

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP**  
**Departamento de Bioquímica**

**Caracterização cinética de uma ATP-difosfohidrolase em  
membranas de placa óssea de rato livres de fosfatase alcalina**

**Marlene Aparecida Demenis Baptistella**

**Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP,  
para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração:  
Bioquímica**

**2001**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP**  
**Departamento de Bioquímica**

**Caracterização cinética de uma ATP-difosfohidrolase em  
membranas de placa óssea de rato livres de fosfatase alcalina**

**Marlene Aparecida Demenis Baptistella**

**Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Leone**

**Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP,  
para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração:  
Bioquímica**

**2001**



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Doutor Francisco de Assis Leone, pelas observações e críticas realizadas durante minha jornada científica.

Aos docentes, funcionários e pós-graduandos do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

Aos docentes, funcionários e pós-graduandos do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Às funcionárias da seção de pós graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

A CAPES, CNPq e FAPESP, pelas bolsas concedidas e pelos auxílios recebidos.

Aos colegas de laboratório do Prof. Dr. Francisco de Assis Leone.

Ao colega Pietro Ciancaglini.

Aos colegas de laboratório do Prof. Dr. Pietro Ciancaglini.

*Salmo de David*

*O Senhor é meu pastor, nada me falta.*

*Ele me faz deitar em verdes pastagens.*

*Às águas do repouso me conduz, ele me reanima.*

*Pelos bons caminhos me conduz, para a honra de seu nome.*

*Mesmo se eu andar por um vale de sombra e de morte, não receio mal algum, pois  
está comigo: teu bastão e teu cajado me dão segurança.*

*Diante de mim fazes servir uma mesa, em face dos meus adversários.*

*Perfumas a minha cabeça com óleo, minha taça é inebriante.*

*Sim, felicidade e fidelidade me acompanham todos os dias da minha vida, e retornarei  
à casa do Senhor, para longos dias.*

*Agradeço à Deus,*

*Dedico à minha numerosa e amada família.*

*Ao meu querido esposo Belo,  
E aos meus dois Thiagos.*

## ABREVIATURAS

AMPOL	2-amino 2-metil 1-propanol
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
ATPase	Adenosina 5'-trifosfatase
ADPase	Adenosina 5'-difosfatase
Ap <sub>5</sub> A	P <sup>1</sup> ,P <sup>5</sup> ( Adenosina 5')-pentafosfato
Bis-PNFF	Bis-p-nitrofenilfosfato
CTP	Citosina 5'-trifosfato
CDP	Citosina 5'-difosfato
CMP	Citosina 5'-monofosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamina tetracético
GTP	Guanosina 5'-trifosfato
GDP	Guanosina 5'-difosfato
GMP	Guanosina 5'-monofosfato
Hepes	Ácido N-2-hidroetilpiperazina-N'-etanosulfônico
ITP	Inosina 5'-trifosfato
IDP	Inosina 5'-difosfato
IMP	Inosina 5'-monofosfato
K <sub>m</sub>	Constante de Michaelis Mentem
Mes	Ácido N-2-morfolino etanosulfônico
n	Coefficiente de Hill
NTF	Nucleotídeo 5'-trifosfato
NDF	Nucleotídeo 5'-difosfato
NMF	Nucleotídeo 5'-monofosfato
NTFase	Nucleotídeo 5'-trifosfatase
NDFase	Nucleotídeo 5'-difosfatase
NMFase	Nucleotídeo 5'-monofosfatase
Pi	Fosfato inorgânico
PNFF	p-nitrofenilfosfato
TCA	Ácido Tricloroacético
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UTP	Uridina 5'-trifosfato
UDP	Uridina 5'-difosfato
UMP	Uridina 5'-monofosfato
V	Velocidade máxima

## RESUMO

Membranas de placa óssea de rato foram preparadas a partir de implante de pó de osso desmineralizado no tecido subcutâneo de ratos Wistar e purificadas em coluna de Sepharose 4B (Cell. Mol. Biol. 32: 55, 1986). A remoção da fosfatase alcalina das membranas foi feita com fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (Biochim. Biophys. Acta 1368: 108, 1998) e a atividade de nucleotídeo fosfatase determinada a 37°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM, teofilina 5 mM, em um volume final de 1 mL.

Durante o processo de purificação das membranas livres de fosfatase alcalina, a razão entre as velocidades de hidrólise do ATP e do ADP permaneceu constante (da ordem 2,4) sugerindo que elas correspondem a uma mesma enzima. O mesmo perfil de pH foi observado para a hidrólise do ATP e ADP e o pH ótimo aparente é 7,5.

Estudos de competição de substratos mostrou que, independentemente da relação entre as concentrações de ATP e ADP presentes no meio reacional, as atividades específicas sempre similares sugerem inequivocamente que a hidrólise do ATP e ADP representam reações competitivas para um único sítio na enzima.

Uma significativa inibição da hidrólise do ATP e ADP pela enzima foi observada na presença de azida de sódio, um inibidor de apirases, em concentrações que variaram entre 2,5 mM (ADP) e 7,5 mM (ATP).

Os valores dos parâmetros cinéticos calculados para a hidrólise dos diferentes substratos pela enzima mostram que a atividade NTFase é quase duas vezes maior que a correspondente NDFase enquanto a NMFase é nula ou desprezível.

A preparação não está contaminada por fosfatases não específicas, ATP-pirofosfatase (EC 3.6.1.8), pirofosfatase inorgânica (EC 3.6.1.1), fosfodiesterases, adenilato quinase e proteína fosfatases.

Em condições saturantes de ATP e magnésio, a atividade das membranas livres de fosfatase alcalina não é inibida pela oligomicina, ouabaína, bafilomicina A<sub>1</sub>, tapsigargina, omeprazol, ácido etacrínico e AP<sub>5</sub>A. Entretanto, a velocidade de hidrólise

do ATP e ADP é reduzida cerca de 30% e 40%, respectivamente, na presença de suramina 1 mM, um antagonista do receptor de purina P<sub>2</sub>.

Na ausência de íons magnésio ou cálcio, a hidrólise do ATP e ADP é desprezível enquanto na presença de íons cálcio ou magnésio a estimulação da atividade da enzima por tais íons é similar e cada íon pode substituir o outro durante o ciclo catalítico da enzima.

A hidrólise do ATP e ADP diminuiu consideravelmente na presença de Polidocanol 1%, Lubrol WX 1,35%, Lubrol PX 1%, CHAPS 2,5%, C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 1%, Triton X-114 1%, Triton X-100 0,2%, n-octil-β-D-glicosídeo 30 mM, polioxietileno-5-decil éter 0,5%. Os resultados mais promissores foram obtidos com a adição conjunta de digitonina e dimiristoil L-α-fosfatidilcolina (DMPC). Dentre todos os detergentes utilizados, a digitonina, na proporção de 5:1 (mg/mL) foi mais eficaz na solubilização.

A ATPase existente na membrana de placa óssea de rato e livre de fosfatase alcalina pode ser considerada uma ATP-difosfohidrolase por apresentar especificidade para nucleotídeos di e trifosfatos; não hidrolisar nucleotídeos monofosfato e fosfomonoésteres não nucleotídeos; ser ativada por íons cálcio ou magnésio; não ser inibida pelos inibidores de V-, Ca<sup>2+</sup>-, H<sup>+</sup>-, e Na<sup>+</sup> ou K<sup>+</sup>-ATPases; ser inibida por altas concentrações de azida de sódio; apresentar a mesma faixa de pH para NTF e NDF; ser facilmente inativada por detergentes; apresentar valores similares de Km (100 μM) para o ATP e ADP.



## ABSTRACT

Rat osseous plate membranes obtained fourteen days after the implantation of demineralized bone particles in the subcutaneous tissue of Wistar rats, were prepared and purified on Sepharose 4B column (Cell. Mol. Biol. 32:55-62). Alkaline phosphatase-free membranes were prepared treating the rat osseous plate membranes with phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *B. thuringiensis* (Biochim. Biophys. Acta 1368: 108, 1998). Nucleotide phosphatase activity was assayed at 37°C, in Hepes buffer 50 mM, pH 7.5, containing MgCl<sub>2</sub> 2 mM and theophylline 5 mM, in a final volume of 1 mL.

The ATPase present in the membranes of osseous plate hydrolyzed nucleotide triphosphates (NTP) at a rate 2-fold higher than that of nucleotide diphosphates (NDP). However, the hydrolysis of nucleotide monophosphates was negligible. The apparent optimum pH of hydrolysis for NTP and NDP was 7.5. The enzyme hydrolyzed ATP following Michaelian kinetics, with  $V = 1,278.7$  U/mg e  $K_m = 83.3$   $\mu$ M. For ADP, it was also observed a single family of hydrolyzing sites ( $n = 1,0$ ) with  $V = 473.9$  U/mg e  $K_m = 150.6$   $\mu$ M. In the absence of magnesium ions, the hydrolysis of ATP or ADP was negligible. A systematic study of the stimulation of the enzyme by calcium and magnesium ions suggested that any of these ions can replace the other during the catalytic cycle of the enzyme.

Theophylline, a phosphodiesterase inhibitor, showed a negligible inhibition of the hydrolysis of ATP and ADP at concentrations up to 7 mM, but sodium azide was an effective inhibitor of ATP (7.5 mM) and ADP (2.5 mM) hydrolysis. On the other hand, the classical V-, P- and F-type ATPase inhibitors had no effect on the hydrolysis of ATP and ADP by the alkaline-free rat osseous plate membranes. A systematic study including a series of other inhibitors excluded the presence of contaminations by non specific phosphatases, inorganic pyrophosphatase, phosphodiesterase and protein phosphatase that could participate on the hydrolysis of NDP and NTP. AP<sub>5</sub>A had no effect on the hydrolysis of ATP and ADP by the enzyme, but suramin inhibited 30 and 40% the hydrolysis of ATP and ADP, respectively.

The solubilization of the alkaline phosphatase-free rat osseous plate membrane ATPase with detergents commonly used to solubilize membrane proteins resulted in a significant depletion of the enzyme activity.

The kinetic similarities of the alkaline phosphatase-free rat osseous plate membrane ATPase with respect to the hydrolysis of NTP and NDP suggested that it apparently functions as an ATP-diphosphohydrolase.



# ÍNDICE

## 1. INTRODUÇÃO

Mineralização biológica	1
Fosfatase alcalina de cartilagem e/ou osso	4
ATP difosfohidrolase	12
Objetivos	17

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Preparação do pó de osso	18
2.2. Desmineralização do pó de osso	18
2.3. Implante do pó de osso desmineralizado	18
2.4. Preparação das membranas de placa óssea	19
2.5. Remoção da fosfatase alcalina das membranas de placa óssea	19
2.6. Determinação da atividade de nucleotídeo fosfatase	20
2.7. Determinação da atividade de pirofosfatase	20
2.8. Determinação da atividade de proteína fosfatase	21
2.9. Determinação da atividade de fosfatase não específica	21
2.10. Determinação da atividade de fosfodiesterase	22
2.11. Efeito do pH ótimo de hidrólise do ATP e ADP	22
2.12. Efeito de íons magnésio e cálcio na hidrólise do ATP e ADP	23
2.13. Efeito do tempo na hidrólise do ATP e ADP.	23
2.14. Efeito da concentração de azida de sódio na hidrólise do ATP e ADP	23
2.15. Efeito da concentração de suramina na hidrólise do ATP e ADP	23
2.16. Verificação da existência de múltiplos sítios de hidrólise para o ATP e ADP	24
2.17. Dosagem de proteínas	24
2.18. Efeito de inibidores na hidrólise do ATP e ADP	24
2.19. Tratamento dos resultados cinéticos	25

## 3. RESULTADOS

26

## 4. DISCUSSÃO

54

## 5. CONCLUSÕES

68

## 6. SINÓPSE

70

## 7. REFERÊNCIAS

72

## Curriculum Vitae

94

## 1. INTRODUÇÃO

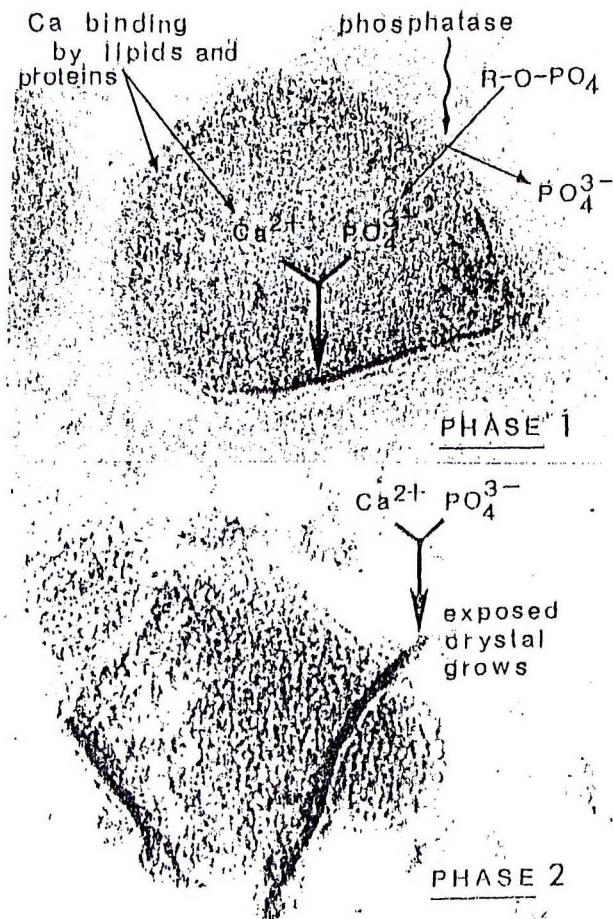
### **Mineralização Biológica**

Em mamíferos, mineralização é sinônimo de calcificação desde que a maioria dos minerais orgânicos depositados seja composta de cálcio. Assim, nos organismos vivos, a mineralização é definida como a deposição de compostos químicos inorgânicos sob condições normais ou patológicas (Boskey, 1981).

Células específicas de tecidos que são calcificados, possuem como função primária a síntese e secreção de componentes da matriz extracelular (Glimcher, 1959; Boyde et al., 1978; Schenk, 1980). Acredita-se também que as células proporcionam sítios para a estocagem de cálcio e fosfato, criando assim um ambiente onde a mineralização ocorre (Boyde et al., 1978). Assim, célula parece ser o principal fator no controle do processo de calcificação.

A biomineralização é essencialmente um fenômeno bifásico (Painel 1). A Fase 1 diz respeito à formação do primeiro cristal mineral dentro da vesícula da matriz. A Fase 2 corresponde à penetração do cristal na membrana da vesícula da matriz, expondo o mineral pré-formado ao fluido extracelular. A velocidade de proliferação do mineral é governada por condições extracelulares, tais como níveis iônicos de cálcio ou fosfato no fluido extracelular, pH do fluido extracelular e presença de moléculas no fluido extracelular que podem controlar a velocidade de proliferação. Dentre elas podem ser citadas as proteoglicanas aniônicas e/ou proteínas não colagenosas ligadoras de cálcio (Anderson, 1995).

A Fase 1 começa com a atração dos íons cálcio para o interior da vesícula da matriz, por ser um local rico em fosfolipídios e proteínas que ligam cálcio na vesícula da matriz (Peress et al., 1974; Wuthier, 1975; Genge et al., 1990; Balmain, 1992; Morris et al., 1992) e também devido à ação de canais iônicos de cálcio (Rojas et al., 1992). O acúmulo de cálcio é seguido pelo acúmulo de fosfato, resultante da ação de fosfatases existentes na membrana da vesícula da matriz, onde a fosfatase alcalina é a mais abundante. Devido a sua composição molecular única e a sua ordem tridimensional, a



**Painel 1**  
 A natureza básica da calcificação  
 (Anderson, 1995)

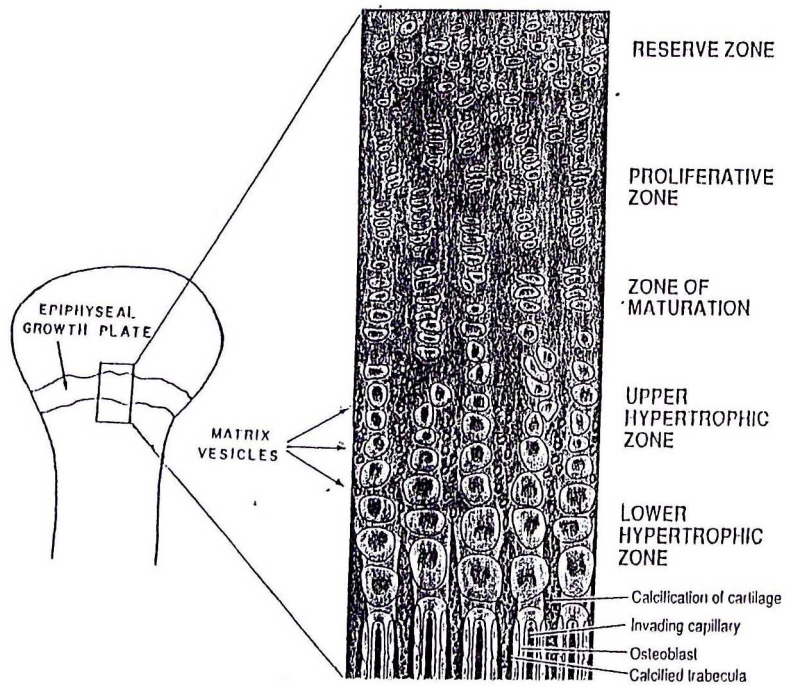


Fase 1 pode ser subdividida em uma cascata de múltiplas interações que podem ocorrer somente dentro da vesícula da matriz (Anderson, 1995).

Tem sido sugerido por diversos autores que o acúmulo de fosfato precede o do cálcio (Wuthier and Boyan, 1992; Wu et al. 1993). Quando o cálcio e o fosfato são acumulados suficientemente dentro da vesícula da matriz ocorre a precipitação do fosfato de cálcio. O primeiro fosfato de cálcio depositado é provavelmente um fosfato de cálcio amorfo não cristalino (Gay et al., 1978; Wu et al., 1993). Posteriormente ele é convertido no intermediário octafosfato de cálcio, cujos cristais são finalmente transformados na forma insolúvel de hidroxiapatita (Anderson, 1969; Sauer and Wuthier, 1988; Wu et al., 1993). Os cristais de hidroxiapatita podem perfurar a membrana da vesícula da matriz e assim ficarem expostos ao fluido extracelular. A Fase 2 começa com o rompimento da membrana da vesícula da matriz, que pode ser assistida pela ação de fosfolipases (Wuthier et al., 1978; Wu et al., 1989) e proteases (Hirschman et al., 1983; Katsura and Yamada, 1986; Dean et al., 1992).

A natureza bifásica do processo de mineralização tem sido confirmada em vários sistemas biológicos. Estudos de microscopia eletrônica de cartilagem, osso e dente têm mostrado que a deposição do mineral ocorre inicialmente no interior e depois ao redor da vesícula da matriz (Anderson, 1969; Bernard, 1972; Eisenman and Glick, 1972; Sisco and Provenza, 1972; Slavkin et al., 1972; Anderson et al., 1975; Dopping-Heppenstall et al., 1981; Landis, 1987; Johnson et al., 1989; Arsenault et al., 1991; Sela et al., 1992). O fenômeno bifásico da mineralização também é observado em modelos de lipossomos que mimetizam a vesícula da matriz (Eanes and Hailer, 1985; Eanes, 1992; Heywood and Eanes, 1992; Skrtic and Eanes, 1992).

As vesículas da matriz, ricas em fosfatase alcalina, estão localizadas na matriz extracelular (Anderson, 1969; Anderson, 1973; Boskey, 1979; Anderson, 1980). Embora a presença das vesículas da matriz extracelular na calcificação da cartilagem e em calcificação patológica já é bem aceita, existem algumas questões que implicam a associação das vesículas da matriz com a deposição do mineral no osso (Glimcher, 1959; Gersch, 1973; Landis et al., 1977a, 1977b; Landis and Glimcher, 1978).



**Painel 2**  
**O crescimento da placa epifisária**  
**(Anderson, 1989)**

O osso é um tecido incomum que durante sua vida adulta retém a capacidade de mudar sua forma e estrutura em resposta a mudanças do meio ambiente. Os ossos longos crescem fundamentalmente pelas pontas, através de uma estrutura denominada placa de crescimento epifisário (Painel 2).

A placa de desenvolvimento epifisário é subdividida nas seguintes regiões anatômicas: uma zona de reserva, localizada no topo da placa em desenvolvimento que contém condrócitos inativos; uma zona de proliferação, região de intensa divisão celular onde condrócitos estão organizados de tal maneira que dividem anatomicamente a matriz em septos transversais, separando as células das colunas adjacentes; e uma zona hipertrófica que contém condrócitos aumentados bem como muitas vesículas da matriz. É nessa zona hipertrófica que o primeiro cristal mineral aparece dentro da vesícula da matriz. A zona de calcificação contém condrócitos degenerados. Este é o nível onde a proliferação do mineral espalha-se radialmente para fora da vesícula da matriz, infiltrando-se nos interstícios do septo longitudinal da matriz (Anderson, 1989).

Fundamentalmente, a matriz é formada por quatro componentes, três orgânicos e um inorgânico. Embora o componente mais abundante do osso é o colágeno tipo I, existem proteínas não colagenosas e componentes não protéicos, envolvidos na integridade estrutural do osso e/ou no controle celular da função óssea (Freemont, 1993). A substância orgânica que forma a matriz não mineralizada é conhecida como osteóide. O outro componente da matriz é um sal de fosfato e cálcio, cuja estrutura é semelhante a da hidroxiapatita (Glimcher, 1987).

Quatro células trabalham em conjunto na reposição da matriz óssea: o osteoclasto, o osteoblasto, o osteócito e a resting surface cell (Revell, 1983; Warwick and Williams, 1989).

O osteoblasto, a célula que manufatura o osso, é responsável pela síntese do colágeno e proteínas não colagenosas do osso; pela organização ordenada das fibrilas do colágeno e pela mineralização do osteóide (Freemont, 1993). O osteócito e a resting surface cell, são derivadas do osteoblasto (Marks and Popoff, 1988).

Durante a formação dos osteóides, alguns osteoblastos são encarcerados dentro de uma matriz óssea recém formada, os osteócitos. Há evidências da ocorrência de troca



de íons entre a rede cristalina da matriz óssea e o fluido extracelular ao redor dos osteócitos. Além disso, os osteócitos possuem uma função mais generalizada na manutenção da estrutura da matriz óssea (Freemont, 1989). Por outro lado, tem sido sugerido que a rede tridimensional do osteócito é um receptor mecânico que capta microdistorções da matriz e as transformam em sinais que influenciam a atividade dos osteoblastos, dos osteoclastos e da resting surface cell (Skerry et al., 1989). Todavia, a função do osteócito, no processo de calcificação ainda é desconhecida.

Os osteoblastos também podem se diferenciar em uma célula plana que se situa sobre a superfície do osso, conhecida como a resting surface cell. Esta célula é separada do osso mineralizado através de uma fina camada de tecido fibroso não mineralizado que envolve completamente a superfície do osso. Tem sido sugerido que a resting surface cell secreta colagenases que podem remover a camada de tecido fibroso, limpando desta maneira uma área na superfície do osso para facilitar o acesso dos osteoblastos à superfície do osso e assim promover a reabsorção óssea (Oyajobi and Russell, 1992).

O quarto e último tipo de célula óssea é o osteoclasto (Chambers, 1985). Ela é uma célula grande, multinucleada, de forma discóide, que adere em toda a superfície óssea. Este modelo de adesão cria efetivamente um espaço sob a célula, no qual o osteoclasto secreta produtos que abaixam o pH do meio ambiente da superfície do osso abaixo do osteoclasto, descalcificando desta maneira o osso. A partir desse momento ocorre a desagregação da rede de colágeno do osso (Mundy and Roodman, 1987).

### **Fosfatase alcalina de cartilagem e/ou osso**

A descoberta de que a fosfatase alcalina pode causar a precipitação de fosfato de cálcio, quando incubada na presença de cálcio e ésteres de fosfato inorgânico, provocou um grande interesse em relação à sua ação no processo de mineralização biológica (Robison, 1923). Apesar das intensas pesquisas realizados, muitos dos eventos envolvidos na iniciação da calcificação dos tecidos duros permanecem a serem esclarecidos (Moss, 1992; Blumenthal, 1989; Hsu, 1994; Bawden, 1989; Anderson, 1995; Whyte, 1994; Wuthier and Register, 1985; Poole et al., 1989; Glimcher, 1989;

Glimcher, 1992; Boskey, 1981; Leone et al., 1997; Wuthier, 1986; Caverzasio and Bonjour, 1996; Abramowitz and Suki, 1996).

A relação fosfatase alcalina/mineralização tem sido reforçada pelo fato de que os primeiros sinais de mineralização aparecem em pequenas vesículas extracelulares que apresentam altos níveis de fosfatase alcalina inespecífica (Bonucci, 1967; Bernard and Pease, 1969; Bab et al., 1979; Ali et al., 1970; Majeska and Wuthier, 1975; Anderson, 1989), de adenosina-5'-trifosfatase e de pirofosfatase (Anderson, 1989; Ali, 1976; Korhonen et al., 1977; Felix and Fleisch, 1976; Skillen and Rahbani-Nobar, 1980; Matsuzawa and Anderson, 1971; Vaananen and Korhonen, 1979; Cyboron et al., 1982; Meyer and Reddi, 1985; Anderson et al., 1970); de 5'-nucleotidase e de nucleotídeo trifosfato pirofosfohidrolase (Anderson, 1989).

A função dessas atividades enzimáticas, localizadas na membrana das vesículas extracelulares, tem sido estudada exaustivamente e, alguns autores admitem que, a fosfatase alcalina poderia provocar um aumento dos níveis de fosfato inorgânico através da hidrólise de substratos fosforilados (Robison, 1923).

Várias outras funções têm sido atribuídas a fosfatase alcalina. A sua ação como uma pirofosfatase é fisiologicamente significativa nestes últimos 40 anos (para revisão ver Leone et al., 1997), uma vez que ela atua na destruição local do pirofosfato, um inibidor do crescimento do cristal de apatita (Neuman et al., 1951; Howell et al., 1969). Tem sido sugerido também que a fosfatase alcalina pode atuar no transporte de fosfato inorgânico, através da membrana celular e/ou da membrana da vesícula da matriz (Warner et al. 1983; Register and Wuthier, 1984; Register et al., 1984; Melani et al., 1967; Shah et al., 1979; Fallon et al., 1980; Nijweide et al., 1981). Além disso, existem evidências experimentais de que essa enzima pode atuar como uma proteína ligadora de cálcio (Vittur and deBernard, 1973; deBernard et al., 1985) e possivelmente como uma  $(Ca^{2+}, Mg^{2+})$ -ATPase (Stagni et al., 1979; Haussler et al., 1970; Hsu and Anderson, 1977). Estudos cinéticos, utilizando moléculas aceptoras do tipo poliol e/ou amino álcool, mostraram que a fosfatase alcalina pode atuar também como uma fosfotransferase (Fernley, 1971; Fishman and Ghosh, 1967; Stinson et al., 1987; Pizauro et al., 1992; Muller et al., 1991).



A hidrólise de ésteres de fosfatos (Vincet et al., 1992) bem como a fosforilação de proteínas (Hanks et al., 1988) têm sido reconhecidas como um importante processo no controle do metabolismo celular. Apesar de suas características multifuncionais (Harris, 1989; Shinozaki et al., 1990; Leone et al., 1997) ainda não está bem estabelecido se a fosfatase alcalina de osso pode atuar como uma proteína fosfatase. O fato desta enzima apresentar atividade de fosfotransferase (Fernley, 1971; Fishman and Ghosh, 1967; Stinson et al., 1987; Pizauro et al., 1992; Muller et al., 1991) além da atividade de hidrolase sugere que ela pode funcionar *in vivo* como uma proteína fosfatase (Shinozaki et al., 1995). Tal sugestão está fundamentada no fato de que o aminopropil bifosfonato e o hidroxietano bifosfonato, muito empregados terapeuticamente no metabolismo de cálcio e do osso (Fleish, 1980; Stone et al., 1990), inibem de uma maneira muito similar a atividade da fosfatase alcalina em relação à hidrólise de fosfoaminoácidos.

Embora a função da fosfatase alcalina na calcificação ainda permanece controversa, o balanço das evidências favorece uma função positiva para a atividade catalítica dessa enzima. Inibidores da fosfatase alcalina de vesículas da matriz (aquecimento, berílio, levamisol) inibem a calcificação da vesícula da matriz em regiões de tecidos em desenvolvimento, de placas de cartilagem de ratos e de culturas celulares de ossos (Anderson and Sajdera, 1976; Fallon et al., 1980; Bellows et al., 1991). A curva de inativação térmica de fosfatases alcalinas isoladas da matriz é muito similar à da inibição do padrão da calcificação de regiões em desenvolvimento da placa (Anderson and Reynolds, 1973). A remoção de substratos da fosfatase alcalina, tais como  $\beta$ -glicerofosfato de soluções que calcificam *in vitro* previnem a calcificação das vesículas da matriz isoladas (Ali and Evans, 1973; Hsu and Anderson, 1977; Murphree et al., 1982; Hsu, 1992) e de culturas celulares de osso (Bellows et al., 1991). Quando a fosfatase alcalina solubilizada com detergentes é reincorporada em vesículas reconstituídas artificialmente a partir dos fosfolipídios da vesícula da matriz, a atividade de calcificação é restaurada (Hsu and Anderson, 1978). Talvez a mais convincente evidência a favor de uma função da fosfatase alcalina na mineralização, seja proveniente de estudos de uma doença hereditária, a hipofosfatasia, onde uma mutação promove a deleção do gene da

atividade catalítica da fosfatase alcalina de ossos e dentes, causando uma falha na calcificação em cartilagem, osso e dentina (Whyte, 1989).

Apesar da existência de uma extensa literatura acerca das propriedades das fosfatases alcalinas de vertebrados (Fernley, 1971; Fishman, 1974; McComb et al., 1979; Coleman and Gettins, 1983; Moss, 1992), para a enzima de cartilagem e osso, os resultados discrepantes obtidos (Ali et al., 1970; Korhonen et al., 1977; Cyboron and Wuthier, 1981; Kahn et al., 1978; Arsenis et al., 1975) têm sido atribuídos a uma proteólise da molécula da enzima por proteases contaminantes da colagenase normalmente empregada na preparação da enzima (Cyboron and Wuthier, 1981; Peterkofsky and Diegelmann, 1971; Farley et al., 1980; Hsu et al., 1985; Cyboron et al., 1982).

Um aspecto ainda mais relevante que essas contradições já relatadas é o fato de que, apesar das inúmeras evidências experimentais, o papel fisiológico dessa enzima bem como o seu substrato natural ainda não são conhecidos (Boskey, 1981; Wuthier and Register, 1985; Blumenthal, 1989; Poole et al., 1989; Leone et al., 1997; Hsu, 1994). A função e a participação da fosfatase alcalina no processo de mineralização não estão esclarecidas devido principalmente às dificuldades encontradas na sua purificação e extração de tecidos ósseos e/ou cartilagosos (Russell, 1965; Russel et al., 1971; Boskey, 1981; Wuthier, 1982, 1984, 1986; Rasmussen, 1983; Wuthier and Register, 1985; Blumenthal, 1989; Poole et al., 1989; Golub et al., 1992).

