

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DE SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO E LOCALIZAÇÃO DE UMA ATP-DIFOSFOIDROLASE
(APIRASE, EC 3.6.1.5) EM SARCOLEMA CARDÍACO DE RATOS ADULTOS

EDILAMAR MENEZES DE OLIVEIRA

Orientador

Prof. JOÃO JOSÉ FREITAS SARKIS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre

1994

Ao Sérgio,
pela paciência e estímulo à minha vida
pessoal e profissional.

À minha família,
que sempre estiveram presentes
compartilhando e apoiando em todos os
momentos da minha formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof Sarkis pelo carinho, amizade e incentivo à minha formação profissional. A maneira clara, objetiva e dedicada com que conduziu a orientação deste trabalho.

À Ana, meu carinho especial e meu muito obrigada pelas orientações diárias a este trabalho. Também por tudo que aprendi nestes três anos de trabalho juntas e pela correção dos originais.

Ao Prof Renato pelo apoio, incentivo e pela correção dedicada deste trabalho.

À direção do CCS e do HUSM da Universidade Federal de Santa Maria que possibilitaram o meu afastamento para a realização do mestrado.

À Dra Maria Nazaré Meirelles do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pela importante contribuição feita aos resultados deste trabalho.

À Marta pelo auxílio na estatística.

Ao Profs Riegel, João Batista e Ester eu gostaria de fazer um agradecimento especial por tudo que aprendi com eles e pelo incentivo à pesquisa científica.

Ao Prof Dalton, por muitas das referências deste trabalho e o incentivo à pesquisa.

Às colegas do grupo Cleci, Silvana, Rosinha, Cláudia, Carmem, Eloá e aos bolsistas Emerson e Rafael pelo auxílio e amizade.

Àos colegas de pós-graduação, professores e funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Sr Aristeu pela ajuda no ratário.

Ao CNPq, CAPES, FINEP, FAPERGS, PROPESP-UFRGS pelo auxílio à pesquisa e ao CNPq pela bolsa concedida.

DESCOBRI COMO É BOM
CHEGAR QUANDO SE
TEM PACIÊNCIA,
E PARA SE CHEGAR ONDE
QUER QUE SEJA, APRENDI
QUE NÃO É PRECISO
DOMINAR A FORÇA, MAS A
RAZÃO. É PRECISO ANTES
DE MAIS NADA, QUERER.

Amyr Klink.

UFPE
BIBLIOTECA SETORIAL
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PREFÁCIO

As doenças cardiovasculares ocupam o primeiro lugar em número de mortes no Brasil. Em 1930, 10% das mortes que ocorriam nas capitais brasileiras eram consequência das doenças do coração. Na década de 80 esse índice subiu para 30% e até o final de 1993 foi a 40%, ganhando inclusive do câncer, que ocupa o segundo lugar em mortes no país, com 30%. No ano de 1992 pelo menos 400 mil brasileiros morreram em decorrência de problemas cardíacos. Em 1993 a estimativa é de que esse número tenha aumentado para 500 mil. Estes dados (*) são fundamentais para demonstrar a importância da pesquisa básica e aplicada na área cardiovascular. A autora desta dissertação não tem a pretensão de achar que, com este trabalho, irá solucionar os problemas acima mencionados. Mas, trabalhos deste tipo poderão contribuir para que no futuro outras pesquisas possam ter início e realmente os problemas venham a ser atenuados.

Além dos estudos realizados pela comunidade científica é necessário que as pessoas dêem a sua contribuição adotando uma alimentação mais saudável, praticando esportes, diminuindo o estresse e o fumo, porque as doenças cardiovasculares estão certamente relacionadas a estes fatores.

(*) Dados fornecidos pela Sociedade Brasileira de Cardiologia.

ABSTRACT

In the present report we demonstrate an ATP-diphospho hydrolase (Apyrase, EC 3.6.1.5) in rat cardiac sarcolemma. The enzyme hydrolyses almost equally well different nucleoside di- and triphosphates. The calcium dependence and pH requirement were the same for the hydrolysis of ATP and ADP and the apparent K_m values are similar for both Ca^{2+} -ATP and Ca^{2+} -ADP as substrates. Ca^{2+} -ATP and Ca^{2+} -ADP hydrolysis could not be attributed to the combined action of different enzymes because adenylate kinase, inorganic pyrophosphatase and nonspecific phosphatases were not detected in our assay conditions. The Ca^{2+} -ATPase and Ca^{2+} -ADPase activities were not affected by classical inhibitors of ATPase, adenylate kinase and alkaline phosphatase, thus excluding these enzymes as contaminants. Electron microscopic analysis revealed the presence of sealed vesicles indicating that the enzyme is plasma membrane-bound. The results demonstrate that an ATP-diphosphohydrolase is involved in the hydrolysis of ATP and ADP to AMP by the sarcolemmal membrane. The physiological role of this cardiac enzyme is unknown, but possibly it participate in the regulation of the cellular homeostasis.

SUMÁRIO

	Páginas
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - A célula cardíaca.....	1
1.2 - A membrana da célula cardíaca.....	3
1.3 - O cálcio e a célula cardíaca.....	5
1.3.1 - Intervenções farmacológicas e componentes celulares.....	6
1.3.1.1 - Glicosídeos cardíacos e β -bloque- adores adrenérgicos.....	6
1.3.1.2 - Antagonistas do cálcio.....	7
1.3.2 - Nucleotídeos da adenina e o fluxo de cálcio	8
1.4 - Os nucleotídeos da Adenina e a célula.....	9
1.4.1 - Origens e destinos intracelular dos nucleo- tídeos da Adenina.....	9
1.4.2 - Origens e destinos extracelular dos nucleo- tídeos da Adenina.....	10
1.4.3 - Purinoreceptores.....	12
1.5 - Efeitos cardiovasculares dos nucleotídeos.....	13
1.5.1 - Vasodilatação endotélio-dependente.....	13
1.5.2 - Vasoconstrição.....	14
1.5.3 - Efeitos cardíacos e coronários.....	15
1.6 - Metabolismo extracelular dos nucleotídeos da Adenina	16
1.7 - ATP-difosfohidrolase (EC 3.6.1.5).....	18
1.8 - Possível papel fisiológico da enzima de sarcolema cardíaco.....	22

OBJETIVOS DO TRABALHO.....	25
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
2.1 - Material.....	27
2.2.1 - Reagentes.....	27
2.1.2 - Equipamentos.....	27
2.1.3 - Animais de laboratório.....	28
2.2 - Preparo da Fração Sarcolemal.....	28
2.3 - Determinação das atividades enzimáticas.....	30
2.3.1 - Marcadores bioquímicos de possíveis contami- nantes da fração sarcolemal.....	30
2.3.1.1 - Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	30
2.3.1.2 - 5'-nucleotidase.....	31
2.3.1.3 - Glicose-6-fosfatase.....	31
2.3.1.4 - Succinato desidrogenase.....	32
2.3.2 - ATP-difosfohidrolase.....	32
2.3.3 - Atividade de hidrólise de P _i , AMP e alguns esteres de fosfato.....	33
2.3.3.1 - ATP-pirofosfohidrolase e Pirofosfata- se Inorgânica.....	33
2.3.3.2 - ATPase(s) e Adenilato Quinase.....	33
2.3.3.3 - ATPase(s) e ADPase(s).....	34
2.3.3.4 - Fosfatases Inespecíficas.....	35
2.4 - Citoquímica.....	34
2.5 - Determinação de proteína.....	37
2.7 - Análise Estatística.....	37

3. RESULTADOS.....	38
3.1 - Caracterização da Fração Sarcolemal.....	38
3.1.1 - Obtenção da Fração Sarcolemal por centrifugação diferencial.....	38
3.1.2 - Marcadores de subfrações celulares.....	41
3.1.3 - Localização da atividade enzimática.....	43
3.2 - Padronização da atividade ATP-difosfoidrolásica em sarcolema de ratos.....	45
3.2.1 - Dependência da velocidade da reação com a con- centração de proteína e tempo de incubação.....	45
3.2.2 - Variação da atividade ATP-difosfoidrolásica com a concentração de substrato.....	51
3.2.3 - Variação da atividade ATP-difosfoidrolásica com a concentração de cálcio.....	51
3.3 - Caracterização da ATP-difosfoidrolase.....	53
3.3.1 - Efeito do pH - Determinação do pH ótimo.....	53
3.3.2 - Dependência da concentração de cálcio.....	56
3.3.3 - Determinação das constantes cinéticas.....	58
3.3.4 - Especificidade de cátions divalentes sobre a ati- vidade ATP-difosfoidrolásica.....	66
3.3.5 - Exclusão de associações enzimáticas.....	66
3.3.5.1 - Associação de ATPase e "ADPase".....	68
3.3.5.2 - Associação de ATP-pirofosfoidrolase e Pirofosfatase Inorgânica.....	69
3.3.5.3 - Associação de ATPase e Adenilato Quinase	71

3.3.5.4 - Fosfatases Inespecíficas.....	72
3.3.6 - Especificidade para o substrato.....	73
3.3.7 - Efeito de inibidores sobre as atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica.....	76
3.3.8 - Efeito de metais pesados sobre a atividade ATP-difosfoidrolásica.....	80
4. DISCUSSÃO.....	84
4.1 - Preparo da Fração Sarcolemal.....	84
4.2 - Localização da atividade ATP-difosfoidrolase.....	85
4.3 - Atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica na fração sarcolemal de ventrículos cardíacos de ratos.....	85
4.4 - Propriedades cinéticas.....	88
4.5 - Especificidade pelo substrato.....	89
4.6 - Exclusão de associações enzimáticas.....	90
4.7 - Efeito de inibidores.....	94
5. CONCLUSÕES.....	100
6. BIBLIOGRAFIA.....	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura A - Representação esquemática de um corte longitudinal da célula cardíaca.....	2
Figura B - Representação esquemática da ultra-estrutura da célula do músculo cardíaco.....	4
Figura C - Esquema geral do subfracionamento celular e obtenção da fração sarcolemal.....	29
Figura 1a - Localização ultra-estrutural da atividade ATP-difosfohidrolase (ATPase).....	46
Figura 1b - Localização ultra-estrutural da atividade ATP-difosfohidrolase (ADPase).....	47
Figura 1c - Localização ultra-estrutural da atividade ATP-difosfohidrolase (Controle).....	48
Figura 2 - Curva de proteína.....	49
Figura 3 - Curva de tempo.....	50
Figura 4 - Variação das atividades ATPásica e ADPásica com a concentração de substrato.....	52
Figura 5 - Variação das atividades ATPásica e ADPásica com a concentração de cálcio na ausência de EGTA.....	54
Figura 6 - Efeito do pH sobre a atividade ATP-difosfohidrolase	55
Figura 7 - Curva de EGTA.....	57
Figura 8a e 8b - Dependência da concentração de cálcio para as atividades ATPásica e ADPásica.....	60
Figura 9 - Representação das curvas de dependência de cálcio	

para as atividades ATPásica e ADPásica pelo duplo recíproco de Lineweaver-Burk.....	61
Figura 10a e 10b - Dependência da concentração do complexo cálcio-nucleotídeo para as atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica.....	64
Figura 11 - Representação das curvas de substrato para Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP pelo duplo recíproco de Lineweaver-Burk.....	65

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Atividades ATPásica e ADPásica nas frações obtidas por centrifugação difirencial do homogeneizado de tecido ventricular cardíaco de ratos.....	39
Tabela 2 - Atividades de enzimas marcadoras no homogeneizado total e fração sarcolemal de ventrículo cardíaco de ratos.....	42
Tabela 3 - Atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica, antes e após centrifugação da fração sarcolemal.....	44
Tabela 4 - Especificidade de cátions divalentes sobre as atividades ATPásica e ADPásica.....	67
Tabela 5 - Incubação simultânea dos substratos Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP.....	70
Tabela 6 - Especificidade enzimática.....	74
Tabela 7 - Efeito de inibidores sobre as atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica.....	78
Tabela 8 - Efeito de inibidores inespecíficos sobre as atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica.....	81
Tabela 9 - Efeito de metais pesados sobre a atividade ATP-difosfoidrolásica.....	83

1. INTRODUÇÃO

A atividade contrátil do músculo cardíaco é dependente de inúmeros fatores que envolvem sistemas tubulares especializados, canais iônicos, proteínas especializadas para gênese de força e encurtamento bem como sistemas enzimáticos diversos de localização intra e extracelular. Assim, para a obtenção de uma idéia integrada desses diversos fatores, é fundamental a descrição, pelo menos superficial, dos mesmos.

1.1 A célula cardíaca.

O tecido cardíaco é constituído de células musculares individualizadas estriadas ramificadas e com núcleo central. As células do miocárdio são menores que as do músculo estriado esquelético, tendo em média 10-20 μm de comprimento. Como característica própria, além do material contrátil, as células miocárdicas apresentam mitocôndrias e sistemas tubulares especializados. Um deles, o sistema transverso, é uma invaginação do sarcolema que penetra e percorre transversalmente as células e, ramificando-se, envolve os sarcômeros a nível dos discos Z. É portanto um sistema tubular que se abre na membrana superficial, estando em contato com o meio extracelular. O outro, o retículo sarcoplasmático, tem localização estritamente intracelular. É formado por túbulos que se apresentam longitudinalmente por entre as miofibrilas e, a nível do disco Z, formam vesículas que entram em contato com o sistema transverso.

A comunicação entre um túbulo transverso e duas vesículas do retículo sarcoplasmático, de localização lateral, recebe o nome de tríade. Dentro das células miocárdicas encontramos grande número de mitocôndrias para suprir energeticamente os elementos contráteis. Também o material contrátil, que se encontra organizado formando uma estrutura repetitiva, o sarcômero. Este é limitado por duas linhas ou discos Z e é considerado como a unidade contrátil básica do músculo (Fawcett e McNutt, 1969; McNutt, 1975; Vassallo et al, 1982). A FIGURA A mostra corte longitudinal esquemático da célula cardíaca.

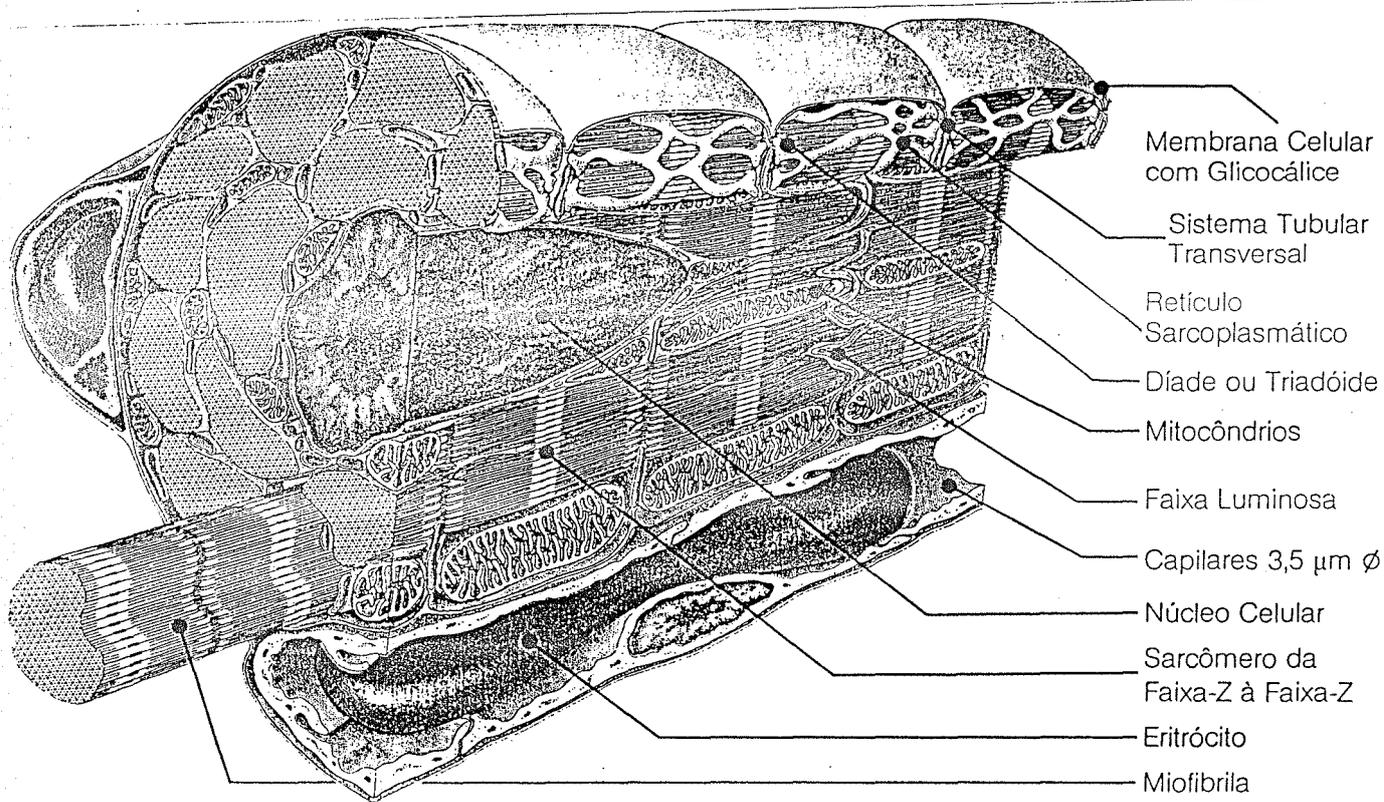


FIGURA A: Representação esquemática de um corte longitudinal da célula cardíaca (segundo Lossnitzer et al, 1984).

1.2 A membrana da célula cardíaca

O nome sarcolema é usado para designar os 7.5-9.0 nm de membrana plasmática que envolve o citoplasma da célula do músculo cardíaco (Fawcett e McNutt, 1969). A membrana plasmática é de natureza lipoproteica, sendo a fração lipídica formada por uma camada bimolecular de fosfolipídios contendo as cadeias hidrofóbicas de ácidos graxos, na parte central, ligadas a porções globulares fosfatadas hidrofílicas, nas regiões periféricas. As proteínas têm forma globular localizando-se na face interna ou externa da membrana ou então transpassando-a em toda a sua espessura. São geralmente de natureza glicoproteica e lipoproteica, com funções diversas, tais como receptores de hormônios e neurotransmissores, enzimas e também podendo funcionar como canais para íons diversos, como sódio, potássio e cálcio. Ligada a membrana plasmática, pela face externa, há uma camada superficial especializada composta de material fibrilar, provavelmente mucopolissacarídeos ou complexos mucopolissacarídeo-proteína, ricos em sítios aniônicos que fixam íons como sódio e cálcio. Esta camada é denominada glicocálice. Internamente também apresentam sítios de grande afinidade pelo cálcio, sensíveis às variações de potencial intracelular. Nas regiões de contato entre células encontramos inúmeras especializações tais como zônulas aderens, desmossomas, regiões de ancoramento de miofilamentos e ainda junções de baixa resistência elétrica, os nexus ou junções do tipo "gap" (McNutt, 1975; De Mello, 1982). A FIGURA B mostra uma representação esquemática da ultra-estrutura da membrana da célula cardíaca.

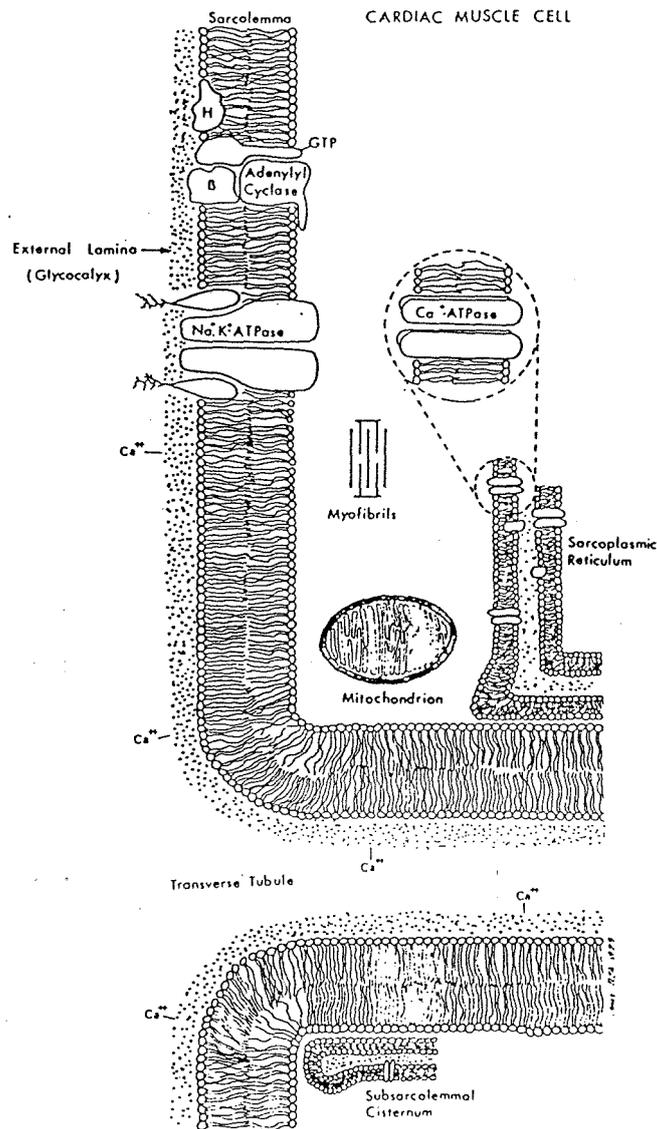


FIGURA B: Representação esquemática da ultra-estrutura da célula do músculo cardíaco (segundo Schwartz e Adams, 1980).

1.3 O cálcio e a célula cardíaca.

O cálcio exerce uma função ímpar para os tecidos excitáveis posto que se constitui no mensageiro entre o processo de excitação e a contração.

Fez 100 anos que Sydney Ringer (1883) descobriu a importância do cálcio para a contração cardíaca. Ringer demonstrou que o coração era incapaz de contrair quando perfundido com uma solução nutritiva na ausência de íons cálcio. Desde então, vários estudos têm sido feitos para compreender as implicações do cálcio na função cardíaca (Dhalla et al, 1977; Lüllmann et al, 1983; Dhalla et al, 1984; Reiter, 1988; Nayler, 1992).

A membrana sarcolemal da célula cardíaca desempenha um papel central na excitação, condução, acoplamento excitação-contração e regulação da contratilidade miocárdica. O cálcio é o regulador principal da contração cardíaca (Ebashi e Endo 1968; Langer 1968; Olson 1971). A excitação da célula do miocárdio aumenta a concentração intracelular de cálcio através da entrada deste íon, via canais iônicos, proveniente do espaço extracelular e de sítios superficiais do sarcolema. Além disso, há uma liberação de cálcio de estoques intracelulares como do retículo sarcoplasmático e possivelmente mitocôndria, considerando que estes sítios são capazes de recaptação de cálcio. É importante salientar que captação de cálcio pela mitocôndria só é considerável se as concentrações de cálcio livre aumentarem a níveis que causem contratura (Chiese et al, 1981). Estas origens

contribuem para aumentar os níveis mioplasmáticos do cálcio livre de 10^{-8} M (diástole) para 10^{-6} M ou 10^{-5} M (sístole). Portanto a contração e o relaxamento cardíacos são reflexos de um aumento seguido de um decréscimo nas concentrações intracelulares de cálcio livre respectivamente, com a participação de diferentes sistemas de membranas (Dhalla et al, 1977).

Muitas são as drogas que atuam sobre os mecanismos de acoplamento excitação-contração permitindo modular a atividade contrátil do miocárdio, com isso possibilitando as intervenções farmacológicas.

1.3.1 Intervenções farmacológicas e componentes celulares.

Várias drogas que interferem na função cardíaca parecem atuar sobre organelas celulares como sarcolema, mitocôndria, retículo endoplasmático e miofibrilas. Estas drogas alteram os mecanismos de entrada e saída de Ca^{2+} da célula, podendo, alguns destes agentes, modificar os estoques de Ca^{2+} intracelular e assim as interações do íon com a maquinaria contrátil (Dhalla et al, 1977). Várias ações de drogas se fazem através de alterações ou interferências em sistemas enzimáticos ligados à contração (Dhalla et al, 1984).

1.3.1.1 Glicosídeos cardíacos e β -bloqueadores adrenérgicos

Tem sido demonstrado que os glicosídeos cardíacos produzem um efeito inotrópico positivo sobre o coração (Lee e Klaus, 1971; Schwartz et al, 1975). A inibição da Na^+,K^+ -ATPase sarcolemal por glicosídeos cardíacos aumenta a força contrátil. A inibição da

enzima resulta em um aumento nas concentrações de Na^+ no mioplasma e este íon pode aumentar os níveis intracelulares de cálcio livre por ocupar os sítios de troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ localizados na parte interna da membrana plasmática (McNamara et al, 1974; Tada et al, 1975; Schwartz et al, 1975). Este mecanismo reduz a atividade da troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, aumenta a disponibilidade do cálcio necessário à contração e, conseqüentemente, causa o efeito inotrópico positivo dos digitálicos.

Drogas β -bloqueadoras adrenérgicas como propanolol, inibem a captação de cálcio e atividades ATPásicas da fração microsomal (Solaro et al, 1972; Kartz et al, 1974) e mitocôndria (Dhalla e Lee, 1976). Outros agentes como acebutolol e practolol, são mais cardio-seletivos em relação a sua ação β -bloqueadora adrenérgica que o propanolol, porém são menos potentes em inibir a captação de cálcio por frações subcelulares, bem como em produzirem efeitos cardio-depressivos (Dhalla e Lee, 1976).

1.3.1.2 Antagonistas do cálcio.

Agentes antagonistas do cálcio como verapamil, seu metoxi-derivado D_{600} (gallopamil) e nifedipina produzem um efeito inotrópico negativo sobre o miocárdio por bloquearem canais de cálcio na membrana da célula (Fleckenstein, 1971, 1983; Lee e Tsien, 1983). O verapamil prejudica a capacidade dos sítios ligados ao sarcolema de acumularem cálcio e em altas concentrações diminui a ligação e captação do cálcio microsomal (Nayler e Szeto, 1972; Watanabe e Besch, 1974)

Através destes estudos fica evidente a importância dos

vários sistemas de membrana como sarcolema, retículo endoplasmático e mitocôndria na regulação da função cardíaca. Tal papel regulatório destas membranas é principalmente atribuído a sua capacidade de liberação e ligação do cálcio.

1.3.2 Nucleotídeos da Adenina e o fluxo de cálcio.

O ATP intracelular altera as propriedades elétricas da membrana, indiretamente, porque atua como substrato para ATPases como Na^+, K^+ -ATPase, $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ -ATPase e adenilato ciclase. Mais recentemente, vários trabalhos têm demonstrado que ATP extracelular pode alterar as correntes de cálcio de membranas excitáveis. Yatani et al (1982), mostraram que ATP extracelular em concentrações nanomolares ativa canais de cálcio da membrana neuronal. Assim como, concentrações micromolares de ATP extracelular aumentam a concentração de cálcio citossólico em miócitos de ventrículo cardíaco de ratos adultos (Young e Scarpa, 1989). Um processo contrário foi observado por Haworth et al (1987), isto é, uma inibição do influxo de cálcio em células cardíacas de ratos adultos por depleção do ATP extracelular. Resultados semelhantes foram descritos em axônio gigante de lula injetado com apirase, enzima capaz de degradar ATP e ADP (Baker e Glistsch, 1973; DiPolo, 1976), mostrando que o fluxo de cálcio é dependente de ATP. Em células endoteliais de aorta bovina (Kitazono et al, 1992) outros nucleotídeos também induziram aumento nas concentrações de cálcio livre intracelular com a seguinte ordem de potência $\text{ATP} = \text{ADP} > \text{UTP} > \text{ITP} > \text{CTP} > \text{GTP}$.

