

Carlos Termignoni

PERFUSÃO DO FÍGADO DE RATO COM TRITON X-100: REMOÇÃO
E CARACTERIZAÇÃO DE UMA AMINOPEPTIDASE
CININO-CONVERSORA E DE UMA ARILAMIDASE

Tese de Mestrado apresentada
à Escola Paulista de Medicina

São Paulo
1980

CARLOS TERMIGNONI

PERFUSÃO DO FÍGADO DE RATO COM TRITON X-100: REMOÇÃO
E CARACTERIZAÇÃO DE UMA AMINOPEPTIDASE
CININO-CONVERSORA E DE UMA ARILAMIDASE

Tese preparada no Departamento de Bioquímica durante o curso de pós-graduação em Biologia Molecular e apresentada à Escola Paulista de Medicina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadores: Jorge Almeida Guimarães
José Leal Prado

À Regina

Forneceram recursos financeiros para
a realização deste trabalho:

PICD / CAPES

FINEP

AGRADECIMENTOS

a Jorge Almeida Guimarães pela orientação segura e mais ainda pela amizade que ofereceu;

a José Leal Prado pelo exemplo;

a José Olavo de Freitas Jr., amigo e companheiro, pela in finita paciência;

a Antônio João Sã de Siqueira pelo incentivo e confiança que depositou;

a Durval Rosa Borges pela constante assistência;

A Claudio Augusto Machado Sampaio, Dalton Ramalho Weigl, Maria Luiza Villela Oliva e em especial a Hercília Maris Molina pela indispensável colaboração.

ã Eline S. Prado, Helena B. Nader, Yara M. C. da Silva Michelacci, Mariana S. Araujo-Viel; Catharina M.W. Brandi, Regina C.R. Stella, Misako U. Sampaio e Carl P. Dietrich pelo apoio;

ã Célia R.R.S. Carlini; Maria Kouyoumdjiam, Anita H. Straus, Madalena M.N.S. Pares e Helio K. Takahashi pelo incentivo;

ã Maria Manuela R. de Caldevilla, Eglelisa G. de Andrade e Manoel B. Torres da Silva pelo auxílio;

aos colegas do DECLIM e à Prô-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da UFRGS pela oportunidade que proporcionaram;

e também a todos dos Departamentos de Bioquímica e Farmacologia da Escola Paulista de Medicina pela maneira fraterna com que me receberam

muito obrigado

INDICE

	PÁG.
INTRODUÇÃO	
Aminopeptidases	01
Papel fisiológico das aminopeptidases	07
Aminopeptidases cinino-conversoras	10
Objetivos	14
MATERIAL	15
MÉTODOS	
Perfusão do fígado "in situ"	20
Concentração de amostras diluídas	24
Ensaio da atividade enzimática	25
Determinação de proteína	30
Tratamento da resina e preparo das colunas de DEAE-celulose	31

PÁG.

Preparo da coluna de Bio Gel A _{0,5} m	33
Determinação de pesos moleculares	33

RESULTADOS

Sistemas de perfusão	34
Caracterização preliminar das enzimas	41
Fracionamento do perfusato	50
Propriedades gerais das enzimas	59

DISCUSSÃO	78
-----------------	----

CONCLUSÕES	94
------------------	----

BIBLIOGRAFIA	96
--------------------	----

ABREVIATURAS

- AANA - aminoacil-2-naftilamida
AANH₂ - aminoacilamida
AApNA - aminoacil-p-nitroanilida
AlaNA - alanil-2-naftilamida
ArgNA - arginil-2-naftilamida
BK - bradiginina
LBK - leucil-bradiginina
LeuNA - leucil-2-naftilamida
MetNA - metionil-2-naftilamida
MLBK - metionil-lisil-bradiginina

INTRODUÇÃO

Aminopeptidases

Aminopeptidases são α -amino-peptidil hidrolases dotadas de especificidade não restrita para a hidrólise da ligação peptídica envolvendo L-aminoácidos localizados na posição N-terminal de proteínas e peptídeos. Devido a esta especificidade relativa a literatura a respeito de aminopeptidases é extensa e confusa. Estas enzimas hidrolisam também L-aminoacil-p-nitroanilidas (AAPNA) e L-aminoacil-2-naftilamidas (AANA) liberando aminoácidos e p-nitroanilina ou 2-naftilamina, proporcionando, neste caso, um conveniente meio para o ensaio de suas atividades (Fig. 1). Por sugestão de G.G. Glenner (PATERSON et al; 1963) a hidrólise de aminoacil-2-naftilamidas foi denominada atividade arilamidásica.

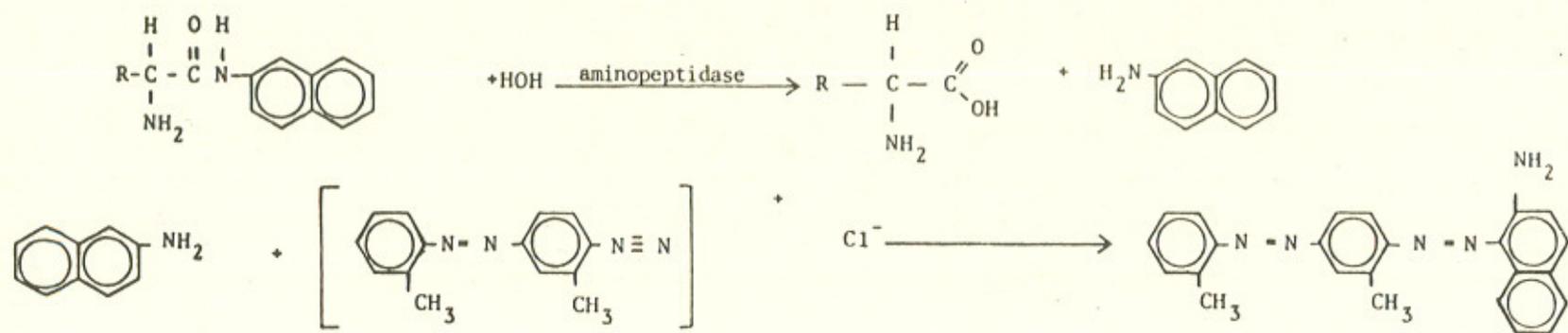


Fig. 1 - Ensaio da atividade arilamidásica de aminopeptidases. A enzima hidrolisa a ligação amida liberando aminoácido e 2-naftilamina. A 2-naftilamina reage com sal de garnet (o-aminoazotolueno) formando um composto com absorvância máxima em 525 nm que é mantido em solução no meio contendo detergente.

Em 1968 Marks sugeriu que a inibição por puromicina poderia discriminar aminopeptidases de arilamidases pois este antibiótico inibiria apenas arilamidases sem ação sobre peptídeos. Entretanto, aminopeptidases típicas (CAMARGO et al, 1972; GUIMARÃES et al, 1973; BORGES et al, 1974) são inibidas por puromicina. Assim o termo aminopeptidase deveria ser reservado apenas para enzimas que comprovadamente tenham ação sobre peptídeos e proteínas, empregando-se a expressão arilamidase para enzimas que hidrolisam AANA e cuja ação sobre peptídeos é nula ou ainda desconhecida.

O Comitê de Nomenclatura da International Union of Biochemistry (1968) menciona e classifica as aminopeptidases da seguinte forma:

Nº	NOME
3.4.11.1	Aminopeptidase (citosol)
3.4.11.2	Aminopeptidase (microsomal)
3.4.11.3	Cistil-aminopeptidase
3.4.11.4	Tripeptídeo-aminopeptidase
3.4.11.5	Prolina-iminopeptidase
3.4.11.6	Arginina-aminopeptidase

Nº	NOME
3.4.11.7	Aspartato-aminopeptidase
3.4.11.8	Piroglutamil-aminopeptidase
3.4.11.9	Aminopeptidase P
3.4.11.10	<u>Aeromonas proteolytica</u> - aminopeptidase
3.4.11.11	Aminopeptidase
3.4.11.12	Aminopeptidase termofílica
3.4.11.13	<u>Clostridium histolyticum</u> - aminopeptidase
3.4.11.14	Aminopeptidase (fígado humano)

Cinco das enzimas mencionadas na classificação são de origem exclusivamente bacteriana: prolina-iminopeptidase (EC 3.4.11.5); aminopeptidase P (EC 3.4.11.9); Aeromonas proteolytica - aminopeptidase (EC 3.4.11.10); aminopeptidase termofílica (EC 3.4.11.12) e Clostridium histolyticum - aminopeptidase (EC 3.4.11.13). A piroglutamil-aminopeptidase (EC 3.4.11.8) parece ser também de origem exclusivamente bacteriana pois sua presença no fígado de rato não foi ainda confirmada.

Aminopeptidase do citosol (EC 3.4.11.1) é a clássica leucina-aminopeptidase e foi obtida de rim suíno (SPACKMAN et al, 1955). Apesar de conter Zn^{2+} na molécula (HIMMELOCH, 1969)

é ativada por Mn^{2+} e Mg^{2+} (SMITH e SPACKMAN, 1955). Tem alta especificidade sobre leucinamida; di- e tripeptídeos contendo L-leucina na extremidade N-terminal (SMITH e SPACKMAN, 1955).

Foi contudo demonstrado por Paterson et al (1963) que enzimas distintas hidrolisam leucinamida e LeuNA. Por isto a atividade sobre este último substrato não pode ser creditada exclusivamente à leucina-aminopeptidase (LAP). Além disso, a atividade arilamidásica da LAP com LeuNA, MetNA e sobre polipeptídeos como substratos é muito baixa em relação à sua atividade sobre Leu-Gly-Gly (BORGES et al, 1974). Desta forma a LAP se comporta mais propriamente como uma tripeptidase do que como uma típica aminopeptidase.

A aminopeptidase microsomal (EC 3.4.11.2) foi purificada (WACHSMUTH et al, 1966) da fração microsomal do rim suíno. É uma metalo-enzima que contém Zn^{2+} e tem natureza glicoproteica (WACHER, 1974). Hidrolisa preferencialmente ligações envolvendo resíduos de alanina N-terminal e tem pH ótimo em 9,0.

A cistil-aminopeptidase ou oxitocinase (EC 3.4.11.3) foi identificada no soro de primatas prenhes. É, aparentemente, produzida no sinciotroflasto (PAGE et al, 1961); hidrolisi-

sa a ligação peptídica do resíduo de cisteína N-terminal da oxitocina (Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu) e também da L-cisteína-di-2-naftilamida (TUPPY e NESVADBA, 1957) sem redução das respectivas pontes dissulfeto.

A tripeptidil-aminopeptidase (EC 3.4.11.4) tem pH ótimo em 7,8; a atividade perdida na diálise contra agentes quelantes é recuperada por Co^{2+} , Mg^{2+} ou Mn^{2+} . É totalmente inibida por oxidantes de -SH. Requer substratos com grupos carboxílico e amino livres e separados por uma distância equivalente a três resíduos de aminoácidos (CHENOWETH et al, 1973).

A arginina-aminopeptidase (EC 3.4.11.6), obtida de fígado de rato, age somente sobre AANA de aminoácidos básicos (ArgNA e LysNA) e dipeptídeos. A enzima depende de cloreto e é inibida por p-hidroximercuribenzoato, cisteína, 1,10-fenantrolina, Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+} e Pb^{2+} (HOPSU et al, 1966a; HOPSU et al, 1966b).

A aspartato aminopeptidase (EC 3.4.11.7), obtida de rim e duodeno de rato e de duodeno de suíno (GLENNER et al, 1962), embora tendo ação sobre Glu-Phe e Arg-Arg só hidrolisa AANA de ácido glutâmico e ácido aspártico. Inativa também angiotensinas I e II por remoção dos respectivos resíduos de Asp N-terminais (ONO et al, 1968).

A aminopeptidase (EC 3.4.11.11) purificada por Donlon e Fottrell (1973) a partir de íleo de cobaio é ativada por Mn^{2+} . Hidrolisa LeuNA e um grande número de di- e tripeptídeos mas não age sobre LeupNA e tetrapeptídeos.

A aminopeptidase (EC 3.4.11.14) obtida por Behal et al (1969) do fígado humano também foi encontrada no rim humano (KAO et al, 1978). Esta enzima, embora com maior especificidade para AlaNA, age também sobre AANA de aminoácidos básicos. É formada por duas sub-unidades iguais de 119 000 daltons contendo um átomo de Zn por sub-unidade (KAO et al, 1978).

A atividade sobre peptídeos de algumas das enzimas listadas pela Comissão de Nomenclatura nunca foi determinada. Mesmo os estudos em que eram empregadas preparações homogêneas de enzimas foram realizados exclusivamente com AANA, AApNA ou $AANH_2$ como substratos. Assim a classificação destas enzimas como aminopeptidases é duvidosa pois já foi demonstrada a discrepância existente entre atividades arilamidásica e aminopeptidásica (MARKS et al, 1968; FREITAS Jr. et al, 1979a). Além disto o emprego de AANA e AApNA de aminoácidos distintos em várias das publicações não permite uma boa compreensão entre os resultados da literatura e é a fonte da introdução de conceitos errôneos no conhecimento das aminopeptidases. Como estas enzi-

mas não têm especificidade absoluta, o emprego indiscriminado de substratos diferentes torna impossível determinar a que enzima se referem os resultados apresentados em muitos trabalhos.

Apesar de obtidas de fontes diferentes algumas das enzimas listadas pela Comissão de Nomenclatura possuem especificidade e outras propriedades semelhantes, não estando as sim excluída a possibilidade de que se trate de uma mesma enzima.

Papel fisiológico das aminopeptidases

A alta taxa de renovação ("turnover") de enzimas e de outras proteínas nobres em tecidos e líquidos biológicos constitui fato intrigante para a biologia (SCHINKE e BRADLEY, 1975). Esta renovação contínua de proteínas se constitui em um processo de aparente desperdício celular implicando em de gradação enzimática (proteólise) e imediata síntese "de novo" de tais moléculas, a qual, por sua vez, requer disponibilidade de aminoácidos livres. Embora o mecanismo de renovação de proteínas ainda não seja conhecido a participação de endo- e

exopeptidases é inevitavelmente admitida.

A ação hidrolítica de exopeptidases (amino- e carboxipeptidases) é essencial para a degradação intracelular de proteínas até aminoácidos. Assim as aminopeptidases poderiam estar envolvidas tanto nos processos de inativação como nos de síntese de proteínas, neste caso colocando aminoácidos livres à disposição dos mecanismos biossintéticos.

Um outro aspecto importante do papel fisiológico das aminopeptidases é o seu possível envolvimento na remoção da metionina na cadeia polipeptídica de proteínas recém sintetizadas. Como se sabe tanto em células procarióticas como em eucarióticas a metionina, formilada ou não, é o aminoácido iniciador da síntese ribossomal de proteínas. Metionina ou formil-metionina é removida posteriormente da cadeia polipeptídica por ação direta ou combinada de uma deformilase seguida, presumivelmente, de uma aminopeptidase. Neste processo a metionina é preservada para a síntese de novas proteínas. Embora a existência dessa aminopeptidase não tenha sido ainda proposta em definitivo, descrevemos recentemente (FREITAS Jr. et al, 1979b; TERMIGNONI et al, 1979; TERMIGNONI et al, 1980) no fígado de rato uma metionil-aminopeptidase particulada (microsomal e mitocondrial) com ação hidrolítica preferencial para

resíduo N-terminal de metionina. O papel dessa enzima no mecanismo de usura pelo qual metionina é removida da cadeia polipeptídica nascente e transferida para o seu t-RNA específico não foi ainda esclarecido.

A participação de aminopeptidases na regulação metabólica, especialmente na regulação da atividade (ativação e inativação) de hormônios peptídicos está, em alguns casos, bem caracterizada. Tuppy e Nesvadba (1957) demonstraram que a inativação da oxitocina por plasma de mulheres grávidas ocorre por ação de uma aminopeptidase que hidrolisa a ligação peptídica do resíduo N-terminal deste octapeptídeo ativo sobre a musculatura lisa. A inativação da angiotensina II que ocorre por remoção do resíduo N-terminal (PAIVA e PAIVA, 1960) pode também ocorrer fisiologicamente por ação de uma angiotensinase (ONO et al, 1968; KOBUKU et al, 1969).

Mais recentemente o papel de aminopeptidases na inativação de outros hormônios peptídicos tem sido sugerido. O fator de liberação do hormônio estimulante de melanócitos (L-Pro-Leu-GlyNH₂) é inativado por uma aminopeptidase do cérebro bovino (SIMMONS E BRECHER, 1973). A inativação de Leu- e Met-encefalina (L-Tyr-Gly-Gly-Phe-^{Leu}_{Met}) por uma aminopeptidase associada à membranas cerebrais foi demonstrada por Knight (1978).

Entre os processos de ativação de hormônios peptídicos foi sugerida a participação de aminopeptidases na conversão de cininas tanto no plasma e urina humanos (WEBSTER e PIERCE, 1963) como no plasma canino (ERDÖS et al, 1963) onde a lisil-bradicinina (LBK) seria convertida em bradicinina (BK, L-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) pela remoção do resíduo de lisina N-terminal.

Qualquer que seja o processo envolvendo aminopeptidases, ativação ou inativação de hormônios peptídicos, um melhor conhecimento das propriedades destas enzimas é fundamental, principalmente para determinar qual a importância fisiológica destas enzimas no metabolismo desses hormônios peptídicos.

Aminopeptidases cinino-conversoras

A hidrólise dos resíduos N-terminais da metionil-lisil-bradicinina (MLBK) e da lisil-bradicinina (LBK) por aminopeptidases foi denominada atividade cinino-conversora (GUIMARÃES et al, 1971). Nesta reação a bradicinina é o produto limite da ação enzimática devido à presença do resíduo de proli

na na posição 2 da molécula do peptídeo produto (GUIMARÃES, 1972).

Embora a sugestão da participação de aminopeptidases na conversão de cininas tenha sido feita anteriormente (WEBSTER e PIERCE, 1963; ERDÖS et al, 1963), Prado et al (1969) foram os primeiros a demonstrar a existência no plasma equino, de uma aminopeptidase capaz de converter lisil-bradicinina em bradicinina. Na purificação desta enzima a partir do plasma humano foi verificado um paralelismo entre as atividades conversora e arilamidásica (GUIMARÃES, 1972; GUIMARÃES et al, 1973). A purificação, a partir do fígado humano, de uma enzima semelhante sugere que a enzima do plasma tenha origem hepática (BORGES et al, 1974; FREITAS Jr. et al, 1979a) e, possivelmente seja semelhante senão a própria aminopeptidase (EC 3.4.11.14) descrita por Behal (1969). Da urina humana também foi purificada uma aminopeptidase com propriedades semelhantes às das enzimas do plasma e do fígado (BRANDI et al, 1976). Camargo et al (1972) separaram do cérebro de coelho uma cininase e uma enzima conversora que também hidrolisa diferentes AANA. Estes autores demonstraram ainda que esta aminopeptidase remove sequencialmente metionina e lisina de metionil-lisil-bradicinina.