A fosfatase alcalina de vários tecidos de mamíferos é uma fosfomonohidrolase inespecífica (EC 3.1.3.1) que pode hidrolisar, em pH alcalino, monoésteres de fosfato (ATP, ADP, AMP, p-nitrofenilfosfato, glicose 6-fosfato, glicose 1-fosfato, gliceraldeído 3-fosfato), pirofosfato, bem como, catalisar reações de transfosforilação (Cox et al., 1967; Harkness, 1968; Hiwada and Wachsmuth, 1974; McComb et al., 1979; Hsu et al., 1985; deBernard et al., 1985; Curti et al., 1987; Pizauro et al., 1987; Muller et al., 1991).

As fosfatases alcalinas de vertebrados são glicoproteínas ligadas à membrana, que normalmente só podem ser removidas das mesmas através do uso de detergente (Cyboron and Wuthier, 1981; Fortuna et al., 1978; Doellgast and Fishman, 1974; Helenius and Simons, 1975; Hjelmeland and Chrambach, 1984; Ey and Ferber, 1977) ou

por tratamento com n-butanol (Arsenis et al., 1975; Kahn et al., 1978; Ghosh and Fishman, 1968).

Considerando-se que a obtenção da fosfatase alcalina com sua estrutura nativa preservada é importante para esclarecer alguns aspectos da mineralização induzida pelas vesículas da matriz óssea (Wuthier, 1982), é importante que durante o seu isolamento e purificação devam ser tomados cuidados especiais para que a molécula seja preservada em sua configuração nativa, afim de se obter progressos mais significativos em relação ao estudo do seu papel fisiológico. A partir dessa idéia, Curti et al. (1986) desenvolveram um método, rápido e simples, de extração e purificação de grandes quantidades de fosfatase alcalina existente em placas ósseas, utilizando a técnica do implante de matriz óssea desmineralizada descrita por Reddi and Huggins (1972). Como não são empregados detergentes, proteases e/ou solventes orgânicos este método aparentemente preserva as características estruturais e cinéticas da enzima, evitando os problemas já descritos anteriormente. A principal característica desse método é que a fosfatase alcalina pode ser estudada em diferentes etapas do processo de ossificação endocondral.

A utilização de matriz óssea desmineralizada para induzir a atividade de fosfatase alcalina, revelou que durante a formação da placa óssea ocorre o aparecimento de uma fosfatase alcalina ligada à membrana e uma outra, solúvel (Leone et al., 1997). Segundo alguns autores, essas duas formas distintas de enzima podem estar envolvidas no processo de calcificação biológica (Cyboron and Wuthier, 1981; Stagni et al., 1983; Curti et al., 1986; Say et al., 1991).

O estudo sistemático de algumas propriedades estruturais da fosfatase alcalina de placa óssea de ratos mostrou que ela é uma enzima ligada à membrana que apresenta uma massa molecular de 130 kDa e é constituída por duas subunidades aparentemente idênticas de 65 kDa. Os dois grupos catalíticos que participam da reação apresentam pKs de ordem de 8,5 e 9,7, independentemente da enzima estar ou não associada à membrana (Pizauro et al., 1987). Cada uma dessas subunidades apresenta dois sítios de fixação para o zinco e um para o magnésio e, a modulação da atividade da enzima por esses íons é devida à modificações conformacionais na molécula da enzima (Ciancaglini et al., 1989, 1990b).



Além da hidrólise de ésteres de fosfato, a fosfatase alcalina de placa óssea também catalisa a transferência do grupamento fosfato da fosforilenzima para diversos aceptores de fosfato (Fernley, 1971; Fishman and Ghosh, 1967; Stinson et al., 1987; Pizauro et al., 1992; Muller et al., 1991). No caso da fosfatase alcalina de placa óssea solubilizada com Polidocanol, a atividade de fosfotransferase independe do substrato empregado (Ciancaglini et al., 1997). Por outro lado, parece que a atividade de fosfotransferase está aparentemente relacionada com a carga líquida do acceptor. Além disso, o aumento da concentração do acceptor provoca um aumento tanto da velocidade máxima como da constante de afinidade aparente para a reação de hidrólise do PNFF pela enzima (Ciancaglini et al., 1997). A utilização de uma grande variedade de aceptores de fosfato permitiu também propor um modelo que explica uma possível atividade de fosfotransferase, em pH fisiológico, da fosfatase alcalina ligada à membrana (Pizauro et al., 1992; Ciancaglini et al., 1997).

Diésteres de fosfato do tipo difenilfosfato, NAD, cAMP, bem como o trimetilfosfato e os trifenilfosfatos, não são hidrolisados pelas fosfatases alcalinas (Morton, 1955; Heppel et al., 1962; McComb et al., 1979). Entretanto, a inibição da enzima pela teofilina, sugerindo uma possível ação da enzima como uma fosfodiesterase, acarretou o aparecimento de resultados controvertidos na literatura (Farley et al., 1980; Hsu et al., 1985). Esta controvérsia foi esclarecida com a demonstração de que a fosfatase alcalina induzida por matriz óssea pode atuar *in vitro* como uma fosfodiesterase do tipo I (Rezende et al., 1994). Além disso, a enzima induzida por matriz óssea apresenta também atividade de pirofosfatase (Rezende et al., 1998; Leone et al., 1998) e de ATPase (Ciancaglini et al., 1990a; Demenis and Leone, 2000). Uma análise mais detalhada do conjunto destas atividades permite considerar que a fosfatase alcalina de placa óssea é uma enzima multifuncional (Leone et al., 1997).

Existem evidências de que a fosfatase alcalina pode atuar como uma proteína fosfatase tirosina-específica (Swarup et al., 1981) uma vez que fatores de crescimento que estimulam a divisão celular diminuem os níveis de fosfatase alcalina e aumentam a atividade de proteínas quinases tirosina-específicas (Carpenter et al., 1979; Ek et al., 1982; Kasuga et al., 1982; Michell, 1984). Entretanto, estes resultados são

circunstanciais e carecem de maiores evidências experimentais para se assegurar que esta é uma provável função fisiológica e não mais uma atividade de uma enzima multifuncional. Por outro lado, o fato da fosfatase alcalina de osso apresentar atividade de transfosforilação (Fernley, 1971; Fishman and Ghosh, 1967; Stinson et al., 1987; Pizauro et al., 1992; Muller et al., 1991) sugere que ela pode funcionar como uma proteína quinase ou proteína fosfatase. Isto é suportado pelo fato da fosfatase alcalina intestinal hidrolisar O-fosfoaminoácidos bem como a fosvitina, uma proteína fosforilada, em pH 7,4 (Shinozaki et al., 1995; Donella-Deana et al., 1991).

Em relação à atividade de hidrólise do ATP pela fosfatase alcalina tem sido sugerido que dado o seu elevado pH ótimo, da ordem de 9,4 a 10,5, ela não poderia atuar como uma hidrolase *in vivo* (Hsu et al., 1985; Cyboron and Wuthier, 1981; Farley et al., 1980). Recentemente foi demonstrado que a fosfatase de placa óssea solubilizada com polidocanol hidrolisa o ATP em pH fisiológico (Demenis and Leone, 2000). Considerando-se que a seqüência N-terminal dessa enzima é similar aquela de fígado (Misumi et al., 1988), ficou comprovado inequivocamente que a fosfatase alcalina de placa óssea pode ser considerada uma fosfomonohidrolase em pH fisiológico (Demenis and Leone, 2000).

A enzima de placa óssea ligada à membrana (Curti et al., 1986) e a solubilizada com detergentes (Pizauro et al., 1988) apresentam algumas propriedades similares às outras fosfatases alcalinas já descritas na literatura (McComb et al., 1979). Tanto os íons zinco como o magnésio são necessários para a atividade máxima de ambas as formas da enzima (Ciancaglini et al., 1989, 1992). Tem sido relatado que a remoção do zinco e do magnésio acarretaria um aumento da labilidade térmica da enzima levando à uma inativação irreversível, o que poderia explicar a diminuição da atividade da fosfatase alcalina durante a mineralização (McLean et al., 1987; Genge et al., 1988). Entretanto, o fato de que a atividade da apoenzima pode ser restaurada até níveis originais da enzima nativa, sugere que provavelmente outros fatores devem estar envolvidos (Ciancaglini et al., 1989; Leone et al., 1997).

Embora a maioria das fosfatases alcalinas seja dependente de zinco, o sítio de fixação desse metal ainda representa um aspecto controvertido para a enzima de

mamíferos (Kim and Wyckoff, 1991). Estudos recentes mostraram que na enzima de placa óssea, o zinco e o magnésio se fixam em sítios diferentes e a assimetria iônica é essencial e importante para a atividade máxima da enzima (Ciancaglini et al., 1989; Ciancaglini et al., 1992). Além disso, esses mesmos sítios podem fixar o manganês (Leone et al., 1995), o cobalto (Ciancaglini et al., 1995) e o cálcio (Leone et al., 1997a). Esses estudos resultaram na proposição de um modelo que explica a estimulação da enzima de placa óssea pelos íons metálicos divalentes (Ciancaglini et al., 1992). Também foi relatado que o pH representa um importante fator na modulação desta enzima pelos íons metálicos (Leone et al., 1992a).

Um problema ainda a ser resolvido é se uma ATPase específica também presente na membrana da matriz ou a própria fosfatase alcalina é a responsável pela calcificação dependente de ATP, uma vez que ambas hidrolisam o ATP (Hsu, 1994; Hsu and Anderson, 1995; Hsu and Anderson, 1996). Apesar de algum progresso já ter sido relatado nessa direção, a remoção da fosfatase alcalina da membrana não é completa e a contaminação que permanece na membrana, da ordem de 20-50%, não tem permitido o sucesso esperado nesses estudos (Hsu et al., 1993; Register et al., 1986). Acredita-se que a acilação dos componentes da âncora do fosfatidilinositol provoca uma ação incompleta da fosfolipase C e como consequência, a fosfatase alcalina seria liberada da membrana apenas parcialmente (Wong and Low, 1992). Este não é o caso da fosfatase alcalina de placa óssea de rato uma vez que, após o tratamento das membranas com fosfolipase C dependente de fosfatidilinositol, os níveis de contaminação em fosfatase alcalina são da ordem de 8 a 13%, suficientemente pequenos para permitir o estudo das propriedades cinéticas da ATPase que ainda permanece na membrana (Pizauro et al., 1994; Pizauro et al., 1995; Pizauro et al., 1998; Leone et al., 1997).

Resta salientar que apesar dos avanços obtidos na caracterização do cDNA e na estrutura dos genes estruturais envolvidos na expressão das fosfatases alcalinas de humanos (Harris, 1989; Moss, 1992), o mesmo não aconteceu em relação às fosfohidrolases dos tecidos que sofrem mineralização (Reddy et al., 1993; Rylander et al., 1991; Kumar et al., 1993; Yuan et al., 1995; Yoon et al., 1989).



Concluindo, em relação ao papel da fosfatase alcalina no processo de biomineralização, o estado da arte pode ser resumido na frase proposta por Golub et al. (1992): “a solução para estas questões interessantes e até agora refratárias parece estar tão próxima e talvez tão distante quanto estavam de Robison e, se elas serão respondidas antes do milênio permanece a ser determinado”. Entretanto, para Leone et al. (1997), o maior desafio a ser vencido no futuro é saber como essas complexas moléculas podem ser reconstituídas *in vitro* afim de se melhor compreender sua ação conjunta na biomineralização. Considerando-se que o esqueleto é uma complexa associação de células metabolicamente ativas, embebidas ou rodeadas pela matriz mineralizada e que, embora a atividade potencial de cada tipo de célula seja conhecida de uma maneira geral (Robey and Boskey, 1996), as complexas interações que ocorrem durante o desenvolvimento e manutenção do esqueleto ainda permanecem a serem esclarecidas, Marks and Hervey (1996) sugerem que as novas fronteiras da biologia do esqueleto requerem uma mudança de foco do sistema *in vitro* usado atualmente para o complexo meio *in vivo*.

### **ATP-difosfohidrolase**

ATP-difosfohidrolase (EC 3.6.1.5) também chamada de apirase, uma enzima que hidrolisa nucleotídeos di e/ou trifosfato extracelulares, foi descrita pela primeira vez por Meyerhof (1945). Essa enzima geralmente é descrita na literatura sob os mais diferentes nomes. Entre eles podem ser citados: ecto-nucleotídeo trifosfatase dependente de cálcio ou magnésio, nucleotídeo fosfohidrolase, adenilpirofosfatase, ATP pirofosfohidrolase, ATP-difosfohidrolase, ATPDase, ATP-DPH, apirase, ATP-difosfatase, adenosina difosfatase, nucleotídeo difosfatase, nucleotídeo-difosfato fosfohidrolase, nucleotidase, ATPase, ADPase, NTFase ou NDFase (Plesner, 1995).

Essa enzima pertence à classe das ATPases do tipo E, uma nova classe de ATPases ligadas à membrana recentemente estabelecida (Plesner, 1995; Plesner et al., 1997). Estas enzimas são caracterizadas pela sua orientação extracelular e marcadamente pelas propriedades enzimáticas diferentes da maioria das ATPases do tipo F, P e V, e

vem sendo extensivamente estudadas atualmente (Knowles and Nagy, 1999). Evidências acumuladas de estudos bioquímicos sugerem que estas ATPases na realidade são constituídas por duas sub famílias: a das ecto-ATPases (EC 3.6.1.3) e a das ecto-ATP-difosfohidrolases ou apirases (EC 3.1.6.5).

Embora as ecto-ATPases e as ecto-ATP-difosfohidrolases apresentem baixa especificidade pelo substrato, pH ótimo entre 6,5 e 7,5, são estimuladas por íons cálcio e magnésio, a diferença fundamental entre elas é que as ecto-ATP-difosfohidrolases hidrolisam os NDF com velocidades similares às observadas para os NTF e são inibidas por concentrações milimolares de azida de sódio, para as ecto-ATPases essas duas características não são observadas (Knowles and Nagy, 1999; Valenzuela et al., 1989; Komoszyński and Skalska, 1990; Vara and Serrano, 1981; Sarkis and Salto, 1991; Picher et al., 1993).

Fundamentalmente, as ecto-ATP-difosfohidrolases apresentam as seguintes características bioquímicas: **i.** especificidade de substrato para os NTF e NDF; **ii.** ausência de atividade sobre NMF e outros substratos monofosfatos não nucleotídeos; **iii.** são ativadas igualmente por cálcio ou magnésio; **iv.** insensibilidade aos inibidores clássicos de ATPase; **v.** inibição pela azida de sódio em altas concentrações; **vi.** mesma faixa de pH para ATP e ADP; **vii.** facilmente inativada por detergentes; **viii.** valores de Km similares tanto para ATP como ADP, da ordem de 100  $\mu$ M (Plesner, 1995; Oliveira et al., 1997; Knowles et al., 1983; Zimmermann et al., 1998; Caldwell et al., 1999; Komoszyński and Wojtczak, 1996; Hohmann et al., 1993; Soriani et al., 1995; Mans et al., 1998; Picher et al., 1994; LeBel et al., 1980; Smith and Kirley, 1998; Mita et al., 1998; Sandoval et al., 1996).

As ATP-difosfohidrolases tem sido descritas em pro- e eucariotos, em células tumorais, vírus, bactérias, protozoários, nematóides, platelmintos, batata (Plesner, 1995; Ribeiro and Garcia, 1980; Ribeiro and Garcia, 1981a; Ribeiro and Garcia, 1981b; Sarkis et al., 1986; Vasconcelos et al., 1993; Knowles et al., 1983; Ribeiro and Garcia, 1979; Mant and Parker, 1981; Ribeiro et al., 1985; Ribeiro et al., 1984; McLaughlin and Muller 1981; Aley et al., 1980; Bermudes et al., 1994).



Os estudos realizados ao longo desses últimos 40 anos têm sugerido várias funções para as ecto-ATPases. Elas podem ter função mecanoquímica; (Epstein and Holt, 1963); participam da transferência de informação não sináptica (Trams and Lauter, 1974); estão associadas a atividade de vírus e de células cancerosas (Plesner, 1995); em algumas viroses, a atividade ecto-ATPase pode modificar as propriedades de permeabilidade das células que respondem a uma fonte externa de ATP (Banerjee, 1981); a possibilidade da atividade ecto-ATPase estar associada às microvesículas sugere que a enzima pode ter uma função no processo secretório (Beaudoin et al., 1986); embora não exista uma identidade entre as ecto-ATPases e os receptores de purina, as ecto-ATPases têm um importante papel na função desses receptores, regulando ou certamente afetando as concentrações de agonistas e antagonistas ao redor dos receptores; elas podem participar na regulação da concentração do substrato da ectokinase (DeSouza and Reed, 1991); como o ATP, o ADP e o AMP não podem entrar na célula, tem sido sugerido que a ação combinada da ecto-ATPase e da 5'-nucleotidase produziriam adenosina, que pode atravessar a membrana e ser fosforilada no interior da célula restaurando assim os estoques de ATP (Henderson and Paterson, 1973; Trams and Lauter, 1974); tem sido proposto por vários autores que as ecto-ATPases teriam função de adesão celular (Lin and Guidotti, 1989); podem atuar como uma proteína transportadora de ácidos biliares.

No caso específico das ATP-difosfohidrolases, existem evidências que elas participam na neurotransmissão; agregação de plaquetas; regulação da pressão sanguínea; glicosilação de proteínas; controle do nível de açúcar e regulação da integridade de membrana (Komoszyński and Wojtczak, 1996). Entretanto, o fato da ATP-difosfohidrolase não ser ativada por cátions livres torna improvável o seu funcionamento como uma bomba de cátions (Laliberté et al., 1982). Além disso, a presença de mRNA da ATP-difosfohidrolase na placenta, pulmão, músculos esqueléticos, rins e coração humanos (Kaczmarek et al., 1996) sugere que a função fisiológica da enzima pode diferir nestes diferentes tecidos (Torres et al., 1998).

As ATP-difosfohidrolases estão localizadas principalmente na membrana plasmática e, apresentam uma única cadeia polipeptídica que é caracterizada pela ausência de grupos SH (Knowles et al., 1983; Magocsi and Penniston, 1991; Yagi et al.,

1991; Picher et al., 1994; Plesner, 1995; Vasconcelos et al., 1996; Handa and Guidotti, 1996; Verjovski-Almeida et al., 1997; Zimmermann, 1999; Zimmermann et al., 1998; Komoszyński and Wojtczack, 1996). Picher et al. (1994) relataram que o sítio catalítico da ATP-difosfohidrolase em músculos lisos não vasculares de traquéia bovina está localizado na superfície da célula, confirmando portanto tratar-se de uma ectoenzima. A demonstração que a ATP-difosfohidrolase é uma glicoproteína, também sugere que ela é uma ectoenzima (Sévigny et al., 1997b).

As ecto-ATPases apresentam dois presumíveis domínios transmembrana, um domínio hidrofóbico na região C-terminal e uma seqüência sinal na região N-terminal (Zimmermann, 1999; Zimmermann et al., 1998; Komoszyński and Wojtczack, 1996). Alguns autores tem sugerido que as ecto-ATPases podem estar ancoradas na membrana através do glicosilfosfatidilinositol porém existem evidências contrárias a esta hipótese (Torres et al., 1990; Strobel, 1993; Hohmann et al., 1993).

Embora muito pouco é conhecido acerca do sítio catalítico das apirases é muito provável que existam algumas similaridades entre as ATPases e apirases em relação aos sítios de ligação de nucleotídeos ou à catálise propriamente dita (Strobel and Rosenberg, 1992). Algumas informações acerca dos requisitos da estrutura do substrato já foram relatadas por vários autores (Cusack et al., 1983; Welford et al., 1987; Dombrowski et al., 1993; Beukers et al., 1993). Além disso, a insensibilidade ao vanadato e a ausência de inibição pelo produto fosfato inorgânico implica na ausência de um intermediário fosforilado durante o processo catalítico (Hidalgo et al., 1983; Valente et al., 1990; Paz et al., 1988).

A necessidade de baixas concentrações ou apenas traços de íons magnésio, tem sido descrita como uma característica comum a todas ATP-disfosfohidrolases (Plesner, 1995; Ferreira et al., 1995). Essa condição é significativamente diferente da necessidade de concentrações milimolares de íons magnésio para ativação da Ca-ATPase de membrana plasmática (Carafoli, 1991). Por outro lado, como a maioria das ecto-ATPases são estimuladas pelos íons cálcio ou magnésio em concentrações significativas (Knowles, 1988; Lin, 1985; Lin and Russel, 1988; Plesner, 1995; Meyer-Fernandes et al., 1997),

enzimas contaminantes tais como a Na/K-ATPase e a adenilato quinase (Sarkis et al., 1995; Torres et al., 1998) podem ser ativadas simultaneamente mascarando o ensaio.

Diferentes procedimentos têm sido utilizados na purificação das ecto-ATPases de diferentes origens (para revisão ver Plesner, 1995). Entretanto, devido à baixa concentração dessas enzimas e a labilidade aos detergentes, somente algumas poucas foram purificadas até a homogeneidade. Dentre elas podem ser citadas as ecto-ATPases de túbulos-T de coelho (Treuheit et al., 1992), de moela de frango (Stout and Kirley, 1994), de vasos umbilicais humanos (Yagi et al., 1992), de oviduto e fígado de frango (Strobel, 1993; Strobel et al., 1996) e placenta humana (Christoforidis et al., 1995). Também foi relatada a purificação parcial da enzima de fígado de rato (Lin and Fain, 1984), de células tumorais humanas (Shi and Knowles, 1994; Knowles and Leng, 1984; Gao and Knowles, 1993), de pâncreas de porco (Sévigny et al., 1995), de rim de porco (Van Erum et al., 1995), de aorta bovina (Côté et al., 1991), de pulmão de boi (Sévigny et al., 1997a), de coração de boi (Beaudoin et al., 1997) e de estômago de frango (Lewis Carl and Kirley, 1997).

De uma maneira geral, o peso molecular das ecto-ATPases é relativamente alto (Valente et al., 1990; Banerjee and Racker, 1977), variando entre 50 e 180 kDa. A enzima do pâncreas de porco tem um PM da ordem de 130 kDa (LeBel et al., 1980) enquanto a de músculos lisos e célula endotelial de aorta bovina têm uma massa molecular de 190 kDa (Miura et al., 1987; Yagi et al., 1989). Esses valores contrastam com a massa molecular relatada para a enzima de pulmão, da ordem de 70 kDa (Côté et al., 1991). Para as apirases de plantas, tem sido relatadas massas moleculares que variam de 40 a 51 kDa (Valenzuela et al., 1989; Komoszyński and Skalska, 1990).

Inúmeras dificuldades têm sido relatadas para a obtenção de ATP-difosfohidrolases solubilizadas e ativas (Plesner, 1995). A mais bem sucedida solubilização de uma ecto-ATPase foi realizada por Kirley (1988), utilizando a enzima de túbulos T de coelho e uma mistura de lisolecitina e digitonina. Embora a enzima de rato é particularmente difícil de ser solubilizada (Lambert and Cristophe, 1978), a de cérebro bovino pode ser solubilizada (80%) com Polidocanol 20 mg/ml (Hohmann et al., 1993). Entretanto, se o detergente for usado em concentrações menores (10 mg/ml), a atividade



da é reduzida em 75% (Dzhandzhugazyan and Bock, 1993). A enzima de fígado de frango pode ser solubilizada sem perda de atividade (Strobel, 1993), enquanto a de fígado de rato perde apenas 40% da sua atividade após a solubilização (Lin and Fain, 1984).

Várias ATP-difosfohidrolases têm sido clonadas (Kirley, 1997; Wang and Guidotti, 1996; Kaczmarek et al., 1996; Marcus et al., 1997; Wang et al., 1997; Kegel et al., 1997; Gao et al., 1998; Smith and Kirley, 1998; Handa and Guidotti, 1996; Asai et al., 1995; Nagy et al., 1998) e as seqüências de aminoácidos comparadas. De uma maneira geral, todas as ATPases do tipo E já clonadas apresentam uma seqüência homóloga ao CD39, um antígeno putativo de ativação da célula linfóide (Maliszewski et al., 1994), e todas elas apresentam quatro regiões conservadas (Handa and Guidotti, 1996; Vasconcelos et al., 1996).

## **1.1 – OBJETIVOS**

O objetivo do presente estudo é a caracterização cinética de uma ATPase que permanece associada à membrana de placa óssea de rato após o tratamento com fosfolipase C específica para fosfatidilinositol.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Preparação do pó de osso.**

Na preparação do pó de osso foram utilizados ratos Wistar adultos, machos ou fêmeas de aproximadamente 400 g. Os animais foram mortos por anestesia com clorofórmio e em seguida seus fêmures foram removidos, as extremidades seccionadas e a medula óssea eliminada. Após a remoção do tecido aderido às diáfises, os ossos foram lavados em água destilada (2 h), desidratados com etanol absoluto (1 h) e finalmente tratados com éter (30 min). Os ossos foram deixados a 37°C, durante 12 h, para secar completamente e em seguida moídos em moedor mecânico (moedor de café). Apenas as partículas de diâmetro compreendido entre 125-175  $\mu$  (selecionadas através de peneiras granulométricas) foram utilizadas nas etapas subsequentes do trabalho.

### **2.2. Desmineralização do pó de osso.**

As partículas selecionadas foram desmineralizadas com HCl 0,5 N na proporção de 25 miliequivalente de ácido/g de pó de osso, com agitação constante, durante 3 h e sob a ação de uma corrente elétrica alternada de 100 mA. Em seguida, o pó desmineralizado foi lavado exaustivamente com água destilada (2 h), desidratado com etanol absoluto (1 h) e lavado com éter etílico (30 min). Finalmente, o pó de osso desmineralizado foi deixado a 37°C, durante 12 h, para secar completamente (Curti et al., 1986).

### **2.3. Implante do pó de osso desmineralizado.**

Após a anestesia cuidadosa com éter, ratos Wistar machos de 30 dias (60 g) foram depilados e, em seguida, foram feitas 5 incisões longitudinais de 1 cm na pele e no tecido subcutâneo dorsal. A seguir foram preparadas cavidades subcutâneas por dissecação com tesoura e, em cada uma, foram implantados 10-20 mg de pó de osso

desmineralizado. Após suturar as incisões com dois ou três pontos cirúrgicos, procedeu-se a assepsia com Mertiolate. Finalmente, os animais receberam uma injeção intramuscular de Pentabiótico veterinário (Fontoura-Wyeth), na proporção de 1 mL/100 g de peso animal.

#### **2.4. Preparação das membranas de placa óssea.**

Catorze dias após o implante do pó de osso desmineralizado, os ratos foram sacrificados por decapitação, as placas ósseas formadas foram removidas e homogeneizadas com tampão Tris.HCl 5 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM e NaCl 150 mM (1 g de placa óssea/3 mL de tampão) em um homogenizador Polytron. O homogeneizado foi centrifugado a 15000xg, durante 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi separado e colocado imediatamente em banho de gelo picado. Ao precipitado foram adicionados 15 mL de tampão e uma nova centrifugação foi efetuada nas mesmas condições. Os sobrenadantes obtidos foram misturados gentilmente e a solução resultante, filtrada em lã de vidro. O filtrado, rico em membranas de placa óssea (que contém fosfatase alcalina e ATP-difosfohidrolase), foi centrifugado à 100000xg durante 1 h, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspense no mesmo volume de Tris.HCl 5 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM e sacarose 200 mM. Aliquotas de 1 mL foram congeladas em um banho de gelo seco/acetona e estocadas à -20°C, por um período de até trinta dias, sem perda apreciável da atividade.

#### **2.5. Remoção da fosfatase alcalina das membranas de placa óssea.**

Aliquotas de membranas de placa óssea de rato (2 mg/mL) foram incubadas em tampão Tris.HCl 50 mM, pH 7,25, contendo sacarose 200 mM e 0,1 U de fosfolipase-C específica para glicosilfosfatidil-inositol de *B. thuringiensis*, sob constante agitação, por 1 h, a 37°C. A mistura resultante foi então centrifugada à 100000xg, durante 1 h, a 4°C. O sobrenadante, rico em fosfatase alcalina, foi congelado e estocado a -20°C, enquanto o pellet, rico em membranas livres de fosfatase alcalina, foi ressuspense em um mesmo

volume de tampão Tris.HCl 5 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM e sacarose 200 mM. Finalmente, alíquotas de 1 mL foram congeladas e estocadas a -20°C, por um período nunca superior a 20 dias sem perda apreciável da atividade.

## **2.6. Determinação da atividade de nucleotídeo fosfatase.**

As atividades de nucleotídeo-5'-trifosfatase (NTFase), nucleotídeo-5'-difosfatase (NDFase) e nucleotídeo-5'-monofosfatase (NMFase) foram determinadas descontinuamente, a 37°C, através da dosagem espectrofotométrica em 355 nm do fosfato inorgânico liberado no sobrenadante, de acordo com o procedimento descrito por Heinonen and Lahti (1981). As condições padrões foram tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM, teofilina 5 mM e NTF (ou NDF ou NMF) 2 mM, em um volume final de 1 mL. A reação enzimática foi iniciada pela adição da enzima e interrompida pela adição de 0,5 mL de solução gelada de TCA 30%. Em seguida os tubos foram colocados em gelo moído para diminuir a hidrólise espontânea do nucleotídeo-fosfato e o precipitado protéico foi eliminado por centrifugação a 4000xg, durante 10 min, imediatamente antes da dosagem do fosfato liberado.

As determinações foram efetuadas em duplicatas, assegurando-se uma hidrólise do substrato sempre inferior à 5%. Uma unidade (U) da enzima foi definida arbitrariamente como sendo a quantidade de enzima que hidrolisa 1 nmol de nucleotídeo-fosfato por minuto, a 37°C.

## **2.7. Determinação da atividade pirofosfatase.**

A atividade de pirofosfatase foi determinada descontinuamente a 37°C, através da liberação do fosfato inorgânico conforme já descrito para a atividade de nucleotídeo fosfatase. As condições padrões foram tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM, teofilina 5 mM e substrato específico 2 mM, em um volume final de 1 mL, usando 20 µg de enzima.



As determinações foram efetuadas em duplicatas, assegurando-se uma hidrólise do substrato sempre inferior a 5%. Uma unidade (U) da enzima foi definida arbitrariamente como sendo a quantidade de enzima que hidrolisa 1 nmol de pirofosfato por minuto, a 37°C.

## **2.8. Determinação da atividade de proteína fosfatase.**

A atividade de proteína fosfatase foi determinada descontinuamente a 37° C, através da liberação do fosfato inorgânico conforme descrito para a atividade de nucleotídeo fosfatase, usando-se O-fosfoserina, O-fosfotirosina e O-fosfotreonina como substratos. As condições padrões foram tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM, teofilina 5 mM e substrato específico 2 mM, em um volume final de 1 mL, usando 20 µg de enzima.

