SUELY LOPES GOMES

Metabolismo de 3',5'-Monofosfato Cíclico de Adenosina
Durante o Ciclo Evolutivo de Blastocladiella emersonii

Tese de Doutorado apresentada
ao Departamento de Bioquímica do
Instituto de Química da Universidade
de São Paulo

São Paulo — 1976

Aos meus pais

A Marcelo e Valéria

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr. José Carlos da Costa Maia, orientador desta tese, pela valiosa ajuda, amizade e contínuo interesse durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Lélia Mennucci, pelas sugestões e auxílio na execução desta tese e pela leitura crítica do manuscrito.

Ao Prof. Dr. Walter Colli pela síntese de $|\alpha\text{-}^{32}\text{P}|-ATP$.

Aos colegas Edda L. Nascimento, Marcus R. Vale e Verbena L. Vale pela ajuda em diferentes etapas deste trabalho.

Aos companheiros do Laboratório BioKaos pelo apoio e amizade.

À fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro.

Esta tese foi realizada com o auxílio financeiro fornecido ao Laboratório BioKaos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, através do Projeto BIOQ/FAPESP.

V
ÍNDICE

	Pág.
ABREVIATURAS	xi
I. INTRODUÇÃO	1
PARTE A	
1. AMP cíclico	1
1.1. Nota histórica	1
1.2. Papel do AMP cíclico no metabolismo celular	2
2. Regulação da concentração celular de AMP cíclico	14
2.1. Adenilato ciclase	14
2.2. AMP cíclico fosfodiesterase	24
2.3. Excreção do AMP cíclico	30
PARTE B	
1. O ciclo biológico de <u>Blastocladiella emersonii</u>	32
2. As fases do ciclo	34
2.1. O zoósporo	34
2.2. A germinação do zoósporo	35
2.3. O crescimento exponencial	37
2.4. O esporângio	38
2.5. A esporulação	39
3. Os nucleotídeos cíclicos em <u>Blastocladiella emersonii</u>	40

	Pág.
II. MATERIAL E MÉTODOS	44
1. Células e condições de cultivo	44
1.1. Cultivo em placas de PYG-agar	44
1.1.1. Obtenção de zoósporos de primeira geração	44
1.1.2. Culturas estoque	45
1.2. Cultivo em meio líquido DM4	45
1.2.1. Zoósporos provenientes de crescimento em DM4	46
1.2.2. Crescimento e esporulação das células vegetativas	46
1.3. Coleta e armazenamento de células vegetativas e zoósporos	47
2. Fracionamento celular	48
3. cAMP fosfodiesterase	49
3.1. Ensaio da atividade enzimática	49
3.2. Caracterização do produto da reação	50
3.3. Gradiente de glicerol	51
3.4. Fracionamento com sulfato de amônio	51
3.5. Cromatografia em coluna de DEAE-celulose	52
3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida	52
4. Ensaio da atividade de cGMP fosfodiesterase	53
5. Adenilato ciclase	54
5.1. Ensaio da atividade enzimática	54
5.2. Caracterização do produto da reação	55

	Pág.
6. Determinação da concentração intracelular de cAMP	56
6.1. Preparo das células	56
6.2. Ensaio do cAMP	56
6.3. Curva padrão	58
7. Teste da excreção de cAMP durante a germinação	58
7.1. Obtenção das células e dos meios extracelulares da germinação	58
7.2. Tratamento do meio extracelular	58
7.3. Tratamento das células	59
8. Ensaio da atividade de fosfatase alcalina	60
9. Ensaio da atividade de succinato:citocromo c redutase	60
10. Dosagem de hemoglobina	61
11. Dosagem de proteína	61
12. Iodação da membrana de zoósporo pelo sistema da lactoperoxidase e H_2O_2	61
13. Reagentes	62
III. RESULTADOS	65
1. cAMP fosfodiesterase em <u>B. emersonii</u>	65
1.1. Identificação do produto da reação	65

1.2. Presença de atividades de cAMP e cGMP fosfodiesterases independentes em <u>B.</u> <u>emersonii</u>	67
2. Adenilato ciclase em <u>B. emersonii</u>	75
2.1. Padronização da coluna de óxido de alumínio	75
2.2. Propriedades gerais de adenilato ci- clase de zoósporos	76
2.2.1. Atividade de adenilato ciclase em função de diversos componen- tes da mistura de reação	76
2.2.2. Tempo de incubação	79
2.2.3. Concentração de enzima	79
2.2.4. pH ótimo da reação	79
2.2.5. Influência de íons	80
2.3. Caracterização do produto de reação	84
2.4. Localização subcelular da adenilato ciclase de zoósporos	84
2.5. Efeito da variação de ATP e Mn^{2+} na atividade enzimática	90
2.6. Efeito de GTP e 5'-AMP na atividade enzimática	96
2.7. Cinética da enzima tratada com Triton X-100	96

	Pág.
2.8. Variação da atividade de adenilato ci clase durante o ciclo biológico de <u>B. emersonii</u>	99
3. AMP cíclico em <u>B. emersonii</u>	102
3.1. Concentração intracelular de cAMP no ciclo biológico	102
3.2. Excreção de cAMP no meio de cultura, durante a germinação	106
IV. DISCUSSÃO	110
V. RESUMO	133
SUMMARY	136
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139

ABREVIATURAS

ADP - difosfato de adenosina
3'-AMP - 3'-monofosfato de adenosina
5'-AMP - 5'-monofosfato de adenosina
ATP - trifosfato de adenosina
cAMP - 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina
CAP - proteína aceptora de cAMP
cCMP - 3',5'-monofosfato cíclico de citidina
cGMP - 3',5'-monofosfato cíclico de guanosina
cpm - contagens por minuto
db-cAMP - dibutiril cAMP
DEAE - dietilaminoetil
DNA - ácido desoxirribonucleico
GTP - trifosfato de guanosina
 K_m - constante de Michaelis
mA - miliampere
mCi - millicurie
mRNA - ácido ribonucleico mensageiro
PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonila
PPO - 2,5-difeniloxazol
psi - libra por polegada ao quadrado
RNA - ácido ribonucleico
TCA - ácido tricloroacético
Tris - tris-(hidroximetil)-aminometano
v/v - volume por volume
x g - vezes a aceleração da gravidade

I. INTRODUÇÃO

PARTE A

1. AMP CÍCLICO

1.1. Nota histórica

A estrutura química do 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) foi descrita pela primeira vez pelos grupos de Markham (Cook et al., 1957; Lipkin et al., 1959) e de Sutherland (Sutherland & Rall, 1957; Sutherland & Rall, 1958; Rall & Sutherland, 1958), simultaneamente.

O reconhecimento de seu papel fisiológico data da descoberta por Sutherland e colaboradores de que este nucleotídeo cíclico era o mediador do efeito hiperglicêmico da epinefrina e do glucagon, estimulando a conversão da glicogênio fosforilase inativa para sua forma ativa (Sutherland & Rall, 1957; Rall et al., 1957; Sutherland & Rall, 1960). Desde então se tem mostrado o envolvimento do cAMP nos efeitos de uma variedade de hormônios e outros agentes biologicamente ativos, dando ampla confirmação ao conceito proposto por Sutherland de que este nucleotídeo seria o "segundo mensageiro" na ação hormonal (Robison et al., 1968).

O cAMP foi encontrado em todas as células animais investigadas. No entanto, este nucleotídeo cíclico não é

restrito a tecidos animais, ocorrendo em bactérias (Okabayashi et al., 1963; Makman & Sutherland, 1965), em eucariotos primitivos (Sy & Richter, 1972; Konijn et al., 1968; Uno & Ishikawa, 1973) e mesmo alguns organismos unicelulares que contêm clorofila, como Chlamydomonas (Amrhein & Filner, 1973). Sua ocorrência em plantas tem sido sujeita a controvérsias, no entanto, evidências recentes parecem confirmar a presença de cAMP em tecidos vegetais (Wood et al., 1972).

1.2. Papel do AMP cíclico no metabolismo celular

Desde a sua descoberta, por Sutherland e colaboradores, durante a investigação dos fatores controlando a degradação de glicogênio em células de fígado, e posterior comprovação do seu papel na regulação da síntese e degradação de glicogênio em vários tecidos de mamíferos, o cAMP tem sido implicado em vários processos metabólicos celulares.

O seu envolvimento na ação de certos hormônios, como "segundo mensageiro" (Robison et al., 1968), tem sido amplamente confirmado. Diferentes células parecem conter diferentes receptores para diferentes hormônios, e um dos resultados importantes da interação hormônio-receptor, em algumas células, é estimular a adenilato ciclase, elevando os níveis intracelulares de cAMP, que então atua alterando a velocidade de

um ou mais processos celulares (Sutherland, 1972).

A descoberta dos detalhes do mecanismo de controle da degradação do glicogênio permitiu elucidar, a nível molecular, o papel do cAMP neste sistema, que tem sido utilizado como modelo genérico em eucariotos, para tentar explicar a função deste nucleotídeo cíclico em outros processos bioquímicos. O glicogênio é hidrolisado a glicose-1-fosfato, pela enzima glicogênio fosforilase, que em músculo e fígado existe em duas formas, b e a. A fosforilase b é convertida a fosforilase a pela enzima fosforilase b quinase, que por sua vez existe na célula em uma forma fosforilada (ativa) e uma forma não fosforilada (inativa). A fosforilase quinase é ativada por outra enzima, uma proteína quinase, que depende de cAMP para sua atividade (Walsh et al., 1968). Concomitantemente com a ativação da degradação do glicogênio, a sua síntese é bloqueada, como resultado da alteração da glicogênio sintetase. Esta última enzima também existe em duas formas, uma fosforilada, inativa (D) e uma não fosforilada, ativa (I). A mesma proteína quinase que catalisa a formação da fosforilase b quinase também pode fosforilar a glicogênio sintetase, convertendo-a em sua forma inativa (Villar-Palasi & Schlender, 1970).

A estimulação hormonal da velocidade da liberação de ácidos graxos do tecido adiposo, efetuada pela ativação de uma lipase, é mediada também por cAMP, através da ativação de

uma proteína quinase (Corbin et al., 1970). A ativação da lipase pode ser correlacionada com a fosforilação-catalisada pela proteína quinase do complexo enzimático, como no caso da fosforilase (Huttunen & Steinberg, 1971).

A descoberta dos mecanismos de ação das proteínas quinases na ativação da glicogênio fosforilase e da lipase, ambos mediados por cAMP, e na inativação da glicogênio sintetase, assim como a comprovada ocorrência de proteínas quinases dependentes de cAMP em vários tecidos e organismos (Kuo & Greengard; 1969) sugeriu a hipótese de que as proteínas quinases mediavam, senão todos, pelo menos a maioria dos efeitos do cAMP em células de mamíferos.

Esta hipótese motivou a procura de possíveis substratos para as proteínas quinases dependentes de cAMP; entretanto, estas quinases mostraram-se pouco específicas, sendo capazes de fosforilar um grande número de proteínas, tanto "in vivo" como "in vitro", sem que qualquer significado fisiológico pudesse ser associado à fosforilação. Assim, por exemplo, proteínas ribossomais de uma variedade de tecidos podem ser fosforiladas, sem que haja qualquer mudança aparente em suas funções. Existe, no entanto, a possibilidade de que não se tenha procurado a função (ou funções) que varie(m) especificamente ou, ainda, que os ensaios efetuados não tenham sido os

mais apropriados (Eil & Wool, 1973). No caso de histonas e proteínas acídicas associadas ao DNA de eucariotos, os resultados são mais promissores. Observou-se, por exemplo, que a remoção - sob condições específicas - da histona F_1 aumenta a atividade de molde da cromatina para a síntese de RNA e que a sua capacidade inibitória é diminuída quando a mesma é fosforilada (Watson & Langan, 1973). Quanto às proteínas acídicas, existem evidências de que, quando fosforiladas, são capazes de estimular a síntese de RNA em sistema acelular, usando-se RNA polimerase de fígado de rato e DNA homólogo como molde, sendo que o efeito estimulatório desaparece quando se utiliza DNA heterólogo (Shea & Kleinsmith, 1973). Estes resultados sugerem um possível papel regulatório para a fosforilação destas proteínas por quinases dependentes de cAMP.

O mecanismo de ativação da proteína quinase por cAMP foi inicialmente proposto por Brostrom et al. (1969). A proteína quinase inativa é constituída de uma subunidade regulatória (R) e uma subunidade catalítica (C). Foi sugerido que o cAMP liga-se à subunidade regulatória, causando a dissociação do complexo inativo, e liberando a subunidade catalítica ativa. Um inibidor específico para proteínas quinases dependentes de cAMP foi descrito e estudado por diversos pesquisadores. Esse inibidor age formando um complexo inativo com a subunidade catalítica, impedindo a recombinação com a

subunidade regulatória (Langan, 1973).

Como foi dito anteriormente, a ocorrência do cAMP não se restringe aos eucariotos superiores, tendo sido encontrado em vários outros organismos. No caso da bactéria E. coli conhecem-se também os detalhes moleculares de sua ação, que difere do modelo que ora descrevemos, pois o nucleotídeo age ao nível da transcrição gênica.

Sabia-se, há muito tempo, que o crescimento de E. coli em glicose inibia o aumento dos níveis de β -galactosidase, normalmente observados quando do crescimento da bactéria em presença do indutor natural, a lactose. Este fenômeno, originalmente chamado "efeito de glicose", veio a ser denominado de "repressão por catabólito", pois foi demonstrado ser uma resposta genérica, dependente da fonte de carbono no meio (Magasanik, 1970). Assim, outras enzimas em E. coli estão sujeitas a este efeito e, de maneira geral, estas enzimas estão envolvidas na utilização de fontes alternativas de energia (Magasanik, 1970; Pastan et al., 1971). A síntese de cada uma dessas enzimas é estimulada, de maneira altamente específica, pelo substrato particular que ela é capaz de metabolizar; assim, embora a indução destas enzimas seja bastante específica, a repressão por glicose é geral a todas elas.

A base molecular para a repressão por catabólito era bem pouco compreendida até que Makman e Sutherland (1965)

mostraram que a concentração de cAMP em E. coli podia ser profundamente alterada por mudanças na composição do meio de crescimento. A concentração de cAMP era baixa durante o crescimento em glicose, mas aumentava dramaticamente com a parada do crescimento, devida à exaustão do açúcar. A adição de glicose causava uma rápida queda na concentração intracelular de cAMP, aparentemente devido à rápida excreção do nucleotídeo cíclico no meio. O paralelismo entre as mudanças na concentração de cAMP e as condições que favoreciam indução ou repressão era notável e os autores sugeriram que o cAMP devia estar envolvido na regulação da síntese de enzimas indutíveis.

O mecanismo pelo qual glicose e outros metabólitos regulam a síntese, degradação e excreção de cAMP permanece totalmente desconhecido. Parece, no entanto, haver uma relativa correlação entre as substâncias capazes de reprimir a síntese de β -galactosidase e de baixar os níveis de cAMP (Pastan & Perlman, 1970).

Perlman & Pastan (1968) e Ullmann & Monod (1968) haviam demonstrado que cAMP exógeno suprimia eficientemente a repressão por catabólito em E. coli. Vários estudos confirmaram o efeito do cAMP na repressão por catabólito ao nível da transcrição. Experimentos mais diretos foram os de Zubay et al. (1970) que mostraram, em um sistema acelular, que a

iniciação da transcrição de mRNA específico para as enzimas do operon da lactose depende da presença de cAMP e de uma proteína que se liga ao cAMP, chamada CAP. A proteína CAP não tem atividade de proteína quinase e evidências experimentais demonstram que o complexo cAMP-CAP se liga ao promotor do operon facilitando a ligação da RNA polimerase ao sítio promotor (Perlman & Pastan, 1971).

Evidências iniciais de que o cAMP agiria ao nível da tradução na indução da enzima triptofanase (Pastan & Perlman, 1969) não foram confirmadas por experimentos posteriores. Ramirez et al. (1972) observaram que a pré-incubação de células com triptofano e cAMP (com ou sem glicose), na ausência de aminoácidos, seguida pela adição de rifampicina e aminoácidos, resultava em um grande aumento da triptofanase. Tal efeito não era observado se o cAMP fosse adicionado ao mesmo tempo que a rifampicina e os aminoácidos. Esses autores concluíram que o RNA mensageiro para a enzima acumula-se durante o período de pré-incubação, não sendo traduzido até que os aminoácidos sejam adicionados. Estes resultados sugerem que a indução da triptofanase, como no caso da β -galactosidase, é regulada por cAMP ao nível da transcrição.

Assim, em procariotos, os exemplos por ora conhecidos sugerem que o cAMP atua nestes microrganismos, facilitando

a transcrição de operons sensíveis à repressão por catabólitos.

Em eucariotos, as evidências de um estímulo por cAMP ao nível da transcrição ou tradução gênicas são ainda fragmentárias e indiretas. A síntese de diversas proteínas específicas, principalmente de fígado, um dos órgãos mais estudados sob este aspecto, pode ser influenciada por cAMP. Assim, por exemplo, a síntese da enzima tirosina-amino transferase parece ser ativada por cAMP ao nível da tradução (Holt & Oliver, 1969), o mesmo ocorrendo com a enzima fosfoenolpirúvico carboxiquinase (Wicks & Mckiblin, 1972). Estudos sobre a indução da enzima serina desidratase sugerem que o cAMP poderia estar implicado na transcrição e/ou no transporte do RNA mensageiro desta enzima para o citoplasma (Jost et al., 1970). Entretanto, é conveniente enfatizar que a maioria destes resultados foi obtida por meio do uso de inibidores de transcrição ou tradução e, portanto, são evidências indiretas.

O cAMP tem sido implicado em vários outros mecanismos celulares, não endócrinos, em células de eucariotos, tais como na resposta imunológica (Parker et al., 1974), no metabolismo de cálcio (Rasmussen et al., 1975), na excitação visual (Bitensky et al., 1972), no controle de secreção de fluidos (Berridge & Prince, 1972), e ainda no controle da

proliferação e diferenciação celulares (Pastan et al., 1975). Visto que este último tópico tem motivado uma série enorme de pesquisas recentes ligadas à morfogênese em geral, e dada a inexistência de um modelo que possa, no momento, unificar as respostas observadas, seria oportuno um breve resumo dos dados mais significativos até agora obtidos.

A primeira evidência de um papel regulatório para o cAMP em divisão celular foi apresentado por Bürk (1968), que trabalhando com células BHK de hamster mostrou que a adição de teofilina ou cAMP exógeno inibia a divisão celular, e que células infectadas com o vírus polioma tinham níveis mais baixos de adenilato ciclase. Desde então, através da adição de análogos de cAMP (menos hidrolisáveis), do próprio cAMP ou de agentes que elevam a sua concentração intracelular, tem-se observado a diminuição da velocidade de crescimento de várias linhagens de origem fibroblástica (Ryan & Heidrick, 1968; Johnson et al., 1971; Sheppard, 1971; Brailovsky et al., 1973). Os resultados destes experimentos sugerem fortemente que o cAMP tem um papel fisiológico na regulação da velocidade da divisão celular. A confirmação desta hipótese foi feita através da medida da concentração intracelular de cAMP em diferentes linhagens e sob diferentes condições de crescimento, encontrando-se uma relação inversa entre a velocidade de crescimento e os níveis deste nucleotídeo. Tem-se observado ainda

que a concentração intracelular de cAMP aumenta quando a célula normal para de crescer (Pastan et al., 1975), devido à "inibição do crescimento dependente da densidade" (Stoker & Rubin, 1967). Células transformadas, que não param de crescer, sob as mesmas condições, não têm suas concentrações de cAMP aumentadas (Otten et al., 1971). Isto pode estar associado ao fato de que, na maioria das células neoplásticas examinadas, há sempre um defeito aparente em algum componente do metabolismo do cAMP (Chlapowski et al., 1975). A impossibilidade de alguns autores de encontrar um aumento nos níveis de cAMP em células atingindo confluência pode ser devido a problemas técnicos na avaliação dos níveis de cAMP, como sugerido por Pastan et al. (1975).

Um dos primeiros eventos que se seguem à adição de agentes que estimulam células em repouso a sintetizar DNA e a sofrer divisão é uma rápida queda nos níveis de cAMP. Isto tem sido observado após adição de soro ou insulina a culturas de fibroblastos (Sheppard, 1972; Froehlich & Rachmeler, 1972). Esta queda na concentração do cAMP é aparentemente importante para o início do crescimento, visto que o mesmo é inibido se o nível do nucleotídeo é mantido alto, após a adição de agentes que promovem o crescimento (Froehlich & Rachmeler, 1972; Kram et al., 1973).

O cAMP não é o único nucleotídeo cíclico encontrado nas células; o cGMP (Goldberg et al., 1973) e, mais recentemente, o cCMP (Bloch, 1974) foram também identificados. Desde a sua descoberta, a função do cGMP não tem sido muito clara. Goldberg et al. (1975) sugeriram que cAMP e cGMP funcionam juntos, mas de maneira oposta (a hipótese Yin Yang), no controle do crescimento e outras funções celulares, enfatizando que é a relação entre as concentrações destes dois nucleotídeos na célula que é importante.

Também em eucariotos primitivos se tem verificado que o cAMP pode desempenhar um papel no crescimento ou morfogênese, embora, como no caso de células em cultura, o nível de controle permaneça ainda desconhecido. Em Tetrahymena pyriformis, um protozoário ciliado, o cAMP parece estar envolvido no controle do metabolismo de carboidratos, particularmente de glicogênio, o polissacarídeo de reserva deste microrganismo (Voichick et al., 1973). Em levedo, mostrou-se que a glicose exerce um efeito repressivo nas enzimas indutíveis (Magasanik, 1961), e que há um aumento nos níveis intracelulares de cAMP, quando a repressão é eliminada (van Wijk & Konijn, 1971), sugerindo que o cAMP pode ter algum papel regulatório no processo catabólico. Ainda mais, Sy & Richter (1972) mostraram que os níveis de cAMP e a atividade da adenilato ciclase aumentavam de 2 a 4 vezes quando as culturas

alcançavam a fase estacionária. Em Mucor racemosus, um fungo dimórfico que possui a capacidade de crescer como levedura ou sob a forma de micélio ramificado, dependendo das condições de cultivo, demonstrou-se que existe uma correlação entre níveis intracelulares de cAMP e a morfologia do fungo: a forma de levedo contém níveis mais altos de cAMP do que a forma micelar e, ainda, a adição de db-cAMP à forma micelar resulta no desenvolvimento da forma de levedura (Larsen & Sypherd, 1974).

Efeitos morfogênicos do cAMP têm sido verificados em outros microrganismos. Yokota & Gots (1970) mostraram que o cAMP é essencial para a formação do flagelo na bactéria E. coli. Em Dictyostelium discoideum, além de atuar como um agente quimiotático na agregação das mixamebas individuais em direção a um centro (Konijn et al., 1967), o cAMP induz a formação de células da base do corpo frutificante a partir da ameba não diferenciada (Bonner, 1970; Darmon et al., 1975). Recentemente, um efeito semelhante ao de Dictyostelium foi encontrado em suspensões de conídios de Aspergillus niger (Wold & Suzuki, 1973).

Há muito se conhecem mutantes morfológicos de Neurospora crassa denominados "crisp", os quais se caracterizam pela incapacidade de formar hifas áreas longas e por apresentarem

um acúmulo exagerado de conídias sobre a superfície da cultura. Resultados recentes mostraram que estes mutantes são deficientes em adenilato ciclase e que a adição de db-cAMP a culturas destas células corrige estes defeitos morfológicos (Torres et al., 1975).

2. REGULAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR DE AMP CÍCLICO

Certamente, se o cAMP exerce a multiplicidade de funções descritas na secção anterior, a sua concentração celular deve estar sujeita a um controle estrito dentro da célula.

