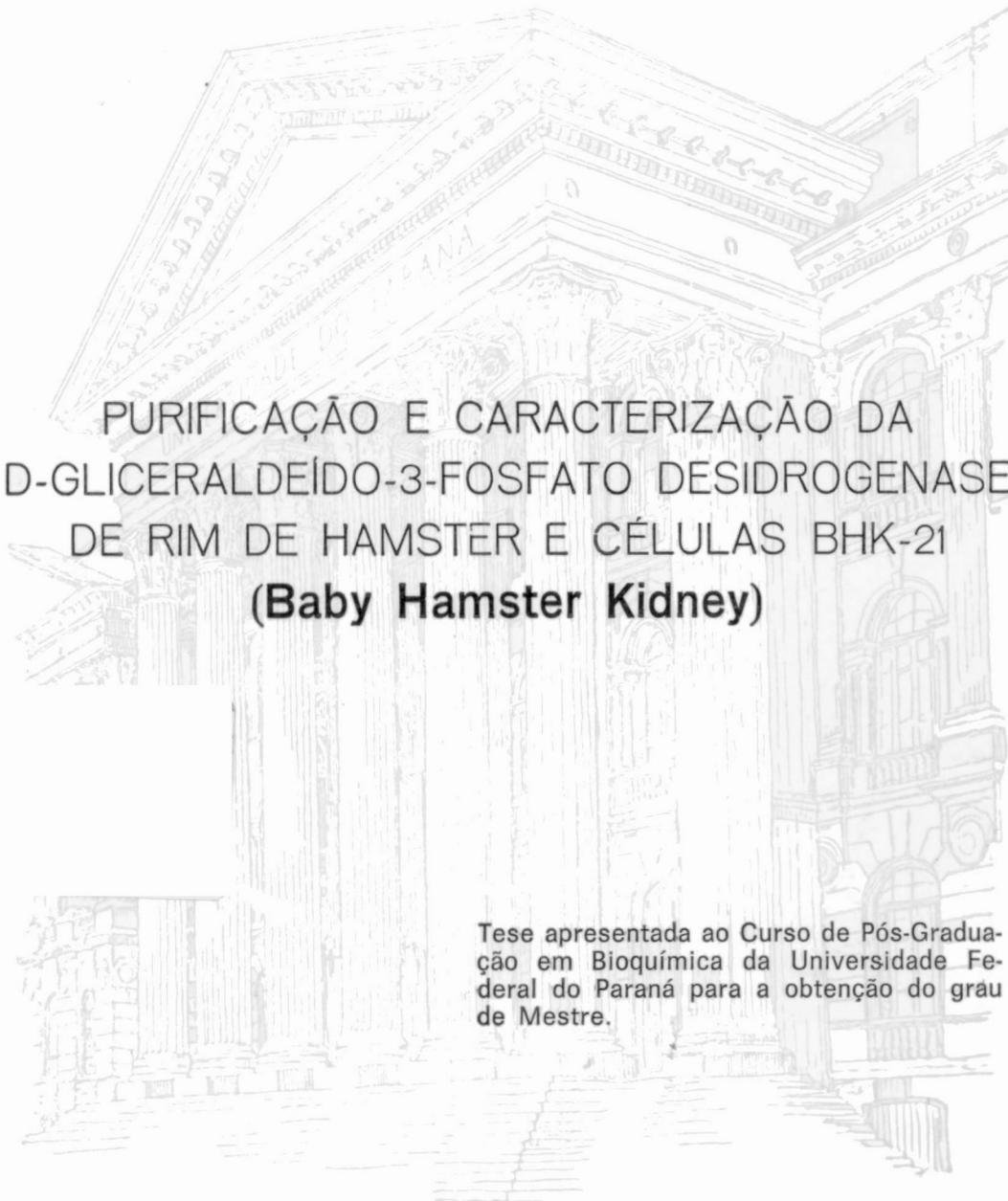


HELENA MARIA SIMONARD LOUREIRO



PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA
D-GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE
DE RIM DE HAMSTER E CÉLULAS BHK-21
(Baby Hamster Kidney)

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná para a obtenção do grau de Mestre.

CURITIBA
1993

HELENA MARIA SIMONARD LOUREIRO

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA
D-GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE
DE RIM DE HAMSTER E CÉLULAS BHK-21
(Baby Hamster Kidney)

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná para a obtenção do grau de Mestre.

CURITIBA
1993

TESE ORIENTADA PELA PROFESSORA

DRA. MOMOYO NAKANO

Com todo o meu amor ao Gerson, meu marido, e meus filhos, Marcela e Gustavo, pelas horas de convívio que lhes foram roubadas e pelo apoio que me deram em tempo integral.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e amiga Dr^a MOMOYO NAKANO pela amizade e estímulo. Seu profundo conhecimento inspira confiança e tranquilidade sem as quais não teria sido possível a conclusão deste trabalho.

À professora Dr^a MARIA BENIGNA MARTINELLI DE OLIVEIRA pela co-orientação deste trabalho. Sua visão crítica de pesquisadora competente também me inspirou confiança para que este trabalho pudesse ser concluído.

Ao professor Dr. SHIGEHIRO FUNAYAMA que participou e colaborou neste trabalho desde seu início até sua revisão final.

À professora Dr^a GLACI T. ZANCAN pelo seu profundo conhecimento de Bioquímica com o qual podemos sempre contar, por seu estímulo permanente ao aluno de pós-graduação e pelo empréstimo de material.

Ao amigo professor Dr. GENEROSO MANOEL CHAGAS pela amizade e ajuda inestimável com os animais.

À amiga muito querida e colega de curso JULIANA MAURER MENESTRINA pela amizade, tempo dispendido, companheirismo e ajuda que tanto me animaram no decorrer deste trabalho.

Ao colega ROBERTO FERREIRA DE MELO pela ajuda com o material e soluções do Cultivo Celular.

À MIRTES MARISA e LIDILENE pelo tempo, amizade e carinho que compartilharam comigo.

À amiga professora SUNG LIE BRUEL pelos comentários, amizade e alegria que irradia no laboratório.

Ao professor Dr. AGUINALDO JOSÉ NASCIMENTO pelo empréstimo de nucleotídeos.

Aos biólogos CÂNDIDO E DENISE do biotério pela amizade e pelo zelo e ajuda com os animais no decorrer do trabalho.

Ao Dr. Y. HAYASHI e aos amigos ELISA, MAURÍCIO e ANGELA do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR) pela ajuda na obtenção das células BHK e material para seu cultivo.

Ao Departamento de Nutrição da UFPR pela liberação de minhas atividades docentes pelo período necessário à conclusão deste trabalho.

Às colegas da minha turma de Pós-Graduação: CÁRMEM, IVONE, NÁDIA, NERY e VALÉRIA, pelo companheirismo e incentivo.

À Coordenação do curso de Pós-Graduação, professores e amigos do Departamento de Bioquímica da UFPR, pelo apoio e incentivo.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica que direta ou indiretamente me ajudaram.