As determinações foram efetuadas em duplicatas, assegurando-se uma hidrólise do substrato sempre inferior a 5%. Uma unidade (U) da enzima foi definida arbitrariamente como sendo a quantidade de enzima que hidrolisa 1 nmol de O-fosfoaminoácido por minuto, a 37°C.

## **2.9. Determinação da atividade fosfatase não específica.**

A atividade de fosfatase não específica foi determinada continuamente, a 37° C, em um espectrofotômetro Hitachi U-3000, equipado com células termostalizadas, através da formação do íon p-nitrofenolato ( $\epsilon = 13160 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), em 410 nm. As condições padrões foram tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM, teofilina 5 mM e PNFF nas concentrações de 2 e 5 mM, em um volume final de 1 mL. Em cada ensaio foram usados 20 µg de enzima.

As determinações foram efetuadas em duplicatas, assegurando-se uma hidrólise do substrato sempre inferior a 5%. Uma unidade (U) da enzima foi definida



arbitrariamente como sendo a quantidade de enzima que hidrolisa 1 nmol de substrato por minuto, a 37°C.

#### **2.10. Determinação da atividade fosfodiesterase.**

A atividade fosfodiesterase foi determinada continuamente, a 37° C, em um espectrofotômetro Hitachi U-3000, equipado com células termostalizadas, através da formação do íon p-nitrofenolato ( $\epsilon = 13160 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), em 410 nm. As condições padrões foram: tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo  $\text{MgCl}_2$  2 mM, teofilina 5 mM e Bis-p-nitrofenilfosfato (Bis-PNFF) 2 e 5 mM, em um volume final de 1 mL. Em cada ensaio foram utilizados 20  $\mu\text{g}$  de enzima.

As determinações foram efetuadas em duplicatas, assegurando-se uma hidrólise do substrato sempre inferior a 5%. Uma unidade (U) da enzima foi definida arbitrariamente como sendo a quantidade de enzima que hidrolisa 1 nmol de Bis-PNFF por minuto, a 37°C.

#### **2.11. Efeito do pH ótimo aparente sobre a hidrólise do ATP e ADP.**

O efeito do pH ótimo aparente sobre a hidrólise do ATP e ADP, pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato livre de fosfatase alcalina, foi estudado utilizando-se tampão Mes 50 mM no intervalo de pH entre 5,5-7,0, o Tris.HCl 50 mM entre 7,0-8,5 e AMPOL 50 mM entre 8,5-11,0. Independentemente do tampão, os ensaios foram realizados na presença de  $\text{MgCl}_2$  2 mM e teofilina 5 mM. O pH de cada mistura foi medido antes e imediatamente após a reação e somente foram considerados os resultados onde o pH não sofreu variações maiores que 0,05 unidades. A reação foi iniciada pela adição de 20  $\mu\text{g}$  enzima e as atividades ATPase e ADPase foram determinadas conforme descrito anteriormente.

### **2.12. Efeito de íons magnésio e cálcio na hidrólise do ATP e ADP.**

O estudo do efeito de íons magnésio (ou cálcio) na hidrólise do ATP e ADP, pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato livre de fosfatase alcalina, foi estudado numa faixa de concentração compreendida entre 1  $\mu$ M à 10 mM. As condições padrões foram tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo ATP (ou ADP) 2 mM e teofilina 5 mM, em um volume final de 1 mL, usando 20  $\mu$ g de enzima.

### **2.13. Efeito do tempo na hidrólise do ATP e ADP.**

O estudo do efeito do tempo na hidrólise do ATP e ADP, pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato livre de fosfatase alcalina, foi realizado num intervalo de tempo compreendido entre 0 a 10 min. A hidrólise do ATP e ADP foi determinada a 37°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM e teofilina 5 mM, conforme descrito anteriormente, usando 20  $\mu$ g de enzima.

### **2.14. Efeito da concentração da azida de sódio sobre a hidrólise do ATP e ADP.**

O efeito da concentração da azida de sódio sobre a hidrólise do ATP e ADP, pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato livre de fosfatase alcalina, foi estudado numa faixa de concentração compreendida entre 0 à 20 mM. A hidrólise do ATP e ADP foi determinada a 37°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM e teofilina 5 mM, conforme descrito anteriormente, usando 20  $\mu$ g de enzima.

### **2.15. Efeito da concentração da suramina sobre a hidrólise do ATP e ADP.**

O efeito da concentração da suramina sobre a hidrólise do ATP e ADP, pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato livre de fosfatase alcalina, foi estudado numa faixa de concentração compreendida entre 1 à 1000  $\mu$ M. A hidrólise do

ATP e ADP foi determinada a 37°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM e teofilina 5 mM, conforme descrito anteriormente, usando 20 µg de enzima.

#### **2.16. Verificação da existência de múltiplos sítios de hidrólise para o ATP e ADP na enzima.**

Este experimento foi realizado para demonstrar inequivocamente que a hidrólise simultânea do ATP e ADP pela enzima pode ser interpretada como reações competitivas que ocorrem no mesmo sítio e com isso, eliminar a possibilidade de ocorrerem em sítios múltiplos. Para isso foi planejado um protocolo conforme descrito por Chevillard et al. (1993). Foram escolhidas concentrações de ATP (70 µM) e ADP (1 mM) que apresentam velocidades aproximadamente iguais. Entre estas duas concentrações extremas, foram preparados meios de reação contendo diferentes proporções, P, entre estas concentrações limites de ADP e ATP. Assim, uma proporção P= 0,2 significa que no meio de reação existe 20% de ADP e 80% de ATP.

A hidrólise do ATP e ADP foi determinada a 37°C, através da liberação do fosfato conforme descrito anteriormente, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM e teofilina 5 mM, usando-se 20 µg de enzima.

#### **2.17. Dosagem de proteínas.**

A dosagem de proteína foi efetuada através do método descrito por Hartree (1972), utilizando a soroalbumina bovina como padrão.

#### **2.18. Efeito de inibidores na hidrólise do ATP pela ATP-difosfohidrolase.**

As condições padrões para determinar o efeito de inibidores na hidrólise do ATP, pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato livre de fosfatase alcalina, foram tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM, teofilina 5 mM e ATP 2 mM, em um volume final de 1 mL, usando-se 20 µg de enzima. Os inibidores

oligomicina, ouabaína, omeprazol, vanadato, ácido etacrínico, levamisol e EDTA foram preparados em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5. O Ap<sub>5</sub>A foi dissolvido em água destilada enquanto a tapsigargina e a bafilomicina foram dissolvidos em DMSO.

## 2.19. Tratamento dos resultados cinéticos

Os parâmetros cinéticos de hidrólise de substrato, obtidos nas diferentes condições experimentais, K<sub>M</sub> (constante de Michaelis), K<sub>0,5</sub> (constante de dissociação), V (velocidade máxima), n (coeficiente de Hill), foram ajustados empregando-se o programa SIGRAF (Leone et al., 1992b), em um microcomputador IBM Pentium. Quando necessário, foi usada a soma de duas equações de Hill, para a obtenção do melhor ajuste dos dados:

$$v = \frac{V_1 \cdot [S]^{n_1}}{(K_{0,5})^{n_1} + [S]^{n_1}} + \frac{V_2 \cdot [S]^{n_2}}{(K_{0,5})^{n_2} + [S]^{n_2}}$$



### 3. RESULTADOS

O processo de purificação da enzima de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina, mostrou que a razão da velocidade de hidrólise do ATP/velocidade de hidrólise do ADP permanece constante (2,4) em todas as etapas das preparações realizadas. Esta similaridade entre as atividades ATPase e ADPase sugere que elas correspondem a mesma enzima, uma ATP-difosfohidrolase ou apirase.

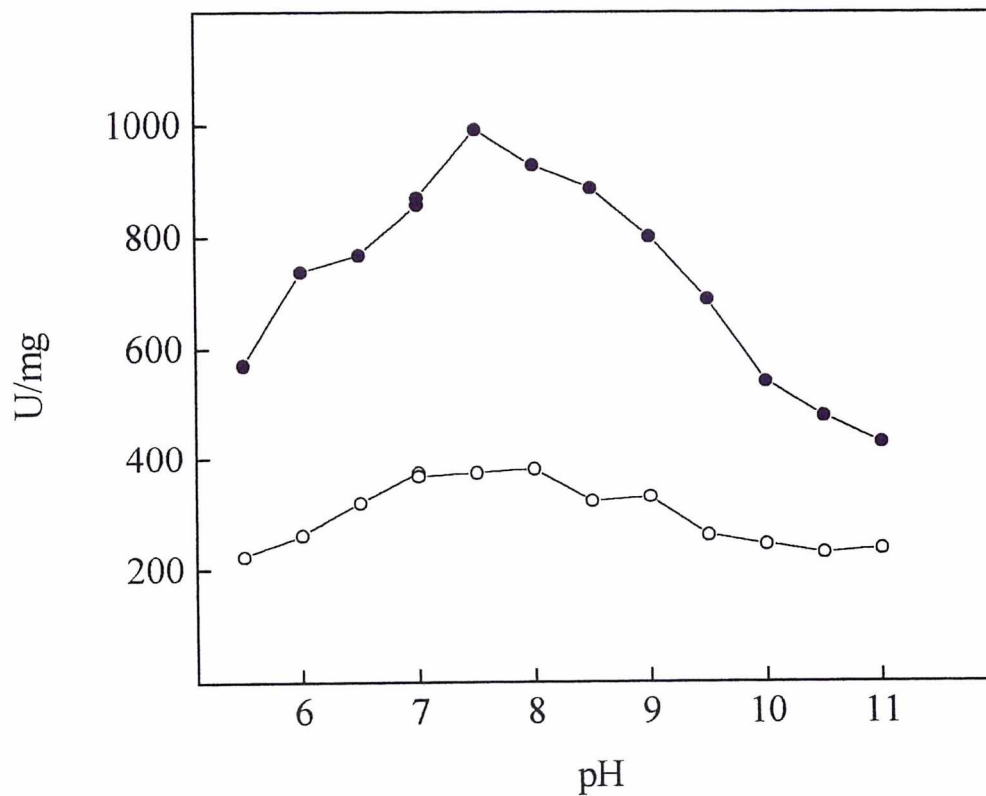
A figura 1 mostra o efeito do pH ótimo aparente sobre a hidrólise do ATP e ADP pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina. A enzima apresentou um pH ótimo aparente da ordem de 7,5 para ambos substratos. Além disso, pode-se observar que o perfil da atividade versus pH é muito semelhante tanto para a hidrólise do ATP como do ADP.

O estudo do efeito do tempo de hidrólise do ATP e ADP, pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina, é mostrado na figura 2. Os dados desta figura mostram que ATP e ADP foram hidrolisados por um único sítio comum existente na molécula da enzima descartando a possibilidade da existência de uma ADPase além da ATPase. Essa interpretação resulta do fato de que na presença simultânea dos dois substratos presentes em concentrações iguais às utilizadas isoladamente, a velocidade de produção de fosfato inorgânico foi intermediária à observada para a formação de fosfato inorgânico quando cada substrato foi usado isoladamente. Se duas enzimas diferentes estivessem envolvidas na reação, a velocidade de hidrólise correspondente à mistura dos dois substratos deveria ser a soma dos valores encontrados para cada um dos substratos isoladamente.

A figura 3 mostra o efeito da concentração de teofilina sobre a hidrólise do ATP e ADP pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato livre de fosfatase alcalina. A semelhança das curvas obtidas sugere que a teofilina não afeta a hidrólise de ambos os substratos pelo menos até concentrações da ordem de 7 mM.

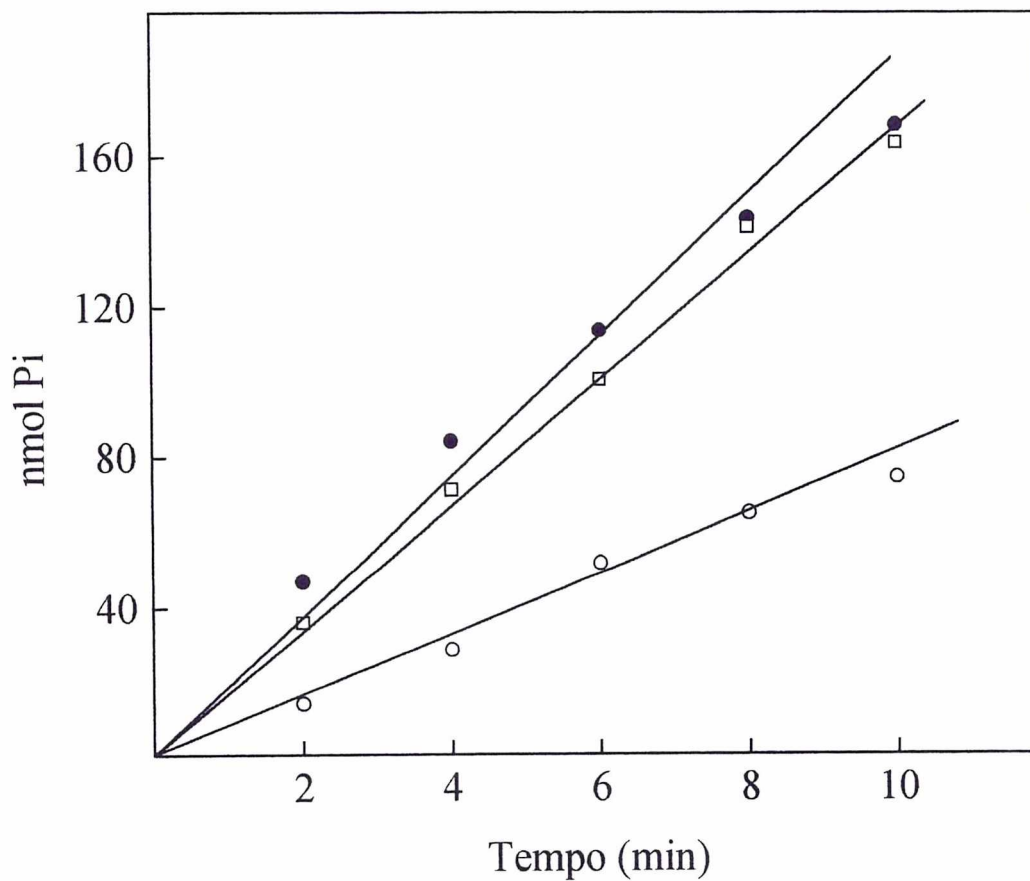
**Figura 1. Efeito do pH ótimo aparente sobre a hidrólise do ATP e ADP pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina.**

As atividades foram determinadas a 37°C, em tampão MES 50 mM no intervalo de pH entre 5,5-7,0, entre 7,0-8,5 o Tris.HCl 50 mM e entre 8,5-11,0, o AMPOL 50 mM. Todos os tampões continham MgCl<sub>2</sub> 2 mM e teofilina 5 mM, usando 20 µg de proteína. (●) 2 mM ATP. (○) 2 mM ADP.



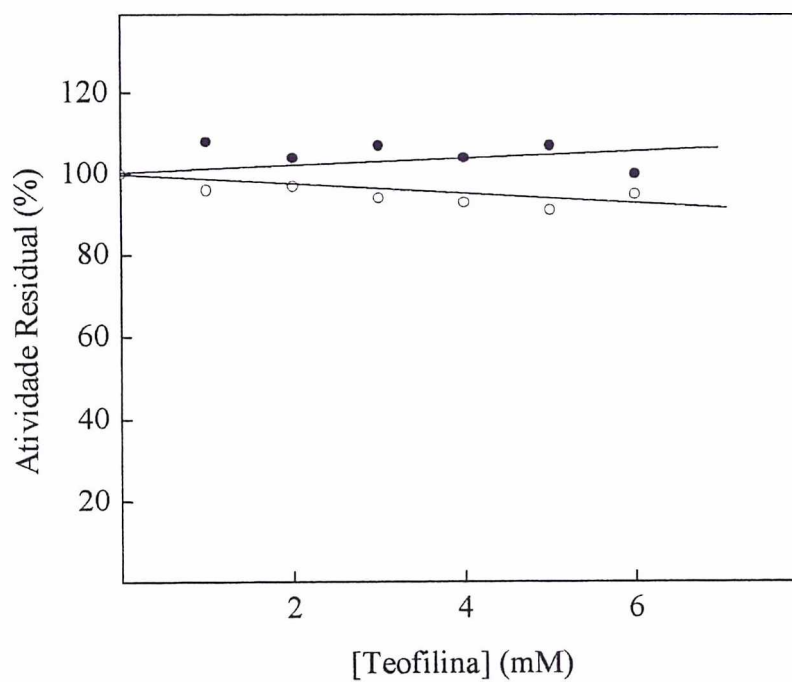
**Figura 2. Efeito do tempo na hidrólise do ATP e ADP pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina.**

As medidas de velocidade inicial foram realizadas a 37°C, em tampão HEPES 50 mM, pH 7,5, contendo teofilina 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, usando 20 µg de proteína. (●) ATP 2.0 mM, (○) ADP 2 mM, (□) ATP 2 mM mais ADP 2 mM.



**Figura 3. Efeito da concentração de teofilina sobre a hidrólise do ATP e ADP pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina.**

As medidas de velocidade inicial foram realizadas a 37°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM, numa faixa de concentração compreendida entre 0 a 7 mM de teofilina, usando 20 µg de proteína. (●) 2 mM ATP. (○) 2 mM ADP.





O efeito da azida de sódio, um inibidor de ATP-difosfohidrolase, na hidrólise do ATP e ADP pela enzima de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina é mostrado na figura 4. A hidrólise do ATP é inibida cerca de 50% por concentrações de azida de sódio da ordem de 7,5 mM, enquanto para a hidrólise do ADP, a concentração de azida de sódio que inibe cerca de 50% da atividade é de apenas 2,5 mM. Essa similaridade observada também é uma forte evidência de que ambos os substratos são hidrolisados pelo mesmo sítio catalítico. O fato de se necessitar uma maior concentração de azida para inibir 50% da atividade ATPase poderia ser atribuído à maior afinidade de enzima pelo ATP, quando comparada com o ADP.

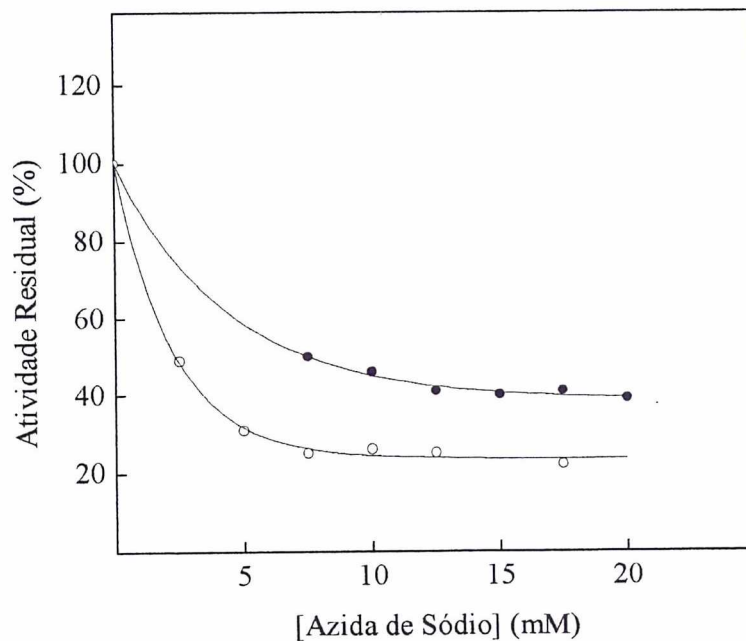
A figura 5 mostra o efeito da concentração do ATP e ADP na atividade da ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina, na presença de  $MgCl_2$  2 mM. A hidrólise do ATP ocorreu através de uma única família de sítios de hidrólise com  $n= 1,0$ ,  $V= 1.278,7$  U/mg e  $K_M= 83,3$   $\mu M$ . Para a hidrólise do ADP, também foi observada uma única família de sítios com  $n= 1,0$ ,  $V= 473,9$  U/mg e  $K_M= 150,6$   $\mu M$ . De acordo com esses resultados, a velocidade de hidrólise do ADP representa cerca de 40% a do ATP, enquanto a afinidade ( $V/K_M$ ) da enzima para o ATP (15,35 U/mg/ $\mu M$ ) é cerca de 5 vezes maior que para o ADP (3,14 U/mg/ $\mu M$ ).

A hidrólise do d-ATP pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea livre de fosfatase alcalina, na presença de  $MgCl_2$  2 mM, é mostrada na figura 6. A hidrólise ocorreu através de duas famílias de sítios: uma de alta afinidade (onde a concentração do substrato varia entre  $5 \cdot 10^{-6}$  e  $1 \cdot 10^{-3}$  M) que apresentam  $V= 1.005,5$  U/mg,  $K_{0,5}= 98,2$   $\mu M$  e  $n= 1,2$  e outra de baixa afinidade (entre  $1 \cdot 10^{-3}$  e  $2 \cdot 10^{-3}$  M) que apresentam  $V_m= 262,9$  U/mg,  $K_{0,5}= 1.962,4$   $\mu M$  e  $n= 4,1$ . Observa-se ainda que os sítios de alta afinidade representam cerca de 80% da velocidade máxima, enquanto os sítios de baixa afinidade apenas 20%.

O efeito da concentração do CTP e CDP na atividade da ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina, na presença de  $MgCl_2$  2 mM é mostrado na figura 7. A hidrólise do CTP ocorreu através de uma única família de sítios com  $n= 1,0$ ,  $V= 871,0$  U/mg e  $K_M = 148,3$   $\mu M$ . Para a hidrólise do CDP, a enzima

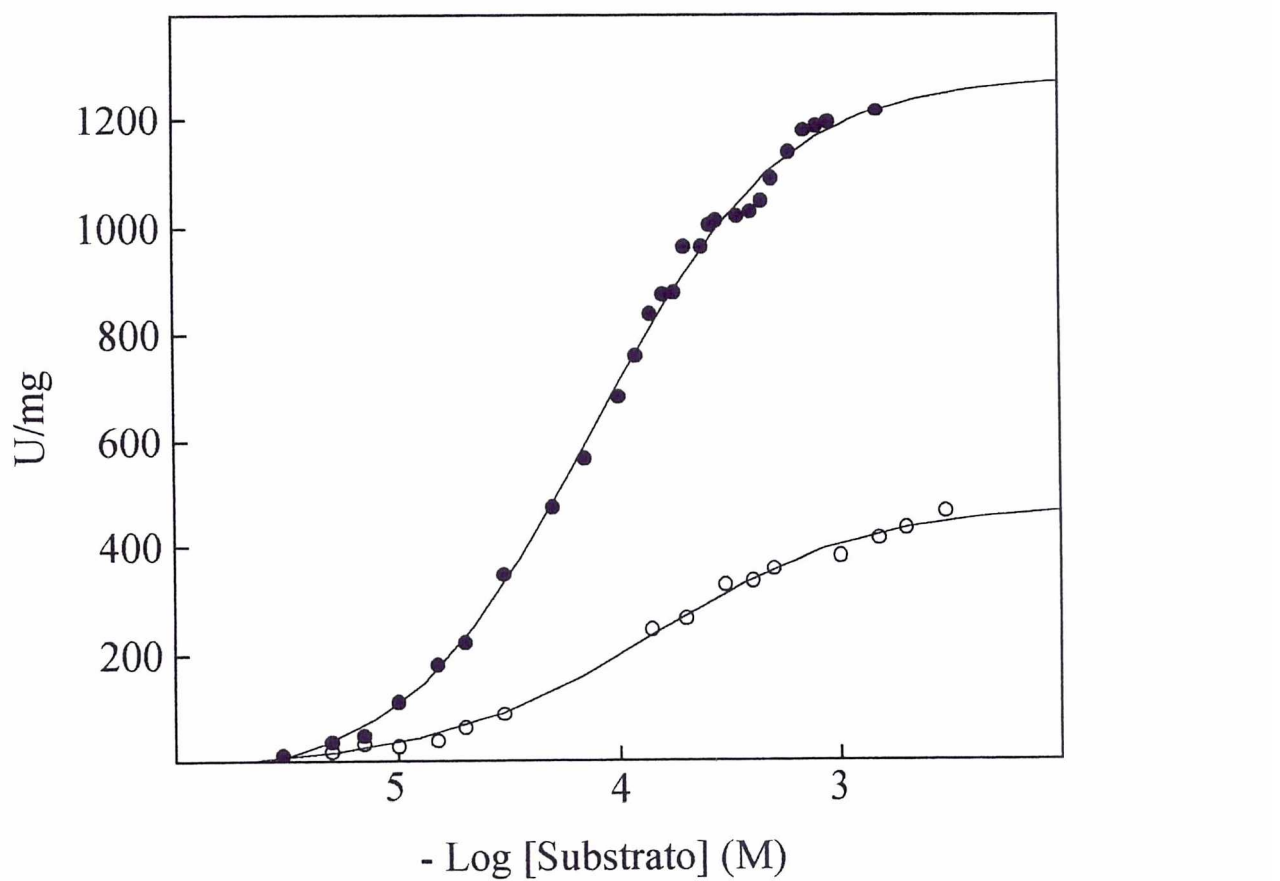
**Figura 4. Efeito da concentração da azida de sódio sobre a hidrólise do ATP e ADP pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina.**

As medidas de velocidade inicial foram realizadas a 37°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo teofilina 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, numa faixa de concentração compreendida entre 0 a 20 mM de azida de sódio, usando 20 µg de proteína. (●) ATP 2 mM. (○) ADP 2 mM.



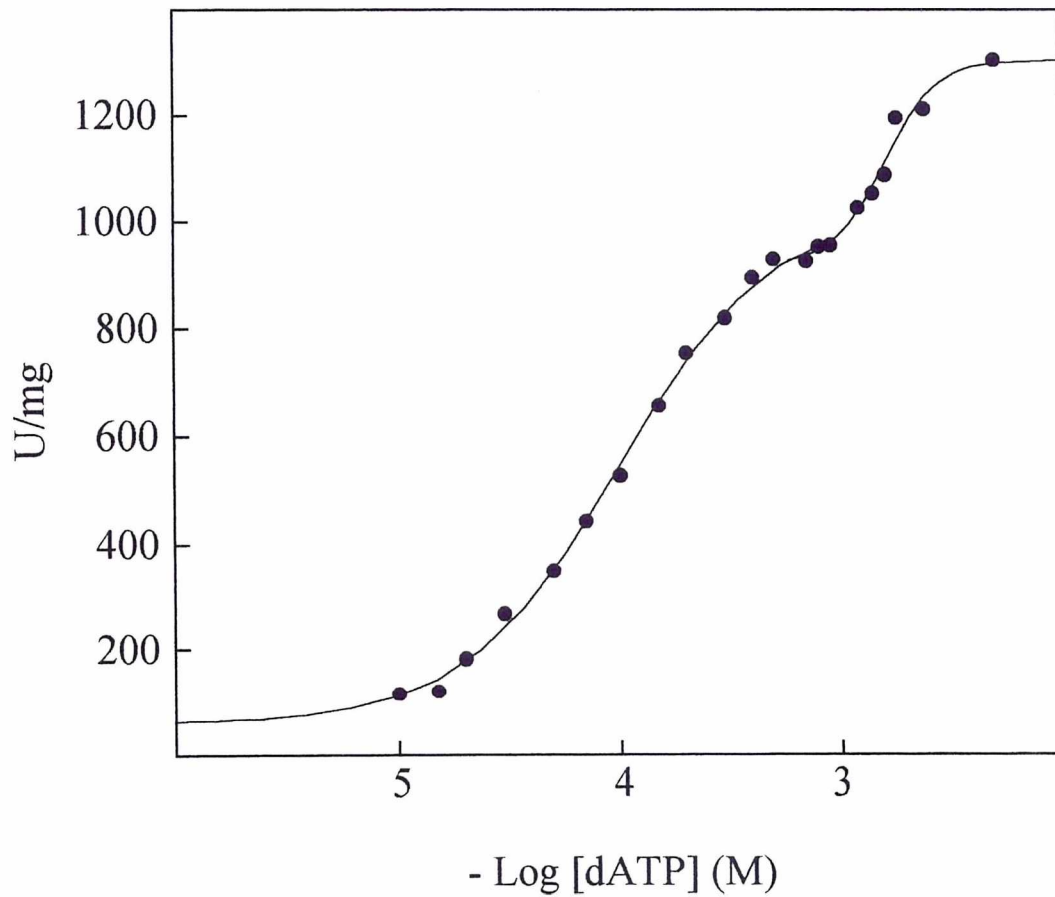
**Figura 5. Hidrólise do ATP e ADP pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina.**

As atividades foram determinadas a 37°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM, teofilina 5 mM, usando 20 µg de proteína. (●) ATP. (○) ADP.



**Figura 6. Hidrólise do d-ATP pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina.**

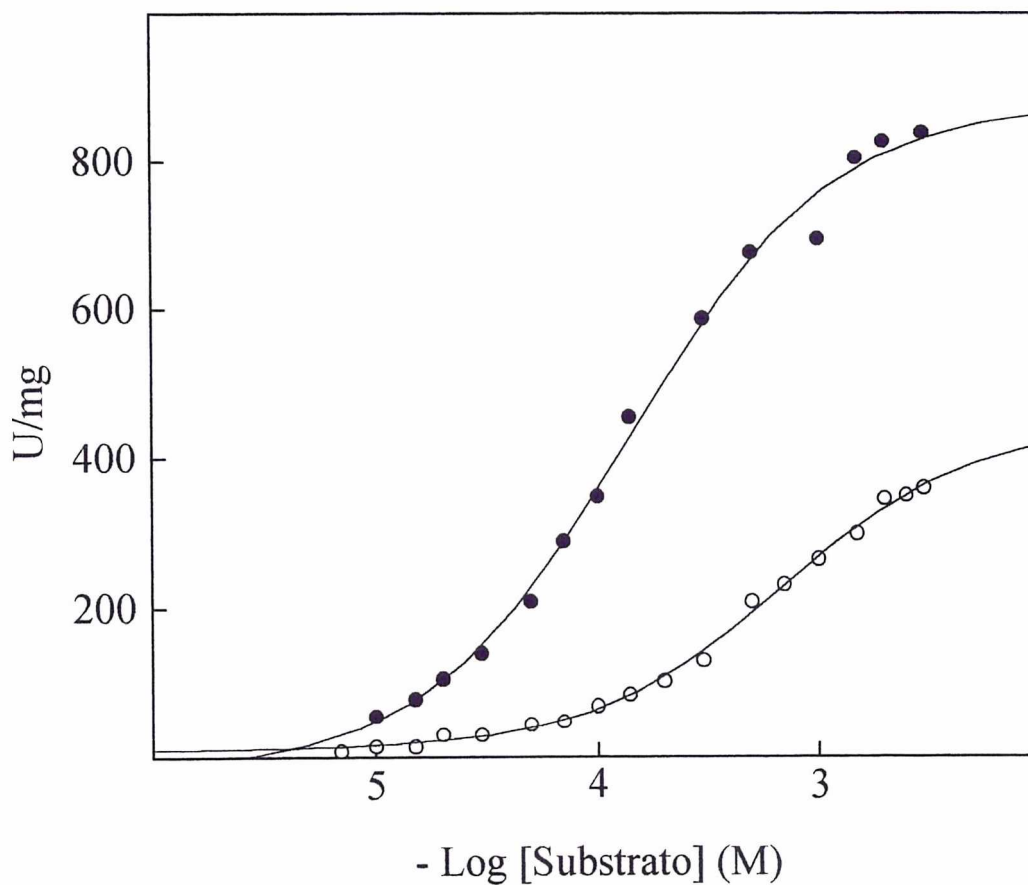
As atividades foram determinadas a 37°C, em tampão HEPES 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM, teofilina 5 mM, usando 20 µg de proteína.