Uma arilamidase com especificidade para ArgNA e Lys-NA foi purificada do fígado de rato por Hopsu et al (1964). A enzima, EC 3.4.11.6, denominada aminopeptidase B (HOPSU et al, 1966a) seria capaz de converter lisil-bradiginina em bradiginina. Na ilustração do experimento (uma cromatografia em papel) de conversão publicado (HOPSU et al, 1966c) não fica claro e inequívocamente comprovado que houve hidrólise da ligação Lys-Arg do substrato. Esta foi a única oportunidade em que procuraram demonstrar atividade aminopeptidásica típica para a aminopeptidase B. A existência de atividade arilamidásica desta enzima foi posteriormente demonstrada em vários tecidos (MÄKINEN et al, 1969; MÄKINEN, 1968; MÄKINEN, 1968; MÄKINEN e MÄKINEN, 1971; MÄKINEN, 1972; MÄKINEN e MÄKINEN, 1972; MÄKINEN e MÄKINEN, 1978). Em nenhuma destas publicações, no entanto, os autores fizeram estudos com peptídeos, especialmente lisil-bradiginina, substrato tido como responsável pelo seu possível papel fisiológico. Assim a atividade aminopeptidásica desta enzima permanece por ser desvendada. Contrariamente, Freitas Jr. et al (1979a) purificaram parcialmente do fígado humano uma arilamidase com propriedades semelhantes à aminopeptidase B, mas desprovida de atividade aminopeptidásica e apresentando preferência para a hidrólise de dipeptídeos contendo resíduos de ar

ginina ou lisina N-terminais. Desta forma foi proposto que a aminopeptidase B do fígado humano teria características de uma dipeptidase (FREITAS Jr. et al, 1979a).

Estudando o catabolismo de cininas por órgãos do rato submetidos a perfusão "in situ" com "by pass" pulmonar, Prado et al (1975) observaram que além de inativação de bradicinina havia também conversão "in vivo" de metionil-lisil-bradicinina e de lisil-bradicinina em bradicinina. Posteriormente, Borges et al (1976) demonstraram também a inativação da bradicinina, além da conversão de angiotensina I em angiotensina II, pelo fígado perfundido do rato. O líquido de perfusão (solução de Tyrode) recuperado após alguns minutos não demonstrava presença apreciável de enzimas capazes de metabolizar polipeptídeos. A adição de Triton X-100 (um detergente aniônico) ao líquido de perfusão (BORGES et al, 1979) foi capaz de remover, presumivelmente do leito vascular hepático, algumas enzimas. Neste perfusato foi encontrada atividade cininásica e atividade arilamidásica sobre LeuNA. A presença de atividade cinino-conversora não foi determinada no perfusato contendo Triton X-100 devido à presença de cininases na preparação. Nos pareceu importante no estudo do metabolismo de cininas pelo fígado, determinar se a atividade arilamidásica removida na perfudo,

são com TRITON X-100 corresponde a uma atividade cinino-conversora, caracterizando assim uma atividade aminopeptidásica típica.

Objetivos

Neste trabalho procuramos estudar aminopeptidases removíveis por perfusão do fígado do rato com Triton X-100. Objetivamos especificamente:

- a - otimizar condições de remoção de enzimas por perfusão com o detergente;
- b - determinar a possível origem intracelular das enzimas;
- c - fracionar e caracterizar os tipos de arilamidases presentes no perfusato;
- d - obter dados que possam esclarecer a dúvida levantada sobre a discrepância entre atividade arilamidásica e aminopeptidásica da aminopeptidase B (EC 3.4.11.6) obtida do fígado de rato.
- e - demonstrar a existência de atividade cinino-conversora em enzimas obtidas do perfusato e separadas cromatograficamente.

MATERIAL

Animais

Ratos adultos da raça Wistar pesando entre 250 e 300g e cobaias com aproximadamente 250 g foram fornecidos pelo Biotério Central da Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

Resinas

DEAE-celulose (Cellex D) e Bio Gel A_{0,5}^m foram obtidos de Bio Rad Laboratories, USA.

Substratos

L-leucil-2-naftilamida; L-arginil-2-naftilamida; DL-metionil-2-naftilamida e L-alanil-2-naftilamida foram obtidos de Sigma Chemical Co., USA; L-lisil-2-naftilamida foi fornecida por Nutritional Biochemicals, Co., USA; Lys-Gly-GlyNH₂, Lys-Val, Arg-Val, Arg-Asp, Ala-Gly, Ala-Arg, Leu-Gly e Leu-Gly-Gly foram fornecidos por Ciclo Chemical Co., USA; bradiginina, lisil-bradiginina e metionil-lisil-bradiginina, foram fornecidos por Protein Research Foundation, Japão.

Proteínas

Albumina sérica bovina e γ -globulina bovina foram obtidos de Sigma Co., USA; ovoalbumina foi fornecida pela Worthington Biochemical Co., USA.

Outras substâncias

Puromicina, L-arginina e L-metionina foram obtidas de Nutritional Biochemical Co., USA; Fast Garnet, Triton X-100,

Coomassie brilhante azul e p-hidroximercuribenzoato de sódio foram fornecidos por Sigma Co., USA; ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico foi obtido de Eastman Co., USA.

Os demais reagentes utilizados eram pró-análise e da melhor procedência possível.

Equipamentos

Centrífuga refrigerada RC-2B, Ivan Sorval Inc., USA; espectrofotômetro DU, Beckman Instruments, USA; espectrofotômetro Spectronic 20, Bausch & Lomb, USA; coletor de frações Ultrorac 7000 e bomba peristáltica Varioperpex, LKB Productors AB, Suécia; agitador eletromagnético PC 353, Corning Glass Work, USA; medidor de pH E 520, Metrohm, Suíça; condutímetro CDM 2e, Radiometer, Dinamarca; sistema de concentração e diálise "Hallom Fiber" equipado com fibra ôca modelo DC-2, Amicon Co., USA; banhos termostáticos, Fanen, Brasil; quimógrafo-registrador Drum, Palmer, Inglaterra; tubos de diálise Visking, The Scientific Instruments Center Ltd, Inglaterra; Potter-Elvehjem, Arthur Thomas, USA; bomba peristáltica 1210 e aparelho para respiração de roedores 680, Harvard Apparatus, USA; microscópio ele-

trônico EM-200, Phillips, Holanda, micrôtomô Potter-Blum MT-1
Ivan Sorval Inc., USA e analisador de aminoácidos construído
segundo descrito por Alonzo et al. (1968).

MÉTODOS

Perfusão do fígado do rato "in situ"

Preparo do animal - Ratos adultos da raça Wistar eram anestesiados através da administração intraperitoneal de uma solução de uretana 20% (2g/Kg peso). Ao perder o reflexo plantar o animal sofria traqueotomia e era mantido sob respiração artificial (6 movimentos por minuto). Para a perfusão do fígado "in situ" foi utilizada a técnica descrita por Borges et al (1976). O rato era fixado pelos quatro membros, em decúbito dorsal, numa lâmina de cortiça cuja face inferior era aquecida por uma lâmpada de 60W de modo que a temperatura do animal permanecia em 37°C. Abertas as cavidades torácica e abdominal as artérias esplênica e mesentérica superior eram ligadas e preparados fios para ligaduras; dois na veia porta e prō

ximos entre si e dois na veia cava inferior (um próximo à aurícula direita e outro logo acima da emergência da veia renal). Após a heparinização (300 unidades de heparina por via intracardíaca) a veia porta era ligada na porção distal e, na porção proximal, era feita uma incisão pela qual se introduzia a cânula de infusão que era fixada pelo segundo fio. Através de incisão realizada na aurícula direita era introduzida, na veia cava inferior, a cânula de coleta do perfusato. Esta cânula era fixada pela sutura preparada anteriormente. A porção caudal da veia cava inferior era ligada e a bomba de perfusão acionada.

Tipos de perfusão - O sistema para a perfusão do fígado do rato (fig. 2) consistia em duas tubulações plásticas: uma levava o líquido de perfusão de um balão rotatório, onde era continuamente oxigenado com 3 litros de oxigênio por minuto, para veia porta. Esta tubulação era intercalada por uma serpentina imersa em banho mantido a 37°C e tinha uma derivação que, mantida em posição vertical e com a extremidade superior aberta permitia, pela medida da altura da coluna líquida, o controle da pressão com que o líquido de perfusão penetrava

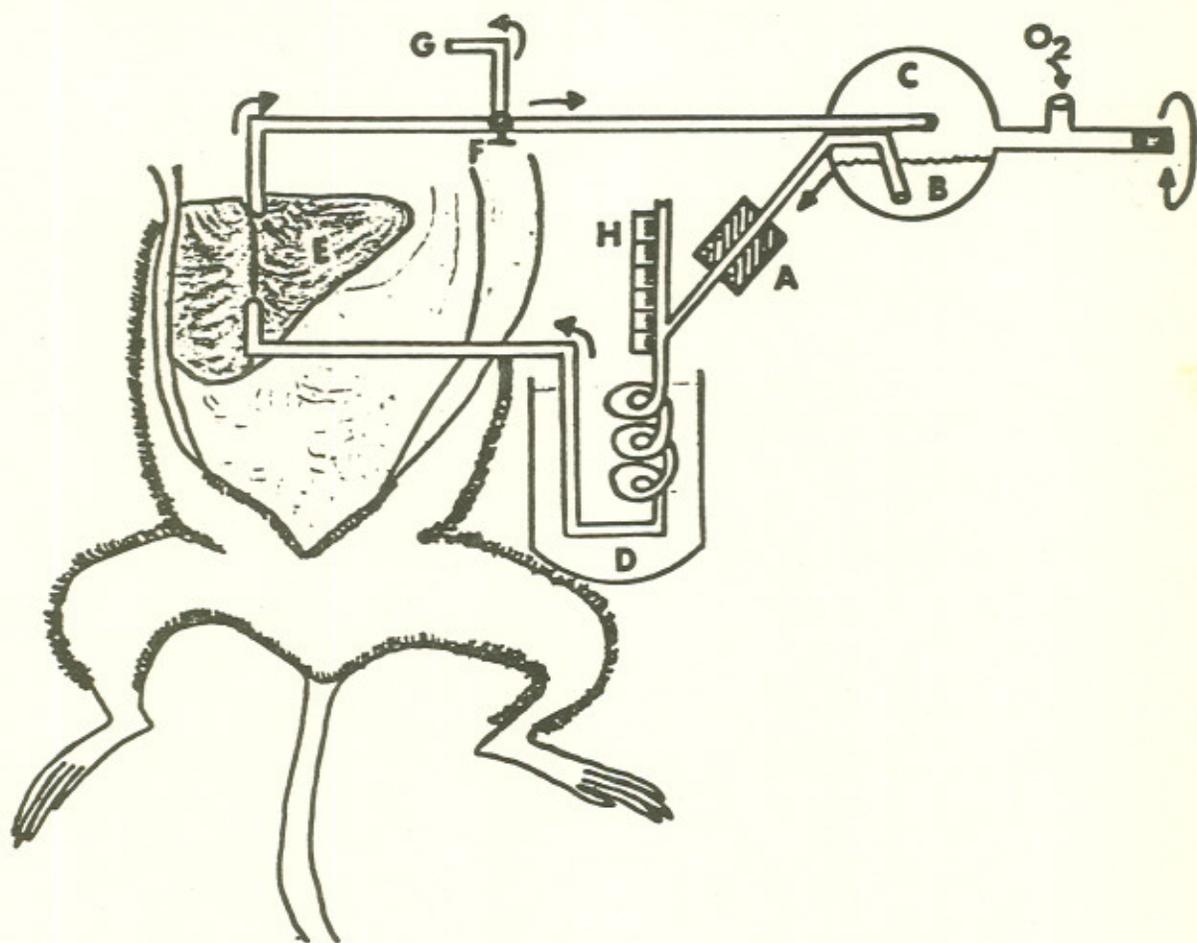


Fig. 2 - Perfusão do fígado de rato "in situ". Uma bomba peristáltica (A) impulsiona líquido (B) de um oxigenador (C) através de uma serpentina aquecida em banho a 37°C (D) ao fígado (E). Por meio de uma torneira de 3 direções o perfusato é coletado (G) ou então dirigido ao balão de aeração (C) para recircular pelo órgão. A pressão, em cm de água, é medida diretamente através de uma derivação da tubulação (H) mantida aberta ao exterior e em posição vertical. O balão de aeração recebe oxigênio sob pressão. O movimento rotatório do balão permite ao líquido de perfusão uma fácil troca de gases.

no órgão. O líquido de perfusão era infundido no órgão através de uma bomba peristáltica intercalada nesta tubulação. A segunda tubulação levava o perfusato recolhido na veia cava inferior de volta ao balão de aeração ou a um frasco coletor. A re-infusão deste líquido para nova passagem pelo fígado consistia o sistema de perfusão fechado. No sistema de perfusão aberto o perfusato era continuamente coletado sem nova passagem pelo órgão. O volume do líquido de perfusão foi mantido em 28 ml no sistema fechado e, no sistema aberto, este volume variava conforme o tempo de perfusão. O fluxo do líquido de perfusão foi mantido em 14 ml por minuto e a pressão oscilava entre 15 e 20 cm de água.

Antes da perfusão o fígado era exanguinado através da infusão do tampão fosfato de sódio 0,01 M - sacarose 0,25 M, pH 7,0 durante 10 minutos. Imediatamente após a exanguinação iniciava-se a perfusão pela adição de quantidades adequadas de Triton X-100 ao tampão fosfato de sódio 0,01 M - sacarose 0,25 M, pH 7,0 contido no balão de aeração. Após a perfusão o fígado era removido, pesado e um fragmento preparado para a observação microscópica.

Controle das lesões hepáticas - O controle das lesões provocadas pelo Triton X-100 foi realizado comparando-se, ao microscópio eletrônico, preparações de fígado perfundido com e sem Triton X-100. Fragmentos de fígado de aproximadamente $1,0 \text{ mm}^3$ eram fixados em glutaraldeído-ácido ôsmico e incluídos em resina Polylyte (WEIGHL e KISIELIUS, 1972). Os cortes foram feitos em micrótomo Potter-Blum MT-1 de avanço mecânico e observados em microscópio eletrônico Phillips EM-200.

Preparo de homogenato de fígado - O fígado era exanguinado como descrito, cortado em pequenos fragmentos e homogenizados a 4°C em Potter-Elvehjem (10 movimentos) com tampão fosfato de sódio 0,01 M - sacarose 0,25 M, pH 7,0 (4,0 ml de tampão por grama de tecido).

Concentração de amostras diluídas

As preparações foram concentradas, a 4°C , em um sistema de diálise sob pressão em tubos de diálise Visking 8/12 (GUIMARÃES, 1972). O tubo era firmemente preso por uma arrue-

la de borracha a um dos dois gargalos de um balão de vidro. O tubo de diálise era então introduzido dentro de uma coluna de vidro longa e mantida sob atmosfera úmida. No balão era colocada a amostra e nitrogênio até pressão de $1,0 \text{ Kg/cm}^2$. As soluções sob concentração podiam ser submetidas simultaneamente à diálise contra líquido dialisante colocado dentro da coluna.

Os tubos de diálise utilizados para este fim eram previamente preparados por aquecimento a 55°C em água por 24h. A seguir eram armazenados em solução de bicarbonato de sódio 0,025 M - EDTA 0,01 M - borato de sódio 0,01 M - azida sódica 0,02 %, pH 9,0.

Volumes superiores a 500 ml foram concentrados em sistema "Hallow Fiber" da Amicon Corp., usando fibras com exclusão nominal de 10 000 daltons.

Ensaio da atividade enzimática

Ensaio da atividade arilamidásica - Dois métodos de medida da atividade arilamidásica foram empregados: para ensaios na ausência de 2-mercaptoetanol foi utilizado o método descrito por Hopsu (1966a). Neste ensaio, alíquotas de $100 \mu\text{l}$

de diluições apropriadas das preparações eram incubadas a 37°C em 2,8 ml de tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,0, contendo ou não NaCl 0,15 M, e o substrato (LysNA, ArgNA, LeuNA, MetNA ou AlaNA, 70 μ M) por intervalos de tempo (10 - 180 minutos) suficientes para a hidrólise de até um terço da quantidade de substrato presente. Ao final da incubação era adicionado 1,0ml de solução recente de cloreto de diazônio-o-amino - azotolueno (sal Fast Garnet 1,0 mg/ml em tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 4,2 contendo 10%, v/v, de Tween 20). Esta solução promovia tanto a interrupção da reação por abaixamento do pH como também se destinava à diazotação da 2-naftilamina pelo sal Fast Garnet. Nos ensaios visando determinar as constantes cinéticas o substrato foi utilizado em concentração que variaram entre 7 μ M e 560 μ M.

Na presença de 2-mercaptoetanol, que interfere na reação de diazotação, os ensaios de atividade arilamidásica foram feitos pelo método descrito por Barrett (1972). Nestes ensaios 100 μ l de diluições apropriadas das amostras eram incubadas, a 37°C, em 1,4 ml de tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,0, contendo ou não NaCl 0,15 M, na presença de 2-mercaptoetanol 1,0 mM e substrato (LysNA, ArgNA, LeuNA, MetNA ou AlaNA, 70 μ M) por intervalos de tempo apropriados. Ao final da incu-

bação eram adicionados 1,1 ml de uma mistura (1:1) de solução recente de Fast Garnet (0,5 mg/ml contendo 4%, v/v, de Brij 35) com solução de p-hidroxi-mercuribenzoato de sódio 10 mM - EDTA 30 mM, pH 6,0.

Ensaio da atividade arilamidásica na presença de inibidores - Aliquotas de 100 μ l de diluições apropriadas da amostra eram adicionados a 1,2 ml de tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 7,0, com ou sem NaCl 0,15 M, e com 100 μ l de solução de um dos seguintes inibidores: tetrionato de sódio, p-hidroxi-mercuribenzoato, EDTA, puromicina, metionina ou arginina. Após pré-incubação por tempo conveniente adicionava-se substrato (concentração final: 70 μ M) e, após incubação a 37°C, a reação era interrompida e a 2-naftilamina formada diazotada. Para verificar a reversibilidade da inibição após a pré-incubação com tetrionato de sódio (ou p-hidroxi-mercuribenzoato de sódio) uma segunda pré-incubação era realizada (20 minutos, temperatura ambiente) adicionando-se a mistura de incubação 2-mercaptoetanol antes do substrato.

Determinação da atividade sobre di- e tripeptídeos - Foi usado o método de determinação de amino-grupo livre de Fields (1971). A incubação (37°C) era realizada adicionando-se 300µl de uma diluição apropriada da amostra a 1,9 ml de tampão fosfato de sódio 0,01 M - NaCl 0,15 M, pH 7,0 contendo substrato $1,14 \times 10^{-4}$ M. A reação era interrompida pela adição de 200 µl do incubado a 1,0 ml de solução de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0,05 M em NaOH 0,05N e 25 µl de ácido 2,4,6-trinitrobenzenosufônico 0,18 M. Esta última solução era preparada imediatamente antes do uso. Após 5 min. de incubação a 37°C adicionava-se 2,0 ml de Na_2SO_3 1,5 mM em NaH_2PO_4 0,1 M, pH 4,0. A quantidade de aminoácido liberado na hidrólise era calculada pelo aumento na absorbância (420 nm) em relação ao tempo zero de reação. O coeficiente de extinção médio para α -aminogrupos usado foi de $22\ 500\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$.

Ensaio da atividade conversora de MLBK e LBK à BK - Esta atividade foi acompanhada através de ensaio biológico que utiliza as diferenças de sensibilidade de resposta do músculo liso (íleo de cobaio) para a contração induzida pelos três peptídeos (SCHÖREDER, 1970) como um parâmetro de conversão. Também foram analisados os aminoácidos liberados na conversão.

Amostras de 100 a 200 μ l das preparações enzimáticas foram incubadas com 100 μ M de Met-Lys-bradicinina ou Lys-bradicinina em volume apropriado (400 - 1200 μ l) de tampão fosfato de sódio 0,01 M - 0,15 M NaCl, pH 7,0, a 37°C.

