (2001) **Antioxidant system involving the glutathione metabolic cycle associated to electroanalytical methods in the oxidative stress evaluation.** *Quim. Nova*, 24:112-119.
- Ruff, S. J.; Chen, K. and Cohen, S. (1997) **Peroxovanadate induces tyrosine phosphorylation of multiple signalling proteins in mouse liver and kidney.** *J. Biol. Chem.*, 272, 1263-1267.
- Rusnak, F. and Reiter, T. (2000) **Sensing electrons: protein phosphatase redox regulation.** *Trends Biochem. Sci.*, 25: 527-529.
- Sasaki, T., Sasaki-Irie, J., Penninger, J.M. (2001). **New insights into the transmembrane protein tyrosine phosphatase CD45.** *J. Biol. Chem.*, 33: 1041-1046.

- Schraven, B., Hegen, H., Autschbach, F., Gayá A, Schwartz, C., Meuer, S., in Kishimoto, (ed), Cluster report Cd148-lueocyte typing VI, Garland Publishings, New York, 1997 in press.
- Shenoi, H., Seavitt, J., Zheleznyak, A., Thomas, M., Brown, E. (1999). **Regulation of integrin-mediated T cell adhesion by the transmembrana protein tyrosine phosphatase CD45.** *J. Immunol.*, 162: 7120-7127.
- Song J.H., Shin, S.H., Ross, G.M. (2001) **Oxidative stress induced by ascorbate causes neuronal damage in an in vitro system.** *Brain Res.* 895: 66-72
- Stoker, A.W. (2005) **Protein tyrosine phosphatases and signalling.** *J. Endocrinol.* 185: 19-33.
- Sullivan, S.G, Chiu, D.T.Y., Errasfa, M., Wang, J.M., Qi, J.S., Stern, A. (1994) **Effects of H₂O₂ on protein tyrosine phosphatase activity in HER14 cells.** *Free Rad. Biol. Med.*, 16: 399-403.
- Sumner, J.B. (1944) **A method for the colorimetric determination of phosphorus.** *Science*, 100: 413-414.
- Switzer, R.C., Merrill, C.R., Shifrin S. (1979) A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 98: 231-237.
- Takagi, T., Moore, C. R., Diehn, F., Buratowski, S. (1997) **An RNA 5'-triphosphatase related to the protein tyrosine phosphatase.** *Cell*, 89: 867-873.
- Thannickal, V.J. and Fanburg, B.L. (2000). **Reactive oxygen species in cell signaling.** *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* 279: 1005-1028
- Thomas, J.A. and Mallis, R.J. (2001) **Aging and oxidation of reactive protein sulfhydryls.** *Exp. Gerontol.* 36: 1519-1526.
- Tonks, N. K. and Neel, B. G. (1996) **From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases.** *Cell.* 87: 365-368.
- Tonks, N.K. (2005) **Redox Redux: Revisiting PTPs and the Control of Cell Signaling.** *Cell* 121:667-670.
- Torres, M. (2003) **Mitogen-activated protein kinase pathway in redox signaling.** *Front. Biosc.* 8:D369-D391.
- Tracey, A. S. (2000) **Hydroxamino vanadates: aqueous chemistry and function in protein tyrosine phosphatase and cell cultures.** *J. Inorg. Biochem.* 80: 11-16.
- Trowbridge, I. S. (1991). **A prototype for transmembrana protein tyrosine phosphatases.** *J. Biol. Chem.*, 266: 23517-23520.

- Tsiani, E. and Fantus, I.G. (1997) **Vanadium Compounds: Biological Actions and Potential as Pharmacological Agents.** *Trends Endocr. Met.*, 8: 51-58.
- Tsuchiya, T., Ikeda, N., Obara, K. And Hartshome, D.J. (1997) **A Type 2A Protein Phosphatase from Clam Smooth Muscle. Use of 4-Methylumbelliferyl Phosphate as Substrate.** *Comp. Biochem. Physiol (B)*, 118: 17-21.
- Vetter, S.W., Keng, Y.F., Laurence, D.S., Zhang, Z.Y. (2000) **Assessment of Protein-tyrosine Phosphatase 1B Substrate Specificity Using "Inverse Alanine" Scanning.** *J. Biol. Chem.*, 275: 2265-2268.
- Wallace, C. and Keast, D. (1992) **Glutamine and macrophage function.** *Metabolism.*, 9: 1016-1020.
- Wang, Q., Scheigetz, J., Gilbert, M., Snider, J., Ramachandran, C. (1999) **Fluorescein monophosphates as fluorogenic substrates for protein tyrosine phosphatases** *Biochim. Biophys. Acta*, 1431: 14-23.
- Wang, S., Stauffacher, C.V. and van Etten, R.L. (2000) **Structural and mechanistic bases for the activation of low-molecular weight protein tyrosine phosphatase by adenine.** *Biochemistry*, 39: 1234-1242.
- Wang, W.Q., Sun, J.P., Zhang, Z.Y. (2003) **An overview of the protein tyrosine phosphatase superfamily.** *Curr. Top. Med. Chem.* 3: 739-748.
- Wijk, T. van der, Blanchetot, C., Hertog, J. den (2005) **Regulation of receptor protein-tyrosine phosphatase dimerization.** *Methods*, 35: 73-79
- Williamson, D.H., Lund, P., Krebs, H.A. (1967) **The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver.** *Biochem. J.*, 103: 514-527.
- Wu, F. Y.H., Sun, T.P. (1999) **Vitamin K3 induces cell cycle arrest and cell death by inhibiting cdc25 phosphatase.** *Eur.J. Cancer* 35: 1388-1393.
- Yakura, H. (1998) **Phosphatases and kinases in lymphocyte signaling.** *Immunol. Today* 19: 198-201.
- Yassad, A., Lavoigne, A., Bion, A., Daveau, M., Husson, A. (1997) **Glutathione accelerates interleukin-6 production by rat peritoneal macrophages in culture.** *FEBS Lett.*, 1: 81-84.
- Zhang, M., Zhou, M., Van Etten, R. L. and Stauffacher, C. V. (1997) **Crystal structure of bovine low molecular weight phosphotyrosyl phosphatase complexed with the transition state analog vanadate.** *Biochemistry*, 36: 15-23.

-
- Zhang, Z. Y. (2003) **Chemical and mechanistic approaches to the study of protein tyrosine phosphatases.** *Acc. Chem. Res.* 36: 385-92.
- Zhang, Z. Y. and van Etten, R. L. (1990) **Purification and characterization of a low-molecular-weight acid phosphatase – a phosphotyrosyl protein phosphatase from bovine heart.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 282: 39-49.
- Zhang, Z.Y. (2001) **Protein tyrosine phosphatases: prospects for therapeutics.** *Cur..Op. Chem. Biol.* 5: 416-423.
- Zhang, Z.Y. (2002) **Protein tyrosine phosphatases: Structure and function, substrate specificity, and inhibitor development.** *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42 209-234.