

**ESTUDO SÔBRE
ATIVIDADE PIROFOSFATÁSICA
E PIROFOSFATO INORGÂNICO
NO SÔRO HUMANO**

UFRGS
Inst. Ciências Básicas da Saúde
Biblioteca

ESTUDO SÔBRE
ATIVIDADE PIROFOSFATÁSICA
E PIROFOSFATO INORGÂNICO
NO SÔRO HUMANO

por

TUISKON DICK

Tese apresentada para o Concurso à
Cadeira de Química Fisiológica,
Faculdade de Medicina de Pôrto Alegre,
Universidade do Rio Grande do Sul

PÔRTO ALEGRE

1958

*À minha esposa,
minha filha e
meus pais.*

Deixo aqui registrado meu agradecimento às seguintes pessoas e instituições:

- Às Direções da Faculdade de Filosofia e do Instituto de Química Industrial, URGS, pelas condições materiais que proporcionaram para a execução do presente trabalho;
- Ao Instituto Tecnológico do Rio Grande do Sul, às Cadeiras de Físico-Química, de Química Analítica Quantitativa e de Química Orgânica do Curso de Engenharia Química, URGS, e ao Instituto de Medicina Experimental da Faculdade de Medicina de Pôrto Alegre, URGS, pela cessão de material, drogas e animais;
- Às várias enfermarias da Santa Casa de Misericórdia, e particularmente aos laboratórios das Enfermarias 2, 38, 27 e 29, cuja colaboração foi para nós valiosíssima;
- Aos colegas, amigos e pacientes, cuja compreensão e auxílio em muito nos ajudaram;
- Ao Professor Francisco Casado Gomes, ao Dr. Alaor Teixeira e à Dna. Wanda Vieira de Castro, que nos prestaram inestimável assistência;
- Aos Serviços de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina e da Escola de Agronomia e Veterinária pela colaboração prestada;
- À Direção e aos funcionários da Livraria Selbach pelo esforço e dedicação demonstrados na confecção deste trabalho.

M A T É R I A

INTRODUÇÃO.

MÉTODOS E MATERIAL.

APLICAÇÕES.

CONCLUSÕES E SUMÁRIO.

BIBLIOGRAFIA.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A segunda metade do século XIX apresenta no campo da Química, duas tendências exponenciais: a) O início de um novo terreno, a Físico-Química, que partiu de uma racionalização unitária de um aglomerado de conhecimentos acumulados por gerações de investigadores; b) O desabrochar vertiginoso da Química Orgânica, a qual, passando de uma fase analítica, se lançou à síntese de inúmeros compostos novos, bem como tratou de obter substâncias que iguallassem às acessíveis da Natureza.

Este trabalho hercúleo, centralizando a atenção de inúmeros laboratórios de investigação, não somente serviu de base para o desenvolvimento da Tecnologia Orgânica, mas cedo se espraiou e projetou sobre um grande número de ciências paralelas ou correlatas.

Com o avanço da Química Orgânica, suas técnicas se aprimoraram sempre e as enormes possibilidades que ela proporcionava, estabeleceram subsídios cada vez mais importantes para novas teorias e aplicações.

O amadurecimento desta última permitiu a formação de uma ponte entre a ciência da matéria, ou seja, a Química, e a ciência da vida, a Biologia, introduzindo no domínio desta, nova conceituação de fenômenos básicos e diferente formulação de problemas de pesquisa e de inquirição especulativa.

Preliminarmente, a Fisiologia, a Farmacologia, a Microbiologia, a Imunologia, a Patologia e tantas outras, apelavam de maneira crescente para informações fornecidas pela Química Orgânica afim de formular interpretações em seu próprio campo, ora lançando mão de técnicas químicas para seus problemas de experimentação, ora empregando substâncias

recentemente elaboradas nos laboratórios de investigação. Estruturou-se, então, uma “Química Orgânica de produtos naturais”, e já no início do presente século, surgiram as primeiras cadeiras universitárias de Química Fisiológica, ou seja, Química aplicada à Fisiologia. Este novo setor passou também a ocupar-se dos grandes problemas da Nutrição, culminando com a conceituação e estudo das vitaminas, dos amino-ácidos e ácidos graxos essenciais, da calorimetria e energética dos alimentos, da essencialidade nutricional de substâncias minerais etc.

Ao lado desta, a Química Fisiológica incluía o desenvolvimento de um novo campo oriundo, primeiro, da curiosidade, depois, da investigação científica dos clínicos e dos patologistas: a Análise, mais tarde, Química Clínica. Esta conseguiu um desenvolvimento vertiginoso, notadamente nos três primeiros decênios deste século, a partir do aparecimento da técnica de dosagem de glicose de Bang (1), mostrando-se uma especialidade utilíssima às pesquisas e para o exercício prático da Medicina.

O corpo básico da metodologia da Análise Clínica ficou já consolidado entre 1915 e 1930 (2), embora modernamente novas técnicas de análise tenham surgido, tais como a eletroforese, fotometria de chama, emprêgo de agentes quelantes etc., prevendo-se, com certeza, uma aplicação mais extensa também da cromatografia.

Da Análise Clínica, lentamente se passou a estruturar um ramo mais amplo, a Química Clínica Patológica, ou seja, a Química Biológica aplicada à Clínica e à Patologia.

A medida que a Bioquímica trazia à luz conhecimentos sempre mais amplos, e que mais harmonizavam entre si, sobre os processos químicos como base para a realização dos fenômenos vitais, o clínico e o patologista achavam ali uma fonte rica de informações para a interpretação de múltiplas observações patológicas, até então obscuras e destituídas de explicação satisfatória.

Hoje até existem, nos currículos de ensino médico, disciplinas e cadeiras independentes, notadamente nas universidades européias, de Química Patológica, perfeitamente dis-

tintas da cadeira básica de Química Biológica e integradas no ensino clínico.

A Química denominada Fisiológica, fundada pelos antigos mestres, como F. G. Hopkins e Chittenden, Knoop e Abderhalden, tomou também novas características além de sua liberação da Química Patológica (3—5).

Ao par da consideração de problemas nutricionais, ela foi paulatinamente deixando de constituir uma simples aplicação à Fisiologia. O estudo que se desenvolveu sobre o metabolismo intermediário, de início rudimentar, consistindo principalmente da separação e identificação de substâncias típicas, a partir de sistemas biológicos (Bioquímica Estática), passou a procurar funções das mesmas, sua origem e destino dentro do próprio ser vivo e suas relações com outras substâncias.

Especialmente de 1930 até nossos dias, estabeleceu-se a investigação real e intensiva do metabolismo intermediário, que sofreu impressionante impulso nos últimos quinze anos, com aplicação de novas técnicas, em particular de isótopos marcadores, cromatografia, respirometria, centrifugação fracionada dos componentes celulares, etc.

A afirmação de que ainda hoje a Bioquímica seja um ramo da Fisiologia é perfeitamente absurda, e demonstra desconhecimento da natureza e finalidades daquela. Tanto a metodologia desenvolvida, como a linguagem usada e a problemática atual desta nova ciência são tão diferentes das da Fisiologia, que não mais se admite falar em Química Fisiológica, uma ciência restritamente aplicada, mas sim em Bioquímica, com corpo e estrutura distintamente próprios. E se em nossos dias contemplarmos o panorama extenso desta, verificaremos que os problemas de Nutrição foram relegados a outros planos; que a Química Orgânica de produtos naturais, a chamada Bioquímica Estática, evoluiu para um "status" próprio, uma especialização separada; que surgiu um novo campo pela aplicação da Bioquímica ao estado mórbido, a Química Patológica, e para a qual deverá ser necessariamente achada a devida posição no ensino clínico de nossas Faculda-

des de Medicina, a exemplo do que acontece em centros mais avançados.

A Bioquímica atual tem agora diante de si problemas mais fundamentais e primários, não mais procurando resolver exclusivamente assuntos de superfície que afloram pelo esforço de outras ciências biológicas ou químicas. Seu corpo de doutrina repousa, basicamente, nos conhecimentos do metabolismo intermediário. Em vez de questões, como o valor biológico das proteínas, ou a composição química dos tecidos, constituem seus tópicos marcantes, por exemplo, a fosforilação oxidativa (6—13), a elucidação dos “marca-passos” (pacer-makers) e suas concentrações críticas (10), o controle e a perturbação do “estado estável” (steady state) de metabólitos, o mecanismo de controle hormonal e nervoso de sistemas enzimáticos (14), a significação dos ácidos nucleicos na biossíntese de proteínas (15, 16), e tantos outros de semelhante repercussão.

Dos resultados obtidos pela investigação bioquímica dinâmica dos últimos anos, está emergindo um panorama progressivamente mais unitário e integrado dos processos e das reações que servem como substrato material para a manifestação dos fenômenos da vida de um sistema biológico.

Ficou evidenciado que os mecanismos metabólicos essenciais, embora extraordinariamente complexos e variados, são exercidos por um número relativamente pequeno de componentes básicos, metabólitos, enzimas, coenzimas e cofatores.

A energia química que possibilita a um sistema a realização de trabalho biológico, é resultado de um número impressionantemente reduzido de rotas e ciclos metabólicos, entre os quais, certamente se põem em realce a fosforilação oxidativa (6-9,13) e o “ciclo de Krebs” (10).

Está, agora, em vias de ser conquistada uma idéia mais precisa da maneira de produção, transporte e utilização desta energia, e da localização intracelular dos diversos processos bioquímicos.

Os conhecimentos dos aspectos bioquímicos relativos ao funcionamento normal de um sistema também estão amadurecendo paulatinamente o bastante a ponto de poderem con-

tribuir para uma feição nova da patologia destes sistemas biológicos. Esta contribuição não é comparável à fornecida para a Patologia, há anos, através de informações ocasionais e isoladas.

Esta, estribada nas lesões anatômicas e funcionais dos órgãos e tecidos, incluindo o conceito de lesão celular, imperou na Medicina com exclusividade até quase os dias presentes. Só recentemente, há mais ou menos vinte anos, R. Peters (3, 5), o decano da Bioquímica inglesa, cunhou o termo "biochemical lesion" a fim de indicar uma patologia em nível molecular ou enzimático.

Para exemplificar essa tendência moderna, basta chamar a atenção para a origem da galactosemia (17—20), formação de bilirubina-conjugada e patologia dos pigmentos biliares (21—23), porfiúria (24—26), amino-acidúrias (27), diabete e cetose, quem sabe a arteriosclerose e o câncer, e tantos outros casos, todos se reduzindo a uma insuficiência enzimática e metabólica.

Em todos estes pontos, a Patologia não foi simplesmente vasculhar a Bioquímica para interpretações, mas as indicações das deficiências nasceram de corolários calcados na pesquisa bioquímica fundamental. Deve reconhecer-se, todavia, que as aquisições recentes da Bioquímica pura se encontram ainda em fase inicial de projeção sobre os diversos ramos da Medicina.

Mas, é evidente em si que, em breve, estes campos poderão, e deverão apelar sempre mais para os recursos de base que lhes pode oferecer a Bioquímica. E' suficiente mencionar o vasto esforço de pesquisas sobre câncer, em face da Bioquímica (28—30), os recursos novos vislumbrados pela aplicação de técnicas enzimáticas à análise clínica (1, 31), a orientação que o conceito de antimetabólito (32, 33) confere a certos setores da Farmacologia, e as novas drogas, como os análogos do ácido fólico, das purinas, do ácido para-amino-benzóico, os rádio-miméticos e tantos outros que se inspiraram em considerações do metabolismo intermediário.

1 — TRANSPORTE METABÓLICO DE ENERGIA QUÍMICA. PARTICIPAÇÃO DE COMPOSTOS FOSFORADOS.

Um dos aspectos que ocupa posição de maior realce no metabolismo intermediário é sem dúvida o que se refere à transferência de energia entre os diversos metabólitos e a aplicação última da mesma como trabalho celular.

Os processos anabólicos, de síntese, que ocorrem na célula, consistem, em regra, de reações endoergônicas. A mobilização desta energia química armazenada se realiza através de três fases capitais (10, 34), tão bem assinaladas por Krebs. Na primeira fase há formação de oses, amino-ácidos, ácidos graxos e glicerol a partir dos glicídios, proteínas e lipídios. Em tal processo, apenas uma pequena parcela da Energia Livre destes compostos é liberada, sendo utilizada exclusivamente na produção de calor. Na segunda etapa verifica-se uma degradação parcial daquelas substâncias unitárias (em geral, três ou mais hexoses, glicerol, em torno de vinte amino-ácidos e vários ácidos graxos) dela resultando unicamente três produtos finais: acetila-coenzima A, α -ceto-glutarato e oxalila-acetato, dos quais o primeiro é o mais frequente.

Neste afunilamento de rotas metabólicas, nem toda a Energia Livre disponível é liberada. Estima-se esta quantidade em um terço do total, sendo aproximadamente dois terços aproveitados através da terceira fase.

A terceira etapa consiste num único processo, o “ciclo de Krebs”, também denominado “ciclo dos ácidos tri-carboxílicos”, a fornalha comum, se assim fôr permitido dizer, do que restou dos compostos de partida.

Começando com substâncias extraordinariamente complexas, o organismo conduz o catabolismo a um único processo final, comum a todos, no qual se verifica o maior aproveitamento de sua Energia Livre, com admirável economia de biocatalisadores e metabólitos intermediários. A sua localização nas mitocôndrias, a estas proporciona o papel de verdadeiras usinas da comunidade celular.

Uma parcela dessa Energia Livre é transferida diretamente ao adenosina-trifosfato, mas a maior parte, notadamente a que provém do “ciclo de Krebs”, é canalizada pelo processo de fosforilação oxidativa (9). Porém, em última instância, o acceptor universal desta energia ainda é o adenosina-trifosfato (ATP) *. Na realidade, o importante derivado fosforilado da base púrica adenosina, serve de ponto de encontro comum dos processos metabólicos de oferta de energia química e dos de solicitação energética, quer para a síntese química de inúmeros intermediários e componentes plásticos celulares, quer para o exercício de trabalhos celulares. [Contração muscular (35—39), movimento protoplasmático em geral (37), condução nervosa (40, 41), transporte ativo de solutos em secreção e absorção (42) etc.]

A energia química utilizável é armazenada e transmitida pelo intermediário, ATP, em suas ligações-pirofosfato, conforme o conceito clássico de Lipmann (45-47), que lhes atribuiu o termo “ligações ricas em energia”, hoje universalmente aceito.

A transferência de energia, em regra, se faz acompanhar de uma reação de fissão do ATP. Como exemplo característico pode ser citada a contração muscular, durante a qual o ATP é cindido em adenosina-difosfato (ADP) e ortofosfato inorgânico (Pi) (48):



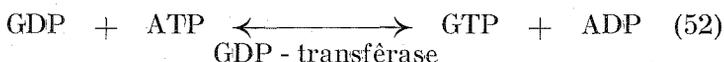
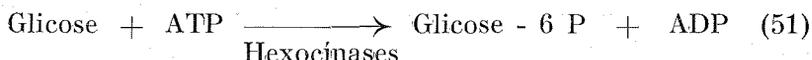
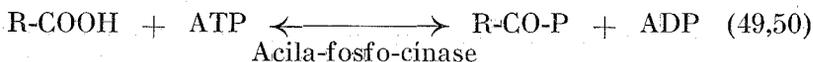
É um típico processo de hidrólise que a rigor é executado por transfêrases. Para a transferência, pode funcionar, como aliás o faz com muita freqüência, a própria água, resultando ortofosfato inorgânico livre.

As enzimas que realizam este último tipo de reação levam genéricamente o nome de fosfátases. Se o acceptor fôr um composto orgânico, a substância resultante será fosforilada, e não mais se falará em fosfátases, mas em cínases.

* Nota — As abreviaturas empregadas encontram-se relacionadas na página 101.

Fundamentalmente, as duas reações são semelhantes, variando apenas o aceptor final do fosfato a ser transferido.

Por exemplo:



Através da ação das fosfátases e cínases há ampla formação de ortofosfato inorgânico e ésteres de fosfato inorgânico, os quais por sua vez, poderão liberar o ortofosfato inorgânico por ação de outras fosfátases. Explica-se assim, a abundante distribuição dos compostos fosfatados e do Fósforo inorgânico, e a sua grande importância na economia metabólica do organismo vivo.

Um bom número dessas reações é reversível. Elas podem, por sua vez, estar interconectadas com uma cadeia de outras reações também reversíveis. Em face disto, a concentração do éster fosfatado é capaz de atingir cifras críticas em relação às rotas metabólicas envolvidas, orientando-as ora num, ora noutro sentido.

Como aquelas concentrações podem ser controladas pela atividade de fosfátases, estas chegam a exercer importante papel como “marca-passos” auxiliares de uma ou outra cadeia metabólica correspondente.

A função do ortofosfato inorgânico, de seus ésteres, e seus anidridos com outros ácidos, desde há muito tem sido objeto de intensa e prolongada investigação em Bioquímica (53). Para tanto as técnicas foram desenvolvidas apropriadamente e os resultados deste trabalho em muito elucidaram problemas metabólicos básicos. Para ilustrar, apenas é lembrada a descoberta já remota dos diversos ésteres fosfatados da glicose, frutose, ácido glicérico, ácido pirúvico etc., que permitiu estabelecer o esquema da glicólise de Meyerhof-Embden.

2. — FORMAÇÃO METABÓLICA DE PIROFOSFATO INORGÂNICO

Curiosamente, só em anos mais recentes entraram em foco investigações que envolviam mais de perto o pirofosfato. Tanto como o ortofosfato, êsse poderia, teoricamente, ser transferido ou liberado em reações que envolvessem passagem de energia química para outro substrato a partir do ATP. Porém, apenas em 1942 foi observado que isto se verifica normalmente com certa extensão no organismo vivo (54-60). Dali por diante, acumularam-se as descobertas de reações bioquímicas que envolvem o pirofosfato inorgânico. Se fôsse possível traçar comparações, poder-se-ia afirmar que estas últimas reações tendem mesmo a sobrepassar de muito, em número e em significação metabólica, àquelas nas quais participa simplesmente o ortofosfato inorgânico.

Êste relativo atraso se deve, principalmente, a duas razões mais relevantes:

a) o desaparecimento do pirofosfato de sistemas biológicos mais complexos pela presença de enzimas hidrolíticas, as pirofosfátases inorgânicas, que o transformam em ortofosfato inorgânico, evitando, pois, sua acumulação;

b) a falta, por muito tempo, de técnica apropriada para detectar e determinar quantitativamente o pirofosfato inorgânico liberado, ao lado do ortofosfato inorgânico.

As tentativas anteriores consistiam somente em observações ocasionais e isoladas, usando métodos bastante complexos e imprecisos que não permitiam um estudo sistemático e extenso.

Únicamente o advento da cromatografia permitiu observar, em larga escala, que o pirofosfato inorgânico realmente se pode produzir e acumular em sistemas biológicos. Solventes e condições apropriados foram exaustivamente desenvolvidos para separar por cromatografia em papel e em coluna, não apenas o ortofosfato, pirofosfato, polifosfatos e metafosfatos entre si, como também, concomitantemente, seus ésteres deri-

vados, assim como os nucleotídios que os contêm, e cuja presença pode impedir a dosagem mesmo grosseira do pirofosfato (61).

Uma determinação quantitativa mais exata, ao lado do ortofosfato, foi desenvolvida há poucos anos (62), e somente então, tornou-se possível a exploração mais apropriada d'êste tópico.

Tem-se verificado que, embora o pirofosfato inorgânico resulte de um grande número de processos bioquímicos, êle se acumula apenas em casos isolados.

Em bactérias, levedos, algas e animais inferiores, porém, pode ser observada a formação de pirofosfato, bem como de metafosfatos e polifosfatos em apreciáveis quantidades (63). Atribuem-se a êstes verdadeiros depósitos, funções metabólicas (por exemplo, de reserva energética), particulares daquelles sêres. Mas, nos animais superiores não foi possível, até o presente momento, demonstrar acúmulo de polifosfatos "in vivo".

Experiências "in vitro" realizadas nos últimos dez anos, nas quais a atividade de pirofosfátases prejudiciais era eliminada, estabeleceram que em um enorme número de reações de alta importância bioquímica há formação transitória de pirofosfato inorgânico, o qual, em regra, é metabolizado com rapidez.

A luz dos conhecimentos atuais, o pirofosfato inorgânico resulta normalmente, de reações nas quais participam nucleosídeo-trifosfatos ou fosfo-ribose ativada, dos quais provém. Dêstes nucleosídeo-trifosfatos, o mais freqüente doador de pirofosfato inorgânico é certamente o ATP. Tal, provavelmente, se deve ao fato de ser êste composto reserva, intermediário ("carrier") de energia química, aquêle mono-nucleotídeo que foi bem estudado e conhecido por mais tempo. Há oito anos, porém, Leloir lançou novo conceito básico, em face de bela evidência experimental, segundo a qual outros mono-nucleotídios apresentam importantes funções como coenzimas (64-66). O seu grupo estudou especialmente, os deriva-

dos da uridina, aos quais foram adicionados logo, outros nucleotídios, derivados da guanosina, citosina, inosina etc. O papel bioquímico destes nucleotídios embora objeto de intensa investigação, não foi perscrutado em tôda a sua extensão. Por isso, talvez, o número de processos conhecidos de produção de pirofosfato inorgânico, que envolvem o ATP, é, presentemente, muito maior do que no caso dos demais mono-nucleotídios.

A reação de cisão do ATP em foco, consiste num processo de transferência da parcela nucleosídio-monofosfato a aceptores diversos, liberando-se o pirofosfato inorgânico (PPi). Há reações, porém, em que existe um acceptor de pirofosfato resultando então, ao lado do nucleosídio-monofosfato em questão, um composto pirofosforilado.

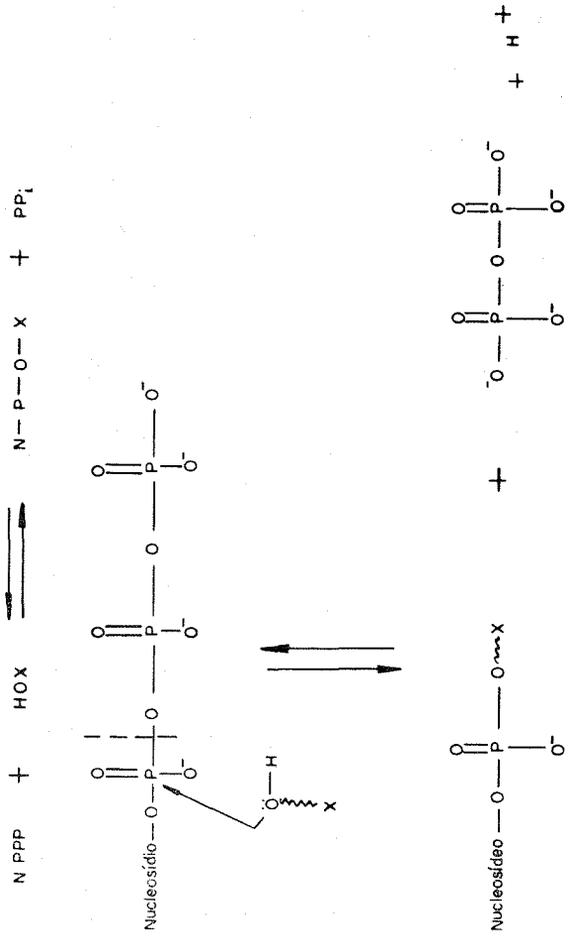
Kornberg postula um ataque nucleofílico sôbre o nucleotídio por parte do acceptor (67) (**Esquema n.º 1**).

Que o ataque se verifica sôbre o primeiro átomo de Fósforo e não sôbre o intermedário, ficou ilustrado, como bem apontou Kornberg (67), pelas experiências de Boyer, Koeppe e Luchsinger (68), ao examinarem com O^{18} a reação de ativação do acetato pela adenila-cínase de Berg (69-72).

As enzimas que catalisam êsse tipo de processo denominam-se nucleosídio-monofosfato-transfêrases. Naqueles casos em que a enzima forma provavelmente um complexo intermediário com o nucleotídio, supõe-se que o mecanismo de ataque seja semelhante (73-75).

Êstes estudos são auxiliados, básicamente, pela observação de "exchange reactions" dos nucleotídios com $P^{32}P^{32}$ (pirofosfato radioativo), tipo de técnica de tão larga aplicação no estudo bioquímico dos nucleotídios em geral.

De acôrdo com o acceptor do nucleosídio-monofosfato, os processos de formação de pirofosfato inorgânico podem ser distribuídos em vários grupos, a serem descritos resumidamente a seguir:



ESQUEMA Nº 1. MECANISMO DE TRANSFERÊNCIA DE NUCLEOSÍDEO—MONOFOSFATO (NMP)

A) ACCEPTOR: H₂O.