**Figura 7. Hidrólise do CTP e CDP pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina.**

As atividades foram determinadas a 37°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM, teofilina 5 mM, usando 20 µg de proteína. (●) CTP. (○) CDP.



Também apresentou uma única família de sítios cujos parâmetros cinéticos foram  $n = 1,0$ ,  $V = 477,7 \text{ U/mg}$  e  $K_M = 777,5 \text{ } \mu\text{M}$ . As velocidades de hidrólise do CTP e CDP representam cerca de 68 e 37%, em relação ao ATP, respectivamente. A afinidade pelo CTP ( $5,87 \text{ U/mg}/\mu\text{M}$ ) é cerca de 10 vezes maior que para a observada para o CDP ( $0,61 \text{ U/mg}/\mu\text{M}$ ), isto é, cerca de 2 vezes maior que a observada para o ATP em relação ao ADP.

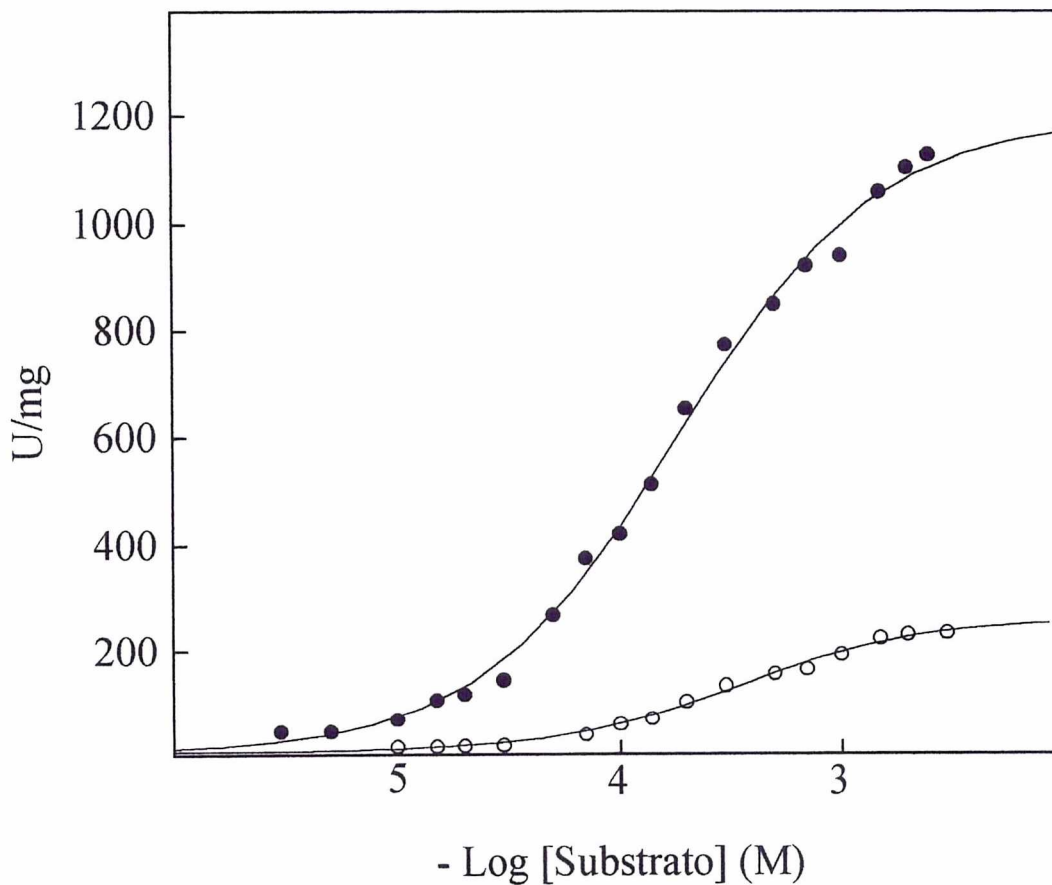
A figura 8 mostra o efeito da concentração do GTP e GDP na atividade da ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina, na presença de  $\text{MgCl}_2$  2 mM. A hidrólise do GTP ocorreu através de uma única família de sítios de ligação, com  $n = 1,0$ ,  $V = 1.143,0 \text{ U/mg}$  e  $K_M = 164,0 \text{ } \mu\text{M}$ . O mesmo foi observado para a hidrólise do GDP, onde a enzima também apresentou uma única família de sítios mas com  $n = 1,0$ ,  $V = 268,1 \text{ U/mg}$  e  $K_M = 357,3 \text{ } \mu\text{M}$ . A velocidade de hidrólise do GTP é cerca de 90% em relação à hidrólise do ATP, enquanto para o GDP, ela é de apenas 20% em relação a do ATP. Neste caso, a afinidade da enzima pelo GTP ( $6,96 \text{ U/mg}/\mu\text{M}$ ) é cerca de 9 vezes maior que para o GDP ( $0,75 \text{ U/mg}/\mu\text{M}$ ).

O efeito da concentração do ITP e IDP na atividade da ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina, na presença de  $\text{MgCl}_2$  2 mM é mostrado na figura 9. A hidrólise do ITP também ocorreu através de uma única família de sítios que apresentaram  $n = 1,0$ ,  $V = 1.407,7 \text{ U/mg}$  e  $K_M = 259,5 \text{ } \mu\text{M}$ . Embora para a hidrólise do IDP, a enzima também apresentou uma única família de sítios, os parâmetros cinéticos foram significativamente diferentes, isto é,  $n = 1,0$ ,  $V = 653,5 \text{ U/mg}$  e  $K_M = 622,6 \text{ } \mu\text{M}$ . Conforme pode ser calculado através dos valores dos parâmetros cinéticos obtidos, a afinidade da enzima pelo ITP ( $5,42 \text{ U/mg}/\mu\text{M}$ ) é cerca de 5 vezes maior que para o IDP ( $1,04 \text{ U/mg}/\mu\text{M}$ ).

A figura 10 mostra o efeito da concentração do UTP e UDP na atividade da ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina. A hidrólise do UTP apresentou uma única família de sítios de ligação, com  $n = 1,0$ ,  $V_m = 1.143,4 \text{ U/mg}$  e  $K_{0,5} = 207,0 \text{ } \mu\text{M}$ . A hidrólise do UDP pela enzima também ocorreu

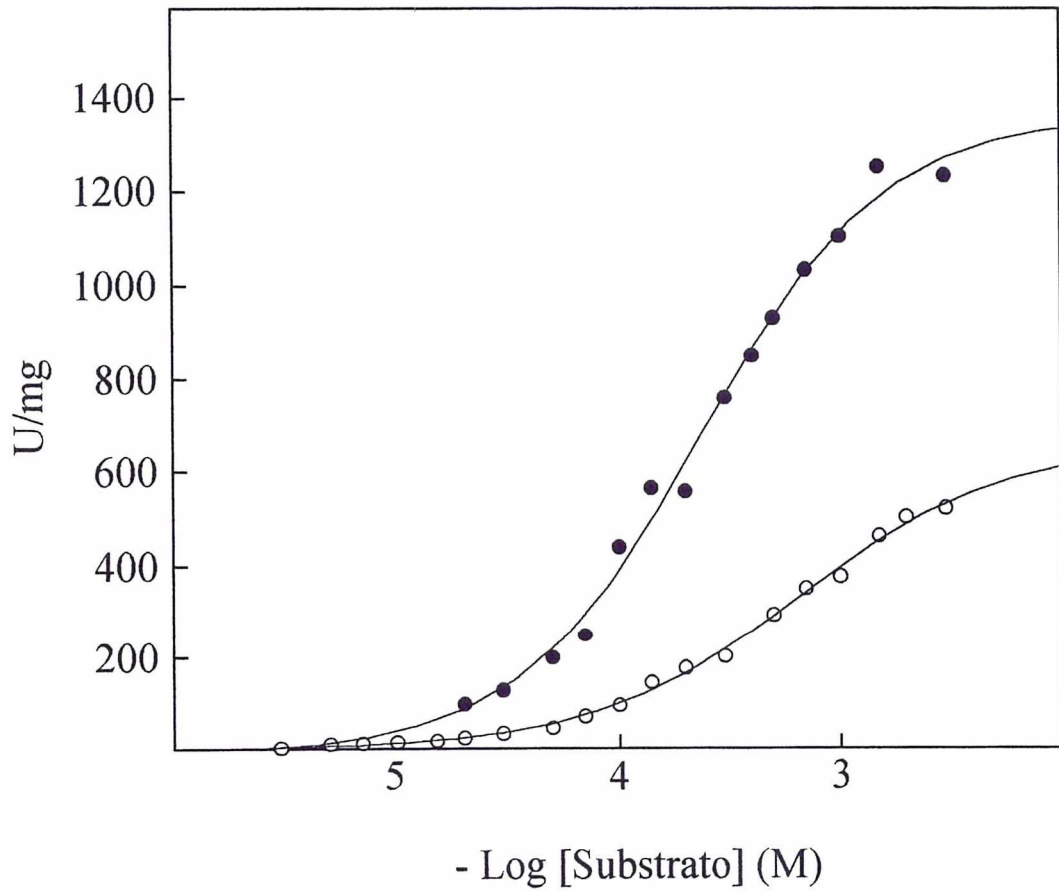
**Figura 8. Hidrólise do GTP e GDP pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina.**

As atividades foram determinadas a 37°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM, teofilina 5 mM, usando 20 µg de proteína. (●) GTP. (○) GDP.



**Figura 9. Hidrólise do ITP e IDP pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina.**

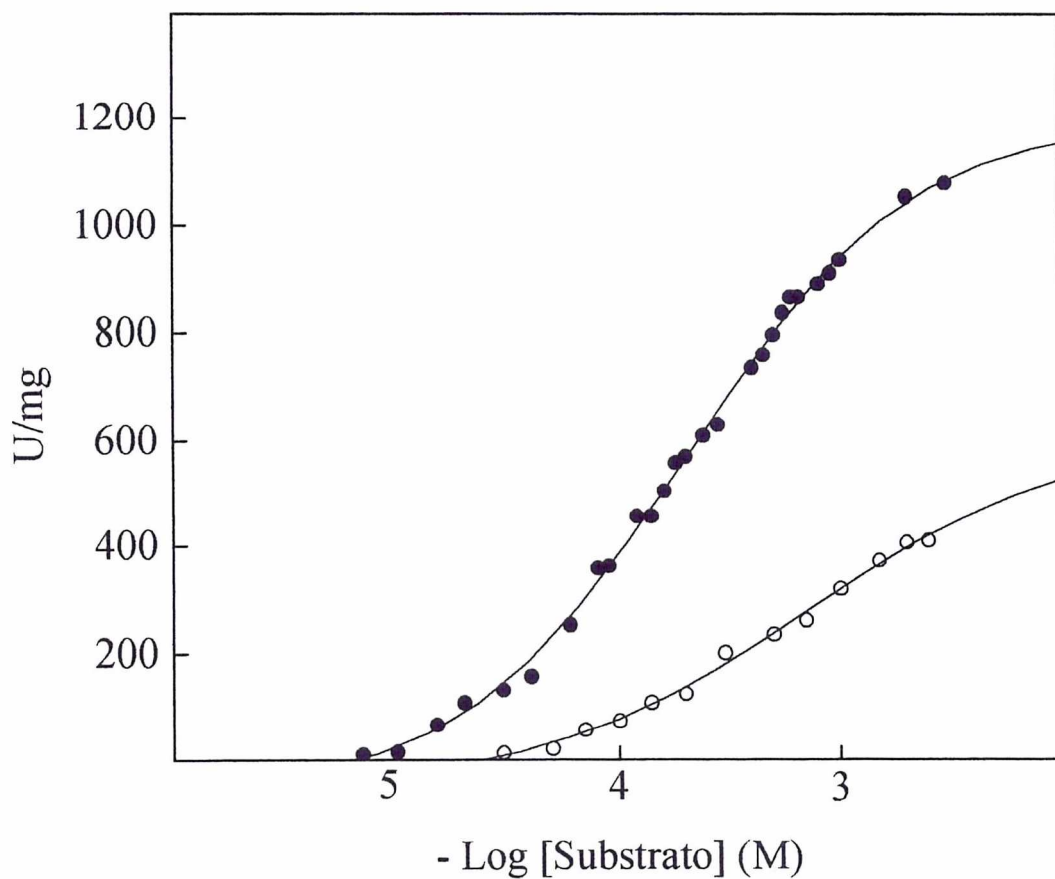
As atividades foram determinadas a 37°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM, teofilina 5 mM, usando 20 µg de proteína. (●) ITP. (○) IDP.





**Figura 10. Hidrólise do UTP e UDP pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina.**

As atividades foram determinadas a 37°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM, teofilina 5 mM, usando 20 µg de proteína. (●) UTP. (○) UDP.



Através de uma única família de sítios que apresentam  $n= 1,0$ ,  $V= 502,0$  U/mg e  $K_M= 554,7$   $\mu$ M. Para esses substratos, a velocidade de hidrólise do UTP é cerca de 90% em relação à hidrólise do ATP, enquanto para o UDP ela é apenas 40% daquela do ATP. A afinidade da enzima para o UTP (5,52 U/mg/ $\mu$ M) é cerca de 6 vezes maior que para o UDP (0,90 U/mg/ $\mu$ M).

A Tabela 1 resume os valores dos parâmetros cinéticos calculados para a hidrólise dos diferentes substratos hidrolisados pela enzima. Exceto para o GTP, fica bastante claro que a atividade NTFase geralmente é quase duas vezes maior que a correspondente NDFase. Por outro lado, a atividade NMFase geralmente é nula ou desprezível como no caso do AMP onde esse valor é da ordem de 3% em relação à atividade ATPase.

Um critério para se estabelecer a classificação de uma ATP-difosfohidrolase ou apirase é a ampla especificidade de substrato. Para que seja proposta a presença de uma ATP-difosfohidrolase é de grande importância a avaliação de enzimas contaminantes que podem mimetizar sua atividade. Os dados da Tabela 1 excluem a possibilidade dos NTF e NDF serem hidrolisados pela ação de fosfatases não específicas. Essa possibilidade é confirmada pelo fato da enzima de membrana de placa óssea de rato livre de fosfatase alcalina não hidrolisar a glicose-1-fosfato, glicose-6-fosfato, p-nitrofenilfosfato e  $\beta$ -glicerofosfato, substratos frequentemente utilizados na caracterização de fosfatases não específicas. Uma possível associação de uma ATP-pirofosfatase (EC 3.6.1.8) e uma pirofosfatase inorgânica (EC 3.6.1.1), também foi excluída uma vez que uma quantidade inexpressiva de fosfato inorgânico foi liberada quando o pirofosfato foi usado como substrato em substituição ao ATP e ADP. A presença de uma possível contaminação por uma fosfodiesterase também foi eliminada uma vez que velocidades relativas da ordem de 3 a 4% foram observadas para tais substratos. Finalmente, a presença de uma proteína fosfatase também foi excluída uma vez que velocidades relativas da ordem de 1% foram observadas na presença dos fosfoaminoácidos O-fosfoserina, O-fosfotirosina e O-fosfotreonina.

**Tabela 1. Especificidade de substrato da ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina.**

As velocidades iniciais foram determinadas a 37°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM e teofilina 5 mM.

Substrato	V (U/mg)	K <sub>M</sub> (μM)	n	V/K <sub>M</sub>	V/V <sub>ATP</sub>
ATP	1.278,7	83,3	1,0	15,3	1,00
ADP	473,9	150,6	1,0	3,2	0,37
CTP	871,0	148,3	1,0	5,9	0,68
CDP	477,7	777,5	1,0	0,6	0,37
GTP	1.143,0	164,0	1,0	7,0	0,89
GDP	268,1	357,3	1,0	0,7	0,21
ITP	1.407,7	259,5	1,0	5,4	1,10
IDP	653,5	622,6	1,0	1,0	0,51
UTP	1.143,4	207,0	1,0	5,5	0,89
UDP	502,0	554,7	1,0	0,9	0,39
AMP	42,2	-	-	-	0,03
CMP	0,0	-	-	-	0,00
GMP	0,0	-	-	-	0,00
IMP	0,0	-	-	-	0,00
UMP	0,0	-	-	-	0,00
PNFF	38,0	-	-	-	0,03
Bis-PNFF	58,4	-	-	-	0,04
β-Glicerofosfato	11,5	-	-	-	0,01
Pirofosfato	34,7	-	-	-	0,03
Glicose-6-fosfato	38,0	-	-	-	0,03
Glicose-1-fosfato	87,1	-	-	-	0,07
O-fosfoserina	17,6	-	-	-	0,01
O-fosfotreonina	0,0	-	-	-	0,00
O-fosfotirosina	13,6	-	-	-	0,01

Os dados da Tabela 2, que representam os resultados do estudo sistemático da ação de diferentes inibidores sobre a hidrólise do ATP pelas membranas de placa óssea de rato livre de fosfatase alcalina também comprovam a presença de uma ATP-difosfohidrolase nessas membranas. Em condições saturantes de ATP e magnésio, não foi observada nenhuma inibição pela oligomicina, o que descarta a presença de  $F_0F_1$  ATPase contaminante, uma vez que a concentração de inibidor utilizada é efetiva para inibir totalmente esse tipo de ATPase. A presença de  $(Na^+,K^+)$ -ATPase também pode ser descartada uma vez que a preparação de membranas de placa óssea não foi inibida por ouabaína. A ausência de efeito da Bafilomicina  $A_1$ , tapsigargina, omeprazol e ácido etacrínico sugere que a preparação também não apresenta contaminações por V-ATPases, Ca-ATPase,  $H^+$ -ATPase e  $Na^+$  ou  $K^+$ -ATPase, respectivamente. O fato da hidrólise do ATP e ADP não ter sido inibida na presença  $Ap_5A$  sugere que a preparação está livre da contaminação pela adenilato quinase. Por outro lado, os valores obtidos para o vanadato e a teofilina sugerem a presença de uma pequena contaminação em fosfatase alcalina não específica. Isto é devido ao fato de que a remoção da fosfatase alcalina das membranas de placa óssea com fosfolipase C dependente de fosfatidilinositol não é completa, restando sempre uma pequena contaminação nas membranas.

A figura 11 mostra o efeito da concentração do ATP e ADP na atividade da ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina, na presença de  $CaCl_2$  2 mM. A hidrólise do ATP ocorreu através de uma única família de sítios que apresentam  $n= 1,0$ ,  $V= 1.346,5$  U/mg e  $K_M= 85,3$   $\mu$ M. Para a hidrólise do ADP, a enzima também apresentou uma única família de sítios com  $n= 1,0$ ,  $V= 783,9$  U/mg e  $K_M= 196,2$   $\mu$ M. A velocidade de hidrólise do ADP é cerca de 60% em relação à hidrólise do ATP e, a afinidade para o ATP (13 U/mg/ $\mu$ M) é cerca de 4 vezes maior que para o ADP (3,99 U/mg/ $\mu$ M). Esses resultados são muito similares aos obtidos com os íons magnésio, o que sugere que a enzima pode utilizar tanto o íon cálcio como o magnésio durante o seu ciclo catalítico.



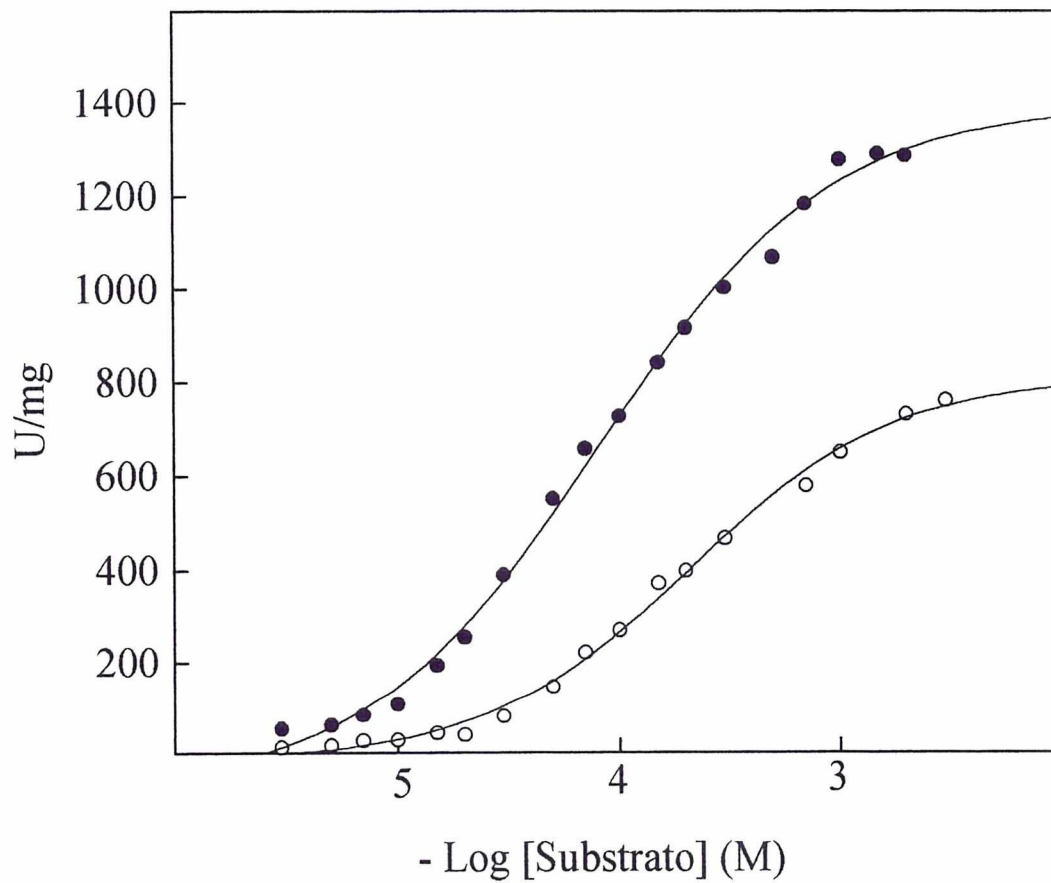
**Tabela 2. Eficiência de vários reagentes na atividade da ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina.**

As velocidades iniciais foram medidas em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo ATP 2 mM e MgCl<sub>2</sub> 2 mM, em um volume final de 1 mL, conforme descrito em Materiais e Métodos.

<b>Inibidor</b>	<b>% Vm</b>
Oligomicina (1 µg/ml)	100,9 ± 5,0
Ouabaína (1 mM)	112,2 ± 5,6
Bafilomicina A <sub>1</sub> (1 µM)	97,2 ± 4,9
Tapsigargina (1 µM)	96,5 ± 6,5
Omeprazol (5 µM)	99,5 ± 1,5
Vanadato (1 mM)	88,1 ± 6,5
Ap <sub>5</sub> A (1 µM)	96,0 ± 2,3
Ap <sub>5</sub> A (1 mM)	96,0 ± 2,9
Ácido etacrínico (2 mM)	90,0 ± 3,1
Suramina (1 mM)	70,1 ± 2,8
Azida de sódio (7,5 mM)	50,0 ± 1,3
Dimetilsulfóxido (10% v/v)	96,0 ± 2,4
Teofilina (5 mM)	91,4 ± 1,8

**Figura 11. Hidrólise do ATP e ADP pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina.**

As atividades foram determinadas a 37°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo CaCl<sub>2</sub> 2 mM, teofilina 5 mM, usando 20 µg de proteína. (●) ATP. (○) ADP.



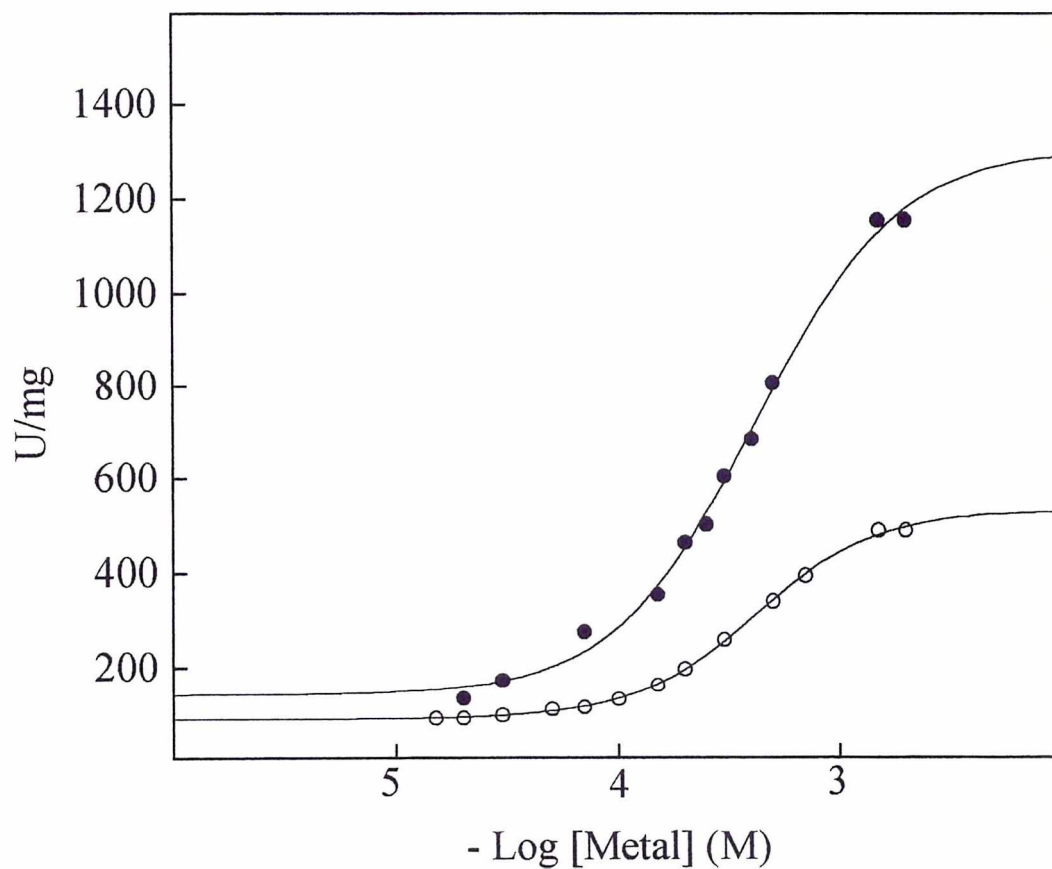
Um aspecto importante a ser observado é que a hidrólise do ATP e ADP, na ausência de íons magnésio ou cálcio, é desprezível (resultados não mostrados). Esses resultados sugerem que os íons cálcio ou magnésio são importantes para o ciclo catalítico da enzima.

O efeito da concentração dos íons magnésio sobre a hidrólise do ATP e ADP pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina, é mostrado na figura 12. A hidrólise do ATP ocorreu através de uma única família de sítios de ligação que apresentam  $n = 1,0$ ,  $V = 1.567,2$  U/mg e  $K_{0,5} = 595,3$   $\mu$ M. A hidrólise do ADP também ocorreu através de uma única família de sítios que apresentam  $n = 1,5$ ,  $V = 458,2$  U/mg e  $K_{0,5} = 420,6$   $\mu$ M. Pode-se notar que os valores de  $K_{0,5}$  para ambos substratos são muito similares embora a atividade específica da enzima em relação ao ADP é cerca de 30% em relação àquela do ATP.

A figura 13 mostra o efeito da concentração dos íons cálcio sobre a hidrólise do ATP e ADP pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina. A hidrólise do ATP ocorreu através de uma única família de sítios que apresentam  $n = 1,1$ ,  $V = 1.084,7$  U/mg e  $K_{0,5} = 377,8$   $\mu$ M. Para a hidrólise do ADP, também foi observada uma única família de sítios que apresentaram os seguintes parâmetros  $n = 1,2$ ,  $V = 635,1$  U/mg e  $K_{0,5} = 144,3$   $\mu$ M. Embora os valores calculados para a constante de dissociação foram similares para ambos os substratos, a atividade específica da enzima pelo ADP é cerca de 60% em relação aquela observada para o ATP. Experimentos realizados utilizando-se concentrações equimolares de íons cálcio e magnésio mostraram que eles não apresentam efeito sinérgico em relação à atividade da ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina (resultados não mostrados). A tabela 3 resume os valores calculados para os parâmetros cinéticos para a hidrólise do ATP e ADP em diferentes condições de ligantes metálicos. Os resultados obtidos sugerem que cada íon pode substituir o outro durante o ciclo catalítico da enzima.

**Figura 12. Efeito dos íons magnésio sobre a hidrólise do ATP e ADP pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina.**

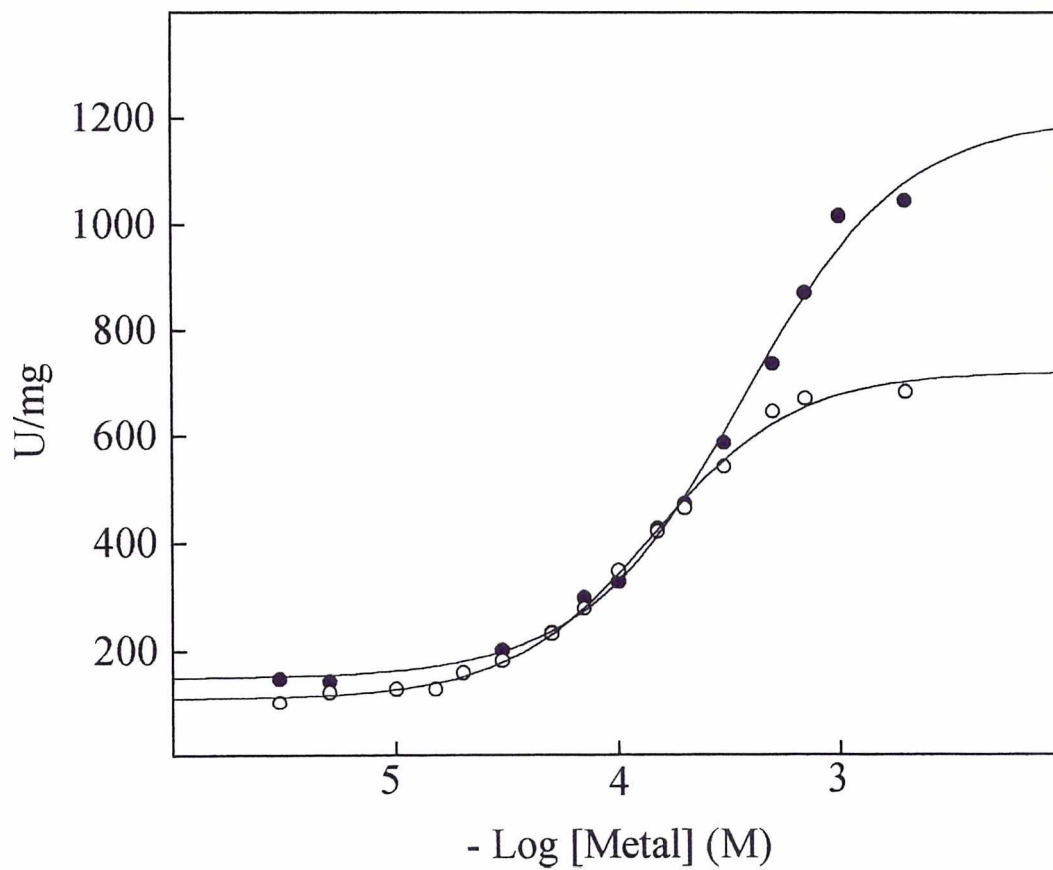
As atividades foram determinadas a 37°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo teofilina 5 mM, usando 20 µg de proteína. (●) ATP 2 mM. (○) ADP 2 mM.