A regulação da concentração de cAMP em sistemas biológicos é uma função, principalmente, da velocidade de sua síntese através da adenilato ciclase, e da velocidade de sua degradação pela cAMP-fosfodiesterase; em alguns sistemas, no entanto, a excreção de cAMP no meio parece ser um mecanismo importante na regulação do nível intracelular deste nucleotídeo cíclico.

2.1. Adenilato ciclase

A adenilato ciclase |E.C. 4.6.1.1, ATP pirofosfato liase (ciclisante)| é a enzima que catalisa a formação de cAMP e pirofosfato a partir de ATP e foi primeiramente descrita

em detalhe por Sutherland e colaboradores (Sutherland et al., 1962; Rall et al., 1962; Murad et al., 1962; Klainer et al., 1962). Mostrou-se que a enzima, que eles chamaram adenil ciclase, e cujo nome mais apropriado seria adenilato ciclase ou adenilil ciclase, exigia ATP e Mg^{2+} para seu funcionamento, estava ligada à fração particulada e era encontrada em diversos tecidos animais.

A partir de então, a enzima adenilato ciclase tem sido encontrada também em procariotos e eucariotos primitivos. Até agora, no entanto, uma atividade de adenilato ciclase não foi ainda demonstrada, de maneira inequívoca, em plantas superiores.

A profunda importância metabólica das adenilato ciclasas de mamíferos reside no fato de que sua atividade responde a uma grande variedade de hormônios e outros compostos farmacologicamente ativos, como histamina, serotonina, ouabaina, ou fluoreto de sódio. A maioria das adenilato ciclasas estudadas encontra-se localizada principalmente na membrana plasmática, apesar de, em alguns casos, poder estar associada também à membrana mitocondrial, nuclear ou ainda do retículo endoplasmático (Rabinowitz et al., 1965; Liao et al., 1971). Cátions divalentes têm um papel primordial e ainda não totalmente compreendido na regulação da adenilato ciclase.

Rall & Sutherland (1962) foram os primeiros a mostrar os detalhes da reação catalisada pela enzima, e a necessidade de Mg^{2+} para a sua atividade. Mais tarde, Birnbaumer et al. (1969), estudando a adenilato ciclase de tecido adiposo, e Drummond & Duncan (1970), a de tecido cardíaco, estabeleceram que o verdadeiro substrato da enzima é o complexo $MgATP^{2-}$, baseando-se em que, nas condições ótimas de ensaio (pH 7,0-8,0; $[ATP] > 3 \text{ mM}$; $[Mg^{2+}]$ de 5 a 10 mM), o ATP está predominantemente na forma do complexo $MgATP^{2-}$.

Esses mesmos autores sugeriram a existência de um segundo sítio, além do sítio catalítico, capaz de ligar Mg^{2+} , e cuja ocupação parecia crítica para a expressão da atividade catalítica. Este segundo sítio explicaria a razão da necessidade de uma quantidade de Mg^{2+} maior do que a necessária para a formação estequiométrica do complexo, para que a velocidade máxima fosse atingida, e ainda a diminuição, em presença de fluoreto ou hormônio, da quantidade em excesso de Mg^{2+} necessária para a total ativação da enzima.

Uma explicação alternativa foi proposta por de Haën (1974), sendo, mais recentemente, confirmada por Lin et al. (1975), ao estudar o sistema da adenilato ciclase hepática. de Haën sugeriu um modelo no qual a enzima tem uma afinidade extremamente alta por ATP livre - na forma de $HATP^{3-}$, no

caso da ciclase hepática - a qual foi calculada como cerca de 100 vezes maior do que a afinidade da enzima pelo complexo MgATP^{2-} . Esse modelo poderia explicar os resultados obtidos, tão bem quanto o modelo de um segundo sítio para Mg^{2+} . Lin e colaboradores propuseram ainda que o estado basal da enzima é mais sensível ao efeito inibitório do substrato protonado (HATP^{3-}) do que o estado ativado por ação de glucagon e GTP.

O envolvimento de GTP na regulação hormonal da atividade da adenilato ciclase foi descrito primeiramente para o sistema da adenilato ciclase hepática sensível a glucagon (Rodbell et al., 1971). Estudos subsequentes de outras adenilato ciclases sensíveis a hormônio sugeriram que o nucleotídeo deve estar envolvido nos mecanismos de ação de hormônios peptídicos, catecolaminas e prostaglandinas. Recentemente foi sugerido, ainda para o sistema da adenilato ciclase hepática, um modelo de três estados para a ativação da enzima por glucagon e GTP (Salomon et al., 1975), no qual a ligação de GTP induz a formação de um estado de transição intermediário, que não apresenta aumento da atividade enzimática e que vagarosamente se isomeriza a um estado de alta atividade da adenilato ciclase; o glucagon atua, acelerando a velocidade de isomerização.

Embora todas as adenilato ciclases de tecidos de mamíferos respondam bem a hormônios na presença de Mg^{2+} , esse catíon, dependendo do sistema estudado, pode ser substituído, com razoável eficácia, por Mn^{2+} . Em geral, tem sido mostrado que as atividades, basal e estimulada por fluoreto, tendem a ser iguais ou mesmo mais altas na presença de Mn^{2+} e que a estimulação hormonal é melhor expressa na presença de Mg^{2+} (Birnbaumer, 1973).

Tem sido proposto que o mecanismo de ativação hormonal da adenilato ciclase envolva uma interação alostérica entre o hormônio, a adenilato ciclase e a membrana à qual ela está associada. Os estudos de ativação são complicados pela natureza particulada da enzima; preparações solubilizadas, apesar de cataliticamente ativas e ainda passíveis de estimula - ção por fluoreto, geralmente não respondem à regulação hormonal (Sutherland et al., 1962; Levey, 1970), o que sugere que o sítio regulatório ou é parte da membrana ou depende, para funcionamento, de uma associação entre a enzima e a membrana.

Vários modelos tem sido propostos para explicar o sistema da adenilato ciclase. O modelo de Robinson, Butcher & Sutherland (1967) presumia a existência de duas subunida - des com orientação direcional específica. A interação do hormônio com a subunidade receptora causaria uma alteração no

receptor que, por sua vez, modificaria a subunidade catalítica de forma a se obter uma atividade aumentada. Este modelo parecia adequado a células respondendo a um único hormônio; no entanto, para células cuja adenilato ciclase responde a vários hormônios, o modelo já se tornava menos razoável.

Recentemente, Birnbaumer et al. (1970) propuseram um modelo para o sistema de adenilato ciclase composto de um receptor (discriminador hormonal), um transdutor e um amplificador (unidade catalítica). O termo transdutor é usado para denotar o elemento que acopla os eventos ocorrendo no discriminador aos eventos tendo lugar no amplificador. Este modelo explicava os resultados obtidos nos estudos de adenilato ciclases que apresentam regulação multivalente (Butcher et al., 1968; Birnbaumer & Rodbell, 1969), mostrando que diferentes hormônios não interagem com um receptor comum e que o sistema da adenilato ciclase tem receptores que são tanto distintos quanto específicos para cada um dos hormônios ativos. No entanto, esses resultados são também compatíveis com um sistema de adenilato ciclase que fosse composto de uma parte receptora e outra catalítica, distintas e separadas fisicamente, mas capazes de interação como resultado de sua posição numa matriz lipídica dinâmica (Singer & Nicolson, 1972).

Uma vez que os sistemas de adenilato ciclases sensíveis a hormônios são firmemente ligados à membrana plasmática

das células, muitas das propriedades destes complexos multimo-
leculares são condicionados ao meio no qual estão localizados.
Assim, o tratamento de membranas plasmáticas de fígado com
fosfolipase A resulta em perda da resposta do sistema de glucag-
on, sem que haja perda da atividade basal ou da estimulação
por fluoreto, indicando um possível papel para os fosfolipí-
dios na regulação do processo de acoplamento entre interação
hormônio-receptor e catálise (Pohl et al., 1971). Levey, tra-
balhando com adenilato ciclase de coração de gato, eviden-
ciou um papel mais específico para os fosfolipídios na expres-
são da interação hormônio-receptor na estimulação da ativida-
de enzimática. Numa série de elegantes experimentos (Levey,
1971a; Levey, 1971b), o autor demonstrou que o tratamento
da adenilato ciclase de coração com o detergente não iônico
Lubrol PX resultava na perda da resposta da enzima a norepine-
frina e glucagon e que, dependendo do fosfolipídio que fosse
adicionado, a resposta hormonal podia ser seletivamente resta-
belecida. Portanto, os fosfolipídios parecem estar intimamen-
te relacionados com o mecanismo responsável pelo acoplamen-
to entre a interação hormônio-receptor e a ativação da enzi-
ma.

A diferença fundamental entre as adenilato ciclases
de mamíferos e as de procariotos e eucariotos primitivos pare-
ce estar relacionada à sua regulação. Como vimos, em células

de mamíferos, a síntese de cAMP é regulada através da ação hormonal sobre a atividade da adenilato ciclase, enquanto que, em células de procariotos e eucariotos primitivos, esta regulação parece estar relacionada ao estado nutricional.

A primeira adenilato ciclase a ser parcialmente purificada em procariotos foi a de Brevibacterium liquefaciens. Hirata & Hayaishi (1967) relataram que a enzima era solúvel, e exigia Mg^{2+} e piruvato para atividade. No entanto, observações recentes por Chiang & Cheung (1973) indicam que, na sua forma nativa, a adenilato ciclase de B. liquefaciens deve estar associada à membrana bacteriana. Uma preparação parcialmente purificada tinha as características de uma lipo-glicoproteína; a enzima era reversivelmente ativada por piruvato e DL-lactato, sendo a ativação abolida por tratamento da enzima com fosfolipases. A ocorrência de uma adenilato ciclase particulada, mas facilmente solubilizada, em Escherichia coli também foi relatada (Tao & Lipmann, 1969; Tao & Huberman, 1970). Os autores mostraram que a enzima possuía um pH ótimo entre 9,0 e 9,5, tinha uma necessidade absoluta de Mg^{2+} para seu funcionamento, e era inibida por fluoreto e pirofosfato. Recentemente, mostrou-se que a atividade "in vivo" da adenilato ciclase de E. coli B é inibida por glicose, mas não por glicose-6-fosfato (Harwood & Peterkofsky, 1975), explicando assim o decréscimo dependente de glicose na concentração de cAMP, em células

de E. coli, pela inibição da adenilato ciclase. Ide (1971) examinou 21 cepas bacterianas diferentes, sendo incapaz de detectar atividade de adenilato ciclase em diversos bacilos.

Em eucariotos primitivos, como Tetrahymena pyriformis, foi encontrada atividade de adenilato ciclase associada à fração da membrana plasmática. A enzima dependia de fluoreto e Mg^{2+} para atividade. T. pyriformis sintetiza epinefrina, norepinefrina e serotonina, e foi demonstrado que a adenilato ciclase era ativada tanto por epinefrina como por serotonina (Rosensweig & Kindler, 1972). Outra enzima de eucarioto primitivo que se demonstrou ser ativada por hormônio, foi a adenilato ciclase de Neurospora crassa, descrita numa série de artigos por Flawiã & Torres (1972a, 1972b, 1972c). A enzima, que exige Mn^{2+} especificamente, está ligada à membrana e íons fluoreto não exercem qualquer efeito sobre a atividade. A enzima particulada é ativada por glucagon, quando baixas concentrações equimolares (0,25 mM) de ATP e Mn^{2+} são usadas; a solubilização da enzima pelo detergente não-iônico Lubrol PX elimina a ativação por glucagon. Dados cinéticos sugerem a existência de um sítio alostérico para Mn^{2+} , similar ao que foi proposto no caso das enzimas de mamíferos. No levedo Saccharomyces cerevisiae, encontrou-se a atividade de adenilato ciclase associada à fração particulada intracelular, pouca atividade sendo encontrada associada à membrana

plasmática (Wheeler et al., 1974). A atividade da enzima era inibida por fluoreto, pirofosfato e aminofilina, enquanto glucagon e concanavalina A não tinham qualquer efeito. A atividade enzimática parece ser modulada por substâncias responsáveis por repressão por catabólito (glicose, frutose) e também por acetato, sugerindo um provável papel para a adenilato ciclase na regulação dos níveis de cAMP da célula, durante a repressão por glicose.

A compreensão do mecanismo de regulação da atividade de adenilato ciclase, tanto em bactérias como em eucariotos primitivos, encontra-se ainda em estado rudimentar. O significado da ativação por hormônios, encontrada em alguns eucariotos primitivos, não é claro, parecendo mais viável a hipótese de que a regulação da atividade da ciclase nestes microrganismos se dê ao nível nutricional.

A possibilidade de que a adenilato ciclase seja regulada pela carga energética da célula (Atkinson & Walton, 1967) também deve ser considerada, sendo que este mecanismo de controle escaparia de detecção. Chapman et al. (1971) mostraram que em E. coli a carga energética passa de um valor de 0,8 durante o crescimento para 0,5 após a exaustão da fonte de carbono, o que indicaria uma grande variação na concentração de substrato disponível nas diferentes fases do ciclo.

2.2. AMP cíclico fosfodiesterase

A enzima que catalisa a hidrólise do cAMP a 5'-AMP, chamada 3',5'-monofosfato cíclico de adenosina 3'-hidrolase (E.C. 3.1.4.17), foi primeiramente descrita por Sutherland & Rall (1958). Desde então, fosfodiesterases capazes de hidrolisar cAMP e/ou cGMP têm sido descritas em uma variedade enorme de tecidos animais, plantas, procariotos e eucariotos primitivos (Appleman et al., 1973; Rickenberg, 1974; Lin, 1974).

As condições ótimas para ensaio das fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos variam com a fonte da enzima, mas, em geral, o pH ótimo é em torno de 7,5 a 8,5 e há necessidade de íon metálico divalente, melhor satisfeita por Mg^{2+} , embora este possa ser substituído por Mn^{2+} .

Quanto à distribuição subcelular, as fosfodiesterases podem ocorrer, em uma mesma célula, tanto na forma solúvel como particulada (Appleman et al., 1973).

As metilxantinas (teofilina, cafeína, aminofilina) são inibidores clássicos das fosfodiesterases, usadas frequentemente para inibir a degradação indesejável de nucleotídeos cíclicos em ensaios de adenilato e guanilato ciclases, ou servindo como agentes sinérgicos para estudos "in vitro" ou

"in vivo" da ação de cAMP e cGMP. Estudos "in vitro" da inibição da atividade de fosfodiesterase por teofilina indicam que este composto é um inibidor competitivo da enzima (Butcher & Sutherland, 1962).

As diferentes formas de fosfodiesterasas encontradas em diversos tecidos animais tem sido demonstradas, usando-se uma variedade de técnicas: análise cinética de preparações parcialmente purificadas, separação física das múltiplas formas moleculares de fosfodiesterasas através de cromatografia em DEAE-celulose, filtração em agarose e Sephadex ou ainda eletroforese em gel de poliacrilamida.

Cromatografia em DEAE-celulose de extratos de fígado de rato preparados por homogeneização, sonicação e centrifugação indicou a presença de três frações ativas, que foram chamadas D I, D II e D III, de acordo com sua eluição da coluna por um gradiente de sal (Russel et al., 1973). D I foi caracterizada como uma cGMP fosfodiesterase, visto que, quando ensaiada em concentrações sub-saturantes, detectava-se pouca, se alguma, hidrólise de cAMP. A segunda fração, D II, parecia hidrolisar ambos os nucleotídios a velocidades quase iguais, enquanto que a terceira fração, D III, foi classificada como uma fosfodiesterase específica para cAMP.

Esta análise cromatográfica tem sido aplicada a uma variedade de outros tecidos de mamíferos, tais como coração, rim, cérebro, fornecendo evidências de três frações com atividade de fosfodiesterase, embora a separação às vezes não tenha sido tão clara quanto em fígado. A notável diferença entre tecidos parece recair sobre as quantidades relativas das diferentes formas de fosfodiesterase (Appleman & Terasaki, 1975). Apesar da variação quantitativa, há boa evidência cinética de que cada fração é basicamente similar nos vários tecidos. A fração I sempre parece seguir um comportamento cinético michaeliano com uma afinidade relativamente alta por cGMP ($K_m \approx 10^{-6}M$), sendo a atividade em relação a cAMP, variável mas sempre muito menor. A fração II tem um K_m apenas um pouco mais baixo para cGMP do que para cAMP, mas a afinidade por ambos os substratos é relativamente baixa ($K_m \approx 10^{-5}M$). Cada nucleotídeo cíclico atua como inibidor não competitivo na hidrólise do outro; a hidrólise de ambos os nucleotídeos apresenta cooperatividade positiva. A fração III é uma fosfodiesterase com alta afinidade por cAMP, apresentando cooperatividade negativa, e sendo inibida por cGMP.

Parece claro, portanto, que existe um conjunto de atividades de fosfodiesterasas característico a todos os tecidos animais examinados. As diversas formas das fosfodiesterasas de nucleotídeos cíclicos exibem diferentes propriedades

catalíticas e regulatórias e devem, portanto, ter papéis fisiológicos diferentes.

A atividade de fosfodiesterase de nucleotídeos cíclicos de uma variedade de fontes parece estar sujeita a fatores endógenos capazes de ativação ou inibição da enzima. Um ativador de origem proteica foi descoberto em cérebro de rato, independentemente por Cheung (1970, 1971) e Kakiushi et al. (1970) e em coração de boi por Goren & Rosen (1971). Tanto Cheung como Goren & Rosen observaram a existência da proteína ativadora durante a purificação da enzima. A perda de grande parte da atividade, observada durante a cromatografia em coluna de DEAE-celulose, pode ser recuperada pela adição de um fator não dialisável, estável a aquecimento, normalmente presente nos extratos; devido à sua sensibilidade à digestão proteolítica e à resistência a tratamento com RNase e DNase, esse fator foi chamado de proteína ativadora (Cheung, 1971). Por outro lado, Kakiushi et al. (1970) descobriram a proteína ativadora durante o estudo de uma fosfodiesterase dependente de Ca^{2+} de cérebro de rato; a adição de um fator não-dialisável, estável a aquecimento, à mistura de ensaio aumentava a sensibilidade da enzima a Ca^{2+} .

Recentemente a proteína ativadora foi obtida com grande grau de purificação a partir de coração bovino

(Teo et al., 1973) e de cérebro bovino (Liu et al., 1974), e foi estabelecido que a ativação da fosfodiesterase de nucleotídeo cíclico por Ca^{2+} e pela proteína ativadora são mutuamente dependentes. O ativador proteico puro liga Ca^{2+} forte e especificamente, e foi sugerido que o complexo proteína ativadora- Ca^{2+} é o verdadeiro ativador da fosfodiesterase (Teo & Wang, 1973).

Fosfodiesterases dependentes de Ca^{2+} e de uma proteína ativadora têm sido descritas em uma variedade de outros tecidos, tais como fígado e rim. A enzima, na presença de Ca^{2+} e da proteína ativadora, hidrolisa preferencialmente cGMP, quando incubada com baixas concentrações de substrato. Análises cinéticas revelam que, embora a hidrólise de cAMP seja quase nula a baixas concentrações de substrato, a altas concentrações, o cAMP é melhor substrato do que o cGMP; como os níveis de cAMP nos tecidos são de 1 ou 2 ordens de grandeza maiores do que os níveis de cGMP, há possibilidade de que o cAMP também seja um substrato fisiológico.

A presença de formas múltiplas de fosfodiesterases tem sido descrita em alguns eucariotos primitivos. Assim, em Neurospora crassa, estudos cinéticos forneceram duas constantes de afinidade para a enzima (Scott & Salomon, 1973), e em Tetrahymena pyriformis, foram separadas formas múltiplas

por filtração em gel (Ramanathan & Chou, 1973). Em Physarum polycephalum, demonstrou-se a liberação no meio de crescimento de uma fosfodiesterase com propriedades cinéticas diferentes das da enzima encontrada na fração particulada de extratos do mesmo organismo (Murray et al., 1971). Uma fosfodiesterase foi também encontrada no meio de cultura de Dictyostelium discoideum: a enzima não necessita de Mg^{2+} ou Mn^{2+} e não é inibida por cafeína (Chang, 1968), parecendo estar envolvida no estabelecimento de gradientes extracelulares de cAMP, o qual, por sua vez, causa agregação das células individuais (Bonner, 1970). Recentemente, demonstrou-se que a síntese desta enzima pode ser induzida através da adição de cAMP (Klein, 1975).

Na bactéria Escherichia coli, foi encontrada uma fosfodiesterase que parece necessitar de três componentes para atividade máxima. O componente I é a unidade catalítica, de alto peso molecular, o componente II é uma proteína de baixo peso molecular, e o componente III é um ativador dialisável (Monard et al., 1969). Em extratos de Bacillus licheniformis, foi detectada, após cromatografia em DEAE-celulose, a presença de duas frações com atividade de fosfodiesterase, capazes de hidrolisar tanto cGMP quanto cAMP (Hwang et al., 1974).

Em resumo, fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos podem ocorrer como misturas complexas de diferentes formas, capazes de hidrolisar cAMP e/ou cGMP, e cuja atividade pode ser regulada por interação entre cAMP e cGMP, por interação com um ativador proteico, ou por indução (d'Armiento et al., 1972; Klein, 1975).

2.3. Excreção do AMP cíclico

O terceiro mecanismo de controle da concentração intracelular de cAMP, a sua liberação das células para o meio, tem sido descrito em vários sistemas biológicos.

Davoren & Sutherland (1963) observaram a liberação de cAMP em eritrócitos intactos de pombo contra um aparente gradiente de concentração e sugeriram a existência de um sistema capaz de bombear ativamente o nucleotídeo cíclico para fora da célula. Seus experimentos com probenecidmostraram que a síntese de cAMP pode continuar, quando a liberação de cAMP é bloqueada, sugerindo que o transporte e a síntese envolvem processos distintos. A excreção de cAMP tem sido descrita em muitas outras células de mamíferos, inclusive em células tumorais, havendo fortes evidências de que o processo é dependente de energia, cuja fonte direta pode ser o ATP (Doore et al., 1975).

Em bactéria, particularmente E. coli, foi demonstrado (Makman & Sutherland, 1965) que, na presença de glicose, o cAMP desaparece das células e aparece rapidamente no meio de cultura, sugerindo um efeito da glicose tanto inibindo a formação do nucleotídeo cíclico quanto estimulando a sua excreção da célula. Este efeito também podia ser obtido com várias outras substâncias, incluindo acetato. Recentemente, foi demonstrado em células intactas de E. coli e S. typhimurium (Saier et al., 1975) que os açúcares têm dois efeitos principais no metabolismo de cAMP: i) inibem a síntese de cAMP enquanto promovem a sua degradação; ii) estimulam o efluxo de cAMP para o meio extracelular. Enquanto o efeito i) é causado tanto por açúcares metabolizáveis como não metabolizáveis, o efeito ii) só é observado com açúcares metabolizáveis. Ainda mais, esses resultados sugerem que a excreção de cAMP da célula bacteriana é dependente de energia e originado por um estado energizado da membrana.

O acúmulo de cGMP no meio de cultura durante o crescimento de E. coli também foi descrito recentemente (Shibuya et al., 1976). A concentração de cGMP no meio extracelular aumenta paralelamente à curva de crescimento, atingindo um patamar quando as células entram em fase estacionária. Assim, embora o aumento de cAMP no meio não possa ser relacionado com o crescimento celular, no caso da excreção de cGMP, parece

ser possível fazer esta correlação.

No eucarioto primitivo Dictyostelium discoideum, onde o cAMP atua como agente quimiotático durante a fase de agregação das mixamebas, mostrou-se também que as células em agregação excretam cAMP, de maneira a produzir um gradiente de concentração do nucleotídeo cíclico no meio (Malkinson & Ashworth, 1973).

Assim, o processo de excreção de nucleotídeos cíclicos das células parece ser extensivo a vários sistemas biológicos e deve ter papel importante na regulação dos níveis intracelulares desses nucleotídeos, assim como nos processos intercelulares.