ATP interage com receptores purinérgicos P_2 da membrana

plasmática em uma variedade de células e estimula um aumento transitório de cálcio intracelular. ATP e/ou ADP em concentrações micromolares, no espaço extracelular, podem influenciar muitos processos biológicos dependentes de cálcio incluindo agregação plaquetária, tônus vascular, neurotransmissão, função cardíaca, migração de neutrófilos e contração muscular (Gordon, 1986).

1.4 Os nucleotídeos da Adenina e a célula

1.4.1 Origens e destinos intracelular dos nucleotídeos da Adenina

O ATP pode ser sintetizado intracelularmente por mecanismos oxidativos bem conhecidos, como a glicólise e a fosforilação oxidativa mitocondrial. Além destes mecanismos, existe uma integração muito importante no metabolismo das purinas, a partir do qual a célula pode obter diferentes intermediários desta natureza ou deles derivados, fosforilados ou não (Murray et al, 1988).

O papel dos nucleotídeos intracelulares da adenina nos processos de armazenamento de energia é bem descrito. O ATP é o intermediário rico em energia em muitas reações, seja como doador do fosfato nas reações de fosforilação ou pela sua formação através da transferência de um grupo fosfato de outro metabólico rico em energia para o ADP. Outros papéis bem descritos destes nucleotídeos intracelulares são como precursores de outras moléculas, como os dinucleotídeos NAD^+ (nicotinamida adenina nucleotídeo) e FAD (flavina adenina nucleotídeo), o RNA (ácido ribonucleico) e DNA (ácido desóxi-ribonucleico). O NAD^+ e o FAD

são importantes nos processos de oxi-redução e o DNA e o RNA são responsáveis pela codificação e fluxo da informação genética, respectivamente. O papel do ATP intracelular como substrato para ATPases e adenilato ciclase também foi estabelecido a bastante tempo. Desta maneira, o ATP é um constituinte intracelular ubíquo sendo que todas as células podem, potencialmente, servir como fonte de ATP extracelular.

1.4.2 Origem e destino extracelular dos nucleotídeos da Adenina

Os nucleotídeos da adenina são liberados no espaço extracelular, em concentrações milimolares, a partir de uma variedade de células em resposta a estímulos ativadores e também pelo rompimento de células durante a injúria de tecidos ou morte celular (Rovetto, 1985). Vários estudos demonstram que o ATP é armazenado e liberado com a noradrenalina em vesícula simpáticas noradrenérgicas (Fried et al., 1978), com a acetilcolina em vesículas sinápticas colinérgicas (Dowdall et al., 1974), com ambas adrenalina e noradrenalina em grânulos de células cromafins de adrenal (Winkler e Carmichael, 1982) e com serotonina em plaquetas (Detwiler e Freinman, 1973). Durante a exocitose, o ATP é liberado quando o conteúdo destas vesículas é excretado. O ATP também é liberado de células que não tem função secretória como órgão elétrico de Torpedo (Israel et al., 1976), músculo esquelético (Abood et al., 1962), células de músculo cardíaco (Paddle e Burnstock, 1974; Forrester e Williams, 1977; Forrester, 1981; Darius et al., 1987) e células de endotélio vascular

(Pearson e Gordon, 1979). As células de endotélio vascular permaneceram inalteradas e não foi detectada a presença de lactato desidrogenase extracelularmente, indicando que não houve rompimento da membrana plasmática destas células. O ATP, aparentemente, foi liberado do citoplasma e não de mitocôndrias. Embora os mecanismos para liberação não estejam bem definidos, este processo parece envolver alterações na topografia dos constituintes da membrana plasmática, resultando na abertura de poros que permitem uma liberação seletiva destes constituintes (Pearson e Gordon, 1979). Apesar disso, a grande maioria dos autores admite que o ATP e outros nucleotídeos não atravessam livremente as membranas celulares (Meunier e Morel, 1978; Dowdall, 1978; Burnstock, 1990), provavelmente para assegurar a conservação desta molécula rica em energia em processos essenciais às funções intracelulares (White, 1988). Além disso, os nucleotídeos da adenina podem sair ou entrar na célula via um sistema de transporte mediado por "carrier", como descrito em nervo motor de lagosta (Lindgren e Smith, 1986), sinaptossomas de cérebro de ratos (Sun e Lee, 1985) e córtex renal (Elgavish e Elgavish, 1985).

O ATP citoplasmático, na maioria das células encontra-se em concentrações acima de 5 mM e quantidades significativas podem ser liberadas sem nenhuma perda morfofuncional da célula. Portanto, as concentrações de ATP ou ADP pericelulares podem alcançar níveis biologicamente ativos, ou seja, concentrações nanomolares ou micromolares. A concentração local destes nucleotídeos dependerá da quantidade liberada, do efeito de

diluição no espaço extracelular e da capacidade de enzimas catabólicas, especialmente ectonucleotidasas nas células adjacentes (Gordon, 1986). Uma vez liberados, estes nucleotídeos interagem com receptores P_2 -purinérgicos antes de sua rápida degradação até adenosina por um conjunto de ectonucleotidasas.

1.4.3 Purinoreceptores

Os nucleotídeos liberados do citoplasma de vários tipos de células antes de serem metabolizados por ectonucleotidasas, que constituem um processo de inativação eficiente, devem interagir com receptores específicos da membrana plasmática destas células, os purinoreceptores.

Os purinoreceptores podem ser subdivididos em duas classes: os purinoreceptores P_1 com o potencial agonista na ordem de adenosina >AMP >ADP >ATP e os purinoreceptores P_2 com o melhor agonista na ordem de ATP >ADP >AMP >adenosina (Burnstock, 1978). A ligação ao purinoreceptor P_1 induz mudanças nos níveis de AMPc intracelular, enquanto que a ligação do purinoreceptor P_2 induz, em alguns casos, biossíntese de prostaglandinas. Os receptores P_1 são divididos nos subtipos A_1 e A_2 que inibem e estimulam a adenilato ciclase, respectivamente (Burnstock, 1985). Baseado nos potenciais farmacológicos de vários nucleotídeos e outros critérios, quatro diferentes classes de purinoreceptores P_2 foram propostas: o P_{2x} e P_{2y} que modulam as respostas de contração e relaxamento, respectivamente (Burnstock e Kennedy, 1985); o P_{2t} envolvido na agregação plaquetária e o P_{2z} que modula a permeabilidade celular pela ligação do ATP^{4-} (Gordon, 1986;

O'Connor et al, 1991). Após a interação com receptores ligados a membrana plasmática onde exercem seus efeitos os nucleotídeos devem ser metabolizados.

1.5 Efeitos Cardiovasculares dos nucleotídeos

Desde os estudos pioneiros de Drury e Szent-Gyorgi (1929), tem sido demonstrada a participação de nucleosídeos e nucleotídeos em outras funções além daquelas relacionadas com o metabolismo celular. Os autores introduziram o conceito de que as purinas desempenham um papel regulatório no espaço extracelular. Embora, este assunto tenha despertado pouco interesse por aproximadamente 20 anos, no momento muitos trabalhos têm demonstrado a ação dos nucleotídeos sobre o Sistema Cardiovascular.

1.5.1 Vasodilatação endotélio-dependente

O ATP extracelular interage com a célula endotelial vascular devido a localização anatômica do endotélio. Na interface entre o sangue e a parede do vaso, o endotélio é o primeiro tecido exposto ao ATP liberado no plasma, proveniente de várias origens tais como eritrócitos, plaquetas, leucócitos, etc (Gordon, 1990). Nas artérias coronárias, o ATP intraluminal pode ser proveniente das células cardíacas (Paddle e Burnstock, 1974; Forrester e Williams, 1977; Forrester, 1981; Darius et al, 1987). Ainda pode, este nucleotídeo, ter sua origem nas células endoteliais vasculares (Pearson e Gordon, 1979), reforçando a interessante possibilidade de que o ATP possa servir como um autoefetor da

função endotelial.

Furchgott e Zawadzki (1980) foram os primeiros a demonstrar a função das células endoteliais no relaxamento de artérias isoladas de coelho em resposta a acetilcolina. Assim como acetilcolina, ATP e ADP causam vasodilação via liberação de um fator relaxante endotélio-dependente (EDRF/óxido nítrico), quando interage com o purinoreceptor P_{2y} deste endotélio (Gordon e Martin, 1983).

Estudos nos quais ATP foi injetado na circulação coronária mostram que, embora prostaciclina e EDRF possam induzir vasodilatação e portanto aumentar o fluxo sanguíneo, o EDRF é responsável por esta ação. O efeito vasodilatador das prostaciclina é evidenciado somente em resposta a grandes quantidades de ATP (Fleetwood e Gordon, 1987). Além dos efeitos das prostaciclina e do óxido nítrico, que são liberados do endotélio estimulado por ATP, outras estruturas (adenosina, ADP) também afetam o tônus vascular e a função plaquetária. Uma grande quantidade de ATP e ADP são liberados de plaquetas durante a trombose (Detwiler e Feinman, 1973) e estes nucleotídeos interagem com receptores P_{2y} do endotélio, relaxando os vasos sanguíneos.

1.5.2 Vasoconstrição

Sobre o músculo liso de algumas artérias existem receptores P_{2x} que mediam a vasoconstrição (Kennedy et al, 1985). O ATP e ADP liberados dos nervos simpáticos da camada adventícia do vaso (nervos perivasculares) causam vasoconstrição quando entram em

contado direto com o músculo liso via purinoreceptores P_{2x} (Gordon, 1986; Burnstock, 1990). As células endoteliais de algumas artérias possuem receptores P_{2y} , que mediam a vasodilatação endotélio dependente. A perda destas células endoteliais (ou perda da capacidade de produzir EDRF ou prostaciclina) resulta em uma vasoconstrição maior que a vasodilatação que seria esperada em resposta ao ATP e/ou ADP. Em alguns vasos o músculo liso apresenta receptores P_{2x} e P_{2y} os quais mediam vasoconstrição e vasodilatação, respectivamente (Kennedy e Burnstock, 1985a).

1.5.3 Efeitos cardíacos e coronários

Existem pelo menos três sítios através dos quais o ATP pode exercer efeitos sobre fluxo coronário e função cardíaca: células do músculo liso coronariano, células endoteliais e miócitos cardíacos.

O ATP tem um pequeno efeito sobre a artéria coronária de coelho sem o endotélio, no entanto a artéria intacta é dilatada por este nucleotídeo (Griffith et al, 1984). Isto sugere que o maior sítio de ação do ATP é sobre as células endoteliais. EDRF e/ou prostaciclina podem ser responsáveis pela vasodilatação observada. Como a dose de ATP requerida para estimular a produção de prostaciclina no coração perfundido é maior do que a necessária para induzir vasodilatação coronária. Então, o efeito principal se deve a produção de EDRF.

Os efeitos do ATP sobre a função cardíaca são, em geral, depressores: decresce o ritmo cardíaco, a força de contração

atrial e em menor proporção a força de contração ventricular (Gordon, 1986).

O ATP também exerce efeitos eletrofisiológicos sobre o coração de mamíferos. Os principais são: efeito cronotrópico negativo sobre marcapassos cardíacos e efeito dromotrópico negativo sobre a condução nodal atrioventricular (Pelleg, 1985).

Além destas funções no sistema cardiovascular, já bem descritas e caracterizadas, os nucleotídeos desempenham importantes papéis fisiológicos em outros tecidos. Uma vez liberados no espaço extracelular e após exercerem seus efeitos, mediados por purinoreceptores, os nucleotídeos são rapidamente metabolizados.

1.6 Metabolismo extracelular dos nucleotídeos da Adenina

Atualmente a degradação extracelular de nucleotídeos por um sistema enzimático, cessando assim o seu efeito biológico é evidência bem aceita pela comunidade científica. Na realidade, a existência de atividades enzimáticas extracelulares capazes de hidrolisar nucleotídeos foram descritas a mais de quarenta anos (Rothstein e Meier, 1948). Nesta época todas as atividades enzimáticas extracelulares eram consideradas "atividades artificiais" derivadas de células rompidas. Hoje, ao sabermos da liberação ativa de nucleotídeos no espaço extracelular, as atividades enzimáticas como sistemas de inativação de efeitos biológicos causados por estes componentes ficaram fundamentadas e tornaram-se muito importantes.

As enzimas responsáveis pela remoção de nucleotídeos da

adenina do espaço extracelular são de maneira geral denominadas ectonucleotidases. Uma ecto-ATPase dependente de Ca^{2+} ou Mg^{2+} que converte o ATP extracelular em ADP tem sido descrita em sinaptossomas, células de músculo liso e endotélio vascular, miócitos cardíacos, hepatócitos, células tumorais e várias células sanguíneas. Posteriormente o ADP extracelular seria metabolizado à AMP por uma "ecto-ADPase". Pearson (1985) acredita que esta enzima deve ser amplamente distribuída como a 5'-nucleotidase, porém a mesma tem sido investigada em poucos tecidos tais como músculo liso (Cooper et al, 1979) e endotélio vascular (Lieberman e Lewis, 1980). Ambas, ecto-ATPase e "ecto-ADPase" podem servir para terminar com a ação extracelular de ATP e ADP via P_2 -purinoreceptores e assim produzindo AMP. Uma ecto-5'-nucleotidase está presente na superfície externa da maioria das células (Pearson, 1985) onde esta enzima metaboliza AMP até adenosina. A adenosina formada pode interagir com P_1 -purinoreceptores e/ou ser removida do espaço extracelular por difusão facilitada através da membrana celular. Uma vez dentro da célula a adenosina pode ser reincorporada ao "pool" de nucleotídeos intracelular ou ser convertida à inosina (White, 1988).

Fosfatases inespecíficas e ectonucleotídeo pirofosfatasas, as quais metabolizam ATP diretamente à AMP, também têm sido descritas, porém parecem não contribuir para o metabolismo extracelular de nucleotídeos na maioria dos tecidos (Pearson, 1985). Ainda, algumas células possuem ectoproteína kinases que podem utilizar ATP como substrato para fosforilação de proteínas

específicas na membrana (Ehrlich et al, 1986). O papel fisiológico das ectoproteína kinases é ainda desconhecido.

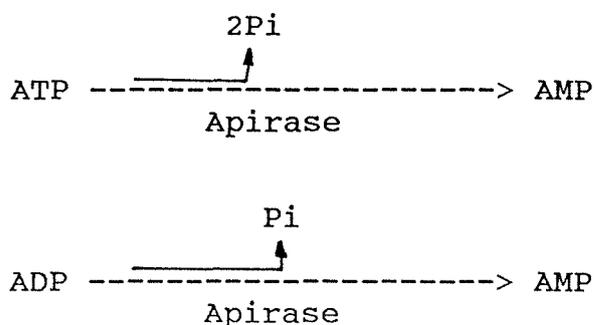
Várias ATP-difosfohidrolases (apirases; EC 3.6.1.5) foram descritas e caracterizadas para explicar a hidrólise de ATP e principalmente de ADP extracelular até AMP em pâncreas de porco (Le Bel et al, 1980; Laliberté et al, 1982), vários tecidos de mamíferos (Knowles et al, 1983), saliva de insetos (Ribeiro et al, 1989, 1990 e 1991), placenta de ratos (Pieber et al, 1991), células endoteliais e de músculo liso de aorta bovina (Yagi et al, 1991), sinaptossomas (Battastini et al, 1991; Sarkis e Salto, 1991), fração microsomal de aorta bovina (Côté et al, 1991) e plaquetas (Frassetto et al, 1994). Apesar de ser mencionada na literatura uma atividade "ADPase", esta atividade é classificada como ATP-difosfohidrolase (EC 3.6.1.5) pela IUB (International Union of Biochemistry). É importante ressaltar que até o presente momento não foi descrita uma atividade enzimática capaz de hidrolisar somente o ADP, isto é, não existe na literatura trabalhos que demonstrem de modo inquestionável a presença de uma ADPase específica. Considerando este fato, podemos concluir que a hidrólise do ATP e ADP até AMP, no espaço extracelular, se deve a ação de uma ATP-difosfohidrolase e não a ação conjunta de uma ecto-ATPase e uma "ecto-ADPase".

1.7 ATP-difosfohidrolase (EC 3.6.1.5)

Na membrana sarcolemal cardíaca foram descritas várias atividades enzimáticas tais como: a) uma alta atividade Na^+, K^+ ATPase (70-100 $\mu\text{mol Pi/mg/h}$); b) um sistema trocador Na^+/Ca^+ que

possivelmente funciona em ambas as direções, de acordo com o potencial elétrico transmembrana (Caroni et al, 1980); c) uma atividade adenilato ciclase (Tada et al, 1975); d) presença de canais de cálcio (Carafoli, 1988) e e) uma atividade Ca^{2+} Mg^{2+} ATPase (Caroni e Carafoli, 1980). Através deste trabalho estamos demonstrando a presença uma ATP-difosfoidrolase.

A denominação apirase para a enzima ATP-difosfoidrolase foi utilizada pela primeira vez na literatura científica em 1945, quando Meyerhof assim denominou as enzimas capazes de remover os fosfatos lábeis do ATP e ADP.



A ATP-difosfoidrolase é uma enzima bastante descrita na literatura e principalmente nas duas últimas décadas tem sido amplamente estudada. Esta enzima foi descrita em:

- a) vegetais (Krishnan, 1949; Mazelis, 1959; Molnar e Lorand, 1961; Traveso-Cori et al, 1962, 1970; Del Campo et al, 1977; Vara e Serrano, 1981; Tognoli e Marré, 1981; Kettlun et al, 1982, 1992; Valenzuela et al, 1988; Anich et al, 1990);
- b) invertebrados (Ribeiro e Garcia, 1980; Ribeiro et al, 1984, 1985, 1985a, 1986, 1989, 1990, 1991; Sarkis et al, 1986; Vachereau e Ribeiro, 1989; Sarkis e Salto, 1991; Vasconcelos et

al, 1993) e

c) em vários tecidos de mamíferos, tais como : eritrócitos e plasma humanos (Herbert, 1956; Holmsen e Holmsen, 1971), pâncreas de porco (LeBel et al, 1980; Lalibertè et al, 1982, 1983), membranas plasmática de mamíferos (Knowles et al, 1983), aorta bovina (Miura et al, 1987; Yagi et al, 1989, 1991; Côtè et al, 1991, 1992, 1992a), secreções de oviduto e seminal (Rosenberg et al, 1988), glândula mamária e útero (Valenzuela et al, 1989), placenta humana e de ratas (Papamarcaki e Tsolas, 1990; Pieber et al, 1991), vaso umbilical humano (Yagi et al, 1992) e pulmão bovino (Picher et al, 1993).

Em nosso laboratório a enzima foi caracterizada em sinaptossomas de hipotálamo (Schadeck et al, 1989) e córtex cerebral (Battastini et al, 1991) bem como em plaquetas (Frassetto et al, 1994), de ratos. Além disso foram realizados vários trabalhos tendo em conta a atividade desta enzima, como: ontogenia em córtex cerebral (Müller et al, 1993), efeitos da desnutrição (Rocha et al, 1990, 1991), efeitos da clorpromazina (Rocha et al, 1990a), efeitos de metais pesados como cloreto de mercúrio (Oliveira et al, 1994), acetato de cádmio (Barcellos et al, 1994) e cloreto de alumínio (Schetinger, 1991).

Semelhanças estruturais entre as ATP-difosfohidrolases de diferentes origens foi sugerido por Vachereau e Ribeiro (1990), uma vez que os autores demonstraram que anticorpos policlonais de apirase de pâncreas de mamíferos apresentaram reação imunológica com apirase de saliva do mosquito Aedes aegypti.

Vários papéis fisiológicos têm sido propostos para a enzima ATP-difosfohidrolase. Em vegetais o papel fisiológico não está bem estabelecido. Os estudos realizados com apirase em plantas se restringem basicamente as características cinéticas da enzima, embora alguns autores tenham proposto sua participação no metabolismo celular. Meyerhof (1945), propôs a participação da enzima na fermentação de leveduras e mais recentemente Anich et al. (1990) descreve como função da enzima hidrolisar ADP durante as diferentes etapas de síntese do amido. Para a apirase presente na saliva de insetos hematófagos foi proposto um papel anti-trombótico. A enzima do inseto hidrolisa o ADP do sangue do hospedeiro que induziria a agregação plaquetária (Sarkis et al, 1986; Vachereau e Ribeiro, 1989; Ribeiro et al, 1984, 1989, 1990, 1991) e assim é possível que se complete o repasto dos insetos. Na superfície externa do tegumento de Schistosoma mansoni a ATP-difosfohidrolase poderia regular as concentrações de nucleotídeos ao redor do parasita e então escapar da hemostasia do hospedeiro por prevenir a ativação de plaquetas induzidas pelo ADP (Vasconcelos et al, 1993). Em mamíferos, embora a ATP-difosfohidrolase tenha sido bem caracterizada o papel fisiológico, em alguns casos, não está muito definido. A função geral para a enzima está associada ao catabolismo intra e/ou extracelular de nucleosídeos di- e trifosfatados (principalmente ATP e ADP). Dependendo do tecido, esta atividade enzimática tem sido descrita com diferentes funções fisiológicas, tais como: degradação do co-transmissor ATP liberado juntamente com o neurotransmissor

principal na fenda sináptica (Rocha et al, 1990; Battastini et al, 1991; Müller et al, 1993), um papel anti-trombótico por inibir a agregação plaquetária induzida pelo ADP (Pieber et al, 1991; Yagi et al, 1991; Côté et al, 1992a; Frassetto et al, 1994) e recentemente um novo papel fisiológico foi sugerido que é a possível participação desta enzima na transferência de sinais através da adesão célula-célula (Yagi et al, 1992).

1.8 Possível papel fisiológico da enzima de sarcolema cardíaco

O coração é dependente do metabolismo aeróbico para produção de energia. O ATP é essencial à função cardíaca principalmente para a contração e manutenção do gradiente iônico. Quando a redução do fluxo arterial coronário é tão severa que o fornecimento de oxigênio para o miocárdio é inadequado à demanda do tecido, o miocárdio torna-se isquêmico (Opie, 1992). Na isquemia há uma liberação de ATP (e outras estruturas) de células endoteliais, as quais contém grande quantidade deste nucleotídeo. Este ATP, juntamente com o ADP liberado da agregação plaquetária, interage localmente com purinoreceptores P_{2Y} nas células endoteliais assim permitindo a liberação do fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) e vasodilação. Assim protegem tecidos delicados, como cérebro e coração, os quais são particularmente sensíveis à hipóxia. Como o ATP é rapidamente degradado por ecto-enzimas, especialmente no sangue, a hiperemia mediada pelo próprio ATP embora forte, é de curta duração. A vasodilatação prolongada que ocorre com a hipóxia é provavelmente

mediada pelo seu produto de hidrólise, a adenosina, que atua diretamente no músculo liso vascular. A adenosina também pode chegar aos nervos simpáticos da camada média adventícia do vaso reforçando esta resposta protetora (vasodilatação) pela inibição da liberação de transmissores vasoconstritores como a noradrenalina (Burnstock, 1990). Portanto a formação de adenosina na isquemia é fator decisivo para promover um efeito benéfico contra as lesões causadas pela isquemia. Quando o fornecimento de sangue para o coração é comprometido, mais adenosina é formada pelo coração em hipóxia em uma tentativa de restaurar o fluxo sanguíneo coronário.

A adenosina está relacionada com várias funções cardíacas, como:

1) É um potente vasodilatador das artérias coronárias, podendo ser o maior regulador fisiológico do fluxo sanguíneo coronariano (Berne, 1980; Schrader, 1990);

2) Inibe os efeitos metabólicos e hemodinâmicos da estimulação beta-adrenérgica por mecanismos pré-sinápticos e pós-sinápticos (Dobson et al 1987; Fredholm et al, 1988). Esta ação anti-adrenérgica pode servir para reduzir o gasto de energia do coração quando o fornecimento de oxigênio fica limitado;

3) Reduz o ritmo cardíaco pela inibição da formação e da condução do impulso nos nós sino-atrial e átrio-ventricular, respectivamente (Schrader, 1990). A bradicardia no coração em hipóxia parece ser mediada pela adenosina endógena (Clemon et al, 1986). A adenosina mostrou clinicamente que elimina a taquicardia supraventricular (DiMarco et al, 1985);

4) Inibe a formação de ânions superóxidos por neutrófilos humanos. Este efeito pode diminuir a injúria causada por radicais livres de oxigênio induzida por neutrófilos sobre as células endoteliais (Cronstein et al, 1986). Os ânions superóxidos de leucócitos ativados estão envolvidos na degradação do EDRF/NO (fator de relaxamento derivado do endotélio/óxido nítrico), o que resultaria em vasoconstrição (Gryglewski et al, 1986). Durante a isquemia cardíaca, esta ação anti-inflamatória da adenosina pode limitar a proporção do infarto (Engler et al, 1986);

5) Inibe a agregação plaquetária e desta maneira pode evitar a embolia nos vasos coronários, sendo portanto anti-trombogênica (Schrader, 1990, Kitakaze et al, 1991).

Portanto, todas estas funções da adenosina tem o mesmo objetivo que é manter o equilíbrio entre o fornecimento e a exigência de oxigênio (Schrader, 1990). É importante salientar que a hidrólise de ATP e ADP circulantes até adenosina tem uma função protetora para assegurar, por vasodilatação prolongada, um fornecimento suficiente de sangue para regiões vitais do organismo.

A ATP-difosfoidrolase da membrana plasmática da célula cardíaca, descrita neste trabalho, pode ser extremamente importante para hidrolisar rapidamente o ATP e ADP no espaço extracelular, aumentando a disponibilidade do substrato da 5'-nucleotidase (Naito e Lowenstein, 1985), o AMP. Desta forma produzindo uma maior quantidade de adenosina no coração, que é um metabólito endógeno protetor do tecido injuriado. A regulação das

concentrações de ATP e ADP e a formação de adenosina são certamente importantes para controlar o processo hemostático regulando o tônus vascular e o fluxo sanguíneo coronário. Portanto, promovendo em condições anormais o fornecimento de oxigênio à regiões vitais do organismo como os tecidos cardíacos e cerebrais.

OBJETIVOS DO TRABALHO

O papel do ATP intracelular como a mais imediata fonte de energia para uma grande variedade de reações bioquímicas é bem conhecido; entretanto, a importância do ATP e/ou ADP extracelular participante em vários processos biológicos como agregação plaquetária, controle do tônus vascular, neurotransmissão, permeabilidade da membrana da célula, função cardíaca e contração muscular tem sido reconhecido recentemente (Pearson e Gordon, 1979; Gordon, 1986; Needham et al, 1987). O ATP é liberado de células cardíacas (Clemens e Forrester, 1980), células de endotélio vascular e músculo liso (Needham et al, 1987) sob várias condições. Nucleotídeos podem ser liberados do citoplasma de vários tipos de células, interagir com receptores específicos localizados na superfície destas células e outras e então serem metabolizados localmente por ectonucleotidases. Recentemente, Zhao e Dhalla (1990) demonstraram a presença de receptores para ATP em membrana plasmática de células cardíacas de ratos. Como consequência este estudo sugere a existência de ecto-enzimas para hidrolisar ATP e ADP até adenosina e de certa maneira justificar a presente investigação.

Considerando o que foi exposto anteriormente e que uma ATP-difosfohidrolase em uma sequência multienzimática juntamente com uma 5'-nucleotidase (Naito e Lowenstein, 1985), é capaz de promover a degradação do ATP e do ADP até adenosina, este trabalho tem os seguintes objetivos:

1. Padronizar, para uso rotineiro em nosso laboratório, a técnica de preparação de membrana plasmática de células cardíacas (sarcolema), de acordo com Velema e Zaagsma (1981).

2. Padronizar as condições ótimas de hidrólise do ATP e do ADP pela fração sarcolemal cardíaca de ratos.

3. Caracterizar uma atividade ATP-difosfoidrolásica em membrana plasmática de miocárdio ventricular de ratos adultos, eliminando outras possíveis associações enzimáticas que poderiam mimetizar uma ATP-difosfoidrolase.