**Figura 13. Efeito dos íons cálcio na hidrólise do ATP e ADP pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina.**

As atividades foram determinadas a 37°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM, teofilina 5 mM, usando 20 µg de proteína. (●) ATP. (○) ADP.



**Tabela 3. Parâmetros cinéticos calculados para a hidrólise do ATP e ADP em diferentes condições de íons magnésio e cálcio pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de ratos livre de fosfatase alcalina.**

As velocidades iniciais foram determinadas a 37°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM e teofilina 5 mM.

[Variável]	Efetor		Parâmetros cinéticos		
	2 mM	V (U/mg)	K <sub>0,5</sub> ou K <sub>M</sub> (μM)	n	
ATP	Mg <sup>2+</sup>	1.278,7	83,3	1,0	
ATP	Ca <sup>2+</sup>	1.346,5	85,3	1,0	
Mg <sup>2+</sup>	ATP	1.567,2	595,3	1,0	
Ca <sup>2+</sup>	ATP	1.084,7	377,8	1,1	
ADP	Mg <sup>2+</sup>	473,9	150,6	1,0	
DP	Ca <sup>2+</sup>	783,9	196,2	1,0	
Mg <sup>2+</sup>	ADP	458,2	420,6	1,5	
Ca <sup>2+</sup>	ADP	635,1	144,3	1,2	

Na tabela 4 foram reunidos os valores calculados da  $V$  para a hidrólise dos diferentes NTF, na presença de íons cálcio ou magnésio 2 mM, pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina. Os resultados mostram que independentemente da natureza do NTF, a estimulação da atividade da enzima por concentrações de cálcio ou magnésio da ordem de 2 mM é muito similar em ambos os casos.

A figura 14 mostra a representação competitiva de Chevillard para a hidrólise de ATP e ADP pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato livre de fosfatase alcalina. Independentemente do valor de  $P$ , as atividades específicas sempre foram da ordem de 400 U/mg, sugerindo inequivocamente que a hidrólise do ATP e ADP representam reações competitivas para um único sítio na enzima. Com isso fica descartada a possibilidade de se tratar de reações independentes (nesse caso a curva seria côncava para baixo) ou reações antagônicas (nesse caso a curva seria côncava para cima e estaria deslocada para o eixo do substrato mais específico para a enzima).

Uma das características que têm sido utilizadas para a caracterização de apirases de vertebrados é a sua sensibilidade a detergentes. Os dados da tabela 5 mostram, como já era esperado, que as atividades de hidrólise do ATP e ADP diminuíram consideravelmente quando os ensaios foram feitos na presença dos seguintes detergentes: polidocanol 1%, Lubrol WX 1,35%, Lubrol PX 1%, CHAPS 2,5%,  $C_{12}E_8$  1%, Triton X-114 1%, Triton X-100 0,2%, n-octil- $\beta$ -D-glicosídeo 30 mM, polioxietileno-5-decil éter 0,5%. De fato, cerca de 80% da atividade de hidrólise do ATP e ADP pela enzima foram perdidas quando da tentativa de solubilização da ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato livre de fosfatase alcalina. Os melhores resultados foram obtidos com a adição conjunta de digitonina e dimiristoil L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (DMPC). Dentre todos os detergentes utilizados, a digitonina, na proporção de 1:1 (mg/mL) com a proteína, foi mais eficaz na solubilização uma vez que cerca de 60% da atividade de hidrólise do ATP e ADP foram perdidas. Os resultados obtidos estão sumariados na tabela 5.

**Tabela 4. Efeito de íons magnésio e cálcio na hidrólise de vários nucleotídeos trifosfatos (NTF) pela ATP difosfohidrolase de membrana de placa óssea, livre de fosfatase alcalina.**

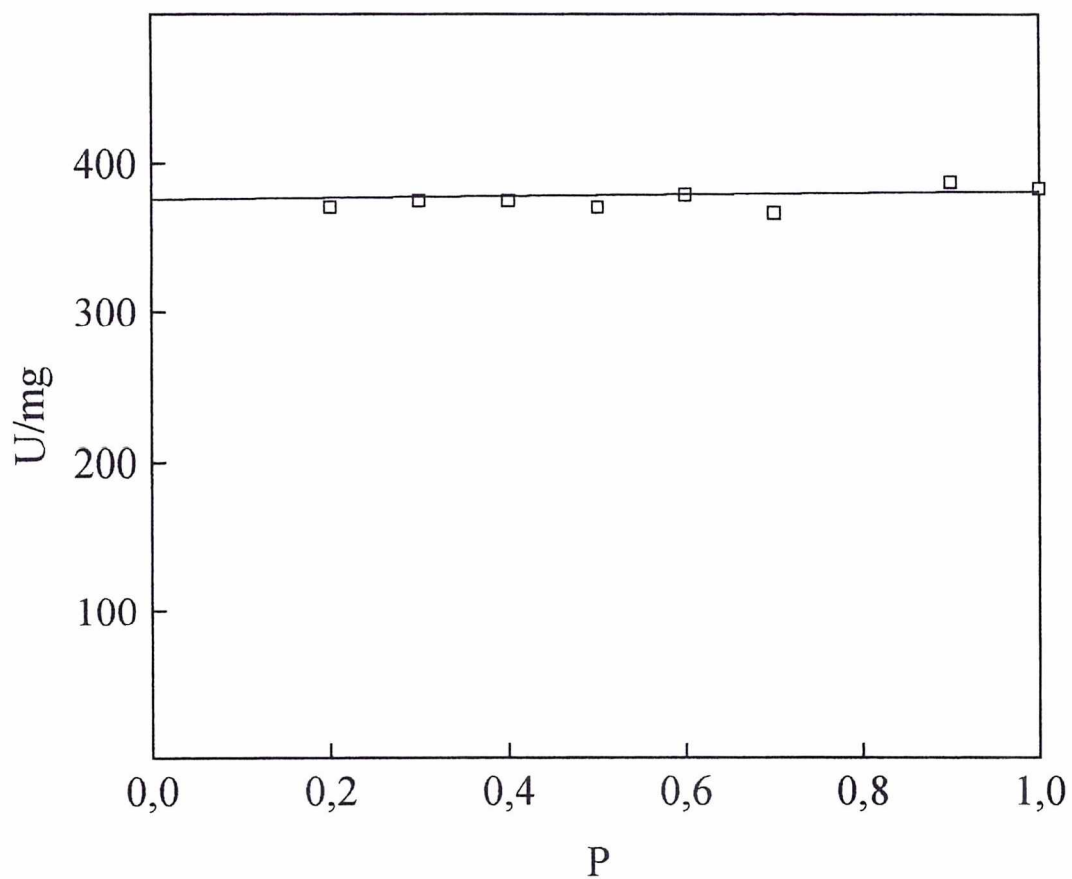
As velocidades iniciais foram medidas a 37°C em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo NTF 2 mM, teofilina 5 mM e MgCl<sub>2</sub> 2 mM ou CaCl<sub>2</sub> 2 mM, em um volume final de 1.0 mL. Atividade específica que corresponde a 100% de atividade ATPase é de 1.252 U/mg.

Substrato	V (U/mg)			
	Mg <sup>2+</sup>	% V <sub>ATP</sub>	Ca <sup>2+</sup>	% V <sub>ATP</sub>
<b>ATP</b>	1252	100	1.209	96,5
<b>DATP</b>	1018	81,3	1.031	82,3
<b>CTP</b>	929	74,2	1.195	95,4
<b>GTP</b>	1039	82,9	1.018	81,3
<b>ITP</b>	1.131	90,3	1.238	98,8
<b>UTP</b>	1.192	95,2	1.185	94,6



**Figura 14. Representação de Chevillard para testar se duas reações ocorrem no mesmo sítio ou em sítios múltiplos de uma enzima.**

As atividades foram determinadas a 37°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub>, teofilina 5 mM, usando 20 µg de proteína.



**Tabela 5. Efeito de diferentes detergentes na hidrólise do ATP e ADP pela ATP difosfohidrolase de membrana de placa óssea livre de fosfatase alcalina.**

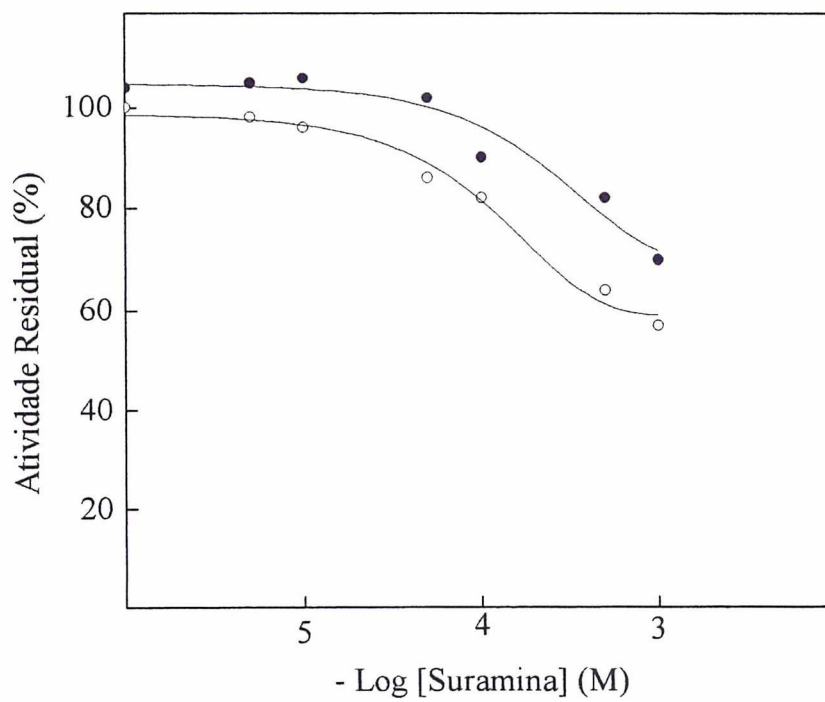
<b>Detergente</b>	<b>Substrato</b>	<b>Controle</b>	<b>Homogenado</b>	<b>Sobrenadante</b>	<b>Pellet</b>
Digitonina	ATP	1144	457,6	59,8	487,8
	ADP	433	173,2	105,4	198,5
Triton X-100	ATP	1144	228,8	36,0	221,8
	ADP	433	86,6	55,1	94,3
Octilglicosídeo 30 mM	ATP	1144	217,4	25,6	64,0
	ADP	433	82,3	24,0	42,0
POEDE 0,5%	ATP	1144	171,6	66,8	66,8
	ADP	-	-	-	-
DMFC + Digitonina	ATP	1144	343,2	209,1	312
C <sub>12</sub> E <sub>8</sub>	ATP	1144	240,2	201,6	178,3
Polidocanol 1%	ATP	1144	234,5	121,9	65,6
Lubrol WX 1,35%	ATP	1144	215,0	55,9	161,2
Lubrol PX 1%	ATP	1144	225,4	121,7	65,4
CHAPS 2,5%	ATP	1144	232,2	109,1	88,2
Triton X-114 1%	ATP	1144	227,6	113,8	59,2

DMFC: Dimiristoil L- $\alpha$ -fosfatidilcolina; Octilglicosídeo: n-octil- $\beta$ -D-glicosídeo;  
POEDE: Polioxietileno-5-decil éter.

A figura 15 mostra o efeito da concentração da suramina, um antagonista P<sub>2</sub>-purinoreceptor, sobre a hidrólise do ATP e ADP pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato livre de fosfatase alcalina. Concentrações da ordem 1 mM inibem cerca de 30% e 40% da hidrólise do ATP e ADP, respectivamente. A semelhança das curvas obtidas para a hidrólise de ambos os substratos também é uma forte evidência de que sejam hidrolisados pelo mesmo sítio catalítico.

**Figura 15. Efeito da concentração da suramina na hidrólise do ATP e ADP pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina.**

As medidas de velocidade inicial foram realizadas a 37°C, em tampão HEPES 50 mM, pH 7,5, contendo MgCl<sub>2</sub> 2 mM, teofilina 5 mM, usando 20 µg de proteína. (●) 2 mM ATP. (○) 2 mM ADP.





#### 4. DISCUSSÃO

ATP-difosfohidrolases (EC 3.6.1.5), comumente chamadas de apirases, são enzimas encontradas nos pro- e eucariotos, em tumores, vírus, bactérias, protozoários (Plesner, 1995; Ribeiro and Garcia, 1980; Ribeiro and Garcia, 1981a; Ribeiro and Garcia, 1981b; Sarkis et al., 1986; Vasconcelos et al., 1993; Knowles et al., 1983; Ribeiro and Garcias, 1979; Mant and Parker, 1981; Ribeiro et al., 1985; Ribeiro et al., 1984; McLaughlin and Muller, 1981; Aley et al., 1980; Bermudes et al., 1994). Os resultados deste trabalho sugerem que a ATPase presente nas membranas de placa óssea de rato é uma apirase que apresenta características semelhantes a outras apirases já descritas em diversos organismos: ampla faixa de especificidade de substrato para nucleotídeos di- e trifosfatos; ausência de atividade sobre substratos nucleotídeos monofosfatos e substratos monofosfatos não nucleotídeos; praticamente a mesma ativação pelos íons cálcio e magnésio; insensibilidade aos inibidores clássicos de ATPase; inibição de azida de sódio em altas concentrações; mesma faixa de pH para NDF e NTF; é facilmente inativada por detergentes; os valores de  $K_m$  (da ordem de 100  $\mu M$ ) são muito similares tanto para o ATP como ADP (Plesner, 1995; Oliveira et al., 1997; Knowles et al., 1983; Zimmermann et al., 1998; Caldwell et al., 1999; Komoszyński and Wojtczak, 1996; Hohmann et al., 1993; Soriani et al., 1995; Mans et al., 1998; Picher et al., 1994; LeBel et al., 1980; Smith and Kirley, 1998; Mita et al., 1998; Sandoval et al., 1996).

As apirases (EC 3.6.1.5) e as ATPases (EC 3.6.1.3) pertencem a um grupo de enzimas que hidrolisam ATP. Entretanto, apesar de ambas as enzimas removerem uma molécula de pirofosfato do ATP, as suas funções fisiológicas parecem ser diferentes. Enquanto as ATPases são enzimas que apresentam uma alta especificidade de substrato, hidrolisando ATP em ADP e ortofosfato e utilizando a energia liberada num processo metabólico ou no transporte de íons, em contraste, as apirases podem hidrolisar nucleotídeo di e/ou trifosfato, liberando AMP e um ou dois ânions ortofosfato, respectivamente.

O valor constante encontrado para a razão entre as velocidades de hidrólise do ATP e ADP em todas as etapas do procedimento de purificação da enzima, da ordem de

2,4, associado a outros resultados, sugere que ambos os substratos são hidrolisados por uma única enzima, uma ATP-difosfohidrolase. A presença de uma outra enzima aparentemente seria sinalizada por mudanças na razão entre as velocidades de hidrólise de ADP e ATP durante o processo de purificação. É importante salientar que embora essa razão constante de velocidade não descarte a possibilidade de ocorrer uma co-purificação de uma ADPase, a combinação deste valor com os demais resultados deste trabalho sugere que inequivocamente não ocorre tal co-purificação. Esse é o caso da ATP-difosfohidrolase de vasos sanguíneos onde durante o processo de purificação não foi possível dissociar a atividade ADPase da atividade ATPase (Sévigny et al., 1997b).

A razão entre as velocidades de hidrólise do ATP e ADP ( $K_{sh}$ ) geralmente varia entre um e dois para a maioria das apirases (Knowles et al., 1983). As ATP-difosfohidrolases apresentam uma velocidade de hidrólise do ADP, frequentemente, próxima daquela do ATP, exibindo, portanto, uma baixa razão ATPase/ADPase. Entretanto essa não é a regra, pois a razão entre as velocidades de hidrólise do ATP e ADP é muito variável para as atividades das ATP-difosfohidrolases de diferentes fontes (Strobel et al., 1996). Isoformas de apirase com alta razão ATPase/ADPase são encontradas em batatas (Molnar and Lorand, 1961; Kettlun et al., 1992). Em células COS-1 transfectadas com HB6, essa razão é de aproximadamente 2,8:1 (Smith and Kirley, 1998). Para as ecto-apirases de neurônio e de astrócito de rato têm sido relatadas razões da ordem de 2:1 e 2,5:1, respectivamente (Wang et al. 1997). Para a CD39 obtida por expressão foram relatadas razões de hidrólise de ATP e ADP da ordem de 1,7:1 e 1,1:1 (Wang and Guidotti, 1996; Kaczmarek et al., 1996). Para sinaptosomas de cérebro de ratos essa razão é da ordem de 2:1 (Battastini et al., 1991). Valores mais altos, da ordem de 5:1 e 6,7:1 foram relatados para as apirases de sarcolema de coração de rato e estômago de frango, respectivamente (Oliveira et al., 1997; Lewis Carl and Kirley, 1997). Em contraste com estes valores, foram relatadas razões ATP:ADP da ordem de 30:1 para as ecto-ATPases isoladas de diferentes fontes (Smith et al., 1997; Kegel et al., 1997; Dombrowski et al., 1997). Desse modo, conforme proposto por Knowles and Nagy (1999), a razão ATPase/ADPase é um critério simples e útil que pode ser utilizado na caracterização de uma ATP-difosfohidrolase.



O pH ótimo para a hidrólise do ADP pela apirase de placa óssea de rato livre de fosfatase alcalina é da ordem de pH 7,5 e é praticamente o mesmo obtido para a hidrólise do ATP nas mesmas condições. Esse valor de pH ótimo em torno da neutralidade é uma característica já relatada para as ATP-difosfohidrolases de diferentes origens (Valenzuela et al., 1989; Komoszyński and Skalska, 1990; Vara and Serrano, 1981; Sarkis and Salto, 1991; Picher et al., 1993; Picher et al., 1994). No caso da ATP-difosfohidrolase de membrana de sarcolema de coração de rato embora o pH ótimo de hidrólise (7,5-8,0) tenha sido similar para o ATP e ADP, ele ficou deslocado para uma região ligeiramente mais alcalina (Oliveira et al., 1997). O mesmo foi relatado para a ATP difosfohidrolase dependente de cálcio, de pâncreas de porco, onde o pH ótimo para a hidrólise do ATP e ADP foi 8,0 e 8,5, respectivamente (LeBel et al., 1980). No caso da ecto-ATP-difosfohidrolase de oviduto de frango, o pH ótimo para a atividade Mg-ATPase ficou na faixa de 7,5-8,5, enquanto para a hidrólise do ADP o pH ótimo foi sensivelmente menor, em torno de 6,0 (Strobel et al., 1996).

A pequena contaminação da membrana de placa óssea de rato pela fosfatase alcalina não poderia ser responsável pela hidrólise dos NDF uma vez que no meio de reação existe teofilina que inibe completamente a fosfatase alcalina de placa óssea (Curti et al., 1987). Mesmo se isso ocorresse, os NMF e os demais substratos fosforilados também deveriam ser hidrolisados por essa pequena contaminação de fosfatase alcalina (Leone et al., 1997). Outro aspecto a ser considerado é que a fosfatase alcalina solubilizada da membrana com polioxietileno-9-lauril-éter e purificada até a homogeneidade hidrolisa o ATP em um pH ótimo aparente deslocado para valores mais alcalinos (Demenis and Leone, 2000). A teofilina foi utilizada nas determinações da atividade de apirase das membranas de placa óssea, pois inibe totalmente a atividade de hidrólise do ATP pela fosfatase alcalina ainda presente nessas membranas como contaminação (8-10%) mesmo após o tratamento das membranas com fosfolipase C dependente de fosfatidilinositol (Pizauro et al., 1995), e não inibe a atividade de apirase presente na placa óssea, mesmo em concentrações de até 7 mM.

A azida de sódio inibiu significativamente e de uma maneira muito similar tanto a hidrólise do ATP como a do ADP, sugerindo a presença de uma ATP-difosfohidrolase

nas membranas de placa óssea de rato. Entretanto, para uma mesma concentração de azida, a inibição da hidrólise do ADP (80%) sempre foi maior que a do ATP (60%). Já é bem conhecido que a azida de sódio, um inibidor de ATPase mitocondrial, também inibe a atividade de ADPase de membrana plasmática (Kwan et al., 1984). Por isso, a azida de sódio tem sido usada para caracterizar ATP-difosfohidrolases, uma vez que a hidrólise do ADP é inibida em uma maior extensão quando comparada com a do ATP (LeBel et al., 1980; Knowles et al., 1983; Papamarcaki and Tsolas, 1990; Yagi et al., 1992; Magocsi and Penniston, 1991; Côté et al., 1992b; Kwan and Ramlal, 1982; Valenzuela et al., 1989; Caldwell et al., 1999). No caso da ATPase do tipo E de cérebro humano, a atividade ADPase é inibida cerca de 75% por concentrações de azida significativamente maiores (Smith and Kirley, 1998). Resultados comparáveis aos obtidos para a enzima de placa óssea de rato também foram relatados para a enzima de miométrio de rato (Magocsi and Penniston, 1991), placenta humana (Christoforidis et al., 1995), célula endotelial humana (Kaczmarek et al., 1996) e de estômago de frango (Stout et al., 1995). Contrariamente, as ecto-ATPases são insensíveis à azida (Smith et al., 1997; Kegel et al., 1997; Dombrowski et al., 1997; Caldwell et al., 1999). Assim, a azida de sódio tem sido utilizada na diferenciação de ecto-apirase e ecto-ATPase, uma vez que ela é um efetivo inibidor de ecto-apirases, mas é um inibidor pobre da atividade ecto-ATPase (Smith and Kirley, 1998).

Knowles and Nagy (1999) propuseram uma explicação para o fato da inibição da hidrólise do ADP, pela azida, ser sempre maior que aquela da hidrólise do ATP. Segundo esses autores, como o sítio ativo de qualquer ecto-ATP-difosfohidrolase ainda é pouco conhecido, é mais simples assumir que o mesmo resíduo catalítico esteja envolvido na clivagem do fosfato  $\gamma$  do ATP e o  $\beta$  do ADP. Uma vez que a enzima utiliza tanto ATP como ADP (e outros NTFs e NDFs), o sítio ativo flexível pode assumir uma conformação tal que pode ligar o ATP ou ADP e em seguida ocorre a interação com os resíduos catalíticos para clivagem da ligação anidrido. Os baixos valores de  $K_m$  para ATP sugerem que a ligação do ATP é mais favorecida, provavelmente porque ele se encaixa melhor que o ADP, devido a falta do fosfato  $\gamma$ . Para explicar o aumento da afinidade aparente para a hidrólise do ADP, na presença de azida, Knowles and Nagy (1999)



consideram que a azida, devido à sua carga negativa e ao seu tamanho, pode ocupar o sítio de ligação do fosfato  $\gamma$  do ATP, facilitando assim a hidrólise do ADP no sítio ativo. Embora a inibição da hidrólise do ATP e ADP pela azida seja um teste positivo para a presença de ATP-difosfohidrolases (Knowles and Nagy, 1999), existem relatos, que para a enzima de grânulos de cromafin de adrenal bovina, que não se obteve nenhuma inibição mesmo em concentrações de azida na faixa de 10 mM (Gronberg and Flatmark, 1987).

As hidrólises do ATP e ADP pela enzima de membrana de placa óssea de rato foram lineares com o tempo. O mesmo ocorreu quando esses mesmos substratos estavam presentes simultaneamente. Entretanto, neste último caso, a velocidade de produção de fosfato inorgânico foi intermediária às velocidades obtidas com ATP e ADP individualmente. De acordo com Dixon and Webb (1979), Cornish-Bowden (1976), Segel (1976), Keleti et al. (1987) e Rezende et al. (1994), este resultado é consequência da ação de uma única enzima agindo sobre dois substratos simultaneamente. Se considerássemos que a enzima tivesse dois sítios catalíticos, um para cada substrato, ou, se a enzima estivesse contaminada, então a velocidade deveria ser necessariamente a soma das atividades ATPase e ADPase, o que não foi o caso. Resultados similares foram relatados para a enzima obtida de outras fontes (LeBel et al., 1980; Oliveira et al., 1997; Battastini et al., 1995; Picher et al., 1994; Sandoval et al., 1996; Valenzuela et al., 1989; Battastini et al., 1991; Vasconcelos et al., 1993; Kettlun et al., 1994, Mans et al., 1998).

Ao testar a influência de uma substância sobre a hidrólise do ATP e ADP, e o resultado obtido produzir o mesmo efeito ou efeito paralelo, este fato indica que ambas atividades estão de acordo com a existência de um único sítio (Sandoval et al., 1996).

Para demonstrar inequivocamente, que a hidrólise do ATP e ADP ocorre em um único sítio da molécula da apirase, foi utilizada a representação competitiva descrita por Chevillard et al. (1993). A linha horizontal obtida para a ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea, da ordem de 400 U/mg no intervalo entre  $1 > P > 0$ , indica uma velocidade de hidrólise constante para todas as combinações de substratos testadas. Esta representação também foi utilizada por outros autores que chegaram a interpretações semelhantes usando enzimas de outras fontes (Kettlun et al., 1994; Pilla et al., 1996; Alvarez et al., 1996).

O valor da atividade específica da ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato para a hidrólise do ATP, da ordem de 1278 nmol de Pi/min/mg, foi muito semelhante (1240 nmol de Pi/min/mg) ao relato para a ATP-difosfohidrolase de membranas de sarcolema de coração de rato (Oliveira et al., 1997). Entretanto, para a hidrólise do ADP o valor encontrado por Oliveira et al. (1997) foi cerca de duas vezes menor (270 nmol de Pi/min/mg) que o obtido para a hidrólise do ADP pela enzima de membrana de placa óssea (477 nmol de Pi/min/mg). No caso da ecto-apirase de cérebro humano foram descritos valores muito parecidos com os obtidos para a enzima de membrana de placa óssea de rato (Smith and Kirley, 1998). Uma ampla especificidade de substrato é um critério estabelecido para a classificação de apirases (Komoszyński and Wojtczak, 1996). Alguns autores tem relatado uma baixa especificidade da ATP-difosfohidrolase de várias fontes em relação aos di- e trifosfonucleotídeos, assim como a ausência de atividade para substratos nucleotídeos monofosfatos e monofosfatos não nucleotídeos (Knowles et al., 1983; Soriani et al., 1995; Mans et al., 1998; LeBel et al., 1980; Marti et al., 1997).

Marti et al. (1997) realizaram estudos com azido-nucleotídeos para marcar os substratos da atividade apirase numa preparação de membrana plasmática pré sináptica de órgão elétrico de *Torpedo*. A fotoativação desta preparação, na presença de tais derivados de azida, resultou numa inativação irreversível da atividade da apirase que, posteriormente foi revertida por nucleotídeos não marcados. Interessantemente, embora o AMP não seja um substrato para apirase, a inativação também foi revertida quando em sua presença. Por outro lado, o mesmo não foi observado quando adenosina estava presente. Este resultado indica que a porção monofosfato da molécula é suficiente para reverter a inativação e que o ambiente nucleotídeo tem baixa afinidade pelo sítio ativo.

Os valores de Km, na faixa micromolar, obtidos para a ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato são similares aos relatados para a maioria de ATP-difosfohidrolases (Côté et al., 1992a; Moodie et al., 1991; Picher et al., 1993; Frassetto et al., 1993; Pieber et al., 1991; Valenzuela et al., 1992). Deve ser salientado, contudo, que para algumas apirases os valores de Km são da ordem de  $10^{-3}$  M. Este é o caso da enzima



de *Ornithodoros savignyi* (Mans et al., 1998), *Rhodnius prolixus* (Sarkis et al., 1986) e *Torpedo marmorata* (Sarkis and Salto, 1991).

Os parâmetros cinéticos calculados para a hidrólise do ATP e ADP, pela ATP-difosfohidrolase de placa óssea de rato são muito similares, independentemente da presença de íons magnésio ou cálcio. Além disso, eles são similares aos relatados para outras ATP-difosfohidrolases já descritas na literatura (Oliveira et al., 1997; Sarkis and Salto, 1991; Battastini et al., 1991; Knowles et al., 1983; Yagi et al., 1991; Côté et al., 1992a; LeBel et al., 1980; Frassetto et al., 1993). Wang et al. (1998) obtiveram um valor de Km para a ecto-apirase solúvel de 200  $\mu\text{M}$  para a hidrólise do ATP, na presença de 5 mM de íons cálcio, comparável com um Km de 75  $\mu\text{M}$  para a enzima do tipo selvagem.

O estudo da velocidade da hidrólise do ATP em função da concentração de ATP, em concentrações fixas de íons magnésio ou cálcio, indicou que o verdadeiro substrato é o complexo metal-nucleotídeo. De fato, a ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato é inibida por excesso de nucleotídeo di- ou trifosfato livre. Esse fato sugere que o nucleotídeo livre pode se ligar à enzima agindo como um inibidor do verdadeiro substrato, o complexo metal-nucleotídeo (Hidalgo et al., 1983; Strobel et al., 1996). O estudo do efeito do ATP e ADP livres, na atividade da ATP-difosfohidrolase de plaquetas de sangue de rato, revelou valores de Km significativamente maiores na presença dos nucleotídeos livres, sugerindo que a enzima tem mais afinidade pelo complexo nucleotídeo-cálcio. Estes resultados suportam a idéia que ATP ou ADP livre podem se ligar na enzima com uma baixa afinidade, mas agem como um inibidor da hidrólise do complexo cálcio-nucleotídeo (Frassetto et al., 1995).