PARTE B

1. O CICLO BIOLÓGICO DE Blastocladiella emersonii

O fungo aquático Blastocladiella emersonii, descoberto por Cantino (1951), tem um ciclo evolutivo assexuado (Figura 1) que pode ser dividido em cinco estágios bem definidos: a fase de zoósporo, a germinação, o crescimento exponencial, a formação de esporângio e a diferenciação em zoósporo (esporulação), completando-se o ciclo (Lovett, 1975).

Figura 1 - Ciclo evolutivo de *Blastocladiella emersonii*. 1. zoósporo, 2. esferócito, 3. gérmen; 4. célula nas fase exponencial, 5. esporângio papilado, 6. esporângio liberando zoósporos.

O tempo de duração de cada estágio depende significativamente das condições de crescimento.

2. AS FASES DO CICLO

2.1. O zoósporo

O ciclo de B. emersonii começa com o zoósporo, uma célula única, móvel, assexuada, que não cresce. O zoósporo pode encistar e começar a germinação poucos minutos após a sua liberação do esporângio, ou pode permanecer nadando por muitas horas, dependendo da composição do meio em que se encontra (Soll & Sonneborn, 1971a, 1972; Suberkropp & Cantino, 1972, 1973). Trata-se de uma célula altamente diferenciada, cujas características mais proeminentes, sob o microscópio óptico, são um longo flagelo posterior flexível, um grande capacete nuclear envolvendo a maior parte do núcleo, uma única e enorme mitocôndria localizada excentricamente ao redor do núcleo, e grânulos de glicogênio e lipídios.

O capacete nuclear contém essencialmente todos os ribossomos celulares, do tipo 80S (Lovett, 1963), envolvidos por uma dupla membrana citoplasmática, que é também contínua com a membrana unitária externa do envelope nuclear.

No citoplasma do zoósporo encontram-se ainda organelas denominadas partículas gama (Cantino & Mack, 1969). São

corpúsculos densos, envoltos por membrana, presentes somente no citoplasma de zoósporos e de função desconhecida (Cantino & Myers, 1973).

O zoósporo possui uma característica própria, que é a ausência de parede celular.

2.2. A germinação do zoósporo

A germinação é acompanhada por uma série de mudanças abruptas na estrutura celular do zoósporo. Os fatores que influenciam a germinação, tais como ambiente iônico, densidade celular, e tratamento prévio, e a cinética do processo têm sido estudados extensivamente nos laboratórios de Cantino (Cantino et al., 1969; Truesdell & Cantino, 1971; Suberkropp & Cantino, 1972) e de Sonnerborn (Soll & Sonneborn, 1969, 1972).

A ordem dos eventos subcelulares que acompanham a germinação foi parcialmente caracterizada por Soll & Sonneborn (1972). Os primeiros eventos parecem ser o resultado de alterações locais da membrana, envolvendo rearranjos de estruturas pré-existentes. O flagelo se retrai, a célula se torna arredondada, adquirindo uma parede celular de quitina, a membrana do capacete nuclear é destruída e os ribossomos se dispersam pela célula; surgem os primeiros vestígios

de retículo endoplasmático, a mitocôndria única se subdivide e as partículas gama características do zoósporo desaparecem. As células neste estágio são chamadas de esferócitos. O esferócito se transforma em gérmen pelo aparecimento, em um dos polos da célula, de um tubo germinal precursor do sistema rizoidal da célula em crescimento.

Vários investigadores têm concordado que a maioria dos eventos anteriores ao aparecimento do tubo germinal pode ocorrer na ausência de síntese proteica detectável e, mais, que a sequência completa da germinação, inclusive a formação do tubo germinal, pode ocorrer na ausência de síntese mensurável de RNA (Lovett, 1975). Dados que contribuíram para estas conclusões foram relatadas por Soll & Sonneborn (1971b) e Leaver & Lovett (1974), mostrando que a adição de cicloheximida (inibidor de síntese proteica) e de actinomicina D (inibidor de síntese de RNA) ao meio de cultura não bloqueava a transformação de zoósporo a esferócito. Entretanto, a transformação de esferócito a gérmen era impedida por cicloheximida, indicando assim que esta transição era dependente de síntese proteica.

Em presença de CaCl_2 1 mM e ausência de cátions monovalentes, os zoósporos podem ser mantidos em um estado móvel e viável por longos períodos de tempo (Suberkropp &

Cantino, 1972). Quando diluídos em um meio contendo KCl, rapidamente iniciam o processo de germinação (Soll & Sonneborn, 1969; Truesdell & Cantino, 1971), com cinética idêntica à obtida na germinação em meio nutriente definido. Dessa maneira, a adição de íons de potássio, em ausência de qualquer nutriente ou outro fator externo, parece ser o sinal que faz desencadear o processo de germinação. O íon K^+ pode ser substituído por Na^+ , Rb^+ e Cs^+ , mas não por Li^+ , que bloqueia completamente e reversivelmente o processo. O mecanismo de ação destes íons ainda é desconhecido.

Em condições ótimas, cem por cento dos zoósporos formarão esferócitos em um período de 15 a 20 minutos, e a germinação completa, isto é, a passagem de zoósporos a gêrmens, se dá em menos de 60 minutos, com alto grau de sincronia (Soll et al., 1969).

2.3. O crescimento exponencial

Quando o primeiro rizóide já está bem definido, a célula passa a crescer rapidamente e o citoplasma começa a apresentar características da fase de crescimento. As mudanças mais proeminentes são o aumento do nucléolo previamente compacto do zoósporo, um aumento na quantidade de retículo endoplasmático e o aparecimento de estruturas equivalentes

ao aparato de Golgi.

A célula cresce em tamanho e o seu único núcleo inicial se divide inúmeras vezes, sem que haja divisão celular, formando um sincício, dotado de espessa parede quitinosa e de um sistema rizoidal amplamente ramificado.

O crescimento da célula em fase logarítmica pode estender-se por tempos variados, dependendo das condições de cultivo. Nas condições por nós utilizadas, a célula atinge o patamar da curva de crescimento aproximadamente 12 horas após a inoculação; neste ponto, a célula cresceu cerca de 100 vezes em relação ao zoósporo (Camargo, 1969).

2.4. O esporângio

Células em crescimento podem ser induzidas a diferenciar em esporângio em qualquer estágio, através da troca do meio nutriente por solução inorgânica tamponada.

As duas mudanças mais óbvias, que podem ser observadas ao microscópio durante a conversão a esporângio, são a formação do septo e da papila; estes eventos são, no entanto, acompanhados por numerosas alterações intracelulares menos evidentes. O septo consiste em uma parede celular que se forma separando a planta multinucleada da região rizoidal. A

papila se forma na parte da parede celular oposta aos rizóides e é a abertura por onde os zoósporos deixam a célula-mãe, durante a esporulação. A abertura da papila é impedida pela presença de concanavalina A (Lemos & Lodi, 1975).

Nas condições habituais de cultivo, as células em crescimento transformam-se em esporângios assincronicamente. Por outro lado, quando as células são cultivadas em meio definido (Soll et al., 1969), ao se substituir o meio nutriente por uma solução de CaCl_2 1 mM, a qualquer momento da fase de crescimento, a formação de esporângios ocorre com grande sincronia e eficiência.

2.5. A esporulação

A formação de zoósporos dentro de um esporângio segue um padrão característico. O primeiro evento claramente identificável na diferenciação do zoósporo é o início da formação do flagelo; a seguir, temos a clivagem do citoplasma, a aparente fusão das mitocôndrias, a formação do capacete nuclear e, finalmente, a liberação dos esporos recém-formados (Lessie & Lovett, 1968).

A esporulação espontânea de uma população celular não é total nem sincrônica. Quando, porém, sincroniza-se a formação do esporângio, a partir da célula em crescimento,

automaticamente obteremos uma esporulação sincrônica.

O número de zoósporos liberados pela célula-mãe pode variar de acordo com as condições de cultivo. A célula cultivada em meio definido libera cerca de cinco vezes menos zoósporos do que a célula crescida em meio complexo.

O metabolismo de proteínas e ácidos nucleicos durante a esporulação foi estudado por Murphy & Lovett (1966).

3. NUCLEOTÍDIOS CÍCLICOS EM Blastocladiella emersonii

Como vimos, B. emersonii apresenta um ciclo evolutivo dos mais favoráveis para o estudo dos eventos relacionados a crescimento e citodiferenciação. Em seu ciclo biológico, o período de crescimento é precedido (germinação) e seguido (esporulação) por períodos, onde não há crescimento, que se caracterizam por mudanças dramáticas na estrutura e funções celulares.

Especialmente durante a germinação dos zoósporos de B. emersonii, a maior parte das mudanças morfológicas e bioquímicas parece ocorrer sem necessidade de concomitante transcrição e/ou tradução. Assim, nesta fase, devem estar envolvidos mecanismos de controle não diretamente relacionados com a expressão gênica.

O acúmulo de evidências sobre o envolvimento dos nucleotídeos cíclicos (cAMP e cGMP) na regulação de um grande número de processos metabólicos, tanto em procariotos como em eucariotos, tem atraído a atenção para o metabolismo e função destes nucleotídeos cíclicos em B. emersonii.

Maia & Camargo (1974) mostraram a existência, neste fungo, de uma cAMP fosfodiesterase, cuja atividade específica sofre mudanças dramáticas durante o ciclo evolutivo.

Uma atividade específica para cGMP foi também descrita em B. emersonii (Vale et al., 1975). A atividade específica desta enzima varia através do ciclo celular do fungo, de maneira similar à variação da atividade da cAMP fosfodiesterase (Vale & Maia, 1976).

A presença de cAMP e cGMP em B. emersonii foi demonstrada por Silverman & Epstein (1975), que estudaram as variações nas concentrações destes nucleotídeos cíclicos durante o ciclo biológico do fungo. Os autores mostraram que os níveis de cAMP eram mais altos no zoósporo do que na célula vegetativa. Posteriormente, as variações do cAMP durante a transição de zoósporo a esferócito foram determinadas (Vale et al., 1976). Quanto aos níveis de cGMP, encontrou-se que aumentavam durante a esporulação, quando cessa o crescimento, e diminuíam durante a liberação dos zoósporos, caindo mais

ainda na germinação, pouco antes do início da fase de crescimento.

Recentemente, foi documentada em B. emersonii a existência de uma atividade de guanilato ciclase (Silvermann, 1976), cujos níveis de atividade variam cerca de 100 vezes em diferentes estágios do ciclo, paralelamente às mudanças de concentração de cGMP que ocorrem no organismo.

Tem sido uma preocupação deste laboratório, nos últimos anos, tentar elucidar a função que possa desempenhar o cAMP nos mecanismos de regulação do crescimento e/ou da citodiferenciação da Blastocladiella emersonii. Para tanto, seria necessário:

- a) demonstrar a existência de enzimas implicadas no seu metabolismo, e as suas características bioquímicas;
- b) verificar as mudanças de concentração do cAMP ao longo do ciclo evolutivo e conhecer os fatores responsáveis por essa flutuação;
- c) demonstrar a presença de proteínas aceptoras de cAMP ou de proteínas quinases dependentes de cAMP, e envolvidas com sua função.

Estas informações possibilitariam experimentos, nos quais, quer por adição de cAMP exógeno, quer por inibição específica das enzimas envolvidas em seu metabolismo, pudéssemos

obter alterações de funções celulares relacionadas com o seu modo de ação. Nesta estratégia, estaria incluída a obtenção de mutantes do metabolismo de cAMP.

Esta tese relaciona-se com os dois primeiros itens acima descritos. No que se refere à cAMP fosfodiesterase, como extensão dos trabalhos de Maia & Camargo (1974), mostramos a especificidade da enzima e algumas de suas propriedades cinéticas e físico-químicas. Um estudo detalhado da adenilato ciclase, suas características cinéticas, e a correlação entre as variações de atividade específica das duas enzimas e as flutuações da concentração intracelular de cAMP, durante o ciclo evolutivo, permitiram algumas conclusões sobre o controle do metabolismo deste nucleotídeo cíclico em Blastocladiella emersonii.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. CÉLULAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A linhagem selvagem de Blastocladiella emersonii utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pelo Dr. E. Plessmann Camargo, sendo desde 1973, mantida em nosso laboratório por repiques de culturas estoque. O cultivo é feito em placas de PYG-agar (meio sólido) ou em meio líquido DM4.

1.1. Cultivo em placas de PYG-agar

O meio de cultura PYG-agar consiste de uma mistura de peptona, extrato de levedo e glicose, com adição de 1% de agar, como descrito por Turian & Cantino (1959). Placas de Petri contendo PYG-agar eram utilizadas para culturas estoque e obtenção de zoósporos de primeira geração.

1.1.1. Obtenção de zoósporos de primeira geração

Culturas em placas PYG-agar eram renovadas diariamente por repique de zoósporos (cerca de 1×10^6 zoósporos por placa de 14 cm de diâmetro), os quais após germinarem na superfície do agar, crescem por 16 a 20 horas a 22°C e transformam-se em esporângios maduros. A liberação de zoósporos desses

esporângios pode ocorrer espontaneamente ou através da indução da esporulação por adição de água bidestilada. Os zoósporos liberados, chamados zoósporos de 1ª geração, eram utilizados no repique diário de novas placas ou coletados e utilizados nos experimentos.

1.1.2. Culturas estoque

A baixas temperaturas (4°C), o crescimento progressivo da célula vegetativa é lento, permitindo assim estocá-las por alguns dias. Para dar continuidade ao seu desenvolvimento normal, bastava elevar a temperatura para 24°C e induzir-se a esporulação pela adição de água bidestilada. Após 6 ou 7 horas, os zoósporos eram liberados. A semeadura destes zoósporos em novas placas permitia a manutenção das culturas.

1.2. Cultivo em meio líquido DM4

O meio líquido DM4 consiste de uma mistura definida de sais, aminoácidos e glicose, e é uma modificação do meio DM2, descrito por Soll et al. (1969), contendo 0,12 g/l de extrato de levedo. Este meio era utilizado para a obtenção de células vegetativas e de zoósporos que, nessas condições, são liberados dos esporângios com elevado grau de sincronia.

1.2.1. Zoósporos provenientes de crescimento em DM4

Zoósporos de 1^a geração eram inoculados em placas de polycarbonato, contendo 13 ml de DM4 (1×10^6 zoósporos por placa). As placas eram incubadas a 20°C por 16 horas, aproximadamente, quando então procedia-se à retirada do meio nutriente. Como ao germinar as células aderem firmemente à superfície de polycarbonato das placas, torna-se fácil a retirada do meio, que é feita por sucção com pipeta Pasteur. As placas eram lavadas três vezes com 4 ml de solução de esporulação (tampão Tris-maleato 1 mM, pH 6,8, contendo CaCl_2 1 mM) e então incubadas a 27°C com 3 ml da mesma solução. A esporulação ocorria dentro de 3 a 3,5 horas após a indução com CaCl_2 , com alto grau de sincronia e eficiência. Os zoósporos assim obtidos são por nós designados de zoósporos de DM4.

1.2.2. Crescimento e esporulação das células vegetativas

Fazia-se em balão de Fauerbach (capacidade para 2 litros) contendo 500 ml de DM4 à temperatura constante de 27°C e sob agitação giratória de 200 rpm. Como inóculo, utilizávamos 1×10^8 zoósporos de DM4 por 500 ml do meio líquido. Nessas condições, os zoósporos germinavam completa e sincronicamente dentro de 60 minutos, seguindo-se então a fase de crescimento. Para se obter a esporulação com alto grau de

sincronia e eficiência, procedia-se à retirada do meio nutri_{ente}, após 6 horas de crescimento, por filtração em rede de nylon com malhas de 30 micras. As células eram lavadas com solução de esporulação e mantidas nessa solução sob as mesmas condições mencionadas. Uma esporulação 100% eficiente ocorria dentro de 3 a 3,5 horas após a indução com solução tampoadade de CaCl_2 .

A identificação e quantitativação das diferentes formas celulares de B. emersonii, durante a germinação, foram feitas por observação ao microscópio de fase, segundo método de Soll et al. (1969).

1.3. Coleta e armazenamento de células vegetativas e zoósporos

A coleta de células vegetativas ou de zoósporos era feita por centrifugação em tubos cônicos, a 1000 x g por 3 minutos. O sedimento obtido, conforme o experimento a que se destinava, era imediatamente utilizado (no caso dos experimentos da adenilato ciclase), ou congelado em nitrogênio líquido e mantido a -70°C (para os experimentos de fosfodiesterase), ou ainda congelado em gelo seco-acetona, tratado com ácido tricloroacético (TCA) a 5% e armazenado a -70°C (nos experimentos para dosagem da concentração intracelular de cAMP).

2. FRACIONAMENTO CELULAR

Nos ensaios da adenilato ciclase, utilizávamos extratos de células recém-colhidas. Após a coleta de zoósporo ou células vegetativas, fazia-se o fracionamento celular. Os sedimentos de células eram ressuspensos em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,5 e em seguida as células eram quebradas em prensa francesa a uma pressão de 1000 psi. Essas preparações brutas eram centrifugadas por 30 minutos a 1000 x g, obtendo-se o que denominamos de sedimento de 1000 x g. O sobrenadante obtido era centrifugado diretamente a 105000 x g por 90 minutos. Em alguns casos especiais, antes da centrifugação a 105000 x g, procedia-se a uma centrifugação a 20000 x g por 30 minutos. Os sedimentos de 1000 x g, 20000 x g e 105000 x g eram então ressuspensos em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,5, e utilizados nos ensaios da adenilato ciclase.

Nos ensaios da fosfodiesterase, usavam-se células vegetativas ou zoósporos congelados, que eram ressuspensos em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo β -mercaptoetanol 1 mM, $MgCl_2$ 5 mM, KCl 10 mM e PMSF 0,15 mg/ml. Os zoósporos congelados rompem-se espontaneamente ao serem descongelados em agitador de tubos. As células vegetativas após degelo, eram rompidas em prensa francesa a 1000 psi, procedendo-se ao fracionamento como descrito anteriormente. O sobrenadante de

105000 x g obtido era a fração utilizada na posterior purificação de cAMP fosfodiesterase ou diretamente em alguns ensaios.

3. cAMP FOSFODIESTERASE

3.1. Ensaio da atividade enzimática

A atividade de cAMP fosfodiesterase foi determinada através do método de duas etapas desenvolvido por Butcher & Sutherland (1962). A mistura padrão de incubação, exceto quando indicado diferentemente, consistia de [^3H]-cAMP 160 μM (2500 cpm por nmol); tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo β -mercaptoetanol 1 mM, MgCl_2 5 mM, KCl 10 mM e PMSF, 0,15 mg/ml; e enzima, num volume final de 0,1 ml. A mistura de reação era incubada por 8 minutos a 30°C e a reação interrompida por aquecimento a 100°C por 2 minutos. Eram então adicionados a cada tubo, 50 μg de veneno de cobra (Naja naja), procedendo-se a nova incubação de 15 minutos a 30°C, para a conversão de todo o 5'-AMP (produto da hidrólise do cAMP) a adenosina. Ao fim deste período, 1 ml de resina Dowex AG1-X2 em água (1:3 v/v), era adicionado às misturas. Após agitação e centrifugação, alíquotas de 0,1 ml do sobrenadante eram adicionadas a 4 ml de líquido de cintilação (5 g de PPO, 100 g de naftaleno/1 de dioxana), e a radioatividade determinada em um contador de cintilação.

Os controles de cada experimento eram obtidos substituindo-se no ensaio a enzima por água ou enzima fervida e nunca ultrapassavam 1% da radioatividade total colocada.

3.2. Caracterização do produto da reação

As misturas de reação contendo homogenatos crus dão como produto 5'-AMP e grande quantidade de adenosina, mesmo na ausência de veneno de cobra. Para a identificação do produto imediato da degradação do cAMP pela fosfodiesterase, tornava-se pois necessário minimizar a produção de adenosina, o que foi conseguido através da utilização de preparações de enzima parcialmente purificada através de gradientes de glicérol. As frações do gradiente exibindo atividade de cAMP fosfodiesterase eram então usadas como fonte de enzima em misturas de incubação padrão, omitidas as etapas de incubação com veneno de cobra e adição de resina Dowex. Após incubação, alíquotas das misturas de reação eram cromatografadas em papel Whatman nº 1, juntamente com os marcadores 5'-AMP, 3'-AMP, cAMP e adenosina, usando-se 0,05 μ moles de cada. Após corrida ascendente por 16 horas a 22°C em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado (79%), acetato de sódio 0,1 M, pH 6, (19%), e isopropanol (2%) (v/v/v); o cromatograma era secado, as manchas identificadas sob luz ultravioleta, cortadas e sua radioatividade determinada por imersão em líquido de cintilação (5 g PPO/1 tolueno) e contagem em contador de cintilação.

3.3. Gradiente de glicerol

Gradientes lineares de 10 a 30% de glicerol (v/v) em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8 contendo 1 mg/ml de albumina de soro bovino, 0,15 mg/ml de PMSF e β -mercaptoetanol 1 mM, foram obtidos através de uma câmara de mistura idêntica à descrita por Martin & Ames (1961). 400 μ g de proteína de um sobrenadante de 105000 x g de zoósporos, eram colocados no topo do gradiente, centrifugando-se a 37000 rpm em rotor SW 50.1 da Spinco, por 14 horas, a 4°C. Após a corrida, eram colhidas 23 frações, sendo cada uma delas subdividida em dois volumes iguais. Na primeira série, determinavam-se as frações que continham atividade de cAMP fosfodiesterase e, na segunda série, as frações com atividade de cGMP fosfodiesterase. Dois marcadores, fosfatase alcalina de E. coli (25 μ g) e hemoglobina de carneiro (1 mg), eram colocados em gradiente centrifugado paralelamente e os seus perfis determinados.

3.4. Fracionamento com sulfato de amônio

Zoósporos congelados (1×10^{10}) eram quebrados por agitação, ressuspensos em tampão A (Tris-HCl 50 mM, pH 8, contendo 10% de glicerol (v/v), β -mercaptoetanol 1 mM, $MgCl_2$ 5 mM, KCl 10 mM e PMSF, 0,15 mg/ml) e posteriormente centrifugados a 105000 x g por 1 hora. Ao sobrenadante assim obtido,

adicionava-se, lentamente e sob agitação, sulfato de amônio até 20% de saturação. A solução era agitada por 30 minutos e o precipitado removido por centrifugação a 20000 x g por 30 minutos. O sobrenadante resultante era então levado a 55% de saturação por nova adição de sulfato de amônio. Após agitação por 30 minutos e centrifugação a 20000 x g por 30 minutos, o precipitado era dissolvido em 3,5 ml de tampão A e submetido a diálise contra o mesmo tampão, por 16 horas.

3.5. Cromatografia em coluna de DEAE-celulose

A fração proveniente da diálise era diluída com o tampão A, de modo a se obter cerca de 2,5 mg/ml, e aplicada a uma coluna de DEAE-celulose (1 x 10 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão. A coluna era lavada com tampão A até se obter um valor de absorbância menor do que 0,005 a 280 nm. Procedia-se então à eluição da coluna com um gradiente linear de KCl de 0,05 M a 0,40 M, coletando-se frações de 1 ml. Aliquotas de 50 µl de cada fração eram dosadas para se determinar as frações contendo atividade de cAMP fosfodiesterase.