Definição de unidade - A unidade de atividade enzimática para todos os casos foi considerada como a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μ mol de substrato por minuto em tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7.0 a 37°C.

Ensaio biológico - Aliquotas de 20 μ l de cada incubado eram removidas a intervalos de tempo convenientes (20-120 minutos) e diluídas com 1,4 ou 2,8 ml HCl 0,001N para interromper a reação e possibilitar diluição adequada à sensibilidade do ensaio biológico dos peptídeos. Acompanhou-se a conversão de cininas procedendo-se ao ensaio biológico do incubado em preparação isolada do íleo de cobaio segundo descrição de Guimarães et al (1973). Neste ensaio usou-se a preparação biológica segundo a técnica descrita por Webster e Prado(1970).

Análise de aminoácidos - A intervalos de tempo suficientes para a conversão como acompanhado pelo ensaio biológico alíquotas de 200 μ l do incubado eram transferidas para um tubo contendo 300 μ l de HCl 0,001N e a mistura mantida em banho fervente a 100°C por 10 minutos. As amostras eram congeladas até o momento de uso e então diluídas com 0,5 ml de tampão citrato de sódio 0,1 M - polietilenoglicol-400 15% (v/v), pH 2,2 e processadas em analisador de aminoácidos conforme técnica de Spackman et al (1958). A atividade aminopeptidásica foi acompanhada pela medida das quantidades de metionina e lisina formadas pelas enzimas.

Atividade cininásica - Foi determinada somente em ensaio biológico utilizando bradicinina (0,7 μ M) como substrato. As incubações eram acompanhadas durante 120 minutos.

Determinação da proteína

Foi utilizado o método descrito por Spector (1978). A 100 μ l de uma diluição apropriada da amostra eram adiciona-

dos 2,9 ml de solução de Coomassie brilhante azul G-250 (100 mg do corante solubilizados em 50 ml de etanol; adicionado 100 ml de ácido fosfórico a 85%, v/v, e, após violenta agitação, ajustado o volume com água destilada em 1000 ml e filtrado em papel Whatmann nº 2). As absorvâncias foram medidas em 595 nm e comparadas com uma curva padrão de albumina bovina, linear para quantidades entre 5 e 20 µg/de proteína/tubo.

Medidas de condutividade

A condutividade de todas as soluções provenientes de frações coletadas, frações combinadas, dialisados e tampões preparados foram determinadas por condutimetria. Os valores obtidos, convertidos a mS ou µS por correção do coeficiente da célula condutimétrica eram proporcionais a concentração de sal das soluções.

Tratamento da resina e preparo das colunas de DEAE-celulose

A resina de DEAE-celulose (Cellex D) previamente utilizada era recuperada por tratamento com NaOH 0,5 N na propor

ção aproximada de 1:70 (p/v). Após agitação suave por 30 minutos a resina era filtrada em funil de placa de vidro porosa com porosidade "grossa", percolada com NaOH 0,5 N até a completa remoção de toda proteína ainda presente e lavada com água destilada até a neutralidade do filtrado. A massa de resina era transferida para um bequer e tratada com HCl 0,5 N (1:70 p/v) por 30 minutos, filtrada e lavada novamente com água destilada até a neutralidade do filtrado. Após novo ciclo com NaOH 0,5 N e lavagem com água destilada até a neutralidade do filtrado a resina era suspensa em água destilada. O pH da suspensão, na presença de KCl, era normalmente de 11,2 - 11,5, mostrando tratamento adequado da resina. A seguir a resina era lavada em funil de placa porosa com tampão (fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0) para a remoção do excesso de sal e equilíbrio da resina até que o filtrado apresentasse os mesmos valores de pH e condutividade que o tampão adicionado. Nas etapas de repouso do gel procedia-se normalmente à remoção de partículas finas por decantação.

A resina assim tratada era sedimentada em colunas de vidro sob pressão de nitrogênio variando de 0 a 0,35 Kg/cm². Nos experimentos de fracionamento aqui descritos, usou-se frequentemente uma coluna de 4,5 x 24,5 cm.

Preparo da coluna de Bio Gel A_{0,5}m.

Bio Gel A_{0,5}m, com poder de resolução nominal variando entre 30 000 e 500 000 daltons fornecida pelo fabricante suspensa em água destilada contendo 0,02% de azida de sódio foi sedimentada em duas colunas (2 x 100 cm cada) sob pressão constante de 20 cm de água. Terminada a sedimentação as duas colunas foram acopladas pelas extremidades inferiores, perfazendo um sistema de filtração molecular de 2 x 200 cm, e lavados com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0 (fluxo 15 ml/h mantido por bomba peristáltica) até o completo equilíbrio.

Determinação de pesos moleculares

A coluna de Bio Gel A_{0,5} m (2 x 200 cm) foi calibrada com proteínas de pesos moleculares conhecidos: ovoalbumina, PM 45 000 daltons; albumina sérica bovina, PM 67 000 daltons; dímero de albumina sérica bovina, PM 134 000 daltons e γ -globulina bovina, PM 160 000 daltons. Amostras de 5,0 ml contendo 100 mg de cada proteína foram cromatografadas a 4°C em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0 (fluxo 15 ml/h). Foram co

letadas frações de 4,5 ml. Os pesos moleculares dos padrões plotados em escala logarítmica contra os volumes de eluição de cada proteína permitiram a determinação dos pesos moleculares das enzimas (ANDREWS, 1964).

RESULTADOS

Sistemas de perfusão

Dois sistemas de perfusão, denominados fechado e aberto (vide métodos) foram utilizados.

Sistema fechado - efeito da concentração de Triton X-100-
Foi inicialmente estudada a eficiência do sistema de perfusão na remoção de arilamidases do fígado de rato. Verificou-se que a remoção de enzimas pelo líquido de perfusão sem Triton X-100 foi praticamente nula. A proteína e a atividade arilamidásica total removidas do fígado do rato por perfusão fechada durante 10 minutos foram diretamente proporcionais à concentração de Triton X-100 presente no líquido de perfusão (Fig. 3). Concentrações do detergente maiores que 0,1% (v/v) não foram usadas

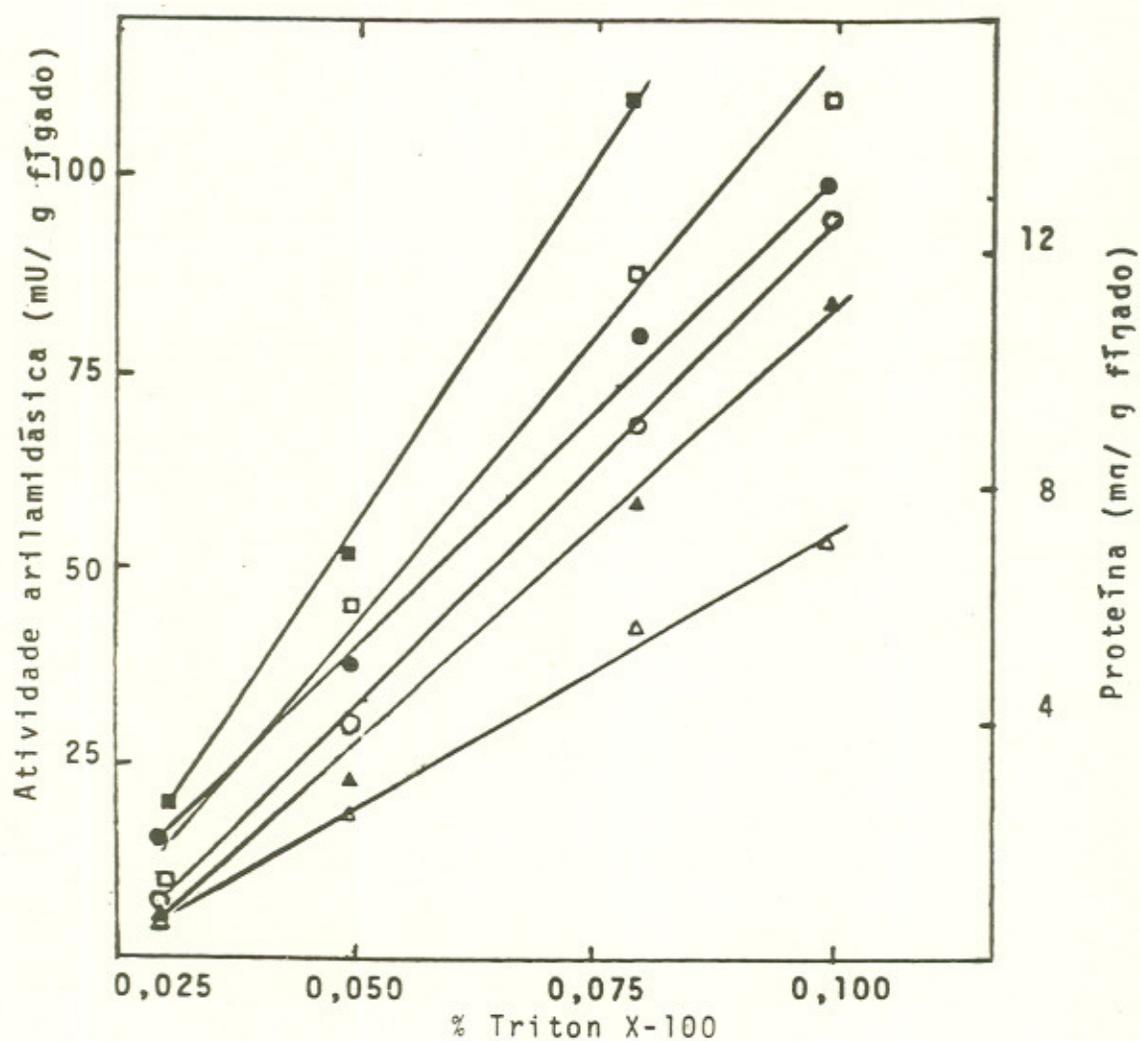


Fig. 3 - Remoção de atividade arilamidásica de proteína do fígado de rato por perfusão fechada com Triton X-100 por 10 minutos. ArgNA (■); LysNA (□); LeuNA (△); MetNA (▲); AlaNA (○); Proteína (●).

porque, com o prosseguimento da perfusão, apareciam na superfície do órgão, logo nos primeiros minutos, lesões macroscópicas acompanhadas de extravasamento de líquido de perfusão. Face aos bons resultados obtidos com a concentração 0,05% (v/v) de Triton X-100, esta foi a escolhida para o prosseguimento dos experimentos com as perfusões fechada e aberta. Em trabalho anterior deste laboratório (BORGES et al, 1979), usando a mesma técnica, foi empregada esta concentração do detergente de modo que aqueles resultados podem ser comparados com os agora obtidos.

Sistema aberto - efeito do tempo de perfusão - A remoção de proteínas e de arilamidases do fígado de rato por perfusão aberta com Triton X-100 foi proporcional ao tempo de perfusão durante os primeiros 10 minutos (Fig. 4). Após este tempo a velocidade de remoção, embora lentamente, diminuiu. Devido ao aparecimento de lesões acompanhadas de extravasamento de líquido não foi possível prosseguir a perfusão por mais de 40 minutos. Na ausência de Triton X-100 a perfusão aberta foi também ineficaz na remoção de quantidades detectáveis de arilamidases e de proteína (Tabela I). A tabela mostra ainda que a perfusão

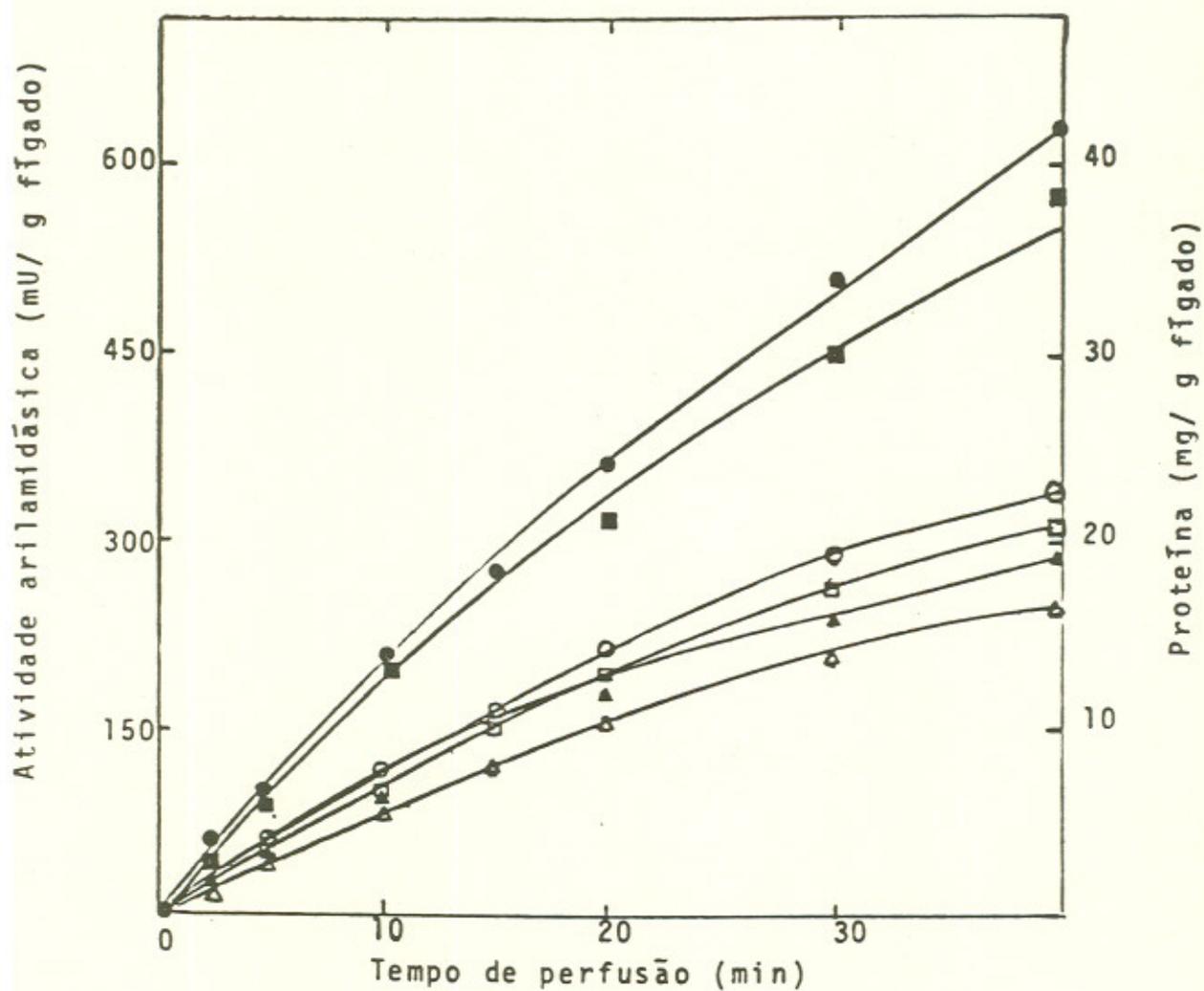


Fig. 4 - Remoção de atividade arilamidásica e de proteína de fígado do rato por perfusão aberta com Triton X-100, 0,05% (v/v). ArgNA (■); LysNA (□); LeuNA (△); MetNA (▲); AlaNA (○); Proteína (●).

TABELA I

Atividade arilamidásica do perfusato e do homogenato do fígado do rato⁽¹⁾

Experiência	Perfusão				Atividade específica ⁽²⁾					Atividade total ⁽³⁾				
	tipo	Triton X-100 % (v/v)	tempo min	volume ml	LysNA	ArgNA	LeuNA	MetNA	AlaNA	LysNA	ArgNA	LeuNA	MetNA	AlaNA
Perfusão	fechada	0	10	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	aberta	0	10	140	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	fechada	0,05	10	28	13,5	15,0	4,6	6,7	7,0	43,0	52,0	19,0	23,0	24,0
	aberta	0,05	10	140	11,7	16,3	5,6	9,4	11,3	164,0	232,0	84,0	136,0	168,0
	aberta	0,05	2	28	13,8	21,4	7,2	10,9	13,9	30,0	47,0	16,0	24,0	33,0
Homogenato	-	-	-	-	3,6	5,1	2,9	6,4	3,6	2000,0	2800,0	1600,0	3500,0	2000,0

⁽¹⁾ atividades ensaiadas na presença de NaCl 0,15 M e na ausência de 2-mercaptoetanol⁽²⁾ mU/mg proteína⁽³⁾ mU/ g fígado

aberta removeu em 10 minutos atividade arilamidásica total 4 a 6 vezes maior que aquela retirada pela perfusão fechada em 10 minutos. Comparando-se estes dados com a atividade enzimática do homogenato do fígado de rato (Tabela I) verifica-se que qualquer dos dois tipos de perfusão removeu apenas parte da atividade total do órgão. A semelhança entre as atividades específicas dos perfusatos obtidos pelos sistemas aberto e fechado indica que em ambos os sistemas um material de mesmo tipo é removido. Portanto os dois sistemas de perfusão são equivalentes e removem enzimas com maior atividade específica que o homogenato. Devido ao seu maior rendimento, o sistema aberto foi o escolhido para a obtenção de perfusato em todas as demais etapas deste trabalho. O tempo de perfusão foi fixado em 10 minutos porque até este tempo existe proporcionalidade na quantidade de arilamidase e proteína removidas (Fig. 4).

O emprego de Triton X-100 nas condições experimentais de perfusão escolhidas provocou lesões no hepatócito. A Fig. 5 mostra o aspecto ultraestrutural da lesão após a perfusão com Triton X-100. Observa-se a desagregação do retículo endoplasmático rugoso (A); a desorganização interna das mitocôndrias (B); a ruptura da membrana celular em alguns pontos (ausente nesta foto) e a distribuição por toda a célula de vacúolo

los (C) que provavelmente sejam micelas mistas formadas por detergente e material celular. Nota-se também uma área do hepatócito menos afetada pelo detergente (D). A perfusão realizada nestas condições mas em ausência de Triton X-100 não alterou a estrutura do hepatócito (Fig. 6). Estas observações indicam que, pelo menos, parte do material removido pelo detergente tem origem intracelular.

Caracterização preliminar das enzimas

Dos dados da tabela I foi possível comparar o número de vezes que as atividades específicas aumentam no perfusato em relação ao homogenato (substratos: LysNA, ArgNA e AlaNA 3 vezes; LeuNA 2 vezes e MetNA 1,5 vezes). Isto indica que as atividades sobre MetNA e LeuNA são extraídas mais dificilmente pelo detergente que aquelas sobre LysNA, ArgNA e AlaNA, por tanto devem estar mais associadas a frações celulares particuladas. Este dado indica também a existência de duas ou três arilamidases distintas presentes no fígado de rato.

Fig. 5 - Hepatócito do fígado do rato após 10 minutos de perfusão aberta com tampão isotônico contendo Triton X-100, 0,05% (v/v). Retículo endoplasmático rugoso (A); mitocôndria (B); vacuolos (C); área menos afetada pelo Triton X-100 (D).

Fig. 6 - Hepatócito do fígado do rato após 10 minutos de perfusão aberta com tampão isotônico sem Triton X-100. Retículo endoplasmático rugoso (A); mitocôndrias (B).