Ao CNPq e FUNPAR pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
ESQUEMA 1	xiii
RESUMO.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS	9
2.1- Reagentes.....	9
2.2- Fontes da Enzima	9
2.2.1- Tecido Renal.....	9
2.2.2- Células BHK-21.....	9
2.3- Cultivo Celular	10
2.3.1- Repique e coleta de células BHK	12
2.3.2- Contagem e determinação da viabilidade celular.....	13
2.4- Preparo e Determinação da Concentração do Gliceraldeído-3-Fosfato	13
2.5- Determinações das Concentrações de NAD ⁺ e NADH	14
2.6- Isolamento e Purificação das D-gliceraldeído-3-fosfato desidrogenases	14
2.6.1- Rim de Hamster.....	15
2.6.1.1- Obtenção do Extrato Bruto	15
2.6.1.2- Fracionamento com Sulfato de Amônio.....	15
2.6.1.3- Cromatografia em DEAE-SEPHADEX A-50	15
2.6.2- Células BHK-21.....	16
2.6.2.1- Obtenção do Extrato Bruto	16
2.6.2.2- Fracionamento com Sulfato de Amônio.....	16
2.7- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presenças de SDS	17
2.8- Determinação da Proteína	17
2.9- Atividade Enzimática	17
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
3.1- Purificação da GPDH de Rim de Hamster	18
3.2- Propriedades cinéticas da GPDH de Rim de Hamster	19
3.2.1- Efeito do pH sobre a atividade da GPDH de rim.....	19
3.2.2- Atividade da GPDH de rim em função da concentração do arseniato	19
3.2.3- Efeito da concentração do 2-Mercaptoetanol sobre a atividade da GPDH de rim	24
3.2.4- Estabilidade da GPDH de rim	24
3.2.5- Efeito da diluição da GPDH sobre sua atividade catalítica.....	24
3.2.6- Efeito da concentração do substrato sobre a atividade da GPDH de rim. Determinação da constante de MICHAELIS-MENTEN (K _m).....	27
3.2.7- Efeito da concentração do NAD ⁺ sobre a atividade da GPDH de rim. Determinação da Constante de MICHAELIS-MENTEN (K _m).....	27

3.2.8- Efeito inibitório do produto da reação, NADH, sobre a atividade enzimática	27
3.2.9- Efeito inibitório de nucleotídeos sobre a GPDH de rim.....	31
3.2.10- Efeito de íons metálicos divalentes sobre a atividade da GPDH de rim.....	39
3.2.11- Efeito de reagentes sulfidrílicos sobre a atividade da GPDH de rim	39
3.3- Purificação da GPDH de Células BHK-21	42
3.4- Propriedades Cinéticas da GPDH de Células BHK-21	42
3.4.1- Efeito do pH sobre a atividade da GPDH de células BHK-21	42
3.4.2- Efeito da concentração do arseniato de sódio sobre a atividade da GPDH de células BHK-21	46
3.4.3- Efeito da concentração do coenzima sobre a atividade da GPDH de células BHK-21. Determinação da constante de MICHAELIS-MENTEN (Km).....	46
3.4.4- Efeito da concentração do substrato sobre a atividade da GPDH de células BHK-21. Determinação da da constante de MICHAELIS-MENTEN (Km).....	46
4- DISCUSSÃO FINAL	50
5- CONCLUSÕES	54
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE TABELAS

TABELA I- PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA GPDH DE RIM DE HAMSTER	20
TABELA II- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NUCLEOTÍDEO NA ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER.....	38
TABELA III- EFEITO DE ÍONS METÁLICOS DIVALENTES SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER.....	40
TABELA IV- EFEITO DOS REAGENTES SULFIDRÍLICOS SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER.....	41
TABELA V- PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS BHK-21.....	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA A- DIAGRAMA REPRESENTANDO A ASSOCIAÇÃO DAS SUBUNIDADES NA GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE. (BUEHNER et al, 1974).....	4
FIGURA B- REPRESENTAÇÃO DIAGRAMÁTICA DO DOMÍNIO CATALÍTICO E DO SÍTIO DE LIGAÇÃO DO NAD ⁺ NA GPDH. (WALKER et al, 1980)	5
FIGURA 1- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS	21
FIGURA 2 - EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER.....	22
FIGURA 3 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ARSENIATO DE SÓDIO SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER	23
FIGURA 4 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE 2-MERCAPTOETANOL NA ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER	25
FIGURA 5 - EFEITO DA DILUIÇÃO SOBRE ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER	26
FIGURA 6 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO (GLICERALDEÍDO 3-FOSFATO) SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER ...	28
FIGURA 7 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NAD ⁺ SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER.....	29
FIGURA 8 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NADH NA ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER	30
FIGURA 9 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO ATP SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER	31
FIGURA 10 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO ADP SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER	33
FIGURA 11 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO AMP SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER	34

ESQUEMAS

ESQUEMA 1 - VIAS QUE LEVAM VÁRIOS PRECURSORES COMO POLIÓIS (SORBITOL, XILITOL), HEXOSES (GALACTOSE, MANOSE, FRUTOSE), PENTOSES (XILOSE, RIBOSE, XILULOSE), TRIOSSES (DIHIDROXIACETONA, GLICERALDEÍDO) E MIO-INOSITOL À FORMAÇÃO DE GLUCOSE NO RIM (KREBS & LUND, 1966).8

RESUMO

No presente trabalho D-gliceraldeído-3-fosfato desidrogenases (GPDHs) (E.C.1.2.1.12) de origem renal provenientes de rim de hamster e células BHK-21 foram isoladas e purificadas. A homogeneidade da GPDH de rim foi demonstrada através de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS, a qual apresentou uma única banda correspondente à subunidade com peso molecular de 36 Kdaltons. O pH ótimo encontrado para a enzima foi de 8,2. Os valores de K_m para a GPDH de rim de hamster foram determinados para o gliceraldeído-3-fosfato e para o NAD^+ sendo 0,12 mM e 0,05 mM, respectivamente. ATP, ADP, AMP, AMPc, CDP, CMP, UDP e NADH demonstraram ser inibidores competitivos com relação ao NAD^+ . Os reagentes sulfidrílicos p-CAB, p-CMB, p-HMB, iodoacetamida e N-etilmaleimida inibiram a atividade enzimática. As inibições causadas pelo p-CAB, p-CMB e p-HMB foram parcialmente revertidas por 2-mercaptoetanol 5 mM, porém as inibições por iodoacetamida e N-etilmaleimida foram irreversíveis. A atividade da enzima de rim também sofreu interferência da ação de íons metálicos como: $MgCl_2$, $MnCl_2$, $CaCl_2$, $CdCl_2$, $CuCl_2$ e $HgCl_2$. A GPDH de células BHK-21 foi purificada parcialmente até a etapa da saturação com sulfato de amônio a 90%. O pH ótimo encontrado para a atividade da enzima foi de 8,4. A concentração de arseniato de sódio para a ativação da enzima foi de 30mM. Os valores de K_m encontrados para a GPDH de células BHK-21 foram de 0,05 mM para o NAD^+ e 0,12 mM para o substrato (G3P), em pH 8,4. As características físico-químicas da enzima de rim não diferiram significativamente das GPDHs de outras fontes citadas na literatura.

esturjão, de lagosta (ALLISON & KAPLAN, 1964), bactérias (AMELUXEN, 1967; AMELUXEN et al, 1970; SUZUKI & HARRIS, 1971; SUZUKI & IMAHORI, 1973; D'ALESSIO & JOSSE, 1971; FUJITA et al, 1976; CRABB et al, 1977), algas (HOOD & CARR, 1967; KRUSTEVA et al, 1981), plantas (SCHULMAN & GIBBS, 1968; MELANDRI et al, 1970; SPERANZA & GOZZER, 1978; YONUSCHOT et al, 1970; DUGGLEBBY & DENNIS, 1974), insetos (CARLSON & BROSEMER, 1971), músculo de peixe (GREENE & FEENEY, 1970; KOLB & HARRIS, 1972), protozoários (GRISSON & KAHN, 1975), músculo de rato (NAGRADOVA et al, 1978), eritrócitos (EBY & KIRTLEY, 1979), músculo de jacaré (VIEIRA et al, 1983) e de pato (BARBOSA & NAKANO, 1987), células HeLa (NAKANO et al, 1992).