Existe uma ATP-ase que hidrolisa o ATP até adenosina — 5 fosfato (AMP) e pirofosfato (76). Esta enzima interessante, cujo papel desempenhado ainda é obscuro, foi isolada em semem de touro (77):



B) ACCEPTOR: OUTROS NUCLEOTÍDIOS. FORMAÇÃO DE DI-NUCLEOTÍDIOS COM PONTE P-O-P E DE OUTRAS COENZIMAS

Um grande número de transfêrases de nucleosídeo-mono-fosfato permitem obter di-nucleotídios, de extensas funções metabólicas.

Piridina-Nucleotídios.

Foi revolucionária, em seus dias, a descoberta de Kornberg referente à formação enzimática do di-fosfo-piridina-nucleotídio (DPN) (58, 59, 78, 79). Este composto, bem como o seu derivado, o 2 fosfo-DPN, ou seja, TPN, são coenzimas essenciais da maior parte das reações enzimáticas que envolvem desidrogenação ou hidrogenação, isto é, reações das quais participam desidrogênases.

Através dos piridina-nucleotídios, inicia-se o transporte do Hidrogênio de substratos até ao Oxigênio molecular a fim de sintetizar água, percorrendo a cadeia de fosforilação oxidativa.

Estes di-nucleotídios servem, no caso das reações de oxirreduções acopladas (10), como depósito temporário de energia química, ao lado do ATP, constituindo uma espécie de curto circuito de transferência energética. O DPN deverá estar presente em tôdas as células como componente essencial, participando, praticamente, em todos os processos metabóli-

cos de síntese ou degradação que compreendem fenômenos respiratórios. Nesta posição chave, as concentrações relativas do DNP oxidado e DPN reduzido, servem como “marca-passo” metabólico de ampla repercussão (10).

Kornberg conseguiu isolar do “pó de acetona” de fígado uma enzima que realiza a seguinte reação:

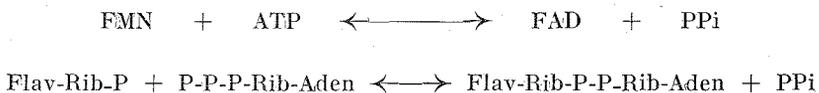


É uma reação reversível, na qual se observa uma pirofosforólise do DPN. Fica evidente que a concentração permanente do pirofosfato influencia a intensidade de formação do DPN e portanto, indiretamente, os processos metabólicos dependentes deste último.

Flavina-Nucleotídio.

O flavina-adenina-dinucleotídio (FAD) difere do DPN somente em ter substituído a nicotinamida (vitamina B₅) por riboflavina (vitamina B₂). Metabolicamente, o papel preenchido pelo FAD não é tão amplo como o do DPN; mas também participa do sistema enzimático de forforilação oxidativa e funciona como intermediário, no transporte do Hidrogênio em geral, recebendo-o do DPN reduzido. Poderá mesmo, ser acceptor direto de Hidrogênio a partir de alguns metabólitos, notadamente do succinila-CoA, e na primeira desidrogenação de acilas-CoA. Esta última reação coloca o FAD entre os componentes essenciais do sistema enzimático que degrada os ácidos graxos.

A sua síntese, igualmente ubíqua, é semelhante à do DPN (80):



lactose em glicose, na síntese de sacarose, trehalose e outros holosídios a partir de oses, na formação do ácido glicurônico a partir da glicose, na formação da glicosamina e da galactosamina e sua metabolização até a incorporação em osídios superiores (“mucopolissacarídios”, quitina) etc.

Em todos êstes processos, as oses não participam diretamente, mas reagem “ativadas”, combinadas com um uridina-nucleotídio. Na realidade, são transferidas dos últimos para outros aceptores ou sofrem modificações prévias, sob forma de osídios do nucleotídio em foco.

Ao lado da uridina, também são conhecidos outros nucleotídios derivados da guanosina [guanosina-difosfo-manose (84, 85)], da citosina [citosina-difosfo-colina, (86), citosina-difosfo-colamina], de funções bioquímicas estabelecidas.

A uridina-difosfo-glicose (UDPG) é resultante da ação de uma transfêrase que age sôbre o uridina-trifosfato (UTP) (87, 88), sendo acceptor a glicose-1 fosfato.



O UDPG pode, por sua vez, ser transformado enzimaticamente, em uma série de derivados. Entre êles sobressai o uridina-difosfo-ácido-glicurônico (UDPGA) (89), que é a coenzima que permitirá o acoplamento do ácido glicurônico (82, 90) com fenóis, ácido nicotínico, bilirubina livre (23) etc., através da ácido-glicurônico-transfêrase.

O UDPG pode ser transformado, por inversão tipo Walden, em uridina-difosfo-galactose (UDPGal) (91), eventualmente dando origem a uridina-difosfo-glicosamina (UDPGam) e uridina-difosfo-galactosamina (UDPGalam). Todos êstes compostos desempenham o papel de fonte dos metabólitos conjugados quando são incorporados em osídios biologicamente importantes.

Também o guanosina-trifosfato (GTP) (86), e o citosina-trifosfato (CTP) (92), são substratos para reações de transferência análogas às ilustradas acima.

Vê-se, pois, que o pirofosfato inorgânico participa de pro-

cessos metabólicos chaves reversíveis, em cuja eficácia poderá influir com sua concentração local.

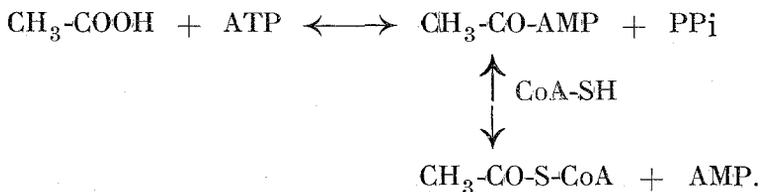
D) ACCEPTOR: ÁCIDOS GRAXOS E AMINO-ÁCIDOS.
PROCESSOS DE ATIVAÇÃO, COM FORMAÇÃO DE
PONTES P-O-C.

Ácidos Graxos.

Tanto o grupo de Lipmann (93-95), como o de Green (96), haviam verificado há poucos anos, que a ativação de ácido acético pela coenzima A (CoA-SH), precedendo a sua degradação oxidativa, requeria, num processo reversível, ATP, o qual viria posteriormente a se degradar em AMP e PPi:



Tal esquema não esclarece adequadamente o modo de participação do ATP. Evidência experimental, relativamente convincente, indica que o processo se realiza em duas etapas, com a formação intermediária de um anidrido do ácido com AMP, um acila-AMP; éste, por seu turno, reage diretamente com CoA-SH:



De fato, o ácido em presença de ATP, mesmo sem CoA-SH, dá reação de hidroxamato com hidroxilamina, bem como nestas mesmas condições se verifica "exchange reaction" entre ATP e $\text{P}^{32}\text{P}^{32}$ radioativo (69, 72, 97).

A transformação dos ácidos graxos superiores em acila-S-CoA também exige a presença de ATP, que se transforma em AMP e PPi (98, 99), sendo admissível que intermediária-

mente se formem acilas-AMP.

Há indicação experimental de que tal acontece na ativação do butanóico (100) e do octanóico (101), e sem grande temor de êrro, podemos sugerir que êste processo é geral.

Fenômeno semelhante se observa com o ácido benzóico (102, 103) durante a síntese de ácido hipúrico e outros derivados a serem excretados, e com o ácido cólico (104, 105) precedendo à formação dos ácidos glicocólico e taurocólico.

A ativação dos ácidos graxos é essencial quer para a sua esterificação, quer para encetarem a rota de degradação oxidativa até acetila-CoA, fragmento de dois carbonos que desemboca no “ciclo de Krebs”.

Estas reações de grande vulto quantitativo na economia de um sistema biológico tem seu início marcado, como ficou evidente, pela produção também apreciável de pirofosfato inorgânico.

Pode ser mencionado nesta altura, outro aspecto que envolve uma das fases de biossíntese da Coenzima A. O ácido pantotênico é um dipeptídeo, formado a partir de B-alanina e ácido pantóico; neste caso é exigida a presença de ATP, que termina por cindir-se em AMP e PPI (105, 106).

Foi verificado que a “exchange reaction” entre ATP e $P^{32}P^{32}$ é dependente de ácido pantóico e não de B-alanina, sendo, portanto conclusivo que aquêle é o reagente que passa por uma fase intermediária de ativação, por influência do ATP.

Amino-Ácidos.

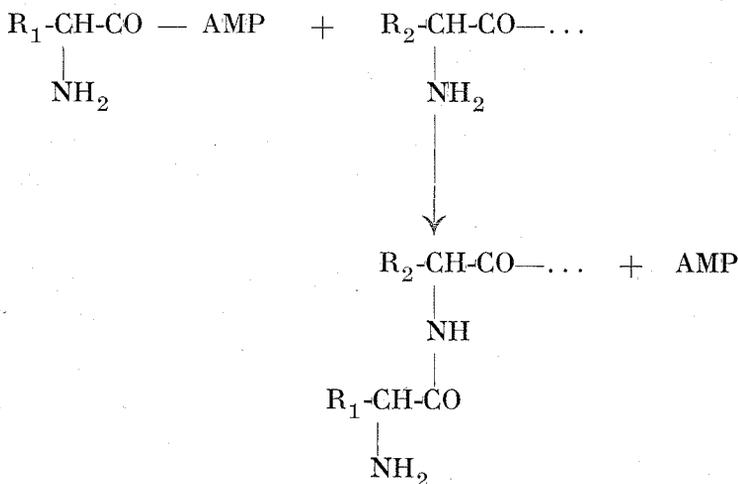
Mas êste fenômeno não abrange somente os nucleotídios ou os ácidos carboxílicos. Até o presente não foi possível elucidar adequadamente o mecanismo bioquímico pelo qual os **amino-ácidos** são ordenados e combinados para formar macro-moléculas de polipeptídios e proteínas.

Constituíram um passo marcante neste sentido, os trabalhos do grupo de investigadores de Boston, sob inspiração de F. Lipmann (46, 72, 107 — 109). Observaram pela reação do hidroxamato, que extratos enzimáticos do sobrenadante (que

Hoagland et al. denominaram “fração pH 5”) podem “ativar” amino-ácidos, com ATP presente. O produto resultante, ao lado de PPI inorgânico, foi identificado como sendo um amino-acila-AMP:



Sabe-se também que esta ativação prévia é essencial para a formação de polipeptídios pelas microsomas (110). Neste processo não há participação de CoA-SH, ao contrário do caso anterior. A reação se realiza diretamente entre os amino-ácidos ativados com AMP:



Estas reações preliminares introduzem qualquer síntese protéica. Realizam-se, por conseguinte, em todos os sistemas biológicos, e é óbvio que tôda síntese protéica é acompanhada de produção de vultosa quantidade de pirofosfato inorgânico.

E) OUTROS ACEPTORES. ATIVAÇÃO, COM FORMAÇÃO DE ANIDRIDOS DE ÁCIDO ETC.

Sulfato.

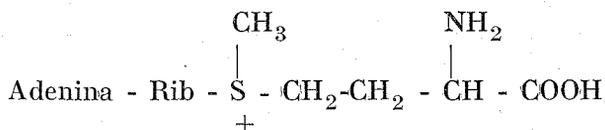
Foi determinado que a incorporação de radical sulfato em metabólitos (por ex.: nas “Bausteine” de “mucopolissacarídios”) é precedida de um estágio de ativação. Toma parte aí, o ATP, formando-se PPi livre (111-113). Provavelmente o sulfato ativado consiste de um AMP-3'fosforila-sulfato (114).

Processo análogo parece verificar-se com selenato (115). O mesmo foi sugerido para a ativação de nitratos, cloretos, transporte de fragmento de um Carbono independentemente de ácido tetra-hidro-fólico, fenolatos etc. (67).

Metionina.

Uma ativação não carboxílica da metionina foi descoberta, há poucos anos, por Cantoni (116-118). Esta é essencial nas reações de transferência de radicais metila, dos quais a metionina é o doador por excelência. Isto se verifica nos processos metabólicos de metilação como os de formação de colina, metila-histidina, sarcosina e betaína, adrenalina etc.

Na ativação da metionina resulta, com a presença de ATP, o intermediário S-adenosila-metionina, além de ortofosfato e pirofosfato inorgânicos. Nota-se que no composto ativado o ATP perdeu todos os seus radicais fosfatos e o átomo de Enxofre da metionina encontra-se diretamente ligado à ose do nucleosídeo.



Citrulina.

Recentemente, uma série de descobertas complementaram

as reações intermediárias do ciclo clássico da uréia, formulado por Krebs, já em 1932 (119).

Assim, a aminação de citrulina, para formar arginina, requer a presença de ácido aspártico (120). Na realidade há formação intermediária de arginino-sucinato, sendo doador de fato do grupo amino, o ácido aspártico, que será regenerado pelo ácido oxalacético por transaminação.

A formação de arginino-sucinato partindo da citrulina e do ácido aspártico, somente se realiza com a presença de ATP, que no final da reação se desdobra em AMP e PPI. Sugere-se a produção inicial de um citrulina-AMP, o qual seria desdobrado pela ação do ácido aspártico (67) (**Esquema n.º 2**).

F) ACCEPTOR: NUCLEOTÍDIOS, COM FORMAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS E POLINUCLEOTÍDIOS. PONTE C-O-P-O-C.

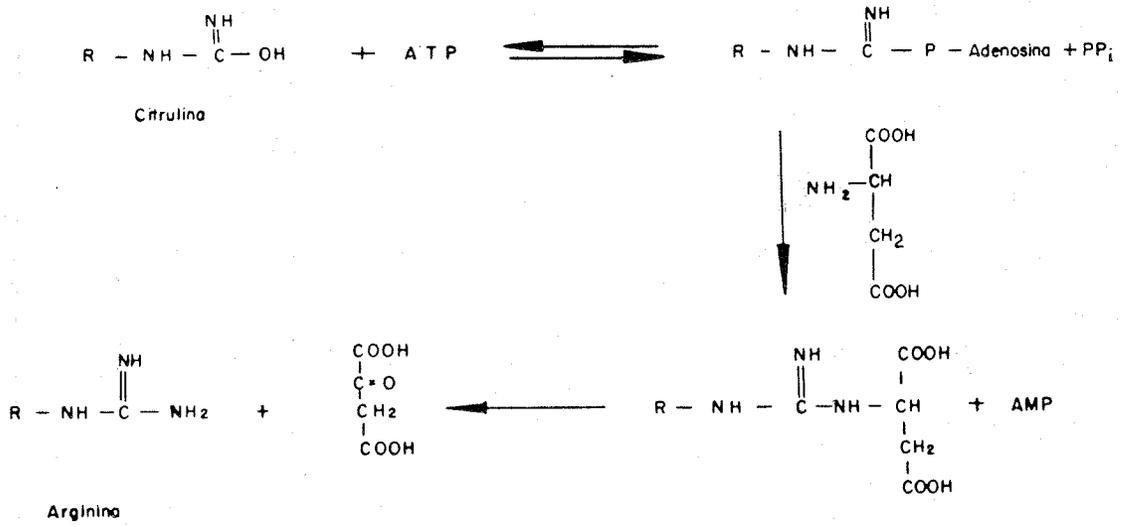
Um campo bioquímico que atualmente desperta extraordinário interesse é o que investiga o papel metabólico exercido pelos ácidos nucleicos. A sua importância é motivada pela participação essencial que têm em um número variado de fenômenos biológicos, como por exemplo, nos mecanismos de hereditariedade genética, de ação e formação de vírus, de evolução do câncer, de biossíntese protéica.

Indiretamente, o tópico de fato subjacente aos demais consiste na formação da molécula de proteína. Nessa, a presença do ácido nucleico é imprescindível, sendo-lhe atribuída uma função de matriz orientadora e ordenadora na estruturação da cadeia polipeptídica.

Para a elucidação deste problema, bem como dos demais ligados aos importantes metabólitos que são os ácidos nucleicos, a descoberta dos processos de biossíntese dos mesmos é um passo inicial.

Bem recentemente, dois laboratórios, o de Ochoa e o de Kornberg, lançaram, independentemente, as primeiras résteas de luz sobre este tópico.

O primeiro obteve uma síntese “*in vitro*” de ácido ribo-



ESQUEMA Nº 2 : ATIVAÇÃO DE CITRULINA.

nucléico (RNA), partindo de difosfo-nucleotídios, através de uma polinucleotídio-fosforilase (121-124). Êste estudo foi amplamente confirmado por outros (67, 125-128).

Kornberg obteve uma enzima purificada que realiza a síntese de ácido desoxi-ribonucléico (DNA) (67, 129, 130). Neste processo foi necessário usar como substrato, trifosfo-nucleosídios, sendo insuficientes os difosfo-compostos. A enzima neste caso não é uma fosforilase, mas uma polinucleotídio-pirofosforilase. Os substratos ensaiados foram os trifosfatos de timidina (TPPP), desoxicitidina (CPPP), desoxiguanosina (GPPP) desoxiadenosina (APPP), sendo necessária a presença simultânea dos quatro desoxinucleosídio-trifosfatos, bem como do ion Mg^{++} e de "primer" de DNA, (de origem animal, vegetal ou de virus), prescindindo-se porém de ATP.

A reação pode ser esquematizada pela seguinte equação:



Vê-se que o processo é reversível, e que é formada uma enorme quantidade de pirofosfato.

Considerando que um número muito grande de moléculas de nucleotídios são incorporados em uma só molécula de DNA, haverá uma liberação de x moles de pirofosfato para cada mol de DNA sintetizado.

Kornberg verificou ainda que concentrações mais elevadas de pirofosfato ($10^{-3}M$), no meio, tornavam o processo deslocável no sentido inverso. Isto sublinha a importância exercida pela concentração local de pirofosfato e sua metabolização subsequente, em face de mais êste processo bioquímico básico e de todos os outros dêle dependentes.

G) REAÇÕES COM FOSFO-RIBOSE-PIROFOSFATO E COMPOSTOS NITROGENADOS (BASES PÚRICAS E PIRIMÍDICAS, GLUTAMINA). FORMAÇÃO DE PONTE C-N.

Existem outras reações que contribuem para a formação

de ácidos nucléicos e durante as quais, também há a formação de pirofosfatos.

Os nucleotídios podem surgir no organismo animal através de várias rotas: a) por degradação de ácidos nucléicos; b) por reação entre bases púricas e pirimídicas com 5 fosfo-ribosila-1 pirofosfato; e c) por neoformação a partir de 5 fosfo-ribosila-1 pirofosfato.

Nas duas últimas rotas surge secundariamente pirofosfato inorgânico.

A biossíntese dos nucleotídios derivados de **bases pirimídicas** inicia-se pela formação de ácido orótico. Este se condensa com 5 fosfo-ribosila-1 pirofosfato, resultando orotidina-5' fosfato.

A descarboxilação do orotidina-5' fosfato produz uridina-5' fosfato (UMP), do qual derivam os demais nucleotídios que incluem bases pirimídicas (131-132) (**Esquema n.º 3**).

O pirofosfato inorgânico aqui se encontra participando em mais outro processo reversível, no qual resulta um composto chave para um grupo de metabólitos essenciais.

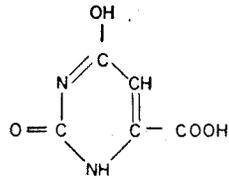
Vários laboratórios trabalharam extensivamente na síntese de nucleotídios derivados de **bases púricas**. Foi verificado de início que o organismo consegue recuperar diretamente as bases púricas (133-138), condensando-as com 5 fosfo-ribosila-1 pirofosfato (139-141):



Os dois grupos que maior contribuição trouxeram para a elucidação da neoformação destes nucleotídios, foram os de Greenberg (142-145) e de Buchanan (146-149).

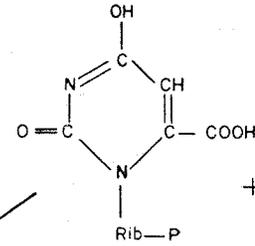
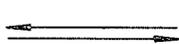
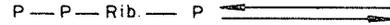
Ficou evidenciado por estes pesquisadores que o organismo não sintetiza previamente o núcleo púrico para depois transformá-lo num nucleosídeo, mas a biossíntese parte do composto já mencionado o 5 fosfo-ribosila-1 pirofosfato, sobre o qual é construído o núcleo heterocíclico do nucleosídeo-monofosfato.

Verificou-se que o primeiro passo nesta síntese consiste na reação entre a fosforibose ativada e a glutamina, resultan-



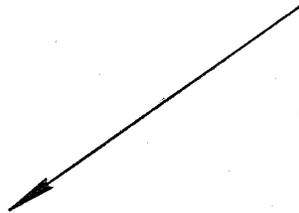
Ácido orótico

+

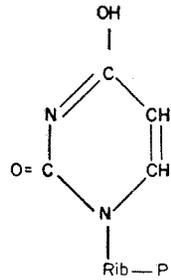


+ PP_i

Orotidina — 5 fosfato



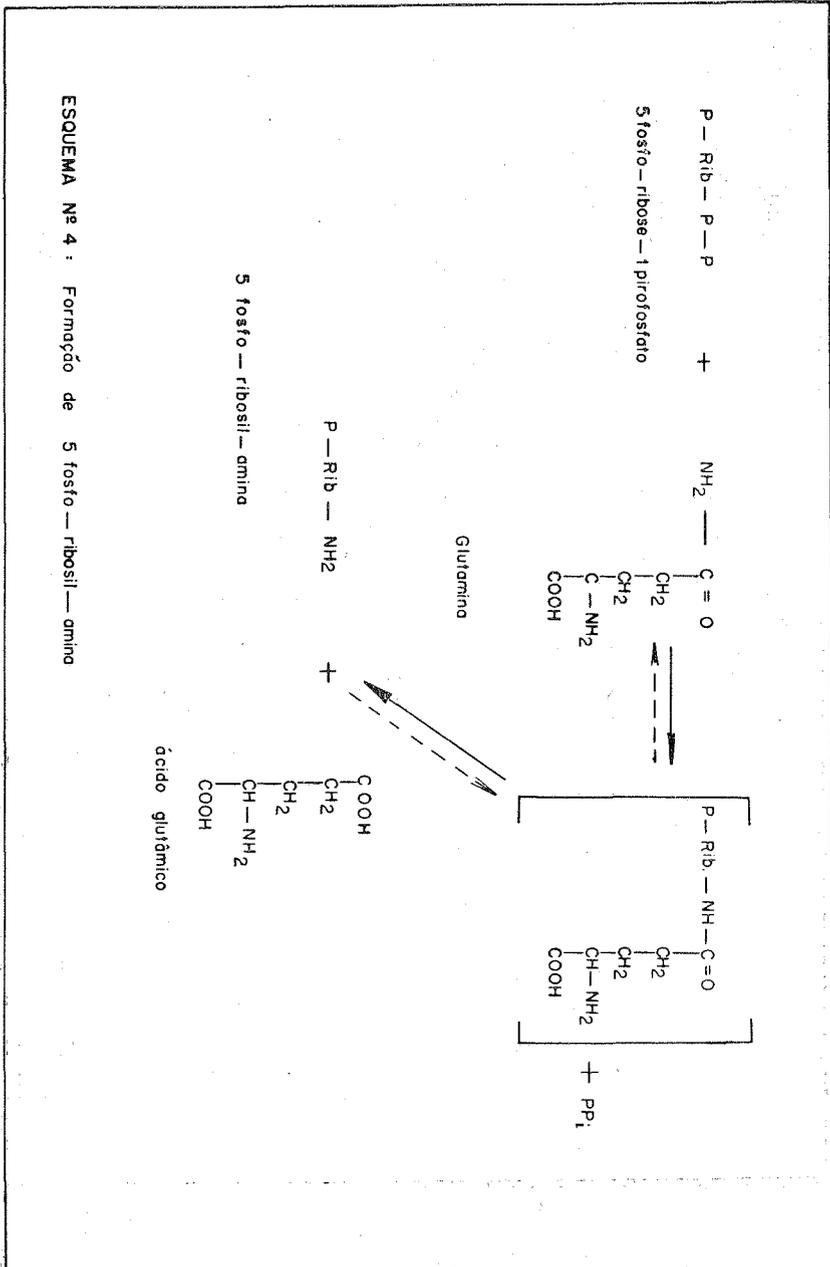
+ CO₂



Uridina — 5 fosfato

ESQUEMA Nº 3: FORMAÇÃO DE UMP.

do a 5 fosfo-ribosilamina, ácido glutâmico e pirofosfato (150)
(Esquema n.º 4).