4. Localizar a enzima na membrana plasmática da célula cardíaca, através de estudos bioquímicos e citoquímicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Reagentes

Nucleotídeos, ouabaína, oligomicina, 2,4-dinitrofenol (NEM), ortovanadato de sódio, cloreto de lantânio (La^{3+}), p-nitrofenil fosfato (pNPP), N-Etilmaleimida (NEM), p^{1}p^{5} -di(adenosine-5')-pentafosfato (Ap5A), hexoquinase, glicose-6-fosfato (G-6-P), trizma base (TRIS), verde malaquita, thapsigargina, valinomicina, trifluorperazina, verapamil, D_{600} ou gallopamil (metóxi-derivado do verapamil), DCIP (2,5-diclorofenolindofenol, foram obtidos da Sigma Co. (Saint Louis, MO, USA). Azida sódica, EDTA, cloreto de cálcio, ácido clorídrico, cloreto de potássio, B-glicerofosfato, pirofosfato e nifedipina foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Molibdato de amônio e TCA (ácido tricloroacético) foram obtidos da Reagen (Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Todos os demais reagentes utilizados eram de pureza analítica e todas as soluções foram preparadas com água destilada e desionizada.

2.1.2 Equipamentos

Centrífuga Sorvall RC_2 -B (rotor SS-34); Ultracentrífuga Beckman L5-75B (rotor SW 28); Potenciômetro Digimed; Balanças Fisher/Ainsworth MX-300, Sartorius 2842 e E. Mettler; Espectrofotômetro Incibrás MF 200 UV/VIS; Homogeneizador Omnimixer e Pipetas automáticas Gilson reguláveis e Kacil volume fixo.

2.1.3 Animais Experimentais

Foram utilizados ratos machos da raça Wistar com 2 a 3 meses de idade, pesando entre 200 e 300g, provenientes do Biotério do Instituto de Biociências da UFRGS. Os animais foram mantidos em uma sala climatizada com temperatura e umidade controladas e um ciclo claro/escuro de 12 horas que iniciava às 7:00. Os ratos foram alimentados com ração de marca "Germani" e água "ad libitum".

2.2 Preparo da Fração Sarcolemal

O material enzimático utilizado ao longo do trabalho foi obtido essencialmente como descrito por Velema e Zaagsma (1981).

O esquema geral do subfracionamento celular, obtido através de centrifugação diferencial, utilizado no presente trabalho é mostrado na FIGURA 1. Vinte ventrículos cardíacos eram picados e homogeneizados em 80 ml de um meio constituído de Tris-HCl 20 mM e EDTA 1 mM (pH 7.0), usando um OMNIMIXER, por quatro períodos de 7s em velocidade máxima com intervalos de 15s de descanso.

O homogeneizado era centrifugado a 8.800g por 20 minutos e, em seguida, o sobrenadante (S1) era centrifugado a 12.500g por 20 minutos. Este procedimento era repetido com o sobrenadante S2, e o sobrenadante resultante S3 era recentrifugado a 44.000g por 1 hora. O precipitado obtido era ressuspensão em 15 ml de Tris-oxalato 20 mM, KCl 0,6 M (para extrair miofibrilas), EDTA 1 mM, pH 6.8 (Tampão Estoque), e recentrifugado a 44.000g por 1 hora. O precipitado era ressuspensão em um volume adequado de Tris-HCl 20

mM, pH 7.2, na proporção que resultasse em concentração de proteína de cerca de 0.4 a 0.5 mg/ml. Esta preparação representa a fração enriquecida em sarcolema. O sobrenadante 4 era recentrifugado a 77.000g por 1 hora, e o precipitado resultante era ressuspensão em um pequeno volume de Tris-HCl 20 mM, pH 7.2, representando a fração enriquecida em retículo sarcoplasmático.

Todos os procedimentos para a obtenção da fração sarcolema eram realizados à temperatura 0-4°C. A fração era mantida a -80°C até ser utilizada.

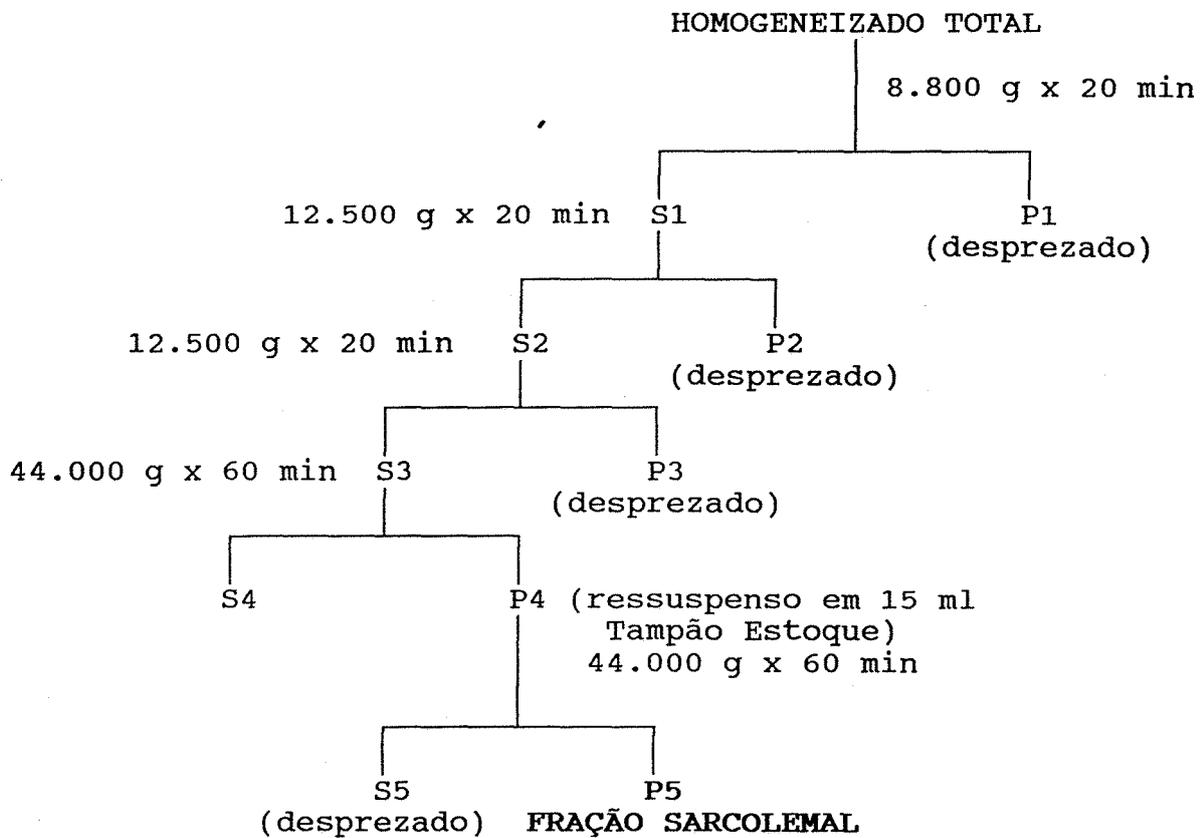


FIGURA C. Esquema geral do subfracionamento celular e obtenção da fração sarcolema.

2.3 Determinação das Atividades Enzimáticas

2.3.1 Marcadores bioquímicos de possíveis contaminantes da fração sarcolemal

Após a obtenção da fração sarcolemal, determinou-se a atividade de vários marcadores nesta fração. As seguintes atividades enzimáticas foram determinadas tanto no homogeneizado total como na fração sarcolemal.

2.3.1.1 Na^+, K^+ -ATPase (marcador de membrana plasmática)

Foi determinada pela diferença de atividade de hidrólise de ATP (concentração final 3,0 mM) entre um meio que continha MgCl_2 3,0 mM, NaCl 125,0 mM, KCl 20,0 mM, glicose 10,0 mM, sacarose 0,25 M e Tris-HCl 50,0 mM (pH 7,5) e um meio idêntico a esse, exceto que continha ouabaína 5,0 mM. Assim pode-se definir como atividade Na^+, K^+ -ATPásica aquela porção da atividade ATPásica total inibida pela ouabaína. Uma vez que, as vesículas sarcolemas eram "right side out" bem como "inside out", usamos alameticina para determinar a atividade da enzima em todas as vesículas. A fração sarcolemal era incubada com alameticina (0,75 mg alameticina/mg de proteína) por 10 minutos a 37°C. As frações (10,0 a 50,0 ug de proteína) eram pré-incubadas por 10 minutos a 37°C, sendo a reação iniciada pela adição de ATP. O tempo de reação variou entre 10 a 20 minutos e a hidrólise do substrato nunca ultrapassou 10% da contração inicial. A reação era interrompida pela adição de TCA (concentração final 5%). O fosfato liberado foi determinado pelo método de Lanzetta et al. (1979).

2.3.1.2 5'-nucleotidase (marcador de membrana plasmática)

Foi determinada de acordo com Heymann et al. (1984), em um meio que continha Tris-HCl 100,0 mM (pH 7,5) e MgCl₂ 15,0 mM. A este meio adicionava-se 5,0 a 10,0 ug de proteína que era pré-incubada por 10 minutos a 37°C. A reação era iniciada pela adição de AMP (1,0 mM). O tempo de reação variou entre 10 e 30 minutos e a hidrólise do substrato nunca passou de 10%. A reação era interrompida pela adição de TCA (concentração final 5%). O fosfato liberado foi determinado pelo método de Lanzetta et al. (1979).

2.3.1.3 Glicose-6-fosfatase (marcador de microssoma)

Foi determinada de acordo com o método de Hubscher e West (1965) em um meio que continha maleato de sódio 50,0 mM, EDTA 5,0 mM, KF 5,0 mM, sacarose 0,25 mM e glicose-6-fosfato 20,0 mM. Este meio era mantido por 10 minutos a 35°C, sendo a reação iniciada pela adição do material enzimático (5,0 ug de proteína). Após 40 minutos de incubação, a reação era interrompida pela adição de TCA (concentração final 5%) e o fosfato liberado era medido pelo método de Lanzetta et al. (1979). Esta reação era iniciada pela adição da preparação porque a glicose-6-fosfatase é inativada na ausência de substrato em temperaturas superiores a 10°C (Nordlie e Arion, 1964). A atividade enzimática da glicose-6-fosfatase foi determinada também na fração microssomal (retículo sarcoplasmático).

2.3.1.4 Succinato desidrogenase, SDH (marcador de membrana mitocondrial)

Foi determinada de acordo com o método descrito por Sorensen e Mahler (1982), com pequenas modificações. O meio de incubação continha tampão fosfato 40,0 mM, pH 7,4, cianeto de sódio 1,5 mM, DCIP 1,7 mM, $MgCl_2$ 0,25 M em HCl 2,5 % e succinato de sódio 0,25 M, em um volume final de 1,5 ml. Esse sistema era pré-incubado a 37°C por 10 minutos e a reação era iniciada pela adição do homogeneizado total ou fração sarcolemal (10,0 a 70,0 ug de proteína). A variação da extinção foi acompanhada em 600 nm em tempos que variaram entre 1 e 20 minutos. A atividade enzimática foi expressa como nmoles de DCIP reduzidos/ min/ mg de proteína.

2.3.2 ATP-difosfohidrolase

As atividades de hidrólise do ATP e do ADP foram determinadas em um meio de incubação que continha Tris-HCl 50,0 mM e $CaCl_2$ 1,5 mM, pH 7,4 em um volume final de 200 ul. Vinte microlitros da fração sarcolemal diluída 10 vezes (0,8-1,0 ug de proteína) eram adicionados à mistura de reação e pré-incubados por 10 minutos à 37°C. A reação era iniciada pela adição de nucleotídeo (ATP, ADP ou outro especificado) para uma concentração final de 1,0 mM. Nos experimentos onde ocorreu a incubação simultânea dos dois substratos, a concentração de cálcio adicionado era dobrada de modo a se manter a proporção nucleotídeo-cátion. O tempo de incubação e a quantidade de proteína adicionada ao meio de reação eram escolhidos de modo a assegurar a linearidade da formação do produto. A reação

enzimática era interrompida pela adição de 200 ul de TCA (concentração final de 5%). As amostras eram mantidas em gelo, por pelo menos 10 minutos e posteriormente alíquotas de 100 ul eram retiradas para determinação do fosfato inorgânico pelo método de Lanzetta et al. (1979).

Toda as amostras foram ensaiadas em duplicata ou triplicata, sendo que a hidrólise não enzimática foi corrigida através de controles onde o material enzimático era adicionado ao tubo após a reação ter sido interrompida com TCA.

O meio de reação usado para o ensaio com outros íons divalentes foi o mesmo utilizado para as atividades determinadas na presença de cálcio.

A atividade específica foi expressa em nmol de fosfato liberado por minuto e por mg de proteína (nmol Pi/ min/ mg) nas condições de ensaio descritas.

2.3.3 Atividade de hidrólise de P_{Pi} (pirofosfato inorgânico), AMP e alguns esteres de fosfato

Como no presente trabalho as atividades de hidrólise do ATP e ADP foram determinadas pelo Pi liberado existia a possibilidade que estas resultassem da atividade simultânea de enzimas que incluem:

2.3.3.1 ATP-pirofosfoidrolase (EC 3.6.1.8) e Pirofosfatase Inorgânica (EC 3.6.1.1), sendo que a primeira enzima hidrolisaria o ATP até AMP e P_{Pi} e a segunda hidrolisaria o P_{Pi} a Pi.

2.3.3.2 ATPase(s) e Adenilato Quinase (EC 2.7.4.3), sendo que neste caso a primeira enzima produziria ADP que seria

transformado pela Adenilato Quinase.

2.3.3.3 ATPase(s) e ADPase(s).

2.3.3.4 Fosfatases Inespecíficas que hidrolisariam qualquer ester orgânico de fosfato.

Para tentar excluir as combinações descritas em 2.3.3.1 e 2.3.3.4 os seguintes compostos foram incubados num meio idêntico ao descrito para o estudo da hidrólise do ATP e ADP: P_{Pi}, glicose-6-fosfatase, p-nitrofenilfosfato, β-glicerofosfato, AMP ou AMPc na concentração final de 1,0 mM. Para tentar excluir a combinação descrita no item 2.3.3.2 a hidrólise do ADP foi medida na presença e ausência de um "ATP-trapping system" e ainda utilizou-se o Ap5A, um inibidor potente e seletivo da adenilato quinase (Lienhard e Secemski, 1973). Para tentar excluir a combinação descrita no item 2.3.3.4 utilizou-se, tanto o tratamento cinético descrito por Dixon e Webb (1979) onde os dois substratos são incubados simultaneamente em concentrações saturantes, bem como o uso de inibidores clássicos de ATPases.

2.4 Citoquímica

A técnica de citoquímica foi realizada de acordo com o método descrito por Ando et al.(1981).

2.4.1 Pré-fixação

A membrana sarcolemal (pellet) foi ressuspensa em tampão glicina (em 3,5% de sacarose) e fixador (glutaraldeído 1% e paraformaldeído 1%) por 20 min a 4°C. Após a membrana foi centrifugada 3500 rpm por 7 min. Essa operação foi repetida com tampão glicina, para remoção do fixador.

2.4.2 Reação

A membrana foi incubada em meio contendo tampão glicina, CaCl_2 5,0 mM, MgCl_2 2,0 mM, ouabaina 1,0 mM (dissolvida em DMSO), $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 2,0 mM e ATP ou ADP 3,0 mM por 1 hora a 37°C. Foi realizada uma amostra controle em paralelo, incubando a membrana no mesmo meio de reação sem os substratos.

2.4.3 Fixação

A membrana foi fixada em glutaraldeído 2,5% por uma hora a 4°C.

2.4.4 Pós-fixação

A membrana foi fixada em solução de OsO_4 1% por 1 hora a 4°C. Após a membrana foi lavada em tampão cacodilato de sódio [$\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$] 0,1 M pH 7,2 com sacarose 3,5% por 3 vezes.

2.4.5 Desidratação

A membrana foi desidratada com acetona em concentrações crescentes:

Acetona 30%, 15 minutos, 4°C. Centrifugar 15 minutos.

Acetona 50%, 15 minutos, 4°C. Centrifugar 15 minutos.

Acetona 70%, 12 horas, 4°C. Centrifugar 15 minutos.

Acetona 100%, 15 minutos, temperatura ambiente, Centrifugar 15 minutos. Esse procedimento foi repetido por mais 2 vezes.

2.4.6 Inclusão em resina de Epon

Preparo do epon para a inclusão:

Colocar em um bequer 25 ml de Epon (Poly/Bed 812)

Adicionar 17 ml do MNA (Nadic Methyl Anhydride)

Adicionar 8 ml do DDSA (Dodecenylsuccinic Anhydride)

Agitar durante 3 minutos

Adicionar 32 gotas de DMP-30 [2,4,6-tri(dimethylaminomethyl)phenol], acelerador da polimerização

Agitar durante 20 minutos

Guardar no congelador pois a temperatura ambiente polimeriza.

Para a inclusão, a acetona 100% foi retirada e substituída por uma solução de Epon e acetona 100% na relação 1:1. Nesta solução a membrana foi deixada em repouso durante 12 horas a 4°C. A solução Epon:acetona (1:1) foi retirada cuidadosamente e substituída por Epon 100%, onde a membrana permaneceu por 4 horas a temperatura ambiente.

2.4.7 Emblocamento

O emblocamento foi feito colocando a membrana em epon 100% em cápsulas Been (estas devem secar por 2 horas a 60°C antes de colocar o epon) e incubando por 72 horas a 60°C, em estufa apropriada (REICHERT-JUNG Mod. KT 100). Para ocorrer a polimerização da resina.

2.4.8 Cortes e contrastação

Após a polimerização foram feitos cortes micrométricos em um ultra-micrótomo (Reichert-Omu3). Os cortes foram colocados sobre grades de cobre (tipo R 250A de 3 mm0) onde foi feita a contrastação.

A contrastação foi feita com acetato de uranila diluído a 5% em água tridestilada (deve ser filtrado na hora de usar e é sensível a luz) por 20 a 30 minutos e citrato de chumbo por 4 a 5 minutos.

2.4.9 Microscopia Eletrônica

As amostras foram então observadas em microscópio eletrônico (EM 10C Zeiss) e fotografadas. Todo o preparo das amostras e a microscopia eletrônica foram realizados no Laboratório da Dra. Maria Nazaré Meirelles, no Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) no Rio de Janeiro.

2.5 Determinação de Proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951) utilizando albumina sérica bovina como padrão.

2.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados através do teste-t de Student para amostras dependentes, sendo os resultados expressos como média e DP (desvio padrão).

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização da Fração Sarcolemal

3.1.1 Obtenção da Fração Sarcolemal por centrifugação diferencial

A fração sarcolemal enriquecida nas atividades ATPásica e ADPásica foi isolada por centrifugação diferencial do homogeneizado de tecido ventricular cardíaco de ratos.

A análise das diferentes frações apresentada na TABELA 1 mostra que, estas atividades são encontradas em concentração aumentada, no precipitado 4 (P4), que sedimenta a 44.000g por 1 hora. Uma maior purificação desta fração é obtida pela centrifugação em presença de KCl 0,6 M, usado para extrair proteínas miofibrilares. A TABELA 1 mostra que, apesar da atividade total do homogeneizado recuperada na fração sarcolemal, assim como a proteína total ser baixa, a atividade específica da enzima (U/mg) é alta. A enzima apresenta um fator de purificação de 10,1 e 9,5 para as atividades ATPásica e ADPásica, respectivamente. Demonstrando desta forma que a fração sarcolemal apresenta-se altamente enriquecida na atividade ATP-difosfoidrolásica.

TABELA 1. Atividades ATPásica e ADPásica nas frações obtidas por centrifugação diferencial do homogeneizado de tecido ventricular cardíaco de ratos.

F	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)	P total (mg)	S	Atividade			
					U/ml	U total	U/mg	FP
HG	45	28,0	1260	ATP	12940	582300	462	1,0
				ADP	4080	183600	146	1,0
S1	32	8,0	256	ATP	1364	43648	171	0,4
				ADP	449	14368	56	0,4
P1	13	56,0	728	ATP	18040	234520	322	0,7
				ADP	5030	65390	90	0,6
S2	31	8,3	257	ATP	1058	32798	128	0,3
				ADP	437	13547	53	0,4
P2	0,25	7,4	1,9	ATP	3118	780	421	0,9
				ADP	1011	253	137	0,9
S3	31	5,9	183	ATP	835	25885	142	0,3
				ADP	375	11625	64	0,3
P3	0,28	5,1	1,4	ATP	2857	800	560	1,2
				ADP	961	269	188	1,3
S4	17	5,8	99	ATP	429	7293	74	0,2
				ADP	249	4233	43	0,3
P4	5	1,3	6,5	ATP	1329	6645	1022	2,2
				ADP	372	1860	286	2,0
S5	17	0,4	6,8	ATP	255	4335	638	1,4
				ADP	64	1088	160	1,1
FS	0,21	0,22	0,05	ATP	1030	216	4682	10,1
				ADP	304	64	1382	9,5

Fração (F), Substrato (S), Fator de Purificação (FP), Homogeneizado (HG), Sobrenadante 1,2,3,4,5 (S1,S2,S3,S4,S5), Precipitado 1,2,3,4 (P1,P2,P3,P4) e Fração Sarcolemal (FS).

U = nmol/minuto, U/ml = Atividade em unidades/ml, U total = Atividade total na fração, U/mg = Atividade específica.

O meio de reação está descrito em Material e Métodos.

Os dados apresentados acima são a média de 3 experimentos, sendo que o desvio padrão foi menor que 10,0% da média em todas as frações.

3.1.2 Marcadores de subfrações celulares - homogeneidade da fração.

A TABELA 2 mostra a atividade de várias enzimas marcadoras no homogeneizado total e na fração sarcolemal de ventrículos cardíacos de ratos. A contaminação da fração sarcolemal com mitocôndrias e microsomas foram estimados de duas maneiras: (a) pela quantidade de unidades de enzima recuperada na fração sarcolemal, considerando como 100% as unidades de enzima encontrada no homogeneizado total, e (b) calculando-se a atividade específica relativa (AER) que é a razão entre a atividade específica da enzima marcadora na fração sarcolemal e a atividade específica no homogeneizado total. Atividade específica relativa também foi calculada para as enzimas marcadoras de membrana plasmática.

Considerando a AER dos marcadores encontrou-se que a fração sarcolemal apresentou uma baixa contaminação com mitocôndrias e microsomas (TABELA 2). O empobrecimento destes marcadores em relação ao homogeneizado foi confirmado pela baixíssima recuperação dos mesmos na fração sarcolemal: aproximadamente uma contaminação 0,02 % com succinato desidrogenase (marcador mitocondrial) e 0,1 % com glicose-6-fosfatase (marcador microsomal). A atividade específica da G6Pase da fração retículo sarcoplasmático foi de 21 ± 4.0 nmol Pi/min/mg de proteína e AER foi de 8,3. Este dado confirma a baixa contaminação com microsomas na fração sarcolemal quando comparada a fração de retículo sarcoplasmático preparada a partir do mesmo homogeneizado. É importante salientar que, para succinato

TABELA 2. Atividades de enzimas marcadoras no homogeneizado total e fração sarcolemal de ventrículo cardíaco de ratos.

enzima	n	Atividade específica			
		homogeneizado	fração sarcolemal	% rec	AER
SDH	5	10,4 ± 0,7	5,7 ± 0,4	0,02	0,5
G6Pase	4	2,5 ± 0,4	7,1 ± 0,6	0,11	2,8
Na ⁺ ,K ⁺ ATPase	7	24,1 ± 3,8	214,8 ± 39,5	-	8,9
5'-Nase	6	17,7 ± 1,2	81,3 ± 13,8	-	4,6

SDH: succinato desidrogenase, G6Pase:glicose-6-fosfatase, 5'-Nase: 5'-nucleotidase, n= número de experimentos com diferentes preparações.

Os dados representam a média ± desvio padrão.

Os ensaios enzimáticos foram realizados como descrito em Material e Métodos.

As atividades específicas das enzimas estão expressas em nmol de produto formado ou substrato consumido/min/mg de proteína. Exceto para SDH que foi expressa em nmoles de DCIP/mg/h.

A recuperação (%) foi calculada como percentagem das unidades de enzima no homogeneizado total recuperadas na fração sarcolemal.

AER: corresponde a atividade específica relativa, calculada como a razão entre a atividade específica na fração sarcolemal e a atividade específica no homogeneizado total.

desidrogenase os resultados obtidos são melhores do que os relatados por Velema e Zaagsma (1981), pois a preparação apresentou uma menor contaminação do que a encontrada por estes autores.

Com relação a Na^+, K^+ -ATPase e 5'-nucleotidase (marcadores de membrana plasmática) a fração sarcolemal apresenta-se enriquecida aproximadamente 9 e 5 vezes nestas duas atividades, respectivamente. As atividades específicas relativas das duas enzimas são bastante semelhantes as descritas pelos autores na técnica original desta preparação.

3.1.3 Localização da atividade enzimática

No presente trabalho, com o objetivo de determinarmos se a atividade de hidrólise de ATP e ADP encontrava-se ligada a membrana plasmática da célula cardíaca, realizamos um experimento descrito por Stefanovik et al (1974). Uma vez obtida, a fração sarcolemal foi centrifugada a 44.000 g por 30 min e aproximadamente 80 % da atividade ATPásica e ADPásica foram recuperadas no precipitado após o mesmo ser ressuspenso, como mostra a TABELA 3. Uma vez que, apenas 20 % da atividade ficou no sobrenadante deste precipitado, estes resultados indicam que a enzima está ligada a membrana da célula cardíaca.

Os dados apresentados na TABELA 2 reforçam estes resultados, porque a fração sarcolemal apresenta-se enriquecida nas enzimas Na^+, K^+ -ATPase e 5'-nucleotidase que são enzimas de membrana muito estudadas em diferentes tipos de células.

TABELA 3. Atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica, antes e após centrifugação da fração sarcolemal.

atividade	Antes	Após	
		sobrenadante	pp ressuspenso
Ca^{2+} -ATPase	1416 ± 150 (3)	284 ± 20 (3)	1150 ± 120 (3)
Ca^{2+} -ADPase	326 ± 43 (3)	50 ± 4 (3)	269 ± 27 (3)

Os dados representam a média ± desvio padrão com o número de experimentos (n) entre parênteses.

Os ensaios enzimáticos foram realizados como descrito em Material e Métodos.

As atividades específicas das enzimas estão expressas em nmol de Pi/ min/ mg de proteína.

pp: precipitado.

A prova definitiva de que a atividade ATP-difosfohidrolase é uma enzima da membrana plasmática da célula cardíaca foi obtida por localização citoquímica ultra-estrutural. Depósitos de fosfato de chumbo eletrodensos encontram-se amplamente distribuídos nas vesículas de membrana sarcolemal, que foram visualizadas por microscopia eletrônica, após a incubação com ATP (FIGURA 1a) ou ADP (FIGURA 1b) como substratos. Controles sem nucleotídeo demonstram a ausência de depósitos eletrodensos (FIGURA 1c).

3.2 Padronização da Atividade ATP-difosfohidrolásica em Sarcolema de Ratos

3.2.1 Dependência da velocidade da reação com a concentração de proteína e tempo de incubação

Com o propósito de estabelecer as condições de linearidade da reação em relação a concentração de proteína e ao tempo de incubação para a hidrólise de ATP e ADP pela fração sarcolemal, utilizou-se o meio de incubação descrito em Material e Métodos e mediu-se o fosfato liberado. Para determinação da concentração variou-se a proteína entre 0,2 a 2,0 ug, sendo a reação linear entre 0,2 e 1,6 ug de proteína para ambos os substratos da enzima (FIGURA 2). Para determinação do tempo de incubação este variou entre 5 e 60 minutos, sendo a reação linear neste intervalo de tempo com os dois substratos (FIGURA 3). Nos demais experimentos o tempo de incubação estabelecido foi de 10 min e 20 min para as atividades ATPásica e ADPásica, respectivamente.