O fato da ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato não hidrolisar substratos tais como a glicose-1-fosfato, glicose-6-fosfato, p-nitrofenilfosfato,  $\beta$ -glicerofosfato, pirofosfato, bis-p-nitrofenilfosfato e fosfomonoácidos sugere que a preparação de membranas não está contaminada por fosfatases não-específicas, ATP-pirofosfatase, pirofosfatase inorgânica, fosfodiesterase e/ou proteína fosfatase. A associação de uma ATPase com uma ADPase, que hidrolizaria simultaneamente o ATP e o ADP, respectivamente, também pode ser excluída baseando-se nas similaridades cinéticas observadas nas diferentes condições usadas no presente trabalho.

O estudo de especificidade de substrato realizado por Pilla et al. (1996), para ATP-difosfohidrolase de plaqueta de sangue humano, mostrou que além de ATP e ADP, a enzima não hidrolisa o p-nitrofenilfosfato, pirofosfato inorgânico bem como a glicose-6-fosfato. Resultados similares foram relatados para a enzima de membrana de sarcolema de coração de rato (Oliveira et al., 1997), membranas sinápticas de cérebro bovino (Hohmann et al., 1993), membrana plasmática sináptica de cérebro de rato (Battastini et al., 1995), oviduto de frango (Strobel et al., 1996), músculo liso não vascular de traquéia bovina (Picher et al., 1994), pâncreas de porco (LeBel et al., 1980), placenta humana e rim de rato (Valenzuela et al., 1996).

Uma variedade de inibidores tem sido utilizada por diferentes autores para testar a possibilidade de preparações de ATP-difosfohidrolases de diferentes origens estarem contaminadas por outras ATPases (Pilla et al., 1996; Oliveira et al., 1997; Battastini et al., 1995; Banerjee and Racker, 1977; Mans et al., 1998; Strobel et al., 1996; Picher et al., 1994; LeBel et al., 1980; Mita et al., 1998; Valenzuela et al., 1996). No caso da enzima de placa óssea eles também foram usados para caracterizar as propriedades bioquímicas da ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato bem como excluir a presença de outras ATPases contaminantes. Nenhuma inibição foi observada pela oligomicina, o que descarta a presença de ATPase mitocondrial (Meyer-Fernandes et al., 1997). A presença de (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>)-ATPase também pode ser descartada, uma vez que a preparação não foi inibida por ouabaína (Periyasamy et al., 1983). As contaminações por V-ATPases, Ca-ATPase, H-ATPase e Na<sup>+</sup> ou K<sup>+</sup>-ATPase foram eliminadas devido à ausência do efeito da bafilomicina A<sub>1</sub> (Keeling et al., 1997), tapsigargina (Ma et al., 1999), omeprazol (Tuukkanen and Vaananen, 1986) e ácido etacrínico (Proverbio et al., 1991), respectivamente. A ausência de contaminação por adenilato quinase foi confirmada pelo fato da preparação não ter sido inibida por Ap<sub>5</sub>A (Lienhard and Secemski, 1973), descartando portanto a possibilidade do fosfato ser produzido através da conversão do ADP em AMP e ATP e subsequente hidrólise por AMPases e ATPases.

A pequena inibição da enzima presente nas membranas de placa óssea de rato pelo vanadato sugere que não ocorre formação de intermediários fosforilados durante o ciclo catalítico da enzima. Essa interpretação está de acordo com os resultados relatados



por diferentes autores para enzima de outras fontes (Hidalgo et al., 1983; Valente et al., 1990; Paz et al., 1988).

Similarmente ao relatado para outras ATP-difosfohidrolases, a dependência da atividade da enzima de membrana de placa óssea de rato por baixas concentrações ou até mesmo traços de íons magnésio tem sido descrita como uma característica comum de diferentes origens (Plesner, 1995; Ferreira et al., 1995; Torres et al., 1998; Picher et al., 1994; Mita et al., 1998; Valenzuela et al., 1996). Um caso particularmente interessante é o da dependência da apirase de carrapato aos íons metálicos divalentes (Mans et al., 1998). Embora a falta de atividade possa estar relacionada com a ausência de formação do substrato ativado metal-nucleotídeo (Sigel, 1990), a possibilidade de essa enzima ser uma metaloproteína também é suportada por três observações: a atividade enzimática foi inibida por EDTA e EGTA; a atividade é inibida por fluoreto, um inibidor de metaloenzimas através da ligação a seu centro por íons metálico (Kiam and Schwederski, 1991); o efeito de proteção pelos íons magnésio, na inativação por DTT, sugere que este íon metálico pode ser quelado no centro ativo da enzima (Mans et al., 1998).

Os íons magnésio parecem ter influência na inibição da enzima pela azida de sódio. Knowles et al. (1983) descreveram que, para a ATP-difosfohidrolase de membrana plasmática de mamíferos, a inibição da atividade pela azida foi muito maior na presença de íons magnésio do que para íons cálcio.

A possibilidade da ATPase presente na membrana de placa óssea ser uma Ca-ATPase também foi descartada através de experimentos de ativação da enzima com concentrações equimolares de íons cálcio e magnésio. O fato de não ocorrer efeito sinérgico na atividade sugere que cada íon pode substituir o outro durante o ciclo catalítico da enzima e que portanto esta enzima não é uma verdadeira (Ca/Mg)-ATPase ou que a preparação não está contaminada por este tipo de ATPase (Tada et al., 1978; DeMeis and Vianna, 1979; Laliberté et al., 1982). É importante salientar que no caso da ATP-difosfohidrolase de *Schistosoma mansoni* existe uma competição entre os íons magnésio e cálcio em relação a ativação de um mesmo sítio (Torres et al., 1998).

A ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato foi estimulada de uma maneira similar pelos íons magnésio ou cálcio da ordem de 2 mM,

independentemente da natureza do NTF. Entretanto, ela é menos ativa que a enzima de oviduto de frango (Strobel et al., 1996). Embora a apirase de carrapato hidrolisa ATP, ADP, UTP e UDP na presença de íons magnésio, exceto para o ADP, o mesmo não acontece na presença de íons cálcio. De fato, a hidrólise desses nucleotídeos na presença de íons cálcio é muito baixa (Mans et al., 1998).

Algumas proteínas estão completamente embebidas na bicamada lipídica, enquanto outras estão ancoradas pelo glicosilfosfatidilinositol. Entre elas podem ser citadas algumas ecto-enzimas tais como a acetilcolinesterase (EC 3.1.17), fosfatase alcalina (EC 3.1.3.1), aminopeptidase P (EC 3.4.11.9) e 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5) (Battastini et al., 1995; Hooper and Bashir, 1991). Uma evidência de que a ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato não está ancorada na membrana através de fosfatidilinositol, resulta do fato que o tratamento dessas membranas com fosfolipase C específica para fosfatidilinositol de *B. thuringiensis* libera aproximadamente 90-95% de fosfatase alcalina enquanto as atividades ATPase e ADPase ainda são detectadas na membrana e sempre na mesma razão 2,4 para a velocidade de hidrólise ATP/velocidade de hidrólise do ADP. As atividades de hidrólise do ATP e ADP, pela ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, diminuíram consideravelmente quando os ensaios foram feitos na presença dos seguintes detergentes: polidocanol 1%, Lubrol WX 1,35%, Lubrol PX 1%, CHAPS 2,5%, C<sub>12</sub>E<sub>8</sub> 1%, Triton X-114 1%, Triton X-100 0,2%, n-octil-β-D-glicosídeo 30 mM, polioxietileno-5-decil éter 0,5%. De uma maneira geral, a extração e estabilização de proteínas integrais de membrana frequentemente necessita de condições especiais que mimetizam o microambiente do lipídeo com o da proteína a qual estava originalmente associada (Singer and Nicolson, 1973). No caso das ATP-difosfohidrolases as dificuldades encontradas na solubilização e purificação tem resultado em sucesso apenas para algumas dessas enzimas (Battastini et al., 1995; Knowles et al., 1983; Plesner, 1995; Shi and Knowles, 1994; Mita et al., 1998; Valenzuela et al., 1996; Wang et al., 1998). Mita et al. (1998) relataram que a ecto-ATP-difosfohidrolase em células de folículo de ovário é muito sensível aos detergentes normalmente empregados para solubilizar proteínas ligadas às membranas e que embora a digitonina seja capaz de solubilizar a atividade da



fração de membrana, a eluição da proteína no volume morto da coluna sugere que ela ainda se encontra ligada à membrana. Wang et al. (1998) relataram que a inibição da atividade enzimática do CD39 por detergentes é causada pela dissociação dos tetrâmeros em monômeros. Por outro lado, ATPases do tipo-E tais como, a da batata, de *T. gondii* NTPases e de *Tetrahymena* que não estão ligadas à membrana, não são sensíveis aos detergentes (Bermudes et al., 1994; Smith et al., 1997). Esta é uma indicação que a presença de segmentos transmembrana aparentemente é o elemento chave na discussão do efeito de detergentes na atividade da enzima. Além disso, mutantes de ectoapirase que não apresentam um ou ambos os domínios transmembrana, apresentam uma menor atividade enzimática que aquela enzima do tipo selvagem. Além disso, a sua atividade não é afetada por detergentes (Wang et al., 1998).

A ação *in vitro* da ATPase sobre os diferentes NTF representa um resultado interessante do ponto de vista fisiológico. Tem sido relatado que baixos níveis de ATP podem promover a mineralização em culturas de condrócitos, similarmente aos resultados obtidos utilizando-se o  $\beta$ -glicerofosfato (Boskey et al., 1992). Apesar dos níveis de NTF existentes no fluido extracelular da cartilagem serem demasiado baixos para suportarem a mineralização (Wuthier, 1981), a presença de níveis consideráveis de NTF desfosforilados é reconhecida como um indicador da atividade da fosfatase alcalina sobre tais compostos. Entretanto, seria realmente a fosfatase alcalina a verdadeira responsável ou então seria a ATPase a responsável pela elevada concentração de fosfato inorgânico e nucleosídeos no fluido da cartilagem epifisária, que é significativamente maior do que as respectivas concentrações que existem no sangue (Wuthier, 1977; Howell et al., 1968). Essa questão ainda permanece aberta. Até o presente momento, conhece-se apenas a concentração de ATP de extratos brutos de cartilagem que, presumivelmente, reflete a concentração do ATP intracelular (Wuthier, 1977). O grande problema encontrado na determinação da concentração intracelular do ATP é a degradação do substrato durante o procedimento experimental. Por outro lado, a participação do ATP como substrato no início da calcificação, apesar dos baixos níveis no fluido extracelular da cartilagem, também não pode ser descartada inequivocamente. Além disso, tem sido acumuladas evidências experimentais que a membrana plasmática de várias células é permeável ao

ATP e que esse efluxo pode ser estimulado por certos estímulos fisiológicos (Chaudry, 1982). Desse modo, não seria totalmente impossível que a hipertrofia dos condrócitos, um evento associado à biomineralização, pudesse facilitar esse efluxo de ATP (ou NMF) para o fluido extracelular da cartilagem.

Os resultados deste trabalho são inéditos e mostram que a atividade de ATPase existente nas membranas de placa óssea livre de fosfatase alcalina é de fato uma ecto-ATP-difosfohidrolase. Qual seria então o papel dessa ecto-ATP-difosfohidrolase no processo de ossificação ?

Uma possibilidade seria a de que essa apirase existente na membrana obtida de placa óssea pode ter um papel importante na modulação de enzimas do tipo adenilato ciclase e 5'-nucleotidase. Já é bem conhecido que a 5'-nucleotidase é inibida por ATP e ADP e estimulada por AMP (Burnstock, 1979; Dornand et al., 1978). Assim, mudando a relação (ATP+ADP)/AMP, a apirase pode regular a atividade da 5'-nucleotidase. Por outro lado, o AMP liberado pela ação da apirase pode ser transformado em adenosina pela 5'-nucleotidase que, contrariamente ao AMP, pode atravessar a membrana e ser fosforilada no interior da célula, restaurando assim os estoques de ATP (Burnstock, 1979; Vasconcelos et al., 1993). No caso da adenilato ciclase, a situação seria um pouco mais complexa. O sistema de transdução de sinal que utiliza o hormônio paratiroideano (PTH) vem sendo intensamente estudado nos últimos anos (para revisão ver Morris and Bilezikian, 1996). Nele estão envolvidas duas enzimas transdutoras adenilato ciclase e fosfolipase C. Na regulação dos níveis de cálcio plasmático e extracelular, o PTH atua principalmente em alvos primários dos rins e ossos através da interação com receptores associados à nucleotídeos de guanina e seus sistemas de transdução. Além de estar intimamente envolvido na homeostase das concentrações normais de cálcio e fosfato no soro que, por sua vez regulam a sua síntese e secreção, o PTH aumenta a síntese de collagenase, inibe a síntese de colágeno tipo I e reduz a atividade da fosfatase alcalina nos osteoblastos (Hall and Dickson, 1985; Heath et al., 1984; Simon et al., 1988). Recentes evidências dos efeitos do PTH nas correntes de cálcio tipo L, sugerem que o osteoblasto é a principal célula alvo (Fritsch and ChesnoyMarchais, 1994). Por outro lado, já é conhecido que em culturas de osteoblastos, o dibutilil-cAMP inibe fosfodiesterases



estimulando a síntese do colágeno (Hiramatsu et al., 1983) e que quando adicionada a essas culturas de osteoblastos, a forskolina, um estimulador da adenilato ciclase provoca um aumento da concentração de cAMP intracelular e estimula a atividade da fosfatase alcalina (Hakeda et al., 1985). Uma vez que a fosfatase alcalina é um marcador da diferenciação de osteoblastos, o aumento dos níveis intracelular de cAMP pode estar intimamente relacionado com a formação do osso in vivo. Assim, a possibilidade dos níveis de adenilato ciclase serem regulados por apirases durante o processo de mineralização é uma possibilidade que não pode ser descartada.

Uma segunda possibilidade estaria baseada no fato da ATP-difosfohidrolase de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina, ter sido inibida pela suramina, um antagonista do receptor  $P_2$  de purina., similarmente ao relatado para a ecto-apirase de *Torpedo* elétrico (Martí et al., 1996), sinaptosomas de hipocampo de ratos (Bonan et al., 1999) bem como para a atividade ecto-ATPase de várias fontes (Beukers et al., 19995; Hourani and Chown, 1989; Meghji and Burnstock, 1995; Ziganshin et al., 1995; Yegutkin and Burnstock, 2000). Assim sendo, a função da apirase no processo de calcificação pode estar relacionada indiretamente com a entrada de íons cálcio para a célula. Este processo de reciclagem da adenosina estaria acoplado ao influxo de íons cálcio uma vez que se a suramina inibe a hidrólise do ATP, ela também inibirá o  $P_{2x}$ , um canal de cálcio, diminuindo portanto a eficiência da calcificação. Em outras palavras, a célula reciclaria adenosina utilizando ATP e ao mesmo tempo jogaria íons cálcio para dentro da célula.

Esta possibilidade é suportada por algumas evidências: i. o receptor  $P_{2x}$  está associado aos canais permeáveis aos íons cálcio (Bonan et al., 1999); ii. o ATP estimula  $P_{2x}$ , portanto estimula o influxo de cálcio (Ioune et al., 1995); iii. a suramina diminui o influxo de  $Ca^{2+}$  e portanto prejudica a eficiência sináptica (Ioune et al., 1995); iv. embora não exista uma identidade entre as ecto-ATPases e os receptores de purina, as ecto-ATPases têm um importante papel na função desses receptores, regulando ou certamente afetando as concentrações de agonistas e antagonistas ao redor dos receptores (Plesner, 1994); v. como o ATP, o ADP e o AMP não podem entrar na célula, a ação combinada da ecto-ATPase e da 5'-nucleotidase produziriam adenosina que, atravessaria a

membrana e seria fosforilada no interior da célula restaurando assim os estoques de ATP (Henderson and Paterson, 1973); iv. a reciclagem da adenosina, passando por ATP-ADP-AMP-adenosina, é realizada através da transdução de sinal induzida por ATP/ADP em conjunto com uma ecto-5'-nucleotidase e transportadores de nucleotídeos (Yegutkin and Burnstock, 2000); vii. os diferentes efeitos da suramina reforçam a idéia de que devido ao seu amplo espectro de propriedades biológicas, a ação desta droga depende significativamente do sistema estudado (Bonan et al., 1999).

## 5. CONCLUSÕES

Durante o processo de purificação da enzima de membrana de placa óssea de rato, livre de fosfatase alcalina, a razão entre as velocidades de hidrólise do ATP e ADP permaneceu praticamente constante e da ordem de 2,4, sugerindo que ambos os substratos são hidrolisados pela mesma molécula, uma ATP-difosfohidrolase ou apirase.

A enzima apresentou um pH ótimo aparente 7,5 para a hidrólise do ATP e ADP.

A representação competitiva de Chevillard obtida para a hidrólise de ATP e ADP também sugere que esses substratos são hidrolisados pela mesma enzima, descartando a possibilidade da existência de uma ADPase associada à ATPase em questão.

A teofilina não afetou a hidrólise de ATP e ADP, pelo menos até concentrações da ordem de 7 mM.

Concentrações, de azida de sódio (entre 2,5 mM e 7,5 mM) e de suramina 1 mM inibem significativamente a hidrólise do ADP e do ATP. Já o  $Ap_5A$  não apresenta nenhuma inibição em concentrações até 1 mM.

A atividade NTFase da enzima presente nas membranas de placa óssea de rato e livres de fosfatase alcalina, é duas vezes maior que a correspondente NDFase. Entretanto, a atividade NMFase é praticamente nula ou desprezível.

Substratos tais como glicose-1-fosfato, glicose-6-fosfato, p-nitrofenilfosfato,  $\beta$ -glicerofosfato, pirofosfato, Bis-p-nitrofenilfosfato, O-fosfoserina, O-fosfotirosina e O-fosfotreonina não são hidrolisados pela ATPase de membranas de placa óssea, descartando a presença de enzimas contaminantes, tais como, fosfatases não específicas, pirofosfatase inorgânica, ATP-pirofosfatase, fosfodiesterase e proteína fosfatase.

Inibidores clássicos de ATPases do tipo V, P e F, tais como bafilomicina A<sub>1</sub>, tapsigargina, vanadato, ouabaína, omeprazol, ácido etacrínico e oligomicina não inibem a ATPase de membrana de placa óssea.

Na ausência de íons cálcio ou magnésio, a hidrólise do ATP e ADP é desprezível ou nula.

Independentemente da natureza do NTF, a estimulação da atividade da enzima por íons cálcio ou magnésio (ordem de 2 mM) é muito similar.

Detergentes, comumente utilizados na solubilização de enzimas de membrana, inativam a ATP difosfohidrolase de membrana de placa óssea.

As características bioquímicas, obtidas para a ATPase de membrana de placa óssea, apresentadas neste trabalho sugerem que se trata de uma ATP difosfohidrolase. Esse resultado é inédito na literatura e abre algumas perspectivas interessantes em relação ao processo da biomineralização.



## 6. SINÓPSE

Membranas de placa óssea de rato foram preparadas a partir do implante de pó de osso desmineralizado no tecido subcutâneo de ratos Wistar e purificada conforme descrito por Curti et al. (1986). Membranas livres de fosfatase alcalina foram preparadas de acordo com Pizauro et al. (Biochim. Biophys. Acta 1368: 108, 1998). A atividade de nucleotídeo fosfatase foi determinada a 37°C, em tampão Hepes 50 mM, pH 7,5, contendo  $MgCl_2$  2 mM e teofilina 5 mM, em um volume final de 1 mL.

A ATPase presente nas membranas de placa óssea de rato e livres de fosfatase alcalina hidrolisou os nucleotídeos difosfatos (NDF) com uma velocidade duas vezes menor que os correspondentes nucleotídeo trifosfato (NTF), enquanto a hidrólise do NMF foi quase nula ou desprezível. A enzima apresentou um pH ótimo aparente da ordem de 7,5 para ambos substratos. A hidrólise do ATP ocorreu através de uma única família de sítios que apresentaram comportamento Michaeliano ( $n= 1,0$ ) e  $V= 1.278,7$  U/mg e  $K_m = 83,3$   $\mu$ M. No caso do ADP, também foi observada uma única família de sítios ( $n= 1,0$ ) que apresentaram  $V= 473,9$  U/mg e  $K_m = 150,6$   $\mu$ M. Na ausência de íons magnésio ou cálcio, a hidrólise do ATP e ADP foi desprezível. Os estudos de estimulação da enzima por íons metálicos sugerem que cada íon pode substituir o outro durante o ciclo catalítico da enzima.

A teofilina, um inibidor de fosfodiesterases, não inibiu completamente a hidrólise do ATP e ADP até concentrações de 7 mM. Por outro lado, a azida de sódio, assim como a suramina mostraram efetivas na inibição da hidrólise do ATP e ADP. A ATPase de membrana de placa óssea de rato e livre de fosfatase alcalina é insensível aos inibidores clássicos de ATPases do tipo V, P e F. Através desse estudo sistemático da ação de inibidores também foram excluídas contaminações com fosfatases não específicas, pirofosfatase inorgânica, ATP-pirofosfatase, fosfodiesterase e proteína fosfatase que, poderiam estar mascarando a atividade da enzima sobre os NDF e NTF.

A ATPase de membrana de placa óssea e livre de fosfatase alcalina é muito sensível aos detergentes comumente empregados na solubilização de enzimas de membrana.

Dada a similaridade entre as propriedades cinéticas e bioquímicas da ATPase de membranas de placa óssea em relação aos nucleotídeos trifosfato pode-se concluir que se trata de uma ATP-difosfohidrolase ou apirase, descartando-se assim existência de uma ADPase associada com uma ATPase.

## 7. REFERÊNCIAS

- Abramowitz J. and Suki W.N. (1996) Ca-ATPase and bone cell mineralization. *Mineral Electrolyte Metab.* 22: 336-344.
- Aley S.B., Scott, W.A. and Cohn Z.A. (1980) Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 152: 391-404.
- Ali S.Y. (1976) Analysis of matrix vesicles and their role in the calcification of epiphyseal cartilage. *Fed. Proc.* 35: 135-142.
- Ali S.Y. and Evans L. (1973) The uptake of <sup>45</sup>Ca-calcium ions by matrix vesicles isolated from calcifying cartilage. *Biochem. J.* 134: 647-650.
- Ali S.Y., Sajdera S.W. and Anderson H.C. (1970) Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67: 1513-1520.
- Alvarez A., Chayet L., Galleguillos M., García L., Kettlun A.M., Collados L., Traverso-Cori A., Mancilla M. and Valenzuela M.A. (1996) Characterization of ATP-diphosphohydrolase from rat mammary gland. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28: 75-79.
- Anderson H.C. (1969) Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J. Cell. Biol.* 41: 59-72.
- Anderson H.C. (1973) Calcium accumulating vesicles in the intercellular matrix bone in hard tissue growth repair and remineralization. *Ciba Foundation Symposium 11 (New Series)* Elsevier. New York. pp. 213-226.
- Anderson H.C. (1980) Calcification Processes. *Path. Ann.* 15: 45-56.
- Anderson H.C. (1989) Mechanism of mineral formation in bone. *Lab. Invest.* 60: 320-330.
- Anderson H.C. (1995) Molecular biology of matrix vesicles. *Clin. Orthop.* 314: 266-280.
- Anderson H.C. and Sajdera S.W. (1976) Calcification of rachitic cartilage to study matrix vesicle formation. *Fed. Proc.* 35: 148-153.
- Anderson H.C. and Reynolds J.J. (1973) Pyrophosphatase stimulation of calcium uptake into cultured embryonic bones. Fine structure of matrix vesicles and their role in calcification. *Develop. Biol.* 34: 211-227.
- Anderson H.C., Cecil R. and Sajdera S.W. (1975) Calcification of rachitic rat cartilage in vitro by extracellular matrix vesicles. *Am. J. Pathol.* 79: 237-255.
- Anderson H.C., Matsuzawa T., Sajdera S.W. and Ali S.Y. (1970) Membranous particles in calcifying matrix. *Trans. N.Y. Acad. Sci.* 32: 629-630.
- Arsenault A.L., Frankland B.W. and Ottsenmeyer F.P. (1991) Vectorial sequence of mineralization in the turkey leg tendon determined by electron microscopic imaging. *Calcif. Tissue Int.* 48: 46-55
- Arsenis C., Rudolph J. and Hackett M.H. (1975) Resolution purification and characterization of the orthophosphate releasing activity from fracture callus calcifying cartilage. *Biochim Biophys. Acta* 391: 301-315.
- Asai T., Miura S., Sibley L.D., Okabayashi H. and Takeuchi T. (1995) Biochemical and molecular characterization of nucleoside triphosphate hydrolase isozymes from the parasitic protozoan *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 270:11391-11397.



- Bab I.A., Muhlrad A. and Sela J. (1979) Ultrastructural and biochemical study of extracellular matrix vesicles in normal alveolar bone of rats. *Cell Tissue Res.* 202: 1-17.
- Balmain N. (1992) Identification of calbindin-D9K in matrix vesicles. *Bone Mineral* 17: 197-201.
- Banerjee R.K. (1981) Ecto-ATPase. *Mol. Cell. Biochem.* 37: 91-99.
- Banerjee R.K. and Racker E. (1977) Solubilization purification and characterization of a nucleoside triphosphatase from avian myeloblastosis virus. *J. Biol. Chem.* 252: 6700-6706.
- Battastini A.M.O., Oliveira E.M., Moreira C.M., Bonan C.D., Sarkis J.J.F. and Dias R.D. (1995) Solubilization and characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) from rat brain synaptic plasma membranes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 7: 209-219.
- Battastini A.M.O., Rocha J.B.T., Barcellos C.K., Dias R.D. and Sarkis J.J.F. (1991) Characterization of an ATP diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in synaptosomes from cerebral cortex of adult rats. *Neurochem. Res.* 16: 1303-1310.
- Bawden J.W. (1989) Calcium transport during mineralization. *Anat. Rec.* 224: 226-233.
- Beaudoin A.R., Sévigny J. and Grondin G. (1997) Purification characterization and localization of two ATP diphosphohydrolase isoforms in bovine heart. *Am. J. Physiol.* 273: H673-H681.
- Beaudoin A.R., Vachereau A., Grondin G., St-Jean P., Rosenberg M.D. and Strobel R. (1986) Microvesicular secretion a mode of cell secretion associated with the presence of an ATP-diphosphohydrolase. *FEBS letters* 203: 1-2.
- Bellows C.G., Aubin J.E. and Heersch J.M.N. (1991) Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: The role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Mineral* 14: 27-40.
- Bermudes D., Peck K.R., Afifi M.A., Beckers C.J. and Joiner K.A. (1994) Tandemly repeated genes encode nucleoside triphosphate hydrolase isoforms secreted into the parasitophorous vacuole of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 269: 29252-29260.
- Bernard G.W. (1972) Ultrastructural observation of initial calcification in dentine and enamel. *J. Ultrastruct. Res.* 41: 1-17.
- Bernard G.W. and Pease D.C. (1969) An electron microscopic study of initial intramembranous osteogenesis. *Am. J. Anat.* 125: 271-290.
- Beukers M.W., Kerkhof C.J.M., van Rhee M.A., Ardanuy U., Gurgel C., Widjaja H., Nickel P., Ijzerman A.P. and Soudijn W. (1995) Suramin analogs, divalent cations and ATPs as inhibitors of ecto-ATPase. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 351: 523-528.
- Beukers M.W., Pirovano I.M., vanWeert A., Kerkhof C.J.M., Ijzerman A.P. and Soudijn W. (1993) Characterization of ecto-ATPase on human blood cells. *Biochem. Pharmacol.* 46: 1959-1966.
- Blumenthal N.C. (1989) Mechanism of inhibition of calcification. *Clin. Orthop.* 247: 279-289.
- Bonan C.D., Roesler R., Qwuevedo J., Battastini A.M.O., Izquierdo I. and Sarkis J.J.F. (1999) Effects of suramin on hippocampal adenylylase activity and inhibitory avoidance learning of rats. *Pharmacol. Biochem. Behavior.* 63: 153-158.



- Bonucci E. (1967) Fine structure of early cartilage calcification. *J. Ultrastruct. Res.* 20: 33-50.
- Boskey A.L. (1979) Models of matrix vesicle calcification. *Inorg. Persp. Biol. Med.* 2: 51-92.
- Boskey A.L. (1981) Current concepts of the physiology and biochemistry of calcification. *Clin Orthop.* 157: 225-257.
- Boskey A.L., Stiner D., Mendelsohn R. and Doty S.B. (1992) Adenosine triphosphate promotes mineral deposition in differentiating chick limb-bud mesenchymal cell-cultures. *J. Bone Miner. Res.* 7: S250-S250.
- Boyde A., Reith E.J. and Jones S.J. (1978) Intercellular attachments between calcified collagenous tissue forming cells in the rat. *Cell Tissue Res.* 191: 507-512
- Burnstock, G. (1979) In: *Physiological and Regulatory Function of Adenosine and Adenine Nucleotides* (Bauer H.P. and Drummond, G.I. eds.). Raven Press. New York. pp. 3-32.
- Caldwell C.C., Davis M.D. and Knowles A.F. (1999) Ectonucleotidases of avian gizzard smooth muscle and liver plasma membranes: a comparative study. *Arch. Biochem. Biophys.* 362: 46-58.
- Carafoli E. (1991) Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol. Rev.* 71: 129-153
- Carpenter G., King L. and Cohen S. (1979) Rapid enhancement of protein phosphorylation in A431 cell membrane preparations by epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 254: 4884-4891.
- Caverzasio J. and Bonjour J.P. (1996) Characteristics and regulation of Pi transport in osteogenic cells for bone metabolism. *Kidney Int.* 49: 975-980.
- Chambers T.J. (1985) The pathophysiology of the osteoclast. *J. Clin. Pathol.* 38: 241-249.
- Chaudry I.H. (1982) Does ATP cross the cell plasma membrane? *Yale J. Biol. Med.* 55: 1-10.
- Chevillard C., Cárdenas M.L. and Cornish-Bowden A. (1993) The competition plot: a simple test of whether two reactions occur at the same active site. *Biochem. J.* 289: 599-604.
- Christoforidis S., Papamarcaki T., Galaris D., Kellner R. and Tsolas O. (1995) Purification and properties of human placental ATP diphosphohydrolase. *Eur. J. Biochem.* 234: 66-74.
- Ciancaglini P., Pizauro J.M. and Leone F.A. (1992) Polyoxyethylene 9-lauryl ether solubilized alkaline phosphatase: synergistic stimulation by zinc ions and magnesium ions. *Int. J. Biochem.* 24: 923-928.
- Ciancaglini P., Pizauro J.M. and Leone F.A. (1995) Mechanism of action of cobalt ions on rat osseous plate alkaline phosphatase. *J. Inorg. Biochem.* 60: 155-162.
- Ciancaglini P., Pizauro J.M. and Leone F.A. (1997) Dependence of divalent metal ions on phosphotransferase activity of osseous plate alkaline phosphatase. *J. Inorg. Biochem.* 66: 51-55.
- Ciancaglini P., Pizauro J.M., Curti C., Tedesco A.C. and Leone F.A. (1990b) Effect of membrane moiety and magnesium ions on the inhibition of matrix-induced alkaline phosphatase by zinc ions. *Int. J. Biochem.* 22: 747-751.