A GPDH compreende cerca de 20% da proteína total solúvel em levedura (KREBS et al, 1953) e de 5 a 10% da proteína solúvel em músculo (CORI et al, 1948), e sua distribuição entre os diferentes tecidos reflete, em geral, a velocidade da glicólise.(PIECHACZYK et al, 1984; FORT et al, 1985).

Os métodos utilizados na purificação da GPDH estão normalmente relacionados à solubilidade da enzima como um complexo enzima-NAD⁺ em altas concentrações de sulfato de amônio. A enzima de músculo por exemplo, pode ser obtida à partir do extrato bruto, por cristalização direta através do fracionamento com sulfato de amônio (ALLISON & KAPLAN, 1964). No entanto, a purificação da enzima requer vários passos de fracionamento em outros tecidos onde a sua concentração é mais baixa (KOCHMAN & RUTTER, 1968; LAMBERT & PERHAM, 1974).

Para organismos inferiores como bactérias (D'ALESSIO & JOSSE, 1971; SUZUKI & HARRIS, 1971) foram desenvolvidos métodos de isolamento da GPDH usando-se a cromatografia de troca iônica. A enzima de *Thermus aquaticus* foi purificada por HOCKING & HARRIS, (1973) por intermédio de uma cromatografia de afinidade em NAD⁺ imobilizado. Com eritrócitos humanos foram desenvolvidos métodos de purificação da enzima, tanto em relação ao isolamento a partir do eritrócito (EBY & KIRTLEY, 1979), quanto em relação ao uso do eritrócito hemolisado por hipotonicidade como meio de purificação da GPDH de músculo, fígado, rim e cérebro de rato. Isto é possível devido à conhecida interação da enzima com a membrana celular destas células e a facilidade de eluição com NADH 2 mM. Devido ao alto grau de homologia apresentado pelas GPDHs, este método pode ser utilizado na purificação de enzimas de outras fontes (HARRIS &

WATERS, 1976; SALLEMUDDIN & ZIMMERMANN, 1978).

Investigações de GPDHs de diversas fontes demonstram que elas são relativamente instáveis em solução, tendendo à desnaturação e floculação espontânea à temperatura ambiente. À baixas temperaturas, porém, conservam-se por períodos mais longos e variáveis de acordo com a fonte da enzima, como suspensão de cristais em solução de sulfato de amônio. A estabilidade da enzima pode ser afetada por vários fatores como: estabilidade dos grupos sulfidrilas, presença ou não de metais pesados, presença ou ausência de coenzima ligado e o tipo e concentração de sal (VELICK & FURFINE, 1963).

A investigação da estrutura das proteínas pode fornecer informações sobre a estabilidade destas macromoléculas e as relações evolucionárias entre elas. A GPDH, semelhante ao citocromo c (FERGUSON, 1980), é considerada uma proteína de evolução lenta por apresentar 68% de homologia entre seres filogeneticamente distantes (HARRIS & PERHAM, 1968; JONES & HARRIS, 1972). Constitui portanto, um ótimo instrumento para investigações filogenéticas, já que é relativamente fácil sua obtenção na forma pura e com bom rendimento.

Através de métodos químicos envolvendo marcação específica dos resíduos de cisteína cataliticamente ativos e caracterização de fragmentos de peptídeos produzidos por clivagem enzimática, HARRIS et al, (1963) e HARRIS & PERHAM, (1965) concluíram que a GPDH é composta de 4 subunidades, compreendendo cada uma aproximadamente 330 resíduos de aminoácidos correspondendo a um peso molecular de 36 Kdaltons. Os resíduos de aminoácidos 1 a 149 estão relacionados à ligação do coenzima (BUEHNER et al, 1973) e os resíduos de número 150 a 334 são responsáveis pela ligação do substrato, especificidade, catálise e cooperatividade. A estrutura contém em sua formação 39% de folha pregueada e 35% de alfa-hélice (BUEHNER et al, 1974).

Para definir a estrutura da GPDH tem sido usado um sistema de coordenadas de eixos P,Q,R (ROSSMAN et al, 1973) (FIG. A), similar ao descrito para a desidrogenase láctica (ADAMS et al, 1970).

O sítio de ligação do NAD^+ consiste de uma folha em conformação beta formada por seis cadeias paralelas ladeadas por hélices (FIG. B). O sítio catalítico consiste de uma folha formada por nove cadeias antiparalelas (FIG. B) ocorrendo três hélices que compreendem os resíduos 147 a 166, 201 a 216 e 215 a 267 respectivamente. A cadeia polipeptídica termina numa longa hélice

FIGURA A - DIAGRAMA REPRESENTANDO A ASSOCIAÇÃO DAS SUBUNIDADES NA GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE. (BUEHNER et al, 1974)