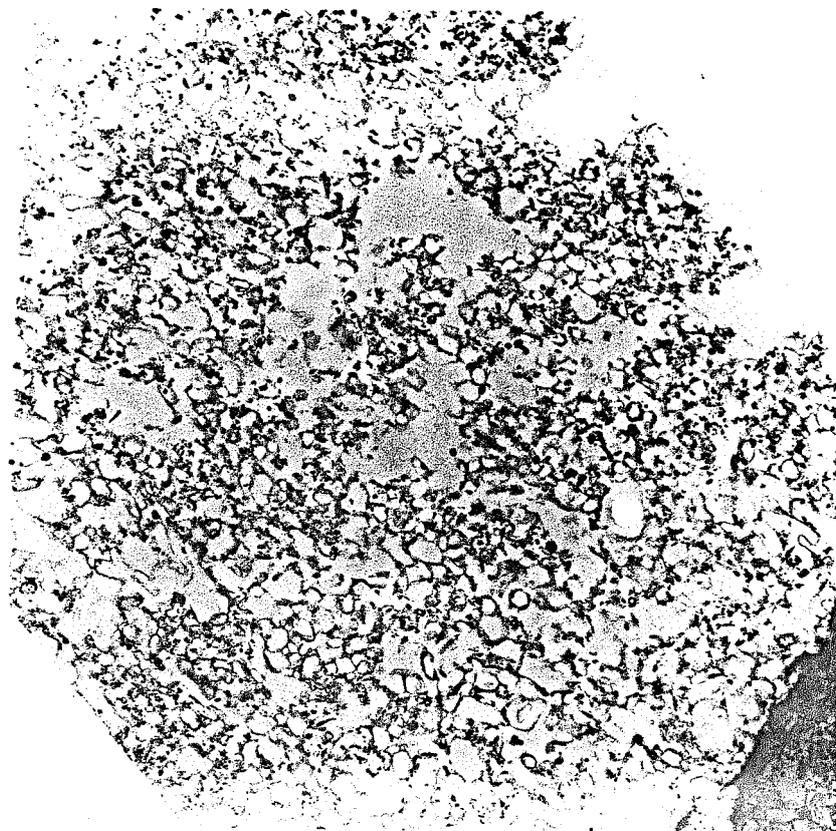


FIGURA 1a. Localização ultra-estrutural da atividade ATP-difosfoidrolase. Aspecto geral da fração sarcolemal mostrando a distribuição de depósitos de fosfato de chumbo eletrodensos originados da hidrólise do ATP pela membrana da célula cardíaca.

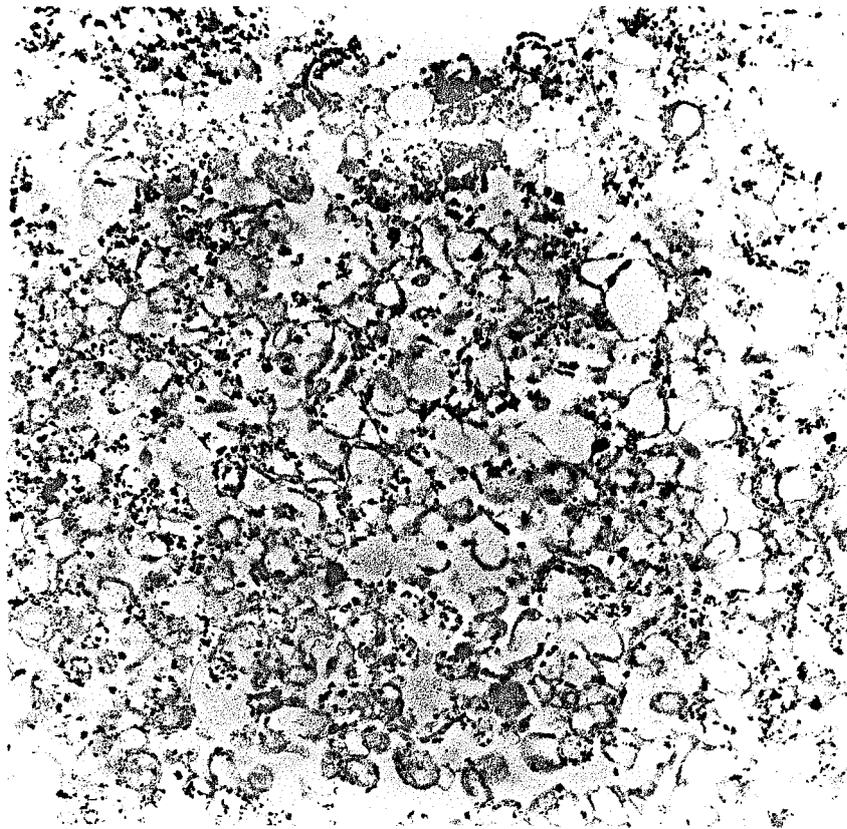


FIGURA 1b. Localização ultra-estrutural da atividade ATP-difosfohidrolase. Aspecto geral da fração sarcolemal mostrando a distribuição de depósitos de fosfato de chumbo eletrodensos originados da hidrólise do ADP pela membrana da célula cardíaca.

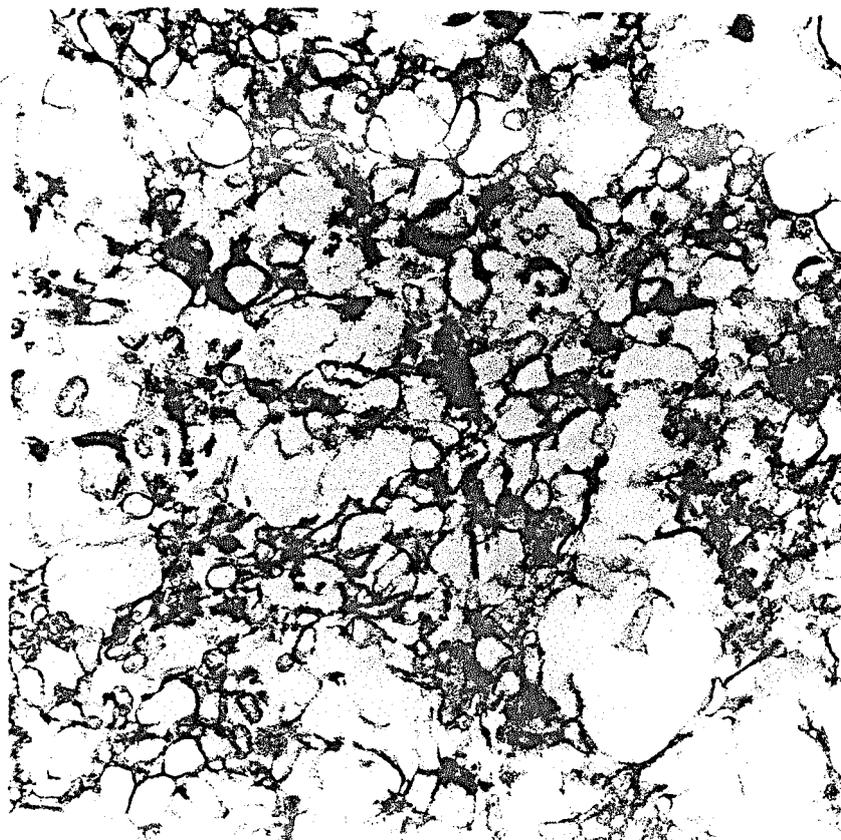


FIGURA 1c. Localização ultra-estrutural da atividade ATP-difosfoidrolase. Aspecto geral da fração sarcolemal mostrando a ausência de depósitos de fosfato de chumbo eletrodensos nos controles incubados sem nucleotídeos.

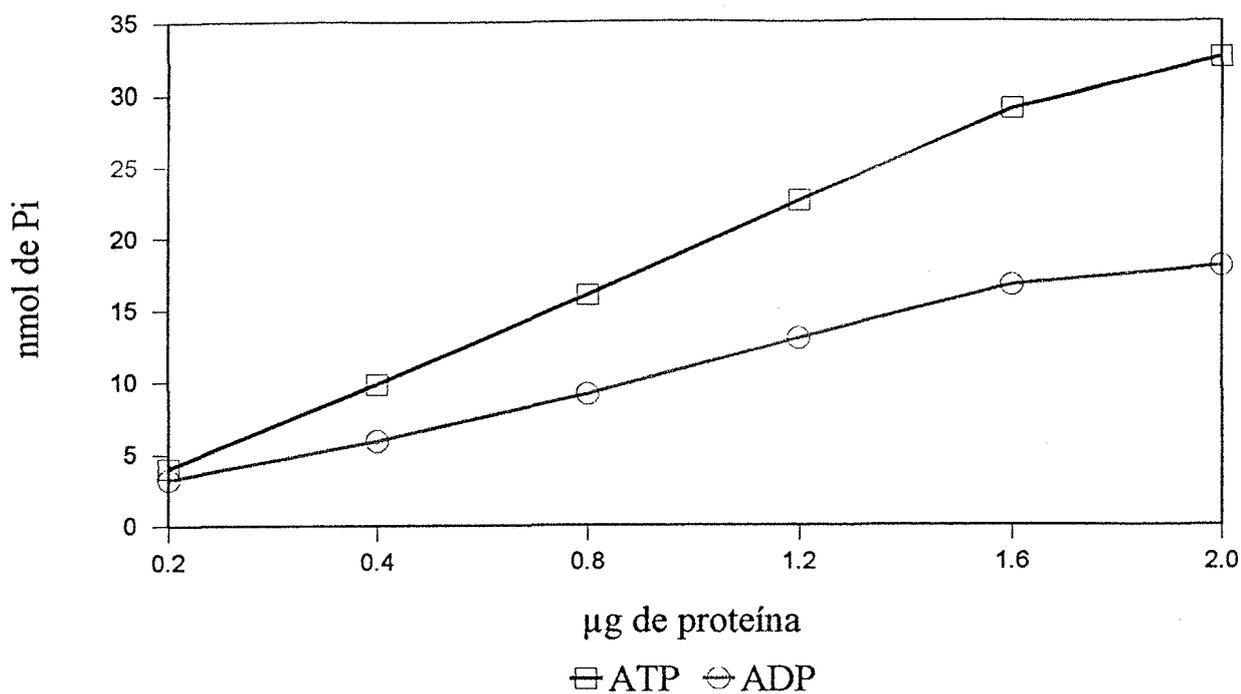


FIGURA 2. Curva de Proteína. A dependência da concentração de proteína para as atividades ATPásica e ADPásica foram determinadas como descrito em Material e Métodos com modificações na concentração de proteína. Cada ponto representa a média de ensaios em duplicata. Os resultados correspondem a média de quatro experimentos com diferentes preparações de sarcolema.

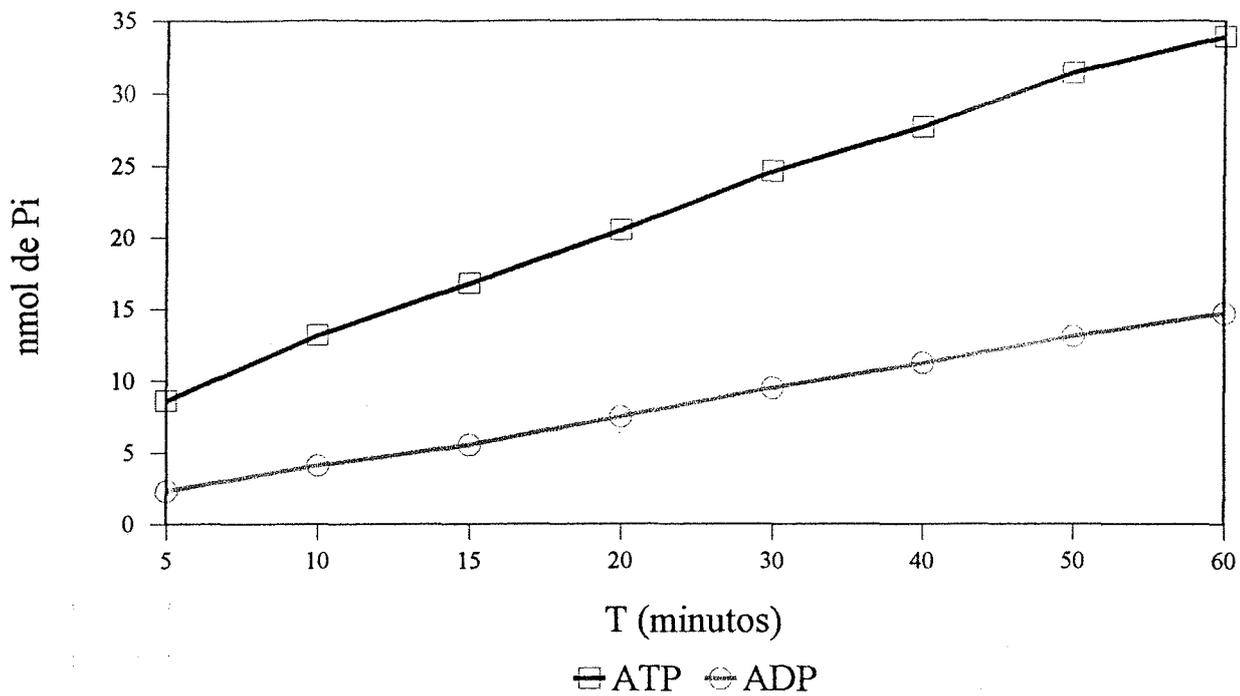


FIGURA 3. Curva de Tempo. As atividades ATPásica e ADPásica em relação ao tempo foram determinadas como descrito em Material e Métodos com modificações no tempo de incubação. Cada ponto representa a média de ensaios em duplicata. Os resultados correspondem a média de três experimentos com diferentes preparações de sarcolema.

Em todos os experimentos apresentados neste trabalho, tivemos o cuidado de limitar o percentual de hidrólise dos nucleotídeos de forma que, mesmo em concentrações baixas de substrato, asseguramos a linearidade da reação.

3.2.2. Variação da Atividade ATP-difosfohidrolásica com a concentração de substrato (ATP e ADP).

A FIGURA 4 mostra a dependência da concentração de substrato para as velocidades de hidrólise do ATP e ADP. As atividades ATPásica e ADPásica foram medidas com três diferentes concentrações de nucleotídeos (1,0, 1,5 e 2,0 mM), apenas com a finalidade de determinarmos se estávamos trabalhando em condições de saturação em relação ao substrato. A FIGURA 4 demonstra que com 1,0 mM atinge-se a velocidade máxima de hidrólise e a reação é paralela para ambos os substratos.

3.2.3 Variação da Atividade ATP-difosfohidrolásica com a Concentração de Cálcio

A sensibilidade da enzima ao cálcio foi primeiramente demonstrada variando as concentrações deste íon na presença de concentrações de ATP e ADP fixadas em 1,0 mM. A FIGURA 5 mostra a dependência das concentrações de cálcio adicionado para a ativação das velocidades de hidrólise do ATP e ADP.

As atividades ATPásica e ADPásica foram medidas na presença de quatro concentrações diferentes de cálcio adicionado (CaCl_2 0,5, 1,0, 1,5 e 3,0 mM). As curvas de velocidade de hidrólise de

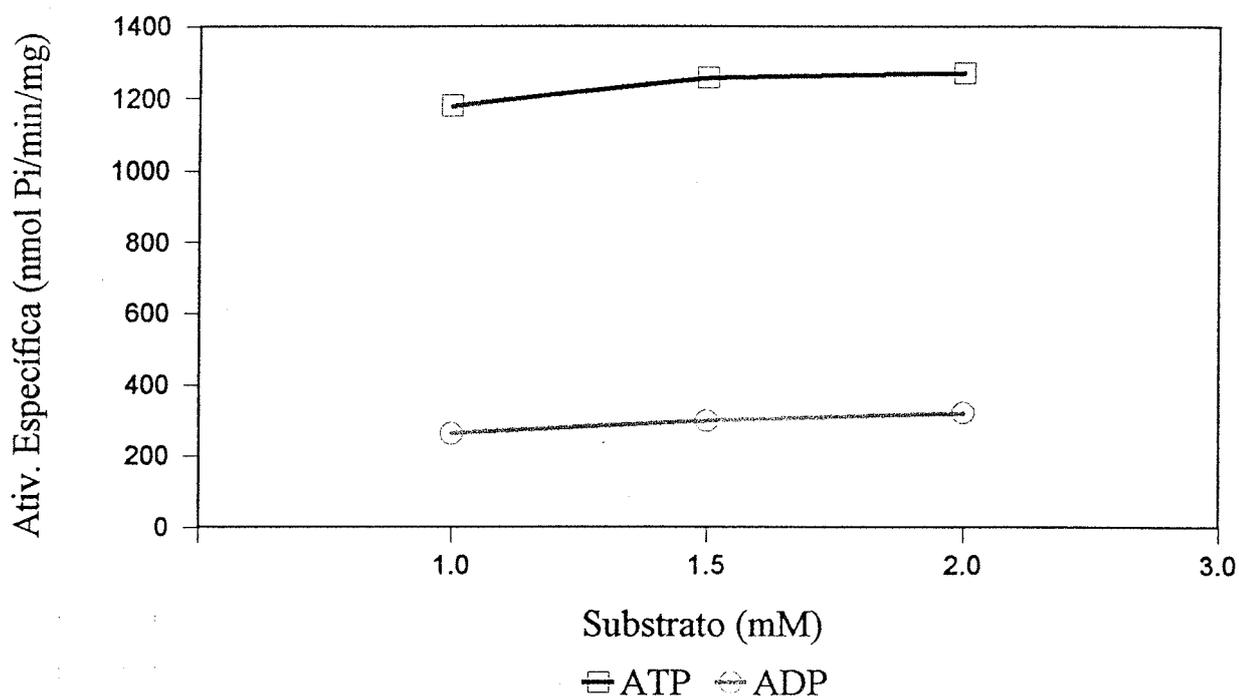


FIGURA 4. Variação das atividades ATPásica e ADPásica com a concentração de substrato. O meio de incubação utilizado foi o mesmo descrito em Material e Método com variação nas concentrações de nucleotídeo (1,0, 1,5 e 2,0 mM), na presença de 1,5 mM de cálcio. Cada ponto representa a média de duplicatas. Os resultados correspondem a média de um total de dois experimentos com diferentes preparações de sarcolema.

ATP e ADP apresentaram um perfil paralelo em função das variações nas concentrações de cálcio, sendo que nestas condições a velocidade da reação já era máxima para ambos os substratos. Este experimento foi realizado apenas para determinarmos se estávamos trabalhando em condições de saturação da enzima em relação aos íons cálcio.

Nestas condições, foram realizados os experimentos cujos resultados serão a seguir relatados e que nos permitiram caracterizar uma atividade ATP-difosfoidrolásica em sarcolema cardíaco de ratos adultos.

3.3 Caracterização da ATP-difosfoidrolase

3.3.1 Efeito do pH - Determinação do pH ótimo.

Com o propósito de determinar qual o pH ótimo para a hidrólise do ATP e ADP pela fração sarcolemal, utilizou-se uma mistura de tampões contendo Tris 50 mM e Histidina 50 mM ajustando-se o pH desejado com adição de HCl. A FIGURA 6 mostra os resultados obtidos, constatando-se que o pH ótimo para as atividades ATPásica e ADPásica é em torno de 7,5 a 8,0. Um paralelismo foi observado para ambas atividades nos diferentes valores de pH testados.

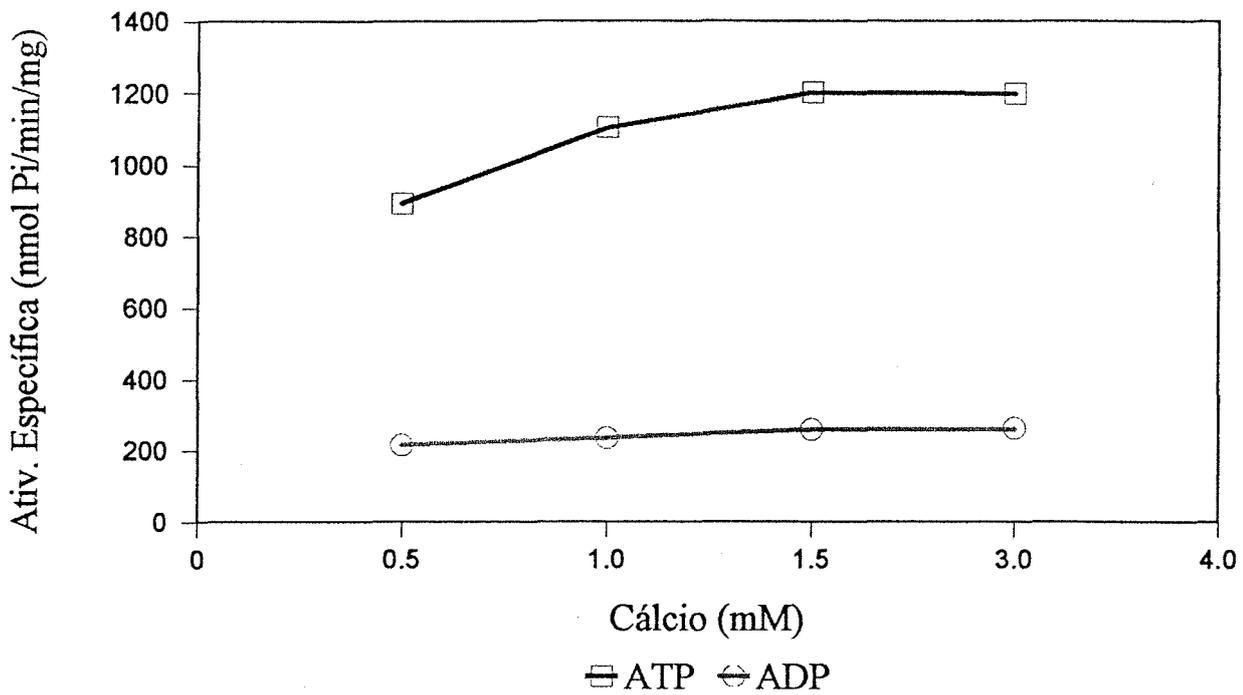


FIGURA 5. Variação das atividades ATPásica e ADPásica com a concentração de cálcio na ausência de EGTA. O meio de incubação foi o descrito em Material e Métodos com variação nas concentrações de cálcio (0,5 a 3,0 mM) na presença de 1,5 mM de nucleotídeo. Cada ponto representa a média de duplicatas. Os resultados correspondem a média de dois experimentos com diferentes preparações de sarcolema.

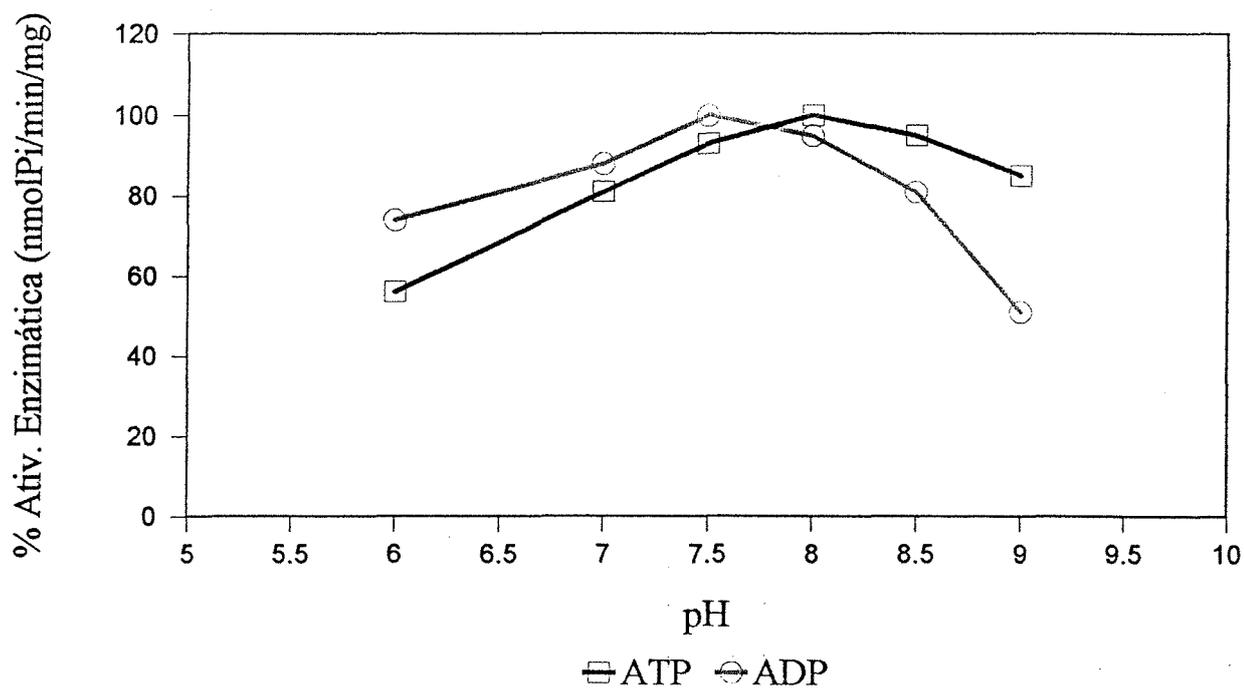


FIGURA 6. Efeito do pH sobre a atividade ATP-difosfoidrolásica. As atividades ATPásica e ADPásica foram determinadas como descrito em Material e Métodos com modificações no tampão. Utilizou-se em todos os pontos uma mistura de Tris 50 mM + histidina 50 mM. Cada ponto representa a média de duplicatas. Os resultados correspondem a média de três experimentos com diferentes preparações de sarcolema.

3.3.2 Dependência da Concentração de Cálcio.

Uma pequena atividade específica residual de aproximadamente 8,7% e 12,0% da atividade máxima medida para ATP e ADP, respectivamente, foi observada na ausência de íons cálcio adicionado, como mostra a FIGURA 7. Para mostrar a dependência da enzima ao cálcio e eliminar a possibilidade de outros íons endógenos como magnésio ou o próprio cálcio estarem contribuindo para a hidrólise de ATP e ADP, inibiu-se a atividade basal com adição de EGTA. O agente quelante escolhido foi o EGTA porque este quela preferencialmente cálcio ao magnésio. A FIGURA 7 mostra que com concentrações crescentes de EGTA ocorre uma remoção paralela das atividades ATPásica e ADPásica dependentes de íons endógenos. O resultado apresentado demonstra a presença de uma pequena concentração de cátions divalentes na fração sarcolemal. Com uma concentração de 20 μ M de EGTA houve remoção total das atividades ATPásica e ADPásica. Para confirmar que a inibição da atividade enzimática era devido a falta de íons cálcio e não a um efeito inibitório direto do EGTA sobre a enzima acrescentamos 1,5 mM de cálcio em presença de 20 μ M de EGTA, nestas condições a atividade da enzima retorna a atividade inicial. Este resultado demonstra que a velocidade de hidrólise de ATP e ADP é dependente das concentrações de cálcio, indicando que o melhor substrato para a atividade ATP-difosfohidrolásica é o complexo cálcio-nucleotídeo.