- Ciancaglini P., Pizauro J.M., Grecchi M.J. Curti C. and Leone F.A. (1989) Effect of Zn(II) and Mg(II) on phosphohydrolytic activity of rat matrix-induced alkaline phosphatase. *Cell. Mol. Biol.* 35: 503-510
- Ciancaglini P., Pizauro J.M., Rezende A.A., Rezende L.A. and Leone F. A. (1990a) Solubilization of membrane-bound matrix-induced alkaline phosphatase with polyoxyethylene 9-lauryl ether (Polidocanol): purification and metalloenzyme properties. *Int. J. Biochem.* 22: 385-392.
- Coleman J.E. and Gettins P. (1983) Alkaline phosphatase solution structure and mechanism. *Adv. Enzymol.* 55: 381-452.
- Cornish-Bowden A. (1976) *Principles of Enzyme Kinetics.* Butterworth London. pp. 43-44.
- Côté Y.P., Filep J.G., Battistini B., Gauvreau J. Sitis P. and Beaudoin A.R. (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.
- Côté Y.P., Oullet S. and Beaudoin A.R. (1992b) Kinetic properties of type-II ATP diphosphohydrolase from tunica media of the bovine aorta. *Biochim. Biophys. Acta* 1160: 246-250.
- Côté Y.P., Picher M., St-Jean P., Béliveau R., Potier M. and Beaudoin A.R. (1991) Identification and localization of ATP-diphosphohydrolase (apyrase) in bovine aorta: relevance to vascular tone and platelet aggregation. *Biochim. Biophys. Acta* 1078: 187-191.
- Cox R.P., Gilbert P. and Griffin M.J. (1967) Alkaline inorganic pyrophosphatase activity of mammalian-cell alkaline phosphatase. *Biochem. J.* 105: 155-161.
- Curti C., Pizauro J.M., Ciancaglini P. and Leone F.A. (1987) Kinetic characteristics of some inhibitors of matrix- induced alkaline phosphatase. *Cell. Mol. Biol.* 33: 625-635.
- Curti C., Pizauro J.M., Rossinholi G., Vugman I., Mello de Oliveira J.A. and Leone F.A. (1986) Isolation and kinetic properties of an alkaline phosphatase from rat bone matrix-induced cartilage. *Cell. Mol. Biol.* 32: 55-62.
- Cusack N.J., Paearson J.D. and Gordon J.L. (1983) Stereoselectivity of ectonucleotidases on vascular endothelial cells. *Biochem. J.* 214: 975-981.
- Cyboron G.W. and Wuthier R.E. (1981) Purification and initial characterization of intrinsic membrane bound alkaline phosphatase from chicken epiphyseal cartilage. *J. Biol Chem.* 256: 7262-7268.
- Cyboron G.W., Vejins M.S. and Wuthier R.E. (1982) Activity of epiphyseal cartilage membrane alkaline phosphatase and the effect of its inhibitors at physiological pH. *J. Biol. Chem.* 257: 4141-4146.
- Dean D.D., Schwartz Z. and Munoz O.E. (1992) Matrix vesicles are enriched in metalloproteinases that degrade proteoglycans. *Calcif. Tissue Int.* 50: 42-349.
- deBernard B., Gherardini M., Lunazzi G.C., Modricky C., Moro L., Panfili E., Pollosello P., Stagni N. and Vittur F. (1985) Alkaline phosphatase of matrix vesicles from preosseous cartilage is a Ca<sup>2+</sup> binding glycoprotein. In: *The chemistry and biology mineralized tissue.* Butler W.T. (ed.) EBSCO Média. pp. 142-145.



- DeMeis L. and Vianna A.L. (1979) Energy interconversion by the  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 48: 275-292.
- Demenis M.A. and Leone F.A. (2000) Kinetic characteristics of ATP hydrolysis by a detergent-solubilized alkaline phosphatase from rat osseous plate. *IUBMB Life* 49: 113-119.
- DeSouza L.R. and Reed J.K. (1991) The involvement of ecto-ATPase activity in the phosphorylation of intracellular proteins by the addition of extracellular  $^{32}\text{P}$ -ATP in PC12 cells. *Neurochem. Int.* 19: 581-592.
- Dixon M. and Webb E.C (1979) In: *Enzymes*. 3rd Edn. Academic Press. New York. pp. 72-75.
- Doellgast G.J. and Fishman W.H. (1974) Purification of human placental alkaline phosphatase, salts effects in affinity chromatography. *Biochem. J.* 141: 103-112.
- Dombrowski K.E., Brewer K.A., Maleckar J.R., Kirley T.L., Thomas J.W. and Kapp J.A. (1997) Identification and partial characterization of ecto ATPase expressed by immortalized B-lymphocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 340: 10-18.
- Dombrowski K.E., Trevellian J.M., Cone C., Lu Y. and Phillips C.A. (1993) Identification and partial characterization of an ecto ATPase expressed by human natural killer cells. *Biochemistry* 32: 6515-6522.
- Donella-Deana A., Meyer H.E. and Pinna L.A. (1991) The use of phosphopeptides to distinguish between protein phosphatase and acid/alkaline phosphatase activities: opposite specificity toward phosphoseryl/phosphothreonyl substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 1094: 130-133.
- Dopping-Heppenstall P.J.C., Ali S.Y. and Stamp T.C.B. (1981) Matrix vesicles in osteoid Of human bone. In: *Proceedings of the Third International Conference on Matrix Vesicles* (Ascenzi A., Bonucci E. and deBernard B., eds). Milano. Wichug Editore Srl. pp. 229-234.
- Dornand J., Bonnafous J.C. and Mani J.C. (1978) Purification and properties of 5'-nucleotidase from lymphocyte plasma membranes. *Eur. J. Biochem* 87: 459-465
- Dzhandzhugazyan K. and Bock E. (1993) Demonstration of  $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})$ -ATPase activity of the neural cell adhesion molecule. *FEBS letters* 336: 279-283.
- Eanes E.D. (1992) Mixed phospholipid liposome calcification. *Bone Mineral* 17: 269-272.
- Eanes E.D. and Hailer A.W. (1985) Liposome-mediated calcium phosphate formation in metastable solutions. *Calcif. Tissue Int.* 37: 390-394.
- Eisenman D.R. and Glick P.L. (1972) Ultrastructure of initial crystal formations in dentin. *J. Ultrastruct. Res.* 41: 18-28.
- Ek B., Westmark B., Wasteson A. and Heldin C.H. (1982) Stimulation of tyrosine-specific phosphorylation by platelet-derived growth factor. *Nature* 295: 419-420.
- Epstein M.A. and Holt S.J. (1963) The localization by electron microscopy of HeLa cell surface enzymes splitting adenosine triphosphate. *J. Cell. Biol.* 19: 325-336.
- Ey P.L. and Ferber E. (1977) Calf thymus alkaline phosphatase. II. Interactions with detergents. *Biochim. Biophys. Acta* 480: 163-17.

- Fallon M.D., Whyte M.P. and Teitlebaum S.L. (1980) Stereo-specific inhibition of alkaline-phosphatase by L-tetramisole prevents in vitro cartilage calcification. *Lab. Invest.* 43: 489-494.
- Farley J.R., Levey J.L. and Baylink D.J. (1980) Human skeletal alkaline phosphatase. Kinetic studies including pH dependence and inhibition by theophylline. *J. Biol. Chem.* 255: 4680-4689.
- Felix R. and Fleisch H. (1976) Pyrophosphatase and ATPase of isolated cartilage matrix vesicles. *Calcif. Tissue Res.* 22: 1-7.
- Fernley H.N. (1971) Mammalian alkaline phosphatase. *The Enzymes* 4: 417-477.
- Ferreira S.T., Vasconcelos E.G. and Verjovski-Alemida S. (1995) The ecto-ATPase of endo-parasites and of blood cells and vessels. *Ciência Cultura* 47: 151-166.
- Fishman W.H. (1974) Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes. *Am. J. Med.* 56: 617-650.
- Fishman W.H. and Ghosh N.K. (1967) Influence of reagents reacting with metal thiol and amino sites on catalytic activity and L-phenylalanine inhibition of rat intestinal alkaline phosphatase. *Biochem. J.* 105: 1163-1170.
- Fleish H. (1980) Experimental basis for clinical use of diphosphonates in Paget's disease of bone. *Arthritis Rheum.* 23: 1162-1171.
- Fortuna R., Anderson H.C., Carty R. and Sajdera S.W. (1978) The purification and molecular characterization of alkaline phosphatase from chondrocytes and matrix vesicles of bone fetal epiphyseal cartilage. *Metab. Bone Disease Related Res.* 1: 161-168.
- Frassetto S.S., Dias R.D. and Sarkis J.J.F. (1993) Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (apyrase EC 3.6.1.5) in rat blood platelets. *Mol. Cell. Biochem.* 129: 47-55.
- Frassetto S.S., Dias R.D. and Sarkis J.J.F. (1995) Inhibition and kinetic alterations by excess free ATP and ADP of the ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) from rat blood platelets. *Platelets* 35: 499-506.
- Freemont A.J. (1989) Histology of mineralized tissues. In: *Topics in Molecular and Structural Biology* 11. Calcified tissue. D.W.L. Hukins (ed.). The Macmillan Press. London. pp. 21-40.
- Freemont A.J. (1993) Basic bone cell biology. *Int. J. Exp. Pathol.* 74: 411-416.
- Fritsch J. and ChesnoyMarchais D. (1994) Dual modulation of the L-type calcium current of rat osteoblastic cells by parathyroid-hormone-opposite effects of protein-kinase-C and cyclic-nucleotides. *Cell Signal* 6: 645-655.
- Gao J.P. and Knowles A.F. (1993) The epidermal growth factor/cAMP-inducible ecto  $Ca^{2+}$ -ATPase of human hepatoma Li-7A cells is similar to rat liver ectoATPase/hepatocyte cell adhesion molecule (Cell-CAM 105). *Arch. Biochem. Biophys.* 303: 90-97.
- Gao L., Dong L. and Whitlock J.P.Jr. (1998) A novel response to dioxin. Induction of ecto-ATPase gene expression. *J. Biol. Chem.* 273: 15358-15365.
- Gay C.V., Schraer H. and Hargest Jr.T.E. (1978) Ultrastructure of matrix vesicles and mineral in unfixed embryonic bone. *Metab. Bone* 16: 105-108.



- Genge B.R., Sauer R.G., Wu N.Y.L., McLean F.M. and Wuthier R.E. (1988) Correlations between loss of alkaline phosphatase activity and accumulations of calcium during matrix-mediated mineralization. *J. Biol. Chem.* 263: 18513-18519.
- Genge B.R., Wu L.N.Y. and Wuthier R.E. (1990) Differential fractionation of matrix vesicle proteins. Further characterization of the acidic phospholipid-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -binding proteins. *J. Biol. Chem.* 256: 4703-4710.
- Gersch I. (1973) Relation of the walls of large matrix compartments of epiphyseal cartilage to the formation of calcium crystals. In: *Submicroscopic Cytochemistry. II. Membranes Mitochondria and Connective Tissues* (Gersch I., ed.). Academic Press New York. pp. 189.
- Ghosh N.K. and Fishman W.H. (1968) L-phenylalanine inhibition of rat intestinal alkaline phosphatase: a homosteric phenomenon. *Arch. Biochem. Biophys.* 126: 700-706.
- Glimcher M.J. (1959) Molecular biology of mineralized tissues with particular reference to bone. *Rev. Comm.* 57: 299-306.
- Glimcher M.J. (1987) The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. *Intr. Course Lect.* 36: 49-69.
- Glimcher M.J. (1989) Mechanism of calcification: role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes in vitro and in vivo. *Anat. Rec.* 224: 139-153.
- Glimcher M.J. (1992) The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. In: *Disorders of bone and mineral metabolism*. pp. 265-286.
- Golub E.E., Harrison G., Taylor A.G., Camper S. and Shapiro I.M. (1992) The role of alkaline phosphatase in cartilage mineralization. *Bone Mineral* 17: 273-278.
- Gronberg M. and Flatmark T. (1987) Studies on  $\text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPase in bovine adrenal chromaffin granules with special reference to the effect on inhibitors and energy coupling. *Eur. J. Biochem.* 164: 1-8.
- Hakeda Y., Ikeda E., Kurihara N., Nakataani Y., Maeda N. and Kumegawa M. (1985) Induction of osteoblastic cell-differentiation by forskolin-stimulation of cyclic-AMP production and alkaline-phosphatase activity. *Biochim. Biophys. Acta* 838: 49-53.
- Hall A.K. and Dickson I.R. (1985) The effects of parathyroid hormone on osteoblast-like cells from embryonic chick calvaria. *Acta Endocrinol.* 108: 217-233.
- Handa M. and Guidotti G. (1996) Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218: 916-923.
- Hanks S.K., Quinn A.M. and Hunter T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241: 42-52.
- Harkness D.R. (1968) Studies on human placental alkaline phosphatase. II. Kinetic properties and studies on the apoenzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 126: 513-523.
- Harris H. (1989) The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin. Chim. Acta* 186: 133-150.
- Hartree E.F. (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analyt. Biochem.* 48: 422-427.
- Haussler M.R., Nagode L.A. and Rasmussen H. (1970) Induction of intestinal brush border alkaline phosphatase by vitamin D and identity with  $\text{Ca}$ -ATPase. *Nature (London)* 228: 1199-1201.

- Heath J.K., Atkinson S.J., Meikle M.C. and Reynolds J.J. (1984) Mouse osteoblasts synthesize collagenase in response to bone resorbing agents. *Biochim. Biophys. Acta* 802: 151-154.
- Heinonen J.K. and Lathi K.R. (1981) A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Analyt. Biochem.* 113: 313-317.
- Helenius A. and Simons K. (1975) Solubilization of membrane by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* 415: 29-79.
- Henderson J.F. and Paterson A.R.P. (1973) *Nucleotide Metabolism*. Academic Press. New York.
- Heppel L.A., Harkness D.R. and Hilmoe R.J. (1962) A study of the substrate specificity and other properties of the alkaline phosphatase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 237: 841-846.
- Heywood B.R. and Eanes E.D. (1992) An ultrastructural study of the effects of acidic phospholipid substitutions on calcium phosphate precipitation in anionic liposomes. *Calcif. Tissue Int.* 50: 149-156.
- Hidalgo C., Gonzalez M.E. and Lagos R. (1983) Characterization of the  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$  ATPase of transverse tubule membranes isolated from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 258: 13937-13945.
- Hiramatsu M., Ikeda E., Kashimata M., Minami N., Kodama H., Sudo H and Kumegawa M. (1983) Effect of dibutyril-cyclic-AMP on collagen-synthesis in a clonal osteoblast-like cell-line derived from newborn mouse calvaria. *J. Biochem.* 94: 1353-1358.
- Hirschman A., Deutsch D. and Hirschman M. (1983) Neutral peptidase activities in matrix vesicles from bovine fetal alveolar bone and dog osteosarcoma. *Calcif. Tissue Int.* 35: 791-797.
- Hiwada K. and Wachsmuth E. (1974) Catalytic properties of alkaline phosphatase from pig kidney. *Biochem. J.* 141: 283-291.
- Hjelmeland L.M. and Chrambach A. (1984) Solubilization of functional membrane proteins. *Methods Enzymol.* 104: 305-318.
- Hohmann J., Kowalewski H., Vogel M. and Zimmermann H. (1993) Isolation of a  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$ -activated ATPase (ecto-ATPase) from bovine brain synaptic membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1152: 146-154.
- Hooper N.M. and Bashir A. (1991) Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins can be distinguished from transmembrane polypeptide-anchored proteins by differential solubilization and temperature-induced phase separation in Triton X-114. *Biochem. J.* 280: 745-751.
- Hourani S.M.O. and Chown J.A. (1989) The effect of some possible inhibitors of ectonucleotidases on the breakdown and pharmacological effect of ATP in the guinea-pig urinary bladder. *Gen. Pharmacol.* 20: 413-416.
- Howell D.S., Pita J.C., Marquez J.F. and Gatter R.A. (1969) Demonstration of macromolecular inhibitors of calcification and nucleational factors in fluid from calcifying sites in cartilage. *J. Clin. Invest.* 48: 630-641.
- Howell D.S., Pita J.C., Marquez J.F. and Madrugá J.E. (1968) Partition of calcium phosphate and protein in fluid phase aspirated at calcifying sites in epiphyseal cartilage. *J.*



- Clin. Invest. 47: 1121-1132.
- Hsu H.H.T. (1992) Further studies on ATP-mediated Ca deposition by isolated matrix vesicles. *J. Bone Mineral Res.* 17: 279-283.
- Hsu H.H.T. (1994) Mechanisms of initiating calcification. ATP-stimulated Ca- and Pi-depositing activity of isolated matrix vesicles. *Int. J. Biochem.* 26: 1351-1356.
- Hsu H.H.T. and Anderson H.C. (1977) A simple and defined method to study calcification by isolated matrix vesicles. Effect of ATP and vesicles phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 500: 162-172.
- Hsu H.H.T. and Anderson H.C. (1978) Calcification of isolated matrix vesicles and reconstituted vesicles from fetal bovine cartilage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 3805-3808.
- Hsu H.H.T. and Anderson H.C. (1995) A role for ATPase in the mechanisms of ATP-dependent Ca and phosphate deposition by isolated rachitic matrix vesicles. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 12: 1349-1356.
- Hsu H.H.T. and Anderson H.C. (1996) Evidence of the presence of a specific ATPase responsible for ATP-initiated calcification by matrix vesicles isolated from cartilage and bone. *J. Biol. Chem.* 271: 26383-26388.
- Hsu H.H.T., Morris D.C., Davis L., Morylan P. and Anderson H.C. (1993) Purification and partial characterization of alkaline phosphatase of matrix vesicles from bovine fetal epiphyseal cartilage. *Int. J. Biochem.* 25: 1737-1742.
- Hsu H.H.T., Munoz P.A., Barr J., Oppliger I., Morris D.C., Vaananem H.K., Tarkenton N. and Anderson H.C. (1985) Purification and partial characterization of alkaline phosphatase of matrix vesicles from fetal bovine epiphyseal cartilage. *J. Biol. Chem.* 260: 1826-1831.
- Ioune K., Koizumi S. and Nakazawa K. (1995) Glutamate-evoked release of adenosine 5'-triphosphate causing an increase in intracellular calcium in hippocampal neurons. *Neuroreport.* 6: 437-440.
- Johnson T.F., Morris D.C. and Anderson H.C. (1989) Matrix vesicles and calcification of rachitic rat osteoid. *J. Exp. Pathol.* 4: 123-132.
- Kaczmarek E., Koziak K., Sévigny J., Siegel J.B., Anrather J., Beaudoin A.R., Bach F.H. and Robson S.C. (1996) Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* 271: 33116-33122.
- Kahn S.E., Jafri A.M., Lewis N.J. and Arsenis C. (1978) Purification of alkaline phosphatase from extracellular vesicles of fracture callus cartilage. *Calcif. Tissue Res.* 25: 85-92.
- Kasuga M., Zick Y., Blithe D.L., Crettaz M. and Kahn R. (1982) Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in a cell free system. *Nature (London)* 298: 667-669.
- Katsura N.Y. and Yamada K. (1986) Isolation and characterization of a metalloprotease associated with chicken epiphyseal cartilage matrix vesicles. *Bone* 7: 137-143.
- Keeling D.J., Hersöf B., Ryberg S., Sjögren S. and Sölvell L. (1997) Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases. Targets for drug discovery? *Ann. New York Acad. Sci. USA* 834: 600-608.

- Kegel B., Braun N., Heine P., Maliszewski C.R. and Zimmermann H. (1997) An ecto-ATPase and an ecto-ATP diphosphohydrolase are expressed in rat brain. *Neuropharmacol.* 36: 1189-1200.
- Keleti T., Leoncini R. Pagani R. and Marinello E. (1987) A kinetic method for distinguishing whether an enzyme has one or two active sites for two different substrates. Rat liver L-threonine dehydratase has a single active site for threonine and serine. *Eur. J. Biochem.* 170: 179-183.
- Kettlun A.M., Alvarez A., Quintar R. Valenzuela M.A., Collados L., Aranda E., Banda A., Chayet L., Chiong M., Mancilla M. and Traverso-Cori A. (1994) Human placental ATP-diphosphohydrolase: biochemical-characterization regulation and function. *Int. J. Biochem.* 26: 437-448.
- Kettlun A.M., Urra R., Leyton M., Valenzuela M.A., Mancilla M. and Traverso-Cori A. (1992) Purification and characterization of 2 isoapyrases from solanum-tuberosum var ultimus. *Phytochem.* 31: 3691-3696.
- Kiam W. and Schwederski B. (1991) *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life.* John Wiley. New York. pp. 286-302.
- Kim E.E. and Wyckoff H.W. (1991) Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two metal catalysis. *J. Mol. Biol.* 218: 449-464.
- Kirley T.L. (1988) Purification and characterization of the Mg<sup>2+</sup>-ATPase from rabbit skeletal transverse tubule. *J. Biol. Chem.* 263: 12682-12689.
- Kirley T.L. (1997) Complementary DNA cloning and sequencing of the chicken muscle ecto-ATPase: homology with the lymphoid cell activation antigen CD39. *J. Biol. Chem.* 272: 1076-1081.
- Knowles A.F. (1988) Differential expression of ecto-Mg<sup>2+</sup>-ATPase and ecto-Ca<sup>2+</sup>-ATPase activities in human hepatoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 263: 264-271.
- Knowles A.F. and Leng L. (1984) Purification of a low affinity Mg<sup>2+</sup>(Ca<sup>2+</sup>)-ATPase from the plasma membranes of a human oat cell carcinoma. *J. Biol. Chem.* 259: 10919-10924.
- Knowles A.F. and Nagy A.K. (1999) Inhibition of an ecto-ATP-diphosphohydrolase by azide. *Eur. J. Biochem.* 262: 349-357.
- Knowles A.F., Isler R.E. and Reece J.F. (1983) The common occurrence of ATP diphosphohydrolase in mammalian plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 731: 88-96.
- Komoszyński M. and Wojtczak A. (1996) Apyrases (ATP diphosphohydrolases EC 3.6.1.5): fuction and relationship to ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* 1310: 233-241.
- Komoszyński M.A. and Skąlska E. (1990) Ca<sup>2+</sup>-stimulated organic pyrophosphatase – a new plant pyrophosphatase from wheat seedling microsomes. *Acta Biochim. Polonica* 37: 405-416.
- Korhonen L.K. Hamalainen M. and Kaivosoja M. (1977) Purification of alkaline phosphatase from extracellular vesicles of fracture callus cartilage. *Calcif. Tissue Res.* 25: 85-92.
- Kumar R., Haugen J.D. and Penniston J.T. (1993) Molecular cloning of a plasma membrane calcium pump from human osteoblasts. *J. Bone Mineral Res.* 8: 505-513.



- Kwan C.Y and Ramlal T. (1982) On the inhibition of smooth muscle membrane ATPase by sodium azide. *Biochem. Int.* 4: 439-449.
- Kwan C.Y., Kostka P. and Ramlal T. (1984) Properties of a widespread azide-sensitive adenosine diphosphohydrolase in smooth muscle. *Mol. Physiol.* 6: 99-114.
- Laliberté J.F., St-Jean P. and Beaudoin A.R. (1982) Kinetic effects of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  on ATP hydrolysis by the purified ATP diphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* 257: 3869-3874.
- Lambert M. and Cristophe J. (1978) Characterization of (MgCa)-ATPase activity in rat pancreatic plasma membranes. *Eur. J. Biochem.* 91: 485-492.
- Landis W.J. (1987) A study of calcification in the leg tendons from the domestic turkey. *J. Ultrastr. Molec. Struct. Res.* 94: 217-238.
- Landis W.J. and Glimcher M.J. (1978) Electron diffraction and electron probe microanalysis of the mineral phase of bone tissue prepared by anhydrous techniques. *J. Ultrastr. Res.* 63: 188-223.
- Landis W.J., Hauschka B.T. Rogerson C.A. and Glimcher M.J. (1977a) Electron microscopic observations of bone tissue prepared by ultracryomicrotomy. *J. Ultrastr. Res.* 59: 185-206.
- Landis W.J., Paine M.C. and Glimcher M.J. (1977b) Electron microscopic observations of bone tissue prepared anhydrously in organic solvents. *J. Ultrastr. Res.* 59: 1-30.
- LeBel D., Poirier G.G., Phaneuf S., St.-Jean P., Laliberté J.F. and Beaudoin A.R. (1980) Characterization and purification of a calcium-sensitive ATP diphosphohydrolase from pig pancreas. *J. Biol. Chem.* 255: 1227-1233.
- Leone F.A., Ciancaglini P. and Pizauro J.M. (1997a) Effect of calcium ions on rat osseous plate alkaline phosphatase activity. *J. Inorg. Biochem.* 68: 123-127.
- Leone F.A., Ciancaglini P., Pizauro J.M. and Rezende A.A. (1995) Rat osseous plate alkaline phosphatase: mechanism of action of manganese ions. *Biometals* 8: 86-91.
- Leone F.A., Degreve L. and Baranauskas J.A. (1992b) Sigraf: A versatile computer program for fitting enzyme kinetic data. *Biochem. Education.* 20: 94-96.
- Leone F.A., Pizauro J.M. and Ciancaglini P. (1997) Rat osseous plate alkaline phosphatase: a search for its role in biomineralization. *Trends Comp. Biochem. Physiol.* 3: 57-73.
- Leone F.A., Pizauro J.M., Ciancaglini P. (1992a) Effect of pH on the modulation of rat osseous plate alkaline phosphatase by metal ions. *Int. J. Biochem.* 24: 923-928.
- Leone F.A., Rezende L.A., Ciancaglini P. and Pizauro J.M. (1998) Allosteric modulation of pyrophosphatase activity of rat osseous plate alkaline phosphatase by magnesium ions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30: 89-97.
- Lewis-Carl S. and Kirley T.L. (1997) Immunolocalization of the ecto-ATPase and ecto-apyrase in chicken gizzard and stomach. Purification and N-terminal sequence of the stomach ecto-apyrase. *J. Biol. Chem.* 272: 23645-23652.
- Lienhard G.E. and Secemski I. (1973)  $\text{P}^1, \text{P}^5$ -Di (adenosine-5') pentaphosphate, a potent multisubstrate inhibitor of adenylate kinase. *J. Biol. Chem.* 248: 1121-1123
- Lin S.H. (1985) Novel ATP-dependent calcium transport component from rat liver plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 260: 7850-7856.

- Lin S.H. and Fain J.N. (1984) Purification of (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase from rat liver plasma membranes. *J. Biol. Chem.* 259: 3016-3020.
- Lin S.H. and Guidotti G. (1989) Cloning and expression of a cDNA coding for a rat liver plasma membrane ecto-ATPase. *J. Biol. Chem.* 264: 14408-14414.
- Lin S.H. and Russell W.E. (1988) Two Ca<sup>2+</sup>-dependent ATPase in rat liver plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 263: 12253-12258.
- Ma H.L., Zhong L.L., Inesi G., Fortea I., Soler F. and Fernandez-Belda F. (1999). Overlapping effects of S3 stalk segment mutations on the affinity of Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) for thapsigargin and cyclopiazonic acid. *Biochemistry* 38:15522-15527.
- Magocsi M. and Penniston J.T. (1991) Ca<sup>2+</sup> or Mg<sup>2+</sup> nucleotide phosphohydrolases in myometrium: two ecto-enzymes. *Biochem. Biophys. Acta* 1070: 163-172.
- Majeska R.J. and Wuthier R.E. (1975) Studies on matrix vesicles isolated from chick epiphyseal cartilage. Association of pyrophosphatase and ATPase activity with alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 391: 51-60.
- Maliszewski C.R., Delespesse G.J.T., Schonenborn M.A., Armitage R.J., Fanslow W.C., Nakajima T., Baker E., Sutherland G.R., Poindexter K., Birks C., Alpert A., Friend D., Gimpel S.D. and Gayle R.B. III (1994) The CD39 lymphoid cell activation antigen. *J. Immunol.* 153: 3574-3583.
- Mans B.J., Gaspar A.R.M.D., Louw A.I. and Neitz A.W.H. (1998) Purification and characterization of apyrase from the tick *Ornithodoros savignyi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 120B: 617-624.
- Mant M.J. and Parker K.R. (1981) Two platelet aggregation inhibitors in tsetse (*Glossina*) saliva with studies of roles of thrombin and citrate in vitro platelet aggregation. *Br. J. Haematol.* 48: 601-608.
- Marcus A.J., Broekman M.J., Drosopoulos J.H.F., Islam N., Alyonycheva T.N., Safier L.B., Hajjar K.A., Posnett D.N., Schoenborn M.A., Schooley K.A., Gayle R.B. and Maliszewski C.R. (1997) The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J. Clin. Invest.* 99: 1351-1360.
- Marks S.C. and Hermey D.C. (1996) The structure and development of bone. In: *Principles of Bone Biology*. Bilezikian J.P., Raiz L.G. and Rodan G.A. (eds.). Academic Press. New York. pp 3-14.
- Marks S.C. and Popoff S.N. (1988) Bone cell biology: the regulation of development structure and function in the skeleton. *Am. J. Anat.* 183: 1-44.
- Marti E., Aranda I.G. and Solsona C. (1997) 8-azido-nucleotides as substrates of *Torpedo* electric organ apyrase. Effect of photoactivation on apyrase activity. *Brain Res. Bulletin* 44: 695-699.
- Marti E., Cantí C., de Aranda I.G., Miralles F. and Solsona C. (1996) Action of suramin upon ecto-apyrase activity and synaptic depression of *Torpedo* electric organ. *Br. J. Pharmacol.* 118: 1232-1236.
- Matsuzawa T. and Anderson H.C. (1971) Phosphatase of epiphyseal cartilage studied by electron microscopic cytochemical methods. *J. Histochem. Cytochem.* 19: 801-808.
- McComb R.B., Bowers G.N. and Posen S. (1979) In: *Alkaline phosphatase*. Plenum Press New York.