Atividade relativa - A tabela II mostra a atividade relativa dessas enzimas no homogenato e no perfusato, tomando a atividade sobre LysNA como unitária. As atividades relativas são idênticas ou semelhantes tanto no homogenato como no perfusato para LysNA, ArgNA e AlaNA. Isto parece indicar que uma mesma enzima é responsável pela hidrólise destes substratos ou ainda que, se estas atividades são devidas a enzimas distintas, elas estão sendo removidas de um mesmo compartimento celular. A menor atividade relativa do perfusato sobre MetNA e LeuNA reforça a sugestão de que a enzima (ou enzimas) responsável por estas atividades está associada a frações celulares particuladas.

Efeito do ion cloreto na atividade arilamidásica do perfusato - A tabela III mostra que a atividade do perfusato sobre os substratos básicos (ArgNA e LysNA) é ativada por NaCl. Em trabalho anterior deste laboratório (FREITAS Jr. et al, 1979a) foi demonstrado que tal efeito é devido ao ion cloreto e com concentração ótima em 0,15 M. A atividade sobre os substratos neutros (LeuNA, MetNA e AlaNA) não é ativada por cloreto. Estes dados demonstram claramente que, em relação ao efeito do

TABELA II

Atividade relativa de arilamidases do homogenato e do perfusato do fígado do rato

Substrato	Homogenato	Perfusato*
LysNA	1,0	1,0
ArgNA	1,4	1,4
LeuNA	0,8	0,5
MetNA	1,8	0,8
AlaNA	1,0	1,0

* perfusão aberta com Triton X-100, 0,05% (v/v), 10 minutos

TABELA III

Atividade arilamidásica do perfusato do fígado do rato em presença e ausência de NaCl. Perfusão aberta com Triton X-100, 0,05% (v/v)

Substrato	Atividade (mU/mg proteína)	
	sem NaCl	com NaCl (0,15 M)
LysNA	8,3	11,7
ArgNA	7,8	16,3
LeuNA	5,5	5,4
MetNA	9,4	9,3
AlaNA	11,0	11,2

ion cloreto, a perfusão remove pelo menos dois tipos de enzimas; uma ativada por cloreto e com preferência por substratos de aminoácidos básicos e outra não ativada por cloreto e com especificidade maior para substratos neutros.

Efeito do 2-mercaptoetanol - Foi verificado preliminarmente que as atividades arilamidásicas do perfusato eram insustentáveis sob diversos tratamentos tais como: conservação a 4°C e congelamento/descongelamento. A inativação não era paralela para todos os substratos. Para verificar a possível participação de grupos -SH nesta inativação espontânea foi adicionado ao perfusato (imediatamente após sua obtenção) 2-mercaptoetanol (concentração final 1,0 mM). Após armazenamento por 24 horas a 4°C as atividades foram comparadas com aquelas de uma amostra que não recebeu 2-mercaptoetanol (Tabela IV). Verificou-se que a perda de 60% da atividade sobre os substratos básicos foi completamente evitada por 2-mercaptoetanol. A proteção da perda de atividade sobre MetNA foi também completa e diferente daquela demonstrada para a atividade sobre LeuNA e AlaNA. Os dados sugerem que além da enzima com ação preferencial sobre substratos básicos o perfusato contém ainda duas

TABELA IV

Efeito do 2-mercaptoetanol na estabilidade da atividade arilamidásica do perfusato do fígado de rato após 24h a 4°C

Substrato	Atividade residual (%)		
	0 h	24 h	24 h em presença de 2-mercaptoetanol 1,0 mM
LysNA	100	60	97
ArgNA	100	59	91
LeuNA	100	53	83
MetNA	100	54	94
AlaNA	100	42	81

enzimas com ação sobre substratos neutros. Entretanto durante as etapas de fracionamento do perfusato 2-mercaptoetanol foi incapaz de proteger totalmente as enzimas (Tabelas VI e VII) indicando que outros mecanismos de inativação participam neste processo.

Inibição por tetracionato de sódio - A atividade ariamidásica do perfusato sobre ArgNA, MetNA e LeuNA foi inibida em mais de 60% por tetracionato de sódio 4,0 mM (Tabela V). A reversão por 2-mercaptoetanol da inibição causada por tetracionato, para as atividades sobre ArgNA e LeuNA foi parcial. Sobre MetNA a reversão foi total e parece haver uma relação estequiométrica entre inibidor e inativador.

A inativação das enzimas do perfusato com tetracionato de sódio, sua reversão por 2-mercaptoetanol e a proteção parcial da inativação espontânea pelo redutor indicam claramente a influência de grupos -SH na atividade das enzimas.

TABELA V

Inibição da atividade arilamidásica do perfusato do fígado do rato por tetracionato de sódio e reversão por 2-mercaptoetanol.

Substrato	tetracionato ⁽¹⁾	2-mercapto- etanol ⁽²⁾	Atividade residual
	mM	mM	%
MetNA	0	0	100
	4	0	35
	4	4	98
LeuNA	0	0	100
	4	0	34
	4	4	71
ArgNA	0	0	100
	4	0	19
	4	4	69

(1) O perfusato foi incubado com tetracionato de sódio por 20 minutos a 37°C

(2) O perfusato tratado com tetracionato foi a seguir incubado por 20 minutos a 37°C em 2-mercaptoetanol.

Fracionamento do perfusato

Cromatografia em DEAE-celulose - Visando explorar a possibilidade da presença de mais de uma enzima o perfusato de fígado de rato foi submetido a fracionamento cromatográfico.

O material obtido de 14 perfusões abertas (1860 ml) foi centrifugado a 8 000 x g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi ajustado para condições finais: tampão fosfato de sódio 0,02 M - 2-mercaptoetanol 1,0 mM, pH 7,0, condutividade 1,65 mS. Este material foi introduzido em coluna (4,5 x 24,8 cm) de DEAE-celulose (cellex D) previamente equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,02 M - 2-mercaptoetanol 1,0 mM, pH 7,0. Após a entrada da amostra a coluna foi lavada com o mesmo tampão. O material retido pela resina foi eluído com gradiente linear de fosfato de sódio (entre 0,02 e 0,2 M) contendo 2-mercaptoetanol 1,0 mM, pH 7,0. A cromatografia foi desenvolvida com fluxo de 170 ml/h a 4°C. Foram coletadas frações de 20,0 ml e ensaiadas para atividade arilamidásica, concentração de proteína e condutividade. A figura 7 mostra o resultado deste fracionamento.

O material não retido na coluna (pico A) corresponde a 40% da proteína e 15% do total da atividade sobre MetNA.

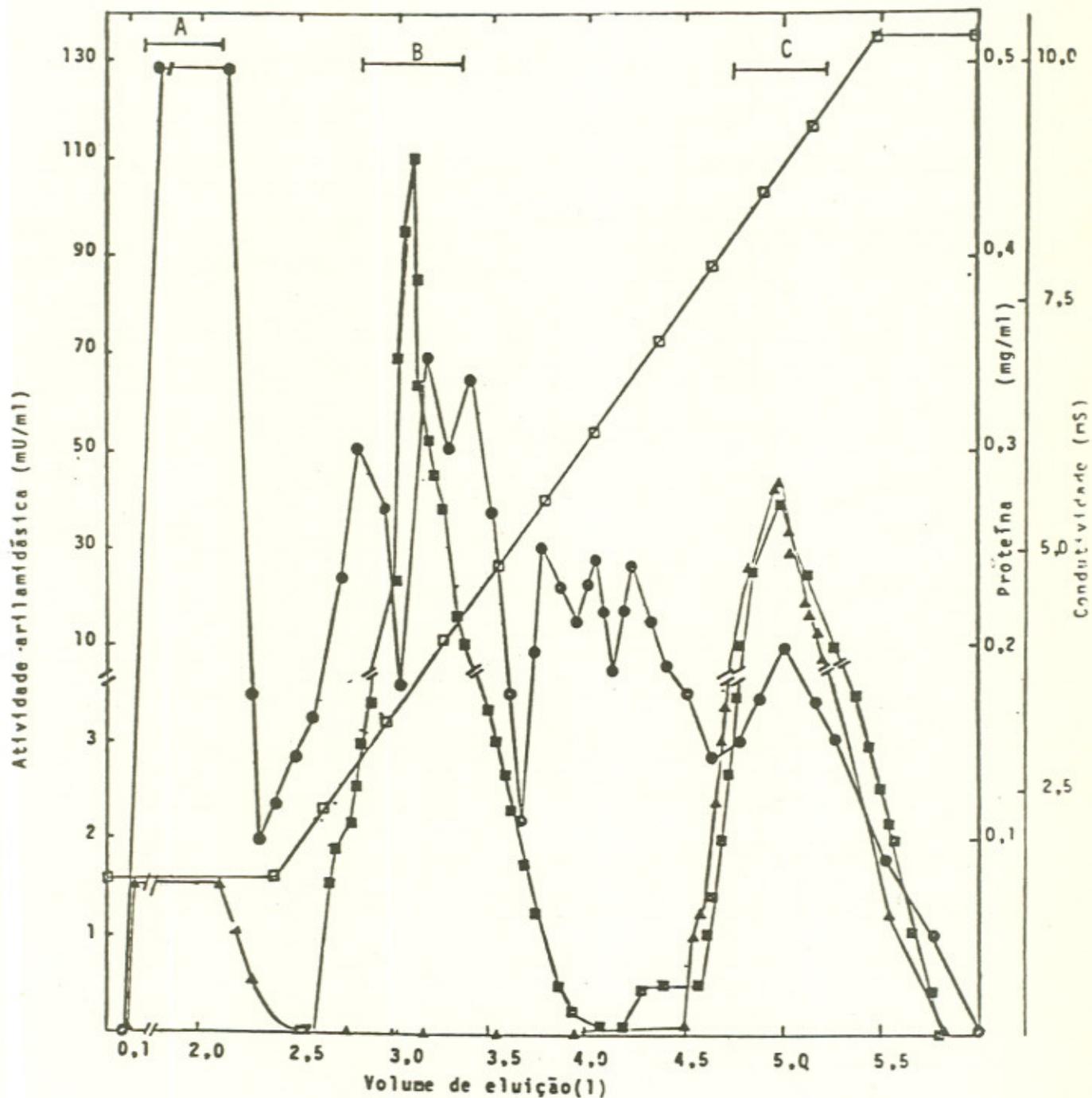


Fig. 7 - Fracionamento do perfusato do fígado do rato em coluna (4,5 x 24,8 cm) de DEAE-celulose. Atividade arilamidásica, MetNA (▲); ArgNA (■); Proteína (●); Condutividade (□).

As frações deste pico mostraram destacada preferência para a hidrólise de MetNA, ao contrário do perfusato e dos picos de atividade eluídos no gradiente salino. O combinado destas frações (1900 ml) foi concentrado até 300 ml em concentrador Amicon ("Hallow Fiber") equipado com fibra H1P10 com porosidade nominal para moléculas de até 10 000 daltons. A seguir a amostra foi concentrada até 13,5 ml no sistema de diálise sob pressão. Este material foi denominado preparado A (Prep. A).

As frações eluídas com força iônica entre 3,0 e 5,7mS (pico B) continham atividade arilamidásica apenas sobre ArgNA e LysNA ativável por cloreto. As frações ativas foram combinadas (750ml) e concentradas em sistema de diálise sob pressão a 4°C. O precipitado que se formou foi retirado por centrifugação (8 000x g/30 min./4°C) e o sobrenadante (196 ml), armazenado a -20°C em pequenas alíquotas, foi denominado preparado B (Prep. B),

As frações do pico de atividade eluído entre 7,5 e 9,8 mS (pico C) apresentaram atividades específicas semelhantes para ArgNA, MetNA e AlaNA. As atividades deste pico não foram ativadas por cloreto e suas frações, diferentemente dos outros picos, apresentaram alta atividade sobre AlaNA. As frações deste pico combinadas deram origem ao preparado C (Prep. C).

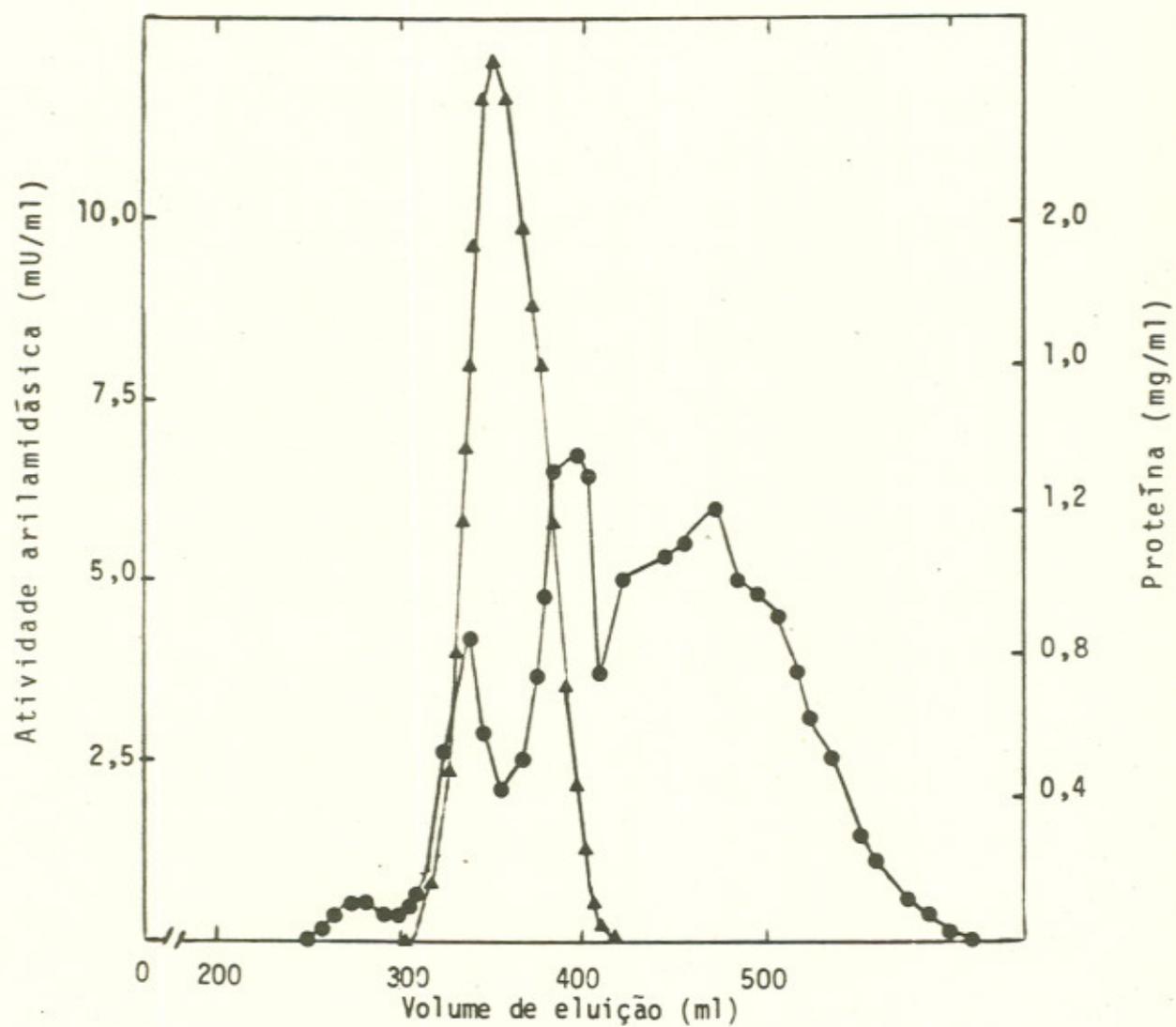


Fig. 8 - Gel filtração do Prep. A em coluna (200 x 2 cm) de Bio Gel A_{0,5}m. MetNA (▲); Proteína (●).

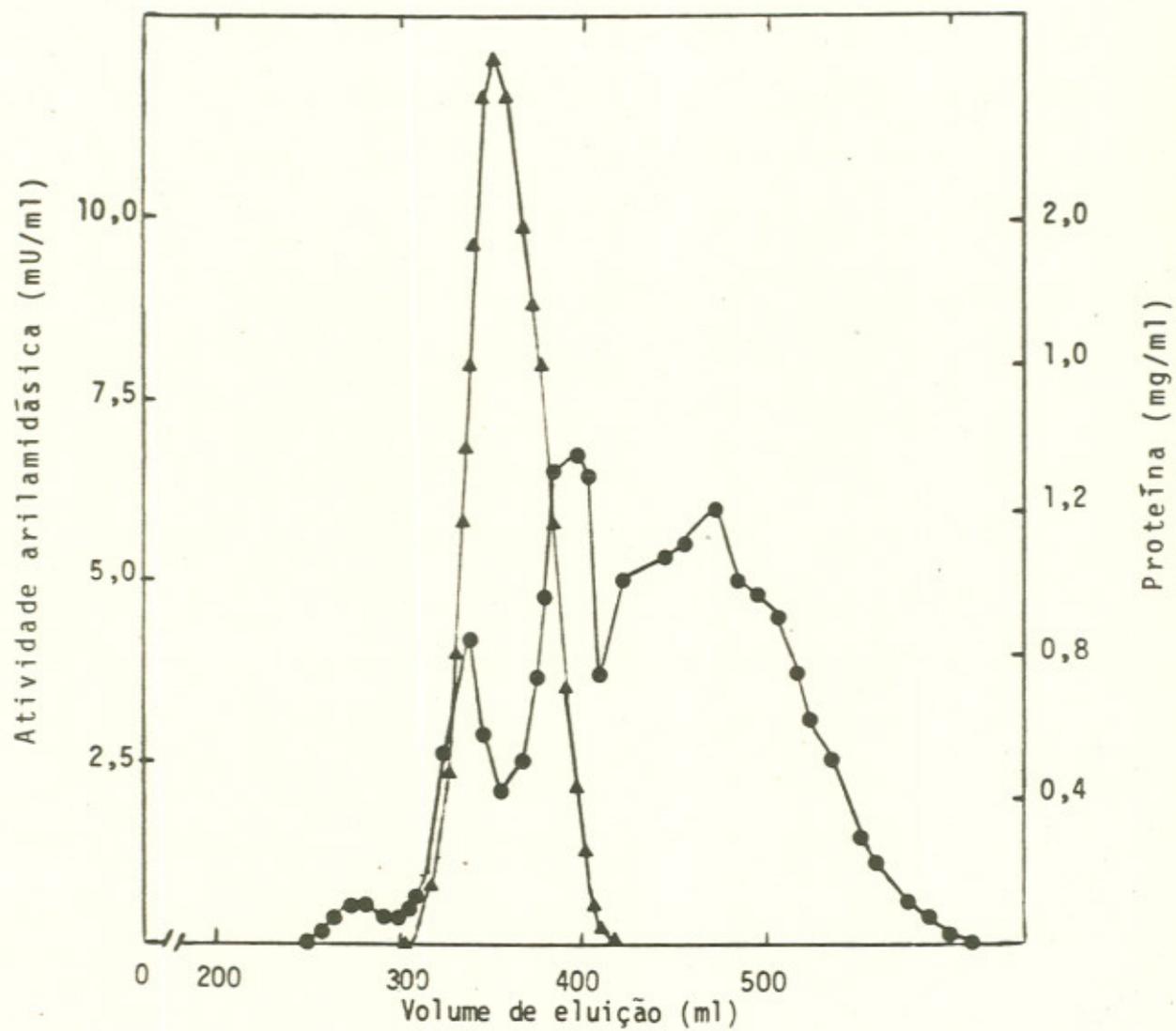


Fig. 8 - Gel filtração do Prep. A em coluna (200 x 2 cm) de Bio Gel A_{0,5}m. MetNA (▲); Proteína (●).

atividade do perfusato sobre MetNA correspondia a esta enzima. O fator de purificação (12 vezes) e o rendimento (45%) não foram maiores devido provavelmente à instabilidade da enzima, pois os procedimentos de purificação eliminaram 97% das proteínas inespecíficas (Tabela VI).