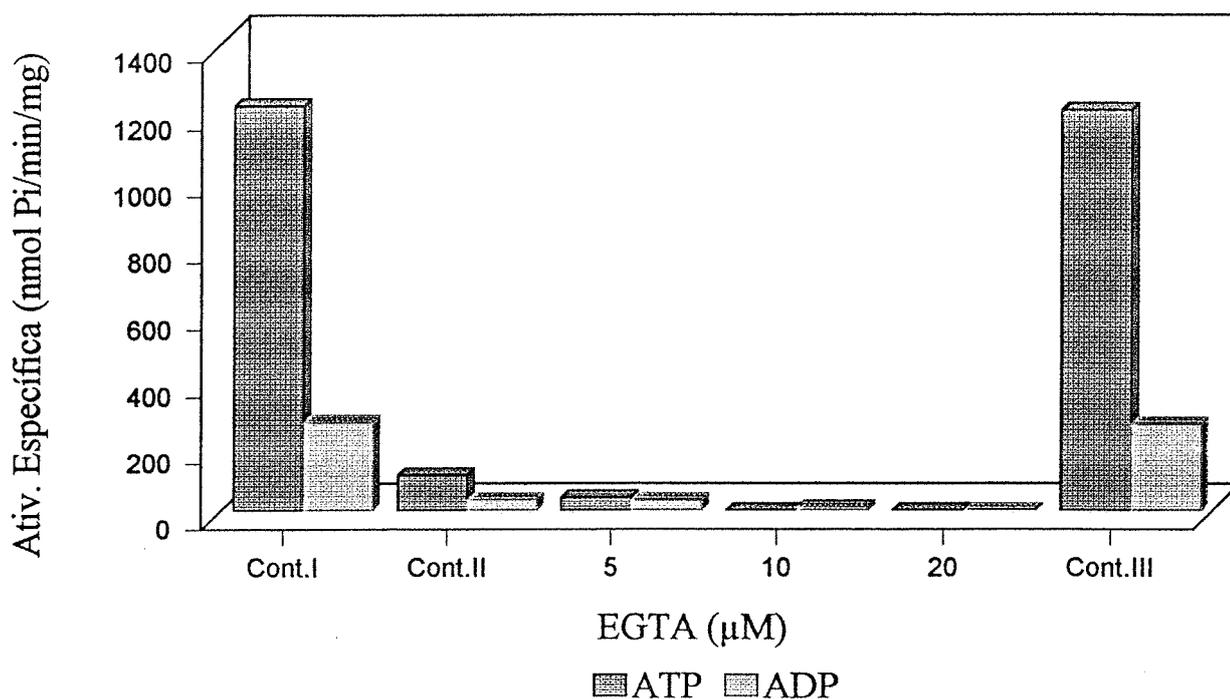


FIGURA 7. Curva de EGTA. Efeito do EGTA como quelante sobre as atividades ATPásica e ADPásica. O meio de reação foi o descrito em Material e Métodos sem adição de cátion (Ca^{2+} ou Mg^{2+}). Cada valor de atividade específica representa a média de duplicatas. Os resultados apresentados correspondem a média de dois experimentos com diferentes preparações de sarcolema. O CONTROLE I representa o ensaio das atividades na presença do íon cálcio adicionado (1,5 mM) e na ausência de EGTA. O CONTROLE II representa as atividades na ausência do íon cálcio adicionado e de EGTA. O CONTROLE III representa as atividades na presença de 20 μM de EGTA e 1,5 mM de íons cálcio.

3.3.3 Determinação das Constantes Cinéticas.

A atividade ATP-difosfohidrolásica descrita no presente trabalho depende da presença de cátions divalentes, podendo ser ativada pelo cálcio ou pelo magnésio (TABELA 4). Considerando que adenilato quinase, uma atividade enzimática envolvida na transformação do ADP, pode estar ativa na presença do magnésio executamos os experimentos deste trabalho na presença exclusivamente de cálcio.

As FIGURAS 8a e 8b mostram a influência das concentrações de cálcio sobre as atividades ATPásica e ADPásica. As atividades foram medidas com as concentrações de cálcio variando entre 10 a 300 μM , em presença de 20 μM de EGTA e 800 μM de nucleotídeo. Observa-se um paralelismo entre as duas atividades enzimáticas e a atividade máxima foi atingida na concentração de cálcio de 150 μM para os dois nucleotídeos. As atividades ATPásica e ADPásica foram dependentes em relação a variação das concentrações de cálcio. Os valores de K_a aparente e $V_{\text{máx}}$ para cálcio foram calculados pelo método de Lineweaver-Burk e os gráficos obtidos são mostrados FIGURA 9. O valor de K_a aparente obtido para ATP foi $32 \pm 4,3$ μM (média \pm desvio padrão, $n=3$) com um $V_{\text{máx}}$ calculado de 1650 ± 247 nmoles de $\text{P}_i/\text{min}/\text{mg}$ de proteína e para ADP o K_a aparente determinado foi $17 \pm 1,4$ μM (média \pm desvio padrão, $n=3$) com um $V_{\text{máx}}$ de 340 ± 51 nmoles de $\text{P}_i/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

FIGURA 8a:

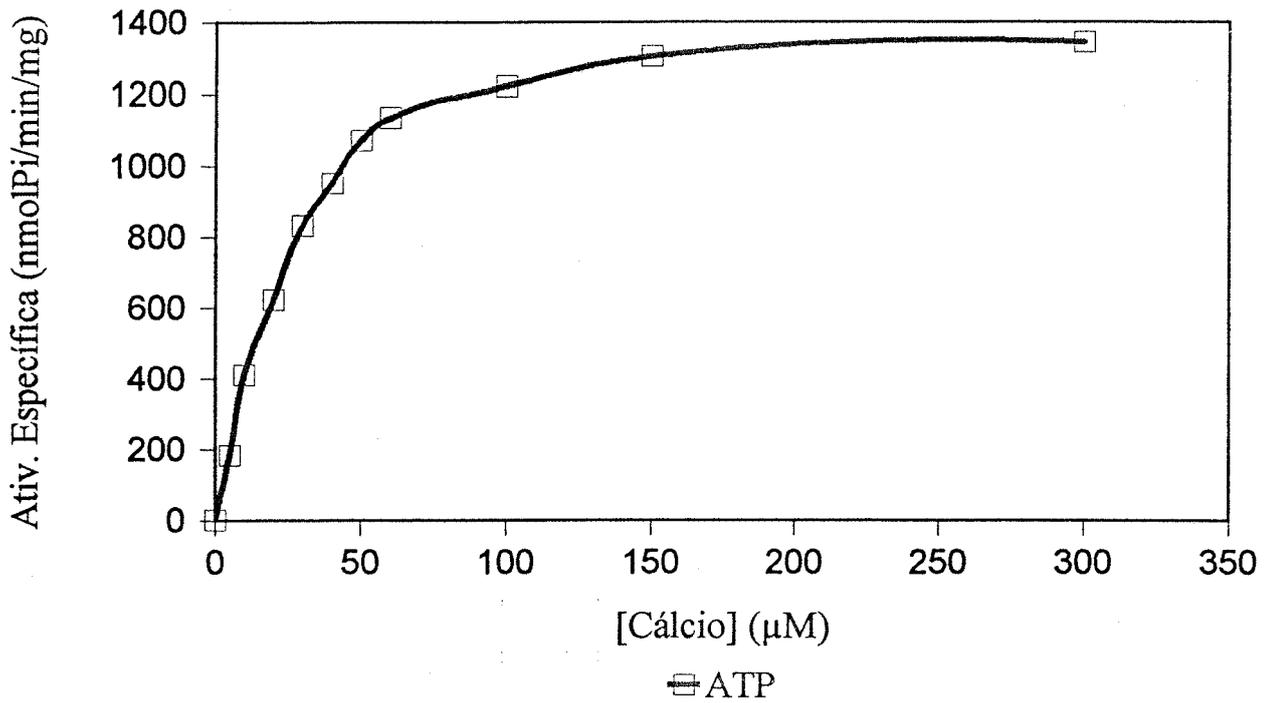
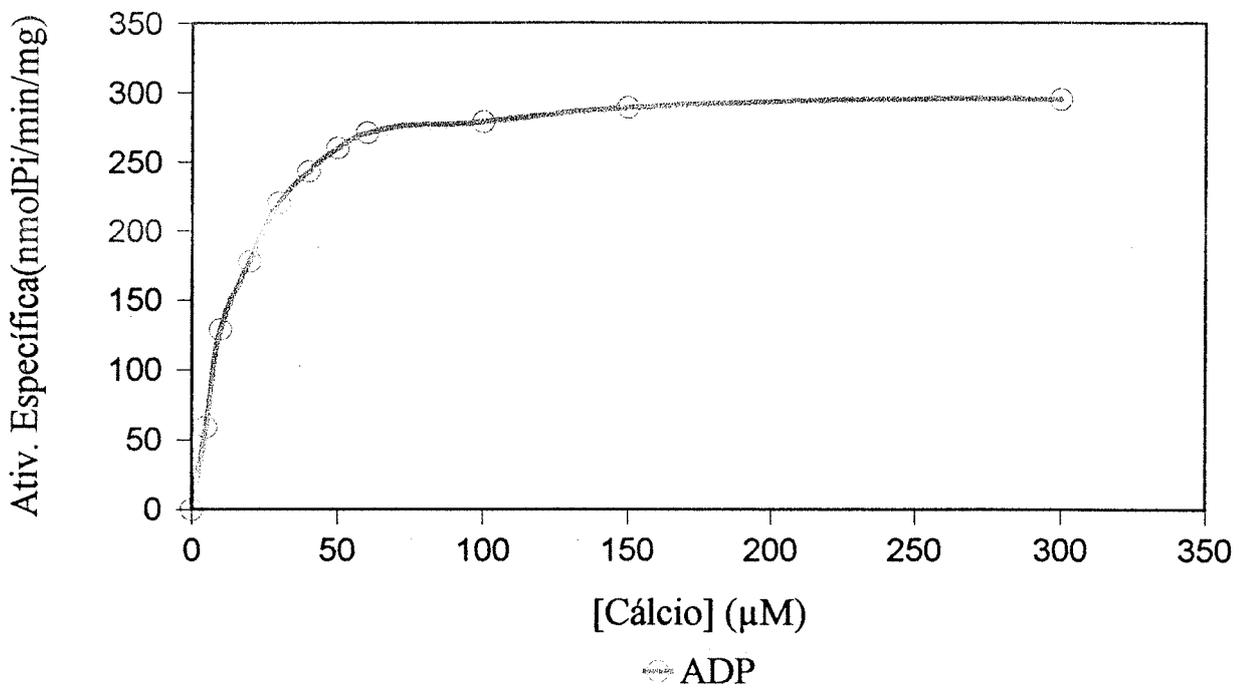


FIGURA 8b:



FIGURAS 8a e 8b: Dependência da concentração de cálcio para as atividades ATPásica e ADPásica. O meio de reação foi o descrito em Material e Métodos com modificações nas concentrações de cálcio. As concentrações de cálcio utilizadas variaram entre 10 e 300 uM para ambos os substratos. A concentração de ATP e ADP utilizada foi 800 uM e os íons endógenos foram removidos pela adição de 20 uM de EGTA. Cada ponto representa a média de duplicatas. Os resultados correspondem a média de três experimentos para ATP e ADP, com diferentes preparações de sarcolema.

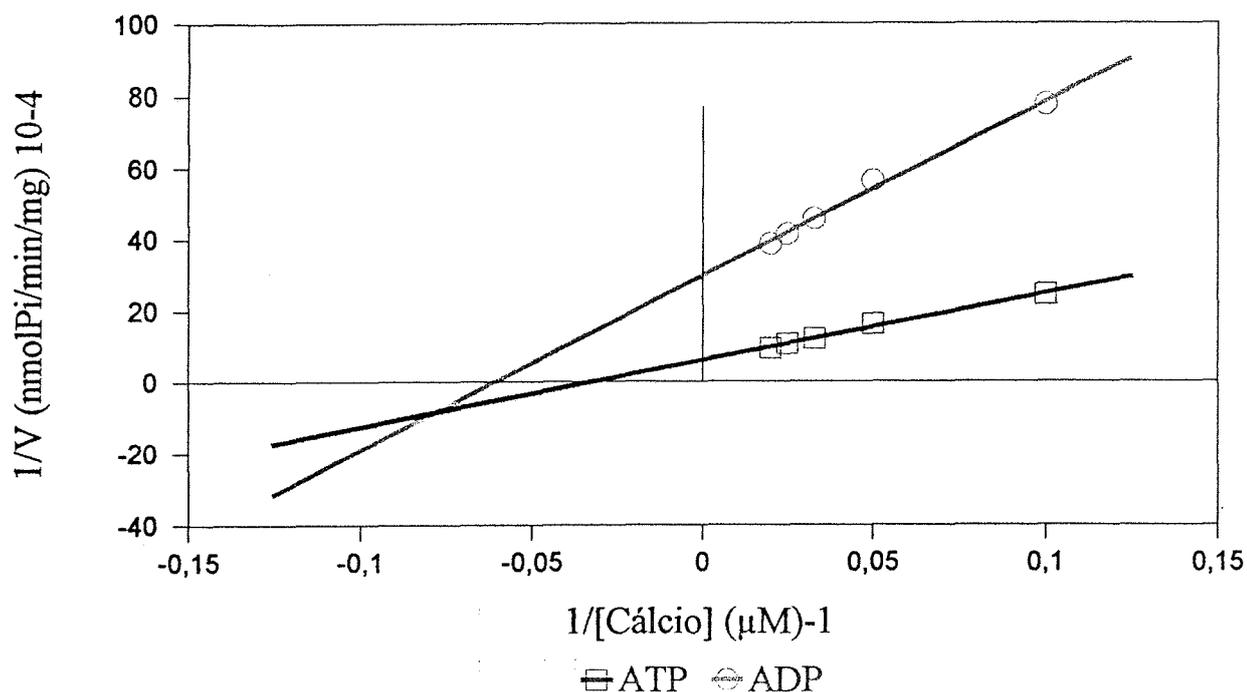


FIGURA 9: Representação das curvas de dependência de cálcio para as atividades ATPásica e ADPásica pelo gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk. O meio de reação foi o descrito em Material e Métodos com modificações nas concentrações de cálcio. As concentrações de cálcio variaram entre 10 e 50 μM em presença de 800 μM de nucleotídeo. Os íons endógenos foram removidos pela adição de 20 μM de EGTA. Cada ponto representa a média de ensaios em duplicata. Os resultados correspondem a média de três experimentos com diferentes preparações de sarcolema. Os valores de K_a aparente e V_{max} para cálcio são $32 \pm 4,3 \mu\text{M}$ com um V_{max} de $1650 \pm 247 \text{ nmol Pi/min/mg}$ de proteína para ATP e $17 \pm 1,4 \mu\text{M}$ com um V_{max} de $340 \pm 51 \text{ nmol Pi/min/mg}$ de proteína para ADP.

As FIGURAS 10a e 10b mostram a dependência da concentração dos complexos Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP para as suas velocidades de hidrólise. As atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica foram determinadas com concentrações do substrato variando entre 50 e 3000 μM , em presença de 20 μM de EGTA e 1.5 mM de cálcio. A enzima exhibe uma cinética hiperbólica com o aumento das concentrações de substrato e observa-se um paralelismo entre as duas atividades. A maior concentração de substrato testada mostra uma pequena inibição da atividade enzimática. Este resultado indica que o ATP ou ADP, em altas concentrações, podem atuar como inibidores da atividade ATP-difosfohidrolásica provavelmente competindo com os substratos Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP. Os valores de K_m aparente e $V_{\text{máx}}$ foram calculados pelo método de Lineweaver-Burk e os gráficos obtidos são mostrados na FIGURA 11 para os substratos Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP. O valor de K_m aparente obtido para o substrato Ca^{2+} -ATP foi $61 \pm 5,1 \mu\text{M}$ (média \pm desvio padrão, $n=4$) com um $V_{\text{máx}}$ calculado de 1240 ± 186 nmoles $\text{Pi}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína e para o Ca^{2+} -ADP o K_m aparente determinado foi $59 \pm 4,9 \mu\text{M}$ (média \pm desvio padrão, $n=4$) com um $V_{\text{máx}}$ de 270 ± 40 nmoles $\text{Pi}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína. Estes valores de K_m em concentrações micromolares indicam que a enzima tem alta afinidade pelo substrato cálcio-nucleotídeo.

É importante notar que os valores de K_m são bastante similares para ambos os substratos da enzima, sendo esta uma característica de várias apirases descritas anteriormente (LeBel et al, 1980; Sarkis et al, 1986; Battastini et al, 1991).

FIGURA 10a:

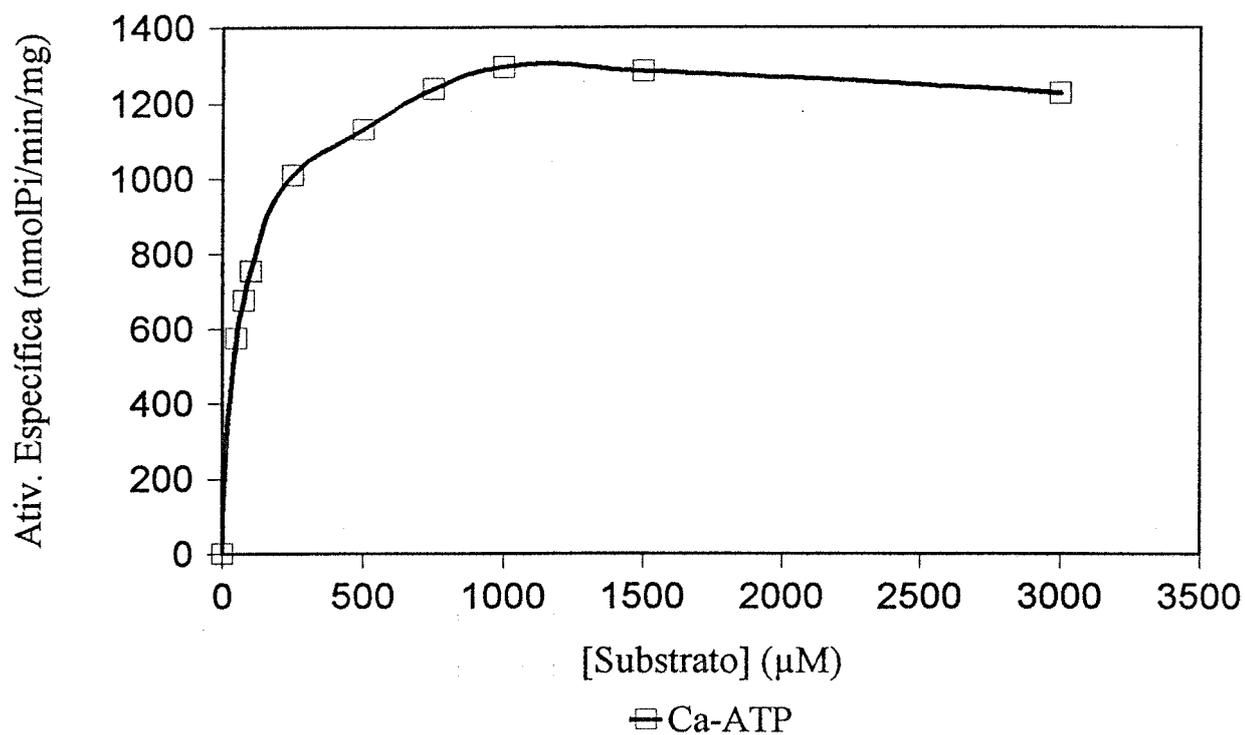


FIGURA 10b:

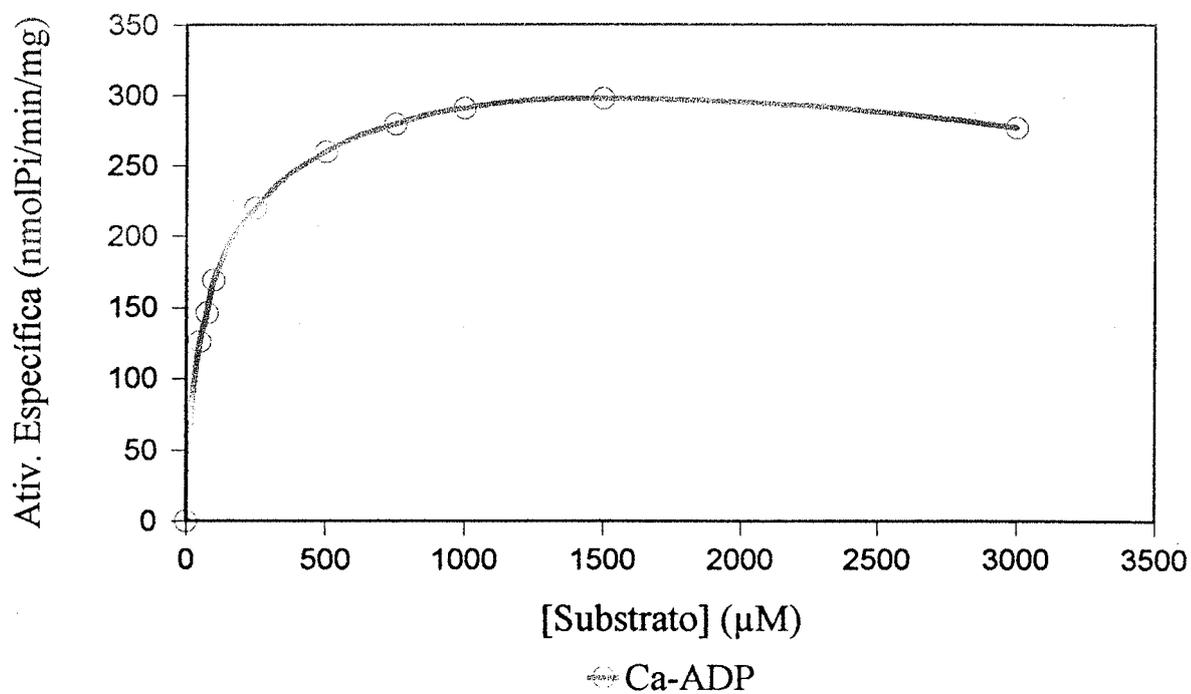


FIGURA 10a e 10b. Dependência da concentração do complexo cálcio-nucleotídeo para as atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica. O meio de reação foi descrito em Material e Métodos com modificações nas concentrações de nucleotídeo. As concentrações de nucleotídeo utilizadas variaram entre 50 e 3000 μM para ATP e ADP. A concentração de cálcio utilizada foi 1,5 mM e os íons endógenos foram removidos pela adição de 20 μM de EGTA. Cada ponto representa a média de duplicatas. Os resultados correspondem a média de quatro experimentos para ATP e ADP, com diferentes preparações de sarcolema.

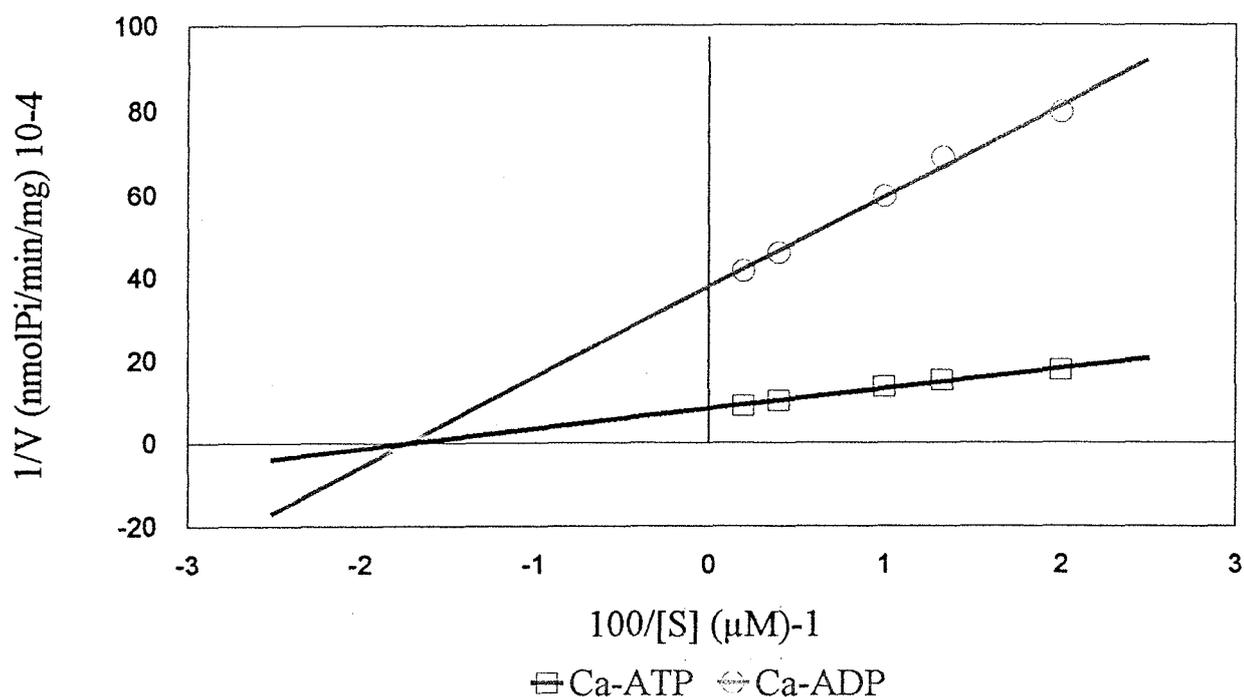


FIGURA 11. Representação das curvas de substrato para Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP pelo gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk. O meio de incubação utilizado foi o descrito em Material e Métodos. As concentrações de cálcio-nucleotídeo variaram entre 50 e 500 μM para os substratos Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP. A concentração de cálcio utilizada foi 1,5 mM em presença de 20 μM de EGTA. Cada ponto representa a média de duplicatas. Os resultados correspondem a média de quatro experimentos para ambos os substratos, com diferentes preparações de sarcolema. Os valores de K_m aparente e V_{max} determinados para Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP são $61 \pm 5,1 \mu\text{M}$ com um V_{max} de $1240 \pm 186 \text{ nmol Pi/ min/mg}$ de proteína e $59 \pm 4,9 \mu\text{M}$ com um V_{max} de $270 \pm 40 \text{ nmol Pi/min/mg}$ de proteína, respectivamente.

3.3.4 Especificidade de cátions divalentes sobre a atividade ATP-difosfoidrolásica.

A fração sarcolemal isolada de ventrículos cardíacos de ratos apresenta atividades ATPásica e ADPásica na presença de cátions divalentes (TABELA 4). A atividade ATP-difosfoidrolásica pode ser totalmente ativada pelo cálcio ou magnésio, na concentração de 1,5 mM. Outros cátions divalentes como manganês, cobalto e zinco (1,5 mM) também ativaram a enzima, porém foram muito menos efetivos que o cálcio e magnésio. De Vente et al. (1984); demonstraram no mesmo tipo de preparação, em presença de íons magnésio, que 26% da atividade ADPásica foi devido a uma adenilato quinase. Outros trabalhos também demonstram que a adenilato quinase é mais ativa em presença de magnésio (Novikoff et al., 1952 ; Batasttini et al., 1991). Como a ATP-difosfoidrolase não foi mais ativa em presença de magnésio, este resultado é uma evidência de que a adenilato quinase não está envolvida na transformação do ADP, na fração sarcolemal.

É importante observar o paralelismo ocorrido para as atividades ATPásica e ADPásica, indicando que uma única enzima é responsável pela hidrólise dos dois substratos.

3.3.5 Exclusão de associações enzimáticas.

Associações enzimáticas como ATPase e "ADPase", ATP-pirofosfoidrolase e Pirofosfatase Inorgânica, e ATPase e Adenilato Quinase são capazes de formar o Pi no meio de reação

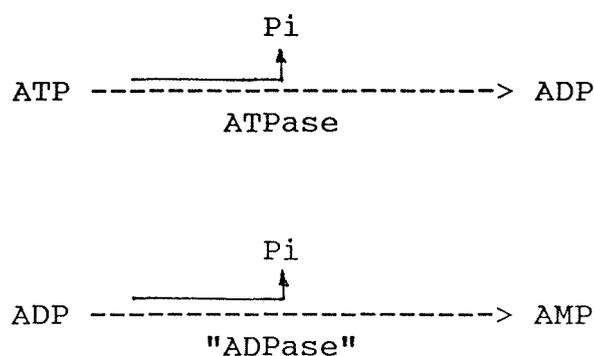
TABELA 4. Especificidade de cátions divalentes sobre as atividades ATPásica e ADPásica.