A fosfo-ribosilamina servirá como ponto de partida para a formação dos núcleos da purina com auxílio de glicina, fragmento de um Carbono, glutamina, CO_2 , ácido aspártico e ATP.

Todavia, processos semelhantes para os desoxinucleotídios, partindo, por exemplo de 5 fosfo-desoxi-ribose-1 pirofosfato, não puderam ser descobertos até a presente data.

Deve chamar-se a atenção para o fato de, na síntese dos ácidos nucléicos, pelo menos em duas fases, isto é, ao se formarem os nucleotídios, como vimos aqui, e na condensação dos mesmos para polinucleotídios, como descrito mais acima, haver produção abundante de pirofosfato.

H) A PARTIR DE ORTOFOSFATO.

Finalmente, Roche e seus colaboradores (151-154) comunicaram a interessante obtenção “*in vitro*” de apreciável quantidade de pirofosfato inorgânico a partir de ortofosfato inorgânico, utilizando uma preparação enzimática de pirofosfatase intestinal. Mas até a presente data, êste achado não foi confirmado por outros laboratórios, bem como carece de interpretação termodinâmica adequada.

3. — METABOLIZAÇÃO DO PIROFOSFATO

No subcapítulo anterior, foram delineados rapidamente os processos enzimáticos observáveis em animais superiores, que conduzem à liberação de pirofosfato inorgânico.

E' perfeitamente plausível, em vista da extensão dêsse tipo de reações e da evolução acelerada da investigação bioquímica, que novos mecanismos de produção de pirofosfato sejam descobertos em futuro próximo.

Tais reações levam concomitantemente à biosíntese de uma plêiade de compostos, essenciais na engrenagem bioquímica da célula:

a) Uma série de coenzimas, como as que colaboram em reações de oxi-redução (DPN, TPN e FAD); a coenzima A, imprescindível nos processos de ativação de compostos car-

boxilados, os nucleotídios (derivados da uridina, guanosina e citidina), que possibilitam as reações de transglicosidação e a interconversão de oses e de derivados (UDPG, UDPGA, UDPGal, UDPGam, UDPGalam e derivados) e a síntese de fosfolipídios (CDP-colina e CDP-colamina).

b) Compostos ativados, tais como amino-ácidos, ácidos graxos e outros ácidos carboxilados (constituindo isto o primeiro passo em sua posterior metabolização), bem como sulfatos, metionina, e a citrulina no ciclo da uréia de Krebs.

c) Nucleotídios em primeira fase, e, posteriormente, polinucleotídios, ou sejam, ácidos nucléicos.

Vê-se que êstes mecanismos dominam largos campos do metabolismo intermediário:

biossíntese de oses, seus derivados e osídios;

biossíntese de proteínas;

biossíntese e degradação de ácidos graxos;

biossíntese de fosfolipídios;

biossíntese de ácidos nucléicos.

São, em maior parte, processos anabólicos e quimicamente reversíveis, dependendo então, a sua realização eficiente no sentido de síntese, do afastamento adequado dos produtos de reação.

Naquelas reações onde há marcado acréscimo negativo de Energia Livre (ΔG), e que, portanto, se realizou com grande espontaneidade, a eliminação do pirofosfato inorgânico não se tornaria obrigatória, sob ponto de vista termodinâmico, com o objetivo de guiar o processo no sentido sintético.

Quase tôdas as reações acima estudadas são quimicamente reversíveis, embora algumas só restritamente, e a sua queda em Energia Livre não é tão acentuada. Torna-se então necessário diminuir constantemente a concentração local do pirofosfato, ou seja, a sua atividade, afim de conduzir o processo no sentido anabólico. Para a execução disto, poderiam ser sugeridos três mecanismos:

a) As reações estudadas também podem ser consideradas como pirofosforólises, se encaradas no sentido inverso. Por sinal, as enzimas correspondentes, frequentemente levam o nome de pirofosforilases.

É um processo semelhante aos de fosforólise ou hidrólise, sendo aí, também, o pirofosfato inorgânico usado num processo de cisão de outras moléculas complexas. Aliás, alguns autores atribuem à pirofosforólise, ao lado da fosforólise, singular importância, notadamente no caso da degradação dos ácidos nucléicos, que então exerceriam também o papel de um imenso reservatório de nucleotídeos facilmente mobilizáveis, se assim fôr solicitado pelo organismo.

Pois bem, é perfeitamente concebível que uma parcela de pirofosfato inorgânico produzida em determinada reação, a qual momentaneamente deve prevalecer sobre as demais, seja reutilizada em outros processos semelhantes que funcionam, porém, em sentido inverso, isto é, de pirofosforólise.

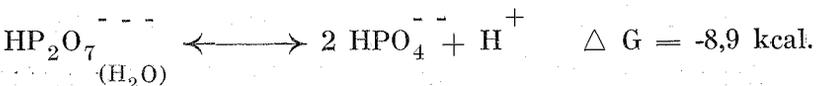
Kornberg chega a propor interessantes mecanismos de possíveis utilizações de pirofosfato inorgânico, com o fito de reaproveitar a Energia Livre ainda apreciável, existente no mesmo (67).

b) Um outro mecanismo que pode ser sugerido, em tese, é o da diminuição local do pirofosfato inorgânico através da passagem do mesmo a compartimentos subcelulares vizinhos. O tema ainda não foi explorado, e provavelmente só o poderá ser após um conhecimento mais aprofundado do fenômeno de permeabilidade de membranas.

Pouco se conhece sobre: como, e em que condicionamento o íon ortofosfato, e muito menos, o íon pirofosfato podem, passiva ou ativamente, passar através de orgânicos membranosos.

c) Tais mecanismos, todavia, seriam acidentais, como pode ser vislumbrado sem maior dificuldade. É sugestivo, pois, procurar-se um processo mais geral que permita o controle da concentração local do pirofosfato inorgânico. Este é fornecido pela hidrólise enzimática do mesmo por pirofosfatases inorgânicas.

A Energia Livre (ΔG) para o processo foi determinada, atingindo o valor de -8,9 kcal, num pH 7,5 (156, 157):



Tal quantidade é perfeitamente adequada para impulsionar as reações das pirofosforilases no sentido anabólico.

E' evidente que a distribuição das pirofosfatases deve ser ubíqua. Em segundo lugar, é de ser esperado também, que existam vários tipos desta enzima, com condições de funcionamento ótimo as mais variadas (pH, ativação, inibição do substrato etc.), uma vez que a pirofosfatase deverá atuar em locais e situações igualmente as mais diversas.

Realmente, desde há mais tempo, foi possível observar que muitos tecidos animais, bem como plantas e microorganismos, apresentam atividade de pirofosfatase.

Foi provado existir em bactérias (158, 159), fungos (160, 161), levedos (162-166), plantas (164, 167-169) e diversos tecidos animais: fígado (170-173), rins, mucosa intestinal (174), cérebro (175, 176), músculo (177), osso, baço (180-182), bem como em sôro (183, 184), eritrócitos (178, 179) e plaquetas (185).

Estas diversas pirofosfatases (ou melhor, atividades pirofosfatásicas), ainda não foram estudadas suficientemente para permitirem uma classificação adequada. Os seus pH ótimos, em geral se distribuem por quatro zonas (pH: 3,5 — 4,5, 6-7, 7-8, e acima de 8) (cf. 186), enquanto outros preferem adotar três zonas: a ácida, a alcalina e a neutra, uma vez que não se observaria separação muito distinta entre as duas zonas intermediárias (173).

O aspecto cinético químico das pirofosfatases, também não foi investigado amplamente. Não foi cristalizada nenhuma pirofosfatase de tecidos animais e a única obtida neste estado foi isolada por Kunitz a partir de levedo (187).

Sabe-se que, em regra, exigem como cofator o ion Mg^{++} , pelo qual são ativadas (173, 188, 189). Podem ser inibidas por ions fluoreto e cálcio (173, 190), necessitando grupos não bloqueados de sulfidrilas (173, 190-192).

4. — ATIVIDADE PIROFOSFATÁSICA NO SÔRO HUMANO.

Até a presente data, a determinação das pirofosfatases do

sôro ou plasma sangüíneo não tem despertado interêsse no sentido de aplicação clínica. Isto, provavelmente, se deve ao fato de não ter surgido técnica adequada de contrôle para a dosagem de pirofosfato ao lado de fosfato inorgânico, no meio de incubação, nem razões de ordem clínica que solicitassem tal tipo de técnica de análise.

Porém, são certamente justificadas as investigações sobre esta enzima no terreno patológico. O reflexo clínico de um estudo desta natureza, evidentemente, está fora do âmbito do bioquímico. Contudo, o seu desenvolvimento metodológico, a fundamentação bioquímica correspondente e as diretrizes para uma eventual valorização de ordem patológica ou mesmo clínica, podem ser perfeitamente indicadas pelo bioquímico, pertencendo isto ao seu campo de trabalho. Todavia fogem-lhe, em tése, competência e ambientação para julgar adequadamente uma técnica de análise sob o ponto de vista de diagnóstico, prognóstico ou orientação de terapêutica.

Da mesma forma, em princípio, é alheia ao clínico ou cirurgião, a capacidade de avaliação crítica de um método de análise em si. Pode ser mesmo acrescentado, nesta altura, que a invasão indevida dos campos próprios de um pelo outro, são extremamente indesejáveis e perigosos, exigindo-se por isto mesmo, uma colaboração mais entrosada entre o médico e o bioquímico.

A Enzimologia, o campo mais recente e mais dominante da Bioquímica, está iniciando sua aplicação prática na Medicina. Além dos subsídios que vem fornecendo, sempre com maior fertilidade, para a interpretação etiológica, algumas de suas técnicas já são adaptadas à rotina da clínica.

O conjunto de métodos de análise clínica foi estruturado basicamente mais ou menos, até 1930 (2).

Um ramo completamente diferente, porém revolucionário e promissor vem se impondo agora a êste grupo: é a análise enzimática.

Stewart (1), quando discute o “desenvolvimento da química clínica” afirma que a “tendency of Clinical Chemistry to penetrate into new fields of enquiry must continue as research extends the range of possible analysis” — indicando

como primeiro exemplo “increasing use of enzyme reactions both in the determination of chemical constituents of the body and in studying the reactions which become abnormal in disease, with its corollaries, the greater use of tissue biopsy material and ultra-micro methods of analysis”.

Ao lado do emprêgo de uréiase ou urícise, na determinação de seus respectivos substratos, mais recentemente as próprias enzimas começaram a ser dosadas, para efeito clínico: UDPGal-transfêrase em galactosemia (20, 193-197), UDPGA-transfêrase e UDPG-desidrogênase nos casos de deficiência de conjugação de bilirubinas, como por exemplo, na moléstia de Gilbert (198). Já se tornaram clássicas as dosagens de ácido-glutâmico-oxalacético-tranaminase do sôro (SGOT) em enfarte do miocárdio (199-204), enquanto outros indicam como mais informativa a determinação da ácido-láctico-desidrogênase (205-210).

Neste sentido também foram consideradas a ácido-málico-desidrogênase (209, 210), a aldólase (205, 209) e a fosfohexose-isomérise (205).

Quanto a afecções hepáticas, foram estudadas novamente a SGOT (212-216) e outra enzima semelhante, porém não envolvida com enfarte de miocárdio, a ácido-glutâmico-pirúvico-transaminase (SGPT) (213, 217). Também foi focada a ácido-láctico-desidrogênase (207, 218) e a aldólase (219, 220), em relação a disfunções hepáticas.

Não é necessário discutir a larga aplicação desde há tempos, da determinação da fosfátase ácida e da fosfátase alcalina na clínica.

Já em 1943, Warburg e Christian (221), levantaram a hipótese de que no caso de neoplasias poderia haver um extravasamento, ao sôro, de certas enzimas, especialmente do tipo glicolítico. Anàlogamente, e em face do exposto acima, ocorre desde logo, a possibilidade de passagem também da pirofosfátase à corrente sanguínea. Tal poderia surgir não somente em neoplasias, mas em tôdas aquelas situações nas quais haja proliferação e lesionamento tecidual.

A atividade pirofosfatásica no sôro seria mais acentuada

no caso de afecções de órgãos caracterizados por metabolismo mais ativo (por exemplo, o fígado).

E' notória a intensificação metabólica em tecido neoplásico. Nestes a ATP-ase tecidual é elevada de muito (222, 223). Também a produção de ácidos nucléicos é aumentada, constituindo isto exatamente uma característica da proliferação neoplásica. Foi visto acima que a síntese de ácidos nucléicos envolve pelo menos, em duas fases, produção avantajada de pirofosfato, que deverá ser eliminado pelas pirofosfatases. Por conseguinte surge a possibilidade de o tecido, ter incrementada a sua atividade pirofosfatásica.

Em face disto, poderão justificadamente ser aventadas as seguintes hipóteses:

a) existe uma superprodução de pirofosfato que se acumularia por um acúmulo do mesmo na corrente circulatória;

b) surge uma atividade pirofosfatásica mais acentuada, que se traduziria em taxas mais elevadas da mesma no sôro sanguíneo.

O presente trabalho nasceu destas considerações acima expostas.

O autor julgou perfeitamente justificado e de eventual utilidade clínica abordar o tópicó ,sob prisma bioquímico.

Como passo inicial se impunha desenvolver técnicas de determinação de pirofosfato inorgânico e de atividade pirofosfatásica no plasma ou sôro. O primeiro até a presente data, ainda não tinha sido tentado e o segundo o foi, porém, fora dos objetivos aquí indicados. Êstes dois pontos constituem o objeto principal do presente trabalho.

Uma vez estabelecidas e caracterizadas as técnicas de análise, deveriam ser verificadas as taxas normais, para depois serem vasculhadas aplicações de ordem clínica. Evidentemente, esta última parte escapa ao setor diretamente afeto ao bioquímico.

Da mesma forma, a valorização clínica dêstes métodos abrangendo muitas entidades patológicas, sômente poderá ser feita em ampla investigação estatística.

Tal programa de pesquisa é unicamente exequível à base de um grupo de trabalho orientado neste sentido, fugindo,

portanto das características de uma tese individual.

Resumindo, deverão ser expostas e discutidas nas páginas a seguir, técnicas de determinação de pirofosfato inorgânico e atividade pirofosfatásica ácida, alcalina e neutra, em sôro humano, além da avaliação de taxas normais correspondentes em pessoas consideradas híginas. E' feita uma ilustração da aplicabilidade em alguns casos patológicos particularmente hepáticos, com as técnicas propostas.

Primeiramente será abordado o tema dos métodos empregados e do estudo daqueles a serem propostos.

Posteriormente, no capítulo de Aplicações, serão vistos os dados obtidos com o uso dêstes métodos.

CAPÍTULO II

MÉTODOS E MATERIAL

Desenvolvemos no presente trabalho métodos originais de dosagem de pirofosfátases ácidas, neutras e alcalinas, bem como de pirofosfato inorgânico, no sôro humano. Concomitantemente, reestudamos a técnica de Flynn, Jones e Lipmann, ampliada por Elliott, para determinação dêste último ion, à qual sugerimos a modificação que nos pareceu imprescindível.

Também é proposta nas linhas que seguem, uma operação adicional à dosagem clássica de ortofosfato de Fiske-Subbarow, que permite simultâneamente a sua execução em grande número de amostras.

Empregamos os seguintes métodos complementares de análise: Bilirubinas (244, 225), reação do timol (226), reação de cefalina-colesterol (227), fosfátase alcalina (228), reação de Kunkel (229), P. G. G. (230), proteínas (231).

São descritas também as condições de experimentação em coelhos nos quais provocamos esteatose hepática através de administração de tetracloreto de carbono.

1. DETERMINAÇÃO DE ORTOFOSFATO INORGÂNICO

Preferimos para o presente trabalho a técnica de Fiske-Subbarow (232). Além de ser, ainda hoje, um processo clássico, o mesmo vem sendo usado em larga escala tanto em pesquisa, como provam publicações atuais dos mais conceituados laboratórios, como também foi declarada através de recente inquérito internacional, a técnica para dosagem de ortofosfatos de maior emprêgo em análise clínica (233). Entre 91 laboratórios de hospitais-escolas, mais do que a metade, 51, preferem o método citado.

O processo de Berenblum e Chain (234) é bastante mais sensível do que os demais (determinação até 2 μ g de fósforo

de ortofosfato). Neste o fosfomolibdato resultante é extraído por isobutanol, com formação posterior de “óxidos de molibdênio” através de reagente redutor. Exatamente por ser muito precisa e possuir um limite de captação tão reduzido, esta reação não tem aplicação corrente em análise de rotina e é reservada de preferência para problemas específicos de pesquisa.

A maior parte das determinações de ortofosfato baseia-se na formação do ácido fosfomolibdico ($H_3PO_4 \cdot 12 MoO_3$), por ação de molibdato de amônio em meio ácido [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}$]. O ácido fosfomolibdico é reduzido por reagentes diversos (no caso de Fiske-Subbarow, pelo ácido 1 amino-2 naftol-4 sulfônico) até “azul de molibdênio” (mistura de “óxidos de molibdênio” de estrutura não estabelecida) que por sua vez pode ser determinado colorimetricamente.

Erros de técnica podem surgir especialmente em presença de sílica, proveniente do material de vidro usado, formando-se intermediariamente o ácido silicico-túngstico ($H_4SiO_3 \cdot 12 MoO_3$) (235), que também é reduzível, em condições análogas, a “óxidos de molibdênio”.

Para a aplicação do processo de Berenblum e Chain far-se-iam necessárias precauções especiais, inconvenientes em trabalho de rotina. Não havendo necessidade especial para alta sensibilidade permanecemos com o processo já consolidado de Fiske-Subbarow, como segue:

- Tratar 0,5 ml de sôro com 4,5 ml de solução de ácido tricloro-acético a 5g por 100 ml (TCA 5%). (Para reagentes, vide fim da descrição).
- Centrifugar durante 10 minutos a 2.000 r.p.m.
- Pipetar 3 ml do sobrenadante. (Para o ensaio de referência tomar 3 ml de TCA 5%).
- Adicionar sucessivamente:
 - 3,2 ml de água destilada; 1 ml de molibdato de amônio a 2,5 g por 100 ml de ácido sulfúrico 5 N;
 - 0,4 ml de cisteína (0,175 mM por ml) (facultativo);

- Deixar no escuro;
- Leitura em fotocolorímetro (Lumetron 401A) com filtro de 650 m μ , exatamente após 7 minutos.

Curva Padrão.

- Tomar 1 ml de solução padrão de ortofosfato (100 mg de fósforo por 100 ml);
- Diluir até 100 ml com TCA 5%;
- Pipetar em tubos diferentes: 0, 2, 4, 6, 8 e 10 ml desta solução e diluir até 10 ml com TCA 5%;
- Tomar 3 ml de cada uma destas soluções (que contém respectivamente: 0, 6, 12, 18, 24 e 30 μ g de fósforo ortofosfórico) e ensaiar, sobre os mesmos a técnica acima descrita.

Nota — A curva padrão foi executada após cada renovação de reagentes.

REAGENTES:

TCA 5%

- Cinco gramas de ácido tricloro-acético (Riedel p.a.) ($\text{CCl}_3\text{-COOH}$), diluídas até 100 ml com água destilada.

Molibdato 2,5% em H_2SO_4 5 N.

- Diluir 67 ml de ácido sulfúrico concentrado ($d=1,82$) (Riedel, p.a.) em 450 ml de água destilada;
- Adicionar 12,5 g de molibdato de amônio [$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$] (Reagente Baker-Adamson);
- Completar o volume de 500 ml com água destilada.

Reagente Redutor

- Pesar 20 g de sulfito ácido de sódio (Merck, reagente analítico), e juntar

1 g de sulfito de sódio anidro (Baker-Adamson, reagente analítico).

- Dissolver o conjunto com água destilada, até completar 200 ml.
- Triturar 0,5 g de ácido 1 amino — 2 naftol — 4 sulfônico (Eastman-Kodak), em gral com um pouco da solução dos sulfitos. Juntar à solução e lavar o gral com a mesma.
- Deixar sedimentar e filtrar.

Solução padrão de ortofosfato

- 4,390 g de ortofosfato biácido de potássio (KH_2PO_4) (Baker — C.P.), (secado sobre cloreto de cálcio anidro por 24 horas) dissolvidas até 1 litro com água destilada (100 mg de fósforo ortofosfórico em 100 ml).

CURVA PADRÃO.

Obtivemos, por exemplo, os seguintes valores de absorvência para a curva padrão:

6 μg P	—	1,00
12 μg P	—	1,90
18 μg P	—	3,00
24 μg P	—	3,95
30 μg P	—	4,95

Verificamos que o envelhecimento do reagente redutor permitia o seu uso a baixas concentrações de ortofosfato mas sua eficiência era reduzida com quantidades mais elevadas:

6 μg P	—	1,00
12 μg P	—	1,80
18 μg P	—	2,70
24 μg P	—	3,10
30 μg P	—	3,10

EFEITO DA ADIÇÃO DE VERSENE.

A leitura da absorvência deve ser feita aos sete minutos com relativa exatidão, uma vez que a formação da côr prossegue continuamente (Fig. 1). Isto não permite o trabalho concomitante em um grande número de amostras.

Procuramos algum meio prático que permitisse contornar esta dificuldade. Verificamos que a adição de versene, uma substância de ação complexante acentuada, permite sustar, temporariamente, a reação corada.

Em face disto, julgamos ser de interêsse, propor a seguinte modificação acessória da técnica de Fiske-Subbarow:

Adicionar ao sétimo minuto exatamente 1 ml de versene (ácido etilena-diamina-tetracético), 0,1 M, pH = 7,2, à solução. A sua côr se diluirá em parte, mas em compensação, permanecerá estabilizada por largo tempo (15 a 17 minutos) permitindo operar com tranqüilidade. Num intervalo de 25 minutos, a variação de côr, usando versene, atinge até 2,5%, enquanto que sem êste reagente quasi chega a 10%. (**Quadro n.º 1**) (Fig. n.º 1).

Pensamos ser de utilidade prática esta modificação da técnica de Fiske-Subbarow, particularmente naqueles casos que exigem a determinação de fosfatos em grande escala, por exemplo, em laboratórios centrais hospitalares.

2. DETERMINAÇÃO DE PIROFOSFATO INORGÂNICO

As primeiras dosagens de pirofosfato inorgânico compreendem, em geral, uma operação de precipitação do mesmo sob forma de sal de metais pesados.

Assim, foi verificado que se formam sais insolúveis com nitrato de chumbo (236) a um pH = 1,6, e com sulfato de zinco ou cloreto de cádmio a um pH = 3,8 (237).

A precipitação com cloreto manganoso também foi usada eficientemente nos primórdios do estudo bioquímico do pirofosfato (57, 77, 238).

No caso da precipitação com sal de zinco ocorre, acessoriamente, uma liberação de ácido (239, 240). Esta observa-

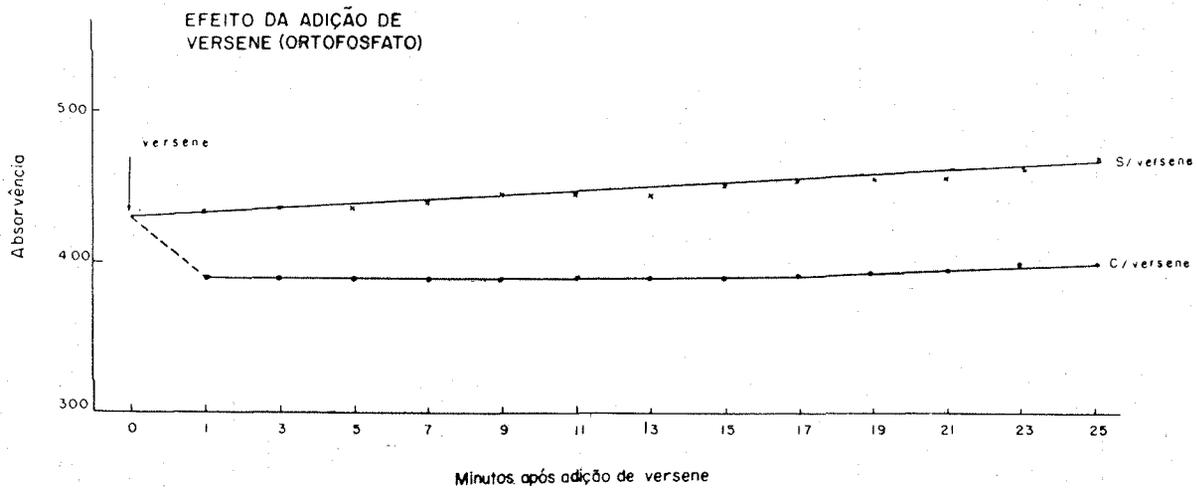
ção permitiu estruturar uma determinação titrimétrica muito prática (241, 242), porém pouco específica. É conveniente, no caso, executar a determinação gravimétrica em vez da litrimétrica, considerando que os polifosfatos fornecem, de um modo geral, reação análoga, porém sem envolver precipitação.