3.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Géis de poliacrilamida foram preparados em tubos de vidro de 10 x 0,5 cm, segundo Williams & Reisfeld (1964),

sendo compostos de uma camada inferior de 7 cm de gel de poli-
acrilamida a 7,5% e de uma camada superior de 1 cm de gel de
poliacrilamida a 0,4%. Amostras contendo 25 µg de proteína
(proveniente do pico ativo do eluato da coluna de DEAE-celulo-
se) em tampão de aplicação Tris-ácido fosfórico 0,4 M, pH
5,5, contendo β-mercaptoetanol 10 mM e 10% de glicerol, eram
colocadas sobre os géis, sendo em seguida aplicada uma corren-
te de 2,5 mA/tubo, por um intervalo de tempo suficiente para
que o marcador, azul de bromofenol, atingisse 2 mm da extremi-
dade inferior do gel. Terminada a eletroforese, os géis eram
removidos dos tubos e fracionados através de um fracionador de
gel Savant, usando-se tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8, conten-
do β-mercaptoetanol 1 mM, MgCl₂ 5 mM, KCl 10 mM e PMSF 0,15
mg/ml, para a eluição. Com o fracionamento, obtiveram-se 46
frações, colhidas em tubos contendo 100 µg de albumina bovi-
na, a fim de preservar a enzima. Estas frações eram dosadas
para determinar a atividade de cAMP fosfodiesterase, segundo
o ensaio padrão, porém em ausência de cAMP não radioativo e
com incubação por 15 minutos a 30°C.

4. ENSAIO DA ATIVIDADE DE cGMP FOSFODIESTERASE

O método utilizado era idêntico ao da cAMP fosfo-
diesterase, mudando-se apenas o substrato para cGMP, numa con-
centração final de 20 µM (30000 cpm por nmol) por ensaio.

5. ADENILATO CICLASE

5.1. Ensaio da atividade enzimática

A mistura de reação, exceto quando indicado diferentemente, constava de $|\alpha\text{-}^{32}\text{P}|$ - ATP 1,5 mM (6000 cpm por nmol); MnCl_2 3 mM; KCl 100 mM; fosfoenol piruvato de potásio 5 mM; 10 μg de piruvato quinase; cAMP 0,4 mM; tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,5 e enzima (sedimento de 105000 xg, exceto indicação ao contrário), num volume final de 0,1 ml. A mistura era incubada por 5 minutos a 30°C e a reação interrompida por adição de 0,1 ml de solução contendo ATP 40 mM e cAMP 12,5 mM, e aquecimento à ebulição por 2 minutos. Em seguida, a mistura de ensaio era colocada em coluna de óxido de alumínio neutro seco (0,5 x 6 cm) e eluída com 3,5 ml de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, de acordo com a técnica de Ramachandran (1971). O eluato, contendo apenas cAMP, visto que ATP e outros nucleotídeos ficam retidos na coluna, era coletado em frasco de cintilação e a radioatividade determinada, após adição de 10 ml de líquido de cintilação (5 g de PPO, 100 g de naftaleno/l de dioxana), em um contador de cintilação. Os controles de cada experimento eram obtidos substituindo-se no ensaio a enzima por água ou enzima fervida e nunca ultrapassavam 0,01% do valor da radioatividade total colocada. A atividade específica é expressa como nanomoles de cAMP formado

por mg de proteína por minuto e os valores apresentados são a média de determinações em duplicatas.

5.2. Caracterização do produto da reação

Ensaio-padrão eram incubados por 10 minutos a 30°C e a reação interrompida apenas por aquecimento a 100°C por 2 minutos. As misturas de reação eram então colocadas em colunas de óxido de alumínio, sendo o eluato liofilizado. Após liofilização, uma das amostras era tratada por 1 hora a 30°C com fosfodiesterase de coração bovino em mistura de incubação, que constava de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 (contendo β -mercaptoetanol 1 mM; $MgCl_2$ 5mM; KCl 10 mM), 200 μ g de albumina e 40 μ g de fosfodiesterase, num volume final de 0,2 ml. Procedia-se então à cromatografia descendente, em papel Whatman nº 1, de alíquotas da amostra tratada com fosfodiesterase e da amostra não tratada, juntamente com os marcadores ATP, ADP e 5'-AMP, usando-se 0,05 μ moles de cada. Após corrida por 16 horas a 22°C em isopropanol - amônia-água (7:2:1), o cromatograma era secado, as manchas identificadas sob luz ultravioleta, cortadas e a radioatividade determinada em líquido de cintilação (5 g PPO/l tolueno).

6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DE cAMP

6.1. Preparo das células

Células vegetativas (2×10^7) ou zoósporos (5×10^7) eram coletados, conforme descrito no item 1.3, congelados e tratados com 0,5 ml de TCA a 5%. As células eram descongeladas e quebradas, os zoósporos por agitação em Vortex e as células vegetativas por sonicação, procedendo-se então a uma centrifugação a 1000 x g por 10 minutos. O sobrenadante era separado e o precipitado novamente tratado com 0,5 ml de TCA a 5%, repetindo-se a centrifugação. O precipitado, após suspensão em 0,5 ml de NaOH 0,5 N, era utilizado para dosagem de proteína. Os sobrenadantes eram juntados e, após adição de HCl a uma concentração final de 0,1 N, tratado com 5 ml de éter etílico gelado saturado com água, por 4 vezes, para extrair o TCA. O éter residual era extraído a 100°C por 2 minutos e o extrato aquoso, liofilizado e redissolvido em água bidestilada, era, após centrifugação, utilizado diretamente nos ensaios, em alíquotas adequadas.

6.2. Ensaio de cAMP

Este ensaio era feito de acordo com o método de Gilman (1970). A proteína quinase de coração bovino era mantida

em tampão fosfato 5 mM, pH 7, à temperatura de nitrogênio líquido e, no momento do ensaio, diluída à concentração adequada, no mesmo tampão.

A mistura de incubação continha por ensaio: $|^3\text{H}|-cAMP$ 7,5 mM (20000 cpm); 1 μg da proteína quinase, 50 μg do inibidor da proteína quinase, tampão acetato de sódio 50 mM, pH 4 e preparações de células, num volume final de 0,2 ml. Após incubação por 90 minutos a 4°C, a reação era interrompida por diluição com 0,8 ml de tampão fosfato de potássio 20 mM, pH 6 e a mistura passada através de filtro Millipore (0,45 micras). Os filtros eram lavados com aproximadamente 10 ml do mesmo tampão e, após secagem, colocados em frascos contendo líquido de cintilação (5 g PPO/1 tolueno) e sua radioatividade contada em contador de cintilação.

O controle destes experimentos fazia-se através do tratamento de alíquotas das amostras processadas como no item 6.1 com fosfodiesterase específica para nucleotídeos cíclicos, quer de coração bovino, quer de B. emersonii. O meio de incubação constava de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8, contendo MgCl_2 5 mM, KCl 10 mM, β -mercaptoetanol 1 mM; albumina 1 mg/ml e 20 μg de fosfodiesterase. A mistura de reação era incubada a 30°C por 3 horas e, após aquecimento a 100°C por 2 minutos e centrifugação, o sobrenadante era utilizado nos ensaios de cAMP, em quantidades convenientes.

6.3. Curva padrão

Em todos os experimentos, era feita concomitantemente uma curva padrão de cAMP, obtida usando-se concentrações crescentes de cAMP (1; 2,5; 5; 10 e 25 pmoles) e uma concentração fixa de 1,5 pmoles de ^3H - cAMP por tubo. O ensaio era feito como em 6.2 e os resultados obtidos projetados em papel bilogarítmico.

7. TESTE DA EXCREÇÃO DE cAMP DURANTE A GERMINAÇÃO

7.1. Obtenção das células e dos meios extracelulares da germinação

O ensaio de germinação era feito em placas de polí-carbonato com 20 ml de DM4 e inóculo de $8,5 \times 10^6$ zoósporos de DM4 por placa. As placas eram incubadas a 27°C . Em tempos determinados, duas placas eram retiradas, sendo seus sobrenadantes juntados e filtrados em filtros Millipore (0,45 micras) colocando-se 2 ml de TCA a 5% sobre as células aderidas à superfície das placas.

7.2. Tratamento do meio extracelular

Ao sobrenadante da germinação de duas placas (40 ml) era adicionado 1 ml de Norita a 5%, sendo a mistura submetida

a agitação em banho rotatório por 10 minutos, e posterior centrifugação a 1000 x g por 10 minutos. Desprezava-se o sobrenadante da centrifugação e o precipitado era eluído duas vezes com 2 ml de NH_4OH 0,3 N em 50% etanol. O volume eluído era filtrado em Millipore UGWG (0,25 micras), secado em roto vácuo e ressuspenso em 1 ml de tampão Tris-HCl 0,06 M, pH 7,4. Em seguida este volume era colocado em coluna de óxido de alumínio neutro (0,6 x 3 cm), equilibrada com tampão Tris-HCl 0,6 M, pH 7,4. Desprezava-se o primeiro ml proveniente da amostra e a eluição com 4 ml do mesmo tampão era feita diretamente sobre uma coluna de resina Dowex AG1-X2 (0,6 x 3,5 cm) fechada, previamente equilibrada com água. Após a passagem de todo o eluato da primeira coluna, a coluna Dowex era aberta, lavada com 4 ml de água e a seguir eluída com 3 ml de HCl 0,05 N, sendo reservados somente estes últimos 3 ml. Este eluato era liofilizado e o tubo contendo o material liofilizado colocado sobre pastilhas de NaOH por 12 horas, para eliminar vestígios de HCl. Este material era então dissolvido em água bidestilada e usado diretamente para dosagem do cAMP presente.

7.3. Tratamento das células

As células aderidas às placas durante a germinação eram retiradas, após a adição de 2 ml de TCA a 5%, através

de raspagem das placas. O material era recolhido em tubo cônico e centrifugado a 1000 x g por 30 minutos. Ao sobrenadante adicionava-se HCl a uma concentração final de 0,1 N. Os sobrenadantes de duas placas eram juntados (4 ml) e tratados 5 vezes com 5 ml de éter etílico gelado saturado com água, para extrair o TCA. A amostra livre de TCA era secada em roto vácuo e em seguida, tratada da mesma maneira que o sobrenadante da germinação.

8. ENSAIO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA

O ensaio constava de p-nitrofenol fosfato 1,25 mM e tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8, num volume final de 0,7 ml. Procedia-se então a uma incubação por 10 minutos a 30°C. A reação era interrompida com 0,5 ml de NaOH 1 N e a absorbância de terminada por leitura a 405 nm, em espectrofotômetro Gilford.

9. ENSAIO DA ATIVIDADE DE SUCCINATO:CITOCROMO c REDUTASE

A mistura de ensaio consistia de: tampão Tris-H₂SO₄ 0,1 M, pH 7,4; succinato 10 mM; citocromo c 1,6 mg/ml; NaCN 1 mM e enzima, num volume final da reação de 1 ml. A reação era acompanhada à temperatura ambiente (20-22°C), por leitura no espectrofotômetro Cary a 550 nm.

10. DOSAGEM DE HEMOGLOBINA

As frações, provenientes do gradiente de glicerol, tinham seus volumes completados para 0,2 ml com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, e eram lidas a 545 nm no espectrofotômetro Gilford.

11. DOSAGEM DE PROTEÍNA

As dosagens de proteína foram feitas de acordo com o método de Lowry et al. (1951), usando-se albumina de soro bovino como padrão.

Nas amostras contendo Triton X-100, a dosagem de proteína foi feita segundo técnica desenvolvida por Dulley & Grieve (1975), que elimina a interferência do detergente nas dosagens.

12. IODAÇÃO DA MEMBRANA DE ZOÓSPORO PELO SISTEMA DA LACTOPE-ROXIDASE E H_2O_2

O método utilizado foi o de Phillips & Morrison (1970). Os zoósporos a serem marcados com ^{131}I eram coletados e filtrados em rede de náilon (30 micras) e centrifugados a 1000 x g por 3 minutos. Em seguida eram lavados 2 vezes com solução de esporulação e ressuspensos em tampão fosfato

de sódio 1 mM, pH 7,4, contendo CaCl_2 5 mM, num volume tal que se obtivesse 3×10^8 zoósporos/ml. A seguir adicionava-se KI a uma concentração final de 2 μM , lactoperoxidase (60 $\mu\text{g/ml}$), ^{131}I (5 μCi) e H_2O_2 8 μM para iniciar a reação, à temperatura ambiente. Duas subseqüentes adições de H_2O_2 eram efetuadas no tempo $t = 1,5$ minutos e $t = 3,0$ minutos. A reação era interrompida após 5 minutos com 10 ml de tampão fosfato de sódio 1 mM, pH 7,4. Os zoósporos marcados com ^{131}I eram então centrifugados a 1000 x g por 3 minutos, ressuspensos em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,5 e rompidos em prensa francesa a 1000 psi. O extrato bruto obtido era submetido a fracionamento celular por centrifugação diferencial.

Ensaio controle mostraram que a incorporação de iodo era totalmente dependente da adição de H_2O_2 e lactoperoxidase exógenas.

13. REAGENTES

A proteína quinase de coração bovino foi obtida através dos métodos de Miyamoto et al. (1969) e de Gilman (1970). O inibidor de proteína quinase de coração bovino foi preparado pelo método de Appleman et al. (1966). A lactoperoxidase foi obtida de leite cru através do método de Hogg & Jago (1970).

$|\alpha-^{32}\text{P}|$ - ATP foi preparado segundo Symons (1974) a partir de ^{32}P obtido do Instituto de Energia Atômica, São Paulo, S.P. Outras drogas radioativas: ^{14}C - ATP (44,9 mCi/mmol), ^3H - cAMP (33,2 Ci/mmol) e ^3H - cGMP (9,92 Ci/mmol) foram adquiridas da New England Nuclear de Boston, Mass., E.U.A. ^{131}I foi obtido do I.E.A., S.P.

cAMP, cGMP, ATP, GTP, ADP, 5'-AMP, 3'-AMP, adenosina, fosfoenolpiruvato, citocromo c (tipo III), piruvato quinase, fosfodiesterase de coração bovino, fosfatase alcalina de E. coli (tipo III), hemoglobina de carneiro, veneno de cobra (Naja naja) e albumina de soro bovino foram fornecidos pela Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., E.U.A.

Filtros de nitrocelulose dos tipos HAWP (0,45 micras de diâmetro de poro) e UGWG (0,25 micras de diâmetro de poro) foram obtidos da Millipore Corporation de Belford, Mass., E.U.A.

Os reagentes para eletroforese em acrilamida, N,N,-metilenbisacrilamida; N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamina foram adquiridos da U.C.B., Bruxelas, Bélgica.

Dioxana foi obtida da Eastman Kodak Co. de Rochester, N.Y., E.U.A.; naftaleno, tolueno e PMSF da E. Merck de Darmstadt, Alemanha e PPO da Calbiochem. Inc., Los Angeles, Cal., E.U.A.

Cicloheximida, adrenalina, noradrenalina, serotonina, 3-hidroxitiramina, dopamina, metanefrina, sinefrina, octopamina, Triton X-100, L-aminoácidos e Norita foram obtidos da Sigma Chemical Co.

Resinas de troca iônica Dowex AG1-X2 (100-200 mesh) e DEAE-celulose eram provenientes da Bio-Rad Laboratories, Richmond, Cal., E.U.A.

Óxido de alumínio neutro seco e fluoreto do sódio foram adquiridos da E. Merck, Darmstadt.

Agar, peptona e extrato de levedo eram provenientes da Oxoid Limited, Londres, Inglaterra.

Outros reagentes utilizados, obtidos de diversas fontes, eram sempre de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas com água bidestilada e desionizada em coluna de troca iônica.

III. RESULTADOS

1. cAMP FOSFODIESTERASE EM B. emersonii

A presença de cAMP fosfodiesterase em B. emersonii foi relatada pela primeira vez por Maia & Camargo (1974), que encontraram uma flutuação cíclica da atividade da enzima durante o ciclo biológico do fungo. Os dados aqui apresentados são uma continuação desse trabalho.

1.1. Identificação do produto da reação

A Figura 2 mostra a caracterização do produto da reação catalisada pela cAMP fosfodiesterase. Misturas de reação, contendo enzima parcialmente purificada em gradiente de glicérol, foram incubadas por 8 minutos, sendo omitida a etapa de tratamento com veneno de cobra, e a seguir cromatografadas em papel (Material e Métodos 3.2). A análise do cromatograma mostrou que 90% da radioatividade estava localizada na área correspondente a 5'-AMP, 5% na área da adenosina e uma quantidade desprezível na área correspondente a 3'-AMP. Estes resultados indicavam que a hidrólise do cAMP ocorre na posição 3'-éster fosfato, dando origem a 5'-AMP, como único produto da reação.

Figura 2 - Cromatografia descendente em papel do produto da reação de cAMP fosfodiesterase. Alíquotas da mistura de ensaio (A) e do substrato radioativo (B) foram aplicados a papel Whatman nº 1, juntamente com os marcadores cAMP, 3'-AMP, 5'-AMP e adenosina, como descrito em Material e Métodos(3.2).

1.2. Presença de atividades de cAMP e cGMP fosfodiesterases in dependentes em B. emersonii

A existência de uma atividade de cGMP fosfodiesterase nos extratos de zoósporos de B. emersonii foi primeiro relatada por Vale et al. (1975). As condições ótimas do ensaio e a variação da atividade específica da enzima durante o ciclo biológico do fungo foram também determinadas (Vale & Maia, 1976).

Várias foram as indicações de que as atividades de cAMP e cGMP fosfodiesterases eram distintas. Quando extratos de zoósporos eram mantidos a 4°C, observava-se uma rápida inativação da atividade de cGMP fosfodiesterase. Essa inativação ocorria, a uma velocidade menor, mesmo em presença de 10% de glicerol e de PMSF (inibidor de proteases). Após 8 dias a 4°C, o extrato continha ainda cerca de 80% da atividade de cAMP fosfodiesterase e apenas 10-20% da de cGMP fosfodiesterase (Figura 3).

Várias tentativas foram feitas para separar as duas atividades. Fracionamento com sulfato de amônio, seguido por diálise e cromatografia em DEAE-celulose, resultou na perda total da atividade de cGMP fosfodiesterase; sob as mesmas condições, a atividade de cAMP fosfodiesterase é bastante estável, sendo eluída da coluna de DEAE-celulose em um único pico e

apresentando uma atividade específica cerca de 20 vezes maior (Figura 4).

Figura 3 - Porcentagem de atividade inicial das cAMP e cGMP fosfodiesterases em função do envelhecimento do sobrenadante de 105000 x g de extrato de zoósporos. O sobrenadante foi mantido a 4°C em tampão contendo 10% de glicerol, durante o tempo indicado na figura. As atividades de cAMP (O—O) e cGMP (●—●) fosfodiesterases foram determinadas de acordo com Material e Métodos (3.1 e 4).

Figura 4 - Cromatografia em DEAE-celulose da enzima obtida no fracionamento com sulfato de amônio, após diálise. O preparo e lavagem da coluna e a eluição do material e a dosagem da atividade foram feitos de acordo com Material e Métodos (3.5 e 3.1).

Na Tabela I é apresentado um resumo da purificação da cAMP fosfodiesterase de extrato de zoósporos. Esta preparação em particular apresentou baixos níveis de atividade de cGMP fosfodiesterase já no extrato bruto; a perda da atividade de logo após a diálise pode ser explicada pela alta instabilidade desta enzima.

Tabela I - Purificação de cAMP fosfodiesterase

Frações	Volume (ml)	Proteína (mg/ml)	Ativ. Espec. (nmoles/mg 10 min)		Ativ. Total (nmoles/10 min)		Recup. (%)	Fator de Purificação	
			cAMP	CGMP	cAMP	CGMP		cAMP	CGMP
Extrato bruto	29,0	11,1	49,8	2,7	16030	869	100	-	-
Sobrenadante (105000 x g)	31,5	5,6	65,6	3,1	11572	538	72	1,3	-
Sulfato de amônio	3,5	16,2	127,0	-	7202	-	45	2,6	-
DEAE-celulose	12,0	0,5	946,0	-	5108	-	32	19,0	-

Os dados se referem a uma purificação a partir de 1×10^{10} zoósporos, de acordo com Material e Métodos (3.4 e 3.5). Os ensaios das enzimas foram realizados segundo Material e Métodos (3.1 e 4).

A eletroforese em gel de poliacrilamida, a pH 7,5, da enzima purificada por coluna de DEAE-celulose, mostrou após fracionamento dos géis e dosagem das frações, apenas um pico de atividade (Figura 5). Também um único pico é obtido na eletroforese da fração obtida após fracionamento com sulfato de amônio e diálise (resultado não apresentado).

Figura 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida da cAMP fosfodiesterase purificada por coluna de DEAE-celulose. O preparo e fracionamento dos géis, as condições da eletroforese e a dosagem da atividade estão descritos em Material e Métodos (3.6 e 3.1). As dosagens foram feitas, omitindo-se o cAMP não radioativo.

A separação das duas atividades de fosfodiesterase presentes no extrato de zoósporos foi conseguida através da sedimentação em gradiente contínuo de glicerol do sobrenadante de 105000 x g desse extrato (Figura 6). A análise do

Figura 6 - Sedimentação de cAMP e cGMP fosfodiesterases em gradiente de glicerol. O preparo dos gradientes, condições de centrifugação e colheita das amostras estão descritos em Material e Métodos (3.3). As atividades de cAMP fosfodiesterase (○—○) e cGMP fosfodiesterase (●—●) foram dosadas respectivamente segundo Material e Métodos (3.1. e 4). Os perfis dos marcadores foram determinados segundo Material e Métodos (8 e 10) e os seus picos são indicados na figura pelas setas F(fosfatase) e H(hemoglobina).

gradiente demonstrou a presença de três frações contendo atividade enzimática; duas eram ativas na hidrólise de cGMP, mas não de cAMP, e a terceira era específica para cAMP. Esses gradientes continham albumina de soro bovino, à concentração de 1 mg/ml, em toda a sua extensão; a omissão de albumina provoca perda considerável da atividade cGMP fosfodiesterase, assim como a sua dispersão através de grande parte do gradiente. A presença de albumina nesses gradientes não afeta o comportamento da cAMP fosfodiesterase.

A análise do efeito de cAMP e cGMP nas propriedades cinéticas das enzimas mostrou que nenhum dos nucleotídeos interfere na hidrólise do outro, quando a fonte de enzima é o sobrenadante de 105000 x g do extrato de zoósporos. A cAMP fosfodiesterase apresenta cinética michaeliana normal com um Km aparente de 2-4 μ M (Figura 7). A cGMP fosfodiesterase apresenta duas constantes de Michaelis para a hidrólise de cGMP, cujos valores de Km aparente são de 4 μ M e 40 μ M e podem refletir as duas formas de enzima encontradas no gradiente (Vale et al., 1975).

Figura 7 - Gráfico de duplos recíprocos da velocidade inicial contra a concentração de cAMP. O sobrenadante de 105000 x g de extrato de zoósporos foi usado como fonte de enzima.

2. ADENILATO CICLASE EM B. emersonii

2.1. Padronização da coluna de óxido de alumínio (segundo o método de Ramachandran (1971))

A Figura 8 mostra o padrão de eluição do ^3H -cAMP colocado em coluna de óxido de alumínio neutro seco, pela lavagem

Figura 8 - Separação de cAMP e ATP em colunas de óxido de alumínio. 0,25 ml de tampão Tri-HCl 10 mM, pH 7,4, contendo ^3H -cAMP (50000 cpm) ou ^{14}C -ATP (22800 cpm) foram aplicados a duas diferentes colunas de óxido de alumínio neutro seco (0,5 x 6 cm), seguindo-se a eluição com o mesmo tampão. Após coleta de 8 frações de 1 ml, o eluente foi trocado por Na_2HPO_4 0,2 M, colhendo-se 12 frações de 1 ml. Aliquotas (0,2 ml) de cada fração foram adicionadas a 5 ml de líquido de cintilação (5 g de PPO, 100 g de naftaleno/l de dióxido de xana), e sua radioatividade contada. ●—● ^3H -cAMP, O---O ^{14}C -ATP.

com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4. O cAMP era recuperado nos primeiros 3 ml. A porcentagem de recuperação variava, de acordo com o lote de alumina, entre 70 a 90%. Assim, para cada lote de alumina em uso, efetuava-se uma determinação da recuperação do cAMP eluído, e os valores obtidos das demais colunas eram corrigidos, levando-se em conta a porcentagem de recuperação. A figura mostra ainda que o ^{14}C -ATP, colocado em coluna paralela, só é eluído pela adição de Na_2HPO_4 0,2M, havendo portanto uma boa separação entre os dois nucleotídeos.