Cátions divalentes	% atividade ATPásica	% atividade ADPásica
Ca ²⁺	100	100
Mg ²⁺	110 ± 5,6	89 ± 2,6
Mn ²⁺	65 ± 5,6	66 ± 1,5
Co ²⁺	30 ± 2,5	24 ± 3,5
Zn ²⁺	12 ± 1,2	8 ± 0,9

Os valores representam a média ± desvio padrão dos percentuais da atividade obtidos em três experimentos com diferentes preparações de sarcolema. Os valores controle (100%) são: 1258 ± 69,3 e 219 ± 38,0 nmol Pi/min/mg de proteína para ATP e ADP, respectivamente.

a semelhança de uma reação catalisada por uma verdadeira ATP-difosfohidrolase. Além destas associações enzimáticas tanto o ATP quanto o ADP podem sofrer hidrólise por ação de fosfatases inespecíficas. Portanto, com o objetivo de excluir estas associações que poderiam mimetizar a hidrólise dos substratos Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP pela ATP-difosfohidrolase foram realizados os seguintes experimentos:

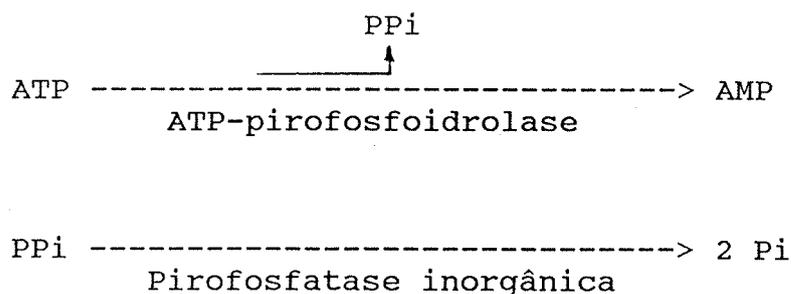
3.3.5.1 Associação de ATPase (EC 3.6.1.3) e "ADPase".



Com o objetivo de determinar se a atividade de hidrólise do ATP estava ocorrendo por ação de uma ATPase combinada com uma possível atividade "ADPásica", mimetizando uma atividade apirásica, foi utilizado um protocolo descrito na literatura para o estudo de apirases (Harper et al, 1978; Le Bel et al, 1980; Tognoli e Marré, 1981; Vara e Serrano, 1981; Sarkis et al, 1986; Schadeck et al, 1989; Battastini et al, 1991; Frassetto et al, 1993) e a β -N-acetil-hexoaminidase, EC 3.2.1.96 (Garcia-Alonso et al, 1990), que constitui um critério cinético para determinar se um único sítio ativo está participando da transformação

catalítica de dois substratos diferentes (Dixon e Webb, 1979). A TABELA 5 mostra que, quando o ATP e o ADP foram adicionados simultaneamente no meio de incubação em concentrações saturantes, a velocidade de hidrólise foi aproximadamente a média aritmética das velocidades obtidas com os dois nucleotídeos incubados separadamente. Portanto, este resultado é uma evidência de que os dois substratos estão competindo pelo mesmo sítio ativo da enzima. Se dois sítios, ou seja, duas enzimas estivessem envolvidas na hidrólise do Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP, a velocidade deveria ser o somatório dos valores encontrados para cada substrato individualmente. Entretanto, fica a possibilidade pouco provável, com base nos outros resultados apresentados neste trabalho, de que duas enzimas estivessem presentes e apresentassem inibição cruzada pelos substratos (Tognoli e Marré, 1981). Esta possibilidade poderá ser investigada posteriormente com a enzima purificada.

3.3.5.2 Associação de ATP-pirofosfoidrolase (EC 3.6.1.8) e Pirofosfatase Inorgânica (EC 3.6.1.1)



A possibilidade da hidrólise do ATP até AMP ocorrer pela associação das atividades ATP-pirofosfoidrolase e pirofosfatase

TABELA 5. Incubação simultânea dos substratos Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP.

Substrato	Concentração	Atividade Específica ^(a) (nmol Pi/min/mg)
Ca^{2+} -ATP	1,0 mM	1273 ± 142
Ca^{2+} -ADP	1,0 mM	284 ± 47
Ca^{2+} -ATP (1,0 mM) + Ca^{2+} -ADP (1,0 mM) ^(b)		803 ± 155
Somatório ^(c)		1557 ± 189
Média ^(c)		779 ± 105

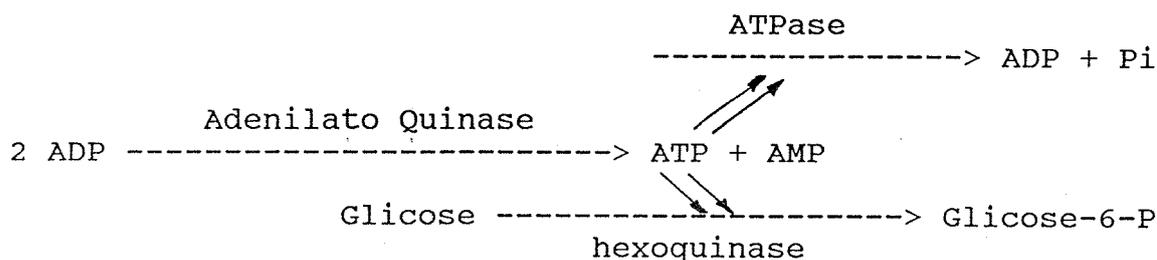
(a) Cada valor representa a média ± desvio padrão de 4 experimentos com diferentes preparações de sarcolema.

(b) O meio de reação foi o utilizado para a determinação das atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica com as concentrações de cálcio ajustadas de modo a assegurar a proporção de cátion em relação ao nucleotídeo (descrito em Material e Métodos).

(c) Os valores representam o somatório e a média aritmética das atividades em relação ao Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP incubados separadamente.

inorgânica foi investigada incubando-se pirofosfato inorgânico (PPi), na concentração final de 1,0 mM, nas mesmas condições de ensaio utilizada para as atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica. A TABELA 6 mostra que, em três experimentos feitos com diferentes preparações enzimáticas não se observa a hidrólise do pirofosfato, enquanto que as mesmas preparações se mostram eficientes para hidrolisar os substratos ATP e ADP. Portanto, demonstra-se que esta associação enzimática não deve ser a responsável pela hidrólise do ATP até AMP.

3.3.5.3 Associação de ATPase (EC 3.6.1.3) e Adenilato Quinase (EC 2.7.4.3)



Considerando a possibilidade da participação de uma adenilato quinase a hidrólise do ADP foi medida na presença e ausência de um "ATP-trapping system" (Tognoli e Marrè, 1981; Vara e Serrano, 1981; Yagi et al, 1991; Vasconcelos et al, 1993). Este sistema consiste de hexoquinase (EC 2.7.1.1; 10 ug/ml) e glicose (10 mM) em excesso, na presença de 1 mM de ADP. Qualquer atividade adenilato quinásica aumentaria a liberação de fosfato no meio de incubação, na ausência deste sistema. Na presença de

um "ATP-trapping system", a adenilato quinase participaria da transformação de 2 moles de ADP formando intermediariamente ATP, que seria utilizado pela hexoquinase que formaria G-6-P + ADP, evitando o acúmulo de ATP e consequente formação de Pi no meio de incubação pela ação de uma ATPase. A TABELA 6 mostra que, a hidrólise do ADP não foi alterada quando comparada na presença de um "ATP-trapping system" (hex/glic), demonstrando que esta atividade de hidrólise é devido a uma ATP-difosfoidrolase e não pela associação de uma ATPase e uma adenilato quinase. Este resultado foi confirmado pelo uso dos inibidores de adenilato quinase, Ap5A (Lienhard e Secemski, 1973) e NEM (Russel et al, 1974), que não alteraram a hidrólise do Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP (TABELA 7).

3.3.5.4 Fosfatases Inespecíficas.



A possível participação de fosfatases inespecíficas hidrolisando o Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP foi excluída uma vez que, a fração sarcolemal não hidrolisou os substratos utilizados para medir a atividade fosfatásica, quando estes foram incubados em substituição ao ATP e ADP na concentração final de 1,0 mM. A TABELA 6 mostra os substratos utilizados para medir as possíveis atividades fosfatásicas (p-nitrofenilfosfato, glicose-6-fosfato, AMPc e B-glicerofosfato).

Foi detectada uma pequena hidrólise do AMP quando este foi

utilizado como substrato, indicando a presença desprezível de uma 5'-nucleotidase hidrolisando o AMP até adenosina. Esta atividade foi muito pequena quando comparada ao resultado obtidos na TABELA 2, onde a enzima foi incubada em um meio de incubação específico para 5'-nucleotidase.

3.3.6 Especificidade para o Substrato

Para investigar se a fração sarcolemal apresentava atividade de hidrólise sobre outros nucleotídeos, incubou-se a preparação nas mesmas condições utilizadas para medir as atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica, substituindo-se o ATP ou ADP por CTP, GTP, UTP, ITP, GDP, UDP, CDP E IDP. Uma das características de apirases descritas em vários tecidos (Le Bel et al, 1980; Tognoli e Marré, 1981; Knowles et al, 1983; Sarkis et al, 1986; Battastini et al, 1991; Pieber et al, 1991; Sarkis e Salto, 1991; Yagi et al, 1991; Côté et al, 1992; Picher et al, 1993; Frassetto et al, 1994) é a hidrólise de diferentes nucleosídeos difosfatados e trifosfatados. A TABELA 6 mostra que, a fração sarcolemal tem uma ampla especificidade de substrato para nucleosídeos di- e trifosfatados uma vez que, na concentração de 1,0 mM, todos os nucleotídeos testados foram hidrolisados na presença de íons cálcio.

Conforme comentado anteriormente (ver 3.3.5.4), os substratos alternativos testados não foram hidrolisados (PPi, B-glicerofosfatos, p-nitrofenilfosfato e glicose-6-fosfato) o que demonstra que realmente a enzima é específica para nucleosídeos tri- e difosfatados (TABELA 6). Portanto, nas condições de ensaio

TABELA 6. Especificidade enzimática.

Substrato	n	Atividade Específica	Atividade Relativa
ATP	3	1230 ± 32,9	1,00
CTP	3	1265 ± 56,6	1,03
GTP	3	1226 ± 41,2	0,99
UTP	3	1566 ± 117,6	1,27
ITP	3	1587 ± 134,8	1,29
ADP	4	247 ± 34,0	0,20
GDP	3	245 ± 26,7	0,20
UDP	3	261 ± 34,3	0,21
CDP	3	388 ± 50,4	0,32
IDP	3	344 ± 41,6	0,28
AMP	3	10 ± 1,2	0,008
Hex/glic	5	243 ± 42,5	0,20
AMP _c	4	N.D.	0,000
G6P	4	N.D.	0,000
pNPP	3	N.D.	0,000
BGP	3	N.D.	0,000
PPI	3	N.D.	0,000

Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão das atividades obtidas em experimentos com diferentes preparações de sarcolema.

As condições de ensaio foram as mesmas descritas em

Material e Métodos.

Todos os substratos testados foram incubados na concentração final de 1,0 mM na presença de 1,5 mM de íons cálcio. BGP: B-glicerofosfato; pNPP: p-nitrofenilfosfato; G6P: Glicose-6-fosfato; P_{Pi}: Pirofosfato Inorgânico; Hex: hexoquinase; Glic: glicose.

Atividade específica: nmol Pi/min/mg de proteína.

Atividade relativa: atividade em relação a atividade de hidrólise do ATP, arbitrariamente tomada como igual 1,00.

N.D.: atividade não detectável.

utilizadas não há fosfatases inespecíficas contaminantes, ativas.

3.3.7 Efeito de Inibidores sobre as Atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica.

Para investigar se outras formas de ATPases poderiam estar interferindo com a atividade ATP-difosfoidrolásica, na preparação sarcolemal, vários inibidores específicos de ATPases foram testados na presença de íons cálcio. A TABELA 7 mostra os resultados obtidos com os diferentes inibidores testados. Como pode ser observado, a oligomicina e azida na concentração final de 1 mM (Bowman et al, 1978) inibidores de ATPases mitocondriais, bem como 2,4-dinitrofenol um ativador (Pullman et al, 1960), não apresentaram efeitos sobre as atividades de hidrólise de Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP. Quando a azida foi testada em concentrações maiores (10 e 20 mM) uma inibição significativa e paralela foi observada para os dois substratos. Uma inibição semelhante a esta, com 10 mM de azida, foi descrita para ATP-difosfoidrolases (apirases) de membranas plasmáticas de diferentes espécies de mamíferos (Knowles et al, 1983), sinaptossomas de córtex cerebral de ratos (Battastini et al, 1991), células endoteliais de aorta bovina e células de músculo liso (Yagi et al, 1991), fração microssomal de tecido placentar de ratos (Pieber et al, 1991) e plaquetas de ratos (Frassetto et al, 1994).

A ouabaína, um inibidor clássico da Na^+, K^+ -ATPase (Besch et al, 1976; Pang e Weglicki, 1977) e vanadato (Cantley et al, 1978; Gustin e Goodman, 1982), não afetaram a hidrólise de ambos os

substratos. A possível presença de uma $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ -ATPase, a qual já foi bem caracterizada e purificada em membrana sarcolemal (Caroni e Carafoli, 1981; Caroni et al, 1983; Schatzmann, 1989; Carafoli, 1992; Brodin et al, 1992) assim como em retículo sarcoplasmático cardíaco (Chamberlain et al, 1984a e 1984b; Schatzmann, 1989; Colyer e Wang, 1991), foi eliminada pelos efeitos não significativos dos inibidores N-etilmaleimida (Hamlyn e Senior, 1983), vanadato (Hamlyn e Senior, 1983) e Lantânio (Pershadsingh e McDonald, 1980) sobre as atividades ATPásica e ADPásica na presença de íons cálcio. Um inibidor clássico de fosfatase alcalina, levamisole (Richardson et al, 1982), também não interferiu nas atividades de hidrólise dos dois substratos.

A TABELA 8 mostra vários inibidores inespecíficos que foram testados em diferentes concentrações. Verapamil, D_{600} e nifedipina (Fleckenstein, 1983; Lee e Tsien, 1983), antagonistas do cálcio ou bloqueadores de canal de cálcio, não apresentaram efeitos sobre as atividades de hidrólise de Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP. Valinomicina (Kuwayama, 1988), um ativador da bomba de cálcio sarcolemal e thapsigargin (Sagara e Inesi, 1991; Inesi e Sagara, 1992), um inibidor específico da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático em concentrações subnanomolares, não alteraram a hidrólise de ambos os substratos. Entretanto, a trifluorperazina (Nagy et al, 1986; Zhao e Dhalla, 1988), um inibidor de processos Ca^{2+} -calmodulina-dependentes, não teve efeito em baixas concentrações, porém causou uma redução significativa e paralela na hidrólise dos dois substratos quando testada em concentrações maiores.

TABELA 7. Efeito de inibidores sobre as atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica.

Inibidor	concentração	% da atividade enzimática controle (100%)	
		Ca^{2+} -ATPásica	Ca^{2+} -ADPásica
Oligomicina	2,0 ug/ml	89 ± 4,0 (3)	97 ± 7,0 (3)
DNP	0,5 mM	102 ± 9,8 (4)	102 ± 9,8 (4)
Azida	1,0 mM	99 ± 9,5 (4)	98 ± 8,3 (4)
	5,0 mM	90 ± 2,4 (4)	89 ± 2,1 (4)
	10,0 mM	79 ± 4,0 (4)*	71 ± 1,0 (4)*
	20,0 mM	70 ± 2,3 (4)*	63 ± 4,2 (4)*
Ouabaína	1,0 mM	95 ± 3,8 (3)	93 ± 9,0 (3)
Vanadato	0,1 mM	105 ± 1,9 (3)	109 ± 5,0 (3)
NEM	1,0 mM	102 ± 7,1 (4)	108 ± 9,0 (4)
Lantânio	0,1 mM	100 ± 1,9 (3)	91 ± 6,0 (3)
Levamisole	1,0 mM	101 ± 3,7 (3)	93 ± 6,0 (3)
Ap5A	0,01mM	104 ± 9,2 (3)	101 ± 6,0 (3)

Os valores representam a média ± desvio padrão dos percentuais de atividade obtidos em experimentos com diferentes preparações de sarcolema. Os valores entre parênteses representam o número de experimentos considerados para a média. Os valores controles (100%) são: 1270 ± 70,1 e 230 ± 40,0 nmol Pi/min/mg de proteína para ATP e ADP, respectivamente.

As diferenças foram significativas estatisticamente ao nível de * $P < 0.01$ em relação ao controle (100%).

Os inibidores testados foram pré-incubados por 10 minutos à 37°C com a fração sarcolemal nas mesmas condições descritas em Material e Métodos.

Oligomicina e DNP foram preparados em uma solução de etanol 98% o qual ficou em uma concentração final de 1% no meio de incubação. Nesta concentração o etanol não promoveu inibição das atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica.

Ap5A (p^1p^5 -di (adenosina-5')-pentafofato); DNP (2,4-dinitrofenol); NEM (N-Etilmaleimida).

O fluoreto (Knowles, 1983; Battastini et al, 1991; Côté et al, 1992) e cloreto de mercúrio (Côté et al, 1992; Picher et al, 1993) causaram uma redução significativa e paralela na hidrólise de ambos os substratos da enzima. Estes resultados em conjunto com outros demonstram que, provavelmente, não existem duas enzimas envolvidas na hidrólise dos substratos Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP uma vez que estas atividades não foram afetadas por inibidores clássicos de ATPases e, quando ocorreu inibição, foi paralela para os dois substratos da enzima.

3.3.8 Efeito de metais pesados sobre a atividade ATP-difosfoidrolásica.

O efeito de alguns metais pesados, em várias concentrações diferentes, sobre as atividades Ca^{2+} -ATPase e Ca^{2+} -ADPase são mostrados na TABELA 9. O HgCl_2 foi um potente inibidor da enzima, em baixas concentrações. Resultados semelhantes foram descritos para ATP-difosfoidrolase de aorta bovina e sinaptossomas de córtex cerebral (Côté et al, 1992; Oliveira et al, 1994). A ATP-difosfoidrolase foi inibida por $\text{HgCl}_2 > \text{ZnCl}_2 > \text{CdCl}_2 > \text{AlCl}_3$ na fração sarcolemal.

Os metais pesados testados causaram uma inibição significativa e paralela na hidrólise dos dois substratos, o que constitui mais uma importante evidência para sustentar a hipótese de que uma única atividade enzimática está envolvida na hidrólise dos dois nucleotídeos.

TABELA 8. Efeito de inibidores inespecíficos sobre as atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica.

Inibidor	Concentração	% da atividade enzimática controle (100%)	
		Ca^{2+} -ATPásica	Ca^{2+} -ADPásica
Valinomicina	0,3 uM	104 ± 4,5 (3)	105 ± 0,5 (3)
Thapsigargin	100 nM	103 ± 5,4 (4)	99 ± 4,2 (4)
Verapamil	1 uM	101 ± 6,1 (3)	100 ± 9,4 (3)
	10 uM	102 ± 9,2 (3)	111 ± 2,2 (3)
	30 uM	107 ± 9,8 (3)	110 ± 9,0 (3)
D ₆₀₀	1 uM	107 ± 5,0 (3)	98 ± 8,5 (3)
	10 uM	100 ± 5,9 (3)	93 ± 9,7 (3)
	30 uM	106 ± 5,7 (3)	110 ± 5,0 (3)
Nifedipina	1 uM	102 ± 2,5 (3)	101 ± 2,0 (3)
	10 uM	103 ± 9,0 (3)	108 ± 5,0 (3)
	30 uM	100 ± 5,0 (3)	108 ± 5,1 (3)
Trifluorperazina	10 uM	92 ± 5,5 (3)	93 ± 6,4 (3)
	50 uM	54 ± 9,2 (4)**	52 ± 9,5 (4)**
NaF	10 mM	5 ± 1,5 (3)*	7 ± 0,5 (3)*
	20 mM	1 ± 0,0 (3)*	1 ± 0,0 (3)*
HgCl ₂	10 uM	36 ± 4,1 (3)*	35 ± 3,2 (3)*

Os valores representam a média ± desvio padrão dos percentuais de atividades obtidas em experimentos com diferentes preparações de sarcolema. Os valores entre parênteses representam

o número de experimentos considerados para a média. Os valores controle (100%) são: $1270 \pm 70,1$ e $230 \pm 40,0$ nmol Pi/min/mg de proteína para ATP e ADP, respectivamente.

Os inibidores testados foram pré-incubados por 10 minutos à 37°C com a fração sarcolemal nas mesmas condições descritas em Material e Métodos.

Valinomicina e Nifedipina foram preparadas em uma solução de acetona e etanol concentrado, respectivamente; estes ficaram em uma concentração final de 1% no meio de reação. A acetona e etanol a 1% não promoveram inibição das atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica.

As diferenças foram estatisticamente significantes em relação ao controle (100%) ao nível de:

* $P < 0.01$ ou

** $P < 0.05$

TABELA 9. Efeito de metais pesados sobre a atividade ATP-difosfohidrolásica.

Metais pesados	concentração (uM)	% inibição Ca ²⁺ -ATPase	% inibição Ca ²⁺ -ADPase
HgCl ₂	1	63 ± 2,9	64 ± 2,5
	10	64 ± 4,1	65 ± 3,2
	100	67 ± 3,5	67 ± 4,2
ZnCl ₂	100	50 ± 4,5	47 ± 4,3
	500	82 ± 7,3	78 ± 6,8
	1500	88 ± 7,5	92 ± 8,1
CdCl ₂	100	32 ± 2,3	33 ± 2,5
	500	73 ± 6,4	77 ± 6,7
	1500	82 ± 7,6	84 ± 7,2
AlCl ₃	100	11 ± 1,8	12 ± 1,9
	500	15 ± 2,1	19 ± 2,3
	1500	25 ± 3,7	34 ± 4,2

Os valores representam a média ± desvio padrão dos percentuais da atividade obtidos em três experimentos com diferentes preparações de sarcolema. Os valores controles (100%) são: 1230 ± 58,7 e 228 ± 35,2 nmol de Pi/min/mg de proteína para as atividades Ca²⁺-ATPásica e Ca²⁺-ADPásica, respectivamente.

4. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho caracterizam uma ATP-difosfohidrolase em membrana plasmática de célula cardíaca de ratos (sarcolema), que está envolvida na hidrólise do ATP e ADP até AMP. Uma vez que, a maior fonte de adenosina coronariana no coração em estado fisiológico normal é proveniente de cardiomiócitos (Kroll, 1987; Borst, 1991) pela ação de uma 5'-nucleotidase, o estudo desta enzima pode contribuir para a compreensão dos mecanismos da degradação extracelular dos nucleotídeos da adenina em células cardíacas.

4.1 Preparação da Fração Sarcolemal.

As condições de homogeneidade e integridade da fração sarcolemal constituem um parâmetro importante a ser considerado, uma vez que este método empregado para isolar membrana plasmática de célula cardíaca, não havia sido utilizado em nosso laboratório até a execução deste trabalho.

A fração sarcolemal, isolada de ventrículos cardíaco de ratos por centrifugação diferencial, apresentou-se enriquecida na atividade ATP-difosfohidrolásica. Analisando as diferentes frações mostradas na TABELA 1 observamos que, a fração sarcolemal apresenta um fator de purificação, em relação ao homogeneizado total, de 10,1 e 9,5 para as atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica, respectivamente. Baseado nos resultados obtidos na

marcação bioquímica TABELA 2, esta fração corresponde a membrana plasmática da célula cardíaca (sarcolema) e apresenta uma contaminação mínima com organelas subcelulares.

4.2 Localização da atividade ATP-difosfoidrolase

A fração sarcolemal apresenta um enriquecimento com Na^+, K^+ -ATPase e 5'-nucleotidase (TABELA 2), que são enzimas marcadoras de membrana plasmática. Estes resultados em conjunto com o procedimento descrito por Stefanovic et al (1974), mostrados na TABELA 3, podemos dizer que a enzima está ligada a membrana plasmática da célula cardíaca. Resultados conclusivos e definitivos foram obtidos na citoquímica por microscopia eletrônica mostrando a localização da ATP-difosfoidrolase nas vesículas da fração sarcolemal obtidas de ventrículos cardíacos de ratos (FIGURAS 1a, 1b e 1c). Para determinarmos se a ATP-difosfoidrolase da membrana plasmática é uma ecto-enzima é necessário uma análise microscópica mais elaborada que será feita posteriormente.

4.3 Atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica na fração sarcolemal de ventrículos cardíaco de ratos.

Trabalhos realizados com membrana plasmática de célula cardíaca demonstram atividades capazes de hidrolisar ATP, sendo classificadas, em vários casos como ATPases (Tuana e Dhalla, 1982; Zhao e Dhalla, 1988; Zhao e Dhalla, 1991). Estas atividades, porém, são capazes de hidrolisar também o ADP. De Vente et al. (1984) caracterizaram uma "ADPase", porém esta

atividade não hidrolisa somente o ADP e além disso, esta enzima, não é classificada pela IUB (International Union of Biochemistry). Estas atividades ATPásicas além de hidrolisarem ATP e ADP, apresentaram outras características de apirase, tais como: a) ampla especificidade para nucleosídeos di e trifosfatados; b) ativadas por Ca^{2+} e Mg^{2+} e menos efetivas frente a outros íons como Mn^{2+} , Co^{2+} e Zn^{2+} ; c) inibidas por azida (5, 10 e 20 mM) e insensíveis ao verapamil; d) inibidas por metais pesados como mercúrio, alumínio, zinco e cádmio. Estes resultados nos permitiram fazer uma série de comparações ao longo deste trabalho, entre as atividades enzimáticas descritas por estes autores e a atividade por nós caracterizada. Estes dados indicam, que, pelo menos parte destas atividades se deve a uma ATP-difosfohidrolase, uma vez que esta enzima é capaz de promover a hidrólise do ATP e do ADP até adenosina em uma sequência multienzimática com uma 5'-nucleotidase (Naito e Lowenstein, 1985).

De acordo com as atividades ATP-difosfohidrolásicas descritas em mamíferos (Le Bel et al, 1980; Knowles et al, 1983; Laliberté e Beaudoin, 1983; Schadeck et al, 1989; Battastini et al, 1991; Moodie et al, 1991; Pieber et al, 1991; Yagi et al, 1991; Côté et al, 1992; Picher et al, 1993), insetos (Ribeiro et al, 1989, 1990, 1991) e parasita sanguíneo (Vasconcelos et al, 1993) a fração sarcolemal obtida de ventrículos cardíacos de ratos mostrou-se capaz de remover os fosfatos lábeis do ATP e ADP (TABELA 6). Esta atividade é então, característica de apirases, conforme definido por Meyerhof (1945).

Para estudarmos a atividade ATP-difosfohidrolásica em sarcolema foi feita a padronização das condições de incubação da enzima como: concentração de proteína, tempo de incubação, pH ótimo, concentração de substrato e cátion (Ca^{2+}). Com relação a concentração de proteína, a reação foi linear entre 0.2 e 1.6 μg de proteína para as atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica (FIGURA 2). A reação foi linear em relação ao tempo, entre 5 e 60 minutos para ambos os substratos (FIGURA 3). Foram utilizados os tempos de 10 minutos para determinação das atividades Ca^{2+} -ATPásica e 20 minutos para as atividades Ca^{2+} -ADPásica, porque nestas condições limitamos o percentual de hidrólise abaixo dos 10% para os dois nucleotídeos, assegurando desta forma a linearidade da reação mesmo em baixas concentrações de substrato. O pH ótimo foi encontrado entre os valores de 7,5 e 8,0 para as atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica (FIGURA 6). A concentração adequada de substrato para ambas as atividades de hidrólise foi de 1,0 mM (FIGURA 4). Com uma concentração de 1,5 mM de cálcio a velocidade já era máxima para ambos os substratos, sendo esta a condição utilizada para os demais experimentos deste trabalho (FIGURA 5). Observou-se um paralelismo em relação a todas as reações de padronização da atividade ATP-difosfohidrolásica. Este comportamento paralelo para as atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica é uma constante nos resultados discutidos a seguir.