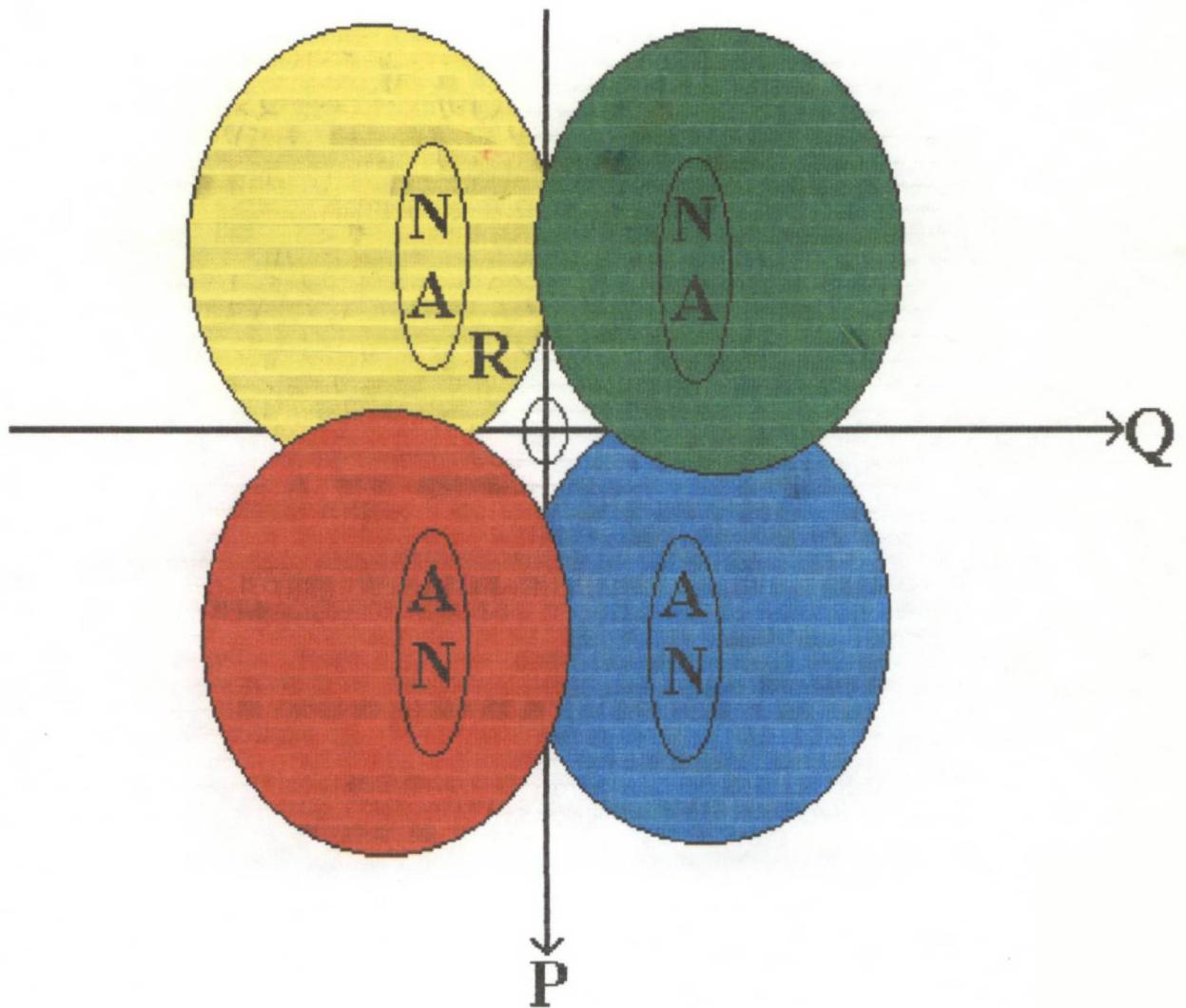
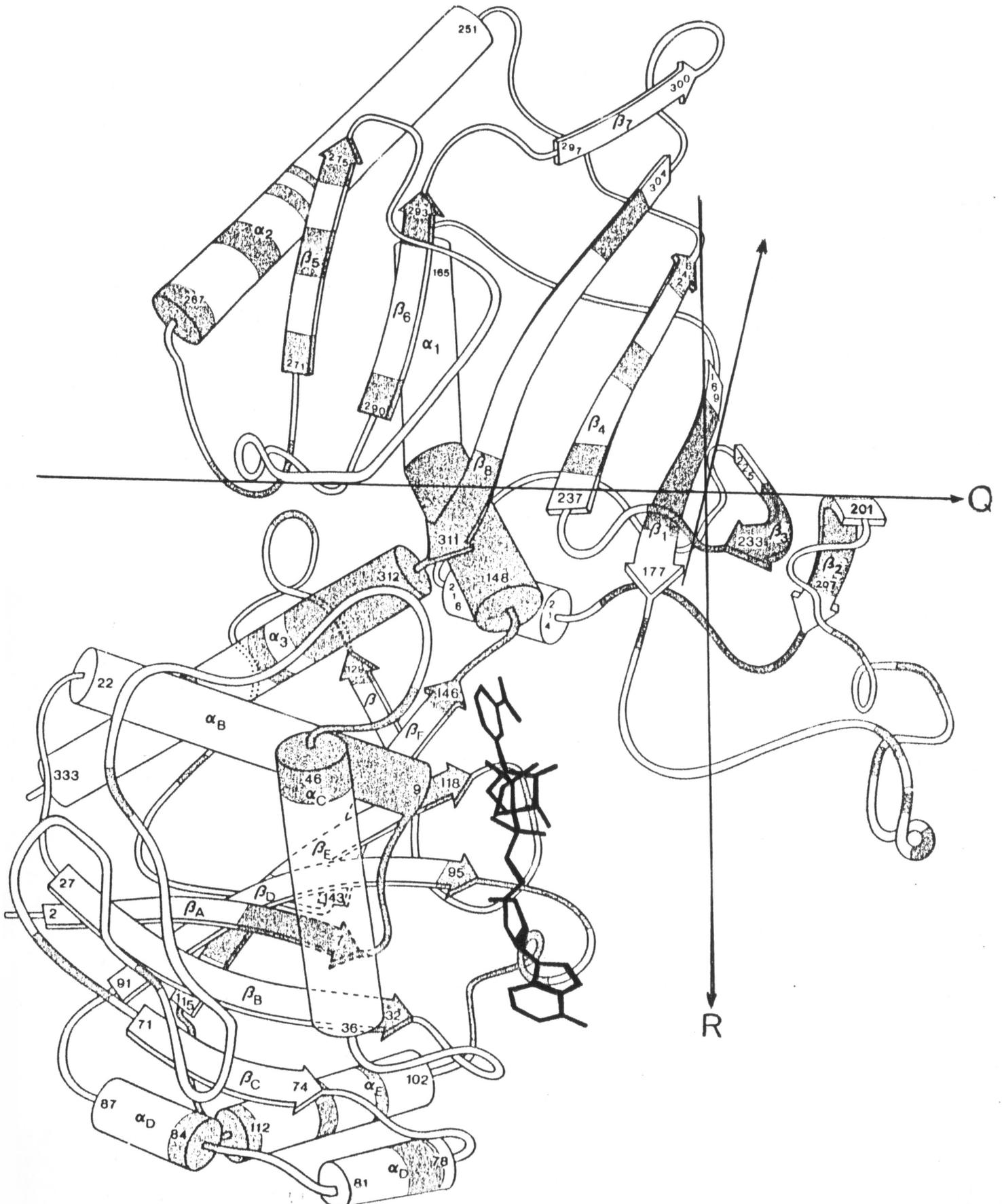


FIGURA B - REPRESENTAÇÃO DIAGRAMÁTICA DO DOMÍNIO CATALÍTICO E DO SÍTIO DE LIGAÇÃO DO NAD⁺ NA GPDH. (WALKER et al, 1980).



(resíduos 313 a 334) que está associada com o sítio do NAD^+ .

Para a reação catalisada pela GPDH têm sido propostos vários mecanismos. SEGAL & BOYER (1953) postularam para a GPDH um mecanismo do tipo ping-pong para o qual tiveram apoio os estudos de TRENTHAM, (1968, 1971), HARRIGAN & TRENTHAM, (1971, 1973) e DUGGLEBY & DENNIS, (1974) com as enzimas de músculos de porco e de Pisum sativum, respectivamente. Nesse mecanismo um dos substratos deve estar ligado e um dos produtos liberado antes da entrada do segundo substrato e a liberação do segundo produto.

ORSI & CLELAND, (1972) sugeriram que o mecanismo cinético para a GPDH de músculo de coelho é do tipo ordenado, com o NAD^+ , aldeído e fosfato ou arseniato entrando nesta ordem e com a liberação de ácido precedendo a do NADH. Estudos com a GPDH de eritrócitos humanos realizados por WANG & ALAUPOVIC, (1980) reforçam o mecanismo proposto por ORSI & CLELAND, (1972).

CARDON & BOYER, (1982) estudando a reação catalisada pela GPDH de músculo de coelho propuseram um modelo simples com alternância de sítios. Neste caso são considerados dois sítios catalíticos interconversíveis.

Embora sejam disponíveis um grande número de informações sobre a GPDH de diferentes fontes, há pouco relato sobre a enzima de tecido renal. O rim desempenha um papel importante na homeostase e é um órgão onde ocorrem importantes processos metabólicos. Numa visão mais ampla, o rim divide-se em duas partes a saber: córtex e medula, que apresentam diferentes características metabólicas (LEE et al, 1962). A especialização metabólica dos compartimentos renais foi demonstrada pelos trabalhos de WALDMAN & BURCH, (1963). Estes autores, trabalhando com enzimas de rim de ratos de diferentes grupos etários, mostraram que a glucose-6-fosfatase era mais ativa no córtex que na papila em todos os grupos, enquanto que a atividade da hexoquinase era maior na papila que no córtex externo, reforçando os relatos de maior taxa de glicólise na região medular (RENAL, 1973; COHEN, 1979) e maior taxa de gluconeogênese na região cortical do rim (KREBS, 1963). No mesmo estudo, os autores descreveram outras especificidades metabólicas, conforme a região, particularmente relacionada com atividades de aminoácido oxidases.

KREBS & LUND, (1966) trabalhando com fatias de córtex renal, mostraram que os principais substratos formadores de glucose ($\mu\text{moles/g}$ peso seco) eram D-frutose, dihidroxiacetona

e D-gliceraldeído e propuseram um esquema (ESQUEMA 1) com vários precursores levando à formação da glucose.