2.2. Propriedades gerais da adenilato ciclase de zoósporos

2.2.1. Atividade de adenilato ciclase em função de diversos componentes da mistura de reação

A Tabela II mostra a dependência da atividade de adenilato ciclase em relação a vários componentes da mistura de reação. A omissão da enzima ou a adição de enzima previamente fervida por 2 minutos fornece valores idênticos ao do branco da reação. A atividade enzimática é dependente de Mn^{2+} , sendo desprezível na presença de MgCl_2 5 mM. Não há hidrólise de ^3H -cAMP, durante uma incubação de 10 minutos, quando na mistura de reação está presente 0,4 mM de cAMP frio. Teofilina (10 mM), normalmente utilizada em ensaios de atividade

Tabela II - Atividade da adenilato ciclase em função dos vários componentes da mistura de reação

Condições de incubação	Atividade da adenilato ciclase nmoles/mg proteína 5 min.
Completo	1,87
Completo, enzima fervida	0,05
Completo + 10 mM de teofilina	1,40
Completo + 1 a 10 mM de NaF	1,85
- $MnCl_2$	0,05
- $MnCl_2$ + 5 mM $MgCl_2$	0,13
- Sistema de regeneração	1,85

As atividades enzimáticas foram determinadas de acordo com Material e Métodos (5.1), com as adições ou omissões indicadas.

de adenilato ciclases, para inibir a degradação por fosfodiesterases contaminantes do cAMP formado, mostrou-se inibitória (25%) em nosso sistema e foi, portanto, eliminada da mistura de reação. A presença de um sistema regenerador de ATP não tem qualquer efeito em incubações de até 5 minutos, mas mantém a linearidade da reação quando a incubação é mais longa (Figura 9). Fluoreto de sódio, um ativador clássico de adenilato ciclases animais, não tem qualquer efeito na enzima de zoósporos de B. emersonii, em concentrações de 1 a 10 mM.

Figura 9 - Atividade da adenilato ciclase em função do tempo de incubação. As misturas de reação continham 100 μ g de proteína e demais condições como em Material e Métodos (5.1). O—O em presença e ●—● em ausência do sistema de regeneração de ATP.

Na tentativa de se encontrar um possível ativador da adenilato ciclase de zoósporos, vários compostos foram testados, entre eles, adrenalina, noradrenalina, serotonina, 3-hidroxitiramina, dopamina, metanefrina, octopamina e adenosina. Estas substâncias, algumas das quais são reconhecidamente capazes de um efeito estimulatório em adenilato ciclasas de mamíferos,

não tiveram qualquer efeito na enzima de B. emersonii, quando testados em concentrações que variavam de 1 a 10 mM e a diferentes pHs (7,0 e 8,5).

2.2.2. Tempo de incubação

Como mostra a Figura 9, nas condições padrão de ensaio, a produção de cAMP foi proporcional ao tempo de incubação até 10 minutos, em presença de um sistema regenerador de ATP. Na ausência desse sistema, a reação deixa de ser linear a partir de 5 minutos de incubação.

2.2.3. Concentração de enzima

Na Figura 10, pode-se observar que quantidades crescentes de extrato determinaram um aumento linear da atividade enzimática até 100 µg de proteína por tubo de ensaio.

2.2.4. pH Ótimo da reação

A Figura 11 mostra a variação da atividade enzimática em função do pH da mistura de reação. A atividade máxima foi observada no intervalo de pH entre 8,5 e 10.

Figura 10 - Atividade da adenilato ciclase em função da concentração de proteína. O tempo de incubação foi de 5 minutos e demais condições como em Material e Métodos (5.1).

2.2.5. Influência de íons

A enzima exige especificamente íons de Mn^{2+} para a sua atividade. Quando este cátion divalente foi substituído por Mg^{2+} , a atividade enzimática foi desprezível (Figura 12). O efeito de outros íons na atividade enzimática foi também investigado (Tabela III). Na presença de Zn^{2+} e Co^{2+} , a atividade é da mesma ordem encontrada para Mg^{2+} . Com Ca^{2+} ,

Figura 11 - Atividade da adenilato ciclase em função do pH. Foram usados os tampões: Tris-HCl ●—● (pH de 7,5 a 9,5); glicina NaOH O—O (pH de 8,5 a 10,5), na concentração final de 60 mM. Outras condições como indicado em Material e Métodos (5.1).

a atividade é praticamente nula. Esses cátions, quando adicionados à mistura de reação contendo Mn^{2+} , mostraram ser inibitórios à atividade da enzima, sendo Zn^{2+} o inibidor mais forte. A presença de Li^+ causou também ligeira inibição

Figura 12 - Atividade da adenilato ciclase em função da concentração de cátions divalentes. A concentração de ATP no ensaio foi de 1,5 mM e outras condições como em Material e Métodos (5.1), excluído MnCl₂ (3 mM).

e a de K⁺ não teve qualquer efeito. Estes dois cátions monovalentes foram testados por seus reconhecidos efeitos na germinação de zoósporos (Soll & Sonneborn, 1972).

Tabela III - Efeito de íons na atividade de adenilato ciclase

Adições	Concentração (mM)	Atividade
MnCl ₂	3	100
MnCl ₂ -KCl*	3	100
MgCl ₂	3	3
	10	8
ZnCl ₂	3	2
	10	5
CoCl ₂	3	4
	10	6
CaCl ₂	3	0,5
	10	1
MnCl ₂ e MgCl ₂	3 e 10	83
MnCl ₂ e ZnCl ₂	3 e 10	6
MnCl ₂ e CoCl ₂	3 e 10	26
MnCl ₂ e CaCl ₂	3 e 10	56
MnCl ₂ e LiCl	3 e 10	90

A atividade enzimática é expressa atribuindo-se um valor de 100 à atividade em presença de MnCl₂ 3 mM. A mistura de reação é a mesma de Material e Métodos (5.1), mas em ausência de MnCl₂.

* Neste caso foi também excluído do sistema completo KCl (100 mM).

2.3. Caracterização do produto da reação

Nas condições padrão de ensaio, somente cAMP foi encontrado como produto da reação (Figura 13). O produto radioativo obtido da coluna de alumina co-cromatografou com o padrão de AMP cíclico e, quando tratado com fosfodiesterase de coração bovino, o único composto radioativo formado foi o 5'-AMP.

2.4. Localização subcelular da adenilato ciclase de zoósporos

A distribuição subcelular da adenilato ciclase após ruptura dos zoósporos em prensa francesa e centrifugação diferencial do homogenato é mostrada na Tabela IV. Os resultados indicam que 73% da atividade enzimática encontra-se no precipitado de 105000 x g, distribuindo-se o restante entre a fração II (4,5%) e fração IV (18%). O tratamento do homogenato de zoósporos com Triton X-100 a 1% (v/v) resulta na recuperação da maior parte da atividade enzimática (61%) no sobrenadante de 105000 x g (Fração IV). Estes resultados indicam uma provável localização da enzima em uma fração membranar de zoósporo.

Os resultados da Tabela V indicam que somente uma pequena porcentagem da atividade de succinato: citocromo c redutase - enzima característica de mitocôndria - contamina a

Figura 13 - Cromatografia descendente em papel do produto de reação da adenilato ciclase. Aliquotas da amostra não tratada (A) e da amostra tratada com fosfodiesterase (B) foram aplicadas em papel Whatman nº 1, juntamente com os marcadores ATP, ADP e 5'-AMP. Condições do experimento como descrito em Material e Métodos (5.2).

Tabela IV - Distribuição da atividade de adenilato ciclase de zoósporos, em ausência e presença de Triton X-100

Fração	Proteína total mg		Atividade específica nmoles/mg prot./5 min.		Atividade total nmoles/5 min.	
	-Triton X-100	+Triton X-100	-Triton X-100	+Triton X-100	-Triton X-100	+Triton X-100
I- Homogenato	10,4	10,4	2,4	2,2	24,5 (100%)	23,0 (100%)
II- Sedimento (1000 x g)	1,3	0,4	0,9	0,5	1,1 (4,5%)	0,2 (1,0%)
III- Sedimento (105000 x g)	3,9	1,8	4,5	2,2	17,8 (73,0%)	4,1 (18,0%)
IV- Sobrenadante (105000 x g)	5,2	8,0	0,8	1,8	4,4 (18,0%)	14,0 (61,0%)

O extrato bruto de zoósporos foi dividido em duas alíquotas iguais sendo uma delas tratada com Triton X-100 a 1%; a seguir ambas as alíquotas foram submetidas a fracionamento por centrifugação diferencial as frações obtidas foram dosadas quanto à atividade de adenilato ciclase segundo Material e Métodos (5.1).

Tabela V - Distribuição das atividades de adenilato ciclase, succinato:citocromo c redutase e cAMP fosfodiesterase nas frações subcelulares de zoósporos

Frações	Adenilato ciclase (nmoles/min.)	Succ:cit. c Redutase (nmoles/min.)	cAMP fosfodies- terase (nmoles/min.)
I- Extrato bruto	4,1 (100%)	81 (100%)	31,9 (100%)
II- Sedimento (20000 x g)	1,2 (29%)	53 (65%)	3,3 (10%)
III- Sedimento (105000 x g)	1,8 (44%)	9 (11%)	0,9 (3%)
IV- Sobrenadante (105000 x g)	0,9 (22%)	12 (15%)	26,3 (82%)

O fracionamento celular e as atividades enzimáticas das frações foram determinadas de acordo com Material e Métodos (2; 3.1; 5.1; 9).

fração III, onde encontramos a maior parte da atividade de adenilato ciclase, nestas condições de fracionamento. A cAMP fosfodiesterase, enzima tipicamente solúvel (Maia & Camargo, 1974), é recuperada no sobrenadante de 105000 x g. Estes resultados mostram que a adenilato ciclase provavelmente não se encontra na mitocôndria do zoósporo.

Em virtude da inexistência de dados na literatura sobre enzimas que se localizem na membrana plasmática de zoósporos e que poderiam servir de marcadores bioquímicos para a identificação dessa fração celular, optamos por uma marcação artificial da membrana. O método da iodação de células intactas pela lactoperoxidase (Philips & Morrison, 1970) constitui uma excelente técnica para a introdução de um marcador na membrana plasmática. Seguindo-se então a distribuição deste marcador através de uma purificação, pode-se correlacioná-lo com a enzima que se supõe estar aí localizada.

Zoósporos marcados com ^{131}I foram rompidos e fracionados, segundo esquema idêntico àquele da Tabela V. A fração sedimentada a 105000 x g foi em seguida purificada por meio de um gradiente descontínuo de sacarose. A Figura 14 mostra que o perfil de ^{131}I coincide com a distribuição da atividade de adenilato ciclase no gradiente, sugerindo fortemente que a enzima esteja localizada na membrana plasmática do zoósporo. A

Figura 14 - Sedimentação em gradiente descontínuo de sacarose do sedimento de 105000 x g de extrato de zoósporos marcados com ^{131}I . A marcação das células, a obtenção do extrato e o seu fracionamento foram feitos segundo Material e Métodos (12 e 2). O sedimento de 105000 x g obtido foi colocado no topo de um gradiente descontínuo de sacarose (sobre amortecedor de sacarose 1,46 M). Após centrifugação a 105000 x g por 1 hora, coletaram-se frações de 0,5 ml, por aspiração. A atividade de adenilato ciclase das frações foi dosada segundo Material e Métodos (5.1), e a quantidade de iodo radioativo, determinada em contador de radiação γ , após precipitação com TCA 5% e dissolução em NaOH 0,5 N. ●—● atividade enzimática; Δ — Δ proteína; O—O ^{131}I .

pequena porcentagem de succinato:citocromo c redutase presente localiza-se nas frações 2 e 3 do gradiente (dados não apresentados).

2.5. Efeito da variação de ATP e Mn^{2+} na atividade enzimática

O gráfico da atividade enzimática em função de concentrações equimolares de ATP e Mn^{2+} é apresentado na Figura 15. O gráfico de Hill destes dados fornece um valor de n próximo de 2, característico de uma curva de velocidade sigmoidal. A adição de excesso de Mn^{2+} (em relação à concentração de ATP) em quantidades crescentes leva a uma ativação da enzima e a uma modificação na cinética enzimática.

O comportamento da enzima tende a michaeliano, quando a concentração de Mn^{2+} em excesso em relação à concentração de ATP é de 0,25 mM, tendo-se, nestas condições, um valor de n próximo de 1, no gráfico de Hill. A concentração de Mn^{2+} adicionada em excesso causa uma diminuição na concentração de substrato necessária para se obter uma velocidade igual à metade da velocidade máxima ($L_{0,5}$); esses valores são mostrados na Tabela VI.

A Figura 16 mostra, com mais detalhes, a variação da atividade enzimática em função da concentração de Mn^{2+} em excesso, para duas concentrações equimolares de ATP e Mn^{2+} . Em

TABELA VI - Parâmetros cinéticos da adenilato ciclase, particulada e tratada com detergente

Fonte de enzima	$ \text{Mn}^{2+} $ em excesso (mM)	$L_{0,5}^*$ (mM)	n^{**}
Sedimento (105000 x g)	-	0,18	1,7
	0,10	0,12	1,5
	0,25	0,08	1,2
Sobrenadante (105000 x g)	-	0,34	1,8
após tratamento com Triton X-100 1%	0,25	0,26	1,3

* $L_{0,5}$ = concentração de substrato necessária para se obter $v = V_{\text{max}}/2$.

** n = coeficiente de Hill

Os valores de $L_{0,5}$ e n foram obtidos das Figuras 15 e 20.

ambos os casos, atinge-se o máximo de atividade em torno de uma concentração de Mn^{2+} em excesso de 0,5 mM, e a partir daí, um excesso maior de Mn^{2+} passa a ser inibitório.

A cinética da reação catalisada pela adenilato ciclase foi também examinada, variando-se a concentração de ATP no ensaio, para várias concentrações fixas de Mn^{2+} (Figura 17).

Figura 15 - Atividade de adenilato ciclase em função de concentrações equimolares de ATP e Mn^{2+} , na ausência e na presença de concentração fixa de Mn^{2+} em excesso. As misturas de reação, sem sistema de regeneração de ATP, foram incubadas por 2,5 minutos. Demais condições como em Material e Métodos (5.1). O—O, nenhum excesso de Mn^{2+} ; Δ — Δ excesso de Mn^{2+} de 0,1 mM; ●—● excesso de Mn^{2+} de 0,25 mM.

A família de curvas obtidas mostra um aumento de atividade enzimática com o aumento da concentração de ATP, até se atingir um valor máximo (para cada concentração fixa de Mn^{2+}), estando

Figura 16 - Atividade da adenilato ciclase em função da concentração de Mn^{2+} em excesso para duas concentrações equimolares de ATP e Mn^{2+} . As misturas de reação, sem sistema de regeneração de ATP, foram incubadas por 2,5 minutos. Outras condições como em Material e Métodos (5.1).

Figura 17 - Atividade da adenilato ciclase em função da concentração de ATP, a diferentes concentrações fixas de Mn^{2+} . As misturas de reação, sem sistema de regeneração de ATP, foram incubadas por 2,5 minutos. Demais condições como em Material e Métodos (5.1).

esse máximo na região onde a concentração de ATP era menor ou igual à concentração de Mn^{2+} presente no ensaio. Concentrações de ATP excedendo a concentração de Mn^{2+} presente resultaram em inibição da atividade enzimática sob todas as condições testadas.

A Figura 18 mostra uma família de curvas obtidas em função da variação da concentração de Mn^{2+} na mistura de ensaio, para diversas concentrações fixas de ATP. As curvas tem aparência sigmoidal, sendo tanto mais sigmoidais quanto maior for a concentração fixa de ATP. Essas curvas também mostram

Figura 18 - Atividade da adenilato ciclase em função da concentração de Mn^{2+} , a diferentes concentrações fixas de ATP. As misturas de reação, sem sistema de regeneração de ATP, foram incubadas por 2,5 minutos. Outras condições como em Material e Métodos (5.1).

um valor máximo na região onde a concentração de Mn^{2+} é maior que a concentração de ATP, indicando que Mn^{2+} deve estar em excesso em relação a ATP, para se obter o máximo de atividade. No entanto, como mostra esta figura, um grande excesso de Mn^{2+} passa a ser inibitório.

2.6. Efeito de GTP e 5'-AMP na atividade enzimática

Como mostra a Figura 19, GTP e 5'-AMP, análogos do ATP, são inibidores competitivos da enzima, competindo com o substrato pelo sítio catalítico da enzima.

2.7. Cinética da enzima tratada com Triton X-100

Foi feito também um estudo das propriedades cinéticas da enzima, após dispersão com o detergente não-iônico Triton X-100 a 1% (v/v). Como mostra a Figura 20, as propriedades da enzima obtida após esse tratamento são similares às aquelas descritas para a enzima particulada. A forma sigmoidal da curva que descreve a atividade enzimática em função de concentrações iguais de ATP e Mn^{2+} pode também ser modificada pela adição de Mn^{2+} em excesso, mostrando um comportamento do tipo michaeliano na presença de um excesso de Mn^{2+} de 0,25 mM. A Tabela VI mostra ainda alguns parâmetros cinéticos da enzima tratada com detergente.

Figura 19 - Gráficos dos duplos recíprocos da velocidade inicial contra concentrações equimolares de ATP e Mn^{2+} , da adenilato ciclase, na ausência e na presença de inibidores. As misturas de reação, sem sistema de regeneração de ATP, foram incubadas por 2,5 minutos, sendo as demais condições como em Material e Métodos (5.1). O—O na ausência de inibidor; ●—● na presença de 5'-AMP 0,1 mM; Δ—Δ na presença de GTP 0,1 mM.

Figura 20 - Atividade da adenilato ciclase tratada com detergente em função de concentrações equimolares de ATP e Mn²⁺. As misturas de reação, sem sistema de regeneração de ATP, foram incubadas por 2,5 minutos. Diferentes curvas representam diferentes concentrações de Mn²⁺ em excesso em relação a ATP. O—O nenhum excesso de Mn²⁺, Δ—Δ excesso de Mn²⁺ de 0,1 mM, ●—● excesso de Mn²⁺ de 0,25 mM. Demais condições como em Material e Métodos (5.1).

2.8. Variação da atividade de adenilato ciclase durante o ciclo biológico de B. emersonii

A atividade de adenilato ciclase foi determinada durante as várias etapas de desenvolvimento do fungo. Encontrou-se que, nas condições-padrão de ensaio, a atividade específica era alta nos zoósporos (0,4-1,6 nmoles/mg prot. min.), sofrendo uma queda durante a germinação; 20 minutos após o início da germinação, quando 80-90% das células estão na forma de esferócitos, obteve-se uma atividade que era cerca de 40% da atividade dos zoósporos; a atividade continua a diminuir, até atingir um nível mínimo aos 60 minutos, no estágio de gérmen. Quando se determinou a atividade de cAMP fosfodiesterase, durante a germinação, observou-se também uma queda na atividade específica desta enzima, a qual, entretanto, ocorria mais bruscamente (Figura 21).

Em presença de cicloheximida (2 µg/ml), a germinação é bloqueada ao nível de esferócito, não havendo a transição desta célula para gérmen. Nestas condições, a queda da atividade específica da cAMP fosfodiesterase não sofreu alteração, enquanto que a da adenilato ciclase, após 60 minutos, diminuiu apenas até os níveis encontrados nos esferócitos (Figura 22).

Resultados semelhantes aos descritos acima foram obtidos na dosagem de adenilato ciclase em presença de 1% de Triton X-100 (v/v).

Figura 21 - Variação das atividades de adenilato ciclase e de cAMP fosfodiesterase durante a germinação. As atividades foram dosadas em extratos brutos de células e as condições de ensaio foram as mesmas descritas em Material e Métodos (3.1 e 5.1). A variação é dada em função dos valores das atividades enzimáticas presentes no zoósporo: cAMP fosfodiesterase = 8,5 nmoles/mg prot. min., adenilato ciclase = 0,8 nmoles/mg prot. min. ●—● cAMP fosfodiesterase; ○—○ adenilato ciclase.

Figura 22 - Variação das atividades de adenilato ciclase e de cAMP fosfodiesterase durante a germinação bloqueada por cicloheximida. Condições idênticas às da figura 21, exceto pela presença de cicloheximida (2 μ g/ml) no meio de cultura. ●—● cAMP fosfodiesterase; ○—○ adenilato ciclase.

Em células vegetativas com 6 horas de crescimento, foi encontrada uma atividade mínima de adenilato ciclase, da mesma ordem de grandeza da atividade presente nos

gêrmens (3-5% do valor dos zoósporos). Essa baixa atividade não é devida à maior degradação do cAMP produzido ou a uma maior atividade de ATPase(s) neste estágio (dados não apresentados). A mistura de homogenatos de células vegetativas com extratos de zoósporos não evidenciou uma adenilato ciclase vegetativa latente, cuja atividade pudesse ser dependente de fatores existentes nos extratos de zoósporos ou inibidores vegetativos da atividade do zoósporo (dados não apresentados).

A atividade da enzima só volta a subir, após a indução da esporulação das células vegetativas. Duas horas após a indução (~ 30% de células papiladas), a atividade atinge cerca de 20% do valor da atividade do zoósporo. Após 3 horas de indução (100% de células papiladas), a atividade é de cerca de 70% do valor da dos zoósporos. Quando a esporulação é induzida em presença de cicloheximida (2 µg/ml), a atividade da adenilato ciclase permanece baixa (Figura 23).

3. AMP CÍCLICO EM B. emersonii

3.1. Concentração intracelular de cAMP no ciclo biológico

A concentração intracelular de cAMP foi dosada durante as diversas fases do ciclo biológico do fungo, conforme Material e Métodos (6.1 e 6.2). O material dosado como cAMP

Figura 23 - Variação da atividade de adenilato ciclase durante a esporulação. A atividade enzimática foi dosada em extra-
tos brutos de células e as condições de ensaio foram como des-
crito em Material e Métodos (5.1). Retângulos brancos repre-
sentam a atividade enzimática durante a esporulação em presen-
ça de cicloheximida e os retângulos pontilhados em ausência da
droga, que foi adicionada uma hora após a troca do meio nutri-
tivo.

foi inicialmente examinado quanto à sua sensibilidade a fosfodiesterases específicas para esse nucleotídeo cíclico, tanto de B. emersonii como de coração bovino, para comprovar se o material testado era realmente cAMP. Os resultados da Tabela VII mostram que cerca de 90% do material era hidrolisado por estas enzimas.

Tabela VII - Hidrólise de cAMP por fosfodiesterases específicas

Células	cAMP (pmoles)		
	Controle	+ fosfodiesterase	
		coração bovino (40 µg)	<u>B. emersonii</u> (38 µg)
Zoósporo	3,8	0,38	0,36
Esferócito	4,6	0,33	0,36
Gérmen	2,4	0,33	-
Célula em crescimento	1,3	0,10	0,13
Esporângio	3,0	0,30	-
Esporângio papilado	4,7	0,45	-

Alíquotas iguais dos extratos celulares (obtidos conforme Material e Métodos, 6.1) foram incubados em presença e ausência das fosfodiesterases. A mistura de reação foi incubada a 30°C por 3 horas e então fervida por 2 minutos e centrifugada; as dosagens de cAMP foram feitas no sobrenadante obtido, segundo Material e Métodos (6.2). A fosfodiesterase de B. emersonii foi purificada como descrito em Material e Métodos (3.4 e 3.5) e é específica para cAMP.