QUADRO N.º 1

EFEITO DA ADIÇÃO DE VERSENE SOBRE A ESTABILIZAÇÃO DA CÔR DEVIDA AO ORTOFOSFATO PELO MÉTODO DE FISKE-SUBBAROW

Minutos após adição de Versene	ABSORVÊNCIA	
	Sem Versene	Com Versene
0	4,30	4,30
—	----	----
1	4,35	3,90
3	4,35	3,90
5	4,35	3,90
7	4,40	3,90
9	4,45	3,90
11	4,45	3,90
13	4,45	3,90
15	4,50	3,90
17	4,55	3,90
19	4,55	3,95
21	4,55	3,95
23	4,65	4,00
25	4,70	4,00

Fig. nº 1



Por outro lado, os polifosfatos mais complexos podem sofrer coprecipitação, juntamente com o pirofosfato, tornando desta forma o processo impreciso para a maior parte dos casos.

Uma outra técnica utilizada empregava pirofosfátases específicas, obtidas de fígado (243), ou de levedo (77). Este método, embora exato, infelizmente é, por sua natureza, de aplicação limitada. Além disso, sua execução não é simples, como o seria de desejar para aplicação em rotina.

Uma terceira possibilidade é apresentada pelas resinas trocadoras de ions (244, 245). Seu uso é indicado para a identificação e separação de pirofosfato ao lado de outros fosfatos complexos, inclusive orgânicos, através de eluição em gradiente. Seria porém desejável, para dosagem comum, um processo mais simples e rápido.

Tal possibilidade foi oferecida pelo método desenvolvido mais recentemente por Flynn, Jones e Lipmann (62), o qual permitiu um estudo mais amplo de problemas bioquímicos que incluem produção ou desaparecimento de pirofosfato inorgânico. Verificaram aquêles autores, acidentalmente, que o pirofosfato em presença do reagente redutor da reação de Fiske-Subbarow (ácido 1 amino — 2 naftol — 4 sulfônico com sulfito e sulfito ácido) desenvolvia lentamente uma cor azul-purpúrea. A formação da cor devida ao pirofosfato inorgânico, era suficientemente vagarosa para permitir a dosagem simultânea do ortofosfato inorgânico.

A estabilização e aceleração do desenvolvimento da cor eram obtidas com cisteína (0,175 milimol por ml), cuja presença não modificava a dosagem do ortofosfato.

Como a variação da cor prossegue, tanto no caso do ortofosfato como no do pirofosfato, Lipmann sugere a leitura da absorvência exatamente aos sete minutos, para o ortofosfato e aos noventa minutos, para o pirofosfato. A diferença entre as duas absorvências corresponde ao pirofosfato.

A reação do pirofosfato não pode ser executada em presença de versene (ácido etilena-diamino-tetracético), que inibe acentuadamente a formação do composto corado. Tal fato foi utilizado por Elliott (246), que adicionava versene após

noventa minutos, inibindo assim, imediatamente o incremento posterior da côr. Aquêlê autor recomendava a leitura da absorvência, pelo menos dentro de dez minutos. Esta modificação é muito interessante e útil, pois permite a dosagem simultânea de grande número de amostras e confere, em princípio, mais exatidão ao método.

DOSAGEM DE PIROFOSFATO (conforme Lipmann e modificada por Elliott).

- Precipitar o material a ser dosado com TCA 5%, de tal forma que 3 ml contenham de 0,1 a 0,5 micro-mol de pirofosfato e menos de 1 micro-mol de ortofosfato, inorgânicos.
- Centrifugar por dez minutos a 2.000 r.p.m.
- Pipetar 3 ml do sobrenadante. (3 ml de TCA 5% para o ensaio de referência).
- Adicionar 3,2 ml de água destilada.
- Adicionar 1,0 ml de molibdato de amônio a 2,5 g % em H_2SO_4 5 N.
- Adicionar 0,4 ml de cisteína (0,175 milimol por ml).
- Adicionar 0,4 ml de reagente redutor tendo o cuidado de marcar precisamente o início da reação.
- Permitir que o desenvolvimento da côr se faça no escuro.
- Ler aos sete minutos, (ortofosfato) em fotocolorímetro (Lumetron 401A), com filtro de 650 m μ .
- Adicionar 1 ml de versene 0,1 M, pH = 7,2, aos 90 minutos, exatamente.
- Ler no prazo de dez minutos (Elliott) nas condições acima.

Curva Padrão.

- Tomar 2 ml de solução padrão de pirofosfato (100 mg de fósforo pirofosfórico por 100 ml).
- Diluir até 100 ml com TCA 5%.
- Pipetar em tubos diferentes: 0, 2, 4, 6, 8 e 10 ml desta solução e diluir até 10 ml com TCA 5%.

— Tomar 3 ml de cada uma destas soluções (que contém respectivamente — 0, 12, 24, 36, 48 e μg de fósforo pirofósforico) e ensaiar sobre os mesmos a técnica acima descrita.

Nota — A curva padrão foi executada em cada renovação de reagentes.

REAGENTES.

TCA 5% — Como na técnica para ortofosfato.

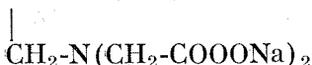
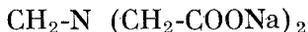
Molibdato de amônio 2,5 g% em H_2SO_4 5 N — Idem.

Reagente redutor — Idem.

Cisteína — 6,896 g de 1 (-) cisteína cloridrato (Roche), dissolvidas até 250 ml com água destilada (0,175 milimol por ml).

Versene 0,1M, pH = 7,2

— 9,505 g de versene (sal sódico do ácido etilena-diamina-tetracético) dissolvidas até 250 ml com água destilada. pH ajustado a 7,2 com potenciômetro Beckman Modelo G, usando ácido clorídrico 1 N.



Solução Padrão de pirofosfato

— 7,195 g de pirofosfato de sódio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) (Analar BDH), dissolvidas até 1 litro com água destilada (100 mg de fósforo pirofósforico por 100 ml de solução).

EFEITO DA ADIÇÃO DE VERSENE.

Verificamos porém, após um exame cuidadoso, que a modificação de Elliott é inexata quanto ao tempo de leitura após a adição de versene.

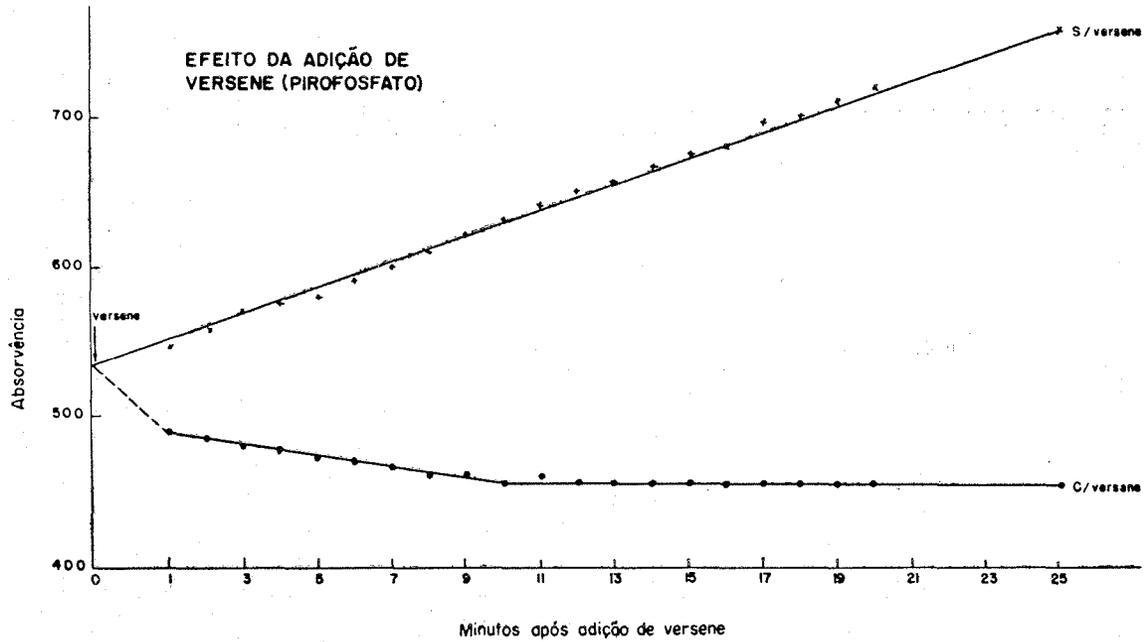
A figura n.º 2 e quadro n.º 2, ilustram a variação da cor de uma solução de pirofosfato, tratada pelo método descrito acima.

QUADRO N.º 2

EFEITO DA ADIÇÃO DE VERSENE SOBRE A ESTABILIZAÇÃO DA CÔR DO PIROFOSFATO PELO MÉTODO DE LIPMANN - ELLIOTT

Minutos após adição de Versene	ABSORVÊNCIA	
	Sem Versene	Com Versene
0	5,40	5,40
—
1	5,45	4,90
2	5,60	4,85
3	5,70	4,80
4	5,75	4,75
5	5,80	4,70
6	5,90	4,70
7	6,00	4,65
8	6,10	4,60
9	6,20	4,60
10	6,30	4,55
11	6,40	4,60
12	6,50	4,55
13	6,55	4,55
14	6,65	4,55
15	6,75	4,55
16	6,80	4,55
17	6,95	4,55
18	7,00	4,55
19	7,10	4,55
20	7,20	4,55
...
25	7,60	4,55
Variação da côr nos primeiros 10 mi- nutos	15,6%	7,2%

Fig. nº 2



Verifica-se então que, de fato a absorvência da solução com versene decresce continuamente, para só estabilizar após 9 a 10 minutos e permanecer assim por largo tempo.

[Como o versene é uma substância de intenso poder que-lante de metais, parece que a reação normal é catalisada por algum cation presente em quantidades mínimas. A eliminação do mesmo pelo versene inibiria o posterior desenvolvimento da côr. Ou ainda, o versene agiria sôbre um dos reagentes adicionados, como por exemplo, o fosfomolibdato.]

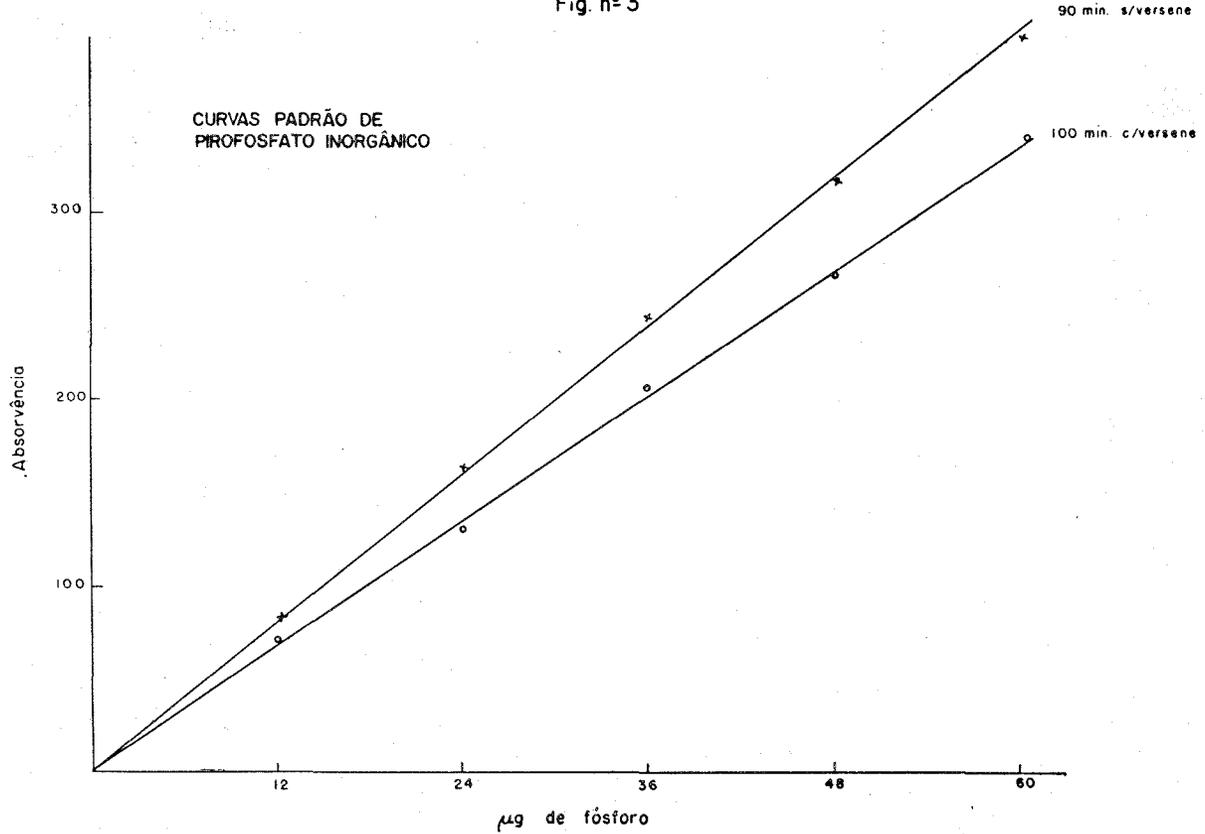
Propomos em face do exposto que na reação de Lipmann, ampliada por Elliott, a leitura final seja feita não antes, mas após 10 minutos da adição de versene. Esta medida evitará erros inerentes ao método antigo. Pensamos que a nossa modificação apresenta utilidade em vista da larga aplicação atual do processo de Lipmann. Cremos mesmo que um apreciável número de resultados incongruentes publicados recentemente se devam ao desconhecimento dêste aspecto. Isto vem reforçar a importância da modificação da técnica original que aqui sugerimos.

Obtiveram-se, por exemplo, os seguintes valores de absorvência para curva padrão com leitura aos 90 minutos sem versene, e leitura aos 100 minutos com versene (Fig. n.º 3):

Quantidade de fósforo pirofosfórico	Absorvência	
	aos 90 minutos sem versene	aos 100 minutos com versene
12 µg P	0,80	0,70
24 µg P	1,60	1,30
36 µg P	2,40	2,05
48 µg P	3,15	2,65
60 µg P	3,90	3,35

Fig. nº 3

CURVAS PADRÃO DE
PIROFOSFATO INORGÂNICO



EFEITO DO OXIGÊNIO SÔBRE A REAÇÃO.

Durante a reação observamos que a formação da côr se iniciava na solução em repouso de maneira não uniforme. Para examinar mais de perto êste aspecto e observar a eventual influência do oxigênio do ar, foi ensaiado o seguinte: Em amostras idênticas de solução de pirofosfato foram executadas respectivamente, as seguintes operações:

- adicionaram-se 0,2 ml de H_2O_2 (20 vol.) em vez de água (ensaio 3);
- lavou-se com Oxigênio gasoso puro, por dez minutos (ensaio 2);
- lavou-se com Nitrogênio gasoso puro, sob camada de vaselina líquida, por dez minutos (ensaio 4), com o seguinte resultado:

Ensaio	Absorvência				
	7 min.	90 min.	Δ 90 min.	100 min.	Δ 100 min. c/versene
1 normal	0,10	2,10	2,00	1,55	1,45
2 c/ O_2	0,05	0,75	0,70	0,60	0,55
3 c/ H_2O_2	0,95	1,70	0,75	1,55	0,60
4 c/ N_2	0,05	1,90	1,85	1,55	1,50

Concluimos daí que o Oxigênio dissolvido na solução, possui um efeito altamente inibitório sôbre a reação (ensaio 2). O mesmo foi confirmado no ensaio 3, no qual o incremento (Δ 100) de absorvência (100 minutos) foi análogo ao do ensaio 2.

Por outro lado, a côr produzida no ensaio 3, aos 7 minutos, poderia eventualmente ser atribuída a uma oxidação de cisteína; o produto formado reduziria o molibdato a óxidos de molibdênio (azul de molibdênio). A lavagem com Nitrogênio (ensaio 4) e cobertura com vaselina, com o objetivo de

expulsar todo o Oxigênio normalmente dissolvido na solução, não modificou sensivelmente o resultado comparado com a dosagem habitual. Isto vem demonstrar que normalmente não se torna imperioso usar precauções especiais quanto à proteção da superfície em contato com o ar.

A experiência acima indica, porém, que a aplicação da reação não pode ser feita de maneira irrestrita.

CLORETO ESTANOSO COMO REDUTOR.

Ainda estudando a técnica mais de perto, tentamos substituir o reagente original de Fiske-Subbarow por cloreto estanoso. Este redutor do ácido fosfomolibdico foi originalmente sugerido por Denigès e constitui reagente no processo de Kuttner-Cohen e outros (247 — 249). Foi também utilizado em técnicas não bioquímicas de dosagem de fosfatos (250).

Neste sentido foi preparada a seguinte solução de cloreto estanoso: 0,2 g de SnCl_2 (Riedel, p.a.) por 100 ml de HCl a 0,5% (v/v).

Adicionaram-se 0,8 ml desta solução, em vez de 0,4 ml do redutor de Fiske-Subbarow e 0,4 ml de água, seguindo-se no restante, a técnica descrita acima. As absorvências obtidas estão relacionadas no **quadro n.º 3**.

Com o ortofosfato a reação é imediata, como demonstra a leitura aos 30 segundos; a côr então varia para se estabilizar temporariamente aos 2 minutos, retornando a um valor estável aos 15 minutos. Neste caso, a absorvência é muito mais acentuada.

Por outro lado, o pirofosfato em pequenas quantidades, produz côr estável em tempo bem menor, comparado com o do método de Fiske-Subbarow, isto é, em 6 a 7 minutos. Mas a formação de azul de molibdênio nestas condições, bem como com quantidades maiores de pirofosfato, é demasiadamente intensa desde o início, não permitindo uma dosagem diferencial do ortofosfato.

Por esta razão foi necessário conservar o redutor da técnica original, embora o cloreto estanoso oferecesse maior sensibilidade de reação.

Q U A D R O N.º 3

Redução com cloreto estanoso			
ORTOFOSFATO		PIROFOSFATO	
N.º	1	2	3
Conteúdo em P	3 µg	3 µg	15 µg
TEMPO (min.) após adição de SnCl ₂	Absorvências		
0,5 min.	6,20	0,10	1,55
1,0	6,40	0,25	2,40
1,5	6,40	0,35	2,95
2,0	6,50	0,45	3,60
2,5	6,50	0,55	3,75
3,0	6,50	0,55	3,90
3,5	6,50	0,55	4,05
4,0	6,50	0,60	4,05
4,5	—	—	4,20
5,0	6,50	0,70	4,30
5,5	—	—	4,35
6,0	—	—	4,40
6,5	—	—	4,40
7,0	—	—	4,45
7,5	—	—	4,45
8,0	—	—	4,50
8,5	—	—	4,55
9,0	—	—	4,55
9,5	—	—	4,55
10,0	5,80	0,70	4,60
15,0	5,70	0,70	4,65
20,0	5,70	—	—
40,0	5,70	0,70	—

EFEITO DA VARIAÇÃO DA SOLUÇÃO DE MOLIBDATO.

Foi igualmente necessário examinar a influência do meio ácido sobre o desenrolar da reação, tendo em vista o material variado a ser examinado. Para isto usaram-se soluções de molibdato em água, em ácido sulfúrico 9 N e ácido sulfúrico 5 N. Os resultados obtidos encontram-se no **quadro n.º 4**.

Do **quadro n.º 4** podemos deduzir que a conservação da acidez é um fator importante na execução da dosagem. Deve-se portanto, sempre partir de filtrado ou centrifugado (3 ml) com concentração de TCA em tórno de 5%.

DETERMINAÇÃO SIMULTANEA DO ORTOFOSFATO E PIROFOSFATO.

Pode observar-se no **quadro n.º 5** que a presença de ortofosfato e de pirofosfato, um ao lado do outro não modifica as respectivas determinações, como em parte já tinha sido observado por Lipmann *et al.* A dosagem de ambos pode ser feita ao mesmo tempo, deduzindo da leitura aos 100 minutos (com versene) a de 7 minutos (do ortofosfato) para obter a absorvência devida exclusivamente ao pirofosfato. (**Fig. n.º 4**).

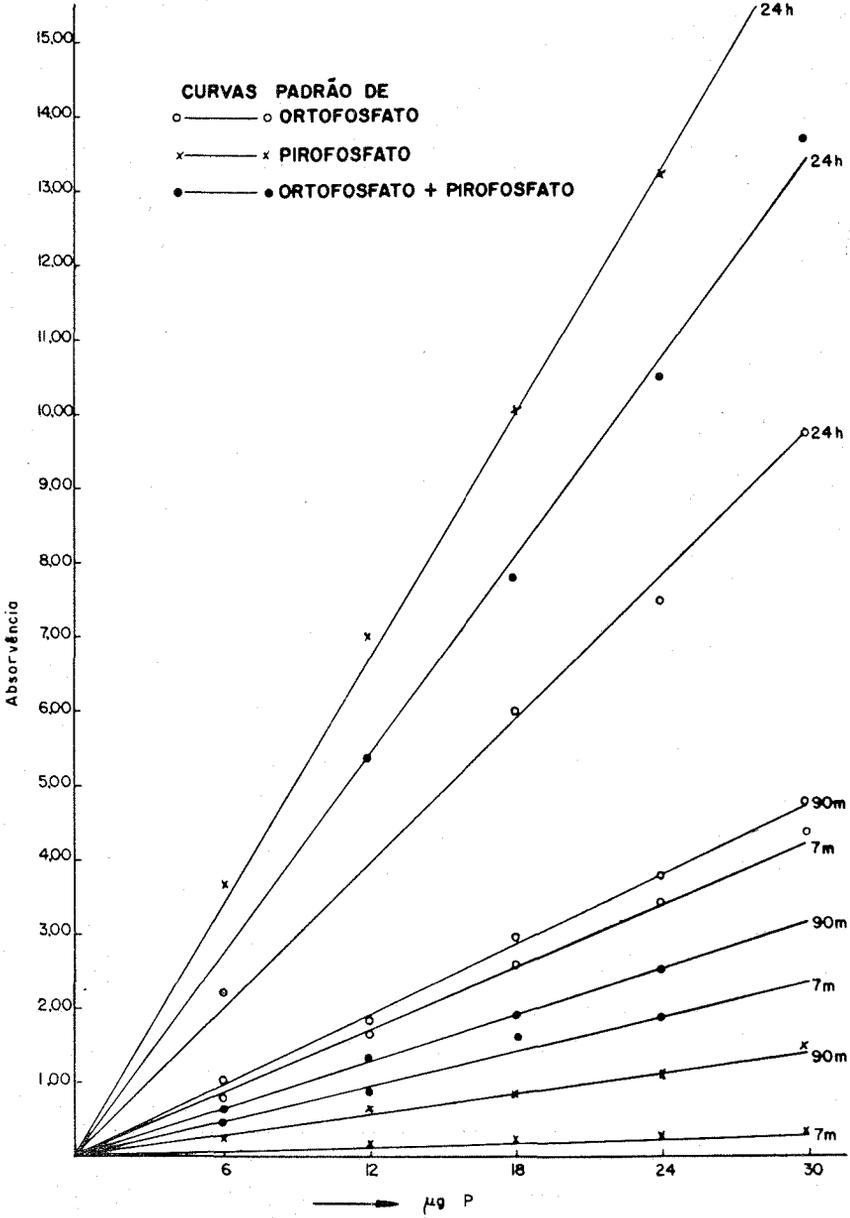
Q U A D R O N.º 4

USO DE SOLUÇÕES DE MOLIBDATO EM AGUA (I), EM ÁCIDO SULFÚRICO 9 N. (II)
E ÁCIDO SULFÚRICO 5 N. (III).

ORTO- FOSFATO	A B S O R V Ê N C I A S						
	I *	II			III		
	7 min.	7 min.	90 min.	24 horas	7 min.	90 min.	24 horas
0 µg P	9,80	—	—	—	—	—	—
6 µg P	8,60	0,70	—	2,40	0,90	0,25	2,45
12 µg P	10,75	1,35	—	3,90	1,65	0,65	4,00
18 µg P	11,00	1,95	—	5,75	2,55	0,80	6,20
24 µg P	10,75	2,70	—	7,70	3,60	1,10	7,70
30 µg P	9,00	3,30	—	9,70	4,35	1,45	10,00
PIRO- FOSFATO							
6 µg P	11,50	0,00	0,00	0,90	0,00	0,25	3,90
12 µg P	12,00	0,00	0,00	1,70	0,15	0,65	7,20
18 µg P	11,00	0,00	0,00	2,65	0,20	0,80	10,30
24 µg P	10,50	0,00	0,00	3,45	0,25	1,10	13,50
30 µg P	11,50	0,00	0,00	4,35	0,30	1,45	17,00

* Nota — Referência: água.