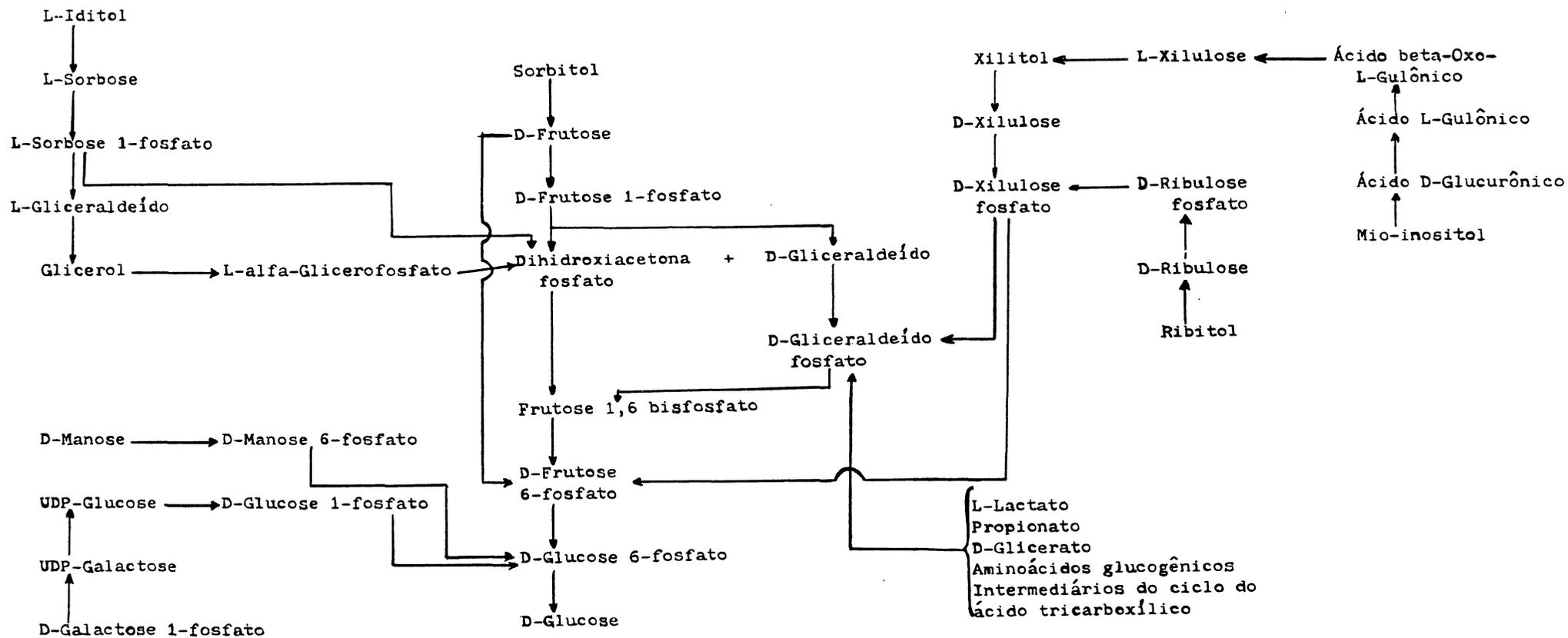
O produto final da degradação da glucose sob condições anaeróbicas que parecem ser as existentes nos rins de animais saudáveis, é o lactato. Na presença de oxigênio entretanto, o piruvato entra na mitocôndria onde é convertido a acetil-CoA que é metabolizado até dióxido de carbono pelo ciclo de Krebs, podendo a glucose ser também parcialmente oxidada pela via das pentoses fosfato.

As atividades glicolíticas como também as de gluconeogênese pelo tecido renal envolvem a participação da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Considerando o desconhecimento quase total sobre a GPDH de origem renal, este trabalho tem por objetivo geral contribuir para o conhecimento desta importante enzima obtida de células renais de hamsters jovens e de células da linhagem BHK-21, também provenientes de hamster. Este paralelo é importante porque sendo as células BHK-21 uma linhagem estabelecida, sofreu a transformação que imortaliza as células em cultura (FRESHNEY, 1987). Assim, a comparação entre as enzimas das duas fontes, dará informações relevantes relacionadas às alterações metabólicas da célula cultivada em relação ao tecido de origem.

São , portanto, objetivos específicos deste trabalho:

- 1- a obtenção da GPDH de rim de hamster em forma pura e homogênea;
- 2- a obtenção da GPDH de células da linhagem BHK-21;
- 3- o estudo de algumas propriedades cinéticas das enzimas;
- 4- o estudo comparativo dos parâmetros cinéticos obtidos para as enzimas destas fontes renais em relação às GPDHs das outras fontes já descritas na literatura.

ESQUEMA 1- Vias que levam vários precursores como polióis (sorbitol,xilitol), hexoses (galactose, manose, frutose), pentoses (xilose, ribose, xilulose), trioses (dihidroxiacetona, gliceraldeído) e mio-inositol a formarem glucose no rim (KREBS & LUND, 1966).



2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. REAGENTES

Bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, cloreto de manganês, cloreto de mercúrio, p-cloro-mercuribenzoato, iodoacetamida, N-etilmaleimida e 2-cloro-4-aminobenzoato foram obtidos da MERCK.

Meio essencial mínimo de EAGLE e meio GLASGOW foram obtidos do INTERLAB.

Soro fetal bovino estéril, livre de vírus e micoplasma foi obtido do LABORCLIN.

Tripsina (1:250) e Sabouraud-dextrose foram de procedência DIFCO.

G3P, NAD⁺, NADH, ATP, ADP, AMP, AMPc, CDP, CMP, UDP, DEAE-Sephadex A-50 e 2-mercaptoetanol foram obtidos da SIGMA CHEMICAL Co.

Os demais reagentes foram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas com água bidestilada e deionizada.

2.2. FONTES DA ENZIMA

Como fontes da enzima foram utilizados:

2.2.1. Tecido renal

Foram utilizados hamsters com 20 dias de vida. Após decapitação do animal, os rins foram retirados e congelados a -18°C até o momento de uso.

2.2.2. Células BHK-21

Células da linhagem BHK-clone 21 (Baby Hamster Kidney).

As células BHK-21 apresentam uma aparência de fibroblastos quando em monocamada aderida à garrafas de Roux (MAC PHERSON, 1963; STARGER & GOLDMAN et al, 1977; TUSZYNSKI et al. 1979; STEINERT et al, 1980; FRANK et al, 1982; ABSHER et al, 1989;

FAGER et al, 1989). São procedentes do Centro Panamericano de Febre Aftosa e foram gentilmente cedidas ao laboratório de Cultivo celular do Departamento de Bioquímica da UFPR à passagem nº 44, pela Assessoria Especial de Desenvolvimento Científico do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR).

2.3. CULTIVO CELULAR

O cultivo das células BHK foi efetuado no laboratório de Cultivo celular do Departamento de Bioquímica da UFPR. Todas as operações de cultivo foram realizadas em capela de fluxo laminar horizontal.

a- Materiais de vidro e acessórios:

Toda a vidraria utilizada no cultivo de células foi esterilizada à seco, a 180°C, por 4h. Rolhas, tampas, pipetas e equipamento de filtração, foram esterilizados em autoclave a 120°C, 1 atm de pressão, por 30 minutos e a seguir secas em estufa a 70°C pelo período necessário à secagem adequada.

b- Soluções e meio de cultura:

Todas as soluções envolvidas no cultivo de células BHK foram preparadas com água bidestilada.