O paralelismo entre rendimento, fator de purificação e atividades específica e relativa durante as etapas de purificações do Prep. A para as atividades sobre MetNA e LeuNA indica que, provavelmente, este material contém uma só arilamidase.

Gel filtração do Prep. B - Uma alíquota de 5,0 ml do Prep. B foi aplicada a uma coluna (200 x 2 cm) de Bio Gel A_{0,5}^m equilibrada e percolada a 4°C com tampão fosfato de sódio 0,02M - 2-mercaptoetanol 2,0 mM, pH 7,0. Foram coletadas frações de 4,5 ml a um fluxo de 15 ml/h mantido constante pelo emprego de bomba peristáltica.

O perfil da eluição da proteína e da atividade sobre ArgNA é mostrado na figura 9. Verifica-se que o pico de atividade corresponde a um pico de concentração protéica secundário. As frações ativas combinadas formaram o Prep. B₁. Consi-

TABELA VI

Purificação parcial da arilamidase com atividade preferencial sobre MetNA⁽¹⁾

Etapa	Proteína total mg	atividade específica mU/mg	Purificação	atividade ⁽³⁾ relativa	atividade total mU	rendimento %
perfusato ⁽²⁾	2183	1,4	1,0	1,8	3035	100
DEAE-celulose(Prep A)	521	4,9	3,5	1,6	2252	74
Gel filtração(Prep A ₁)	79	16,4	11,7	1,7	1297	43

(₁) os valores correspondem ao processamento, em cada etapa, de todo o material obtido de 14 perfusões

(₂) calculado considerando que apenas 15% da atividade total do perfusato sobre MetNA correspondem ao pico A

(₃) relação atividades sobre MetNA e LeuNA

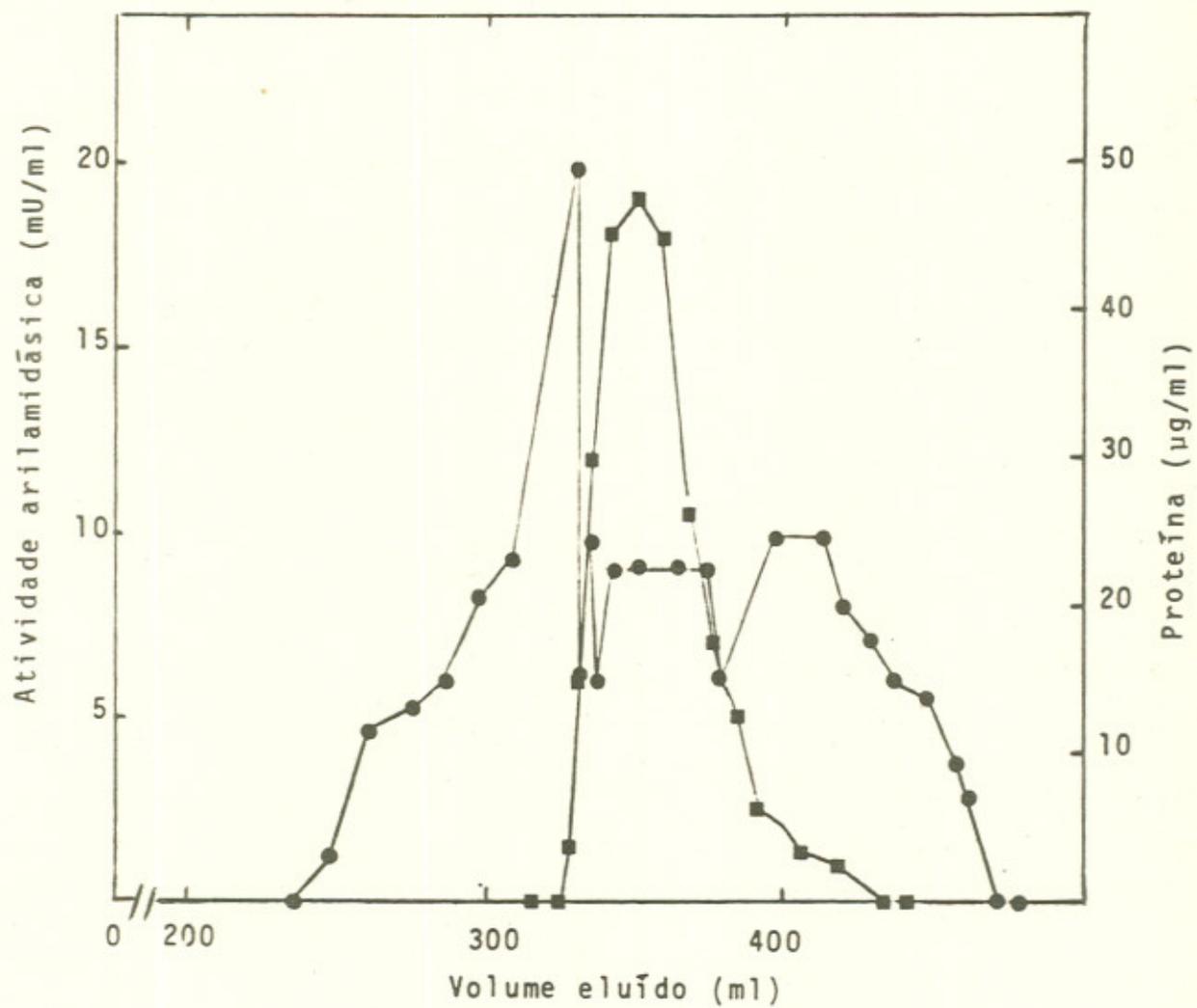


Fig. 9 - Gel filtração do Prep. B em coluna (200 x 2 cm) de Bio Gel A_{0,5}m. ArgNA (■); Proteína (●).

derando a atividade sobre ArgNA do perfusato que corresponde a esta enzima (57% no pico B) o fator de purificação alcançado foi de 30 vezes (Tabela VII).

Propriedades gerais das enzimas

A hipótese de que a perfusão com Triton X-100 pudesse remover mais de uma arilamidase do fígado do rato se baseou em propriedades tais como: ativação por ion cloreto para a atividade sobre ArgNA e LysNA; o efeito do 2-mercaptoetanol em reativar de maneira distinta a atividade sobre diferentes AANA; a falta de paralelismo na inibição da atividade sobre diferentes AANA por tetracionato de sódio e a reversão desta inibição por 2-mercaptoetanol. Tal hipótese foi confirmada pela obtenção, na coluna de DEAE-celulose, de três picos distintos de atividade arilamidásica.

Comparando as atividades relativas das preparações sobre diversos AANA (Tabela VIII) fica evidente que a perfusão removeu do fígado do rato arilamidases que podem ser caracterizadas pelas diferentes especificidades sobre AANA. Por preferir MetNA a enzima do Prep. A₁ foi denominada de metionil-

TABELA VII

Purificação parcial da arilamidase com ação preferencial sobre substratos básicos⁽¹⁾

Etapa	Proteína total mg	Atividade específica ⁽²⁾ mU/mg proteína	Purificação vezes	Atividade total ⁽²⁾ mU	Rendimento %
perfusato ⁽³⁾	2183,0	18,4	1,0	4018	100
DEAE-celulose(Prep B)	136,0	157,1	8,5	2136	53
Gel filtração(Prep B ₁)	18,6	554,5	30,1	1031	26

(1) os valores correspondem ao processamento, em cada etapa, de todo material obtido em 14 perfusões

(2) sobre ArgNA, na presença de NaCl 0,15 M e 2-mercaptoetanol 1,0 mM

(3) calculado considerando que os 57% da atividade total sobre ArgNA correspondentes ao pico B da coluna de DEAE-celulose pertencem à AAB

TABELA VIII

Atividades relativas dos Prep A1⁽¹⁾, Prep B1⁽²⁾ e Prep. C⁽³⁾

Substrato	Prep A1	Prep B1	Prep C
LysNA	1,0	1,0	1,0
ArgNA	1,6	2,3	1,1
LeuNA	10,4	0	0,6
MetNA	12,4	0	0,6
AlaNA	2,2	0	0,7

- (1) Atividade não retida na coluna de DEAE-celulose após gel-filtração
- (2) Atividade eluída da coluna de DEAE-celulose em baixa força iônica após gel filtração
- (3) Atividade eluída da coluna de DEAE-celulose em alta força iônica

-aminopeptidase - MAP (a caracterização desta enzima como uma aminopeptidase típica está mostrada adiante). A enzima do Prep. B₁, por agir exclusivamente sobre AANA de aminoácidos básicos foi denominada de arilamidase B - AAB. As enzimas dos picos A e B foram estudadas mais detalhadamente neste trabalho porque a enzima do pico A possuía propriedades distintas das arilamidases hepáticas já conhecidas, especialmente quanto à sua especificidade e a enzima do pico B apresentava propriedades características de aminopeptidases B (EC 3.4.11.6).

Pesos moleculares - A gel filtração das enzimas MAP e AAB, separadamente, em coluna de Bio Gel A_{0,5}m calibrada com proteínas de pesos moleculares conhecidos (ovoalbumina, albumina sérica bovina e γ -globulina bovina) mostrou que as mesmas foram eluídas em volumes correspondentes à pesos moleculares de 68.000 e 57.000 daltons, respectivamente, calculados pelo método de Andrews (1964).

Inibição por p-hidroximercuribenzoato de sódio - A semelhança nas curvas de inibição da MAP e da AAB por p-hidro

ximercuribenzoato (Fig. 10) sugere que as duas enzimas possuem grupos -SH igualmente importantes para as respectivas atividades. 2-mercaptoetanol foi capaz de reverter completamente esta inibição mostrando que, nestas enzimas, a oxidação e posterior redução de grupos sulfidrilas não é acompanhada de alterações conformacionais que afetem a atividade irreversivelmente.

Inibição por EDTA - A tabela IX mostra a inibição seletiva da AAB por EDTA. Uma alíquota da enzima foi então dializada contra EDTA (5,0 mM) e, em seguida, contra água destilada para remoção do excesso do quelante. A inativação foi completa e nenhum sal de vários cátions testado (Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} e Cu^{2+}) foi capaz de restabelecer a atividade.

Nenhum destes cátions e nem EDTA foi capaz de ativar a MAP em qualquer grau.

Inibição por puromicina - Puromicina 8×10^{-5} M e $1,6 \times 10^{-4}$ M inibiu, respectivamente, 19% e 33% da atividade da

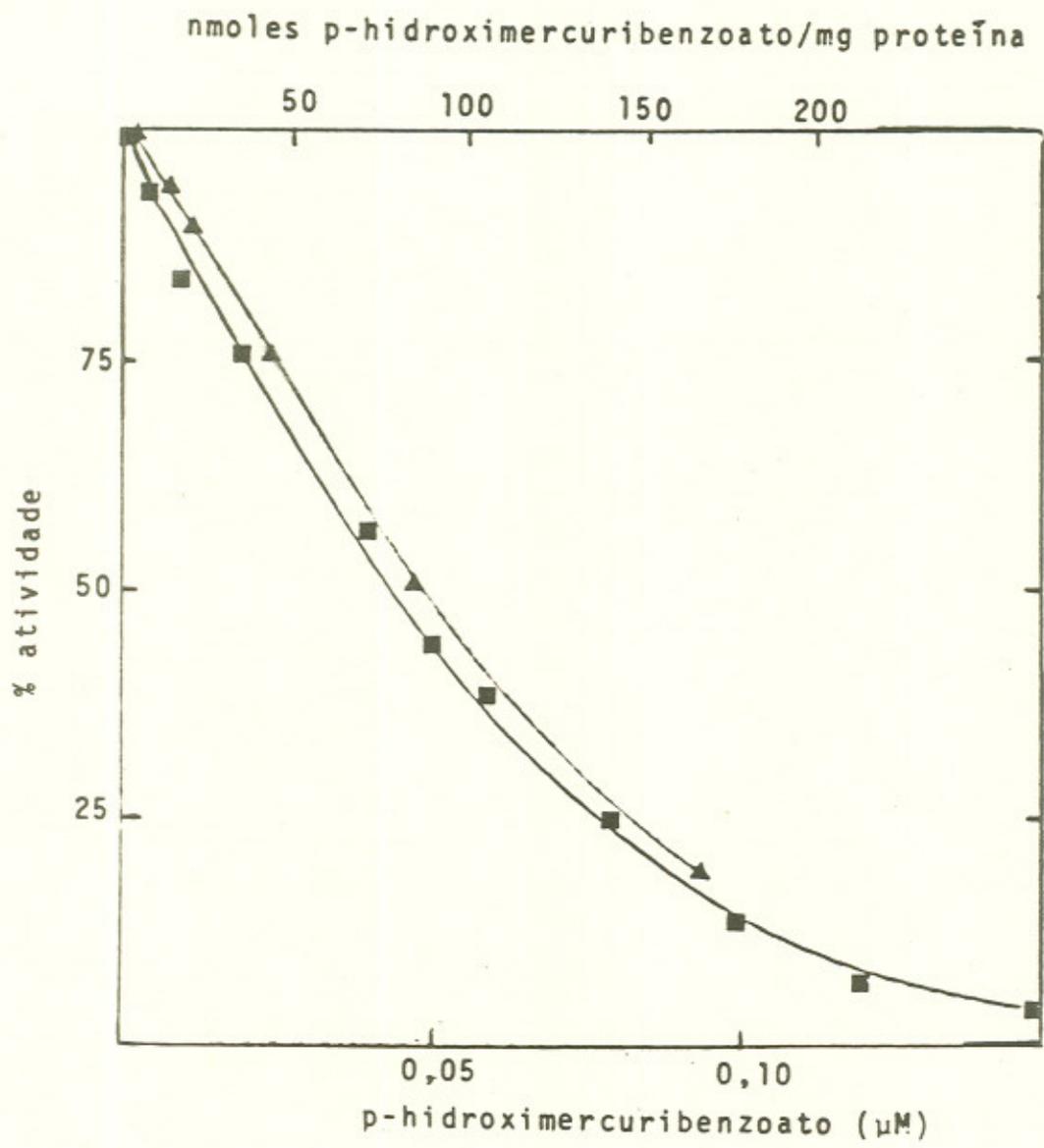


Fig. 10 - Inibição da MAP (▲) e da AAB (■) por p-hidroxi-mercuribenzoato.

TABELA IX

Inibição da MAP e da AAB por EDTA^(*)

EDTA M	% inibição	
	MAP	AAB
0	0	0
$1,0 \times 10^{-4}$	0	33
$1,5 \times 10^{-4}$	0	45
$2,0 \times 10^{-4}$	0	49
$5,0 \times 10^{-4}$	0	55

(*) antes da incubação com os respectivos substratos, MetNA para a MAP e ArgNA para a AAB, as enzimas foram pré-incubadas a temperatura ambiente por 15min com EDTA nas concentrações indicadas

AAB, mas o antibiótico não teve efeito sobre a MAP em concentrações de até $3,2 \times 10^{-4} \text{M}$.

Parâmetros cinéticos - Os valores de K_M e V_m obtidos pelo método duplo-recíproco (LINEWEAVER e BURK, 1934) foram respectivamente $8,3 \times 10^{-5} \text{M}$ e $25 \text{ nmoles. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ para a MAP (Fig. 11) e $1,7 \times 10^{-4} \text{M}$ e $1,67 \text{ } \mu\text{moles. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ para a AAB (Fig. 12).

pH ótimo - A dependência de pH para as duas enzimas mostrou um pH ótimo em torno de 7,0, comum a ambas as enzimas.

Inibição pelo produto - A inibição da AAB por L-arginina 5,3 mM (relação molar substrato-inibidor 1:70) foi completa. Na mesma relação substrato-inibidor L-metionina inibia a MAP em 18% (Tabela X).

Atividade sobre di- e tripeptídeos - A hidrólise de di- e tripeptídeos pela MAP e AAB está mostrada nas figuras 13