Fig. nº 4



Q U A D R O N.º 5

VARIAÇÃO DA CÔR DO ORTOFOSFATO E DO PIROFOSFATO PELO
METODO DE LIPMANN-ELLIOT. EFEITO DA PRESENÇA DE
ORTOFOSFATO NA DETERMINAÇÃO DE PIROFOSFATO.

TEMPO	A B S O R V Ê N C I A S			
	7 min.	90 min.	$\frac{A_{90} - A_7}{A_7} \times 100$	24 horas
ORTOFOSFATO				
6 µg P	0,90	1,00	11,1 %	2,45
12 µg P	1,65	1,85	10,3 %	4,00
18 µg P	2,55	2,90	13,6 %	6,20
24 µg P	3,60	3,75	12,1 %	7,70
30 µg P	4,35	4,75	9,2 %	10,00
		Média	11,3 %	
PIROFOSFATO				
6 µg	0,00	0,25		3,90
12 µg	0,15	0,65		7,20
18 µg	0,20	0,80		10,30
24 µg	0,25	1,10		13,50
30 µg	0,30	1,45		17,00
ORTOFOSFATO - PIROFOSFATO				
3 µg P + 3 µg P	0,45	0,65		3,75
6 µg P + 6 µg P	0,90	1,30		5,60
9 µg P + 9 µg P	1,35	1,90		8,10
12 µg P + 12 µg P	1,85	2,50		10,75
15 µg P + 15 µg P	2,35	3,20		14,00

Cabe uma pequena observação nesta altura. Lipmann et al. haviam determinado que a côr do ortofosfato evoluiu

até aos 90 minutos em média de 11,9 por cento, sobre o valor dos 7 minutos. Na dosagem da mistura de ortofosfato e pirofosfato era obrigado a somar esta correção ao valor do ortofosfato para então deduzir o resultado da absorvência total.

$$A_{\text{total } 90 \text{ min.}} = A_{\text{P } 7 \text{ min.}} + \Delta A_{\text{P } 90 \text{ min.}} + A_{\text{PP } 90 \text{ min.}}$$

onde:

$$A_{\text{total } 90 \text{ min.}} = \text{Absorvência total aos 90 minutos.}$$

$$A_{\text{P } 7 \text{ min.}} = \text{Absorvência aos 7 minutos devida ao ortofosfato.}$$

$$\Delta A_{\text{P } 90 \text{ min.}} = \text{Incremento da absorvência do ortofosfato até os 90 minutos.}$$

$$A_{\text{PP } 90 \text{ min.}} = \text{Absorvência aos 90 minutos devida ao pirofosfato.}$$

Nossas correções calculadas à base do quadro n.º 5 foram, em média de 11,3%, confirmando o acima achado. Porém, a adição de versene, nos termos que aqui propomos (1 ml para 8 ml de solução em reação) simplifica a técnica, pois a diluição importa no decréscimo de 12,5% da absorvência, compensando a variação de côr do ortofosfato. Desta forma, basta diminuir da leitura de 100 minutos com versene a de 7 minutos para obter o valor correspondente ao pirofosfato, a ser determinado por curva padrão obtida da mesma forma.

$$A_{\text{total } 100 \text{ min.}} = A_{\text{P } 7 \text{ min.}} + A_{\text{PP } 100 \text{ min.}}$$

onde:

$$A_{\text{total } 100 \text{ min.}} = \text{Absorvência total a 100 minutos após adição de versene.}$$

$$A_{\text{PP } 100 \text{ min.}} = \text{Absorvência do pirofosfato a 100 minutos após adição de versene.}$$

Deve chamar-se atenção para outro fato não assinalado convenientemente em publicações anteriores. Em concentrações mais elevadas de pirofosfato já aos 7 minutos, há certa coloração inicial, que pode ser apreciável em face dos valores de ortofosfato. Neste caso se pode trabalhar com diluições maiores. Melhor, porém, é determinar primeiramente a concentração de pirofosfato. Pela curva padrão do mesmo poder-se-á calcular a correção a ser aplicada à dosagem de ortofosfato, ou seja, à leitura dos 7 minutos.

O gráfico n.º 4 obtido à base do quadro n.º 5 mostra que a vários tempos, a reação com o ortofosfato e o pirofosfato isolados, bem como misturados, obedecem à Lei de Lambert e Beer. Também a adição de versene não modifica este comportamento.

3. DOSAGEM DE ATIVIDADE PIROFOSFATÁSICA ALCALINA, NEUTRA E ÁCIDA NO SÔRO

Desenvolvemos e estudamos diversos esquemas de incubação e determinação de atividade pirofosfatásica, selecionando entre êles o que julgamos o mais conveniente e exato. Em face desta experiência propomos o seguinte método de dosagem:

— Misturar:

- 1 ml de solução de pirofosfato 0,004 M;
- 0,2 ml de cloreto de magnésio 0,1 M;
- 1,5 ml de tampão veronal-acetato;
- 1,3 ml de água.

- Deixar por alguns minutos em banho de temperatura constante a 37°C até obter equilíbrio térmico.
- Adicionar 0,2 ml de sôro. Misturar bem.
- Deixar incubando por 60 minutos.
- Precipitar com 3,8 ml de TCA 10%.
- Centrifugar por 10 minutos a 2.000 r.p.m.

- Pipetar 3 ml do sobrenadante e sôbre êstes aplicar a técnica descrita para a dosagem de orto e pirofosfato.

REAGENTES:

Solução de pirofosfato 0,004 M.

- Dissolver 1,7844 g de pirofosfato de sódio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) (Analar BDH) até 1 litro com água destilada.

Solução de cloreto de magnésio 0,1 M

- 5,082 g de cloreto de magnésio ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) (Riedel p.a.) dissolvidas até 250 ml com água destilada.

Solução tampão veronal-acetato (251)

- 8,28 g de veronal sódico (di-etil-barbiturato de sódio) (Chemo-Pure),
- 5,42 g de acetato de sódio (CH_3COONa) (Riedel p.a.),
- 4,78 g de cloreto de sódio (Riedel p.a.),
- Diluídos até, aproximadamente, 1.400 ml com água destilada.
- Ajustar o pH, pelo potenciômetro Beckman, modelo G, com soluções de NaOH 2 N e HCl 2 N.
As soluções empregadas tiveram
pH = 8,6 para a atividade em meio alcalino.
pH = 7,4 para a atividade em meio neutro.
pH = 3,6 para a atividade em meio ácido.
- Completou-se o volume final até 1.500 ml, com água destilada.

A determinação de atividade pirofosfatásica foi sempre acompanhada de um ensaio análogo, para os diversos pH, po-

rém sem sôro. Verificamos, todavia, que não se tornam necessários testes de comparação nos 3 pH diferentes, simultaneamente, pois o resultado é semelhante nos 3 casos. Ou seja, a hidrólise que se poderia supor que se realizasse durante a incubação em pH ácido não é significativa, durante êste curto período.

Contudo, a solução de pirofosfato e as de tampões não podem ser conservadas em mistura a não ser por ocasião da dosagem, em vista da hidrólise espontânea, após tempo mais prolongado.

O ortofosfato contido no sôro exige uma pequena correção sôbre o resultado da leitura aos 7 minutos. Cada mg de fósforo por 100 ml de sôro contribui com um erro de leitura a mais, de aproximadamente 0,1 unidade de absorvência.

A escolha da mistura tampão foi determinada pela cobertura ampla de pH que a veronal-acetato proporciona, e assim permitir condições semelhantes nos três tipos de ensaios. Outras espécies de tampões não foram consideradas, ou por possuírem menor amplitude de pH, ou por serem de difícil aquisição.

A leitura da absorvência é feita aos 7 minutos e aos 100 minutos, após a adição de versene. A primeira medida permite estabelecer a liberação de ortofosfato e a segunda oferece um contrôle da dosagem.

Assinalamos que no meio de incubação preferimos uma concentração não exageradamente elevada de pirofosfato. Isto foi motivado pela observação de que grandes quantidades do mesmo já produzem certa coloração aos sete minutos, interferindo desta forma na dosagem de ortofosfato liberado durante a incubação (Vide **quadro n.º 4**). Alimentamos séria dúvida quanto àquêles resultados de trabalhos publicados nos quais alta concentração de pirofosfato tem sido usada.

Unidade de atividade pirofosfatásica.

Propomos ainda a definição de uma unidade de medida de atividade pirofosfatásica do sôro, apropriada ao método:

“Uma unidade de atividade pirofosfatásica do sôro cor-

responde a um micro-mol de pirofosfato decomposto por 100 ml de sôro, em 60 minutos, a 37°C, nas condições descritas”.

Esta conceituação afasta-se da oferecida em “Methods in Enzymology” (252). E’ evidente porém, ser mais adequado, por razões estequiométricas e de comparação metabólica, expressar a atividade enzimática em frações molares por quantidades de proteína, ou, como no caso, por unidade de volume.

Em parte é lamentável que o mesmo não mais se possa fazer para as atividades fosfatásicas alcalina e ácida, já tão arraigadas. De qualquer forma, pensamos que à medida que novas técnicas enzimáticas forem introduzidas em análises clínicas, a expressão molar deverá ser preferida pelos autores, e ser cultivada por aqueles que a usam.

4. EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.

Foram realizadas dosagens de atividade pirofosfatásica do sôro em coelhos nos quais havia sido provocada esteatose hepática. As experiências foram acompanhadas de exame histopatológico do fígado.

Os animais eram machos, brancos, alimentados com dieta comum, porém padronizada e completa.

A colheita de material foi realizada antes e no transcorrer da experiência. A sistematização da mesma foi a seguinte:

1 — Colocamos, de início, os animais em decúbito dorsal sobre mesa cirúrgica apropriada e realizamos a depilação manual do hipocôndrio direito. Em prosseguimento, anestesiámos os planos da parede com novocaína a 1% e abordamos a cavidade abdominal através de incisão para-retal direita, de 3 cm aproximadamente, a qual se estendeu paralelamente ao músculo reto, a partir do rebordo costal.

Em seguida, identificamos o lóbulo hepático anterior direito, com o qual se relaciona a vesícula biliar (253), (com vista à uniformidade do material) e retiramos um fragmento do mesmo, medindo aproximadamente 1 x 1,5 x 0,5 cm. Concluída a retirada do fragmento hepático, reconstituímos

a parede com catgut (0) em pontos separados e na pele com linho.

Dividimos o fragmento retirado em duas partes: uma imergida em álcool absoluto e outra em formol (diluído 10 vezes em água), para o estudo histopatológico.

2 — Procedemos, em continuação, à colheita de sangue feita por punção cardíaca. Para isto, o animal foi deitado em decúbito lateral direito, puncionamos o coração ao nível do quinto espaço intercostal, a meio centímetro para fora do rebordo do externo. Em tôdas as punções usamos agulha de 8 x 70 e retiramos, em média, 10 ml de sangue por animal.

(Tentamos inicialmente obter sangue através de punção da veia do pavilhão auricular, mas a colheita foi irregular e freqüentemente difícil de ser executada).

3 — Concluídas as duas operações acima, injetamos, por via intraperitoneal, 10 ml de vaselina líquida nos animais testemunhas, e nos de prova, 8 ml de tetracloreto de carbono (Riedel, p. a.) diluídos com 2 ml de vaselina.

4 — Decorridas 48 horas, realizamos nova colheita de sangue, sacrificamos os animais com alta dose de nembutal intravenoso, retiramos o fígado (examinando-o macroscopicamente) e fixamos, para exame histopatológico, fragmentos em álcool absoluto e em formol (diluído 10 vezes em água).

No presente capítulo foram expostas as razões que nos levaram a propor modificações as quais reputamos de importância, na técnica de dosagem de ortofosfatos (Fiske-Subbarow) e de pirofosfatos (Lipmann-Elliott). Igualmente estabelecemos métodos de determinação da atividade pirofosfática do sôro e definimos uma unidade de medida correspondente.

No capítulo que segue, serão descritos alguns resultados exploratórios da aplicação destas técnicas a casos normais e patológicos, bem como será exposto no mesmo sentido, experimentação executada em animais.

1. The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records of all transactions. This is essential for ensuring the integrity of the financial statements and for providing a clear audit trail. The records should be kept up-to-date and should be easily accessible to all relevant parties.

2. The second part of the document outlines the various methods used to collect and analyze data. These methods include interviews, surveys, and focus groups. Each method has its own strengths and weaknesses, and it is important to choose the most appropriate method for the specific research objectives.

3. The third part of the document describes the process of data analysis. This involves identifying patterns and trends in the data, and then interpreting these findings in the context of the research objectives. It is important to be objective and unbiased in this process, and to avoid drawing conclusions that are not supported by the data.

4. The final part of the document discusses the importance of reporting the results of the research. This involves writing a clear and concise report that summarizes the findings and provides recommendations for future action. The report should be written in a way that is easy to understand and that is accessible to all relevant parties.

CAPÍTULO III

APLICAÇÕES

Uma vez estruturada a técnica de determinação da atividade pirofosfatásica, executamos dosagens em indivíduos considerados hígidos, afim de poder indicar limites de variabilidade normal. Em seguida examinamos casos patológicos, que envolviam, preferencialmente, o fígado. Tratando-se de um órgão de intensa atividade metabólica, poder-se-ia esperar que suas alterações mórbidas se refletiriam de maneira mais acentuada no valor da atividade pirofosfatásica do sôro.

1. ATIVIDADE PIROFOSFATÁSICA EM COELHOS NORMAIS E COM ESTEATOSE EXPERIMENTAL

Como ensaio preliminar, porém, realizamos uma verificação da atividade pirofosfatásica em coelhos. Êstes foram divididos em dois grupos de oito animais cada, dos quais o primeiro, **A**, era tomado como grupo de contrôle (injetados intraperitonealmente com dez ml de vaselina líquida) e o segundo, **B**, constituía o grupo experimental (injetados intraperitonealmente com oito ml de tetracloreto de carbono em dois ml de vaselina líquida). Conforme descrito no capítulo anterior, foi realizado exame histopatológico (Hematoxilina-Eosina e Sudão III), em amostras de fígado, obtidas antes daquelas injeções, e ao ser recolhida a amostra de sangue após 48 horas de ação do tetracloreto de carbono.

O contrôle histopatológico considerou os animais submetidos à experiência, normais ou praticamente normais. O resultado com Sudão III foi sempre negativo, com exceção do coelho n.º dez, (no qual apenas “três hepatócitos acusavam gotículas alaranjadas no citoplasma”) e do coelho n.º quatro (com “esteatose discretíssima de hepatócitos”).

O exame histopatológico da amostra de fígado colhido no fim da experiência acusava em todos os casos do grupo experimental B, necrose com esteatose, centro ou perilobular, indicada na maior parte dos casos já por exame macroscópico. Nesta altura os animais do grupo A não apresentavam alterações dignas de nota.

Três animais, um do grupo A e dois do grupo B, não resistiram à intervenção e sucumbiram no mesmo dia do início da experiência.

Logo antes da administração do tetracloreto de carbono, e após 48 horas, foi recolhido sangue, no qual dosamos a atividade pirofosfatásica ácida, neutra e alcalina. Os resultados obtidos se encontram relacionados no **quadro n.º 6**.

Resumindo, foram encontrados os seguintes valores médios no **grupo A**, no início da experiência:

atividade pirofosfatásica	ácida ...	139,0 ± 8,26	unidades
"	"	neutra ..	87,5 ± 10,44 "
"	"	alcalina ..	84,7 ± 9,33 " ;

e no fim da experiência:

atividade pirofosfatásica	ácida ...	199,0 ± 8,26	unidades
"	"	neutra ..	132,4 ± 8,23 "
"	"	alcalina .	120,0 ± 11,68 " .

No **grupo B**, os valores médios foram, no início da experiência:

atividade pirofosfatásica	ácida	142,1 ± 13,46	unidades
"	"	neutra ..	88,8 ± 7,29 "
"	"	alcalina .	95,5 ± 8,42 " ;

e no fim da experiência:

atividade pirofosfatásica	ácida	262,1 ± 17,51	unidades
"	"	neutra ..	134,5 ± 8,99 "
"	"	alcalina .	134,5 ± 10,99 " .

Da comparação numérica dos resultados, apesar do número reduzido de animais, podemos sugerir as seguintes observações:

- a) Nos animais normais (coelhos), a atividade pirofosfatásica ácida é superior à neutra e à básica, as últi-

QUADRO N.º 6 — ATIVIDADE PIROFOSFATÁSICA EM COELHOS NORMAIS E COM ESTEATOSE HEPÁTICA

COELHO	PESO (g)	TRATAMENTO	P _i mg /100 ml	UNIDADES DE ATIVIDADE PIROFOSFATÁSICA			P _i mg /100 ml	UNIDADES DE ATIVIDADE PIROFOSFATÁSICA			Diferença e erro padrão da diferença (Fim e início da experiência)
				ÁCIDA	NEUTRA	ALCALINA		ÁCIDA	NEUTRA	ALCALINA	
GRUPO A											
1	2.290	10 ml Vasel.	3,60	147	87	87	4,20	213	133	120	Pi = -0,03 ± 0,20 Ácida = 60,0 ± 4,42 Neutra = 44,9 ± 5,03 Alcalina = 35,3 ± 5,65
2	1.900	"	4,00	133	73	80	4,00	200	140	107	
3	2.300	"	3,00	153	80	73	3,40	207	127	113	
4	2.250	"	3,40	133	93	100	2,80	193	127	133	
5	2.540	"	4,00	140	80	93	3,50	193	133	120	
6	2.170	"	3,90	127	93	73	3,70	200	120	107	
7	2.000	"	3,50	140	107	87	3,40	187	143	140	
Média	2.207		3,63 ± 0,341	139,0 ± 8,26	87,5 ± 10,44	84,7 ± 9,33	3,57 ± 0,423	199,0 ± 8,26	132,4 ± 8,23	120,0 ± 11,68	
GRUPO B											
8	2.200	8 ml CCl ₄ + 2 " Vasel.	3,20	160	93	107	4,30	280	140	153	Pi = 0,50 ± 0,24 Ácida = 120,0 ± 8,94 Neutra = 46,0 ± 4,73 Alcalina = 39,2 ± 5,65
9	2.150	"	3,50	133	100	100	4,00	260	147	140	
10	1.950	"	3,20	120	80	93	3,80	273	120	127	
11	2.630	"	4,00	147	93	100	4,00	280	127	140	
12	2.680	"	4,20	140	80	93	4,30	233	133	120	
13	2.480	"	3,20	153	87	80	3,90	247	140	127	
Média	2.348		3,55 ± 0,407	141,1 ± 13,16	88,8 ± 7,29	95,3 ± 8,42	4,05 ± 0,43	262,1 ± 17,51	134,5 ± 8,99	134,5 ± 10,99	
Diferença e erro padrão da diferença. (Comparação do grupo B ao A no fim da experiência)							0,48 ± 0,24	63,1 ± 7,99	0,21 ± 4,81	14,5 ± 6,30	

mas sendo praticamente iguais entre si.

- b) A administração de vaselina, somente, já parece causar o aumento das três atividades medidas, de maneira aproximadamente proporcional em cada caso. Isto vem ilustrar dados paralelos de Frunder *et al.* (254) que observaram em fígado de camundongos, após administração intraperitoneal de óleo vegetal, o seguinte: um deslocamento do quociente $\text{DPN}_{\text{ox}} / \text{DPN}_{\text{red}}$ de 3 : 1 para 5-6 : 1, permanecendo a soma de ambos constantes; um aumento de Fósforo ácido-solúvel em 20 a 30%; duplicação da concentração do ácido láctico; aumento da concentração do ATP por quase 60%, permanecendo constantes as concentrações do AMP e ADP.

Esta verificação nos dita prudência na interpretação dos resultados experimentais.

- c) Naqueles casos, nos quais foi produzida esteatose experimental, a atividade pirofosfatásica ácida aumentou significativamente em relação à do grupo A, de controle. Também houve aumento das médias de atividades neutra e alcalina durante a experiência, a qual, porém, não poderá ser atribuída exclusivamente ao tetracloreto.

Concluimos portanto, que a administração do tetracloreto de carbono em coelhos, e a esteatose hepática dela resultante, podem causar um incremento acentuado de atividade pirofosfatásica ácida do sôro.

Evidentemente, este estudo poderia ser estendido em vários sentidos, abordando tópicos interessantes. Assim, pretendemos executar experiências análogas em coelhos nos quais se provocará a instalação de neoplasia hepática experimental através de azocompostos e sensibilização com irradiação de Raio-X e cortisona. Também se impõe uma investigação sistemática da distribuição e caracterização de atividades pirofosfatásicas nos diversos tecidos animais e a sua localização nas subfrações celulares, particularmente no caso do fígado.

E como corolário, deverá ser interessante verificar a variação de atividade pirofosfatásica neste órgão, em condições de esteatose e de neoplasia experimentais. Por último, a separação das pirofosfatases hepáticas em si deverá ser tentada, coisa que ainda não foi feita com suficiente empenho. Poder-se-ia acrescentar que, em regra, as pirofosfatases são enzimas relativamente estáveis, prometendo portanto serem passíveis de concentração e purificação química.

A execução destas diversas linhas de trabalho, certamente de interêsse justificado em face da crescente importância do metabolismo do pirofosfato em Bioquímica, é limitado unicamente pelas deficientes condições materiais de trabalho com que contamos atualmente. Tão logo esta falha seja sanada, os assuntos acima focados deverão ser encetados.

2. ATIVIDADE PIROFOSFATÁSICA EM SÔRO HUMANO NORMAL

Examinamos 24 soros de indivíduos adultos, afim de poder avaliar aproximadamente o nível dos três tipos de atividade pirofosfatásica e as suas margens prováveis de variação. Não vai nisso a intenção de estabelecer taxas normais correspondentes, uma vez que para tal um grande número de fatores acessórios deveriam ser considerados, tais como idade, sexo, raça, hábitos de alimentação etc. E' evidente também, que, embora obtendo resultados estatisticamente aceitáveis, um número muito mais representativo deverá ser examinado, sob pena de aceitarmos erros inerentes à experiência, não assinalados pelo cálculo estatístico.