- Solução de bicarbonato de sódio:

A solução de bicarbonato de sódio foi preparada na concentração 7,5% (p/v) e distribuída em tubos, em volumes de 10 mL. Após esterilização em autoclave (FANEM) a 120°C e 1 atm de pressão por 20 minutos, a solução foi mantida à temperatura ambiente. Esta solução foi usada para ajustar o pH do meio de crescimento das células.

- Solução salina fosfato tamponada (PBS):

A solução salina tamponada, pH 7,4, foi preparada rotineiramente na forma de estoque, sendo constituída de Na₂HPO₄ 40,5 mM, NaCl 680 mM e KH₂PO₄ 7,3 mM. Quando havia necessidade de utilizá-la em coleta estéril, esta solução foi autoclavada a 120°C, 1 atm de pressão por 20 minutos. Após resfriamento, foi armazenada a 4°C. No momento

de uso, foi feita diluição 1:5 com água bidestilada deionizada estéril e sua temperatura foi levada à 37°C.

- Solução tripsina-verseno (STV):

A finalidade desta solução é descolar as monocamadas das garrafas de cultura. A solução é constituída de tripsina 0,05%, verseno 0,46 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, dextrose 5,55 mM, NaHCO₃ 5,95 mM e 0,45mg% de vermelho de fenol preparada a 1%. O pH final desta solução deve ser acertado para 7,8. Quando usada em repiques ou em coletas estéreis a solução STV foi esterilizada por filtração, sendo usados filtros marca Millipore e membranas de 0,22 µm. A solução foi mantida a -18°C, ou a 4°C, para armazenamento por períodos curtos de tempo. Para utilização no repique e coleta de células a solução STV foi pré-aquecida a 37°C.

- Meio de cultura:

Para o crescimento das células BHK foram usados o meio essencial de EAGLE (PAUL, 1973) ou alternadamente, o meio GLASGOW (MAC PHERSON; 1962). Após a reconstituição em água bidestilada estéril, o meio foi esterilizado por filtração em membranas de acetato de celulose de 142 mm de diâmetro, com poros de 0,22µm, em aparelho marca Sartorius (Carl Zeiss do Brasil).

Todas as soluções estéreis foram submetidas a testes para verificar a eficácia do procedimento de filtração esterilizante, colocando-se amostras dos meios em estufa a 37°C por um período mínimo de 15 dias, antes do uso. Quando necessário, foram utilizados meios especiais como tioglicolato Brewer, caldo caseína tripticase (caldo Casoy) e Sabouraud dextrose, para comprovação de eventuais contaminações.

2.3.1. Repique e coleta de células BHK-21.

As células BHK foram cultivadas em meio Glasgow, (MAC PHERSON; 1962), suplementado com soro fetal bovino (10% v/v), adicionado antes do uso. O pH foi ajustado para 7,4, com quantidades adequadas de bicarbonato de sódio. As células desenvolvem-se em forma de monocamada, sendo utilizadas garrafas de Roux, com capacidade de 100 mL de meio.

O repique foi feito por tripsinização, usando-se solução STV. Resumidamente, o procedimento de tripsinização consistiu na remoção do meio de cultura seguida da adição de pequena quantidade de PBS estéril ou de STV, para remoção do meio residual. Este primeiro lavado foi imediatamente descartado. Adicionou-se então solução STV, em quantidade suficiente para cobrir a monocamada (10mL) ficando esta solução, em contato com as células por 3 a 5 minutos. Aos primeiros sinais de descolamento da monocamada a solução de STV foi cuidadosamente desprezada e as células foram então suspensas em meio de crescimento, com pipeta equipada com pera. Esta suspensão foi então dividida em novas garrafas de cultivo a uma concentração de 2×10^6 células por garrafa, contendo 100 mL de meio. As culturas foram deixadas em crescimento por cerca de 5 dias à temperatura de 37°C e repicadas ou coletadas ao final deste período. O crescimento e a adesão celular das monocamadas foram observadas em microscópio ótico invertido (E. Leitz Wetzlar).

As culturas tornavam-se confluentes com cerca de 120 h. de crescimento em meio Glasgow e de 72 a 96 h. em meio EAGLE.

Nesta tese foram utilizadas culturas crescidas em meio Glasgow para fins de purificação e estudos cinéticos da enzima e células crescidas em meio EAGLE para fins de elaboração da curva de crescimento celular.

A coleta das células foi feita por tripsinização com STV. O procedimento é semelhante ao de repique, porém, após a tripsinização, as células foram ressuspensas em solução PBS. O descolamento das células foi efetuado com o auxílio de pipeta equipada com pera. A suspensão de células descoladas foi recolhida e centrifugada em centrífuga clínica a 4.000 rpm por cerca de 1 minuto. As células foram lavadas com PBS contendo 25mg de BSA para remoção da tripsina residual e mais uma vez com PBS sem BSA. Após a última centrifugação, foram ressuspensas num pequeno volume de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetano 1 mM, sendo mantidas congeladas a -80°C até o momento de uso.

2.3.2. Contagem e determinação da viabilidade celular

As células foram contadas em câmara de Neubauer, usando-se microscópio Jenaval modelo 30-GOO20a - Carl Zeiss - Alemanha Oriental.

A viabilidade celular foi determinada usando-se o corante vital azul de tripan (PHILLIPS, 1973). Esta solução foi preparada a 0,4% (p/v) em solução salina constituída de KH_2PO_4 5 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4. Para 1 mL de suspensão celular foi utilizado 0,1 mL de solução corante. O percentual de células viáveis foi calculado pela seguinte relação:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{células não coradas} \times 100}{\text{células coradas} + \text{não coradas}}$$

sendo somente utilizadas as preparações que apresentavam 95% de viabilidade por este método.

2.4. PREPARO E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO.

Para o preparo da solução do substrato, foi utilizado D-L-gliceraldeído-3-fosfato na forma de sal de bário. Este foi dissolvido com vigorosa agitação em água bidestilada e deionizada contendo DOWEX 50W (Sigma), resina catiônica, em suspensão na proporção de 1,5 g de DOWEX para 100 mg do substrato. Após centrifugação, a solução resultante foi aquecida em banho fervente por 3 minutos e em seguida resfriada em banho de gelo. Ao ser utilizado nos testes cinéticos, o pH da solução foi acertado para 7,0 com uma solução de KOH a 15%.

A concentração do D-gliceraldeído-3-fosfato foi determinada enzimaticamente em presença de excesso de NAD^+ , arseniato de sódio e GPDH, de acordo com o método de DAGHER & DEAL Jr., (1977). A mistura de incubação continha tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, arseniato de sódio 40 mM, NAD^+ 1 mM, enzima em excesso e 5 μL da solução de D-L-gliceraldeído-3-fosfato a ser testada, num volume final de 1 mL. A cubeta contendo o branco continha todos os componentes acima, exceto o G3P, o qual foi substituído por igual volume de tampão. A reação foi iniciada pela adição de G3P na

segunda cubeta. O progresso da reação, foi monitorado a 340 nm e ao ser completada a reação, calculou-se a diferença entre as D.O. final e inicial. A concentração do G3P foi expressa em função de seu isômero ativo (D) e calculada de acordo com a equação:

$$D\text{-G3P mM} = \frac{D.O.(340 \text{ nm}) \times \text{volume total do ensaio}}{6,22 \times \text{volume da amostra}}$$

O cálculo da concentração foi resultante da média aritmética de duas determinações.

2.5. DETERMINAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DE NAD⁺ E NADH

A concentração do NAD⁺ foi determinada espectrofotometricamente através da absorbância a 260 nm. Para o cálculo da concentração foi utilizada a média aritmética de duas determinações. Sua concentração foi calculada usando-se o coeficiente de extinção molar de 17.600 M⁻¹cm⁻¹ (SIGMA CHEMICAL Co) de acordo com a seguinte equação:

$$NAD^+ \text{ mM} = \frac{D.O.(260\text{nm}) \times \text{volume total}}{17,6 \times \text{volume da amostra}}$$

A concentração de NADH foi determinada espectrofotometricamente pela medida da absorbância a 340 nm do mesmo modo que para o NAD⁺, usando-se o coeficiente de extinção molar de 6.220 M⁻¹cm⁻¹ (HORECKER & KORNBERG, 1948).