- McLaughlin J. and Muller M. (1981) A calcium regulated adenosine-triphosphatase in *entamoeba-histolytica*. *Molec. Biochem. Parasitol.* 3: 369-379.
- McLean F.M., Keller P.J., Genge B.R. Walters S.A. and Wuthier R.E. (1987) Disposition of preformed mineral in matrix vesicles. Internal localization and association with alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* 262: 10481-10488.
- Meghji K. and Burnstock G. (1995) Inhibition of extracellular degradation in endothelial cells. *Life Sci.* 57: 762-771.
- Melani F. Rampom G Farnararo M. Cocucci and Gerritore A. (1967) Regulation by phosphate of alkaline phosphatase in rat kidney. *Biochim. Biophys. Acta.* 138: 411-420.
- Meyer J.H. and Reddi H.A. (1985) Changes in pyrophosphatase activity during the *de novo* mineralization associated with cartilage and bone formation. *Arch. Biochem. Biophys.* 242: 532-539.
- Meyer-Fernandes J.R., Dutra P.M.L., Rodrigues C.O., Saad-Nehme J. and Lopes A.H.C.S. (1997) Mg-dependente Ecto-ATPase activity in *Leishmania tropica*. *Arch. Biochem. Biophys.* 341: 40-46.
- Meyerhof O. (1945) The origin of the reaction of Harden and Young in the cell-free alcoholic fermentation. *J.Biol. Chem.* 157:105-109.
- Michell R.H. (1984) Hormone action at membranes. *TIBS* 9: 3-4.
- Misumi Y., Tashiro K., Hattori M., Sakaki Y. and Ykehara Y. (1988) Primary structure of rat liver alkaline phosphatase deduced from its cDNA. *Biochem. J.* 249: 661-668.
- Mita M., Yoshikumi M. and Nagahama Y. (1998) Ecto-ATP diphosphohydrolase (apyrase) in ovarian follicle cells of starfish *Asterina pectinifera*. *Comp. Biochem. Physiology* 119B: 577-583.
- Miura Y., Hirota K., Arai Y. and Yagy K. (1987) Purification and partial characterization of adenosine diphosphatase activity in bovine aorta microsomes. *Tromb. Res.* 46: 685-695.
- Molnar J. and Lorand L. (1961) Studies on apirases. *Arch. Biochem. Biophys.* 93: 353-363.
- Moodie F.D.L, Baum H., Butterworth P.J., and Peters T.J. (1991) Purification and characterization of bovine spleen ADPase. *Eur. J. Biochem.* 22: 1209-1215.
- Morris D.C., Moylan P.E. and Anderson H.C. (1992) Immunochemical and immunocytochemical identification of matrix vesicle proteins. *Bone Mineral* 17: 209-213
- Morris S.A. and Bilezikian J.P. (1996) In: *Principles of Bone Biology* (J.P. Bilezikian J.P., Raisz L.G. and Rodan G.A., eds.). Academic Press. New York. pp. 1203-1215.
- Morton R.K. (1955) Some properties of alkaline phosphatase of cow's milk and calf intestinal mucosa. *Biochem. J.* 60:573-582
- Moss D.W. (1992) Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clin. Chem.* 38: 2486-2492
- Muller K., Schellenger V., Borneleit P. and Reide A. (1991) The alkaline phosphatase from bone: transphosphorylating activity and kinetic mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1076: 308-313
- Mundy G.R. and Roodman G.D. (1987) Osteoclast ontogeny and function. In: *Bone and Mineral Research*. Vol. 5. W. A. Peck (ed.). Eselvier. Amsterdam. pp. 209-279.

- Murphree S., Hsu H.H.T. and Anderson H.C. (1982) In vitro formation of crystalline apatite by matrix vesicles isolated from rachitic rat epiphyseal cartilage. *Calcif. Tissue Int.* 24: 562-568.
- Nagy A.K., Knowles A.F. and Nagami G. (1998) Molecular cloning of the chicken ecto-ATP diphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* 273: 16043-16049.
- Neuman W.F., Distefano V. and Mulryan B.J. (1951) The surface chemistry of bone III. Observation on the role of phosphatase. *J. Biol. Chem.* 193: 227-235.
- Nijweide P.J., DeHaas E.W.H.K. and Vassenaar A.M. (1981) Alkaline phosphatase and calcification correlated or not? *Metab. Bone Disease* 3: 61-66.
- Oliveira E.M., Batastini A.M.O., Meirelles M.N., Moreira C.M., Dias R.D. and Sarkis J.J.F. (1997) Characterization and localization of an ATP diphosphohydrolase activity (EC 3.6.1.5) in sarcolemmal membrane from rat heart. *Mol. Cell. Biochem.* 170:115-123.
- Oyajobi B.O. and Russell R.G.G. (1992) Bone remodeling cytokines and joint disease. In: *Articular Cartilage and Osteoarthritis* (Kuettner K.E., Schleyerbach R., Feyron J.G. and Hascall V.C., eds.). Raven Press. New York. pp. 333-348
- Papamarcaki T. and Tsolas O. (1990) Identification of ATP diphosphohydrolase activity in human term placenta using a novel assay for AMP. *Mol. Cell Biochem.* 97: 1-8.
- Paz C.A.O., Gonzalez D.A. and Alonso G.L. (1988) Demonstration of the simultaneous activation of  $Ca^{2+}$ -independent and  $Ca^{2+}$ -dependent ATPases from rat skeletal muscle microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* 939: 409-415.
- Peress N.S., Anderson H.C. and Sajdera S.W. (1974) The lipids of matrix vesicles from bovine fetal epiphyseal cartilage. *Calcif. Tissue Res.* 14: 275-281.
- Periyasamy S.M. Huang W. and Askari A. (1983) Origins of the different sensitivities of  $(Na^+K^+)$ -dependent adenosine triphosphatase preparations to ouabain. *Comp. Biochem. Physiol.* 76B: 449-454.
- Peterkofsky B. and Diegelmann R. (1971) Use of a mixture of proteinase-free collagenase for specific assay of radioactive collagen in presence of other proteins. *Biochemistry* 10: 988-994.
- Picher M., Béliveau R., Potier M., Savaria D., Rousseau E. and Beaudoin A.R. (1994) Demonstration of an ectoATP-diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in non-vascular smooth muscles of the bovine trachea. *Biochim. Biophys. Acta.* 1200: 167-174.
- Picher M., Coté Y.P., Beliveau R., Potier M. and Beaudoin A.R. (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., Valenzuela M.A., Kettlun A.M., Mancilla M., Aranda E., Collados L. and Traverso-Cori A. (1991) ATPase-ADPase activities of rat placental tissue. *Comp. Biochem. Physiol.* 100B: 281-285.
- Pilla C., Emanuelli T., Frassetto S.S., Battastini A.M.O., Dias R.D. and Sarkis J.J.F. (1996) ATP diphosphohydrolase activity (apyrase EC 3.6.1.5) in human blood platelets. *Platelets* 7: 225-230.
- Pizauro J.M., Ciancaglini P. and Leone F.A. (1992) Phosphotransferase activity associated with rat osseous plates alkaline phosphatase: a possible role in biomineralization. *Int. J. Biochem.* 24: 1391-1396.



- Pizauro J.M., Ciancaglini P. and Leone F.A. (1994) Osseous plate alkaline phosphatase is anchored by GPI. *Brazilian J. Med. Res.* 27: 453-456.
- Pizauro J.M., Ciancaglini P. and Leone F.A. (1995) Characterization of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C-released form of rat osseous plate alkaline phosphatase and its possible significance on endochondral ossification. *Mol. Cell. Biochem.* 152: 121-129.
- Pizauro J.M., Curti C., Ciancaglini P. and Leone F.A. (1988) Kinetic properties of Triton X-100 solubilized bone matrix- induced alkaline phosphatase. *Cell. Mol. Biol.* 34: 553-562.
- Pizauro J.M., Curti C., Ciancaglini P. and Leone F.A. (1987) Triton X-100 solubilized bone matrix-induced alkaline phosphatase. *Comp. Biochem. Physiol.* 87B: 921-926.
- Pizauro J.M., Demenis M.A., Ciancaglini P. and Leone F.A. (1998) Kinetic characterization of a membrane-specific ATPase from rat osseous plate and its possible significance on endochondral ossification. *Biochim. Biophys. Acta* 1368: 108-114.
- Plesner L. (1995) Ecto-ATPases: identities and functions. *Int. Rev. Cytol.* 158: 141-214.
- Plesner L., Kirley T.L. and Knowles A.F. (1997) Ecto-ATPases. Recent progress on structure and function. Plenum Press. New York.
- Poole A.R., Mitsui Y., Hinek A. and Lee E.R. (1989) Cartilage macromolecules and the calcification of cartilage matrix. *Anat. Rec.* 224: 167-179.
- Proverbio F., Marín R. and Proverbio T. (1991) The ouabain-insensitive sodium pump. *Comp. Biochem. Physiol.* 99: 279-283.
- Rasmussen H. (1983) Hypophosphatasia. In: *The metabolic basis of inherited disease.* Stanbury J.B., Wyngaarden J.B. and Fredrickson D.S. (eds.). McGraw-Hill. New York. pp. 1497-1507.
- Reddi A.H. and Huggins C. (1972) Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblast in adolescent rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1601-1605.
- Reddy S.V., Scarcez T., Windle J.J., Leach R.J., Hundley J.E., Chirgwin J.M., Chou J.Y. and Roodman G.D. (1993) Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the mouse tartrate-resistant acid phosphatase gene. *J. Bone Mineral Res.* 8: 1263-1270.
- Register T.C. and Wuthier R.E. (1984) Effect of vanadate a potent alkaline phosphatase inhibitor on <sup>45</sup>Ca and <sup>32</sup>Pi uptake by matrix vesicle enriched fractions from chicken epiphyseal cartilage. *J. Biol. Chem.* 259: 3511-3518..
- Register T.C., Gregory P.W. and Wuthier R.E. (1984) Effect on L- and D-tetramisole on <sup>32</sup>Pi and <sup>45</sup>Ca uptake and mineralization by matrix vesicle-enriched fractions from chicken epiphyseal cartilage. *J. Biol. Chem.* 259: 922-928
- Register T.C., McLean F.M., Low M.G. and Wuthier R.E. (1986) Roles of alkaline phosphatase and labile internal mineral in matrix vesicle-mediated calcification. *J. Biol. Chem.* 261: 9354-9360.
- Revell P.A. (1983) Histomorphometry of bone. *J. Clin. Pathol.* 36: 1323-1331.
- Rezende A.A., Pizauro J.M., Ciancaglini P. and Leone F.A. (1994) Phosphodiesterase activity is a novel property of alkaline phosphatase from osseous plate. *Biochem. J.* 301: 517-522.

- Rezende L.A., Ciancaglini P., Pizauro J.M. and Leone F.A. (1998) Inorganic pyrophosphate-phosphohydrolytic activity associated with rat osseous plate alkaline phosphatase. *Cell. Mol. Biol.* 44: 293-302.
- Ribeiro J.M.C. and Garcia E.S. (1979) Apyrase activity in saliva and crop of *Rhodnius prolixus*. *Anais Acad. Bras. Cien.* 51: 182.
- Ribeiro J.M.C. and Garcia E.S. (1980) The salivary and crop apyrase activity of *Rhodnius prolixus*. *J. Insect. Physiol.* 26: 303-307.
- Ribeiro J.M.C. and Garcia E.S. (1981a) Platelet antiaggregation activity in the salivary secretion of the blood sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Experientia* 37: 384-386
- Ribeiro J.M.C. and Garcia E.S. (1981b) The role of salivary in feeding in *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol.* 94: 219-230
- Ribeiro J.M.C., Makoul G.T., Levine J., Robinson D and Spielman A. (1985) Antihemostatic, antiinflammatory and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *J. Exp. Med.* 161: 332-344.
- Ribeiro J.M.C., Sarkis J.J.F., Rossignol P.A. and Spielman A. (1984) Salivary apyrase of *Aedes aegypti*: characterization and secretory fate. *Comp. Biochem. Physiol.* 79B:81-86.
- Robey P.G. and Boskey A.L. (1996) The biochemistry of bone. In: Osteoporosis. Marcus R., Feldman D. and Kelsey J. (eds.). Academic Press. New York. pp. 95-183.
- Robison R. (1923) The possible significance of hexose phosphoric esters in ossification. *Biochem. J.* 17: 286-293.
- Rojas E., Arispe N., Haigler H.T., Burns. A.L. and Pollard H.B. (1992) Identification of annexins as calcium channels in biological membrane. *Bone Mineral* 17: 214-218.
- Russell R.G.G. (1965) Excretion of inorganic pyrophosphatase in hypophosphatasia. *Lancet* II. 461-464.
- Russell R.G.G., Bisaz S., Donath A., Morgan D.B. and Fleisch H. (1971) Inorganic pyrophosphate in plasma normal persons and in patient with hypophosphatasia osteogenesis imperfecta and other disorders of bone. *J. Clin. Invest.* 50: 961-969.
- Rylander B.E., Bergman T. and Andersson G. (1991) Characterization of a tartrate-resistant acid phosphatase (ATPase) from rat bone: hydrodynamic properties and N-terminal amino acid sequence. *J Bone Mineral Res* 6: 365-373.
- Sandoval S., García L., Mancilla M., Kettlun A.M., Collados L., Chayet L., Alvarez A., Traverso-Cori A. and Valenzuela M.A. (1996) ATP-diphosphohydrolase activity in rat renal microvillar membranes and vascular tissue. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28: 591-599.
- Sarkis J.J.F. and Salto C. (1991) Characterization of a synaptosomal ATP diphosphohydrolase from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *Brain Res. Bulletin* 26: 871-876.
- Sarkis J.J.F., Battastini A.M.O., Oliveira E.M., Frassetto S.S. and Diaz R.D. (1995) ATP diphosphohydrolase: an overview. (1995) *J. Braz. Ass. Ad. Sci.* 47: 131-136.
- Sarkis J.J.F., Guimares J.A. and Ribeiro J.M.C. (1986) Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus*: kinetics and purification. *Biochem. J.* 233: 885-891.



- Sauer G.R. and Wuthier R.E. (1988) Fourier transform infrared characterization of mineral phases formed during induction of mineralization by collagenase released matrix vesicles in vitro. *J. Biol. Chem.* 263: 13718-13724.
- Say J.C., Ciuffi K., Furriel R.P.M., Ciancaglini P. and Leone F.A. (1991) Alkaline phosphatase from rat osseous plates: purification and biochemical characterization of a soluble form. *Biochim. Biophys. Acta* 1074: 256-262.
- Schenk R.K. (1980) Basic histomorphology and physiology of skeletal growth. In: *Treatment of fractures in children and adolescents* (Werber B.G., Brunner C. and Freuler F., eds.). Springer Verlag, Berlin.
- Segel I.H. (1976) *Enzyme Kinetics*. John Wiley & Sons New York. pp. 113-118.
- Sela J., Schwartz Z., Amin D., Swain L.D. and Boyan B.D. (1992) The effect of bone injury on extracellular matrix vesicle proliferation and mineral formation. *Bone Mineral* 17: 163-167.
- Sévigny J., Côté Y.P. and Beaudoin A.R. (1995) Purification of pancreas type-I ATP diphosphohydrolase and identification by affinity labelling with the 5'-p-fluorosulphonyl benzoladenosine ATP. *Biochem. J.* 312: 351-356.
- Sévigny J., Levesque F.P., Grondin G. and Beaudoin A.R. (1997b) Purification of the blood vessel ATP diphosphohydrolase identification and localisation by immunological techniques. *Biochim. Biophys. Acta* 1334: 73-88.
- Sévigny J., Picher M., Grondin G. and Beaudoin A.R. (1997a) Purification and immunohistochemical localization of the ATP diphosphohydrolase in bovine lungs. *Am. J. Physiol.* 272: L939-L950.
- Shah S.U., Kempson S.A., Northrup T.E. and Douse T.P. (1979) Renal adaptation to a low phosphate diet in rat. Blockage by actinomycin D. *J. Clin. Invest.* 64: 955-966.
- Shi X.J. and Knowles A.F. (1994) Prevalence of the mercurial sensitive Ecto-ATPase in human small cell lung carcinoma: characterization and partial purification. *Arch. Biochem. Biophys.* 315: 177-184.
- Shinozaki T., Chigira M. and Udagawa E. (1990) Identification of serum alkaline phosphatase from human bone. *J. Japanese Orthop. Assoc.* 64: 50-55.
- Shinozaki T., Watanabe H., Arita S. and Chigira M. (1995) Amino acid phosphatase activity of alkaline phosphatase. A possible role of protein phosphatase. *Eur. J. Biochem.* 277: 367-371.
- Sigel H. (1990) Mechanistic aspects of the metal ion promoted hydrolysis of 5'-triphosphates (NTPs). *Coord. Chem. Rev.* 100: 453-539.
- Simon L.S., Slovik S.M., Neer R.M. and Krane S.M. (1988) Changes in serum levels of type-I and type-III procollagen extension peptides during infusion of human parathyroid-hormone fragment (1-34). *J. Bone Mineral Res.* 3: 241-246.
- Singer S.J. and Nicolson G.L. (1973) The fluid mosaic model of structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731.
- Sisca R.F. and Provenza D.V. (1972) Initial dentin formation in human deciduous teeth. An electron microscopic study. *Calcif. Tissue Res.* 9: 1-16.
- Skerry T.M., Bitensky L., Chayen J. and Lanyon L. (1989) Early strain related changes in osteocytes following bone loading in vivo. *J. Bone Mineral Res.* 4: 783-788.

- Skillen A.W. and Rahbani-Nobar M. (1980) Alkaline phosphatase and ATPase activities of rat bone: separation and characterization. *Calcif. Tissue Int.* 30: 67-71.
- Skrtic D. and Eanes E.D. (1992) Membrane mediated precipitation of calcium phosphate in model liposomes with matrix vesicle like lipid composition. *Bone Mineral* 16: 109-119.
- Slavkin H.C., Bringas Jr.P., Croissant R. and Bavetta L.A. (1972) Epithelial-mesenchymal interactions during odontogenesis. II Intercellular matrix vesicles. *Merch Age Dev.* 1: 139-161.
- Smith T.M. and Kirley T.L. (1998) Cloning sequencing and expression of a human brain ecto-apyrase related to both the ecto-ATPases and CD39 ecto-apyrases. *Biochim. Biophys. Acta* 1386: 65-78.
- Smith T.M., Kirley T.L. and Hennessey T.M. (1997) A soluble ecto ATPase from *Tetrahymena thermophila*: purification and similarity to the membrane-bound ATPase of smooth muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 337: 351-359.
- Soriani M., Spaans M.C., Tobler M. and Freiburghaus A.U. (1995) Nucleoside phosphatase activities on pig pancreas zymogen membranes analyzed by non-denaturing polyacrilamide gel electrophoresis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 27: 1043-1054.
- Stagni N., Furlan G., Vittur F., Zanetti M. and de Bernard B. (1979) Enzymatic properties of the Ca-binding glycoprotein isolated from preosseous cartilage. *Calcif. Tissue Int.* 29: 27-32.
- Stagni N., Vittur F. and de Bernard B. (1983) Solubility properties of alkaline phosphatase from matrix vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 761: 246-251.
- Stinson R.A. McPhee J.L. and Collier H.B. (1987) Phosphotransferase activity of human alkaline phosphatases and the role of enzyme Zn. *Biochim. Biophys. Acta* 913: 272-278.
- Stone M.D., Hawthorne A.B., Kerr D., Webster G. and Hosking D.J. (1990) Treatment of Paget's disease with intermitten low-dose infusion of disodium pamidronate (APD). *J. Bone Mineral Res.* 5: 1231-1235.
- Stout J.G. and Kirley T.L. (1994) Purification and characterization of the ecto-Mg-ATPase of chicken gizzard smooth muscle. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 29: 61-75.
- Stout J.G., Strobel R.S. and Kirley T.L. (1995) Identification and immunolocalization of ecto-ATPDase in chicken stomach. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 36: 529-535.
- Strobel R. and Rosenberg M. (1992) Immunoaffinity chromatographic purification of chicken ecto-ATP diphosphohydrolase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 671: 487-489
- Strobel R.S. (1993) Purification and immunochemical characterization of ecto-ATP-diphosphohydrolase from chicken oviduct and liver. PhD Thesis University of Minnesota. Minneapolis.
- Strobel R.S., Nagy A.K., Knowles A.F., Buegel J. and Rosenberg M.D. (1996) Chicken oviductal ecto-ATP-diphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* 271: 16323-16331.
- Swarup G., Cohen S. and Garbers D.L. (1981) Selective dephosphorylation of proteins containing phosphotyrosine by alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* 256: 8197-8201.
- Tada M., Yamamoto T. and Tonomura Y. (1978) Molecular mechanism of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum. *Physiol. Rev.* 58: 1-79



- Torres C.R., Vasconcelos E.G., Ferreira S.T. and Verjovski-Almeida S. (1998) Divalent cation dependence and inhibition of *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase by fluorosulfonylbenzoyl adenosine. *Eur. J. Biochem.* 251: 516-521.
- Torres M., Pintor J. and Miras-Portugal M.T. (1990) Presence of ectonucleotidases in cultured chromaffin cells: Hydrolysis of extracellular adenine nucleotides. *Arch. Biochem. Biophys.* 279: 37-44.
- Trams E.G. and Lauter C.J. (1974) On the sidedness of plasma membrane enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 345: 180-197.
- Treuheit M.J., Ataei A., Kirley T.L. and Wallick E.T. (1992) Purification of the glycosylated beta subunit of (NaK)-ATPase by lectin affinity chromatography. *Chromatographia* 33: 521-524.
- Tuukkanen J. and Vaananen H.K. (1986) Omeprazole a specific inhibitor of (HK)-ATPase inhibits bone resorption in vitro. *Calcif. Tissue. Int.* 38:123-125.
- Vaananen H.K. and Korhonen C.K. (1979) Matrix vesicles in chicken epiphyseal cartilage. Separation from lysosomes and the distribution of inorganic pyrophosphatase activity. *Calcif. Tissue Int.* 28: 65-72.
- Valente A.P.C., Barrabin H., Jorge R.V., Paes M.V. and Scofano H.M. (1990) Isolation and characterization of the  $Mg^{2+}$ -ATPase from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum membrane preparations. *Biochim. Biophys. Acta* 1039: 297-304.
- Valenzuela M.A., Collados L., Kettlun A.M., Mancilla M., Lara H., Puente J., Aranda E., Chayet L., Alvaraz A. and Traverso-Cori A. (1992) Changes in apyrase activity in uterus and mammary glands during the lactogenic cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* 103B: 113-118.
- Valenzuela M.A., Kettlun A.M., Sandoval S., García L., Mancilla M., Neckelmann G., Chayet L., Alvarez A. Cuevas F., Collados L., Espinosa V., Traverso-Cori A., Bravo I., Acevedo C.G. and Aranda E. (1996) Comparasion of the biochemical properties regulation and function of ATP-diphophohydrolase from human placenta and rat kidney. *Brazillian J. Med. Biol. Res.* 29: 589-597.
- Valenzuela M.A., Lopez J., Depix M., Mancilla M., Kettlun A.M., Catalan L., Chiong M., Garrido J. and Traverso-Cori A. (1989) Comparative subcellular distribution of apyrase from animal and plant sources. Characterization of microsomal apyrase. *Comp. Biochem. Physiol.* 93B: 911-919.
- Van Erum M., Lemmens R., Berden J., Teuchy H. and Vanduffel L. (1995) Identification and partial purification of ( $Ca^{2+}$  or  $Mg^{2+}$ )-ATPase in a renal brush border membrane. *Eur. J. Biochem.* 227: 150-160.
- Vara F. and Serrano R. (1981) Purification and partial characterization of a membrane-bound ATP-diphosphohydrolase from *Cicer arietinum* (chick-pea) roots. *Biochem. J.* 197: 637-643.
- Vasconcelos E.G., Ferreira S.T., deCarvalho T.M.U., deSouza W., Kettlun A.M., Mancilla M., Valenzuela M.A. and Verjovski-Almeida S. (1996) Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*: Immunological cross reactivities with potato apyrase and *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 271: 22139-22145.

- Vasconcelos E.G., Nascimento P.S., Nazareth M., Meireles L., Verjovski-Almeida S. and Ferreira S.T. (1993) Characterization and location of na ATP diphosphorydrolase on the external surface of the tegument of *S. mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 58: 205-214.
- Verjovski-Almeida S., Vasconcelos E.G., Ferreira S.T., Kettlun A.M., Mancilla M., Valenzuela M.A. (1997) ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni* belongs to a new family of apirases. In: *Ecto ATPases*. Plesnes L., Kirley T.L. and Knowles A.F. (Eds). Plenum Press. New York. pp. 153-159.
- Vincet J.B., Crowder M.W. and Averill B.A. (1992) Hydrolysis of phosphate monoesters: a biological problem with multiple chemical solutions. *TIBS* 17: 105-110.
- Vittur F. and deBernard B. (1973) Alkaline phosphatase activity associated to a calcium binding glycoprotein from calf scapula cartilage. *FEBS letters* 38: 87-90.
- Wang T.F. and Guidotti G. (1996) CD39 is an ecto (Ca<sup>2+</sup>Mg<sup>2+</sup>)-apyrase. *J. Biol. Chem.* 271: 9898-9901.
- Wang T.F., Ou Y. and Guidotti G. (1998) The transmembrane domains of ectoapyrase (CD39) affect its enzymatic activity and quaternary structure. *J. Biol. Chem.* 273: 24814-24821.
- Wang T.F., Rosenberg P.A. and Guidotti G. (1997) Characterization of brain ecto-apyrase: evidence for only ecto apyrase (CD39) gene. *Mol. Brain Res.* 47: 295-302.
- Warner G.P., Hubbard H.L., Loyd G.C. and Wuthier R.E. (1983) Inorganic phosphorus<sup>32</sup> and calcium<sup>45</sup> metabolism by matrix vesicles enriched microsomes prepared from chicken epiphyseal cartilage by isoosmotic Percoll density gradient fractionation. *Calcif. Tissue Int.* 35: 327-338.
- Warwick R. and Williams P.L. (1989) *Gray's Anatomy*. 37th edition. Churchill Livingstone Edinburgh.
- Welford L.A., Cusack N.J. and Hourani S.M.O. (1987) The structure-activity relationships of ectonucleotidases and of excitatory P<sub>2</sub>-purinoreceptors: evidence that dephosphorylation of ATP analogues reduces pharmacological potency. *Eur. J. Pharmacol.* 141:123-130.
- Whyte M.P. (1989) Alkaline Phosphatase: Physiological Role Explored in Hypophosphatasia. Peck W. A. (ed.). *Bone Mineral Research*. Vol. 6. Eselvier Science. Amsterdam. pp. 175-218.
- Whyte M.P. (1994) Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocrine Rev.* 15: 439-461.
- Wong Y.W. and Low M.G. (1992) Phospholipase resistance of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor on human alkaline phosphatase. *Clin Chem.* 38: 2517-2525.
- Wu L.N.Y., Sauer G.R., Genge B.R. and Wuthier R.E. (1989) Induction of mineral deposition by primary cultures of chicken growth plate chondrocytes in ascorbate-containing media-evidence of an association between matrix vesicles and collagen. *J. Biol. Chem.* 264: 21346-21355.
- Wu L.N.Y., Yoshimori T. and Genge B.R. (1993) Characterization of the nucleational core complex responsible for mineral induction by growth plate cartilage matrix vesicles. *J. Biol. Chem.* 268: 25084-25094.



- Wuthier R.E. (1975) Lipid composition of isolated epiphyseal cartilage cells membranes and matrix vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 409: 128-143.
- Wuthier R.E. (1982) A review of the primary mechanism of endochondral calcification with special emphasis on role of cells mitochondria and matrix vesicles. *Clin. Orthop.* 169: 219-242.
- Wuthier R.E. (1984) Calcification of vertebrate hard tissues. In: *Metal ions in biological systems-Calcium and its role in biology.* Sigel H. (ed.), 17: 411-471.
- Wuthier R.E. (1986) Mechanism of matrix vesicles mediated mineralization. In: *Cell Mediated Calcification and Matrix-Vesicles.* Ali S.Y. (ed.) Elsevier. Amsterdam. pp. 47-55.
- Wuthier R.E. and Boyan B.D. (1992) Mechanism of matrix vesicle calcification. *Bone Mineral* 17: 240-295.
- Wuthier R.E. and Register T.C. (1985) Role of alkaline phosphatase a polifunctional enzyme in mineralizing tissues. In: *The chemistry and biology of mineralized tissues.* Butler W.T. (ed.). EBSCO Média Inc. Birmingham. pp. 113-124
- Wuthier R.E., Giancola M.S. and Dragic S.S. (1978) In vitro biosynthesis of phospholipids by chondrocytes and matrix vesicles of epiphyseal cartilage. *Biochemistry* 17: 1431-1436.
- Wuthier, R.E. (1977) Electrolytes of isolated epiphyseal chondrocytes, matrix vesicles, and extracellular fluid. *Calcif. Tissue Res.* 23: 125-133.
- Wuthier, R.E. (1981) Proc 3<sup>rd</sup> Int Conf on Matrix Vesicles – Montelucio, Spatelo. pp 103. Proposed mechanism of matrix vesicle formation and vesicle-mediated mineralization.
- Yagi K., Arai Y., Kato N. and Miura Y. (1989) Purification of ATP diphosphohydrolase from bovine aorta microsomes. *Eur. J. Biochem.* 180: 509-513.
- Yagi K., Kato N. Shimbo M. Shimba L.S. and Miura T. (1992) Purification and characterization of adenosine phosphatase from human umbilical vessels. *Chem. Pharm. Bulletin* 40: 2143-2146.
- Yagi K., Shinbo M., Hashizume M. Shimba L.S., Kurimura S. and Miura Y. (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.
- Yegutkin G.G. and Burnstock G. (2000) Inhibitory effects of some purinergic agents on ecto-ATPase activity and pattern of stepwise ATP hydrolysis in rat liver plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1466: 234-244.
- Yoon K., Golub E. and Rodan G.A. (1989) Alkaline phosphatase cDNA transfected cells promote calcium and phosphate deposition. *Connect. Tissue Res.* 22 17-25.
- Yuan Z.A., Golub E.E., Collier P.M. and Gibson C.W. (1995) Bovine enamel organ cells express tissue non-specific alkaline phosphatase mRNA. *J. Dental Res.* 74: 1886-1890.
- Ziganshin A.U., Ziganshin L.E., King B.F. and Burnstock G. (1995) Characteristics of ecto-ATPase of *Xenopus* oocytes and inhibitory actions of suramin on ATP breakdown. *Pflugers Arch.* 429: 412-418.
- Zimmermann H. (1999) Two novel families of ecto-nucleotidases: molecular structure, catalytic properties and a search for function. *TIPS* 20: 231-236.



Zimmermann H., Braun N. Kegel and Heine P. (1998) New insights into molecular structure and function of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Neurochem. Int.* 32: 421-425.

## CURRICULUM VITAE

### **Marlene Aparecida Demenis Baptistella**

Natural de Araras, SP.

#### **Formação:**

#### **Graduação**

Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP

Bacharel em Química, 1993

Licenciada em Química, 2000

#### **Mestrado**

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Área de concentração: Bioquímica

Título da Dissertação: “Fosfatase alcalina de placa óssea: caracterização da atividade ATPase da enzima solubilizada com polioxietileno-9-lauril-éter”.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Leone

#### **Artigos publicados em revistas de circulação internacional**

Pizauro J.M.; **Demenis M.A.**; Ciancaglini P. and Leone F.A. (1998) Kinetic characterization of membrane-specific ATPase from rat osseous plate and its possible significance on endochondral ossification. *Biochim. Biophys. Acta* **1368**: 108-114.

**Demenis, M.A.** and Leone, F.A (2000) Kinetic characteristics of ATP hydrolysis by a detergent-solubilized alkaline phosphatase from rat osseous plate. *IUBMB Life* **49**: 113-119.