Tínhamos em mente obter resultados em indivíduos os quais poderiam ser considerados laboratorialmente normais sob ponto de vista hepático. Para tal foram realizadas as provas funcionais mencionadas no quadro n.º 7, eliminando-se todos os casos que não se apresentassem dentro dos limites normais aceitos, bem como aquêles em cuja anamnese era indicada qualquer afecção hepática recente ou remota. Infelizmente não nos foi possível realizar, por falta de material suficiente, a prova de bromosulfaleína, aliás empregada só espo-

QUADRO N.º 7 — DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES PIROFOSFATÁSICAS EM INDIVÍDUOS CONSIDERADOS NORMAIS

NOME	IDADE anos	PESO kg	SEXO	ALTURA cm	T I M O L		HANGER	KUNKEL	P. G. G.	BILIRUBINAS — mg por 100 ml.				PROTEÍNAS		Fosfatase alcalina	Unidades de Atividade Pirofosfatásica			
					Turva- ção	Flocu- lação				Direta Imediata	Direta Total	Indireta	Total	Totais — Album.	Ácida		Neutra	Alcalina		
D. C.	26	48	F	156	0,8 U	N	N	5,0 U	10,55 U	0	0,18	0,36	0,54	7,25—4,20	2,2U.B.	133	120	120		
C. P. L.	23	49	F	145	0,8	N	N	1,4	11,62	0	0,12	0,24	0,36	7,15—4,50	1,9	120	107	113		
A. O.	22	54	F	156	2,4	N	N	2,6	6,74	0	0,18	0,54	0,72	6,90—3,90	2,9	120	120	107		
Z. S.	18	49	F	150	4,8	P(+)	N	5,4	7,50	0	0,12	0,42	0,54	6,80—4,10	3,0	140	127	120		
A.M.M.R.	44	63	F	165	0,4	N	N	5,6	10,24	0	0,12	0,42	0,54	7,50—4,50	2,5	127	113	120		
I. N.	42	59	F	160	3,3	N	N	9,5	9,33	0	0,12	0,24	0,36	6,90—3,90	3,2	147	133	127		
T. D.	31	75	M	169	0,8	N	N	2,6	10,85	0,06	0,48	0,42	0,90	7,10—4,05	1,7	133	140	133		
C. S.	24	75	M	184	1,8	N	P(+)	4,8	9,33	0,12	0,24	0,60	0,84	6,60—3,95	3,9	147	127	120		
E. S.	24	54	M	162	0,8	N	N	4,5	13,75	0,06	0,24	0,54	0,78	6,95—4,15	2,8	120	107	100		
G. E.	24	70	M	175	0,6	N	N	2,4	11,09	0,06	0,24	0,30	0,54	7,60—4,65	3,7	133	120	120		
O. B.	24	69	M	174	3,5	N	N	6,0	7,20	0	0,12	0,66	0,78	7,20—4,40	4,0	127	107	113		
H. I. O. S.	23	75	M	190	1,6	N	P(+)	5,6	8,57	0	0,24	1,32	1,56	6,75—3,90	2,1	153	133	120		
Eg. H.	18	62	M	178	4,1	P(+)	P(+)	13,5	12,07	0	0,06	0,72	0,78	7,35—4,30	2,5	140	140	127		
E. S.	20	68	M	172	2,3	N	P(+)	9,1	10,24	0,06	0,30	1,08	1,38	7,15—4,30	1,9	133	127	113		
En. H.	23	60	M	158	2,1	N	N	5,6	6,74	0	0,06	0,66	0,72	6,90—3,90	2,9	147	133	127		
H. W. P.	25	72	M	187	2,8	N	P(+)	10,1	12,07	0,06	0,36	1,32	1,68	6,50—4,00	3,3	120	127	113		
H. E.	17	64	M	178	2,9	N	N	7,4	10,24	0	0,12	0,84	0,96	7,05—4,30	2,7	133	120	107		
P. U.	21	68	M	170	1,6	N	N	2,8	11,09	0	0,12	0,42	0,54	6,70—4,00	3,4	127	113	120		
H. B.	19	65	M	179	0,5	N	N	5,4	8,57	0	0,06	0,36	0,42	6,85—4,10	1,8	127	120	107		
C. L. E.	22	58	M	174	1,1	N	N	4,5	7,20	0,06	0,24	0,54	0,78	7,25—4,00	3,8	147	127	120		
S. D.	19	69	M	175	2,6	N	P(+)	9,1	9,33	0	0,06	0,66	0,72	7,10—4,50	3,0	140	133	127		
V. C.	24	85	M	181	0,5	N	N	2,6	7,50	0,12	0,24	0,36	0,60	6,85—4,40	2,4	127	120	120		
H. D.	22	61	M	172	0,8	N	N	6,0	10,85	0	0,12	0,54	0,66	7,10—4,50	2,9	120	133	120		
E. R. H.	20	65	M	177	2,1	N	N	10,4	12,33	0	0,24	0,66	0,90	6,70—4,00	3,1	147	133	127		
															Média e desvio padrão:			133,6 ± 10,29	124,1 ± 9,68	118,3 ± 7,78

ràdicamente nos serviços clínicos da Faculdade de Medicina de Pôrto Alegre.

Com exceção de duas pessoas, dedicadas a atividades domésticas, os componentes do grupo examinado eram todos estudantes, submetidos anteriormente a freqüentes contrôles médicos. Fisicamente apresentavam-se sadios e a sua alimentação foi considerada normal e completa.

Como pode ser observado no **quadro n.º 7**, as médias apuradas consistiam para a

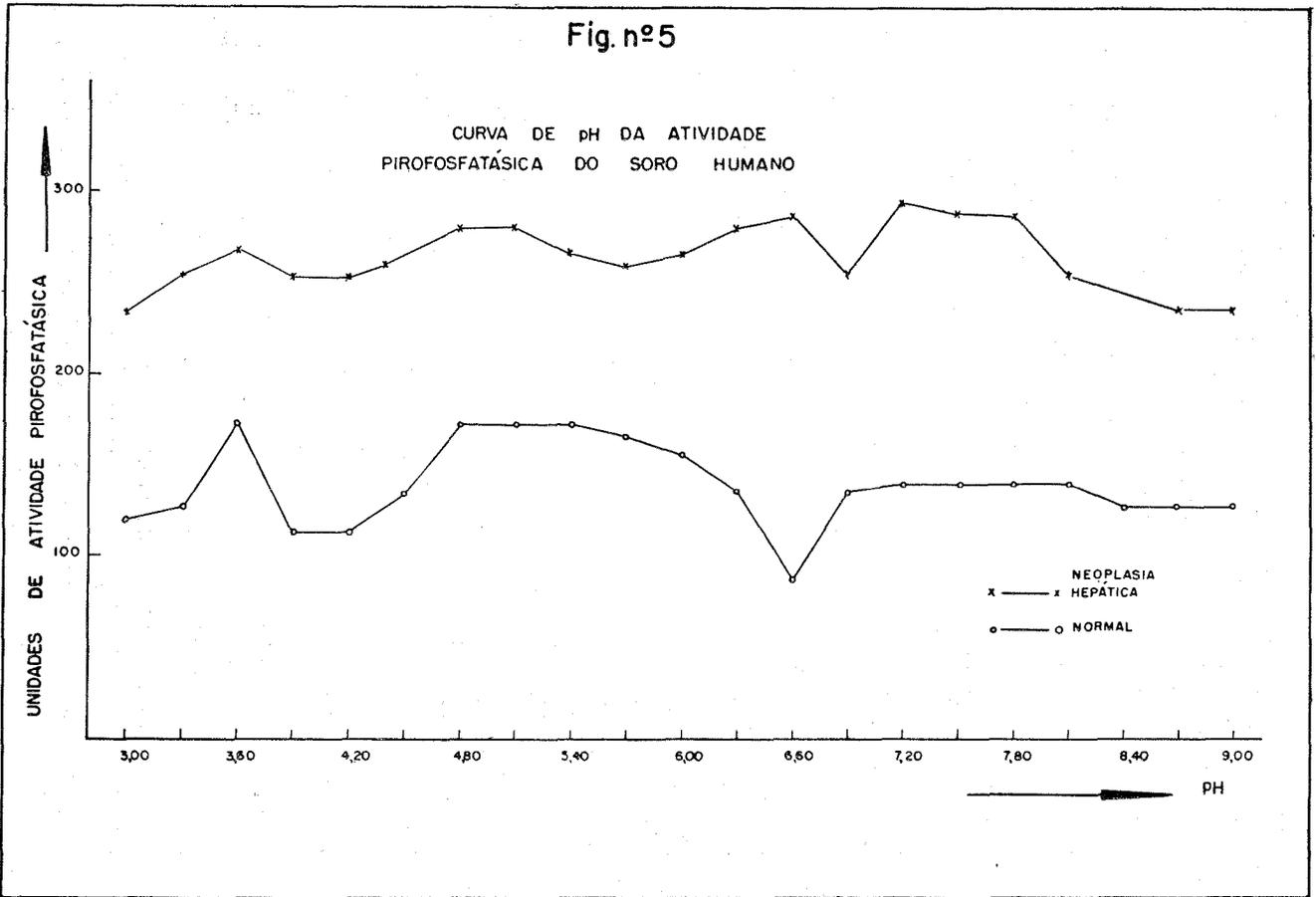
atividade pirofosfatásica ácida	133,6 ± 10,29	unidades
” ” neutra . .	124,1 ± 9,68	”
” ” alcalina .	118,3 ± 7,78	”

Curva de pH.

Com objetivo exploratório, examinamos várias das características do sôro. Inicialmente determinamos a curva de pH das atividades pirofosfatásicas, desde pH 3,00 até pH 9,00, com intervalos de três décimos de unidade. (As soluções-tampão usadas foram as de veronal-acetato, mencionadas no capítulo “Métodos”, ajustados com potenciômetro Beckmann, modelo G).

O **quadro n.º 8** demonstra os resultados obtidos, ilustrados pela **figura n.º 5**. Pode ser observado que existe atividade pirofosfatásica permanente entre o extenso limite de pH estudado. Surgiram três zonas de atividades incrementadas, a saber: do pH 3,40 até 3,90, do pH 4,50 até 6,30 e do pH 6,90 até 8,60. Em nenhum ponto, porém, a atividade se anula; somente atinge um valor mínimo no pH 6,60.

Fig. nº5



QUADRO N.º 8

VARIAÇÃO DA ATIVIDADE PIROFOSFATÁSICA COM O pH.

pH	Unidades de atividade pirofosfatásica	
	Soro normal	Soro de neoplasia hepática
	120	
3,00	127	233
3,30	173	253
3,60	113	267
3,90	113	253
4,20	113	253
4,50	173	260
4,80	173	280
5,10	173	280
5,40	167	267
5,70	157	260
6,00	137	267
6,30	0,87	280
6,60	1,37	287
6,90	1,40	253
7,20	1,40	293
7,50	1,40	287
7,80	1,40	287
8,10	1,27	253
8,40	1,27	253
8,70	1,27	233
9,00	1,27	227

Tudo indica que existem no plasma várias entidades enzimáticas pirofosfatásicas, diferenciadas por zonas distintas de pH ótimo, e responsáveis pela topografia irregular da curva de pH. A curva geral parece ser resultante de três atividades individuais, parcialmente sobrepostas, e por esta razão a atividade do soro em nenhum ponto alcança a zero. Os vales da curva,

neste caso, não seriam absolutamente fixados, mas antes, determinados pelas concentrações relativas das diversas entidades enzimáticas. Ainda esta suposição nos leva a admitir que, em casos patológicos, não só os valores de atividade pirofosfáticas a certos pH convencionais estejam alterados, mas que a própria curva de pH seja modificada substancialmente, ocorrendo particularmente um deslocamento dos pontos de atividade mínima.

A pirofosfátase circulante no soro é provavelmente originada pelo lançamento constante, na corrente circulatória, de citoplasma proveniente do desgaste orgânico geral. Isto explicaria a sua heterogeneidade.

Ativação e Inibição.

Examinamos o efeito de várias substâncias, cujos ions possuem caracterizada atividade biológica geral, sobre a atividade pirofosfática do soro. Para êste fim foram preparadas soluções 0,1 M de cloreto de cálcio, cianeto de potássio, cloreto manganoso, sulfato ferroso, cloreto cobaltoso, e de 0,3 M de fluoreto de sódio. Além disto, metanal foi diluído até 3,5 g por 100 ml de solução. Todos os reagentes eram de marca Riedel, p.a.

Em vez de 0,2 ml de cloreto de magnésio 0,1 M da técnica original, foram adicionados ao meio de incubação 0,2 ml de cada uma das soluções acima, ou 0,2 ml de água, em condições de meio neutro. Os resultados obtidos foram os seguintes:

Ensaio	Solução adicionada (0,2 ml)	Unidades de atividade
1	—	140
2	MgCl ₂ 0,1 M	133
3	CaCl ₂ 0-1 M	133
4	NaF 0,3 M	140
5	KCN 0,1 M	140
6	MnCl ₂ 0-1 M	120
7	FeSO ₄ 0,1 M	93
8	CoCl ₂ 0,1 M	100
9	CH ₂ O 3,5%	127

Como pode ser visto, os ions Magnésio, Fluoreto, Cálcio e Cianeto não apresentaram nenhum efeito de ativação ou de inibição sôbre a atividade pirofosfatásica, perceptível nas condições empregadas. Verificou-se uma inibição parcial com o ion manganoso, e mais acentuada com o ion ferroso e cobalto-so. Quanto ao aldeído fórmico, deve ser acrescentado que o mesmo suprimiu em parte, a côr do pirofosfato padrão usado paralelamente, indicando que o resultado apresentado foi talvez ocasionado por um artefato de reação.

Swanson verificou que, na pirofosfatase neutra do fígado (rato), o ion Cálcio possui um efeito de inibição, competitivo com o de ativação do Magnésio (173). Ou a atividade que examinamos não é afetada pelo ion Cálcio, ou a quantidade de Magnésio presente normalmente no sôro é demasiadamente alta para ser atingida sensivelmente pelo Cálcio adicionado.

Este assunto poderia ser estudado com mais minúcias adicionando versene ao meio de incubação. O agente quelante fixaria os metais em questão e nestas condições possibilitaria o exame da ação isolada de cada ion, adicionado em excesso estequiométrico, sem interferência dos demais. Tal porém, não foi realizado porque o versene interfere na dosagem final de ortofosfatos e pirofosfatos, como foi visto no capítulo anterior.

Examinamos ainda mais de perto a ação dos ions Magnésio e Fluoreto, conforme demonstra o seguinte quadro:

Ensaio	MgCl ₂ 0,1 M adicionado (ml)	Unidades de atividade
1	—	133
2	0,2	127
3	0,4	127
4	0,8	133
5	1,6	133
	NaF 0,1 M adicionado (ml)	
6	0,2	127
7	0,8	127
8	1,6	113

Usando material heterogêneo (sôro), aquêle ion não exhibia em concentrações elevadas efeito inibitório muito acentuado. Vale a pena chamar a atenção a esta altura para a observação de Swanson (173) que verificou, em sua preparação enzimática, um efeito máximo de ativação à concentração de 10^{-3} M, e inibição marcante a concentração acima de 10^{-2} M.

Por outro lado, a pirofosfátase que Elliott estudou em sistema de ativação do ácido cólico (246), tinha sua ação anulada pelo ion Magnésio. Tal fato interessante é singular entre as várias pirofosfátases conhecidas.

Em face da relativa inércia do ion Magnésio em relação à atividade de pirofosfatásica, poder-se-ia opinar, à primeira vista, que seria desnecessária a adição de cloreto de magnésio ao meio de incubação. Em casos patológicos, porém, não é previsível se as pirofosfátases anormais lançadas à corrente sanguínea são ou não sensíveis ao ion Magnésio. Por êste motivo recomendamos a inclusão de cloreto de magnésio no sistema de incubação, como medida preventiva.

Quanto ao ion Fluoreto, os resultados sugerem uma diminuição discreta da atividade pirofosfatásica, elevando-se a concentração daquêle ion.

Um estudo mais extenso e exato dêste assunto sòmente é exequível com um preparado enzimático concentrado, livre de fatores interferentes acessórios. A purificação e caracterização das diversas pirofosfátases do soro sanguíneo permitiria elucidar não sòmente os tipos de cofatores e a sua intensidade de ação, bem como poderia eventualmente correlacionar variações anormais no soro em face de determinadas entidades patológicas.

Não podemos deixar de acrescentar mais um resultado, que, embora negativo, não deixa de ter significação. Ao dosar ortofosfato, tanto nos sôros de coelho como de seres humanos normais e patológicos, procuramos determinar ao mesmo tempo, o pirofosfato inorgânico. Em nenhum dos casos houve indicação da existência dêste último no sôro. Quanto é de nosso conhecimento, até a presente data, ainda

não fôra tentada a verificação dêste aspecto, que por essa razão é aqui registrada.

3. ATIVIDADE PIROFOSFATÁSICA EM SÔRO HUMANO DE ALGUNS CASOS PATOLÓGICOS

Extendendo a aplicação do método de dosagem estudado no capítulo anterior, procuramos coletar resultados obtidos em sôros patológicos. Fixamo-nos em casos de afecções hepáticas, partindo da suposição que, sendo o fígado um órgão dos mais ativos metabolicamente, alterações funcionais patológicas no mesmo se refletiriam de maneira mais acentuada nos espelhos sangüíneos. Estávamos particularmente interessados em pacientes que apresentassem neoplasia hepática, independentemente da origem da mesma, à base de considerações metabólicas expostas no Capítulo I.

Não seria improvável, que exatamente em tecidos com proliferação ampla, a atividade pirofosfatásica fôsse incrementada de muito, com repercussão significativa em sua taxa sangüínea correspondente.

Não temos intenção de aqui estabelecer cifras que possam orientar um eventual diagnóstico clínico e transformarem a nossa técnica de dosagem num método de análise de rotina. Como já foi assinalado mais acima, propósito desta natureza somente poderá ser satisfeito à base de um plano de trabalho bem mais amplo. Neste caso, um grande número de quadros clínicos deverão ser aferidos pela técnica, afim de autorizar uma valorização da mesma para diagnóstico diferencial. Isto não pode ser objeto nem de um trabalho único, nem de um laboratório isolado. E' exatamente a confirmação de resultados com o uso de um método em outras mãos que concorre para a aceitabilidade do mesmo de maneira ampla.

Uma outra limitação também é ponderável neste sentido. Pela especialização de suas atividades, o bioquímico forçosamente é conduzido a se louvar, em princípio, no critério e julgamento do clínico para os casos patológicos a serem estudados. O contrário constituiria imprudência e séria infra-

ção científica. Impõe-se, portanto, uma colaboração íntima entre o clínico e o bioquímico nesse tipo de trabalho.

Desta forma, os resultados abaixo descritos, devem constituir, antes, observações prévias, à vista das quais se poderá delinear um plano de trabalho mais amplo.

Os casos estudados foram provenientes de diversas enfermarias da Santa Casa de Misericórdia, tendo sido alguns também encaminhados a nós através de clínicas particulares, com diagnóstico definitivo ou presuntivo estabelecidos pelas mesmas.

Caso 1: A. C.

Branco, 18 anos, agricultor, sexo masculino, brasileiro.

Diagnóstico clínico: Cirrose porta, com ascite (Evolução clínica de aproximadamente 2 anos).

Para o diagnóstico clínico havia sido considerado o seguinte quadro laboratorial:

Fosfatase alcalina	— 4,2 U. B.
Timol, turvação	— 15 U.
floculação	— Positivo (+++)
Hanger	— Positivo (+++)
Kunkel	— 36 U. (2,60 g%)
P. G. G.	— 17 U. (2,99 g%)
Bilirubinas	
direta imediata	— 0,90 mg%
direta total	— 1,86 mg%
indireta	— 1,86 mg%
total	— 3,72 mg%
Proteína total	— 7,48 g%
Albumina	— 3,20 g%
Relação A/G	— 0,75
Lipídios totais	— 366,6 mg %
Urina	— normal

Determinação da atividade pirofosfatásica

 ácida — 140 unidades

Determinação da atividade pirofosfatásica neutra	— 133	”
Determinação da atividade pirofosfatásica alcalina	— 100	”

Caso 2: A. A. O.

Branco, 43 anos, brasileiro, sexo masculino.

Diagnóstico clínico: Cirrose porta (Etilista. Evolução clínica de aproximadamente 4 anos).

Para o diagnóstico clínico havia sido considerado o seguinte quadro laboratorial:

Fosfátase alcalina	— 26 U. K. A.
Timol, turvação	— 14,6 U.
floculação	— Positivo (++++)
Hanger	— Positivo (++++)
Kunkel	— 29,5 U.
P. G. G.	— 2,55 g. %
Bilirubinas, total	— 2,50 mg %
direta rápida	— 1,00 mg %
Proteína total	— 6,90 g %
Albumina	— 2,50 g %
Relação A/G	— 0,57
Tempo de protrombina	— 19,5 seg
concentração	— 31 %
Urina, pigmentos biliares	— Positivo
Determinação de Na, K, Cl, Ca	— dentro dos limites normais

Determinação da atividade pirofosfatásica ácida	— 133 unidades	
Determinação da atividade pirofosfatásica neutra	— 120	”
Determinação da atividade pirofosfatásica alcalina	— 113	”

Caso 3: V. R. O.

Branco, 48 anos, brasileiro, pedreiro, sexo masculino.

Diagnóstico clínico: Cirrose porta, descompensada (Eti-
lista. Evolução clínica de aproximadamente um ano).

Para o diagnóstico clínico havia sido considerado o se-
guinte quadro laboratorial:

Fosfátase alcalina	—	23 U.
Timol, turvação	—	15,5 U.
floculação	—	Positivo (++++)
Hanger	—	Positivo (++++)
Kunkel	—	32 U.
P. G. G.	—	3,45 g%
Bilirubinas, total	—	7,60 mg%
direta rápida	—	1,70 mg%
Proteína total	—	7,00 g%
Albuminas	—	2,50 g%
Relação A/G	—	0,62
Colesterol, total	—	136 mg%
esterificado	—	61 mg%
Tempo de protrombina	—	18 seg.
concentração	—	35%
Urina	—	normal
Determinação da atividade pirofosfatásica		
ácida	—	147 unidades
Determinação da atividade pirofosfatásica		
neutra	—	113 "
Determinação da atividade pirofosfatásica		
alcalina	—	100 "

Caso 4: O. K.

Branco, 37 anos, brasileiro, sexo masculino.

Diagnóstico clínico: Cirrose porta.

Para o diagnóstico clínico havia sido considerado o se-
guinte quadro laboratorial:

Timol, turvação — 8,2 unidades.

floculação	—	Negativo
Hanger	—	Positivo (++++)
Bilirubinas		
direta imediata	—	11,96 mg%
direta total	—	19,68 mg%
indireta	—	4,22 mg%
total	—	23,90 mg%
Proteína total	—	7,07 g%

Determinação da atividade pirofosfatásica		
ácida	—	207 unidades
Determinação da atividade pirofosfatásica		
neutra	—	187 "
Determinação da atividade pirofosfatásica		
alcalina	—	173 "

Caso 5: S. Z.

Branco, 53 anos, polonês, mineiro, sexo masculino.

Diagnóstico clínico: Cirrose porta (Etilista. Evolução clínica de aproximadamente 7 anos).

Para o diagnóstico clínico havia sido considerado o seguinte quadro laboratorial: .

Fosfatase alcalina	—	5,4 U. K. A.
Timol, turvação	—	17 U.
floculação	—	Positivo (++++)
Hanger	—	Positivo (++++)
Kunkel	—	17,5 U.
P. G. G.	—	4,60 g%
Bilirubinas, total	—	5,50 mg%
direta rápida	—	2,20 mg%
Proteína, total	—	7,20 g%
Albumina	—	1,40 g%
Relação A/G	—	0,24
Colesterol, total	—	187 mg%
esterificado	—	112 mg%
Tempo de protrombina	—	20

concentração	— 30%
Urina, pigmentos biliares	— Positivo
ácidos biliares	— Positivo
urobilinogênio	— leve excesso

Determinação da atividade pirofosfatásica ácida	— 153 unidades
Determinação da atividade pirofosfatásica neutra	— 113 ”
Determinação da atividade pirofosfatásica alcalina	— 93 ”

Caso 6: C. T. S.

Branca, brasileira, 19 anos, doméstica, sexo feminino.

Diagnóstico clínico: Hepatite, sôro homólogo. (Evolução clínica de aproximadamente 5 semanas).

Para o diagnóstico clínico havia sido considerado o seguinte quadro laboratorial:

Fosfátase alcalina	— 5,7 U. B.
Timol, turvação	— 9 U.
floculação	— Negativo
Hanger	— Positivo (+++)
Kunkel	— 13 U (118 g%)
P. G. G.	— 5 U (116 g%)
Bilirubinas, total	— 7,56 mg%
direta total	— 4,12 mg%
Proteína, total	— 7,56 g%
Albumina	— 4,12 g%
Relação A/G	— 1,19
Colesterol total	— 232 mg%
Lípidios totais	— 8 U (399 mg%)

Determinação da atividade pirofosfatásica ácida	— 153 unidades
Determinação da atividade pirofosfatásica neutra	— 140 ”

Determinação da atividade pirofosfatásica
alcalina — 127 ”

Caso 7: A. L. S.

Branca, doméstica, 53 anos, brasileira, sexo feminino.

Diagnóstico clínico: Hepatite. (Evolução clínica de aproximadamente 6 semanas).

Para o diagnóstico clínico havia sido considerado o seguinte quadro laboratorial:

Fosfátase alcalina	— 25,5 U. K. A.
Timol, turvação	— 11 U.
floculação	— Negativo
Hanger	— Negativo
Kunkel	— 23 U. (1,71 g%)
P. G. G.	— 17 U. (2,99 g%)
Bilirubina, total	— 24,7 mg%
direta total	— 15,0 mg%
Proteína, total	— 6,08 g%
Albumina	— 3,84 g%
Relação A/G	— 1,74
Colesterol total	— 324 mg%
Lípidios totais	— 35 U. (848 mg%)
Urina, ácidos biliares	— Positivo
pigmentos biliares	— Positivo
urobilinogênio	— Normal

Determinação da atividade pirofosfatásica
ácida — 160 unidades

Determinação da atividade pirofosfatásica
neutra — 167 ”

Determinação da atividade pirofosfatásica
alcalina — 140 ”

Caso 8: F. J. F.

Branca, 30 anos, brasileira, doméstica, sexo feminino.

Diagnóstico clínico: Icterícia hemolítica (Evolução clínica de aproximadamente 6 semanas).