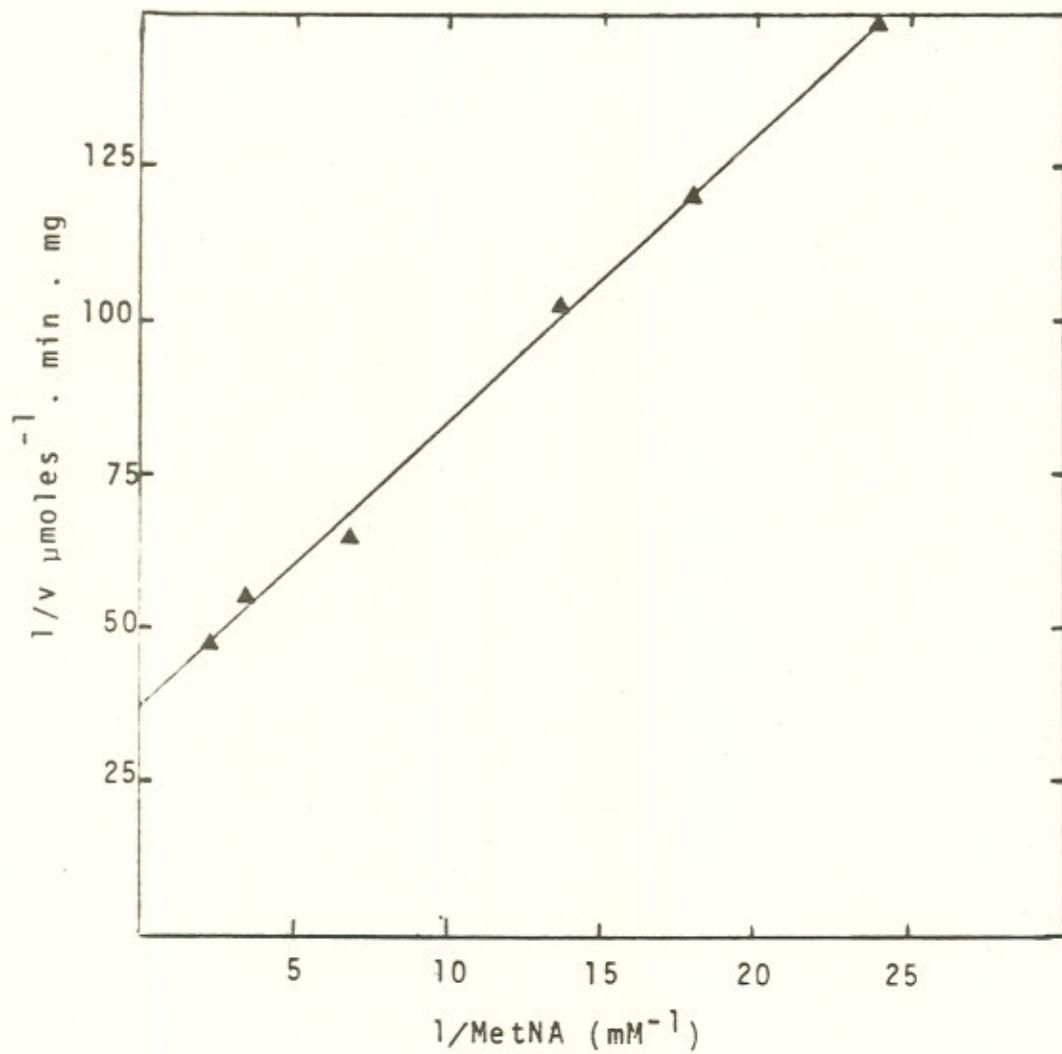


Fig. 11 - Cálculo de K_M e V_m da MAP pelo método duplo-recíproco

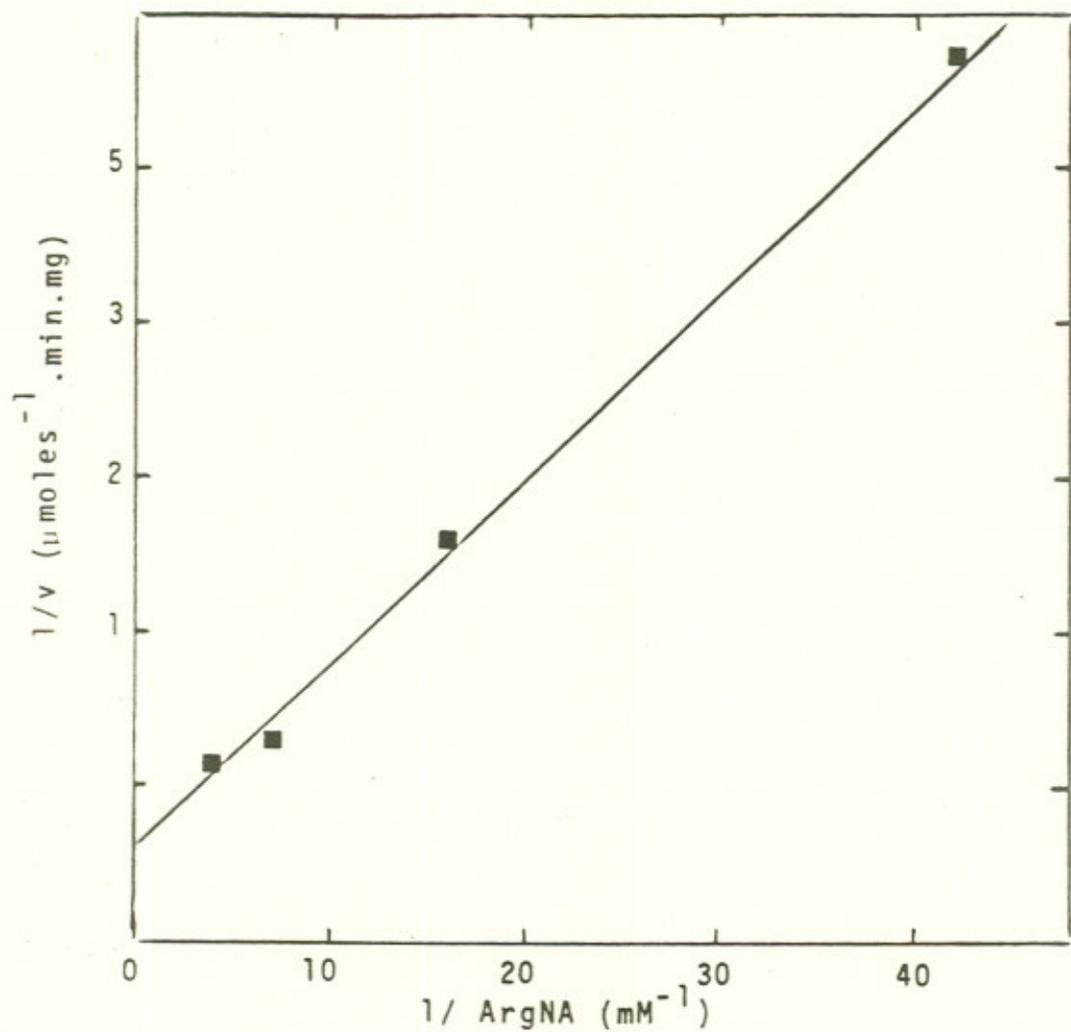


Fig. 12 - Cálculo de K_M e V_m da AAB pelo método duplo-recíproco

TABELA X

Inibição da MAP e da AAB pelos respectivos aminoácidos produtos da reação⁽¹⁾

Inibidor	mM	% inibição	
		MAP ⁽²⁾	AAB ⁽³⁾
L-metionina	1,0	11	-
	2,0	13	-
	3,0	17	-
	5,0	18	-
L-arginina	0,7	-	60
	1,3	-	64
	2,7	-	90
	4,0	-	94
	5,3	-	97
	6,7	-	98

(1) antes da adição do substrato as enzimas foram pré-incubadas 15 min com as concentrações de aminoácidos indicadas

(2) atividade sobre MetNA

(3) atividade sobre ArgNA

e 14. Os valores de velocidade inicial para estas atividades estão resumidos na tabela XI. Verifica-se nítidamente que AAB não tem ação sobre os tripeptídeos testados (Leu-Gly-Gly e Lys-Gly-Gly-NH₂) e que a atividade sobre dipeptídeos desta enzima é muito mais alta do que a da MAP.

Atividade conversora - Antes dos ensaios de conversão foi verificado através de ensaio biológico que a preparação de MAP não continha atividade cininásica pois após a incubação de 200 µl do Prep. A₁ com 1 µg de bradicinina (volume final 1,2 ml) por períodos de até duas horas a resposta do íleo isolado de cobaio ao incubado manteve-se constante.

A Fig. 15 mostra o ensaio biológico da atividade conversora da MAP sobre MLBK. Observa-se que após 18 minutos de incubação já há nítido aumento na resposta do músculo liso ao incubado. Uma resposta semelhante a 0,1 µg de MLBK nos tempos iniciais da incubação foi obtida com 50 µl do incubado e aos 41 minutos com metade deste volume. Este aumento de resposta do músculo liso indica claramente a conversão do peptídeo mas não informa sobre o tipo de cinina-produto de modo que não é possível determinar qual ou quais as ligações que a enzima ata

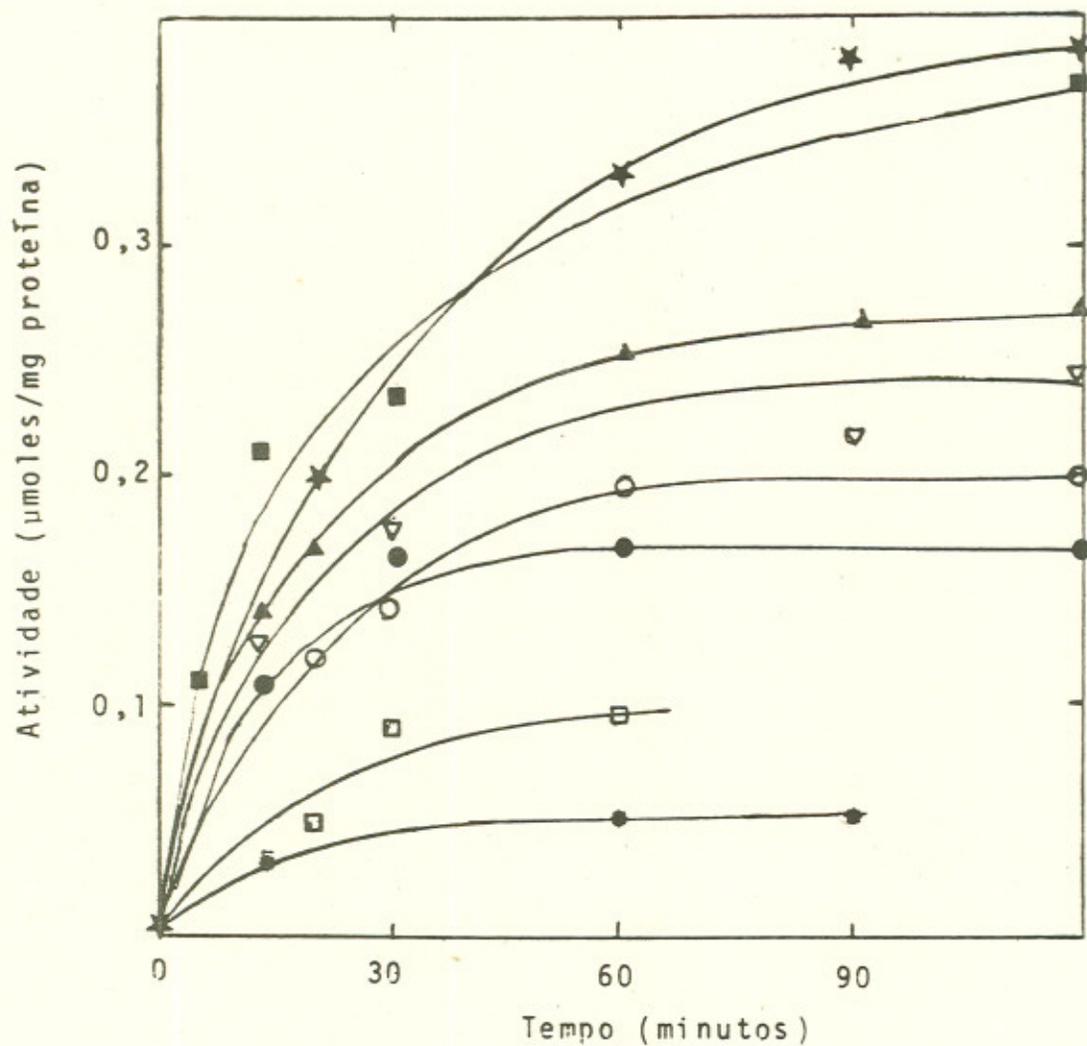


Fig. 13 - Hidrólise de di- e tripentídeos pela MAP. Lys-Val (■); Arg-Val (▲); Arg-Asp (○); Ala-Gly (□); Ala-Arg (△); Leu-Gly (●); Leu-Gly-Gly (★); Lys-Gly-GlyNH₂ (●).

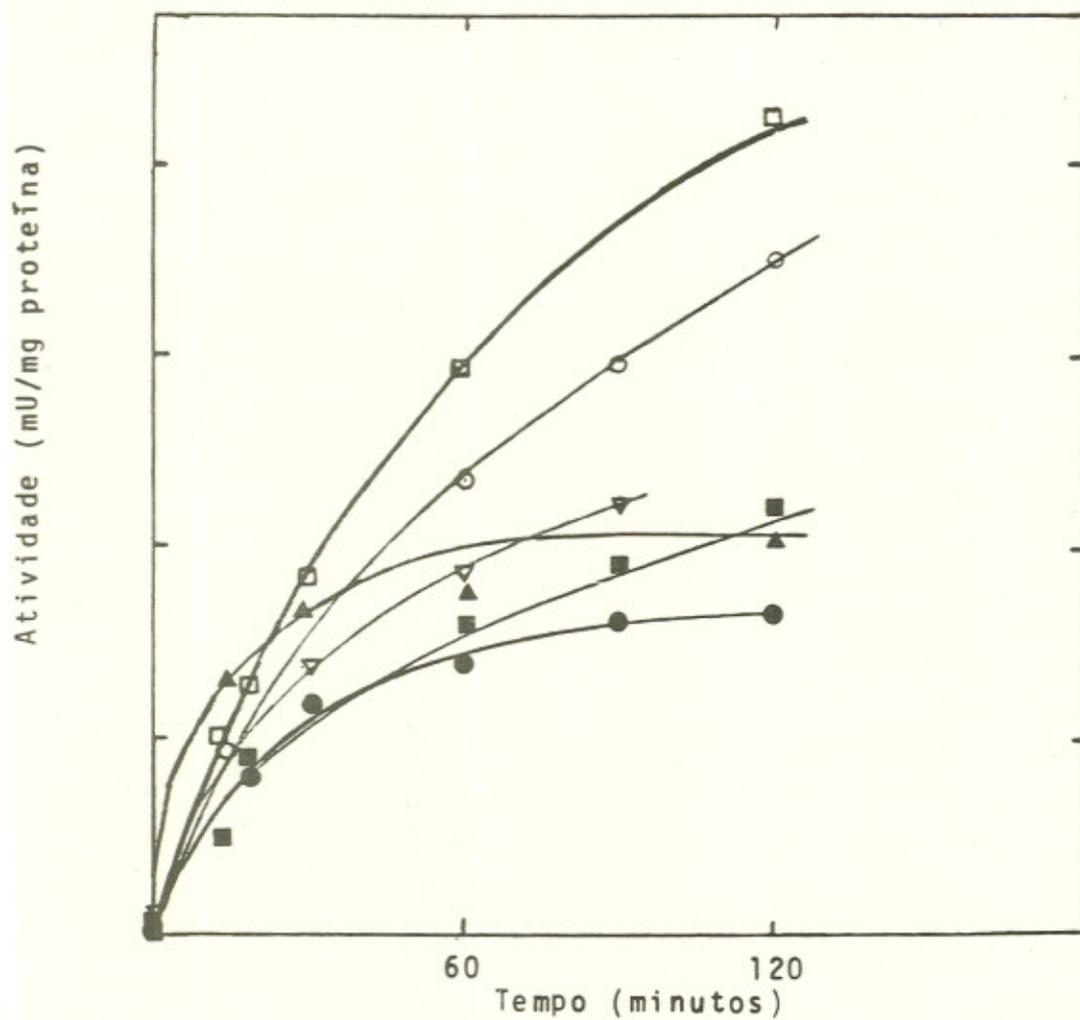
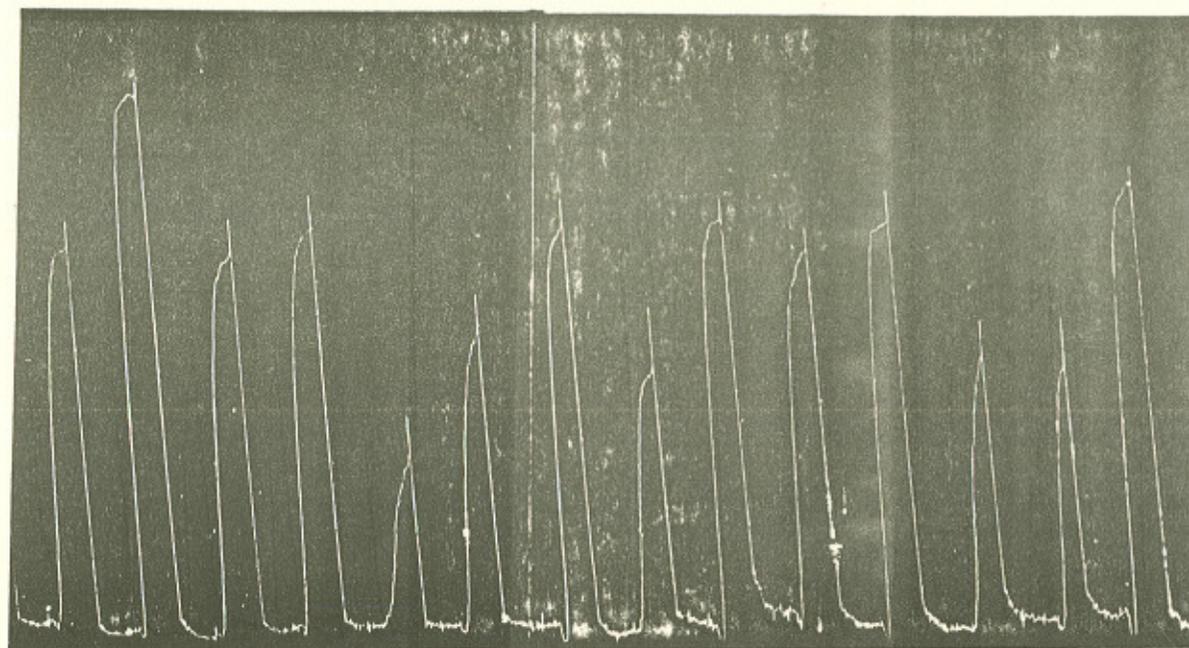


Fig. 14 - Hidrólise de dipeptídeos pela AAB. Lys-Val (○); Arg-Val (□); Arg-Asp (●); Ala-Gly (▲); Ala-Arg (■); Leu-Gly (▽).

TABELA XI

Velocidades iniciais para a hidrólise de dipeptídeos e tripeptídeos pelas enzimas MAP e AAB

Substrato	Atividade (mU/mg proteína)	
	MAP	AAB
Lys-Val	23,0	400,0
Leu-Gly-Gly	16,6	0
Arg-Val	14,4	467,0
Ala-Arg	13,0	300,0
Arg-Asp	11,1	333,0
Lys-Gly-GlyNH ₂	10,0	0
Ala-Gly	3,6	933,0
Leu-Gly	3,5	366,0



MLBK (μg)		0,2	0,1	0,05		0,1	0,05	0,1		0,1	0,05	0,1
incubado (μl)	50	50		25		25		25		15		
incubado (min)	3	9		18		41		47				

Fig. 15 - Ensaio biológico da atividade conversora da MAP. 100 μl do Prep. A₁ foram incubados com Met-Lys-bradicinina (109 μM) em tampão fosfato de sódio 0,01M contendo NaCl 0,15 M. 20 μl do incubado ou de uma solução de Met-Lys-bradicinina (109 μM) foram adicionados à 1,4 ml de HCl 0,001 N e alíquotas desta diluição (indicado) foram ensaiadas na preparação de óleo isolado de cobaio.

cou. Entretanto, observou-se também um aumento na atividade farmacológica da LBK após sua incubação com a MAP. Este aumento de resposta pelo músculo liso prova que a enzima converte também LBK em bradicinina, isto é, a MAP remove o resíduo de lisina N-terminal da LBK.

A comprovação da atividade aminopeptidásica da MAP foi obtida por análise de aminoácidos.

A liberação de metionina e lisina de MLBK e de LBK por ação da MAP (Fig. 16) foi proporcional ao tempo de reação. Os dados mostram também que embora a enzima tenha preferência para a remoção de resíduo de metionina N-terminal ($19,2 \text{ nmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) há remoção sequencial dos resíduos de metionina e lisina. A menor atividade da enzima na remoção de resíduo de lisina N-terminal foi confirmada usando LBK como substrato. Esta propriedade é característica da própria enzima e não determinada pela velocidade de aparecimento do novo substrato com resíduo de lisina N-terminal. Com efeito, as velocidades de liberação de lisina foram semelhantes tanto com a utilização de MLBK como de LBK como substrato ($4,4$ e $5,7 \text{ nmoles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectivamente).