2.6. ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DAS D-GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO

DESIDROGENASES.

As GPDHs de rim de hamster e de células BHK foram isoladas e purificadas segundo descrito por OHKUBO et al, (1986). Todas as etapas do processo de isolamento e purificação foram realizadas à temperatura de 4°C.

2.6.1 Rim de Hamster.

2.6.1.1. Obtenção do extrato bruto

Os hamsters foram decapitados e seus rins rapidamente retirados e armazenados a -18°C até o momento de serem utilizados no processo de purificação da GPDH. Para obtenção do extrato bruto, 28 rins correspondendo a cerca de 16g, foram descongelados, finamente picados em presença de 15 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM previamente gelados e então passados por 15 vezes em homogeneizador Van Potter Elvehjem. Este homogenato foi centrifugado a $10.000 \times g$ a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi então separado e deixado em banho de gelo. Ao precipitado foram adicionados 15 mL do tampão acima descrito e o processo de extração novamente repetido até que o precipitado não apresentasse mais indícios de atividade da enzima. Os sobrenadantes (30 ml) reunidos continham 37 mg de proteína/ml e a fração foi denominada extrato bruto.

2.6.1.2. Fracionamento com sulfato de amônio

Ao extrato bruto (30,0 mL) foi acrescentado lentamente sulfato de amônio sólido, com agitação leve e constante, até que uma saturação de 60% fosse alcançada. Após 30 minutos sem agitação, o precipitado foi removido por centrifugação a $10.000 \times g$ por 30 minutos, a 4°C e desprezado. O sobrenadante foi tratado com sulfato de amônio sólido acrescentado como anteriormente, até alcançar uma saturação de 90%. Após 30 minutos de repouso, o material foi centrifugado e o precipitado ressuspensão em pequena quantidade (2,1 mL) de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2 contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM. A solução de enzima foi dialisada por 12 h contra o mesmo tampão. Em todas as etapas foram retiradas alíquotas de 0,5 mL para testes enzimáticos e dosagem de proteínas.

2.6.1.3. Cromatografia em DEAE-Sephadex A-50

2,1 ML da fração dialisada de GPDH de rim com uma concentração de proteínas de 20 mg/mL foram submetidos a uma cromatografia em DEAE-Sephadex A-50 em coluna de vidro medindo 1,5 cm por 20,0 cm. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2,

contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM. Como a GPDH não é retida nesta coluna, ela é eluída no volume morto. A enzima foi eluída com o mesmo tampão, a um fluxo de 21 mL/hora. Frações de 3,1 mL / tubo foram coletadas em um coletor de frações refrigerado. Cada fração foi analisada quanto à atividade enzimática (DAGHER & DEAL Jr., 1977) e à concentração de proteínas (WARBURG & CHRISTIAN, 1941). As frações de maior atividade foram reunidas e dialisadas contra solução saturada de sulfato de amônio, pH 8,2 contendo 2-mercaptoetanol 1 mM.

A GPDH assim obtida mostrou-se homogênea em eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e foi então usada para os estudos cinéticos.

2.6.2. Células BHK-21

2.6.2.1. Obtenção do extrato bruto

Para a obtenção do extrato bruto, um total de $1,0 \times 10^8$ células foram descongeladas e ressuspensas em 2,0 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM gelado e então rompidas em homogeneizador Van Potter Elvehjem. Esta suspensão de células foi centrifugada a $10.000 \times g$ a 4°C , por 15 minutos. O extrato bruto (13,0 mL) assim obtido continha 5,0 mg de proteína / mL.

2.6.2.2. Fracionamento com sulfato de amônio

Ao extrato bruto (13,0 mL) foi adicionado sulfato de amônio sólido lentamente, com agitação leve, até que fosse obtida uma saturação de 60%. Após 30 minutos em repouso, o precipitado foi removido por centrifugação e desprezado. A solução sobrenadante (12,0 mL) foi tratada com sulfato de amônio sólido até atingir saturação de 90%. Após 30 minutos em repouso, o material foi centrifugado e o precipitado ressuspenso em 1 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM. A solução de enzima foi dialisada por 12 h. contra o mesmo tampão e utilizada nos experimentos cinéticos. Em todas as etapas, foram retiradas alíquotas de 0,5 mL para o teste de atividade enzimática e dosagem de proteínas.

2.7. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS

A GPDH de rim de hamster purificada foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS. Os géis, a 10% em poliacrilamida contendo 0,1% de SDS, foram polimerizados em cilindros de vidro (0,6cm x 9,5 cm), segundo o método descrito por WEBER & OSBORN, (1969). Foram aplicadas 50 μ g de proteína da amostra. A banda de proteína foi localizada mergulhando o gel por aproximadamente 2 h. numa solução contendo 475 mL de metanol a 50% (v/v), 46 mL de ácido acético glacial, 1,25 g de Comassie Brilliant Blue. A descoloração foi feita numa mistura 5% (v/v) de metanol e 7,5% (v/v) de ácido acético glacial para 1 litro de água.

2.8. DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA

A concentração de proteína foi estimada pelos métodos de WARBURG & CHRISTIAN, (1941) e de LOWRY et al, (1951), usando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

2.9. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática foi medida espectrofotometricamente a 25°C, segundo o método de DAGHER & DEAL Jr., (1977), acompanhando-se a formação de NADH a 340 nm, em espectrofotômetro VARIAN TECHTRON modelo 635-D. O sistema de incubação continha em um volume final de 1 mL, tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2 contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, arseniato de sódio 40 mM, NAD⁺ 1 mM, gliceraldeído-3-fosfato 1 mM e quantidades variáveis de proteína. A reação foi iniciada pela adição do substrato, já que este é instável em soluções aquosas, decompondo-se com o tempo (DEAL Jr., 1969; DAGHER & DEAL Jr., 1977).

Uma unidade de enzima foi considerada como a quantidade de enzima que catalisa a redução de um μ mol de NAD⁺ por minuto nas condições de ensaio a 25°C. A atividade específica foi expressa como unidade de enzima por miligrama de proteína.

Tendo por objeto um melhor ajuste aos dados cinéticos, os valores de K_m e K_i foram calculados pelo método de regressão linear.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade da GPDH pode ser medida de várias maneiras. Sendo uma enzima de cinética rápida, facilmente reversível e que sofre inibição pelos produtos (DUGGLEBY & DENNIS, 1974) foi escolhido, na presente tese, um método que contorna estas dificuldades assim como facilita a medida da velocidade inicial. O método utilizado neste trabalho para a medida da atividade da enzima foi o arsenolítico onde o uso do arseniato, em lugar do fosfato (FERDINAND, 1964) resulta na rápida formação de 1-arseno-3-fosfoglicerato, que não é enzimaticamente hidrolisado a 3-fosfoglicerato, este método evita a reversibilidade da reação e a inibição por 1-3-bisfosfoglicerato, sendo considerado um método sensível para a análise de estudos cinéticos (DAGHER & DEAL Jr., 1977; BYERS et al, 1979).