Para o diagnóstico clínico havia sido considerado o seguinte quadro laboratorial:

Fosfátase alcalina	— 3,5 U. K. A.
Timol, turvação	— 5,3 U.
floculação	— Positivo (++)
Hanger	— Positivo (++++)
Kunkel	— 7,1 U.
P. G. G.	— 1,44 g%
Bilirubinas	
direta imediata	— 1,2 mg%
direta total	— 1,9 mg%
indireta	— 3,0 mg%
total	— 4,9 mg%
Colesterol total	— 112 mg%

Determinação da atividade pirofosfatásica ácida	— 167 unidades
Determinação da atividade pirofosfatásica neutra	— 153 ”
Determinação da atividade pirofosfatásica alcalina	— 153 ”

Caso 9: M. D. F.

Preta, aproximadamente 40 anos, brasileira, doméstica, sexo feminino.

Diagnóstico clínico: Icterícia hemolítica adquirida. (Evolução clínica de aproximadamente 2 meses).

Para o diagnóstico clínico havia sido considerado o seguinte quadro laboratorial:

Fosfátase alcalina	— 4,2 U. B.
Timol, turvação	— 7 U.
floculação	— Positivo (++)
Hanger	— Positivo (++)

Kunkel	— 9 U. (0,97 g%)
P. G. G.	— 5 U. (1,16 g%)
Bilirubina total	— 3,10 mg%
direta total	— 1,03 mg%
Proteína total	— 7,0 g%
Albumina	— 4,3 g%
Relação A/G	— 1,59
Colesterol total	— 254 mg%
Esterificado	— 102 mg%
Lipídios totais	— 10 U. (433 mg%)
Urina, ácidos biliares	— Negativo
Pigmentos biliares	— Negativo
Urobilinogênio	— Leve excesso
Reticulócitos	— 25%
Medulograma	— Acentuada hiperplasia eritroblástica.

Determinação da atividade pirofosfatásica	
ácida	— 167 unidades
Determinação da atividade pirofosfatásica	
neutra	— 207 "
Determinação da atividade pirofosfatásica	
alcalina	— 147 "

Caso 10: E. G. S.

Branco, 28 anos, brasileiro (Baía), sexo masculino.

Diagnóstico clínico presuntivo: Esquistosomose. (Diagnosticado em 1950 com esquistosomose. Evolução clínica atual de 6 semanas aproximadamente).

Para o diagnóstico clínico havia sido considerado o seguinte quadro laboratorial:

Fosfátase alcalina	— 49 U.
Timol, turvação	— 6,8 U.
floculação	— Negativo
Hanger	— Positivo (++++)
Kunkel	— 7,0 U.

P. G. G.	— 1,7 U.
Bilirubina, total	— 5,20 mg%
direta imediata	— 2,45 mg%
Proteína total	— 7,7 g%
Albumina	— 4,0 g%
Relação A/G	— 1,08
Colesterol total	— 150 mg%
Esterificado	— 93 mg%
Urina, pigmentos bilia- res	— Positivo — 14 segundos
Tempo de protrombina Fézes	— Larvas de Strongiloides Stercolaris Ovos de Necatur america- nus e de Schistosoma manzoni.

Determinação da atividade pirofosfatásica ácida	— 147 unidades
Determinação da atividade pirofosfatásica neutra	— 140 ”
Determinação da atividade pirofosfatásica alcalina	— 127 ”

Caso 11: A. A.

Preto, 26 anos, brasileiro, sexo masculino.

Diagnóstico clínico: Moléstia de Weil (Evolução clínica de aproximadamente 3 semanas).

Para o diagnóstico clínico havia sido considerado o seguinte quadro laboratorial:

Fosfátase alcalina	— 15,5 U. K. A.
Kunkel	— 21 U.
P. G. G.	— 10 U. (1,9 g%)
Bilirubina total	— 30 mg%
direta imediata	— 15 mg%
Colesterol total	— 169 mg%
Esterificado	— 44 mg%

Urina	— normal
Tempo de protrombina	— 13,5 segundos
Concentração	— 75%

Determinação da atividade pirofosfatásica ácida	— 173 unidades
Determinação da atividade pirofosfatásica neutra	— 140 "
Determinação da atividade pirofosfatásica alcalina	— 160 "

Caso 12: U. G.

Preta, 36 anos, brasileira, doméstica, sexo feminino.

Diagnóstico clínico presuntivo: Icterícia obstrutiva (Agenesia vesicular, observada durante ato operatório).

Evolução clínica de aproximadamente 2 a 3 meses).

Para o diagnóstico clínico havia sido considerado o seguinte quadro laboratorial:

Fosfátase alcalina	— 54,6 U. A.
Timol, turvação	— 9 U.
floculação	— Negativo
Hanger	— Negativo
Kunkel	— 20 U. (1,56 g%)
Bilirubina total	— 11 mg%
direta total	— 6,5 mg%
Proteína total	— 7,06 g%
Albumina	— 3,84 g%
Relação A/G	— 1,20
Colesterol total	— 648 mg%
Esterificado	— 459 mg%
Lipídios totais	— 45 U. (1.014 mg%)
Urina, Urobilinogênio	— Excesso.
Determinação da atividade pirofosfatásica ácida	— 167 unidades
Determinação da atividade pirofosfatásica neutra	— 207 "

Determinação da atividade pirofosfatásica
alcalina — 140 ”

Caso 13: B. O. K.

Diagnóstico clínico: Icterícia obstrutiva.

Para o diagnóstico clínico havia sido considerado o seguinte quadro laboratorial:

Timol, turvação	— 5,44 U.
floculação	— Negativo
Hanger	— Positivo (++)
Urina, ácidos biliares	— Positivo
pigmentos biliares	— Positivo
urobilinogênio	— Grande excesso

Determinação da atividade pirofosfatásica
ácida — 153 unidades

Determinação da atividade pirofosfatásica
neutra — 187 ”

Determinação da atividade pirofosfatásica
alcalina — 127 ”

Caso 14: A. M.

Diagnóstico clínico: Neoplasia do figado.

Para o diagnóstico clínico havia sido considerado o seguinte quadro laboratorial:

Fosfátase alcalina	— 9,5 U. B.
Timol, turvação	— 1,1 U.
floculação	— Negativo
Hanger	— Negativo
Bilirubinas	
direta imediata	— 3,68 mg%
direta total	— 5,98 mg%
indireta	— 2,02 mg%
total	— 8,00 mg%
Proteína total	— 6,45 g%

Albumina	—	3,85 g%
Relação A/G	—	1,48
Tempo de protrombina	—	15 segundos
Concentração	—	48%
Anátomo-patológico	—	Carcinoma sólido, grau III.
Urina	—	normal
Determinação da atividade pirofosfatásica ácida	—	220 unidades
Determinação da atividade pirofosfatásica neutra	—	227 ”
Determinação da atividade pirofosfatásica Alcalina	—	180 ”

Caso 15: M. S. B.

Branco, sexo masculino, brasileiro.

Diagnóstico clínico: Neoplasia renal, com metástases generalizadas. (Gânglios cervicais grandes. Nódulos à palpção abdominal). Oligúria.

Para o diagnóstico clínico haviam sido considerados os seguintes dados laboratoriais:

Timol, turvação	—	0,8 U.
floculação	—	Negativo
Hanger	—	Negativo
Kunkel	—	3,5 U. (685 g%)
Bilirubinas		
direta imediata	—	0,0
direta total	—	traços
indireta	—	0,42 mg%
total	—	0,42 mg%
Proteína total	—	6,14 mg%
Albumina	—	3,77 mg%
Relação A/G	—	1,59
Urina	—	normal
Exame radiológico	—	Exclusão do rim esquerdo; manchas disseminadas nas regiões pulmonares.

Determinação da atividade pirofosfatásica	
ácida	— 193 unidades
Determinação da atividade pirofosfatásica	
neutra	— 187 ”
Determinação da atividade pirofosfatásica	
alcalina	— 167 ”

Caso 16: H. H.

Branca, brasileira, doméstica, sexo feminino.

Diagnóstico clínico: Neoplasia hepática (confirmada por laparotomia exploradora).

Determinação da atividade pirofosfatásica	
ácida	— 210 unidades
Determinação da atividade pirofosfatásica	
neutra	— 153 ”
Determinação da atividade pirofosfatásica	
alcalina	— 140 ”

Caso 17: F. B.

Branco, engenheiro, sexo masculino.

Diagnóstico clínico: Neoplasia hepática (confirmada por laparotomia exploradora).

Determinação da atividade pirofosfatásica	
ácida	— 227 unidades
Determinação da atividade pirofosfatásica	
neutra	— 173 ”
Determinação da atividade pirofosfatásica	
alcalina	— 153 ”

Caso 18: J. L.

Branco, 47 anos, brasileiro, sexo masculino.

Diagnóstico clínico: Carcinoma gástrico, com metástases hepáticas. (Diagnóstico confirmado por autópsia).

Para o diagnóstico clínico havia sido considerado ainda o seguinte quadro laboratorial:

Hanger	—	Positivo (+)
Bilirubinas		
direta imediata	—	6,70 mg%
direta total	—	2,80 mg%
indireta	—	1,40 mg%
total	—	4,20 mg%
Colesterol total	—	120 mg%

Determinação da atividade pirofosfatásica		
ácida	—	220 unidades
Determinação da atividade pirofosfatásica		
neutra	—	207 ”
Determinação da atividade pirofosfatásica		
alcalina	—	173 ”

Caso 19: M. O. K.

Branca, 19 anos, doméstica, brasileira, sexo feminino.

Diagnóstico clínico: Carcinoma sólido de estômago com caquexia e metástases, inclusive hepáticas (Diagnóstico confirmado por laparotomia exploradora e exame anátomopatológico).

Determinação da atividade pirofosfatásica		
ácida	—	197 unidades
Determinação da atividade pirofosfatásica		
neutra	—	160 ”
Determinação da atividade pirofosfatásica		
alcalina	—	133 ”

Caso 20: S. G. S.

Branca, 44 anos, brasileira, doméstica, sexo feminino.

Diagnóstico clínico: Carcinoma de estômago, com metástases hepáticas. (Confirmado por laparotomia exploradora).

Determinação da atividade pirofosfatásica	
ácida	— 207 unidades
Determinação da atividade pirofosfatásica	
neutra	— 167 ”
Determinação da atividade pirofosfatásica	
alcalina	— 153 ”

Os casos mencionados acima constituem apenas experiências exploratórias. Conclusões definitivas sobre a variação patológica das atividades pirofosfatásicas do soro, somente serão possíveis após coleta de dados por um largo período de tempo, com documentação subsidiária ampla e completa.

E' nosso objetivo, porém, possibilitar pelo presente trabalho o encaminhamento de investigação desta natureza, que se nos afigura meritória.

Os resultados obtidos em alguns casos esparsos parecem indicar que em pacientes com cirrose, icterícia hemolítica e icterícia obstrutiva pode ocorrer uma pequena variação das atividades pirofosfatásicas.

A única observação porém, que sugere a necessidade de um levantamento amplo, com resultado promissor para efeito de corroboração de diagnóstico diferencial, é o das neoplasias hepáticas. As atividades pirofosfatásicas surgiram elevadas nos séros observados, particularmente a ácida.

Para estudar mais de perto as condições de trabalho nestes casos, executamos uma curva de pH das atividades de pirofosfatase em soro de paciente com neoplasia hepática, análogamente ao feito com o soro normal (pág. 77). O quadro n.º 8 contém os resultados obtidos. A curva correspondente, demonstrada na figura n.º 5 indica que, em geral, a atividade é bem mais elevada em relação à do soro normal, em todos os valores de pH examinados. Repetem-se as mesmas zonas de atividade máxima, porém a curva da neoplasia indica claramente um novo componente, que se manifesta entre os pH 5,70 e 6,90. Vemos ainda que, pela adição deste novo “plateau” de atividade, houve um deslocamento do ponto mínimo para o pH 6,90.

O exame da curva nos levou ainda, em face deste novo

componente às seguintes considerações: A oscilação das atividades pirofosfatásicas entre os indivíduos normais não é tão reduzida, e variações patológicas modestas poderiam facilmente ser consideradas de caráter normal. Mesmo em diferenças mais acentuadas, como parece acontecer em neoplasias hepáticas, a simples medida da atividade pirofosfatásica em pH isolados poderão fornecer informações quantitativas insuficientes. A modificação patológica não é tão marcada, como por exemplo, no caso da fosfatase alcalina em icterícias obstrutivas.

Sugerimos portanto, que não se estude dosagens em pH isolados, mas antes se estabeleça um quociente entre valores de pH diferentes. Parece-nos, à primeira vista, que para tal os pH de escolha, no caso de neoplasias hepáticas, seriam os de 5,10 e 6,60, ou seja

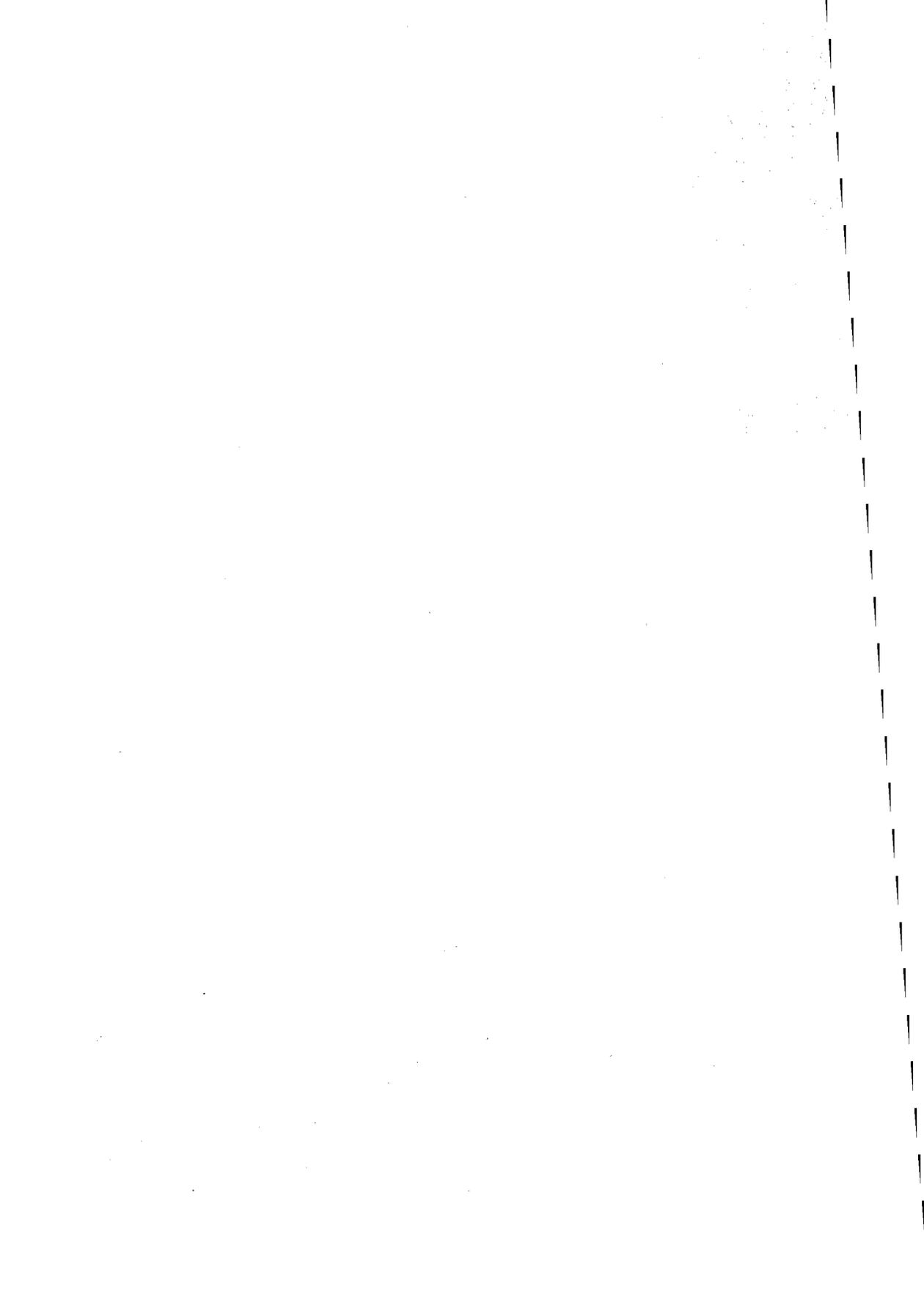
$$\text{coeficiente} = \frac{\text{atividade pirofosfatásica ao pH 6,60}}{\text{atividade pirofosfatásica ao pH 5,10}}$$

De acôrdo com o **quadro n.º 8**, obteríamos para aquêlê sôro normal um coeficiente de 0,502 e no caso da neoplasia examinada e referida no mesmo quadro, 1,02.

Em virtude do aparecimento do novo componente neste último, poder-se-ia supor que o coeficiente em neoplasias parece aproximar-se de 1,0, enquanto que o normal deverá permanecer em tôrno de 0,5. Pretendemos estender a investigação da aplicabilidade desta hipótese à medida que tivermos mais casos para estudo.

Os resultados obtidos nos três subcapítulos acima sugerem um grande número de tópicos de pesquisa, mostrando que o estabelecimento do método desenvolvido e descrito no Capítulo II poderá ser empregado extensamente em investigação pura, bem como clínica.

Foi êste o nosso propósito fundamental, estabelecido ao encerrar o Capítulo I, quando equacionamos o objetivo do presente trabalho.



CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES E SUMÁRIO

1. No Primeiro Capítulo resumimos os processos metabólicos pelos quais o pirofosfato inorgânico resulta no organismo. Ficou evidenciado que êstes mesmos processos estão incluídos em uma série de rotas bioquímicas essenciais para os fenômenos vitais básicos da célula. A eliminação do pirofosfato inorgânico, necessária para a orientação dessas rotas no sentido anabólico, é realizada através de enzimas hidrolíticas, as pirofosfatases, as quais são ubíquas e podem exercer a sua função sôbre uma larga extensão de pH.

Indicamos a necessidade de uma técnica de dosagem para a atividade pirofosfatásica no soro, tendo em vista possíveis variações desta, em estados patológicos.

2. Estabelecemos um método para a determinação da atividade pirofosfatásica ácida, neutra e alcalina e definimos a sua unidade de medida em face do mesmo método.

Introduzimos modificações nas técnicas de dosagem do ortofosfato inorgânico e pirofosfato inorgânico, a última considerada essencial. Nesta ocasião estudamos a influência de versene no desenvolvimento das respectivas reações.

3. Verificamos a existência normal de atividade pirofosfatásica (ácida, neutra e alcalina) no soro do coelho. A administração intraperitoneal de vaselina líquida produziu aumento proporcional destas três atividades. Incluindo no tratamento tetracloreto de carbono, que causava a instalação de esteatose hepática, o acréscimo foi bastante maior, particularmente na atividade pirofosfatásica ácida.

4. Determinamos os valores médios das atividades pirofosfa-

tásicas em vinte e quatro indivíduos considerados normais, das quais a mais elevada é a ácida, e estudamos a variação da curva de pH daquelas.

Assinalamos, à base desta curva, que as atividades pirofosfatásicas do sôro são pelo menos três, responsáveis pelas zonas de atividade máxima.

Examinamos igualmente alguns sôros patológicos com o objetivo de obter orientação para o desenvolvimento de trabalho sistemático neste sentido. Pareceu-nos que em neoplasias hepáticas os níveis de atividade pirofosfatásicas são significativamente mais elevados. A análise da curva de pH de um destes sôros permitiu verificar a existência de um quarto componente pirofosfatásico. Sugerimos, no caso de confirmação das curvas de pH, um coeficiente para a avaliação mais apropriada da variação patológica do pH.

Em nenhum dos casos foi observada a existência de pirofosfato inorgânico no soro examinado.

Durante a discussão dos vários problemas abordados experimentalmente, apontamos diversos temas de investigação, que poderão ser desenvolvidos a partir do presente trabalho.

ABREVIATURAS EMPREGADAS NO TEXTO

- ATP: Adenosina tri-fosfato (Aden.-Rib.-P-P-P).
ADP: Adenosina di-fosfato.
AMP: Adenosina mono-fosfato (Adenosina — 5 P).
Pi: Ortofosfato inorgânico.
R-COOH: Ácido carboxílico.
R-CO-P: Acila-fosfato.
Glicose-6 P: Glicose-6 fosfato.
Glicose-1 P: Glicose-1 fosfato.
GTP: Guanosina tri-fosfato.
GDP: Guanosina di-fosfato.
CTP: Citidina tri-fosfato.
Glicerol-P: α -glicero-fosfato.
PPi — Pirofosfato inorgânico.
N-P-P-P — Nucleosídio tri-fosfato.
H-O-X: Compostos hidroxilados, aceptores.
N-P-O-X: Derivado de nucleosídio monofosfato com
acceptor.
DPN: Di-fosfato-piridina-nucleotídio
(Nicot.-Rib.-P-P-Rib.-Aden).
TPN: Tri-fosfo-piridina-nucleotídio.
NMN: Nicotinamida-ribose-monofosfato
(Nicot.-Rib.-P).
FAD: Flavina-adenina-dinucleotídio
(Fla.-Rib.-P-P-Rib.-Aden).
UTP: Uridina tri-fosfato.
UDPG: Uridina-difosfo-glicose.
UDPGA: Uridina-difosfo-ácido-glicurônico.
UDPGam: Uridina-difosfo-glicosamina.
UDPGal: Uridina-difosfo-galactose.
UDPGalam: Uridina-difosfo-galactosamina.
CoA-SH ou CoA: Coenzima A ou
Pantoteína-P-P-Rib.-Adenina.
P-P-Rib.-P: 5 fosfo - ribosila - 1 pirofosfato.
UMP: Uridina 5' monofosfato.

CAPÍTULO V

BIBLIOGRAFIA

1. Stewart, C. P. — *Clin. Chim. Acta*, 2, 469 (1957), "The trend of clinical chemistry".
2. Bodansky, O. — *Ann. Rev. Biochemistry*, 24, 627 (1955), "Clinical applications of biochemistry".
3. Mellanby, E. — citado por B. S. Platt, em *Ann. Rev. Biochemistry*, 25, 1, (1956), "Prefatory chapter".
4. Stephenson, M. e Baldwin, E. — "F. G. Hopkins and Biochemistry", Cambridge University Press, London, (1949).
5. Peters, R. — *Ann. Rev. Biochemistry*, 26, 1 (1957), "Prefatory chapter".
6. Green, D. E. — "Proceedings, 3rd. International Congress of Biochemistry", Brussels, 1955, ed. C. Liébecq, Academic Press Inc., (1956), p. 281.
7. Slater, E. C. — *ibidem*, p. 264.
8. Martius, C. — *ibidem*, p. 1.
9. Chance, B. — em "Currents in Biochemical Research 1956" — ed. D. G. Green, Interscience Publishers, (1956), p. 308.
10. Krebs, H. A. e H. L. Kornberg — "Energy Transformations in Living Matter", edição especial da "Ergebn. der Physiol., Biol. Chemie u. Exp. Pharmak.", 49, 212 (1957).
11. Lardy, H. A. — como referência 6, p. 287.
12. Lynen, F. — como referência 6, p. 294.
13. Chance, B. — como referência 6, p. 300.
14. Sutherland, E. W. — como referência 6, p. 318.
15. Gale, E. F. — como referência 6, p. 345.
16. Haurowitz, F. — como referência 6, p. 104.
17. Kalckar, H. M. e Maxwell, E. S. — *Physiol. Rev.* 38, 77 (1958).

18. Isselbacher, K. J. — *Science*, **126**, 653 (1957).
19. Mills, G. T., Lockhead, A. C. e Smith, E. E. B. — *Biochim. Biophys. Acta*, **27**, 103 (1958).
20. Anderson, E. P., Kalekar, H. M. e Isselbacher, K. J. — *Science* **125**, 113, (1957).
21. Brown, A. K. e W. W. Zuelzer — *J. Clin. Investig.*, **37**, 332 (1957).
22. Schmid, R. — *Science*, **124**, 76 (1956).
23. Cole, P. G. e Lathe, G. H. — *J. Am. Med. Science*, **24**, 116, (1958).
24. Shemin, D. — como referência 6, p. 197.
25. Westall, R. G. — *Nature*, **170**, 614 (1952).
26. Cooxson, G. H. e Rimington, C. — *Nature*, **171**, 875 (1953).
27. Harris, H. — como referência 6, p. 467.
28. Haddow, A. — *Ann. Rev. Biochemistry* **24**, 743 (1955).
29. Heidelberger, C. — *ibidem*, **25**, 573 (1956).
30. Rusch, H. P. — como referência 9, p. 675.
31. Reinhold, J. C. — *Ann. Rev. Biochemistry* **26**, 587 (1957).
32. Woolley, D. W. — “A Study of Antimetabolites”, J. Wiley and Sons, N. York, (1952).
33. Brown, G. B. — como referência 6, p. 61.
34. Krebs, H. A. — *Brit. Med. Bull.*, **9**, 97 (1953), cf. referência 10.
35. Weber, H. H. — *Harvey Lectures*, **49**, 37 (1954).
36. Weber, H. H. — como referência 6, p. 356.
37. Weber, H. H. e H. Portzehl — em “Progress in Biophysics” **4**, 60 (1954).
38. Morales, M. F., Botts, J., Blum, J. J. e Hill, T. L. — *Physiol. Rev.* **35**, 475, (1955).
39. Morales, M. F. e Botts, J. — como referência 9, p. 609.
40. Nachmansohn, D. — *Harvey Lectures*, **49**, 57 (1955).
41. Nachmansohn, D. e Wilson, I. B. — como referência 9, p. 628.
42. Davies, R. E. — *Sympos. Soc. Exper. Biol.* **8**, 453 (1954).