Os zoósporos contêm uma concentração média de $33,2 \pm 1,95$ pmoles cAMP/mg prot. Este valor corresponde à média $\pm$ DPM (desvio-padrão da média) de 30 dosagens.

Durante a germinação, observou-se um aumento significativo nos níveis intracelulares de cAMP, alcançando um máximo (cerca de 100 pmoles/mg prot.) aos 20 minutos de germinação, quando a quase totalidade dos zoósporos transformou-se em esferócitos (Figura 24). A partir daí, foi observado um declínio gradual nos níveis de cAMP, o qual acompanhava de perto a curva de desaparecimento dos esferócitos. A cinética da germinação foi seguida ao microscópio de fase, sob o qual os três tipos de células (zoósporos, esferócitos e gêrmens) podem ser facilmente reconhecidos.

Quando a germinação foi induzida em presença de cicloheximida (2 μ g/ml), que impede a passagem de esferócito a germen, encontrou-se que o conteúdo de cAMP, após atingir o máximo, permanecia constante (Figura 25).

Durante toda a fase de crescimento, a concentração de cAMP permaneceu em um nível basal baixo. No processo de esporulação, nas duas primeiras horas após a troca do meio nutritivo por solução de CaCl_2 (1 mM), os níveis de cAMP permaneceram baixos, começando então a subir, até atingir, nas células totalmente papiladas, o valor encontrado nos zoósporos (Figura 26).

Figura 24 - Variação da concentração intracelular de cAMP durante a germinação. Os desenhos no alto da figura representam o aparecimento sequencial dos três tipos de célula durante a germinação, como descrito no texto e identificados por exame sob o microscópio de fase. Vinte minutos após o inóculo dos zoósporos no meio líquido DM4 a porcentagem de esferócitos em 4 experimentos variou entre 80-90%. Nos intervalos indicados, as células foram colhidas e o nível de cAMP determinado segundo Material e Métodos (6.1 e 6.2). Os valores representam a média de 4 experimentos. As barras indicam o DPM. * $p < 0,05$

3.2. Excreção de cAMP no meio de cultura, durante a germinação

Foi também investigada a possível excreção de cAMP das células para o meio, durante a germinação. As amostras dosadas foram obtidas conforme Material e Métodos (7.1, 7.2, 7.3).

Figura 25 - Variação da concentração intracelular de cAMP durante a germinação em presença de cicloheximida. Seguiu-se o mesmo procedimento da Figura 24. Cicloheximida (2 μ g/ml) foi adicionada no tempo zero. $\circ$ — $\circ$ zoósporo; $\bullet$ — $\bullet$ esferócito; $\bullet$ — $\bullet$ cAMP.

Como mostra a Figura 27, encontrou-se cAMP no meio de cultura, 20 minutos após a indução da germinação. A quantidade de cAMP no meio aumentava quase linearmente até 45 minutos de indução e, a partir daí, permanecia constante.

Figura 26 - Variação da concentração intracelular de cAMP durante o ciclo biológico de B. emersonii. As células foram colhidas e o nível de cAMP determinado de acordo com Material e Métodos (6.1 e 6.2). A seta indica o momento em que o meio nutritivo é substituído por uma solução tamponada de CaCl_2 1 mM.

A concentração de cAMP das células obtidas no mesmo experimento foi determinada paralelamente, como controle.

Figura 27 - Concentração de cAMP no meio extracelular durante a germinação. Os sobrenadantes e as células provenientes de germinação em placas contendo meio líquido DM4, foram colhidos separadamente nos tempos indicados e tratados segundo Material e Métodos (7.2 e 7.3). A concentração de cAMP das amostras assim obtidas foi determinada segundo Material e Métodos (6.2). O—O cAMP no meio; ●—● cAMP na célula.

IV. DISCUSSÃO

As pesquisas na área dos nucleotídeos cíclicos expandiram-se rapidamente nos últimos anos, constituindo atualmente um campo muito promissor para a compreensão de determinados mecanismos de regulação celular. Uma consequência desse fato foi a implicação destes nucleotídeos em uma série de fenômenos os mais diversos tais como ação hormonal, regulação metabólica pós-tradução, proliferação e diferenciação celular, entre vários outros.

O papel fisiológico do cAMP em fungos não tem sido estudado em detalhes, embora recentemente tenham surgido evidências de sua ação em processos morfogênicos em Dictyostelium discoideum (Darmon et al., 1975), Neurospora crassa (Torres et al., 1975), Mucor racemosus (Larsen & Sypherd, 1974) e Aspergillus niger (Wold & Suzuki, 1973). A elucidação do nível de ação do cAMP nestes organismos depende portanto de estudos posteriores e das possibilidades que estes diferentes sistemas biológicos ofereçam para a abordagem experimental dos vários aspectos relacionados ao problema. Isto porque, como foi discutido anteriormente, este processo é bastante complexo e envolve a caracterização das enzimas responsáveis pelo metabolismo do nucleotídeo cíclico, as flutuações da sua concentração

intracelular e a identificação dos fatores responsáveis por essas variações, a identificação de proteínas mediadoras de seus efeitos e, no caso das quinases dependentes de cAMP, dos substratos fisiológicos para a sua ação.

O ficomiceto aquático Blastocladiella emersonii reúne muitas das condições favoráveis para a abordagem experimental destes aspectos. Trata-se de um sistema eucarioto dos mais simples, de fácil manutenção, cultivo e manipulação, apresentando eventos morfogênicos que ocorrem em uma sequência temporal fixa, e que podem ser controlados por simples manipulação de fatores externos.

A germinação dos zoósporos de B. emersonii é um excelente exemplo de transição morfogênica, experimentalmente manipulável e propício ao estudo de mecanismos de regulação pós-tradução, dissociados de expressão gênica simultânea. Nesta fase ocorre uma série de mudanças bioquímicas e morfológicas, muitas das quais não necessitando de transcrição e/ou tradução concomitantes. Um exemplo de regulação pós-tradução ligado a esta citodiferenciação é a síntese "de novo" da parede de quitina. Recentemente demonstraram-se os detalhes dos mecanismos de controle implicados neste processo*. O zoósporo contém, na sua fração solúvel, alta atividade específica de todas as enzimas da via de síntese da UDP-N-acetilglicosamina, substrato

* Selitrennikoff, C.P. & Sonneborn, D.R. - comunicação pessoal.

para a quitina-sintetase. Induzida a germinação, ocorre uma desrepressão dessa via metabólica e provavelmente uma descompartimentalização e/ou ativação da quitina sintetase, previamente existente na fração particulada do zoósporo (Camargo et al., 1967) e como resultado, a síntese da parede celular é iniciada. A presença nos zoósporos de todas as enzimas responsáveis pela síntese "de novo" de uma nova estrutura, a parede de quitina, vem reforçar a idéia de que as diversas alterações de organelas verificadas durante a transição de zoósporo a gêrmen, podem resultar na liberação de algumas das enzimas pré-existentes, que seriam então utilizadas para as suas funções específicas.

A demonstração da existência de enzimas proteolíticas nos zoósporos, bem como o aumento da degradação de proteínas logo após a indução da germinação (Lodi & Sonneborn, 1974), sugerem que estas proteases possam também desempenhar uma função na ativação do metabolismo observada nesta fase, seja por intermédio da ativação de zimogênios, seja pela remoção de inibidores específicos.

Apesar de o cAMP ser teoricamente um candidato potencial para regular alguns destes eventos, não existia nenhuma referência sobre este nucleotídeo em B. emersonii até recentemente quando Maia & Camargo (1974) demonstraram a

existência neste fungo, de uma cAMP fosfodiesterase, cuja atividade específica variava de uma maneira cíclica durante o ciclo evolutivo. A atividade desta enzima é alta nos zoósporos, caindo para valores 15 vezes menores durante a germinação e permanecendo baixa durante toda a fase de crescimento. Na esporulação, a atividade enzimática começa a aumentar após 1,5 horas de carência, até atingir os níveis máximos nos zoósporos recém-liberados. Estes mesmos autores excluíram, por meio de experimentos de mistura de extratos de diferentes células, a presença de ativadores ou inibidores da enzima. Não pudemos demonstrar durante a germinação, uma excreção da cAMP fosfodiesterase para o meio de cultura (resultados não apresentados) e por ora o mecanismo de inativação permanece desconhecido.

Esta enzima, específica para o cAMP e dando como produto de reação o 5'-AMP, foi separada da atividade de cGMP fosfodiesterase também presente nos zoósporos, por intermédio de um gradiente contínuo de glicerol. A confirmação da existência de uma única espécie molecular da cAMP fosfodiesterase, demonstrada nesses gradientes, foi obtida por purificação parcial em coluna de DEAE-celulose, bem como por análises em gel de poliacrilamida. Com ambas as técnicas, evidenciamos sempre um único pico de atividade enzimática. A análise cinética da cAMP fosfodiesterase mostrou um K_m aparente

de 2-4 μ M, não sendo esta constante alterada pela presença de cGMP nas misturas de reação.

Esses resultados parecem indicar que em eucariotos unicelulares, o sistema de degradação de cAMP é bem mais simples do que aqueles descritos em animais superiores (Appleman et al., 1973), onde demonstrou-se a presença de mais de uma enzima capaz de hidrolisar esse nucleotídeo cíclico, sendo tais atividades moduladas quer pela presença de cAMP ou cGMP, quer pela presença de fatores proteicos (Appleman & Terasaki, 1975).

Silverman & Epstein (1975) demonstraram pela incorporação de 32 P e posterior isolamento de cAMP e cGMP marcados por cromatografia em papel, que B. emersonii era capaz de sintetizar ambos os nucleotídeos cíclicos.

Um dos objetivos desta tese foi caracterizar a enzima adenilato ciclase e verificar as possíveis flutuações de sua atividade específica durante o ciclo evolutivo.

A adenilato ciclase de B. emersonii é uma enzima particulada, que sedimenta a 105000 x g. A fração celular contendo a atividade de adenilato ciclase é, muito provavelmente, a membrana plasmática, como indicam os resultados obtidos por tratamento da enzima com o detergente não iônico

Triton X-100, e por iodação da membrana plasmática de zoósporo. Neste particular, a enzima se assemelha à maioria das adenilato ciclases descritas tanto em tecidos animais como em bactérias e eucariotos primitivos.

Nas condições padrão de ensaio, a atividade específica do sedimento de 105000 x g do extrato de zoósporos apresenta valores entre 0,4 a 1,6 nmoles de cAMP produzidos por minuto por mg de proteína. Esta atividade é da mesma ordem de grandeza das adenilato ciclases de mamíferos, quando totalmente ativadas (Sutherland et al., 1962; Birnbaumer et al., 1969) e cerca de 3 vezes mais alta do que a atividade basal de N. crassa (Flawiá & Torres, 1972a).

O pH ótimo da enzima situou-se em torno de 8,5 e 10, sendo semelhante ao determinado para a adenilato ciclase de E. coli (Tao & Huberman, 1970), enquanto as enzimas de tecido animal apresentam pH ótimo em torno de 8.

A adenilato ciclase de B. emersonii exige especificamente Mn^{2+} para sua atividade; a substituição deste cátion por Mg^{2+} resulta em atividade quase nula, contrastando com as enzimas de tecido de mamíferos que atuam tão bem com Mg^{2+} como com Mn^{2+} , e assemelhando-se, neste particular, às enzimas de N. crassa (Flawiá & Torres, 1972a) e T. cruzi*. Na

* Franco da Silveira, J.; Zingales B.; Colli, W. - comunicação pessoal.

procura de um possível ativador da adenilato ciclase de B. emersonii, vários compostos foram testados, alguns dos quais reconhecidamente capazes de estimular adenilato ciclases de células de mamíferos. No entanto, nenhum efeito estimulador foi encontrado; nem mesmo NaF, ativador clássico das adenilato ciclases animais, teve qualquer ação sobre a enzima de B. emersonii. O íon K^+ , indutor da germinação, também não tem nenhum efeito.

Os estudos cinéticos das adenilato ciclases têm sido de modo geral dificultados por no mínimo dois motivos principais: primeiro, a enzima apresenta uma baixa atividade "in vitro"; segundo, as preparações de membrana contendo essa atividade normalmente contêm ATPases muito ativas.

Em consequência de baixa atividade destas enzimas, faz-se necessário um método de detecção de pequenas quantidades do produto. O uso de substrato radioativo de alta atividade específica parece ser a solução adequada.

Para contornar o segundo problema, ou seja, a atividade de ATPase que acompanha a maioria das preparações de adenilato ciclases, deve ser incluído na mistura de reação, um sistema regenerador de ATP, de modo a obter-se quantidade de produto proporcional ao tempo de incubação. Esta exigência, entretanto, torna incerta a concentração de

catíon divalente. A única solução disponível é diminuir a concentração de enzima e o tempo de incubação a um nível tal que a ATPase não interfira na reação.

Assim, todas as determinações cinéticas deste trabalho foram feitas em misturas de ensaio sem sistema de regeneração de ATP e com tempo de incubação de 2,5 minutos.

Todas as adenilato ciclases até agora descritas exigem catíons divalentes para a sua atividade, necessidade essa satisfeita por Mg^{2+} e/ou Mn^{2+} que são, portanto, ativadores essenciais destas enzimas. Em casos de ativação essencial por íons metálicos, o verdadeiro substrato é o complexo substrato-ativador. Assim, nos sistemas de adenilato ciclases estudadas até o momento, pressupõe-se que o verdadeiro substrato é o complexo $MgATP^{2-}$ ou $MnATP^{2-}$, dependendo do catíon divalente utilizado.

A análise cinética das enzimas, cujo verdadeiro substrato é o complexo substrato-ativador (SA), é complicada pela existência do equilíbrio adicional $S + A \xrightleftharpoons{K_0} SA$. Assim, quando se colocam, na mistura de reação, concentrações equimolares de substrato e ativador, por exemplo 1 mM, uma concentração final de 1 mM do complexo SA só será obtida se K_0 for muito menor que 1 mM. A presença de ativador em excesso pode assegurar que todo o substrato esteja na forma de complexo SA,

mas com este procedimento, certas informações podem ser perdidas (por exemplo, se o substrato livre pode ligar-se à enzima) ou surgirem outras dificuldades (como no caso do ativador em excesso ser inibitório).

No caso particular da adenilato ciclase de B. emersonii, cujo verdadeiro substrato é o complexo MnATP^{2-} , o K_0 do complexo é da ordem de 10^{-5} M (Phillips, 1966). Assim, a baixas concentrações de ATP e Mn^{2+} (0,1-1 mM) uma fração considerável do nucleotídeo e do cátion estarão presentes na sua forma livre (não complexada) mesmo quando adicionados em concentrações iguais à mistura de reação.

O gráfico de atividade de adenilato ciclase de B. emersonii em função de concentrações equimolares de ATP e Mn^{2+} apresenta uma curva com aparência sigmoidal, com um valor de $n = 1,8$, nos gráficos do tipo Hill. A adição de quantidades crescentes de Mn^{2+} em excesso em relação à concentração de ATP, resulta em uma ativação da enzima e em uma modificação da cinética enzimática. O comportamento cinético da enzima tende a ser michaeliano quando se tem uma concentração de Mn^{2+} de 0,25 mM em excesso sobre ATP; nestas condições, os gráficos de Hill apresentam um valor de 1,2 para o parâmetro n . A adição de Mn^{2+} em excesso leva ainda à diminuição na concentração de ATP necessária

para se obter uma velocidade igual à metade da velocidade máxima ($L_{0,5}$). Estes resultados não podiam ser interpretados a penas pelo aumento na concentração real do complexo na presença de Mn^{2+} em excesso e pareciam indicar que: ou (a) a enzima apresenta cooperatividade na ligação do substrato, ou (b) a enzima requer Mn^{2+} livre para atividade máxima; ou (c) ambos os casos.

Dados obtidos posteriormente, no entanto, mostra - ram que havia ainda outras interpretações possíveis.

As curvas de atividade enzimática contra concentração de ATP, a várias concentrações fixas de Mn^{2+} , apresentam um máximo de atividade, que ocorre na região onde a concentração de ATP é menor do que a concentração de Mn^{2+} , em cada curva. Concentrações de ATP excedendo a concentração de Mn^{2+} presente na reação resulta em inibição da atividade enzimática, sob todas as condições testadas.

Por outro lado, gráficos da atividade enzimática em função da concentração de Mn^{2+} , a diferentes concentrações fixas de ATP, mostram curvas de aparência sigmoidal. Quanto mais alta a concentração de ATP, mais sigmoidal se apresenta a curva. Essa sigmoidicidade pode ser explicada de duas maneiras: (a) o aumento na concentração de Mn^{2+} retira ATP livre inibitório do sistema pela formação do complexo ativo

MnATP²⁻; ou (b) o aumento na concentração de Mn²⁺, fornece Mn²⁺ livre necessário para a ativação da enzima ou (c) ambos os casos. Cada curva apresenta um máximo de atividade, que ocorre quando a concentração de Mn²⁺ é maior do que a concentração de ATP presente. Quando em grande excesso, porém, o cation passa a ser inibitório, sugerindo que Mn²⁺ livre se liga à enzima.

A adição de 5'-AMP e GTP às misturas de reação mostrou que estes análogos de ATP apresentam características de inibidores competitivos, ou seja, competem com o complexo MnATP²⁻ pelo sítio catalítico, confirmando a hipótese de que ATP livre se liga ao sítio ativo da enzima.

As propriedades cinéticas da enzima tratada com Triton X-100 são semelhantes às aquelas descritas para a enzima particula da. A forma sigmoideal da curva descrevendo atividade enzimática em função de concentrações iguais de ATP e Mn²⁺ pode ser modificada pela adição de Mn²⁺, apresentando-se com característica de comportamento cinético michaeliano na presença de um excesso de 0,25 mM deste cation.

Os resultados obtidos através do estudo cinético da adenilato ciclase de B. emersonii poderiam se ajustar tanto a um modelo em que ATP livre compete com o complexo MnATP²⁻ pelo sítio catalítico da enzima, como a um modelo no qual a

enzima possuisse um sítio adicional, capaz de ligar Mn^{2+} ; neste caso o efeito inibitório de ATP seria explicado pela diminuição da concentração de Mn^{2+} livre na mistura de reação.

A existência de um outro sítio capaz de ligar Mg^{2+} (ou Mn^{2+}), além do sítio catalítico, foi inicialmente sugerido por Birnbaumer et al. (1969) estudando a adenilato ciclase de tecido adiposo e por Drummond & Duncan (1970) investigando a enzima de tecido cardíaco. de Haen (1974), comparando os resultados dos autores acima citados com modelos teóricos, propôs uma interpretação alternativa. Pressupondo que o complexo $MgATP^{2-}$ é o verdadeiro substrato da enzima e que ATP livre é inibitório, esse autor sugeriu que a concentração de Mg^{2+} necessária para a atividade máxima da enzima deveria estar relacionada às afinidades relativas de ATP e $MgATP^{2-}$ pela enzima; isto é, quanto maior a afinidade da enzima por ATP livre, maior será a concentração de Mg^{2+} necessária para a atividade máxima. Cálculos baseados nos resultados obtidos por Birnbaumer et al. (1969) e Drummond & Duncan (1970) indicaram que este mecanismo é possível se a afinidade da enzima por ATP livre for pelo menos cem vezes maior que a sua afinidade por $MgATP^{2-}$.

Recentemente, Lin et al. (1975), estudando a adenilato ciclase hepática confirmaram o modelo de de Haen e propuseram que $HATP^{3-}$, a forma protonada do ATP, é a verdadeira espécie

cie inibitória, descartando a hipótese da existência de um sítio adicional, capaz de ligar Mg^{2+} .

London & Steck (1969) estudando a cinética de reações enzimáticas com interação entre substrato e um modificador metálico sugeriram critérios para distinguir as duas alternativas mencionadas. Segundo estes autores, o modelo no qual Mn^{2+} se ligaria a outro sítio existente na enzima, além do sítio ativo, deveria apresentar curvas de atividade versus concentrações equimolares de ATP e Mn^{2+} fortemente sigmoidais, mesmo nas regiões de alta concentração de substrato. Estenão parece ser o caso da adenilato ciclase de B. emersonii, que apresenta curvas levemente sigmoidais a baixa concentração de substrato. Estes investigadores sugeriram ainda que os máximos das curvas de atividade em função da concentração de Mn^{2+} com concentrações fixas de ATP deveriam ocorrer quando a concentração de Mn^{2+} excedesse de muito a concentração de ATP, no modelo da enzima ativada por Mn^{2+} livre. Este critério também não é satisfeito pela adenilato ciclase de B. emersonii.

Em resumo, os dados cinéticos da adenilato ciclase de B. emersonii aqui apresentados parecem se ajustar melhor a um modelo no qual o verdadeiro substrato da enzima é o complexo $MnATP^{2-}$, onde tanto o ATP como o Mn^{2+} , na forma

livre, competem com o complexo pela enzima, a qual apresenta uma afinidade maior pelas formas livres do que pelo complexo MnATP^{2-} .

O estudo das características cinéticas da enzima adenilato ciclase de zoósporos foi acompanhado da determinação de sua atividade específica durante o ciclo biológico do fungo. Encontraram-se variações semelhantes às aquelas descritas anteriormente para a cAMP fosfodiesterase (Maia & Camargo, 1974), mas certas características destas flutuações merecem uma discussão mais pormenorizada.

Aqueles autores haviam demonstrado que a queda da atividade específica da cAMP fosfodiesterase durante a germinação é muito semelhante à curva de desaparecimento dos zoósporos na população, não sendo alterada pela presença de cicloheximida, que bloqueia a conversão de esferócito à gêrmen. Experimentos semelhantes aos destes autores confirmaram seus resultados e permitiram verificar que a queda da atividade específica da enzima adenilato ciclase é mais lenta; aos 20 minutos de germinação, quando 80-90% dos zoósporos transformaram-se em esferócitos, a atividade da adenilato ciclase é ainda significativa, em torno de 40% da atividade inicial, atingindo os níveis mínimos somente após a transição de esferócito a gêrmen. Em presença de cicloheximida, a atividade de

cAMP fosfodiesterase atinge os valores mínimos observados na ausência da droga, enquanto que a atividade específica da adenilato ciclase permanece em torno dos 40% da atividade do zoósporo. A presença da droga reflete-se também na concentração intracelular de cAMP, que atinge o nível máximo observado aos 20 minutos da germinação normal, mas permanece alta o restante do tempo.

A adição de Triton X-100 à mistura de dosagem não alterou os valores encontrados, descartando-se portanto uma possível atividade de adenilato ciclase latente.

As razões para o decréscimo da atividade de adenilato ciclase durante a germinação permanecem obscuras, tendo sido excluída a presença de ativadores ou inibidores nos diferentes extratos. A adenilato ciclase de zoósporo, como já foi discutido, está provavelmente ligada à membrana plasmática. Durante a germinação, ao lado da síntese da parede celular, devem ocorrer alterações da membrana plasmática, pois observa-se, por exemplo, um grande aumento na capacidade de tomada de aminoácidos e nucleosídeos pela célula (Murphy & Lovett, 1966; Soll & Sonneborn, 1971b, Silverman et al., 1974). Se estas mudanças são a causa da queda da atividade enzimática ou se todas elas são o resultado de um mesmo evento inicial que desencadeia a germinação, são no momento questões sem respostas.

A atividade de adenilato ciclase, após atingir um nível mínimo no fim da germinação, permanece baixa durante toda a fase de crescimento e só volta a apresentar um aumento na atividade após a indução da esporulação. Quando este processo é induzido na presença de cicloheximida, a atividade permanece baixa, sugerindo que a enzima é sintetizada "de novo" nesta fase do ciclo evolutivo.