Foi demonstrado que o EGTA, como quelante, inibiu as atividades ATPásica e ADPásica residuais dependentes de íons

endógenos contaminantes. Com 20 μ M de EGTA houve remoção total de ambas as atividades que retornam a atividade inicial quando acrescentamos 1,5 mM de cálcio, mostrando que a inibição se deve a falta íons e não a um efeito do agente quelante sobre a atividade enzimática (FIGURA 7). Concentrações crescentes de cálcio aumentaram estas atividades (FIGURAS 8a e 8b) mostrando a dependência da enzima ao cálcio e possivelmente à formação do melhor substrato, o complexo cálcio-nucleotídeo. Este complexo foi demonstrado por Lalibertè e Beaudoin (1983), como um dos melhores substratos para a atividade ATP-difosfohidrolásica em membranas de grânulos de zimogênio de pâncreas de porco.

4.4 Propriedades cinéticas.

As atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica estudadas neste trabalho apresentaram um comportamento cinético similar a outras apirases de origem vegetal ou animal (Le Bel et al, 1980; Tognoli e Marré, 1981; Knowles et al, 1983; Valenzuela et al, 1989; Battastini et al, 1991; Pieber et al, 1991; Sarkis e Salto, 1991; Yagi et al, 1991; Côté et al, 1992; Frassetto et al, 1994), no que se refere aos valores de K_m e dependência de cátions divalentes (Ca^{2+} ou Mg^{2+}).

As curvas de cálcio, mostradas nas FIGURAS 8a e 8b exibem um padrão cinético típico "michaeliano" para as atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica. A partir destes resultados calculou-se os valores de K_a aparente e velocidade máxima, para cálcio, pelo método de Lineweaver-Burck, como mostra a FIGURA 9. Também foram feitas curvas de substrato para os nucleotídeos ATP e ADP na

presença de íons cálcio como mostram as FIGURAS 10a e 10b, a enzima exibe uma cinética hiperbólica e observa-se um paralelismo entre as duas atividades. Os valores de Km aparente e velocidade máxima foram determinados pelo mesmo método e os gráficos obtidos são mostrados na FIGURA 11 para os substratos Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP. Com relação ao valor de Km para ADP, na presença de íons cálcio, é importante observar que o valor obtido é semelhante ao valor encontrado por De Vente et al. (1984) para uma "ADPase" descrita em sarcolema de coração de ratos. Por outro lado, também é interessante salientar que valores de Km semelhantes para os dois substratos (FIGURA 11) têm sido considerado uma característica de apirases (Le Bel et al, 1980; Knowles et al, 1983; Laliberte et al, 1983; Battastini et al, 1991; Pieber et al, 1991; Frassetto et al, 1994). A atividade ATP-difosfohidrolase foi totalmente ativada pelo cálcio ou magnésio, entretanto cátions divalentes como manganês e cobalto foram menos efetivos para ativar a enzima, como pode ser visto na TABELA 4. Resultados semelhantes foram obtidos por De Vente et al (1984) ao caracterizarem uma atividade ADPásica, Zhao e Dhalla (1988) e Zhao et al (1991) ao caracterizar e purificar uma atividade Ca^{2+} ou Mg^{2+} -ATPase em membrana plasmática de coração de ratos.

4.5 Especificidade pelo substrato

Com relação a especificidade pelo substrato, a TABELA 6 mostra que a fração sarcolemal foi capaz de hidrolisar todos os nucleosídeos di- e trifosfatados. É importante colocar que, Zhao e Dhalla (1988) caracterizaram e Tuana e Dhalla (1982)

purificaram e caracterizaram uma Ca^{2+} -ATPase em membrana plasmática de coração de ratos, a qual apresentava uma ampla especificidade frente a diferentes nucleotídeos, inclusive ATP e ADP. A atividade específica de hidrólise para os nucleotídeos ATP e ADP, com a enzima purificada 4,7 vezes, são bastante semelhantes aos nossos resultados. Nagy et al (1986) caracterizaram uma ecto-ATPase em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos. No mesmo ano Grondal e Zimmermann trabalhando com sinaptossomas colinérgicos de órgão elétrico de Torpedo marmorata caracterizaram uma ecto-atividade enzimática a qual se referiram como uma NTPase (nucleosídeo trifosfatase) em função da especificidade por nucleotídeos. Desta mesma forma se referiram Juul et al (1991) ao caracterizarem em artéria mesentérica de ratos uma atividade enzimática com as mesmas características. Este dado é de grande importância, uma vez que atividades enzimáticas capazes de hidrolisar outros nucleosídeos, di- e trifosfatados, além do ATP são definidas como ATP-difosfohidrolase e não ATPases ou até mesmo NTPases, como vem sendo descrito por estes autores.

4.6 Exclusão de associações enzimáticas

As associações enzimáticas que poderiam estar simulando os resultados característicos de uma ATP-difosfohidrolase (vide 3.3.5) foram investigadas.

A combinação de uma atividade ATPásica e uma atividade ADPásica foi excluída por várias evidências. A primeira evidência a ser considerada foi o paralelismo observado entre as atividades

Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica ao longo deste trabalho. Uma segunda evidência foi o critério cinético descrito por Dixon e Webb (1979), quando foram incubados simultaneamente Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP, na mesma concentração no meio de reação (TABELA 5). Este critério cinético é utilizado para determinar se dois substratos competem por um mesmo sítio ativo. Se o valor de velocidade obtido na incubação simultânea dos dois substratos aproxima-se da média aritmética das velocidades obtidas separadamente para cada um dos substratos, é um indicativo de que ambos os substratos devem estar competindo por um mesmo sítio catalítico. Se duas atividades enzimáticas distintas estivessem presentes seria esperado que a velocidade da reação, com a incubação simultânea dos substratos, apresentasse um valor igual ou muito próximo ao somatório das velocidades medidas separadamente para cada um dos substratos. Observando este critério cinético, os resultados da TABELA 5 apontam para a primeira hipótese. Persistiu entretanto, a possibilidade de que duas enzimas estivessem presentes e apresentassem inibição cruzada pelos substratos, possibilidade apontada por Tognoli e Marré (1981), ao estudar a pirase de fração microssomal de plantas. O paralelismo observado para as atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica, nas diversas abordagens deste trabalho, é um indicativo contra esta possibilidade. No entanto, estudos posteriores com a enzima purificada na presença de substratos com adequada marcação radioativa, deverão esclarecer melhor esta questão. A terceira evidência para a exclusão de associação entre ATPase e "ADPase" foi observada com o estudo das referidas

atividades na presença de inibidores específicos de ATPases (TABELA 7), os quais, como será discutido posteriormente, não afetaram a hidrólise dos substratos Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP. Por outro lado, mesmo quando foi observado algum efeito inibitório, este não foi suficientemente grande para justificar a participação exclusiva de uma ATPase na hidrólise do ATP.

A segunda associação enzimática que poderia mimetizar uma ATP-difosfohidrolase foi a de uma atividade ATP-pirofosfohidrolásica combinada a uma atividade pirofosfatásica. Esta associação somente seria possível se a fração sarcolemal fosse capaz de hidrolisar o pirofosfato inorgânico nas condições descritas para medir as atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica. Uma vez que, não detectamos hidrólise do PPI (TABELA 6), esta possibilidade foi excluída. A ausência de atividade pirofosfatásica era esperada, pois o cálcio na concentração final de 1,5 mM é inibidor desta atividade (Bailey e Webb, 1944). É importante salientar que a presença de tal associação explicaria somente a hidrólise do ATP e não explicaria a hidrólise do ADP.

A terceira associação enzimática investigada, que poderia simular uma ATP-difosfohidrolase, foi a de uma adenilato quinase e uma ATPase. Esta associação foi estudada na presença de um "ATP-trapping system". Neste experimento foi adicionado ao meio de incubação um sistema enzimático capaz de utilizar o ATP produzido a partir de ADP, evitando o acúmulo de ATP e consequente formação de Pi no meio de incubação (Vara e Serrano, 1981; Tognoli e Marré, 1981; Yagi et al, 1991; Vasconcelos et al, (1993). Pelo resultado mostrado na TABELA 6 podemos observar que

a hidrólise do ADP não foi alterada quando comparado na presença de um "ATP-trapping system", indicando que nestas condições o ADP provavelmente não está sendo utilizado como substrato por uma adenilato quinase. Este resultado foi confirmado pela adição de Ap5A, potente inibidor da adenilato quinase (Lienhard e Secemski, 1973), pois não alterou a velocidade de hidrólise dos dois substratos na presença de íons cálcio (TABELA 7). A atividade "ADPásica" caracterizada por De Vente et al. (1984), em fração sarcolemal, demonstrou que 26% dessa atividade se devia a uma adenilato quinase. Esta atividade foi determinada na presença de íons magnésio. Estes autores não se preocuparam em determinar a atividade enzimática na presença de íons cálcio, uma vez que dados da literatura demonstram que a adenilato quinase é mais ativa na presença de íons magnésio (Novikoff et al, 1952; Battastini et al, 1991). Os resultados acima discutidos nos permitiram demonstrar que não há participação de uma adenilato quinase na hidrólise do ADP. Portanto, na presença de íons cálcio, fica excluída a possível associação enzimática ATPase/adenilato quinase.

A participação de fosfatases inespecíficas na hidrólise do Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP foram também excluídas, pois a fração sarcolemal não hidrolisa os vários ésteres de fosfatos, quando estes foram testados como substrato (TABELA 6). Esta possibilidade também foi eliminada quando usamos o levamisole, um inibidor de fosfatases, em especial fosfatase alcalina (Van Belle, 1972; Richardson et al, 1982). Este não interferiu nas atividades de hidrólise dos dois substratos (TABELA 7). Observou-

se uma pequena participação de uma 5'-nucleotidase, na produção de Pi, quando AMP foi incubado como substrato (TABELA 6). Naito e Lowenstein (1985) demonstraram que o ATP e o ADP são inibidores da 5'-nucleotidase purificada de membrana plasmática de coração de ratos, com um K_I de 17 μ M. Como o valor da constante de inibição é muito baixo, a enzima seria inibida pelo ATP ou o ADP. Uma vez que, a atividade ATP-difosfoidrolásica foi determinada com uma concentração de 1.0 mM de nucleotídeo. Portanto, exclui-se a participação de uma 5'-nucleotidase na produção de Pi no meio de incubação utilizado para determinar a atividade ATP-difosfoidrolásica.

4.7 Efeito de Inibidores.

No estudo de ATP-difosfoidrolases a utilização de inibidores tem sido importante na montagem de um protocolo para diferenciar esta atividade de várias ATPases conhecidas (Valenzuela et al, 1989; Battastini et al, 1991; Pieber et al, 1991; Sarkis e Salto, 1991; Yagi et al, 1991; Côté et al, 1992, 1992a; Picher et al, 1993; Frassetto et al, 1994). Além disso, um comportamento paralelo de inibição, com relação à hidrólise dos substratos Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP, constitui uma importante evidência que estes são hidrolisados por uma mesma enzima, uma ATP-difosfoidrolase (Le Bel et al, 1980; Knowles et al, 1983; Valenzuela et al, 1989; Battastini et al, 1991; Pieber et, 1991; Sarkis e Salto, 1991; Yagi et al, 1991; Côté et al, 1992, 1992a; Picher et al, 1993; Frassetto et al, 1994).

Como pode ser observado pelos resultados da TABELA 7, os

inibidores (oligomicina, ouabaína, vanadato, lantânio e NEM) de diversas classes de ATPases, um inibidor de fosfatase alcalina (levamisole) e um inibidor de adenilato quinase (Ap5A) não exerceram qualquer efeito sobre as atividades Ca^{2+} -ATPásica e Ca^{2+} -ADPásica. Com relação ao ativador de ATPase mitocondrial 2,4-dinitrofenol (DNP), podemos observar que o mesmo não afetou a hidrólise dos dois substratos. Além disso, a azida sódica, a qual em baixas concentrações inibe totalmente a F1-ATPase mitocondrial (Bowman et al, 1978), exerceu um efeito inibitório significativo e paralelo sobre as duas atividades somente nas concentrações mais altas (10 e 20 mM). Estas concentrações foram descritas na literatura como inibidoras de apirases de pâncreas de porco (LeBel et al, 1980), fígado e cérebro de camundongo, rins de cão e alguns tipos de células tumorais (Knowles et al, 1983), aorta bovina (Miura et al, 1987), microssoma de plantas e glândula mamária e salivar e útero de ratas (Valenzuela et al, 1989), aorta bovina (Côté et al, 1992) e pulmão bovino (Picher et al, 1993). O pequeno efeito inibitório, porém não significativo (cerca de 10 %), promovido pela azida sobre a atividade da enzima, na concentração de 5 mM, pode ser atribuído a pequena contaminação da nossa preparação por mitocôndrias, como pode ser observado na TABELA 2. Em nosso laboratório também foi demonstrado que a azida causa uma inibição significativa e paralela na atividade de hidrólise tanto do Ca^{2+} -ATP como do Ca^{2+} -ADP, quando testada em concentrações acima de 10 mM (Battastini et al, 1991; Frassetto et al, 1994). Como pode ser visto acima, vários inibidores de ATPases não afetaram a

hidrólise do ATP, sugerindo que estas ATPases não estão envolvidas na hidrólise do mesmo. Entretanto, não se pode excluir a possibilidade da participação de uma ATPase insensível a estes inibidores na hidrólise do ATP.

Os inibidores inespecíficos (TABELA 8), verapamil, D₆₀₀ e nifedipina, bloqueadores de canal de cálcio (Fleckenstein, 1983; Lee e Tsien, 1983), e valinomicina um ativador da bomba de cálcio sarcolemal (Kuwayama, 1988), não produziram efeitos sobre as atividades de hidrólise de ambos os substratos. Demonstrando que a atividade da enzima não tem como contaminante uma Ca²⁺ + Mg²⁺-ATPase sarcolemal. Thapsigargina, um inibidor específico da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático em concentrações subnanomolares (Sagara e Inesi, 1991; Inesi e Sagara, 1992), também não alterou a hidrólise dos dois substratos. Este inibidor é específico para a bomba de cálcio de retículo e não atua sobre bomba de cálcio de membrana plasmática (Sagara e Inesi, 1991) nem sobre Na⁺,K⁺-ATPase (Lytton et al, 1991). Com este resultado demonstramos que nossa preparação provavelmente não está contaminada por uma Ca²⁺+ Mg²⁺-ATPase (bomba de cálcio) de retículo endoplasmático. A trifluorperazina, um inibidor de processos Ca²⁺-calmodulina-dependentes (Levin e Weiss, 1978; Nagy et al, 1986; Zhao e Dhalla, 1988), mostrou-se sem efeito em baixas concentrações. Porém em concentrações maiores causou uma inibição significativa e paralela na hidrólise dos dois substratos da enzima. Resultados semelhantes já tinham sido descritos por Battastini et al, (1991) em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos. Considerando, que a trifluorperazina é um

composto hidrofóbico e capaz de exercer um efeito de fluidez sobre a membrana da célula (Seeman, 1977), é possível que possa afetar a ATP-difosfohidrolase sarcolemal por alterar o microambiente da enzima de alguma maneira não específica. O fluoreto de potássio e o cloreto de mercúrio causaram uma inibição bastante acentuada nas atividades de hidrólise tanto do Ca^{2+} -ATP como do Ca^{2+} -ADP. O fluoreto está descrito como inibidor, embora não específico, de ATPases de células vegetais e animais (LeBel et al, 1980; Knowles et al, 1983; Valenzuela et al, 1989; Battastini et al 1991; Côté et al, 1992); assim como o cloreto de mercúrio em baixas concentrações (Côté et al, 1992; Picher et al, 1993). Este efeito inibitório sobre as duas atividades constitui uma importante evidência para sustentar a hipótese de que uma única enzima está envolvida na hidrólise dos dois nucleotídeos, uma vez que três diferentes e inespecíficos inibidores causaram uma diminuição paralela na atividade enzimática.

Com relação ao efeito de inibidores, é importante salientar que, resultados semelhantes foram encontrados por Zhao e Dhalla ao caracterizar (1988) e purificar (1991) uma atividade Ca^{2+} ou Mg^{2+} -ATPase de membrana plasmática de célula cardíaca. Estas atividades enzimática foram inibidas por azida na concentração de 10 mM e por trifluorperazina nas concentrações de 10, 20 e 50 μM . Não foram inibidas por inibidores clássicos de ATPase como vanadato, oligomicina, ouabaína e nem por verapamil.

A inibição da ATP-difosfohidrolase por metais pesados são mostrados na TABELA 9. Um grande número de trabalhos demonstram

os efeitos tóxicos de metais pesados sobre os Sistemas Nervoso Central e Renal, mas pouco se sabe dos seus efeitos e mecanismos moleculares de sua ação no Sistema Cardiovascular. A inibição da ATP-difosfohidrolase, por estes metais, em sinaptossomas de córtex cerebral de ratos, tem sido bem investigada em nosso laboratório. Oliveira et al (1994) demonstraram que o cloreto de mercúrio inibe a atividade da enzima, em ratos jovens de diferentes idades. Porém a inibição por este metal na fração sarcolemal foi bem mais acentuada, quando comparada aos resultados obtidos com sinaptossomas. Os percentuais de inibição foram muito semelhantes aos demonstrados por Côté et al (1992) para ATP-difosfohidrolase de aorta bovina, onde o cloreto de mercúrio foi um potente e irreversível inibidor para ambos os substratos da enzima. Neste trabalho os autores mostram que, 10 μ M de cloreto de mercúrio inibe 64 % da atividade da enzima, concentrações maiores do metal não aumentam o percentual de inibição (foram testados até 50 μ M de cloreto de mercúrio). Este resultado foi muito semelhante aos demonstrados na TABELA 6. Schetinger (1991) mostrou que o cloreto de alumínio inibe a ATP-difosfohidrolase com IC_{50} de 5.0 mM e Barcellos et al (1994) mostraram que o acetato de cádmio inibe a enzima com IC_{50} de 0.20 mM. Os resultados encontrados para fração sarcolemal, também demonstram o cloreto de zinco e cloreto de cádmio como inibidores mais efetivos que cloreto de alumínio para ambos os substratos da enzima. Zhao e Dhalla (1988 e 1991) também mostram que Ca^{2+} ou Mg^{2+} -ATPase de membrana plasmática de coração de ratos foi inibida por cádmio e zinco.

Um mesmo perfil de inibição foi observado para os substratos

Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP. Estes dados demonstram que provavelmente um único sítio catalítico é responsável pela hidrólise dos dois substratos, portanto são hidrolisados por uma única enzima, uma ATP-difosfohidrolase.

5. CONCLUSÕES

Os dados apresentados, neste trabalho, nos permitem concluir que:

5.1 A técnica de preparo da fração sarcolemal por centrifugação diferencial apresenta condições de homogeneidade e integridade comparáveis ao método original, descrito por Velema e Zaagsma (1981), podendo tornar-se, portanto, um método de uso rotineiro neste laboratório.

5.2 A fração sarcolemal apresenta atividade de hidrólise do ATP e ADP que é devido a uma ATP-difosfoidrolase.

5.3 O paralelismo observado na atividade de hidrólise dos dois nucleotídeos reforçam a hipótese de que uma única enzima é responsável pela hidrólise Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP.

5.4 A atividade enzimática é dependente de íons cálcio ou magnésio, sendo menos efetiva frente a outro íons.

5.5 A atividade ATP-difosfoidrolásica mostrou um comportamento cinético semelhante ao descrito para outras ATP-difosfoidrolases de origem vegetal e animal no que se refere à pH ótimo, dependência iônica, especificidade para substratos e K_m para os complexos Ca^{2+} -ATP e Ca^{2+} -ADP.

5.6 A atividade ATP-difosfoidrolásica mostrou insensibilidade a inibidores de diferentes classes de ATPases tais como: oligomicina (inibidor de ATPase mitocondrial); ouabaína (inibidor de Na^+ , K^+ -ATPase); vanadato, NEM e lantânio (inibidores de Ca^{2+}

Mg²⁺-ATPase). Além disso, não foi afetada também por dinitrofenol (ativador de ATPase mitocondrial), levamisole (inibidor de fosfatases) e Ap5A (inibidor de adenilato quinase). Por outro lado, quando houve efeito inibitório significativo (fluoreto, trifluorperazina, azida, cloreto de mercúrio e outros metais pesados), o mesmo foi paralelo para as duas atividades enzimáticas.

5.4 Os dados deste trabalho demonstram que a atividade ATP-difosfohidrolásica é uma enzima ligada a membrana plasmática da célula cardíaca. A possibilidade de se tratar de uma ecto-enzima, necessita de uma análise mais detalhada com microscopia eletrônica.

O estudo desta atividade enzimática poderá contribuir para o entendimento dos mecanismos de degradação de ATP e ADP, o processo de formação de adenosina e todos os controles resultantes do desaparecimento dos nucleotídeos e consequente aparecimento do nucleosídeo (adenosina).

6. BIBLIOGRAFIA

- Aboud LG, K Koketsu, S Miyamoto (1962). Outflux of various phosphates during membrane depolarization of excitable tissues. *Am J Physiol* 202: 469-474.
- Ando T, K Fujimoto, H Miyajima, K Ogawa (1981). A new one-step method for the histochemistry and cytochemistry of Ca-ATPase activity. *Acta Histochem Cytochem* 14: 705-726.
- Anich M, N Fanta, M Mancilla, AM Kettlun, MA Valenzuela, A Traverso-Cori (1990). Apyrase activity and changes in metabolites during germination and tuberization of Solanum tuberosum. *Phytochemistry* 29: 1411-1415.
- Bailey K, EC Webb (1944). Purification and properties of yeast pyrophosphatase. *Biochem J* 38: 394-398.
- Barcellos CK, MRC Schetinger, AMO Battastini, LB Silva, RD Dias, JJJ Sarkis (1994). Inhibitory effect of cadmium acetate on synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5; apyrase) from adult rat cerebral cortex. *Braz J Med Biol Res* 27: 1111-1115.
- Battastini AMO, JBT da Rocha, CK Barcellos, RD Dias, JJJ Sarkis (1991). Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem Res* 16: 1303-1310.
- Baker PF, HG Glitsch (1973). Does metabolic energy participate directly in the Na⁺-dependent extrusion of Ca²⁺ ions from squid giant axons? *J Physiol (London)* 233: 44P-46P.
- Besch HR, LR Jones, AM Watanabe (1976). Intact vesicles of canine cardiac sarcolemma. Evidence from vectorial properties of Na⁺,K⁺-ATPase. *Circulation Research* 39: 586-595.
- Berne RM (1980). The role of adenosine in the regulation of coronary blood flow. *Circulation Research* 47: 807-813.
- Borst MM, J Schrader (1991). Adenine nucleotide release from isolated perfused guinea pig hearts and extracellular formation of adenosine. *Circulation Research* 68: 797-806.
- Bowman BJ, SE Mainzer, KE Allen, CW Slayman (1978). Effects of inhibitors on the plasma membrane and mitochondrial adenosine triphosphatases of Neurospora crassa. *Biochem Biophys Acta* 512: 13-28.

- Brodin P, R Falchetto, T Vorherr, E Carafoli (1992). Identification of two domains which mediate the binding of activating phospholipids to the plasma-membrane Ca^{2+} pump. *Eur J Biochem* 204: 939-946.
- Burnstock G (1978). In Cell membrane receptors for drugs and hormones. Straub RW & Bolis L eds. Raven Press, New York, 107-118.
- Burnstock G (1985). Purinergic mechanisms broaden their sphere of influence. *Trends in Neurosciences* 8: 5-6.
- Burnstock G, C Kennedy (1985). Is there a basis for distinguishing two types of P_2 purinoceptor? *General Pharmacol* 16: 433-440.
- Burnstock G (1990). Purinergic Mechanisms. *Ann of the N Y Acad of Sci* 603: 1-18.
- Cantley LC, LA Cantley, L Josephson (1978). A characterization of vanadate interactions with the $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{-ATPase}$. *J Biol Chem* 253: 7361-7368.
- Carafoli E (1988). Intracellular calcium regulation, with special attention to the role of the plasma membrane calcium pump. *J Cardiovasc Pharmacol* 12 (Supp 3).
- Carafoli E (1992). The Ca^{2+} pump of the plasma membrane. *J Biol Chem* 267: 2115-2118.
- Caroni P, E Carafoli (1980). An ATP-dependent Ca^{2+} -pumping system in dog heart sarcolemma. *Nature* 283: 765-767.
- Caroni P, E Carafoli (1981). The Ca^{2+} -pumping ATPase of heart sarcolemma. *J Biol Chem* 256: 3263-3270.
- Caroni P, L Reinlib, E Carafoli (1980). Charge movements during the $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchange in heart sarcolemmal vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 6354-6358.
- Caroni P, M Zurini, A Clark, E Carafoli (1983). Further characterization and reconstitution of the purified Ca^{2+} -pumping ATPase of heart sarcolemma. *J Biol Chem* 258: 7305-7310.
- Chamberlain BK, P Volpe, S Fleischer (1984a). Calcium-induced calcium release from purified cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Biol Chem* 259: 7540-7546.
- Chamberlain BK, P Volpe, S Fleischer (1984b). Inhibition of calcium-induced calcium release from purified cardiac sarcoplasmic reticulum vesicles. *J Biol Chem* 259: 7547-7553.

- Chiesi M, MM Ho, G Inesi, AV Somlyo, AP Somlyo (1981). Primary role of sarcoplasmic reticulum in phasic contractile activation of cardiac myocytes with shunted myolemma. *J Cell Biol* 91: 728-742.
- Clemens MG, T Forrester (1980). Appearance of adenosine triphosphate in the coronary sinus effluent from isolated working rat heart in response to hypoxia. *J Physiol* (London) 312: 143-158.
- Clemo HF, L Belardinelli (1986). Effect of adenosine on atrioventricular conduction. II. Modulation of atrioventricular node transmission by adenosine in hypoxic isolated guinea pig hearts. *Circulation Research* 59: 437-446.
- Colyer J, JH Wang (1991). Dependence of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium pump activity on the phosphorylation status of phospholamban. *J Biol Chem* 266: 17486-17493.
- Cooper DR, GP Lewis, GE Lieberman, H Webb, J Westwick (1979). ADP metabolism in vascular tissue, a possible thrombo-regulatory mechanism. *Thrombos Res* 14: 901-914.
- Côté YP, M Picher, P St-Jean, R Béliveau, M Potier, AR Beaudoin (1991). Identification and localization of ATP-dihosphohydrolase (apyrase) in bovine aorta: relevance to vascular tone and platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta* 1078: 187-191.
- Côté YP, S Ouellet, AR Beaudoin (1992). Kinetic properties of type-II ATP diphosphohydrolase from the tunica media of the bovine aorta. *Biochim Biophys Acta* 1160: 246-250.
- Côté YP, JG Filep, B Battistini, J Gauvreau, P Sirois, AR Beaudoin (1992a). Characterization of ATP-diphosphohydrolase activities in the intima and media of the bovine aorta: evidence for a regulatory role in platelet activation in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1139: 133-142.
- Cronstein BN, RI Levin, J Belanoff, G Weissmann, R Hirschhorn (1986). Adenosine: An endogenous inhibitor of neutrophil-mediated injury to endothelial cells. *J Clin Invest* 78: 760-770.
- Darius H, GL Stahl, AM Lefer (1987). Pharmacologic of ATP from isolated rat hearts in response to vasoconstrictor stimuli using a continuous flow technique. *J Pharmac Exp Ther* 240: 542-547.