45. Lipmann, F. — *Adv. Enzymology*, 1, 99 (1941).
46. Lipmann, F. — como referência 9, p. 241.
47. Lipmann, F. — em “*Currents in Biochemical Research — 1946*”, — ed. D. E. Green, Interscience Publ., N. York, (1946), p. 137.
48. Engelhardt, W. A. e Ljubimova, M. N. — *Nature*, 144, 669 (1939).
49. Stern, J. R. e Ochoa, S. — *J. Biol. Chem.* 191, 161 (1951).
50. Stadtman, E. R. — *ibidem*, 196, 535 (1952).
51. Colowick, S. P. e Kalckar, H. M. — *ibidem*, 148, 117 (1943).
52. Sanady, D. R., Gibson, D. M., Ayengar, P. e Ouellet, L. — *Biochim. Biophys. Acta*, 13, 146 (1954).
53. Harden, A. e Young, W. J. — *Proc. Chem. Soc.* 21, 189 (1905), cf. “*General Chemistry*”, J. S. Fruton e S. Simmonds, J. Wiley and Sons, N. York (1953).
54. Cori, C. F. — em “*Respiratory Enzymes*”, edit. H. A. Lardy, University of Wisconsin Press, Madison (1942). p. 175.
56. Cori, G. T., Ochoa, S., Slein, M. W. e Cori, C. F. — *Biochim. Biophys. Acta* 7, 304 (1951).
57. Kornberg, A. e Lindberg, O. — *J. Biol. Chem.* 176, 665 (1948).
58. Green, D. E. et al. — cf. H. M. Kalckar em “*The Enzymes*”, ed. J. B. Sumner e K. Myrbäck, vol. II, parte 1, Academic Press Inc., N. York, 1951, p. 151.
59. Kornberg, A. — *J. Biol. Chem.* 176, 1475 (1948).
60. Kornberg, A. — *ibidem*, 182, 779 (1950).
61. Krebs, H. A. e Hems, R. — *Biochim. Biophys. Acta*, 12, 172 (1953).
62. Flynn, R. M., Jones, M. E. e Lipmann, F. — *J. Biol. Chem.* 211, 791 (1954).
63. Schmidt, G. — em “*Phosphorous Metabolism*”, ed. W. D. McElroy e B. Glass, vol. I, J. Hopkins Press, Baltimore (1951), p. 443.
64. Caputto, R., Leloir, L. F., Cardini, C. F. e Paladini, A. C. — *J. Biol. Chem.*, 184, 333 (1950).

65. Leloir, L. F. — como referência 9, p. 585.
66. Leloir, L. F. — como referência 6, p. 154.
67. Kornberg, A. — *Adv. Enzymology*, 18, 191 (1957).
68. Boyer, P. D., Koeppe, O. J. e Luchsinger, W. W. — *J. Am. Chem. Soc.* 78, 356 (1956).
69. Berg, P. — *Federation Proc.*, 15, 219 (1956).
70. Berg, P. — *J. Biol. Chem.* 222, 991 (1956).
71. Berg, P. — *ibidem*, 222, 1015 (1956).
72. Berg, P. — *ibidem*, 222, 1025 (1956).
73. Doudoroff, M., Barker, H. A. e Hassid, W. Z. — *ibidem*, 168, 725 (1947).
74. Koshland, D. E. Jr. — *Disc. Faraday Soc.* 20, 142 (1955).
75. Munch-Petersen, A. — *Acta Chem. Scand.* 9, 1523 (1955).
76. Hitchings, G. H. e Fuller, H. S. — *J. Biol. Chem.* 128, XLV (1939).
77. Heppel, L. A. e Hilmoe, R. J. — *Federation Proc.* 10, 196 (1951).
78. Kornberg, A. — *ibidem*, 8, 215 (1949).
79. Kornberg, A. — como referência 63, p. 392.
80. Schrecker, A. W. e Kornberg, A. — *J. Biol. Chem.* 182, 795 (1950).
81. Lipmann, F., Kaplan, N. O., Novelli, G. D. e Tuttle, L. C. — *ibidem*, 186, 235 (1950).
82. Storey, I. D. E. e Dutton, G. J. — como referência 6, p. 162.
83. Strominger, J. L. — como referência 6, p. 165.
84. Burnett, G. e Kennedy, E. P. — *J. Biol. Chem.* 211, 969 (1954).
85. Strominger, J. L. — *Federation Proc.* 13, 307 (1954).
86. Kennedy, E. P. e Weiss, S. B. — *J. Am. Chem. Soc.* 77, 250 (1955).
87. Kalckar, H. M. — *Biochim. Biophys. Acta*, 12, 250 (1955).
88. Munch-Petersen, A., Kalckar, H. M., Cutalo, E. e Smith, E. E. B. — *Nature*, 172, 1036 (1953).
89. Strominger, J. L., Kalckar, H. M., Axelrod, J. e Max-

- well, E. S. — *J. Am. Chem. Soc.* 76, 6411 (1954).
90. Dutton, G. J. e Storey, I. D. E. — *Proc. Biochem. Soc., Biochem. J.* 53, XXXVII (1953).
91. Leloir, L. F. — *Arch. Biochem. Biophys.* 33, 186 (1951).
92. Munch-Petersen, A. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 55, 592 (1955).
93. Lipmann, F. — em “The Mechanism of Enzyme Action”, ed. W. D. McElroy e B. Glass, J. Hopkins Press, Baltimore, 1954, p. 599.
94. Lipmann, F., Jones, M. E., Black S. e Flynn, R. M. — *J. Cell. Comp. Physiol.* 41, Suppl. 1, 109 (1953).
95. Lipmann, F. — *J. Am. Chem. Soc.* 74, 2384 (1952).
96. Beinert, H., Green, D. E., Hele, P., Hift, H., v. Korff, R. W. e Ramakrishnan, C. V. — *J. Biol. Chem.* 203, 35 (1953).
97. Berg, P. — *J. Am. Chem. Soc.* 77, 3163 (1955).
98. Kornberg, A. e Pricer, W. E. Jr. — *J. Biol. Chem.* 204, 329 (1953).
99. Mahler, H. F., Wakil, S. J. e Bock, R. M. — *ibidem*, 204, 453 (1953).
100. Lee-Peng, C. H. — *Biochim. Biophys. Acta* 22, 42 (1956).
101. Jencks, W. P. — *Federation Proc.* 12, 703 (1953).
102. Schachter, D. e Taggart, J. V. — *J. Biol. Chem.* 208, 263 (1954).
103. Lipmann, F. — *cit. por A. Kornberg, ref. 67.*
104. Elliott, W. H. — *Biochem. J.* 62, 427 (1956).
105. Elliott, W. H. — *ibidem*, 62, 433 (1956).
106. Maas, W. K. — *cf. F. Lipmann, ref. 93.*
- 106a. Maas, W. K. — *Reports, Third Int. Congr. Biochem., Brussels.*
107. DeMoss, J. A. e Novelli, G. D. — *Biochim. Biophys. Acta*, 18, 592 (1955).
108. Hoagland, M. B. — *ibidem*, 16, 288 (1955).
109. Hoagland, M. B., Keller, E. B. e Zamecnik, P. C. — *J. Biol. Chem.* 218, 345 (1956).
110. Keller, E. B. e Zamecnik, P. C. — *J. Biol. Chem.* 221, 45 (1956).

111. Hilz, H. e Lipmann, F. — Proc. Natl. Acad. Sci., U. S., 41, 880 (1955).
112. DeMeio, R. H. e Wizerkanink, M. — Biochim. Biophys. Acta 20, 428 (1956).
113. Segal, H. L. — Biochim. Biophys. Acta 21, 194 (1956).
114. Robins, P. W. e Lipmann, F. — J. Am. Chem. Soc. 78, 2652 (1956).
115. Wikon, L. G. e Bandurski — Arch. Biochem. Biophys. 62, 503 (1956).
116. Cantoni, G. L. — J. Biol. Chem. 204, 403 (1953).
117. Cantoni, G. L. e Durell, J. — Federation Proc. 15, 229 (1956).
118. Cantoni, G. L. — como referência 6, p. 233.
119. Krebs, H. A. e Henseleit, K. — Z. Physiol. Chemie 210, 33 (1932).
120. Ratner, S. e Petrack, B. — J. Biol. Chem. 200, 175 (1953).
121. Grunberg-Manago, M., Ortiz, P. J. e Ochoa, S. — Science, 122, 907 (1955).
122. Ochoa, S. — Federation Proc. 15, 832 (1956).
123. Grunberg-Manago, M., Ortiz, P. J. e Ochoa, S. — Biochim. Biophys. Acta, 20, 269 (1956).
124. Grunberg-Manago, M. — Bull. Soc. Chim. Biol. 38, 589 (1956).
125. Littauer, U. Z. — Federation Proc. 15, 302 (1956).
126. Littauer, U. Z. e Kornberg, A. — cf. ref. 67.
127. Beers, R. F. Jr. — Nature, 177, 790 (1956).
128. Beers, R. F. Jr. — ibidem, 178, 595 (1956).
129. Kornberg, A., Lehman, I. R. e Simms, E. S. — Federation Proc. 15, 291 (1956).
130. Kornberg, A., Lehman, I. R., Bessmant, M. J. e Simms, E. S. — Biochim. Biophys. Acta 21, 197 (1956).
131. Lieberman, I., Kornberg, A. e Simms, E. S. — J. Am. Chem. Soc. 76, 2844 (1954).
132. Lieberman, I., Kornberg, A. e Simms, E. S. — J. Biol. Chem. 215, 403 (1955).

133. Buchanan, J. M. — em “Phosphorous Metabolism”, vol. II, ed. W. D. McElroy e B. Glass, J. Hopkins Press, Baltimore, 1952, p. 406.
134. Williams, W. J. e Buchanan, J. M. — J. Biol. Chem. 203, 583 (1953).
135. Saffran, M. e Scarano, E. — Nature, 172, 949 (1953).
136. Bennet, E. e Kalckar, H. M., — cf. H. M. Kalckar em ref. 93, p. 675.
137. Korn, E. D., Remy, C. N., Wasilejko, H. C. e Buchanan, J. M. — J. Biol. Chem. 217, 875 (1955).
138. Kornberg, A. — em “The Chemical Basis of Heredity”, ed. W. D. McElroy e B. Glass, J. Hopkins Press, Baltimore, 1957, p. 579.
139. Kornberg, A., Lieberman, I. e Simms, E. S. — J. Am. Chem. Soc. 76, 2027 (1954).
140. Kornberg, A., Lieberman, I. e Simms, E. S. — J. Biol. Chem. 215, 417 (1955).
141. Remy, C. N., Remy, W. T. e Buchanan, J. M. — ibidem, 217, 885 (1955).
142. Greenberg, G. R. — ibidem, 190, 611 (1951).
143. Greenberg, G. R., — Federation Proc. 12, 651 (1953).
144. Goldthwait, D. A. e Peabody, R. A. — ibidem, 13, 218 (1954).
145. Greenberg, G. R. — J. Biol. Chem. 219, 423 (1956).
146. Buchanan, J. M. e Wilson, D. W. — Federation Proc. 12, 646 (1953).
147. Levenberg, B. e Buchanan, J. M. — J. Am. Chem. Soc. 78, 504 (1956).
148. Levenberg, B. e Melnick, I. — Federation Proc. 15, 117 (1956).
149. Luckens, L. N. e Buchanan, J. M. — ibidem, 15, 117 (1956).
150. Goldthwait, D. A., Greenberg, G. R. e Peabody, R. A. — Biochim. Biophys. Acta 18, 148 (1955).
151. Roche, J., Nguyen-van-Thoai e Danzas, E. — Bull. Soc. Chim. Biol. 26, 1138 (1944).
152. Roche, J., Nguyen-van-Thoai e Danzas, E. — ibidem, 27, 401 (1945).

153. Roche, J., Nguyen-van-Thoai e Danzas, E. — C. R. Acad. Sci., Paris, 220, 834 (1945).
154. Roche, J. — em "The Enzymes", vol. I, parte 1, ed. J. B. Sumner e K. Myrbäck, Academic Press, Inc., N. York, 1950, p. 482.
155. Jones, M. — Federation Proc. 12, 708 (1953).
156. Burton, K. — em apêndice à ref. 10.
158. Pett, L. B. e Wynne, A. M. — Biochem. J., 32, 563 (1938).
159. Brown, D. W., Militzer, W. e Georgi, C. E. — Arch. Biochem. Biophys. 70, 248 (1957).
160. Mann, T. — Biochem. J. 38, 339 (1944).
161. Mann, T. — ibidem, 38, 345 (1944).
162. Lüers, H., v. Zychlinski, B. N. e Bengston, K. — Wochschr. Brau. 48, 519, 529 (1933), cf. ref. 63.
163. Bauer, E. — Naturwissenschaften, 23, 866 (1935), cf. ref. 63.
164. Fleury, P. e Courtois, J. — Enzymologia 1, 377 (1937).
165. Bailey, K. e Webb, E. C. — Biochem. J., 38, 394 (1944).
166. Kunitz, M. — J. Amer. Chem. Soc. 73, 1387 (1951).
167. Fleury, P. e Courtois, J. — C. R. Soc. Biol., 128, 465 (1938).
168. Fleury, P. e Courtois, J. — Enzymologia, 5, 254 (1938).
169. Mayer, K. e Klinga-Mayer, M. — Z. Physiol. Chemie, 267, 115 (1940).
170. Haase, A. — Z. Physiol. Chemie, 239, 1 (1936).
171. Bamann, E. e Gall, H. — Biochem. Z., 239, 1 (1937).
172. Roche, J. e Baudoin, J. — C. R. Soc. Biol., 137, 245 (1943).
173. Swanson, M. A. — J. Biol. Chem. 164, 685 (1952).
174. Roche, J., de Laromigwière, L. e Laurens, A. — C. r. Acad. Sci., 215, 495 (1942).
175. Gordon, J. J. — Biochem. J. 46, 96 (1950).
176. Seal, U. S. — Federation Proc. 16, 351 (1956).
177. Lohmann, K. e Schuster, P. — Biochem. Z. 272, 24 (1934).

178. Naganna, B. e Narayana Menon, V. K. — *J. Biol. Chem.* **174**, 501 (1948).
179. Malkin, E. e Denstedt, O. F. — *Can. J. Bioch. Physiol.* **34**, 121 (1956).
180. Jenner, H. D. e Kay, H. D. — *J. Biol. Chem.* **93**, 733 (1931).
183. Roche, J., Nguyen-van-Thoai e Marcellet, J. — *C. R. Soc. Biol.* **138**, 517 (1944).
185. Datta, N. e Zajicek, J. — *Acta Haemat.* **12**, 81 (1954) cf. *Excerpta Medica*, **8**, 374 (n. 1871) (1955).
186. Norberg, B. — *Acta Chem. Scand.* **4**, 601 (1950).
187. Kunitz, M. — *J. Amer. Chem. Soc.* **73**, 1387 (1951).
188. Warburg, O. e Christian, W. — *Biochem. Z.* **310**, 384 (1941-42).
189. Bloch-Frankenthal, L. — *Biochem. J.* **57**, 87 (1954).
190. Bailey, K. e Webb, E. C. — *Biochem. J.* **38**, 394 (1944).
191. Gordon, J. J. — *Nature*, **164**, 579 (1949).
192. Naganna, B., Raman, A., Venugopol, B., e Sripathi, C. E. — *Biochem. J.* **60**, 215 (1955).
193. Kalckar, H. M., Anderson, E. P. e Isselbacher, K. J. — *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S.*, **42**, 49 (1956).
194. Komrower, G. M., Schwarz, V., Holzel, A. e Goldberg, L. — *Arch. Dis. Childhood*, **31**, 254 (1956), cf. ref. 31.
195. Schwarz, V., Goldberg, L., Komrower, G. M. e A. Holzel — *Biochem. J.* **62**, 34 (1956).
196. Isselbacher, K. J., Anderson, E. P., Kurahashi, K. e Kalckar, H. M. — *Science* **123**, 635 (1956).
197. Anderson, E. P., Isselbacher, K. J. e Kalckar, H. M. — *Federation Proc.* **15**, 211 (1956).
198. Arias, I. M. e London, I. M. — *Science* **126**, 563 (1957).
199. La Due, J. S. e Wroblewski, F. — *Circulation* **9**, 871 (1954).
200. Steinberg, D. e Ostrow, B. H. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **89**, 31 (1955).
201. Kattus, A. A., Watanabe, R., Semonson, R., Drell, W.

- e Agress, C. — *J. Amer. Med. Assoc.* **160**, 16 (1956).
202. Chinsky, M., Shmogradoff, G. L. e Sherry, S. — *J. Lab. Clin. Med.* **47**, 108 (1956).
203. Krause, S. e Krause, C. — *J. Amer. Med. Assoc.* **161**, 144 (1954).
204. Denney, J. L., MacAuley, C. B., Martin, H. E., Ware, A. G. e Segalone, M. — *ibidem*, **161**, 614 (1956).
205. White, L. P. — *New England, J. Med.* **255**, 984 (1956).
206. Wroblewski, F., Rueggsegger, P. e Lahue, J. — *Science* **123**, 1122 (1956).
207. Zimmermann, H. J. e Weinstein, H. G. — *J. Lab. Clin. Med.* **48**, 607 (1956).
208. Hsieh, K. M. e Blumenthal, H. T. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **91**, 626 (1956).
209. Siegel, A. e Bing, R. J. — *ibidem*, **91**, 604 (1956).
210. Wacker, W. E. C., Ulmer, D. D. e Vallee, B. L. — *New Engl. J. Med.* **255**, 449 (1956).
211. Volk, B. W., Losner, S., Aronson, S. M. e Lew, H. — *Am. J. Med. Sci.* **232**, 38 (1956).
312. Wroblewski, F. e La Due, J. S. — *Ann. Internal Med.* **43**, 345 (1955), cf. ref. 31.
213. De Ritis, F., Coltorti, M. e Ginsti, G. — *Minerva Med.* **46**, 1207 (1955), cf. ref. 31.
214. Wroblewski, F. e LaDue, J. S. — *J. Amer. Med. Assoc.* **160**, 1130 (1956).
215. Wroblewski, F., Jervis, G. e LaDue, J. S. — *Ann. Internal Med.* **45**, 782 (1956), cf. ref. 31.
216. Molander, D. W. — *Amer. J. Med.* **21**, 136 (1956).
217. Wroblewski, F. e LaDue, J. S. — *Ann. Internal Med.* **45**, 801 (1956), cf. ref. 31.
218. Wroblewski, F. e LaDue, J. S. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **90**, 210 (1955).
219. Sibley, J. A., Higgins, G. M. e Fleisher, G. A. — *Arch. Pathology* **59**, 712 (1955).
220. Loken, F. — *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **8**, 175 (1956).
221. Warburg, O. e Christian, W. — *Biochem. Z.* **314**, 399 (1943).

222. Fodor, P. F., Tomashefsky, P. e Funk, E. — Arch. Biochem. Biophys. 71, 403 (1957).
223. Warburg, O., Schroeder, W., Gewitz, H. e Völker, W. — Naturwissenschaften 45, 192 (1952).
224. Malloy, H. T. e Evelyn, K. A. — J. Biol. Chem. 119, 480 (1937).
225. Ducci, H. e Watson, C. J. — J. Lab. Clin. Med. 30, 293 (1945).
226. MacLagan, N. F. — Brit. J. Exptl. Pathol. 25, 234 (1944).
227. Hanger, F. M. — Am. J. Med. 16, 565 (1954).
228. Bodansky, O. — J. Biol. Chem. 101, 93 (1933).
229. Kunkel, H. G. — Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 66, 217 (1947).
230. de la Huerga, J. e Popper, H. — J. Lab. Clin. Med. 35, 459 (1950).
231. Hawk, P. H., Oser, B. L. e Summerson, W. H. — em “Practical Physiological Chemistry”, 13a. ed., The Blakiston Company, N. York, p. 602.
232. Fiske, C. H. e Subbarow, Y. — J. Biol. Chem. 66, 375 (1925).
233. Rice, E. W. — Clin. Chim. Acta 3, 121 (1958).
234. Berenblum, I. e Chain, E. — Biochem. J. 32, 295 (1938).
235. Krumholz, P. — Z. Anorg. Allgem. Chem. 212, 91 (1933), cf. Snell, F. D. e Snell, C. T. — “Colorimetric Method of Analysis”, vol. I, Van Nostrand Co., N. York, 1943, p. 480.
236. Cross, R. J., Taggart, T. V., Cow, G. A. e Green, D. E. — J. Biol. Chem. 177, 655 (1949).
237. Cohn, B. e Kolthoff, I. M. — Ind. Eng. Chem.-Anal. Ed. 14, 886 (1942).
238. Heller, J. Karpiak, S. e Zubikowa, I. — Nature, 166, 187 (1950).
239. Britske, E. V. e Dragunov, S. S. — J. Chem. Ind. USSR, 4 49 (1927), cf. ref. 63.
240. Gerber, A. B. e Miles, F. T. — Ind. Eng. Chem. — Anal. Ed. 10, 519 (1938).

241. Bell, R. N. — *Anal. Chem.* **19**, 97 (1947).
 242. Wurzschnitt, B. e Schuhknecht, W. — *Angew. Chemie*, **52**, 711 (1939), cf. ref. 63.
 243. Lohmann, K. e Schuster, P. — *Biochem. Z.* **272**, 24 (1934).
 244. Deuel, H., Solms, J. e AngasWeisz, L. — *Helv. Chim. Acta* **33**, 2171 (1950).
 245. Neu, R. — *Z. Anal. Chem.* **131**, 102 (1950).
 246. Elliott, W. H. — *Biochem. J.* **65**, 315 (1957).
 247. Kuttner, T. T. e Cohen, H. R. — *J. Biol. Chem.* **75**, 517 (1927).
 248. Kuttner, T. T. e Lichtenstein, H. — *J. Biol. Chem.* **86**, 671 (1930).
 249. Shinowara, Jones e Reinhart — *ibidem*, **142**, 921 (1942).
 250. Snell, F. E. e Snell, C. T. — “Colorimetric Methods of Analysis”, Van Nostrand, N. York, 1943, p. 508.
 251. Steiner, M. — em “Die Methoden der Fermentforschung”, ed. E. Bamann e K. Myrbäck, Georg Thieme Verlag, Leipzig 1941, vol. I, p. 781.
 252. Heppel, L. A. — em “Methods of Enzymology”, ed. S. P. Colowick e N. O. Kaplan, vol. II, Acad. Press, Inc., N. York, 1955, p. 570.
 253. Bensley, B. A. — “Practical Anatomy of the Rabbit”, 8.^a ed. The Blakiston Co., Philadelphia, 1948.
 254. Frunder, H., Boerning, H., Richter, G. e Stade, K. — *Z. f. Physiol. Chemie*, **307**, 161 (1957).
-

Í N D I C E

Capítulo I: Introdução	9
1. Transporte metabólico de energia química. Participação de compostos fosforados	14
2. Formação metabólica de pirofosfato inorgânico	17
3. Metabolização do pirofosfato	35
4. Atividade pirofosfatásica no sôro humano	38
Capítulo II: Métodos e Material	43
1. Determinação de ortofosfato inorgânico	43
2. Determinação de pirofosfato inorgânico	48
3. Dosagem da atividade pirofosfatásica alcalina, neutra e ácida no sôro	65
4. Experimentação animal	68
Capítulo III: Aplicações	71
1. Atividade pirofosfatásica em coelhos normais e com esteatose experimental	71
2. Atividade pirofosfatásica em sôro humano nor- mal	74
3. Atividade pirofosfatásica em sôro humano de alguns casos patológicos	81
Capítulo IV: Conclusões e Sumário	99
Abreviaturas empregadas no texto	101
Capítulo V: Bibliografia	103