Por outro lado, a incubação da AAB ($0,15 \text{ mU}$ sobre LysNA) com 29 nmoles de LKB (volume final de $450 \mu\text{l}$) por duas ho-

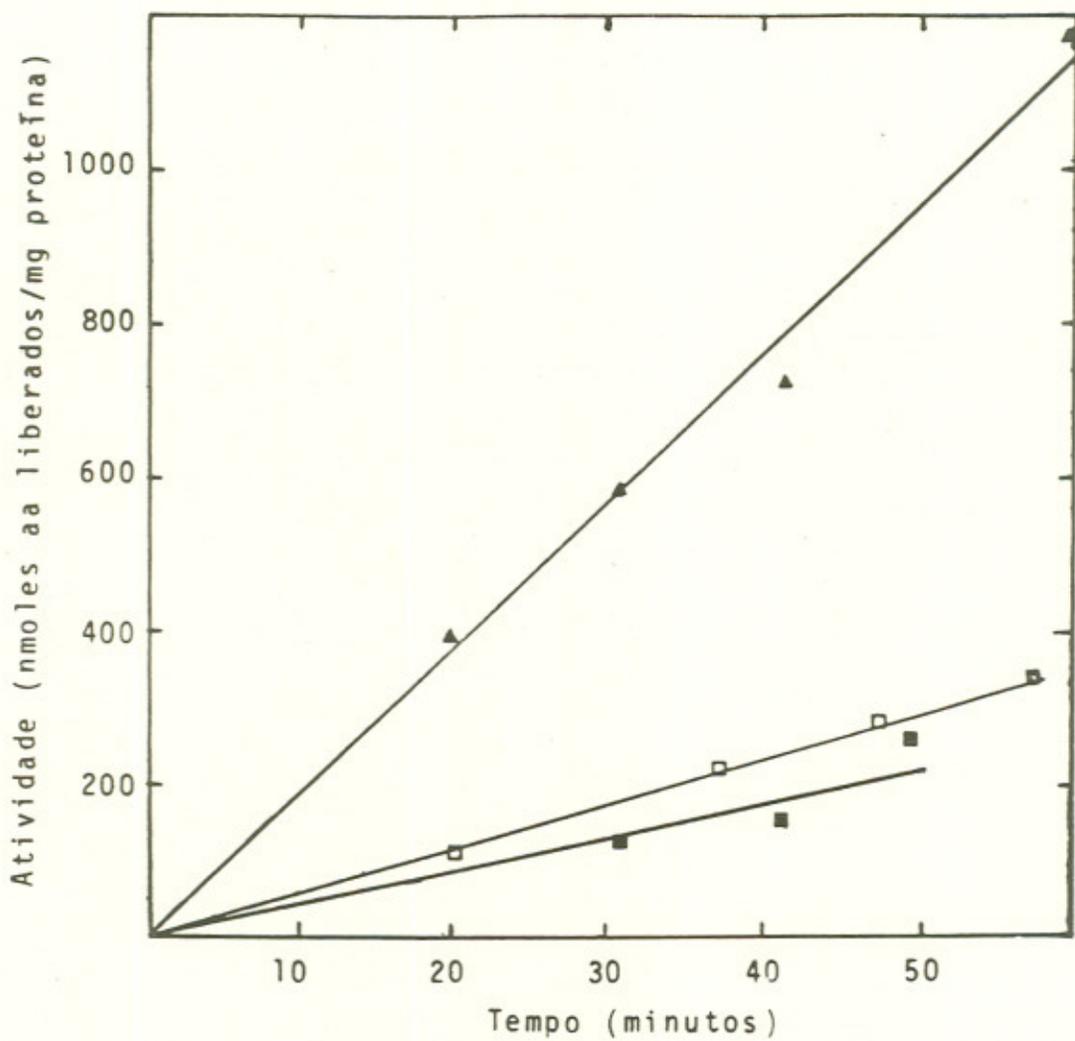


Fig. 16 - Atividade da MAP na remoção de metionina (▲) e de lisina (■) da Met-Lys-bradicina e na remoção de lisina (□) da Lys-bradicina.

ras não foi capaz de modificar a resposta da preparação de íleo isolado de cobaio à administração de alíquotas do incubado. Como neste incubado também não foi detectado, em analisador de aminoácidos, a presença de lisina livre fica evidente que a preparação de AAB não possui atividades conversora nem cininásica.

DISCUSSÃO

A perfusão do fígado de rato com tampão isotônico contendo Triton X-100, mostrou-se um método adequado para a remoção de arilamidases do tecido hepático, confirmando sua eficiência para a remoção de outras enzimas (BORGES et al, 1979). O método parece apresentar também algumas vantagens pela possibilidade do uso do tecido exanguinado além da obtenção de um "micro homogenato" com características uniformes e reproduzíveis.

A comparação entre perfusão fechada e aberta mostra claramente que a quantidade de enzima removível do fígado de rato por perfusão depende da quantidade de Triton X-100 que entra em contato com o órgão pois o prolongamento do tempo da perfusão aberta, na qual sempre é infundida nova solução como detergente, resultou em maior remoção de atividade arilamidási-

ca e proteína. Isto não ocorreu na perfusão fechada (Tabela I) que em 10 minutos removeu praticamente a mesma atividade arilamidásica que a perfusão aberta em 2 minutos. Como o tempo de 2 minutos de perfusão é suficiente para uma só passagem do volume (28 ml) utilizado no sistema fechado, a recirculação do perfusato pelo fígado foi incapaz de aumentar a remoção de enzimas e de proteína. Isto indica, possivelmente que o Triton X-100 inicialmente presente foi todo consumido nas primeiras interações com as membranas e outras partículas.

O sistema que apresentou melhores resultados na remoção de atividade arilamidásica do fígado do rato, e por isto mesmo o escolhido para a obtenção de grandes quantidades de perfusato, foi o sistema de perfusão aberto porque retirou maior quantidade de atividade arilamidásica com atividade específica semelhante à do sistema fechado.

A impossibilidade de continuar indefinidamente a perfusão aberta ou de aumentar a concentração de Triton X-100 além de 0,1 % (v/v) devido ao extravasamento de líquido pelo fígado indicou que Triton X-100 lesou o órgão. Mesmo nas condições de perfusão escolhidas (perfusão aberta por 10 minutos com tampão fosfato de sódio 0,01 M contendo sacarose 0,25 M e Triton X-100 0,05%, v/v, pH 7,0) houve lesão do hepatócito como mos-

trado na Fig. 5. As alterações observadas na ultraestrutura celular indicam claramente que o detergente penetrou no hepatócito e solubilizou algum material particulado. O grau de destruição celular indica claramente que o material removido pelo detergente é originário do hepatócito e não apenas do leito vascular como inicialmente se supôs (BORGES et al, 1979). Parte do material removido do fígado provavelmente tem origem endotelial, mas considerando a massa de hepatócitos e de células endoteliais presentes no fígado parece que a maior contribuição para o perfusato provém dos hepatócitos.

Devido à desagregação da membrana celular em alguns pontos, material celular, solúvel e particulado, passam ao líquido de perfusão. A relação das atividades específicas perfusato/homogenato, para os diversos substratos utilizados (LysNA, ArgNA e AlaNA 3,0 vezes; LeuNA 2,0 vezes e MetNA 1,5 vezes) prova claramente que o Triton X-100 não é igualmente efetivo na remoção de diferentes proteínas. A menor eficiência do detergente na remoção da atividade sobre LeuNA e MetNA parece indicar que a atividade responsável por estas hidrólises se encontra mais fortemente associada a frações celulares particuladas do que as enzimas responsáveis pela hidrólise dos outros três substratos. Com efeito, obtivemos anteriormente (FREITAS Jr.

et al, 1979b; TERMIGNONI et al, 1979) evidências da existência de uma enzima particulada (mitocondrial e microsomal) provavelmente a responsável pela atividade sobre MetNA e LeuNA acima mencionada. A comparação entre as atividades relativas do homogenato e do perfusato também mostra um comportamento distinto na remoção das atividades sobre os vários substratos: a relação MetNA/LysNA é, no perfusato, menos da metade daquela do homogenato. Portanto o Triton X-100 foi mais efetivo na remoção das enzimas com atividade sobre LysNA, ArgNA e AlaNA (atividades relativas do mesmo valor no homogenato e no perfusato). A remoção de apenas uma parcela da atividade total do órgão pela perfusão (atividades sobre LysNA, ArgNA e AlaNA, 8%; LeuNA, 5% e MetNA, 4%) pode ser devida à incapacidade do Triton X-100 remover proteínas ligadas muito fortemente a partículas ou à sua impossibilidade em atingir homogeneamente as células do fígado ou ainda todas as regiões de uma célula. Durante o tempo de perfusão utilizado não foi perdido líquido de perfusão pela superfície do órgão e muitas das suas estruturas ainda permaneceram íntegras ou parcialmente íntegras; justificando assim as hipóteses aventadas. A presença de regiões do hepatócito afetadas pelo detergente em graus diferentes (Fig. 5) mostra claramente que a ação do detergente no fígado não é homogênea. Provavelmente a ação do detergente se irradie a partir

dos vasos atingindo também estruturas próximas. Desta maneira a perfusão com Triton X-100, apesar de não se restringir à remoção de material do endotélio, pode ser um bom sistema para remover moléculas que eventualmente tenham algum papel em processos fisiológicos importantes associados aos vasos sanguíneos, tais como micro-circulação e pressão arterial.

A existência de várias aminopeptidases hepáticas (HOPSU et al, 1964; BEHAL et al, 1969; BORGES et al, 1974; FREITAS Jr., et al 1979a) tem sido sugerida, embora algumas vezes com dados desconcontrados. Em nossos experimentos, demonstramos que o Triton X-100 foi capaz de remover enzimas com atividades aparentemente distintas. O efeito do ion cloreto na ativação da hidrólise apenas de ArgNA e LysNA indicou que provavelmente o perfusato contém uma enzima semelhante à aminopeptidase B. Além desta atividade a perfusão com Triton X-100 removeu também outras com propriedades distintas.

Um parâmetro que indicou a presença de várias arilamidases foi o da inativação espontânea da atividade arilamidásica do perfusato. Esta inativação não foi paralela: ArgNA e LysNA (60%); MetNA e LeuNA (53%) e AlaNA (42%). A perda de atividade foi evitada em maior ou menor grau por 2-mercaptoetanol que também reverteu a inibição da atividade por tetrationato de

sódio. Assim as arilamidases do perfusato possuem um ou mais grupos sulfidrilas que, estando ou não no sítio ativo, são importantes para a atividade enzimática.

Para confirmar a existência de várias arilamidases o perfusato foi fracionado em cromatografia de troca iônica (coluna de DEAE-celulose).

Neste fracionamento foram obtidos três picos de atividade, com eluição e especificidade bastante distintos. A cromatografia, repetida várias vezes, confirmou as evidências da existência de pelo menos três arilamidases no perfusato. A partir deste fracionamento foi possível calcular a fração da atividade sobre cada um dos substratos que correspondia a cada pico, ou seja, quando da atividade do perfusato era devida a cada uma das três enzimas. Deste modo foi possível contornar parcialmente o problema causado pela existência, num mesmo material, de várias enzimas com atividade por vezes sobrepostas, e então calcular seus graus de purificação.

Neste trabalho algumas propriedades das enzimas dos dois primeiros picos de atividade fracionável por DEAE-celulose, foram estudadas mais detalhadamente.

Dada a destacada preferência para a hidrólise de MetNA, a enzima não retida na coluna foi denominada de metionil-aminopeptidase (MAP). Considerando a utilização de apenas duas etapas (cromatografia de troca iônica e gel filtração) na purificação parcial desta enzima o fator de purificação (11,7) é baixo pois 57% da atividade foi perdida durante o processamento. Este resultado mostra que mesmo processada em presença de 2-mercaptoetanol a enzima permaneceu instável, de modo que, além da oxidação de grupos sulfidrilas, outros mecanismos estão envolvidos na inativação, principalmente com a enzima mais purificada. Devido a esta instabilidade a quantidade de cada enzima no perfusato talvez não seja exatamente a calculada pois pode ter havido inativação durante as etapas de purificação e a fração da atividade do perfusato que correspondia a cada enzima pode ser outra que não a calculada. Por esta razão o fator de purificação não deve ser tomado sem reservas.

Comparando as atividades relativas de arilamidases de diversas fontes (Tabela XII), verifica-se que, a exceção da arilamidase do tecido de cicatrização (MÄKINEN e RAEKALLIO, 1968), nenhuma outra arilamidase tem atividade relativa tão alta para a hidrólise de MetNA como a MAP. Além da especificidade a arilamidase do tecido de cicatrização se distingue da MAP por

TABELA XII

Comparação das atividades sobre AANA de arilamidases de diversas procedências⁽¹⁾

Procedência	LysNA	ArgNA	LeuNA	MetNA	MetNA
fígado de rato - MAP (perfusato)	1,0	1,6	10,1	12,0	2,2
fígado humano (sobrenadante, homogenato) ⁽²⁾	1,0	1,7	3,7	4,8	6,5
plasma humano ⁽³⁾	1,0	1,8	2,6	4,0	nd ⁽¹⁰⁾
fígado humano (pellet, homogenato) ⁽⁴⁾	1,0	1,8	2,9	6,2	nd ⁽¹⁰⁾
urina humana ⁽⁵⁾	1,0	1,8	2,9	4,0	nd ⁽¹⁰⁾
fígado humano (sobrenadante, autólise) ⁽⁶⁾	1,0	2,2	2,8	4,5	7,7
fígado humano (pellet, homogenato) ⁽⁷⁾	nd ⁽¹⁰⁾	nd ⁽¹⁰⁾	1,0	1,5	1,6
aminopeptidase do citosol ⁽⁸⁾	nd ⁽¹⁰⁾	nd ⁽¹⁰⁾	2,0	1,0	nd ⁽¹⁰⁾
tecido de cicatrização de rato ⁽⁹⁾	0 ⁽¹²⁾	0 ⁽¹²⁾	2,0	8,0	1,0
cérebro de coelho ⁽¹⁰⁾	1,8	1,3	1,0	1,4	nd ⁽¹¹⁾

(1) a menor atividade de cada preparação foi tomada como unitária; (2) FREITAS Jr. et al, 1977; (3) GUIMARÃES et al, 1972; (4) BORGES et al, 1974; (5) BRANDI et al, 1976; (6) BEHAL et al, 1969; (7) SMITH et al, 1965; (8) BORGES et al, 1974; (9) MAKINEN E RAEKALLIO, 1968 (10) CAMARGO et al, 1972; (11) não determinado; (12) sem atividade.

sofrer ativação por EDTA e inibição por NaCl. Não foi possível comparar as atividades da MAP com a aminopeptidase do citosol (EC 3.4.11.2) e com a aminopeptidase microsomal (EC 3.4.11.2) devido ao uso de substratos diferentes. Apesar disto, a MAP se distingue daquelas enzimas porque não é ativada por Mn^{2+} e Mg^{2+} (distinção com a aminopeptidase do citosol, SMITH e SPACKMAN, 1955) e porque ao contrário da aminopeptidase microsomal (WACHSMUTH et al, 1966) a MAP é dependente de grupo -SH livre como prova sua inibição por p-hidroximercuribenzoato e reativação por 2-mercaptoetanol. Portanto os resultados obtidos sugerem que a MAP é uma nova enzima.

Apesar de não ser inibida por EDTA não está descartada a hipótese de que a MAP, como outras aminopeptidases, seja uma metaloenzima. Foi descrita uma aminopeptidase (SCHWABE, 1969) que só é inibida por EDTA a $40^{\circ}C$, condição na qual a MAP não foi testada.

O peso molecular determinado para esta enzima foi de 68 000 daltons e o ótimo de pH para a hidrólise de MetNA está situado ao redor de pH 7,0.

A atividade conversora mostra que a MAP é uma aminopeptidase típica, isto é, não só age sobre substratos sintéti

cos artificiais do tipo das 2-naftilamidas, como também age sobre peptídeos mais longos do que di- e tripeptídeos.

Esta enzima provavelmente é responsável, ao menos por parte da atividade conversora verificada em preparações de rato exanguinado (PRADO et al, 1975). Suas propriedades são também muito similares à metionil-aminopeptidase particulada encontrada em microsomas (36%) e mitocôndrias (40%) do fígado de rato (FREITAS Jr. et al, 1979b; TERMIGNONI et al, 1979; TERMIGNONI et al, 1980).

A enzima do pico B da coluna de DEAE-celulose foi denominada arilamidase B (AAB) em decorrência de possuir duas propriedades (especificidade para ArgNA e LysNA e dependência de ion cloreto) características da aminopeptidase B (HOPUSU et al, 1966b).

Calculando a atividade sobre ArgNA desta enzima no perfusato com base na fração de atividade do pico B em relação ao total eluído da coluna de DEAE-celulose, esta enzima foi purificada cerca de 30 vezes com um rendimento de 26%. Este valor não foi mais alto porque, entre as etapas de purificação foi necessário armazenar a enzima a -20°C , o que se constituiu em etapa de perda de atividade, já que, por vezes, o tem

po de preservação da amostra era longo demais para o uso de outras condições.

A comparação entre as características da AAB com aquelas da aminopeptidase B (HOPSU et al, 1966b) mostrou muitas semelhanças: ambas são dependentes de ion cloreto; tem mesma especificidade (preferem AANA de resíduos de aminoácidos básicos com relação de atividade ArgNA/LysNA de 2,5); são dependentes de -SH (inibidas por p-hidroximercuribenzoato); têm pH ótimo em torno de 7,0; perdem atividade sob congelamento/descongelamento; hidrolisam Arg-Val e não hidrolisam Lys-Gly-GlyNH₂. Entretanto somente a AAB hidrolisa Ala-Gly e Leu-Gly. Os outros dipeptídeos testados como substrato não foram os mesmos para as duas enzimas e por isto uma comparação detalhada não pode ser realizada. Entretanto nenhum dipeptídeo com resíduo de alanina na posição N-terminal foi hidrolisado pela aminopeptidase B ao contrário da AAB que agiu sobre dipeptídeos com resíduos N-terminais de alanina e leucina. A atividade da AAB sobre estes dipeptídeos não encontra paralelismo na aminopeptidase B preparada por Hopsu et al (1966b) e pode ser devida a presença de algum contaminante. Entretanto há uma diferença que não pode ser creditada a este possível contaminante: a AAB não converte Lys-bradicinina em bradicinina ao contrário do

que foi relatado para a aminopeptidase B (HOPSU et al, 1966c). A AAB não tem atividade conversora pois mesmo considerando que sua atividade sobre Lys-bradicinina fosse cem vezes menor do que aquela sobre LysNA (observar que as atividades sobre AANA e sobre dipeptídeos são semelhantes) o tempo de incubação, 120 minutos, e a quantidade de enzima incubada com 29 nmoles de Lys-bradicinina seriam suficientes para produzir 1,8 nmoles de bradicinina. Esta quantidade seria detectada não só pelo ensaio biológico, que é extremamente sensível, mas também pela caracterização da lisina no analisador de aminoácidos. Portanto parece claro que a AAB não é uma típica aminopeptidase e não participa na conversão de cininas pelo fígado.

Há muitas semelhanças entre as propriedades da AAB e da aminopeptidase B do grupo de Hopsu. As diferenças de peso molecular encontradas (aminopeptidase B, 95 500 daltons, Hopsu et al, 1966a; AAB, 57 000 daltons) não justificam concluir que se tratem de enzimas diferentes. Conforme discutido pelos autores, uma variação de até 20% nas suas determinações seria aceitável. Além disso, a coluna utilizada por Hopsu et al era muito curta (60 cm) para permitir uma avaliação mais acurada do peso molecular. Desta forma, pode-se aceitar como válida a semelhança entre as enzimas. Entretanto, nossa conclu-

são de que a AAB não é dotada de atividade aminopeptidásica típica, mostra acentuada discrepância entre nossos dados e os daqueles autores. Como foi mencionado anteriormente o cromatograma apresentado pelos autores (HOPSU et al, 1966c) não permite concluir-se pela inequívoca atividade cinino-conversora da aminopeptidase B. Se alguma atividade existisse ela poderia ainda ser devida à presença de algum dos contaminantes citados pelos próprios autores e capazes de tal atividade. Assim, acreditamos que as duas enzimas sejam realmente a mesma, com propriedades mais dirigidas para a hidrólise de dipeptídeos e tendo em comum a atividade arilamidásica sobre ArgNA e LysNA compatível com a atividade dipeptidásica. Uma comprovação de tal possibilidade é a ausência de hidrólise de tripeptídeos por ambas enzimas. Alguma discordância encontrada na hidrólise de dipeptídeos poderia novamente ser atribuída à contaminação de uma ou de ambas as preparações.