Encontramos, no zoósporo, uma concentração intracelular média de 33 pmoles de cAMP por mg de proteína. Se considerarmos o zoósporo como sendo uma esfera de raio aproximado de 4 μm e contendo 20 pg de proteína (Lovett, 1968), este nível corresponderia a uma concentração intracelular de cerca de 2,5 μM , que é comparável aos níveis observados por Silverman & Epstein (1975).

Durante a germinação, observamos um significativo aumento na concentração intracelular de cAMP, o qual ocorre na fase inicial do processo, no período que independe de tradução, alcançando um valor máximo (cerca de 100 pmoles/mg proteína), quando a maioria das células completou a transformação de zoósporos a esferócitos. A partir daí, observou-se um declínio gradual nos níveis de cAMP, que permanecem baixos durante todo o crescimento. No processo de esporulação, durante as duas primeiras horas após a retirada do meio nutritivo, o nível de cAMP continua baixo e então começa a subir, até atingir o valor encontrado no zoósporo.

Os níveis intracelulares de cAMP por nós determinados durante a germinação diferem daqueles descritos por Silverman & Epstein (1975); segundo estes autores, a concentração do cAMP cai abruptamente durante a germinação, as células perdendo cerca de 60-80% do seu conteúdo em cAMP. Entretanto, esses autores só dosaram o nível do cAMP após 45 minutos do início da germinação, quando praticamente a maioria da população encontra-se sob a forma de germen. Por outro lado, os inóculos de zoósporos utilizados por estes autores provinham de células crescidas em placas de agar; nossa experiência indica que, nestas condições, a germinação perde grande parte de sua sincronia, provavelmente em virtude da heterogeneidade dos zoósporos, que podem estar em diferentes estados de ativação, devido a nutrientes remanescentes na placa de agar que são recolhidos com os zoósporos no momento da colheita dos mesmos. Não podemos entretanto, explicar a discrepância dos valores observados em relação aos germens, que em nossos experimentos são da mesma ordem de grandeza daqueles encontrados nos zoósporos.

Como é possível relacionar o pico de cAMP observado nos esferócitos, com os valores das atividades específicas das enzimas implicadas no seu metabolismo durante a germinação?

Em estudos desta natureza, as conclusões a serem tiradas precisam levar em consideração as dificuldades intrín-

secas a esse tipo de experimentos, quando se tenta determinar e comparar atividades enzimáticas em diferentes formas celulares. Nós procuramos usar condições ótimas de ensaio para ambas as enzimas, que permitissem medir o potencial catalítico máximo de cada uma delas. Entretanto, estas condições "in vitro" podem não permitir a expressão de algumas das propriedades regulatórias das enzimas. A ruptura das células pode alterar a atividade da enzima e, obrigatoriamente, as misturas de reação não reproduzem as concentrações de substrato existentes nas células em cada fase da colheita, sobretudo em relação aos diversos compartimentos celulares. Deste modo, a atividade determinada "in vitro" nem sempre reflete aquilo que ocorre "in vivo". Levando em conta estas limitações, os resultados das dosagens de cAMP indicam que durante a germinação deve existir necessariamente uma predominância da síntese em relação à degradação, sobretudo nos primeiros 20 minutos. Os valores de atividade específica das enzimas cAMP fosfodiesterase e adenilato ciclase obtidos ao longo da germinação não são incompatíveis com o aumento da concentração de cAMP nesta fase. Entretanto, outros fatores que poderiam ajudar na compreensão desta regulação devem ser considerados. Como já observamos, não podemos excluir, por enquanto, uma ativação "in vivo" da adenilato ciclase nos primeiros minutos de germinação. Ao mesmo tempo não dispomos ainda de dados que

possam evidenciar, por exemplo, o papel que possa desempenhar o estado energético da célula na regulação da adenilato ciclase "in vivo". Como descrito por Atkinson & Walton (1967) a carga energética $[(ATP) + 1/2(ADP)]/[(ATP) + (ADP) + (AMP)]$ representa um balanço do reservatório celular de nucleotídeos de adenina; a influência de semelhante mecanismo é difícil de verificação direta, pois necessitaríamos da presença simultânea, na mistura de reação, de determinadas razões entre esses diferentes nucleotídeos. Entretanto, medidas da carga energética em diversas situações nutricionais, na bactéria E. coli e outros microrganismos, mostraram que ela cai de um valor de 0,8 durante o crescimento, para 0,5 durante a fase estacionária de crescimento (Chapman et al., 1971). O zoósporo é uma célula que não cresce nem divide, permanecendo viável por longos períodos, mesmo na ausência de nutrientes externos (à custa de reservas endógenas de carboidratos e lipídios) e contendo uma atividade biossintética extremamente baixa (Lovett, 1968; Soll & Sonneborn, 1971a; Suberkropp & Cantino, 1973). Estas características são muito semelhantes às condições de células em carência e pode supor-se que a germinação seja acompanhada de um aumento considerável da carga energética. Indicações neste sentido foram descritas por Suberkropp & Cantino (1968) e Smith & Silverman (1973) ao mostrarem que logo após a indução da germinação há um grande aumento no consumo de

oxigênio enquanto decresce rapidamente a reserva de polissacarídios e lipídios. Tomadas estas indicações em conjunto e levando-se em conta que o 5'-AMP mostrou ser um inibidor competitivo da adenilato ciclase "in vitro", um provável aumento na concentração de ATP e/ou mudanças intracelulares destes nucleotídeos de adenina após induzida a germinação, poderiam modular a síntese de cAMP por nós observada nesta fase. Determinações da concentração de ATP e da carga energética ao longo da germinação poderão consubstanciar no futuro esta hipótese.

Atingida a concentração intracelular máxima aos 20 minutos da germinação, os níveis cAMP começam a decrescer, retornando a níveis idênticos àqueles dos zoósporos, quando toda a população transformou-se em germen. Aos 20 minutos da germinação, a atividade de cAMP fosfodiesterase é muito baixa e está próxima de seus níveis mínimos; portanto, esta enzima não poderia ser responsável pelo desaparecimento do cAMP que ocorre em seguida, sendo a alternativa a excreção do nucleotídeo cíclico para o meio de cultura. A presença de cAMP foi verificada no meio extracelular, a partir de 20 minutos após induzida a germinação, sua concentração aumentando quase linearmente até 45 minutos, e tornando-se constante a partir de então.

Em função das informações obtidas quanto ao controle do metabolismo do cAMP na germinação, podemos concluir que:

a) a cAMP fosfodiesterase deve participar na regulação dos níveis de cAMP apenas nos zoósporos, onde tanto esta enzima quanto a adenilato ciclase apresentam atividades específicas máximas.

b) durante a transição de zoósporos a células vegetativas, em virtude do rápido desaparecimento da cAMP fosfodiesterase, a concentração intracelular do cAMP seria função mais direta da adenilato ciclase, modulada talvez pela carga energética da célula.

c) um terceiro mecanismo, a excreção do cAMP para o meio extracelular seria operante a partir de esferócitos, quando a concentração intracelular seria praticamente uma resultante da velocidade de excreção, em virtude do desaparecimento progressivo da atividade de adenilato ciclase.

Este esquema assemelha-se muito àquele descrito para E. coli (Rickenberg, 1974) e pode ser uma característica de organismos unicelulares, onde as respostas celulares são dadas mais diretamente pelas mudanças do meio externo, que na natureza varia frequente e indeterminadamente. Já nos organismos superiores, o aparecimento de mecanismos adicionais, como a modulação por hormônios, seria uma resposta às necessidades de controles integrativos e supracelulares.

Não dispomos por enquanto de evidências diretas que permitam relacionar o aumento dos níveis de cAMP durante a transição de zoósporos a esferócitos com a ativação metabólica que ocorre nesta fase (Lovett, 1975). Entretanto, o processo de germinação é conhecido com detalhes suficientes para considerarmos algumas sugestões como as mais prováveis.

As células de B. emersonii, nas diferentes fases de crescimento, encontram-se em diferentes regimes de síntese de glicogênio (Camargo, 1969), sendo que células em crescimento sintetizam glicogênio ativamente, enquanto zoósporos sintetizam pouco, se algum, glicogênio, encontrando-se pelo contrário, em processo de degradação e utilização desse polissacárido. As mudanças no conteúdo de lipídios seguem aproximadamente estes mesmos padrões (Smith & Silverman, 1973). Esses diferentes programas de síntese e degradação de glicogênio e lipídios nas diferentes fases do ciclo biológico do fungo sugerem um provável ponto de regulação por cAMP.

A hipótese de que o aumento dos níveis de cAMP estaria relacionado com a ativação do processo de síntese proteica durante a germinação é sugerido pelas observações de Schmoyer & Lovett (1969) de que ribossomos extraídos de zoósporos, ao contrário de ribossomos provenientes de células vegetativas, são inativos em sistema acelular de síntese proteica.

O aumento na concentração intracelular de cAMP, durante a germinação de B. emersonii pode ainda refletir uma característica de sistemas em diferenciação, como propuseram Filosa et al. (1975); estes autores, estudando células embrionárias de pâncreas, verificaram que altos níveis de cAMP são necessários para a transição entre dois estados celulares diferenciados.

V. RESUMO

Foram estudadas as enzimas implicadas no metabolismo de cAMP, bem como as variações na concentração deste nucleotídeo cíclico e na atividade de adenilato ciclase durante o ciclo biológico de B. emersonii.

Demonstrou-se que os zoósporos contêm enzimas específicas e distintas para a hidrólise de cAMP e cGMP. Existe apenas uma espécie molecular da cAMP fosfodiesterase, que hidrolisa cAMP a 5'-AMP com um K_m aparente de 2-4 μM ; a presença de cGMP nas misturas de reação, não altera as propriedades cinéticas da enzima.

A adenilato ciclase de B. emersonii é uma enzima particulada, provavelmente ligada à membrana plasmática do zoósporo, que exige especificamente Mn^{2+} para sua atividade. A enzima não é ativada por NaF, catecolaminas ou outros compostos de estrutura semelhante. O estudo das propriedades cinéticas da adenilato ciclase sugere um modelo simples no qual o verdadeiro substrato da enzima é o complexo $MnATP^{2-}$ e tanto ATP como Mn^{2+} , nas suas formas livres, competem com o complexo pelo sítio catalítico da enzima, que apresenta uma afinidade maior pelas formas livres do que pelo complexo $MnATP^{2-}$.

A atividade específica da adenilato ciclase, determinada durante o ciclo biológico do fungo, mostra-se elevada nos zoósporos, cai lentamente durante a germinação e permanece baixa em todo o período de crescimento, só voltando a apresentar um aumento na atividade após a indução da esporulação. Quando este processo é induzido na presença de cicloheximida, a atividade permanece baixa, sugerindo que a enzima é sintetizada "de novo" nesta fase do ciclo evolutivo.

A concentração intracelular de cAMP foi também determinada nas várias fases do ciclo biológico de B. emersonii. No zoósporo encontrou-se um valor médio de 33 pmoles cAMP/mg proteína. Durante a germinação, os níveis de cAMP aumentam, atingindo um máximo (~ 100 pmoles/mg proteína) quando a quase totalidade dos zoósporos se transformou em esferócitos. A partir daí observou-se um declínio gradual nos níveis de cAMP, que permanecem baixos durante toda a fase de crescimento, voltando a elevar-se na fase final da esporulação até alcançar o nível de zoósporo.

O grande aumento na concentração intracelular de cAMP na fase de esferócitos é parcialmente explicado pela predominância da atividade de adenilato ciclase sobre a atividade de cAMP fosfodiesterase neste período; a possibilidade

de uma ativação "in vivo" da adenilato ciclase, neste estágio do ciclo, não pode ser excluída. A queda nos níveis de cAMP que ocorre na passagem de esferócito a gérmen, numa fase onde a atividade de cAMP fosfodiesterase já é muito baixa, é devido principalmente a excreção deste nucleotídeo cíclico para o meio extracelular.

O grande aumento nos níveis de cAMP durante a transição de zoósporo a esferócito pode estar relacionado com a ativação metabólica ocorrendo nesta fase e pode também refletir uma característica de sistemas em diferenciação, isto é, a necessidade de altos níveis de cAMP para a transição entre dois estados celulares diferenciados.

SUMMARY

The enzymes involved in the metabolism of cAMP have been studied, as well as the fluctuations in the concentration of this cyclic nucleotide and in the adenylate cyclase activity during the life cycle of B. emersonii.

Zoospores were shown to contain independent specific enzymes involved in the hydrolysis of cAMP and cGMP. A single molecular species was found for the cAMP phosphodiesterase activity, which catalyses the hydrolysis of cAMP to 5'-AMP. This enzyme displays normal Michaelis kinetics with an apparent K_m of 2-4 μM ; the addition of cGMP to the reaction mixtures does not modify the kinetic properties of the enzyme.

Adenylate cyclase activity in B. emersonii is associated with particulate subcellular fractions, most probably bound to the zoospore plasma membrane. The activity requires Mn^{2+} and it is not activated by NaF, catecholamines or other related compounds. The enzyme substrate is the $MnATP^{2-}$ complex and the kinetic data obtained studying the adenylate cyclase activity can be explained by a simple model where free ATP and Mn^{2+} compete with $MnATP^{2-}$ for the catalytic site of the enzyme, the affinity for $MnATP^{2-}$ being lower than for free Mn^{2+} and ATP.

The specific activity of adenylate cyclase has been determined throughout the fungus life cycle. The enzyme activity is high in zoospores, falls slowly during germination remaining low at the growth phase and rising again during the later stage of sporulation. When this process is induced in the presence of cycloheximide, there is no increase in adenylate cyclase activity, suggesting that "de novo" synthesis of the enzyme occurs at this stage.

Fluctuations in the intracellular levels of cAMP during the cell cycle of B. emersonii have also been shown. Zoospores contain an average concentration of 33 pmoles cAMP/mg protein. During germination, a significant increase in the cAMP levels is observed, reaching a maximum (ca. 100 pmoles/mg protein) when the majority of the zoospores have changed into round cells. From then on a gradual decline in the cAMP levels is observed. During the growth phase the cAMP contents of the cells remain low, increasing again late in the sporulation stage.

The large increase in the intracellular concentration of cAMP in the round cell phase is partially explained by the predominance of adenylate cyclase activity over cAMP phosphodiesterase activity (during this stage); the possibility of an "in vivo" activation of the adenylate cyclase during this period, however, cannot be excluded. The decrease in the

cAMP levels occurring during the passage of round cells to germlings, in a stage where cAMP phosphodiesterase activity is negligible, is mainly due to the excretion of this cyclic nucleotide to the extracellular medium.

The rise in cAMP contents during encystment might be related to the activation of metabolism occurring in this phase and may also reflect a characteristic of differentiating systems, that is, high cAMP levels being necessary for a differentiative transition.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amrhein, N. & Filner, P. - Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate in Chlamydomonas reinhardtii. Isolation and characterization. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70: 1099-1103, 1973.
- Appleman, M.M.; Birnbaumer, L. & Torres, H.N. - Factors affecting the activity of muscle glycogen synthetase. III. The reaction with adenosine triphosphate, Mg^{++} and cyclic 3',5'-adenosine monophosphate. Arch. Biochem. Biophys. 116: 39-43, 1966.
- Appleman, M.M. & Terasaki, W.L. - Regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5: 153-162, 1975.
- Appleman, M.M.; Thompson, W.J. & Russel, T.R. - Cyclic nucleotide phosphodiesterases. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 3: 65-98, 1973.
- Atkinson, D.E. & Walton, G.M. - Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme. J. Biol. Chem. 242: 3239-3241, 1967.
- Berridge, M.J. & Prince, W.T. - The role of cyclic AMP in the control of fluid secretion. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 1: 137-147, 1972.
- Birnbaumer, L. - Hormone-sensitive adenylyl cyclases: useful models for studying hormone receptor functions in cell-free systems. Biochim. Biophys. Acta 300: 129-158, 1973.

- Birnbaumer, L.; Pohl, S.L.; Krans, M.L. & Rodbell, M. -
The actions of hormones on the adenylyl cyclase system.
Adv. Biochem. Psychopharmacol. 3: 185-208, 1970.
- Birnbaumer, L.; Pohl, S.L. & Rodbell, M. - Adenylyl cyclase
in fat cells. I. Properties and the effects of
adenocorticotropin and fluoride. J. Biol. Chem. 244:
3468-3476, 1969.
- Birnbaumer, L. & Rodbell, M. - Adenylyl cyclase in fat cells.
II. Hormone receptors. J. Biol. Chem. 244: 3477-3482,
1969
- Bitensky, M.W.; Miller, W.H.; Gorman, R.E.; Neufeld, A.H.
& Robinson, R. - The role of cyclic AMP in visual
excitation. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 1: 317-335,
1972.
- Bloch, A. - Cytidine 3',5'-monophosphate (cyclic CMP).
I. Isolation from extracts of leukemia L-4210 cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 58: 652-659, 1974.
- Bonner, J.T. - Induction of stalk cell differentiation by
cyclic AMP in the cellular slime mold Dictyostelium
discoideum. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 65: 110-113,
1970.
- Brailovsky, C.; Trudel, M.; Lallier, R. & Nigam, V.N. -
Growth of normal and transformed rat embryo fibroblasts.
Effects of glycolipids from Salmonella minnesota R mutants.
J. Cell Biol. 57: 124-132, 1973.

- Brostrom, M.A.; Reimann, E.M.; Walsh, D.A. & Krebs, E.G. - A cyclic 3',5'-AMP-stimulated protein kinase from cardiac muscle. In: Weber, G., Adv. Enzyme Reguln., New York, Pergamon Press, 1969, vol. 8, p. 191-203.
- Bürk, R.R. - Reduced adenyl cyclase activity in a polyoma virus transformed cell line. Nature 219: 1272-1275, 1968.
- Butcher, R.W.; Baird, C.E.; Sutherland, E.W. - Effects of lipolytic and antilipolytic substances on adenosine 3',5'-monophosphate levels in isolated fat cells. J. Biol. Chem. 243: 1705-1712, 1968.
- Butcher, R.W. & Sutherland, E.W. - Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. J. Biol. Chem. 237: 1244-1250, 1962.
- Camargo, E.P. - Biossíntese de glicogênio em Blastocladiella emersonii. Ribeirão Preto, 1969 (Tese de doutoramento - Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP).
- Camargo, E.P.; Dietrich, C.P.; Sonneborn, D. & Strominger, J.L. - Biosynthesis of chitin in spores and growing cells of Blastocladiella emersonii. J. Biol. Chem. 242: 3121-3128, 1967.
- Cantino, E.C. - Metabolism and morphogenesis in a new Blastocladiella. Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol. 17: 325-362, 1951.

- Cantino, E.C. & Mack, J.P. - Form and function in the zoospore of Blatocladia emersonii. I. The γ -particle and satellite ribosome package. Nova Hedwigia Z. Kryptogamenkd. 18: 115-148, 1969.
- Cantino, E.C. & Myers, R.B. - The γ -particle and intracellular interactions in Blastocladia emersonii. Brokhave Symp. Biol. 25: 51-74, 1973.
- Cantino, E.C.; Suberkropp, K.F. & Truesdell, L.C. - Form and function in the zoospore of Blastocladia emersonii. II. Spheroidal mitochondria and respiration. Nova Hedwigia Z. Kryptogamenkd 18: 149-158, 1969.
- Chang, Y.-Y. - Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate phosphodiesterase produced by the slime mold Dictyostelium discoideum. Science 161: 57-59, 1968.
- Chapman, A.G.; Fall, L. & Atkinson, D.E. - Adenylate energy charge in Escherichia coli during growth and starvation. J. Bacteriol. 108: 1072-1086, 1971.
- Cheung, W.Y. - Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator. Biochem. Biophys. Res. Commun. 38: 533-538, 1970.
- Cheung, W.Y. - Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase: evidence for and properties of a protein activator. J. Biol. Chem. 246: 2859-2869, 1971.
- Chiang, M.H. & Cheung, W.Y. - Adenylate cyclase of Brevibacterium liquefaciens. Inactivation by neuraminidase, phospholipase A and phospholipase C. Biochem. Biophys. Res. Commun. 55: 187-192, 1973.

- Chlapowski, F.J.; Kelly, L.A. & Butcher, R.W. - Cyclic nucleotides in cultured Cells. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 6: 245-338, 1975.
- Cook, W.H.; Lipkin, D. & Markham, R. - The formation of a cyclic dianhydrodiadenylic acid by alkaline degradation of adenosine-5'-triphosphoric acid. J. Am. Chem. Soc. 79: 3607-3608, 1957.
- Corbin, J.D.; Reimann, E.M.; Walsh, D.A. & Krebs, E.G. - Activation of adipose tissue lipase by skeletal muscle cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-stimulated protein kinase. J. Biol. Chem. 245: 4849-4851, 1970.
- d'Armiento, M.; Johnson, G.S. & Pastan, I. - Regulation of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase activity in fibroblasts by intracellular concentrations of cyclic adenosine monophosphate. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69: 459-462, 1972.
- Darmon, M.; Brachet, P. & Pereira da Silva, L.H. - Chemotatic signals induce cell differentiation in Dictyostelium discoideum. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72: 3163-3166, 1975.
- Davoren, P.R. & Sutherland, E.W. - The effect of L-epinephrine and other agents on the synthesis and release of adenosine 3',5'-phosphate by whole pigeon erythrocytes. J. Biol. Chem. 238: 3009-3015, 1963.
- de Haën, C. - Adenylate cyclase. A new kinetic analysis of the effects of hormones and fluoride ion. J. Biol. Chem. 249: 2756-2762, 1974.

- Doore, B.J.; Bashor, M.M.; Spitzer, N.; Mawe, R.C. & Saier, M.H. - Regulation of adenosine 3',5'-monophosphate efflux from rat glioma cells in culture. *J. Biol. Chem.* 250, 4371-4372, 1975.
- Drummond, G.I. & Duncan, L. - Adenyl cyclase in cardiac tissue. *J. Biol. Chem.* 245: 976-983, 1970.
- Dulley, J.R. & Grieve, P.A. - A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination. *Analytical Biochem.* 64: 136-141, 1975.
- Eil, C. & Wool, I. - Function of phosphorylated ribosomes. *J. Biol. Chem.* 248: 5130-5136, 1973.
- Filosa, S.; Pictet, R. & Rutter, W.J. - Positive control of cyclic AMP on mesenchymal factor controlled DNA synthesis in embryonic pancreas. *Nature* 257: 702-705, 1975.
- Flawiã, M.M. & Torres, H.N. - Adenylate cyclase activity in Neurospora crassa. I. General properties. *J. Biol. Chem.* 247: 6873-6879, 1972a.
- Flawiã, M.M. & Torres, H.N. - Adenylate cyclase activity in Neurospora crassa. II. Kinetics. *J. Biol. Chem.* 247: 6880-6883, 1972b.
- Flawiã, M.M. & Torres, H.N. - Activation of membrane-bound adenylate cyclase in Neurospora crassa by glucagon. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 69: 2870-2873, 1972c.
- Froehlich, J.E. & Rachmeler, M. - Effect of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate on cell proliferation. *J. Cell Biol.* 55: 19-31, 1972.

- Gilman, A.G. - A protein binding assay for adenosine 3',5'-cyclic monophosphate. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 67: 305-312, 1970.
- Goldberg, N.D.; Haddox, M.K.; Nicol, S.E.; Glass, D.B.; Sanford, C.H.; Kuehl, F.A. & Estensen, R. - Biologic regulation through opposing influences of cyclic GMP and cyclic AMP: The Yin Yang hypothesis. Adv. Cyclic. Nucleotide Res. 5: 307-330, 1975.
- Goldberg, N.D.; O'Dea, R.F. & Haddox, M.K. - Cyclic GMP. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 3: 155-223, 1973.
- Goren, E.N. & Rosen, O.M. - The effect of nucleotides and a non-dialyzable factor on the hydrolysis of cyclic AMP by a cyclic nucleotide phosphodiesterase from beef heart. Arch. Biochem. Biophys. 142: 720-723, 1971.
- Harwood, J.P. & Peterkofsky, A. - Glucose-sensitive adenylate cyclase in toluene-treated cells of Escherichia coli B. J. Biol. Chem. 250: 4656-4662, 1975.
- Hirata, M. & Hayaishi, O. - Adenyl cyclase of Brevibacterium liquefaciens. Biochim. Biophys. Acta 149: 1-11, 1967.
- Hogg, D. Mc C. & Jago, G.R. - The antibacterial action of lactoperoxidase. The nature of the bacterial inhibitor. Biochem. J. 117: 779-790, 1970.
- Holt, P.G. & Oliver, I.T. - Studies on the mechanism of induction of tyrosine aminotransferase in neonatal rat liver. Biochemistry 8: 1429-1437, 1969.