- Del Campo G, J Puente, MA Valenzuela, A Traverso-Cori, O Cori (1977). Hydrolysis of synthetic pyrophosphoric esters by an isoenzyme of apyrase from Solanum tuberosum. *Biochem J* 167: 525-529.
- De Mello WC (1982). Intercellular Communication in Cardiac Muscle. *Circulation Research* 51: 1-9.
- Detwiler TC, RD Feinman (1973). Kinetics of the thrombin-induced release of adenosine triphosphate by platelets. Comparison with release of calcium. *Biochemistry* 12: 2462-2468.
- De Vente J, J Velema, J Zaagsma (1984). Properties and subcellular localization of adenosine diphosphatase in rat heart. *Arch Biochem Biophys* 233: 180-187.
- Dhalla NS, SL Lee (1976). Comparison of the actions of acebutolol, practolol and propranolol on calcium transport by heart microsomes and mitochondria. *Br J Pharmacol* 57: 215-221.
- Dhalla NS, A Ziegelhoffer, JAC Harrow (1977). Regulatory role of membrane systems in heart function. *Can J Physiol Pharmacol* 55: 1211-1234.
- Dhalla NS, PK Singal, V Panagia, JAC Harrow, MB Anand-Srivastava, RE Beamish (1984). Progress and problems in understanding the involvement of calcium in heart function. *Can J Physiol Pharmacol* 62: 867-873.
- DiMarco J, DT Sellar, BB Lerman (1985). Diagnostic and therapeutic use of adenosine in patients with supraventricular tachyarrhythmias. *J Am Coll Cardiol* 6: 417-425.
- DiPolo R (1976). The influence of nucleotides on calcium fluxes. *Federation Proc* 35: 2579-2582.
- Dixon M, EC Webb (1979). *Enzymes* 3rd edn., p 73-74. Academic Press, NY.
- Dobson JG, RA Fenton, FD Romano (1987). The antiadrenergic actions of adenosine in the heart. Gerlach, E & Becker, BF eds. In *Topics and Perspectives in Adenosine Research*. Berlin, Springer, 356-368.
- Dowdall MJ, AF Boyne, VP Whittaker (1974). Adenosine triphosphate a constituent of cholinergic synaptic vesicles. *Biochem J* 140: 1-12.

- Dowdall MJ (1978). Adenine nucleotides in cholinergic transmission: presynaptic aspects. *J Physiology (Paris)* 74: 497-501.
- Drury AN, A Szent-Gyorgi (1929). The physiological activity of adenine compounds with special reference to their actions upon the mammalian heart. *J Physiol (London)* 68: 213-237.
- Ebashi S, Endo M (1968). Calcium and muscle contraction. *Prog Biophys Mol Biol* 18: 123-183.
- Ehrlich YH, TB Davis, E Bock, E Kornecki, RH Lenox (1986). Ecto-protein kinase activity on the external surface of neural cells. *Nature* 320: 67-70.
- Elgavish A, GA Elgavish (1985). Evidence for the presence of an ATP transport system in brush-border membrane vesicles isolated from the kidney cortex. *Biochem Biophys Acta* 812: 595-599.
- Engler RL, MA Dahlgren, DD Morris, MA Peterson, GW Schmid-Schoenbein. Role of leucocytes in the response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *Am J Physiol* 251: H314-H323.
- Fawcett WD, NS McNutt (1969). The ultrastructure of the cat myocardium I. Ventricular Papillary Muscle. *The J of Cell Biology* 42:1-45.
- Fleckenstein A (1971). Specific inhibitors and promoters of calcium action in the excitation-contraction coupling of heart muscle and their role in the prevention or production of myocardial lesions: Calcium and the heart. Edited by P Harris and L Opie. Academic Press, Inc London p 135-188.
- Fleckenstein A (1983). History of calcium antagonists. *Circulation Research* 52(suppl I): 3-16.
- Fleetwood G, JL Gordon (1987). Purinoceptors in the rat heart. *Br J Pharmacol* 90: 219-227.
- Forrester T, CA Williams (1977). Release of adenosine triphosphate from isolated adult heart cells in response to hypoxia. *J Physiol (London)* 268: 371-390.
- Forrester T (1981). Adenosine or adenosine triphosphate? In: *Vasodilatation*, pp 229-250, Vanhoutte, PM and Leusen, I eds Raven Press, New York.
- Frassetto SS, RD Dias, JJF Sarkis (1994). Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase, EC 3.6.1.5) in rat blood platelets. *Mol Cell Biochem* In press.

- Fredholm BB, TW Dunwiddie (1988). How does adenosine inhibit transmitter release? *Trends Pharmacol Sci* 9: 130-134.
- Fried G, H Lagercrantz, T Hokfelt (1978). Improved isolation of small noradrenergic vesicles from rat seminal ducts following castration. A density gradient centrifugation and morphological study. *Neuroscience* 3: 1271-1291.
- Furchgott RF, JV Zawadzki (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376.
- Garcia-Alonso J, A Reglero, JA Cabezas (1990). Purification and properties of B-N-Acetylhexosaminidase A from pig brain. *Int J Biochem* 22: 645-651.
- Gordon JL, W Martin (1983). Stimulation of endothelial prostacyclin production plays no role in endothelium-dependent relaxation of the pig aorta. *Br J Pharmacol* 80: 179-186.
- Gordon JL (1986). Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* 233: 309-319.
- Gordon JL (1990). The effects of ATP on endothelium. *Ann of the N Y Acad of Sci* 603: 46-52.
- Griffith TM, DH Edwards, MJ Lewis, AC Newby AH Henderson (1984). The nature of the endothelium-derived relaxant factor. *Nature (London)* 308: 645-647.
- Grondal EJM, H Zimmermann (1986). Ectonucleotidase activities associated with cholinergic synaptosomes isolated from Torpedo electric organ. *J Neurochem* 47: 871-881.
- Gryglewski RJ, RMJ Palmer, S Moncada (1986). Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium derived vascular relaxing factor. *Nature* 320: 454-456.
- Gustin MC, DBP Goodman (1982). Characterization of the phosphorylated intermediate of the K^+ -ouabain-insensitive ATPase of the rabbit colon brush-border membrane. *J Biol Chem* 257: 9629-9633.
- Hamlyn JM, AE Senior (1983). Evidence that Mg^{2+} or Ca^{2+} -activated adenosine triphosphate in rat pancreas is a plasma-membrane ecto-enzyme. *Biochem J* 214: 59-68.
- Harper F, F Lamy, R Calvert (1978). Some properties of a Ca^{2+} and (or) Mg^{2+} - requiring nucleoside di- and triphosphatase(s) associated with the membranes of rat pancreatic zymogen granules. *Canadian J Biochem* 56: 565-576.

- Haworth RA, AB Goknur, DR Hunter, JO Hegge, HA Berkoff (1987). Inhibition of calcium influx in isolated adult rat heart cells by ATP depletion. *Circulation Research* 60: 586-594.
- Herbert E (1956). A study of the liberation of orthophosphate from adenosine triphosphate by the stromata of human erythrocytes. *J Cell Comp Physiol* 47: 11-36.
- Heymann D, M Reddington, GW Kreutzberg (1984). Subcellular localization of 5'-nucleotidase in rat brain. *J Neurochem* 43: 971-978.
- Holmsen I, H Holmsen (1971). Partial purification and characterization of an ADP phosphohydrolase from human plasma. *Thromb et Diathesis Haemorrhagica* XXVI: 177-191.
- Hubscher G, GR West (1965). Specific assays of some phosphatases in subcellular fraction of small intestinal mucosa. *Nature* 20: 779-780.
- Inesi G, Y Sagara (1992). Thapsigargin, a high affinity and global inhibitor of intracellular Ca^{2+} transport ATPases. *Arch Biochem Biophys* 298: 313-317.
- Israel M, B Lesbats, FM Meunier, J Stinnakre (1976). Postsynaptic release of adenosine triphosphate induced by single impulse transmitter action. *Proc R Soc London* 193(B): 461-468.
- Juul B, ME Lüscher, C Aalkjaer, L Plesner (1991). Nucleotide hydrolytic activity of isolated intact rat mesenteric small arteries. *Biochem Biophys Acta* 1067: 201-207.
- Kartz AM, DI Repke, M Tada, S Corkedale (1974). Propranolol-induced inhibition of cardiac microsomal calcium-uptake, calcium-binding, and epinephrine-stimulated adenylate cyclase. *Cardiovas Research* 8:541-549.
- Kennedy C, G Burnstock (1985). ATP produces vasodilatation via P_1 purinoceptors and vasoconstriction via P_2 purinoceptors in the isolated rabbit central ear artery. *Blood Vessel* 22: 145-155.
- Kennedy C, G Burnstock (1985a). Evidence for two types of P_2 -purinoceptors in longitudinal muscle of the rabbit portal vein. *Eur J Pharmacol* 111: 49-56.
- Kettlun AM, L Uribe, V Calvo, S Silva, J Rivera, M Mancilla, MA Valenzuela, A Traverso Cori (1982). Properties of two apyrases from Solanum tuberosum. *Phytochemistry* 21: 551-558

- Kettlun AM, M Leyton, MA Valenzuela, M Mancilla, A Traverso-Cori (1992). Identification and subcellular localization of two isoenzymes of apyrase from Solanum tuberosum. Phytochemistry 31(6): 1889-1894.
- Kitakaze M, M Hori, H Sato, S Takashima, M Inoue, A Kitabatake, T Kamada (1991). Endogenous adenosine inhibits platelet aggregation during myocardial ischemia in dogs. Circulation Research 69: 1402-1408.
- Kitazoto T, K Takeshige, S Minakami (1992). Activation of cultured bovine aortic endothelial cells by extracellular pyrimidine triphosphate. Int J Biochem 24(No 8): 1323-1327.
- Knowles AF, RE Isler, JF Reece (1983). The common occurrence of ATP diphosphohydrolase in mammalian plasma membranes. Biochem Biophys Acta 731: 88-96.
- Krishnan PS (1949). Studies on apyrases. I. Purification of potato apyrase by fractional precipitation with ammonium sulfate. Arch Biochem 20: 272.
- Kroll K, J Schrader, HM Piper, M Herinch (1987). Release of adenosine and cyclic AMP from coronary endothelium in isolated guinea pig hearts: relation to coronary flow. Circulation Research 60: 659-665.
- Kuwayama H (1988). The membrane potential modulates the ATP-dependent Ca^{2+} pump of cardiac sarcolemma. Biochem Biophys Acta 940: 295-299.
- Laliberté JF, P St-Jean, AR Beaudoin (1982). Kinetic effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} on ATP hydrolysis by the purified ATP diphosphohydrolase. J Biol Chem 257: 3869-3874.
- Laliberté JF, AR Beaudoin (1983). Sequential hydrolysis of Y- and B-phosphate groups of ATP by the ATP diphosphohydrolase from pig pancreas. Biochem Biophys Acta 742: 9-15.
- Langer GA (1968). Ion fluxes in cardiac excitation and contraction and their relation to myocardial contractility. Physiol Rev 48: 708-757.
- Lanzetta PA, LJ Alvarez, PS Reinach, OA Candia (1979). An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. Analytical Biochem 100: 95-97.
- LeBel D, GG Poirier, S Phaneuf, P St.-Jean, JF Laliberté, AR Beaudoin (1980). Characterization and purification of a calcium-sensitive ATP diphosphohydrolase from pig pancreas. J Biol Chem 255: 1227-1233.

- Lee KS, W Klaus (1971). The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of cardiac glycosides. *Pharmacol Rev* 23: 193-261.
- Lee KS, RW Tsien (1983). Mechanism of calcium channel blockade by verapamil, D600, diltiazem and nitrendipine in single dialysed heart cells. *Nature* 302: 790-794.
- Levin RM, B Weiss (1978). Specificity of the binding of trifluoperazine to the calcium-dependent activator of phosphodiesterase and to a series of other calcium-binding proteins. *Biochem Biophys Acta* 540: 197-204.
- Lieberman GE, GP Lewis (1980). Properties of vascular ADPase. *Artery* 8: 374-380.
- Lienhard GE, H Secemski (1973). p^1 - p^5 -di(adenosine-5)pentaphosphate, a potent multisubstrate inhibitor of adenylate kinase. *J Biol Chem* 248: 1121-1123.
- Lindgren CA, DO Smith (1986). Increased presynaptic ATP level coupled to synaptic activity at the crayfish neuromuscular junction. *J Neuroscience* 6:2644-2652.
- Lossnitzer K, G Pfennigsdorf, B Hans (1984). Sinopse em figuras sobre o princípio de ação dos antagonistas do cálcio. *Miocárdio Vasos Cálcio* pag 13. Knoll AG ed. MSM Medical Service, München.
- Lowry OH, NJ Rosebrough, AL Farr, RJ Randall (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Lüllmann H, T Peters, J Preuner (1983). Role of the plasmalemma for calcium homeostasis and for excitation-contraction coupling in cardiac muscle. In *Cardiac Metabolism* ed AJ Drake-Holland and MIM Noble, London: John Wiley & Sons Ltda.
- Lytton J, M Westlin, MR Hanley (1991). *J Biol Chem* 266: 17067-17071.
- McNamara DB, PV Sulakhe, JN Singh, NS Dhalla (1974). Properties of heart sarcolemmal Na^+ - K^+ ATPase. *J Biochem* 75: 795-803.
- Mazelis M (1959). Enzymatic degradation of adenosine triphosphate to adenine by cabbage leaf preparations. *Plant Physiol* 34: 153-158.
- McNutt NS (1975). Ultrastructure of the Myocardial Sarcolemma. *Circulation Research* 37: 1-13.

- Meunier FM, N Morel (1978). Adenosina uptake by cholinergic synaptosomes from Torpedo electric organ. *J Neurochem* 31: 845-851.
- Meyerhof O (1945). The origin of the reaction of Harden and Young in cell-free alcoholic fermentation. *J Biol Chem* 157: 105-119.
- Miura Y, K Hirota, Y Arai, K Yagi (1987). Purification and partial characterization of adenosine diphosphatase activity in bovine aorta microsomes. *Thromb Res* 46: 685-695
- Molnar J, L Lorand (1961). Studies on apyrases. *Arch Biochem Biophys* 93: 353-363.
- Moodie FD, H Baum, PJ Butterworth, TJ Peters (1991). Purification and characterization of bovine spleen ADPase. *Eur J Biochem* 202: 1209-1215
- Müller J, JBT Rocha, AMO Battastini, JF Sarkis, RD Dias (1993). Postnatal development of ATPase-ADPase activities in synaptosomal fraction from cerebral cortex of rats. *Neurochem Int* 23(5): 471-477.
- Murray RK, DK Granner, PA Mayes, VW Rodwell (1988). *Harper's Biochemistry*, 21st ed. Noewalk, Connecticut, San Mateo, California; Appleton & Lange.
- Nagy AK, AS Terrence, AV Delgado-Escueta (1986). Ecto-ATPase of mammalian synaptosomes: identification and enzymatic characterization *J Neurochem* 47: 976-986.
- Naito Y, JM Lowenstein (1985). 5'-nucleotidase from rat heart membranes. *Biochem J* 226: 645-651.
- Nayler WG, J Szeto (1972). Effect of verapamil on contractility, oxygen utilization, and calcium exchangeability in mammalian heart muscle. *Cardiovasc Res* 6: 120-128.
- Nayler WG (1992). Calcium, calcium antagonism, atherosclerosis, and ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 19(suppl2):S17-S21.
- Needham L, NJ Cusak, JD Pearson, JL Gordon (1987). Characteristics of the P₂ Purinoceptor that mediates prostacyclin production by pig aortic endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 184: 199-209.
- Nordlie RC, WJ Arion (1964). Evidence for the common identify of glucose-6-phosphate, inorganic pyrophosphate, and pyrophosphate-glucose-phosphotransferase. *J Biol Chem* 239: 1680-1685.

- Novikoff AB, L Hecht, E Podber, J Ryan (1952). Phosphatases of rat liver. I. The dephosphorylation of adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 194: 153-170.
- O'Connor SE, IA Dainty, P Leff (1991). Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies. *TIPS* 12: 137-141.
- Oliveira EM, JBT Rocha, JJJ Sarkis (1994). In vitro and in vivo effects of HgCl₂ on synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from cerebral cortex of developing rats. *Arch Intern de Physiol, de Bioch et de Biophy* 102: 97-102.
- Olson RE (1971). Introduction: Calcium and the heart. Edited by P. Harris and L Opie. Academic Press Inc London. p 1-23.
- Opie LH (1992). Cardiac metabolism - emergence, decline, and resurgence. Part II. *Cardiovascular Research* 26: 818-830.
- Padle BM, G Burnstock (1974). Release of ATP from perfused heart during coronary vasodilatation. *Blood Vessels* 11: 110-119.
- Pang DC, WB Weglicki (1977). Cardiac sarcolemma of the hamster enrichment of the (Na⁺+K⁺)-ATPase. *Biochem Biophys Acta* 465: 411-414.
- Papamarcaki T, O Tsolas (1990). Identification of ATP diphosphohydrolase activity in human term placenta using a novel assay for AMP. *Mol Cell Biochem* 97: 1-8.
- Pearson JD, JL Gordon (1979). Vascular endothelial and smooth muscle cells in culture selectively release adenine nucleotides. *Nature* 281: 384-386.
- Pearson JD (1985). Ectonucleotidases: measurement of activities and use of inhibitors. *Methods Pharmacol* 6: 83-107.
- Pelleg A (1985). Cardiac cellular eletrophysiologic effects of adenosine and adenosine triphosphate. *Am Heart J* 110: 688-693.
- Pershadsingh HA, JM McDonald (1980). A high affinity calcium-stimulated magnesium-dependent adenosine triphosphatase in rat adipocyte plasma membranes. *J Biol Chem* 255: 4087-4093.
- Picher M, YP Coté, R Béliveau, M Potier, AR Beaudoin (1993). Demonstration of a novel type of ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in the bovine lung. *J Biol Chem* 268: 4699-4703.
- Pieber M, MA Valenzuela, AM Kettlun, M Mancilla, E Aranda, L Collados, A Traverso-Cori (1991). ATPase-ADPase activities of rat placental tissue. *Comp Biochem Physiol* 100B: 281-285.

- Pullman ME, HS Penefsky, A Datta, E Racker (1960). Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative-phosphorylation. *J Biol Chem* 235: 3322-3329.
- Reiter M (1988). Calcium mobilization and cardiac inotropic mechanisms. *Pharmacological Reviews* 40: 189-217.
- Ribeiro JMC, ES Garcia (1980). The salivary and crop apyrase activity of Rhodnius prolixus. *Insect Physiol* 26: 303-307.
- Ribeiro JMC, JJF Sarkis, PA Rossignol, A Spielman (1984). Salivary apyrase of Aedes aegypti: characterization and secretory fate. *Comp Biochem Physiol* 79B: 81-86.
- Ribeiro JMC, G Makoul, J Levine, D Robinson, A Spielman (1985). Antihemostatic, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, Ixodes dammini. *J Exp Med* 161: 332-344.
- Ribeiro JMC, PA Rossignol, A Spielman (1985a). Salivary gland apyrase determines probing time in anopheline mosquitoes. *J Insect Physiol* 31: 689-692.
- Ribeiro JMC, PA Rossignol, A Spielman (1986). Blood-finding strategy of a capillary-feeding sandfly, Lutzomyia longipalpis. *Comp Biochem Physiol* 83A: 683-686.
- Ribeiro JMC, GB Modi, RB Tesh (1989). Salivary apyrase activity of some old world phlebotomine sandflies. *Insect Biochem* 19: 409-412.
- Ribeiro JMC, JA Vaughan, AF Azad (1990). Characterization of the salivary apyrase activity of three rodent flea species. *Comp Biochem Physiol* 95B: 215-219.
- Ribeiro JMC, TM Endris, R Endris (1991). Saliva of the tick Ornithodoros mouba contains anti-platelet and apyrase activities. *Comp Biochem Physiol* 100A: 109-112.
- Richardson DJ, GP Smith, TW Meade, P Langley, TJ Peters (1982). Assay, kinetics and properties of plasma adenosine diphosphatase. The relationship to acid and alkaline phosphatase and variations in disease. *Clinica Chemica Acta* 121: 87-94.
- Ringer S (1883). A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J Physiol (London)* 4: 29-42.
- Rocha JBT, CF Mello, JJF Sarkis, RD Dias (1990). Undernutrition during the preweaning period changes calcium ATPase and ADPase activities of synaptosomal fraction of weanling rats. *Br J Nutr* 63: 273-283.

- Rocha JBT, AMO Battastini, JJJ Sarkis, RD Dias (1990a). Effects of chronic treatment with high doses of chlorpromazine on ATP and ADP hydrolysis by synaptosomal fraction from the rat caudate nucleus. *Braz J Med Biol Res* 23: 969-973.
- Rocha JBT, AMO Battastini, JJJ Sarkis, RD Dias (1991). Effects of undernutrition during suckling on ATP and ADP hydrolysis by synaptosomes from the cerebral cortex of adult rats. *Braz J Med Biol Res* 24: 515-526.
- Rosenberg MD, J Buegel, RS Strobel (1988). Purification and characterization of nucleotide diphosphohydrolase from oviductal and seminal secretions. *J Cell Biol* 107: 178 (Abstract).
- Rothstein A, R Meier (1948). The relationship of the cell surface to metabolism. I. Phosphatases in the cell surface of living yeast cells. *J of Comparative and Cellular Physiology* 32: 77-95.
- Rovetto MJ (1985). Myocardial nucleotide transport. *Ann Rev Physiol* 47: 605-616.
- Russel PJ, JM Horenstein, L Goins, D Jones, M Laver (1974). Adenylate kinase in human tissues. *J Biol Chem* 249: 1874-1879.
- Sagara Y, G Inesi (1991). Inhibition of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} transport ATPase by Thapsigargin at subnanomolar concentrations. *J Biol Chem* 266: 13503-13506.
- Sarkis JJJ, JA Guimarães, JMC Ribeiro (1986). Salivary apyrase of Rhodnius prolixus. Kinetic and purification. *Biochem J* 233: 885-891.
- Sarkis JJJ, C Salto (1991). Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of Torpedo marmorata. *Brain Res Bull* 26: 871-876.
- Schadeck RJG, JJJ Sarkis, RD Dias, HMM Araújo, DOG Souza (1989). Synaptosomal apyrase in the hypothalamus of adult rats. *Brazilian J Med Biol Res* 22: 303-314.
- Schatzmann HJ (1989). The calcium pump of the surface membrane and of the sarcoplasmic reticulum. *Ann Rev Physiol* 51: 473-485.
- Schetinger MR (1991). Effects of aluminum chloride on the kinetics of rat cortex synaptosomal ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5). Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Instituto de Biociências, UFRGS, Porto Alegre.

- Schrader J (1990). Adenosina. A homeostatic metabolite in cardiac energy metabolism. *Circulation* 81:389-391.
- Schwartz A, GE Lindenmayer, JC Allen (1975). The sodium-potassium adenosine triphosphatase: Pharmacological, physiological, and biochemical aspects. *Pharmacol Rev* 27: 3-134.
- Schwartz A, RJ Adams (1980). Studies on the digitalis receptor. *Circulation Research* 46: I154-I160.
- Seeman P (1977). *Biochem Pharmacol* 26: 1741-1748.
- Solaro RJ, EW Gertz, FN Briggs (1972). Sucrose antagonism of drug and temperature effects on cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Acta* 255:751-761.
- Sorensen RG, HR Mahler (1982). Localization of endogenous ATPases at the nerve terminal. *J Bioenergetics and Biomembranes* 14: 527-546.
- Stefanovik V, J Ciesielski-Treska, A Ebel, P Mandel (1974). Nucleoside triphosphatase activity at the external surface of neuroblastoma cells. *Brain Research* 81: 427-441.
- Sun AY, DZ Lee (1985). Synaptosomal ADP uptake. *J Neurochem suppl* 44: S90.
- Tada M, MA Kirchberger, JM Iorio, AM Katz (1975). Control of cardiac sarcolemmal adenylate cyclase and sodium, potassium-activated adenosine-triphosphatase activities. *Circulation Research* 36: 8-17.
- Tognoli L, E Marré (1981) Purification and characterization of a divalent cation-activated ATP-ADPase from Pea steam microsomes. *Biochim Biophys Acta* 642: 1-14.
- Traverso-Cori A, O Cori (1962). Splitting of the terminal phosphate group of adenosine triphosphate by potato apyrase. *Biochem Biophys Acta* 57: 158-160.
- Traverso-Cori A, S Traverso, H Heyes (1970). Different molecular forms of potato apyrase. *Arch Biochem Biophys* 137: 133-142.
- Tuana BS, NS Dhalla (1992). Purification and characterization of a Ca^{2+} -dependent ATPase from rat heart sarcolemma. *J Biol Chem* 257: 14440-14445.
- Vachereau A, JMC Ribeiro (1989). Immunoreactivity of salivary gland apyrase of Aedes aegypti with antibodies against a similar hydrolase present in the pancreas of mammals. *Insect Biochem* 19: 527-534.

- Valenzuela MA, AM Kettlun, M Mancilla, V Calvo, N Fanta, A Traverso-Cori (1988). The effect of bivalent metal ions on ATPase-ADPase activities of apyrase from Solanum tuberosum. *Phytochemistry* 27: 1981-1985.
- Valenzuela MA, J López, M Depix, M Mancilla, AM Kettlun, L Catalán, M Chiong, J Garrido, A Traverso-Cori (1989). Comparative subcellular distribution of apyrase from animal and plant sources. Characterization of microsomal apyrase. *Comp Biochem Physiol* 93B: 911-919.
- Van Belle H (1972). Kinetics and inhibition of alkaline phosphatase from canine tissues. *Biochem Biophys Acta* 289: 158-168.
- Vara F, R Serrano (1981). Purification and characterization of a membrane-bound ATP diphosphohydrolase from Cicer arietinum (chick-pea) roots. *Biochem J* 197: 637-643.
- Vasconcelos EG, PS Nascimento, MNL Meirelles, S Verjovski-Almeida, ST Ferreira (1993). Characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of Schistosoma mansoni. *Mol Biochem Parasitol* 58: 205-214.
- Vassallo DV, JG Mill, AL Costa (1982). Contração cardíaca I. Bases ultraestruturais e acoplamento excitação-contração. *Arq Bras Cardiol* 39: 181-187.
- Velema J, J Zaagsma (1981). Purification and characterization of cardiac sarcolemma and sarcoplasmic reticulum from rat ventricle muscle. *Arch Biochem Biophys* 212: 678-688.
- Watanabe AM, JrHR Besch (1974). Subcellular myocardial effects of verapamil and D600: Comparison with propranolol. *J Pharmacol Exp Ther* 191: 241-251.
- White TD (1988). Role of adenine compounds in autonomic neurotransmission. *Pharmac Ther* 38: 129-168.
- Winkler H, SW Carmichael (1982). The chromaffin granule pp 3-79. AM Poisner, JM Trifaro eds Elsevier, Amsterdam. In White TD (1988). Role of adenine compounds in autonomic neurotransmission. *Pharmac Ther* 38: 129-168.
- Yagi K, Y Arai, N Kato, K Hirota, Y Miura (1989). Purification of ATP diphosphohydrolase from bovine aorta microsomes. *Eur J Biochem* 180: 509-513.
- Yagi K, M Shinbo, M Hashizume, LS Shimba, S Kurimura, Y Miura (1991). ATP diphosphohydrolase is responsible for ecto-ATPase and ecto-ADPase activities in bovine aorta endothelial and smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res*

Commun 180: 1200-1206.

- Yagi K, N Kato, M Shinbo, LS Shimba, Y Miura (1992). Purification and characterization of adenosine diphosphatase from human umbilical vessels. *Chem Pharm Bull* 40: 2143-2146.
- Yatani A, Y Tsuda, N Akaike, AM Brown (1982). Nanomolar concentrations of extracellular ATP activate membrane Ca channels in snail neurones. *Nature* 296: 169-171.
- Young MB, A Scarpa (1989). ATP receptor-induced Ca^{2+} transients in cardiac myocytes: sources of mobilized Ca^{2+} . *Am J Physiol* 257: C750-C758.
- Zhao D, NS Dhalla (1988). Characterization of rat heart plasma membrane Ca^{2+}/Mg^{2+} ATPase. *Archiv Biochem Biophys* 263: 281-292.
- Zhao D, NS Dhalla (1990). [^{35}S] ATPyS binding sites in the purified heart sarcolemma membrane. *Am J Physiol* 258: C185-C188.
- Zhao D, NS Dhalla (1991). Purification and composition of Ca^{2+}/Mg^{2+} ATPase from rat heart plasma membrane. *Mol Cell Biochem* 107: 135-149.