Os resultados da inibição por puromicina estão de acordo com a sugestão de Marks (1968) de que a inibição por este antibiótico discrimina arilamidases de aminopeptidases. Assim puromicina inibiu a AAB que não tem atividade sobre polipeptídeos e foi incapaz de inibir a MAP, uma aminopeptidase típica. Entretanto acreditamos que a inibição por este antibió-

tico não discrimina arilamidases de aminopeptidases pois não pode ser negada a existência de aminopeptidases verdadeiras que são inibidas por puromicina (CAMARGO et al, 1972; GUIMARÃES et al, 1972; BORGES et al, 1974).

A maior atividade da enzima na remoção de metionina da Met-Lys-bradicinina do que na remoção de lisina da Lys-bradicinina indica um paralelismo entre as especificidades para AANA e peptídeos. Entretanto os aminoácidos N-terminais dos dipeptídeos e tripeptídeos que foram melhor substrato para cada uma das enzimas (MAP e AAB) não corresponderam obrigatoriamente aos AANA que cada enzima hidrolisa preferencialmente. A atividade da AAB (não age sobre AlaNA) foi maior sobre Ala-Gly do que aquela sobre qualquer outro dipeptídeo, inclusive aqueles com resíduo de arginina ou lisina em posição N-terminal. Entre os dipeptídeos e tripeptídeos a MAP preferiu Lys-Val, embora sua ação sobre LysNA seja muito pequena. Considerando os tripeptídeos, esta falta de paralelismo na especificidade sobre os vários tipos de substrato volta a ocorrer. Desta maneira a especificidade de uma aminopeptidase não pode ser determinada apenas com o uso de substratos artificiais, embora nestes casos, para comparação, seja possível manter constante o radical de 2-naftilamina.

Este fato poderia possibilitar outras interpretações. Acreditamos porém, que a hidrólise de dipeptídeos por aril- ou aminopeptidases seja muito influenciada pela existência de um grupamento carregado negativamente na extremidade C-terminal. Não há, além disso, aparentemente nenhum empecilho para que uma dipeptidase não tenha atividade arilamidásica, tornando-se difícil a distinção entre estas enzimas e dipeptidases típicas. Ademais, a distinção entre di-, tri- e aminopeptidases somente pode ser feita com o uso de peptídeos de cadeias mais longas.

No caso da MAP, a especificidade não é dirigida somente ao resíduo de aminoácido N-terminal pois a enzima foi mais ativa sobre Lys-Val, Leu-Gly-Gly e Ala-Arg do que sobre Lys-Gly-GlyNH₂, Leu-Gly e Ala-Gly, respectivamente. Parece claro assim, que alguns parâmetros sejam essenciais para a atividade aminopeptidásica típica: a) comprimento da cadeia polipeptídica; b) natureza do resíduo N-terminal; c) tipo de aminoácido envolvido na ligação peptídica com o resíduo N-terminal. Assim parece que a MAP e provavelmente outras aminopeptidases possuem, no centro ativo, sub-sítios para ligação de aminoácidos situados nas posições vizinhas ao aminoácido N-terminal, à semelhança do que ocorre com a papaina (SCHECHTER e BERGER,

1967) que reconhece aminoácidos vizinhos aos que formam a ligação peptídica hidrolisada.

Os parâmetros cinéticos obtidos com a atividade ariamidásica, ensaiada com os melhores substratos para cada uma das enzimas, mostram que o K_M da AAB tem o dobro do valor do K_M da MAP indicando que esta última tem maior afinidade pelo respectivo substrato. Além disso, AAB sofre inibição mais acentuada pelo produto da reação (arginina) do que a MAP pela metionina. O valor de V_m da AAB sobre ArgNA é 66 vezes maior que o da MAP sobre MetNA. Esta diferença pode ser resultante de diferenças no grau de pureza de cada enzima e não necessariamente uma diferença real nas atividades catalíticas e precisa ser melhor esclarecida através da obtenção de preparações das enzimas em grau mais alto de pureza. Para isto, entretanto, é necessário estudar mais detalhadamente os processos de inativação das enzimas.

Os resultados obtidos mostram que a conversão da MLBK em BK se dá em duas etapas de remoção de aminoácidos N-terminais. A atividade da MAP na remoção de resíduo de metionina N-terminal foi maior que na remoção de resíduo de lisina N-terminal, a semelhança do que ocorre com AANA como substrato.

A capacidade da MAP em converter cininas não significa, por si só, que esta enzima tenha um papel importante no metabolismo destes peptídeos. Talvez esta seja uma atividade secundária da enzima. Para estabelecer este ponto é necessário comparar não só os dados cinéticos de todas as enzimas convertoras como também verificar os níveis de cada uma destas enzimas em diferentes estados fisiológicos. Esta enzima pode ainda participar em outros mecanismos envolvendo a remoção de resíduos N-terminais de metionina que não apenas a ativação de hormônios peptídicos. Portanto, para estabelecer a função metabólica da MAP, é necessário testar sua atividade sobre outros peptídeos, proteínas contendo metionina na posição N-terminal e mesmo pré-proteínas.

CONCLUSÕES

1 - A perfusão do fígado de rato "in situ" com tampão fosfato de sódio 0,01 M - sacarose 0,25 M, pH 7,0 contendo 0,05% Triton X-100, pelo método "aberto" (i.e, sem recirculação), remove parcialmente a atividade arilamidásica contida no órgão. A atividade específica do perfusato é maior do que a do homogenato do fígado. A remoção das enzimas deve ser devida a lesões do hepatócito, constatadas pela observação com microscópio eletrônico do tecido perfundido.

2 - O fracionamento do perfusato em coluna de DEAE-celulose revelou a presença de três atividades arilamidásicas distintas. Uma delas, não adsorvida, tem alta especificidade para metionil-2-naftilamida; é uma aminopeptidase típica; converte metionil-lisil-bradiginina em lisil-bradiginina; seu peso molecular é de 68 000 daltons; pH ótimo 7,0 e é -SH depen-

dente. Esta enzima, chamada metionil-aminopeptidase, tem propriedades que permitem distingui-la de outras aminopeptidases previamente descritas, e foi parcialmente descrita em comunicações científicas (FREITAS Jr. et al, 1979b; TERMIGNONI et al, 1979; TERMIGNONI et al, 1980).

3 - A segunda enzima, eluída da coluna de DEAE-celulose entre as condutividades 3,0 e 5,7 mS (baixa força iônica) apresentou características que permitem identificá-la como a aminopeptidase B (EC 3.4.11.6), anteriormente descrita por Hopsu (1966a). Esta arilamidase hidrolisa AANA e dipeptídeos mas não apresentou atividade cinino-conversora e nem agiu sobre os tripeptídeos Lys-Gly-GlyNH₂ e Leu-Gly-Gly, comportando-se como uma dipeptidase e não como uma aminopeptidase típica.

4 - A terceira enzima, eluída entre as condutividades 7,5 e 9,8 mS e não apresentando distinção na atividade sobre ArgNA, MetNA e AlaNA ainda não pode ser melhor caracterizada.

BIBLIOGRAFIA

- Alonzo, N. e Hirs, C.H.W. - Automation of sample application in amino acid analyzers. *Anal.Biochem.* 23: 272, 1968.
- Andrews, P. - Estimation of the molecular weight of protein by Sephadex gel filtration. *Biochem.J.* 91: 222, 1964.
- Barrett, A.J. - A new assay for cathepsin B1 and other thiol proteinases. *Anal.Biochem.* 47: 280, 1972.
- Behal, F.J.; Little, G.H. e Klein, R.A. - Arylamidase of human liver. *Biochim.Biophys.Acta* 178: 118, 1969.
- Borges, D.R.; Prado, J.L. e Guimarães, J.A. - Characterization of a kinin-converting arylaminopeptidase from human liver. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol.* 281: 403, 1974.

- Borges, D.R.; Limões, E.A. e Prado, J.L. - Catabolism of vasoactive polypeptides by perfused rat liver. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 295: 33, 1976.
- Borges, D.R.; Guimarães, J.A.; Limões, E.A.; Prado, J.L. e Camargo, A.C.M. - Bradykinin inactivation by γ -perfused rat liver. Role of a thiol activated endopeptidase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 309: 197, 1979.
- Brandi, C.M.W.; Prado, E.S.; Prado, M.J.A. e Prado, J.L. - Kinin-converting aminopeptidase from human urine. Partial purification and properties. *Int. J. Biochem.* 7: 335, 1976.
- Camargo, A.C.M.; Ramalho-Pinto, F.J. e Greene, L.J. - Brain peptidases: conversion and inactivation of kinin hormones. *J. Neurochem.* 19: 37, 1972.
- Chenoweth, D.; Mitchel, R.E.J. e Smith, E.L. - Aminotripeptidase of swine kidney. I Isolation and characterization of three different forms; utility of the enzyme in sequence work. *J. Biol. Chem.* 248: 1672, 1973.

- Donlon, J. e Fottrell, P.F. - Purification and characterization of one of the forms of peptide hydrolases from guinea-pig small intestinal mucosa. *Biochem.Biophys.Acta* 327: 425, 1973.
- Erdős, E.G.; Renfrew, A.G.; Sloane, E.M. e Wohler, J.R. - Enzymatic studies on bradykinin and similar peptides. *Ann. N.Y.Acad.Sci.* 104: 222, 1963.
- Fields, R. - The measurement of amino groups in proteins and peptides. *Biochem.J.* 124: 581, 1971.
- Freitas Jr., J.O.; Guimarães, J.A.; Borges, D.R. e Prado, J.L. - Further characterization of two arylaminopeptidases from human liver. *An.Acad.brasil.Ciênc.* 50: 115, 1978.
- Freitas Jr., J.O.; Guimarães, J.A.; Borges, D.R. e Prado, J.L. - Two arylamidases from human liver and their kinin-converting activity. *Int.J.Biochem.* 10: 81, 1979a.
- Freitas Jr., J.O.; Guimarães, J.A.; Borges, D.R. e Prado, J.L. - Arylamidases distribution in rat organs; characterization of a liver-converting arylaminopeptidase. Resumos da VII. Reunião da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Caxambū, Minas Gerais, D34, 1979b.

- Glenner, G.G.; McMillan, P.J. e Folk, J.E. - A mammalian peptidase specific for the hydrolysis of N-terminal alfa-L-glutamyl and aspartyl residues. *Nature* 194: 867, 1962.
- Guimarães, J.A.; Prado, E.S. e Prado, J.L. - Plasma aminopeptidase capable of converting kallidin (L-lysyl-bradykinin) to bradykinin and plasma L-lysyl-naphthylamidase: *An. Acad. brasil. Ciênc.* 43: 834, 1971.
- Guimarães, J.A. - Enzima cinino-conversora do soro humano. Preparação e propriedades. *Tese.* Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1972.
- Guimarães, J.A.; Borges, D.R.; Prado, E.S. e Prado, J.L. - Kinin-converting aminopeptidase from human serum. *Biochem. Pharmacol.* 22: 3157, 1973.
- Himmelhoch, S.R. - Leucine aminopeptidase: a zinc metalloenzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 134: 597, 1969.
- Hopsu, V.K.; Kantonen, V. e Glenner, G.G. - A peptidase from rat tissues selectively hydrolyzing N-terminal arginine and lysine residues. *Life Sciences* 3: 1449, 1964.

- Hopsu, V.K.; Mäkinen, K.K. e Glenner, G.G. - Purification of a mammalian peptidase selective for N-terminal arginine and lysine residues: aminopeptidase B. *Arch.Biochem.Biophys.* 114: 557, 1966a.
- Hopsu, V.K.; Mäkinen, K.K. e Glenner, G.G. - Characterization of aminopeptidase B: substrate specificity and effector studies. *Arch.Biochem.Biophys.* 114: 567, 1966b.
- Hopsu-Havu, V.K.; Mäkinen, K.K. e Glenner, G.G. - Formation of bradykinin from kallidin-10 by aminopeptidase B. *Nature* 212: 1271, 1966c.
- International Union of Biochemistry. Enzyme Nomenclature. Academic Press, New York, 1979, pp. 300.
- Kao, Y.J.; Starnes, W.L. e Behal, F.J. - Human kidney alanine aminopeptidase: physical and kinetic properties of a sialic acid containing glycoprotein. *Biochemistry* 17: 2290, 1978.
- Knight, M. e Klee, W.A. - The relationship between enkephalin degradation and opiate receptor occupancy. *J.Biol.Chem.* 253: 3843, 1978.

- Kobuku, T.; Akutsu, H.; Fugimoto, S.; Ueda, E.; Hiwada, K. e Yamamura, Y. - Purification and properties of endopeptidase from rabbit red cells and its process of degradation of angiotensin. *Biochem.Biophys.Acta* 191: 688, 1969.
- Lineweaver, H. e Burk, D. - The determination of enzyme dissociation constants. *J.Am.Chem.Soc.* 56: 658, 1934.
- Mäkinen, K.K. - Effect of certain chemical compounds on rat liver aminopeptidase B acting on L-arginyl-2-naphthylamide with evidence of the occurrence of a similar enzyme in the liver of human fetuses. *Arch.Biochem.Biophys.* 126: 803, 1968.
- Mäkinen, K.K. e Mäkinen, P.L. - Effect of sodium chloride on substrate constant and maximum velocity in the enzymic hydrolysis of N-L-aminoacyl-2-naphthylamines and N-L-aminoacyl-p-nitroanilines. *Acta Chem. Scand.* 25: 969, 1971.
- Mäkinen, K.K. - Evidence for the aggregation of aminopeptidase B during storage and breakdown of the aggregate by substrate and serum albumin. *Biochem.Biophys.Acta* 271: 413, 1972.

- Mäkinen, K.K. e Mäkinen, P.L. - Purification and characterization of two human erythrocyte arylamidases preferentially hydrolysing N-terminal arginine on lysine residues. *Biochem. J.* 175: 1051, 1978.
- Mäkinen, P.L. e Raekallio, J. - Purification and properties of an arylaminopeptidase of rat tissue, acting chiefly on the 2-naphthylamides of L-methionine and L-valine. *Acta Chem. Scand.* 22: 3111, 1968.
- Mäkinen, P.L.; Raekallio, J. e Mäkinen, K.K. - On the localization of aminopeptidase B and separation of its two molecular forms by automated recycling chromatography. *Acta Chem. Scand.* 24: 1101, 1970.
- Mäkinen, P.L. e Mäkinen, K.K. - Fractionation and properties of aminopeptidase B during purification and storage. *Int. J. Peptide Res.* 4: 241, 1972.
- Marks, N.; Datta, R.K. e Lajtha, A. - Partial resolution of brain arylamidases and aminopeptidases. *J. Biol. Chem.* 243: 2882, 1968.

- Ono, T.; Eto, L. e Arakawa, K. - Origin of urinary enzymes hydrolyzing β -naphthylamides of L-leucine and L-glutamic acid. *Clin.Chim.Acta* 19: 257, 1968.
- Page, E.W.; Titus, M.A.; Mohun, G. e Glendening, M.B. - The origin and distribution of oxytocinase. *Am.J.Obst.Gynec.* 82: 1090, 1961.
- Paiva, A.C.M. e Paiva, T.B. - The importance of the N-terminal end of angiotensin II for its pressor oxytocic activities. *Biochem.Pharmacol.* 5: 187, 1960.
- Patterson, E.K.; Hsiao, S. e Keppel A. - Studies on dipeptidases and aminopeptidases: I Distinction between leucine aminopeptidase and enzymes that hydrolyze L-leucil- β -naphthylamide. *J.Biol.Chem.* 238: 3611, 1963.
- Prado, E.S.; Webster, M.E. e Prado, J.L. - Aminopeptidase no plasma equino que converte calidina para bradicinina. *Ciênc. e Cult.* 21: 537, 1969.

- Prado, J.L.; Limões, E.A.; Roblero, J.; Freitas Jr., J.O.; Prado, E.S. e Paiva, A.C.M. - Recovery and conversion of kinin in exsanguinated rat preparations. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 290: 191, 1975.
- Schechter, I. e Berger, A. - On the size of the active site in Proteases. I papain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 27: 157, 1967.
- Schinke, R.T. e Bradley, M.O. - Properties of protein turnover in animal cells and a possible role for turnover in "quality" control of proteins. In: Reich, E.; Rifkin, D.B. e Shaw, E. ed. - Proteases and Biological control. Cold Spring Harbour Conferences on cell proliferation. CSH, 1975, p. 515.
- Schöder, E. - Structure-activity relationships of kinins. In: Erdős, E.G. - Handbook of experimental pharmacology. Berlin, Springer, 1970, Vol. XXV, p. 324.
- Schwabe, C. - Peptide hydrolases in mammalian connective tissue. I Survey of activities and preliminary characterization of certain peptidases. *Biochemistry* 8: 771, 1969.

- Simmons, W.H. e Brecher, A.S. - Inactivation of melanocyte-stimulating hormone release-inhibiting factor by a manganese-stimulated bovine brain aminopeptidase. *J.Biol.Chem.* 248: 5780, 1973
- Smith, E.E.; Kaufman, J.T. e Rutenburg, A.M. - The partial purification of an amino acid naphthylamidase from human liver. *J.Biol.Chem.* 240: 1718, 1965.
- Smith, E.L. e Spackman, D.H. - Leucine aminopeptidase V. Activation, specificity and mechanism of action. *J.Biol.Chem.* 212: 271, 1955.
- Spackman, D.H.; Smith, E.L. e Brown, D.M. - Leucine aminopeptidase. IV . Isolation and properties of the enzyme from swine kidney. *J.Biol.Chem.* 212: 255, 1955.
- Spackman, D.H.; Stein, W.R. e Moore, S. - Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal.Chem.* 30: 1190, 1958.

Spector, T. - Refinement of the coomasie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for \leq 0,5 to 50 μ g of protein. *Anal.Biochem.* 86: 142, 1978.

Termignoni, C.; Freitas Jr., J.O.; Guimarães, J.A.; Borges, D. R. e Prado, J.L. - Methionyl-aminopeptidase from rat liver. *An. Acad. brasil.Ciênc.* 51: 770, 1979.

Termignoni, C.; Freitas Jr., J.O., Guimarães, J.A.; Borges, D. R. e Prado, J.L. - Further characterization of methionyl-aminopeptidase from rat liver. Resumos da IX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica, Caxambú, Minas Gerais, D 19, 1980.

Tuppy, H.C. e Nesvadba, H. - "Über die Amino-peptidaseaktivität des Schwangerenseruns und ihre Beziehung zu dessen Vermögen Oxytocin, zu inaktivieren." *Monatsh.Chem.* 88: 977, 1957.

Wachsmuth, E.D.; Fritze, I. e Pfeleiderer, G. - An amino-peptidase occurring in pig kidney. I An improved method of preparation. Physical and enzymatic properties. *Biochemistry* 5: 169, 1966.

Wacker, H. - The role of carbohydrate moieties in the activity and properties of aminopeptidase from pig kidney. *Biochim.Biophys.Acta* 334: 417, 1974.

Webster, M.E. e Pierce, J.V. - The nature of the kallidins released from human plasma by kallikreins and other enzymes *Ann.N.Y. Acad.Sci.* 104: 191, 1963.

Webster, M.E. e Prado, E.S. - Glandular kallikrein from horse and human urine and from hog pancreas. In *Methods in Enzymology* ed. Clowich, S.P. e Kaplan, N.O., vol. XIV, Academic Press, New York, pp. 681, 1970.

Weigl, D.R. e Kisielius, J.J. - A resina polylyte na microscopia eletrônica. *Ciênc. e Cult. Supl.* 24: 212, 1972.