- Huttunen, J.K. & Steinberg, D. - Activation and phosphorylation of a purified adipose tissue hormone-sensitive lipase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 239: 411-427, 1971.
- Hwang, T.C.H.; Clark, V.L. & Bernlohor, R.W. - Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase activity of Bacillus licheniformis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58: 708-713, 1974.
- Ide, M. - Adenyl cyclase of bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 144: 262-268, 1971.
- Johnson, G.S.; Friedman, R.M. & Pastan, I. - Restoration of several morphological characteristics of normal fibroblasts in sarcoma cells treated with adenosine-3',5'-cyclic monophosphate and its derivative. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 68: 425-429, 1971.
- Jost, J.-P.; Hsie, A.; Hughes, S.D. & Ryan, L. - Role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in the induction of hepatic enzymes. I. Kinetics of the induction of rat liver serine dehydratase by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *J. Biol. Chem.* 245: 351-357, 1970.
- Kakiushi, S.; Yamazaki, R. & Nakajima, H. - Properties of a heat stable phosphodiesterase activating factor isolated from brain extract. *Proc. Jap. Acad.* 46: 587-592, 1970.
- Klainer, L.M.; Chi, Y.-M.; Freidberg, S.L.; Rall, T.W. & Sutherland, E.W. - Adenyl cyclase. IV. The effects of neurohormones on the formation of adenosine 3',5'-phosphate by preparations from brain and other tissues. *J. Biol. Chem.* 237: 1239-1243, 1962.

- Klein, C. - Induction of phosphodiesterase by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in differentiating Dictyostelium discoideum amoebae. J. Biol. Chem. 250: 7134-7138, 1975.
- Konijn, T.M.; Barkley, D.S.; Chang., Y.-Y. & Bonner, J.T. - Cyclic AMP: A naturally occurring acrasin in the cellular slime molds. American Naturalist, 102: 225-233, 1968.
- Konijn, T.M.; van de Meene, J.G.C.; Bonner, J.T. & Barkley, D.S. - The acrasin activity of adenosine 3',5'-cyclic phosphate. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 58: 1152-1154, 1967.
- Kram, R.; Mamont, P. & Tomkins, G.M. - Pleiotypic control by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate: A model for growth control in animal cells. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 70: 1432-1436, 1973.
- Kuo, J.F. & Greengard, P. - Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. IV. Widespread occurrence of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in various tissues and phyla of the animal kingdom. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 64: 1349-1355, 1969.
- Langan, T.A. - Protein kinases and protein kinase substrates. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 3: 99-153, 1973.
- Larsen, A.D. & Sypherd, P.S. - Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and morphogenesis in Mucor racemosus. J. Bacteriol. 117: 432-438, 1974.
- Leaver, C.J. & Lovett, J.S. - An analysis of protein and RNA synthesis during encystment and outgrowth germination of Blastocladiella zoospores. Cell Differ. 3: 165-192, 1974.

- Lemos, E.M. & Lodi, W.R. - Effect of concanavalin A on sporulation of Blastocladiella emersonii. Exptl. Cell Res. 94: 437-440, 1975.
- Lessie, P.E. & Lovett, J.S. - Ultra-structural changes during sporangium formation and zoospore differentiation in Blastocladiella emersonii. Am. J. Bot. 55: 220-236, 1968.
- Levey, G.S. - Solubilization of myocardial adenyl cyclase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 38: 86-92, 1970.
- Levey, G.S. - Restoration of glucagon responsiveness of solubilized myocardial adenylate cyclase by phosphatidylserine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43: 108-113, 1971a.
- Levey, G.S. - Restoration of norepinephrine responsiveness of solubilized myocardial adenylate cyclase by phosphatidylinositol. J. Biol. Chem. 246: 7405-7407, 1971b.
- Liao, S.; Lin, A.H. & Tymoczko, J.L. - Adenyl cyclase of cell nuclei isolated from rat ventral prostate. Biochim. Biophys. Acta 230: 535-538, 1971.
- Lin, M.C.; Salomon, Y.; Rendell, M. & Rodbell, M. - The hepatic adenylate cyclase system. II. Substrate binding and utilization and the effects of magnesium ion and pH. J. Biol. Chem. 250: 4246-4252, 1975.
- Lin, P. P-C. - Cyclic nucleotides in higher plants? Adv. Cyclic Nucleotide Res. 4: 439-461, 1974.

- Lipkin, D.; Cook, W.H. & Markham, R. - Adenosine-3',5'-phosphoric acid: A proof of structure. J. Am. Chem. Soc. 81: 6198-6203, 1959.
- Liu, Y.P.; Lin, Y.M. & Cheung, W.Y. - Active form of protein activator of cAMP phosphodiesterase is a Ca^{2+} -activator complex. Biochemistry/Biophysics 1974 Meeting, Minneapolis, Minn, June 1974. Apud: Liu, Y.P.; Lin, Y.M. & Cheung, W.Y., Fed. Proc. 33, 1391, 1974.
- Lodi, W.R. & Sonneborn, D.R. - Protein degradation and protease activity during the life cycle of Blastocladiella emersonii. J. Bacteriol. 117: 1035-1042, 1974.
- London, W.P. & Steck, T.L. - Kinetics of enzyme reactions with interaction between a substrate and a (metal) modifier. Biochemistry 8: 1767-1779, 1969.
- Lovett, J.S. - Chemical and physical characterization of "nuclear caps" isolated from Blastocladiella zoospores. J. Bacteriol. 85: 1235-1246, 1963.
- Lovett, J.S. - Reactivation of ribonucleic acid and protein synthesis during germination of Blastocladiella zoospores and the role of the ribosomal nuclear cap. J. Bacteriol. 96: 962-969, 1968.
- Lovett, J.S. - Growth and differentiation of the water mold Blastocladiella emersonii: Cytodifferentiation and the role of ribonucleic acid and protein synthesis. Bacteriological Rev. 39: 345-404, 1975.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1951.

- Magasanik, B. - Catabolite repression. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26: 249-256, 1961.
- Magasanik, B. - Glucose effects: Inducer exclusion and repression. In: Beckwith, J.R. & Zipser, D., eds., The Lactose Operon, Cold Spring Harbor Laboratory, 1970, p. 189-220.
- Maia, J.C.C. & Camargo, E.P. - c-AMP phosphodiesterase activity during growth and differentiation in Blastocladiella emersonii. Cell Differ. 3: 147-155, 1974.
- Makman, R.S. & Sutherland, E.W. - Adenosine 3',5'-phosphate in Escherichia coli. J. Biol. Chem. 240: 1309-1314, 1965.
- Malkinson, A.M. & Ashworth, J.M. - Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate concentration and phosphodiesterase activities during ascenic growth and differentiation of cells of the cellular slime mold Dictyostelium discoideum. Biochem. J. 134: 311-319, 1973.
- Martin, R.G. & Ames, B.N. - A method for determining the sedimentation behavior of enzymes. J. Biol. Chem. 236: 1372-1379, 1961.
- Miyamoto, E.; Kuo, J.F. & Greengard, P. - Cyclic nucleotide-dependent protein kinase. III. Purification and properties of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from bovine brain. J. Biol. Chem. 244: 6395-6402, 1969.

- Monard, D.; Janacek, J. & Rickenberg, H.U. - The enzymatic degradation of 3',5'-cyclic AMP in strains of E. coli sensitive and resistant to catabolite repression. Biochem. Biophys. Res. Commun. 35: 584-591, 1969.
- Murad, F.; Chi, Y.-M.; Rall, T.W. & Sutherland, E.W. - Adenyl cyclase. III. The effect of catecholamines and choline esters on the formation of adenosine 3',5'-phosphate by preparations from cardiac muscle and liver. J. Biol. Chem. 237: 1233-1238, 1962.
- Murphy, M.N. & Lovett, J.S. - RNA and protein synthesis during zoospore differentiation in synchronized cultures of Blastocladiella. Dev. Biol. 14: 68-95, 1966.
- Murray, A.W.; Spizman, M. & Atkinson, D.E. - Adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase in growth medium of Physarum polycephalum. Science 171: 496-498, 1971.
- Okabayashi, T.; Ide, M. & Yoshimoto, A. - Excretion of adenosine 3',5'-phosphate in the culture broth of Brevibacterium liquefaciens. Arch. Biochem. Biophys. 152: 786-794, 1963.
- Otten, J.; Johnson, G.S. & Pastan, I. - Cyclic AMP levels in fibroblasts: relationship to growth rate and contact inhibition of growth. Biochem. Biophys. Res. Commun. 44: 1192-1198, 1971.
- Parker, C.W.; Sullivan, T.J. & Wedner, H.J. - Cyclic AMP and the immune response. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 4: 1-80, 1974.

- Pastan, I.H.; Johnson, G.S. & Anderson, W.B. - Role of cyclic nucleotides in growth control. *Ann. Rev. Biochem.* 44: 491-522, 1975.
- Pastan, I. & Perlman, R.L. - Stimulation of tryptophanase synthesis in Escherichia coli by cyclic 3',5'-adenosine monophosphate. *J. Biol. Chem.* 244: 2226-2232, 1969.
- Pastan, I. & Perlman, R.L. - Cyclic adenosine monophosphate in bacteria. *Science* 169: 339-344, 1970.
- Pastan, I.; Perlman, R.L.; Emmer, M.; Varmus, H.E.; De Crombrughe, B.; Chen, B. & Parks, J. - Regulation of gene expression in Escherichia coli by cyclic AMP. *Recent Progress in Hormone Research* 27: 421-432, 1971.
- Perlman, R.L. & Pastan, I. - Regulation of β -galactosidase synthesis in Escherichia coli by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *J. Biol. Chem.* 243: 5420-5427, 1968.
- Perlman, R.L. & Pastan, I. - The role of cAMP in bacteria. In: Horecher, B.L. & Stadtman, E.R., eds., *Current Topics in Cellular Regulation*, Academic Press, New York, 1971, p. 117-314.
- Phillips, R. - Adenosine and the adenine nucleotides. Ionization, metal complex formation and conformation in solution. *Chem. Rev.* 66: 501-527, 1966.
- Phillips, D.R. & Morrison, M. - The arrangement of proteins in the human erythrocyte membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 40: 284-289, 1970.

- Pohl, S.L.; Krans, H.M.J.; Kosyreff, V.; Birnbaumer, L. & Rodbell, M. - The glucagon-sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. VI. Evidence for a role of membrane lipids. J. Biol. Chem. 246: 4447-4454, 1971.
- Rabinovitz, M.; Desalles, L.; Meisler, J. & Lorand, L. - Distribution of adenylyl cyclase activity in rabbit muscle fractions. Biochim. Biophys. Acta 97: 29-36, 1965.
- Rall, T.W. & Sutherland, E.W. - Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. J. Biol. Chem. 232: 1065-1076, 1958.
- Rall, T.W. & Sutherland, E.W. - Adenylyl cyclase. II. The enzymatically catalyzed formation of adenosine 3',5'-phosphate and inorganic pyrophosphate from adenosine triphosphate. J. Biol. Chem. 237: 1228-1232, 1962.
- Rall, T.W.; Sutherland, E.W. & Berthet, J. - The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorilase. IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorilase in liver homogenate. J. Biol. Chem. 224: 463-475, 1957.
- Ramachandran, J. - A new simple method for separation of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate from other nucleotides and its use in the assay of adenylyl cyclase. Anal. Biochem. 43: 227-239, 1971.
- Ramanathan, S. & Chou, S.C. - Cyclic nucleotide phosphodiesterase from Tetrahymena pyriformis. Comp. Biochem. Physiol. B. 46: 93-97, 1973.

- Ramirez, J.M.; Conde, F. & DelCampo, F.F. - Transcriptional control of tryptophanase synthesis by cyclic AMP in Escherichia coli. Eur. J. Biochem. 25: 471-475, 1972.
- Rasmussen, H.; Jensen, P.; Lake, W.; Friedmann, N. & Goodman, D.B.P. - Cyclic nucleotides and cellular calcium metabolism. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5: 375-394, 1975.
- Rickenberg, H.V. - Cyclic AMP in prokaryotes. Ann. Rev. Microbiol. 28: 353-369, 1974.
- Robison, G.A.; Butcher, R.W. & Sutherland, E.W. - Adenyl cyclase as an adrenergic receptor. Ann. N.Y. Acad. Sci. 139: 703-723, 1967.
- Robison, G.A.; Butcher, R.W. & Sutherland, E.W. - Cyclic AMP. Ann. Rev. Biochem. 37: 149-174, 1968.
- Rodbell, M.; Birnbaumer, L.; Pohl, S.L. & Krans, H.M.J. - The glucagon-sensitive adenyl cyclase in glucagon action. V. An obligatory role of guanyl nucleotides in glucagon action. J. Biol. Chem. 246: 1872-1876, 1971.
- Rosensweig, Z. & Kindler, S.H. - Epinephrine and serotonin activation of adenyl cyclase from Tetrahymena pyriformis. FEBS Lett. 25: 221-223, 1972.
- Russel, T.R.; Terazaki, W.L. & Appleman, M.M. - Separate phosphodiesterases for the hydrolysis of cyclic AMP and cyclic GMP in rat liver. J. Biol. Chem. 248: 1334-1340, 1973.

- Ryan, W.L. & Heidrick, M.L. - Inhibition of cell growth "in vitro" by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* 162: 1484-1485, 1968.
- Saier, M.H.; Feucht, B.U. & McCaman, M.T. - Regulation of intracellular adenosine cyclic 3',5'-monophosphate levels in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. *J. Biol. Chem.* 250: 7593-7601, 1975.
- Salomon, Y.; Lin, M.C.; Londos, C.; Rendell, M. & Rodbell, M. - The hepatic adenylate cyclase system. I. Evidence for transition states and structural requirements for guanine nucleotide activation. *J. Biol. Chem.* 250: 4239-4245, 1975.
- Schmoyer, I.R. & Lovett, J.S. - Regulation of protein synthesis in zoospores of Blastocladiella. *J. Bacteriol.* 100: 854-864, 1969.
- Scott, W.A. & Salomon, B. - Cyclic 3',5'-AMP phosphodiesterase of Neurospora crassa. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53: 1024-1030, 1973.
- Shea, M. & Kleinsmith, L.J. - Template-specific stimulation of RNA synthesis by phosphorylated non-histone chromatin proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 50: 473-477, 1973.
- Sheppard, J.R. - Restoration of contact-inhibited growth to transformed cells by dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 68: 1316-1320, 1971.
- Sheppard, J.R. - Difference in the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels in normal and transformed cells. *Nature New Biol.* 236: 14-16, 1972.

- Shibuya, M.; Takebe, Y.; Ishizuka, S. & Kaziro, Y. - Accumulation of cGMP in the culture medium of growing cells of E. coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 68: 430-435, 1976.
- Silverman, P.M. - Regulation of guanylate cyclase activity during cytodifferentiation of Blastocladiella emersonii. Biochem. Biophys. Res. Commun. 70: 381-387, 1976.
- Silverman, P.M.; Huh, M.M.-O. & Sun, L. - Protein synthesis during zoospore germination in the aquatic phycomycete Blastocladiella emersonii. Dev. Biol. 40: 59-70, 1974.
- Silverman, P.M. & Epstein, P.M. - Cyclic nucleotide metabolism coupled to cytodifferentiation of Blastocladiella emersonii. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72: 442-446, 1975.
- Smith, J.D. & Silverman, P.M. - Lipid turnover during morphogenesis in the water mold Blastocladiella emersonii. Biochem. Biophys. Res. Commun. 54: 1191-1197, 1973.
- Singer, J.J. & Nicolson, G.S. - The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175: 720-731, 1972.
- Soll, D.R.; Bromberg, R. & Sonneborn, D.R. - Zoospore germination in the water mold, Blastocladiella emersonii. I. Measurement of germination and sequence of succellular morphological changes. Dev. Biol. 20: 183-217, 1969.
- Soll, D.R. & Sonneborn, D.R. - Zoospore germination in the water mold Blastocladiella emersonii. II. Influence of cellular and environmental variables on germination. Dev. Biol. 20: 218-235, 1969.

- Soll, D.R. & Sonneborn, D.R. - Zoospore germination in Blastocladiella emersonii. III. Structural changes in relation to protein and RNA synthesis. J. Cell Sci. 9: 679-699, 1971a.
- Soll, D.R. & Sonneborn, D.R. - Zoospore germination in Blastocladiella emersonii. Cell differentiation without protein synthesis? Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68: 459-463, 1971b.
- Soll, D.R. & Sonneborn, D.R. - Zoospore germination in Blastocladiella emersonii. IV. Ion control over cell differentiation. J. Cell Sci. 10: 315-333, 1972.
- Stoker, M.G.P. & Rubin, H. - Density dependent inhibition of cell growth in culture. Nature 215: 171-172, 1967.
- Suberkropp, K.F. & Cantino, E.C. - Environmental control of motility and encystment in Blastocladiella emersonii zoospores at high population densities. Trans. Brit. Mycol. Soc. 59: 463-475, 1972.
- Suberkropp, K.F. & Cantino, E.C. - Utilization of endogenous reserves by swimming zoospores of Blastocladiella emersonii. Arch. Mikrobiol. 89: 205-221, 1973.
- Sutherland, E.W. - Studies on the mechanism of hormone action. Science 177: 401-408, 1972.

- Sutherland, E.W. & Rall, T.W. - The properties of an adenine ribonucleotide produced with cellular particles, ATP, Mg^{++} , and epinephrine or glucagon. J. Am. Chem. Soc. 79: 3608, 1957.
- Sutherland, E.W. & Rall, T.W. - Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. J. Biol. Chem. 232: 1077-1091, 1958.
- Sutherland, E.W. & Rall, T.W. - The relation of adenosine-3',5'-phosphate and phosphorilase to the actions of catecholamines and other hormones. Pharmacol. Rev. 12: 265-299, 1960.
- Sutherland, E.W.; Rall, T.W. & Menon, T. - Adenyl cyclase. I. Distribution, preparation and properties. J. Biol. Chem. 237: 1220-1227, 1962.
- Sy, J. & Richter, D. - Content of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate and adenylyl cyclase in yeast at various growth conditions. Biochemistry 11: 2788-2791, 1972.
- Symons, R.H. - Synthesis of α -³²P-ribo and deoxyribonucleoside 5'-triphosphates. Methods Enzymol. 29: 102-115, 1974.
- Tao, M. & Huberman, A. - Some properties of Escherichia coli adenyl cyclase. Arch. Biochem. Biophys. 141: 236-240, 1970.
- Tao, M. & Lipmann, F. - Isolation of adenyl cyclase from Escherichia coli. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 63: 86-92, 1969.

- Teo, T.S. & Wang, J.H. - Mechanism of activation of a cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase from bovine heart by calcium ions: Identification of the protein activator as a Ca^{2+} -binding protein. J. Biol. Chem. 248: 5950-5955, 1973.
- Teo, T.S.; Wang, T.H. & Wang, J.H. - Purification and properties of the protein activator of bovine heart cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase. J. Biol. Chem. 248: 588-596, 1973.
- Torres, H.N.; Flawiá, M.M.; Terenzi, H.F. & Tellez-Inon, M.T. - Adenylate cyclase activity in Neurospora crassa. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5: 67-78, 1975.
- Truesdell, L.C. & Cantino, E.C. - The induction and early events of germination in the zoospore of Blastocladiella emersonii. Curr. Top. Dev. Biol. 6: 1-44, 1971.
- Turian, C. & Cantino, E.C. - The stimulatory effect of light on nucleic acid synthesis in the mold Blastocladiella emersonii. J. Gen. Microbiol. 21: 721-735, 1959.
- Ullmann, A. & Monod, J. - Cyclic AMP as an antagonist of catabolite repression in Escherichia coli. FEBS Lett. 2: 57-60, 1968.
- Uno, I. & Ishikawa, T. - Metabolism of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate and induction of fruiting bodies in Coprinus macrorhizus. J. Bacteriol. 113: 1249-1255, 1973.
- Vale, M.R.; Gomes, S.L. & Maia, J.C.C. - Independent cAMP and cGMP phosphodiesterases in Blastocladiella emersonii. FEBS Lett. 56: 332-336, 1975.

- Vale, M.R. & Maia, J.C.C. - Changes in cGMP phosphodiesterase levels during growth and differentiation in Blastocladiella emersonii. Aceito para publicação no FEBS Lett., 1976.
- Vale, V.L.; Gomes, S.L.; Maia, J.C.C. & Mennucci, L. - Transient cyclic AMP accumulation in germinating zoospores of Blastocladiella emersonii. Aceito para publicação no FEBS Lett., 1976.
- van Wijk, R. & Konijn, T.M. - Cyclic 3',5'-AMP in Saccharomyces carlsbergensis under various conditions of catabolite repression. FEBS Lett. 13: 184-186, 1971.
- Villar-Palasi, C. & Schlender, K.K. - Purification and properties of muscle UDPG glycogen glucosyl transferase I kinase. 54th Annual Meeting, Atlantic City, N.J., April, 1970. Apud: Villar-Palasi, C. & Schlender, K.K., Fed. Proc. 29: 938, 1970.
- Voichick, J.; Elson, C.; Granner, D. & Shrago, E. - Relationship of adenosine 3',5'-monophosphate to growth and metabolism of Tetrahymena pyriformis. J. Bacteriol. 115: 68-72, 1973.
- Walsh, D.A.; Perkins, J.P. & Krebs, E.G. - An adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. J. Biol. Chem. 243: 3763-3774, 1968.
- Watson, G. & Langan, T.A. - Effects of F₁ histone and phosphorylated F₁ histone on template activity of chromatin. 57th Annual Meeting, Atlantic City, N.J. April, 1973. Apud: Watson, G. & Langan, T.A., Fed. Proc. 32: 588, 1973.

- Wheeler, G.E.; Schibeci, A.; Epand, R.M.; Rattray, J.B.M. & Kidby, D.K. - Subcellular localization and some properties of the adenylate cyclase activity of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Biochim. Biophys. Acta 372: 15-22, 1974.
- Wicks, W.D. & McKiblin, J.B. - Evidence for translational regulation of specific enzyme synthesis by N^6, O^2 -dibutyryl cyclic AMP in hepatoma cell cultures. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48: 205-211, 1972.
- Williams, D.E. & Reisfeld, R.A. - Disc electrophoresis in polyacrylamide gels: Extension to new conditions of pH and buffer. Ann. N.Y. Acad. Sciences 121: 373-381, 1964.
- Wold, W.S.M. & Suzuki, I. - Promotion of conidia aggregation in Aspergillus niger by cyclic AMP and 5'-GMP. Biochem. Biophys. Res. Commun. 55: 824-830, 1973.
- Wood, H.N.; Lin, M.C. & Brawn, A.C. - The inhibition of plant and animal 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterases by a cell-division-promoting substance from tissues of higher plant species. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69: 403-406, 1972.
- Yokota, T. & Gots, J.S. - Requirement of adenosine 3',5'-cyclic phosphate for flagella formation in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 103: 513-516, 1970.
- Zubay, G.; Schwarz, D. & Beckwith, J. - Mechanism of activation of catabolite-sensitive genes. A positive control system. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 66: 104-110, 1970.