3.1. PURIFICAÇÃO DA GPDH DE RIM DE HAMSTER

As etapas da purificação bem como os rendimentos estão apresentados na TABELA I. A enzima foi purificada por dois fracionamentos sucessivos com sulfato de amônio; a 60% numa primeira etapa e até 90% numa segunda etapa. GPDHs de outras fontes têm sido obtidas de uma maneira homogênea após purificação com sulfato de amônio a partir de precipitados obtidos com saturações acima de 70%, (VELTRI et al, (1977); VIEIRA et al, (1983); OHKUBO et al, (1986); BARBOSA & NAKANO, (1987); NAKANO et al, (1992)), o que sugere similaridade entre as várias GPDHs estudadas e a GPDH de rim de hamster.

No extrato bruto, a GPDH de rim apresentou atividade específica de 0,9 U/mg de proteína. Vale a pena mencionar que esta atividade específica foi semelhante tanto para a porção cortical como para a porção medular do órgão, razão pela qual optamos por trabalhar com o órgão inteiro. Após cromatografia em DEAE-Sephadex A-50, a atividade específica passou a 140 U/mg significando uma purificação de 155 vezes com um rendimento de 17% (TABELA I).

Para fins de comparação relatamos valores encontrados na literatura para as atividades específicas das GPDHs purificadas de diversas fontes como: de células HeLa e tumor de mama, 32 U/mg e 24 U/mg respectivamente (NAKANO et al, 1992); tecido tumoral de pulmão, 31 U/mg (OHKUBO et al, 1986); músculo de jacaré, 80 U/mg (VIEIRA et al, 1983); músculo de pato, 203 U/mg (BARBOSA & NAKANO, 1987); fígado suíno, 150 U/mg

(DAGHER & DEAL Jr., 1977); músculo de suíno, 130 U/mg (HALÁSZ & POLGAR, 1982); levedura, 150 U/mg (JAENICKE et al, 1980) todas ensaiadas pelo método arsenolítico. O número de vezes de purificação (155), ficou bastante próximo ao valor encontrado por SALEEMUDDIN & ZIMMERMANN, (1978) para a GPDH de rim de rato, (150 vezes) purificada pelo método do eritrócito hemolisado.

A FIGURA 1 mostra o perfil eletroforético em presença de SDS da preparação após a última etapa de purificação. A banda única observada foi consistente a uma subunidade com peso molecular de 36 Kdaltons e comprovou a homogeneidade da enzima obtida.

3.2. PROPRIEDADES CINÉTICAS DA GPDH DE RIM DE HAMSTER

3.2.1. EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM

A FIGURA 2 mostra o efeito do pH sobre a atividade da GPDH de tecido renal. O pH ótimo para a atividade da GPDH de rim de hamster foi estimado em torno de 8,2. Em pH 7,8 a atividade foi cerca de 60% da encontrada para pH 8,2. O valor de pH ótimo encontrado foi compatível com os pHs ótimos relatados para a maioria das GPDHs (VELICK & FURFINE, 1963; DAGHER & DEAL Jr., 1977; VIEIRA et al, 1983; BARBOSA & NAKANO, 1987; NAKANO et al, 1992).

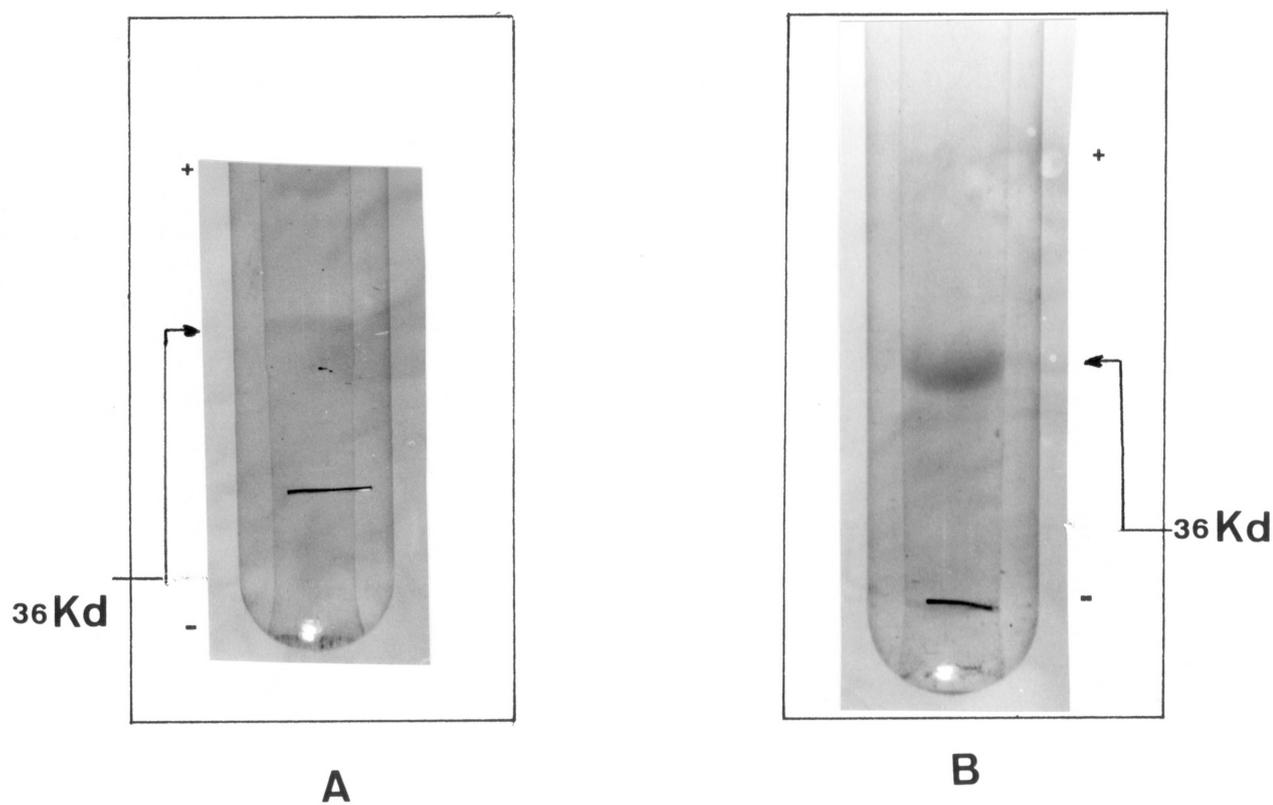
3.2.2. ATIVIDADE DA GPDH DE RIM EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO ARSENIATO

O efeito da concentração do arseniato sobre a atividade da GPDH de rim está mostrado na FIGURA 3. A concentração ótima de arseniato encontrada foi de 40mM, sendo que concentrações acima de 50mM tiveram efeito inibitório sobre a atividade da enzima. Valores descritos na literatura para concentrações ótimas do arseniato são similares aos aqui encontrados FERDINAND, (1964); VIEIRA et al, (1983) e NAKANO et al, (1992) encontraram uma concentração ótima de 50 mM de arseniato de sódio para a atividade das GPDHs de músculo de coelho, músculo de jacaré e células HeLa, respectivamente. A concentração ótima de 30 mM de

TABELA I - PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA GPDH DE RIM DE HAMSTER

PROCESSO PURIFICAÇÃO DA GPDH DE RIM DE HAMSTER								
FRAÇÃO	VOL. (mL)	ATIV. (U/mL)	UNID. TOTAL	PROT. (mg/mL)	PROT. TOTAL (mg)	ATIV. ESP (U/mg)	REND. (%)	PURIF.
EXTRATO BRUTO	30,0	34,0	1020	37,0	1110,0	0,9	100,0	1,0
SULFATO DE AMÔNIO p.p.90%	2,1	126,0	264,6	20,0	42,0	6,3	26,0	7,0
CROMATOGRAFIA DEAE-SEPHADEX A-50	3,1	56,0	173,6	0,4	1,24	140	17,0	155

FIGURA 1 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS.

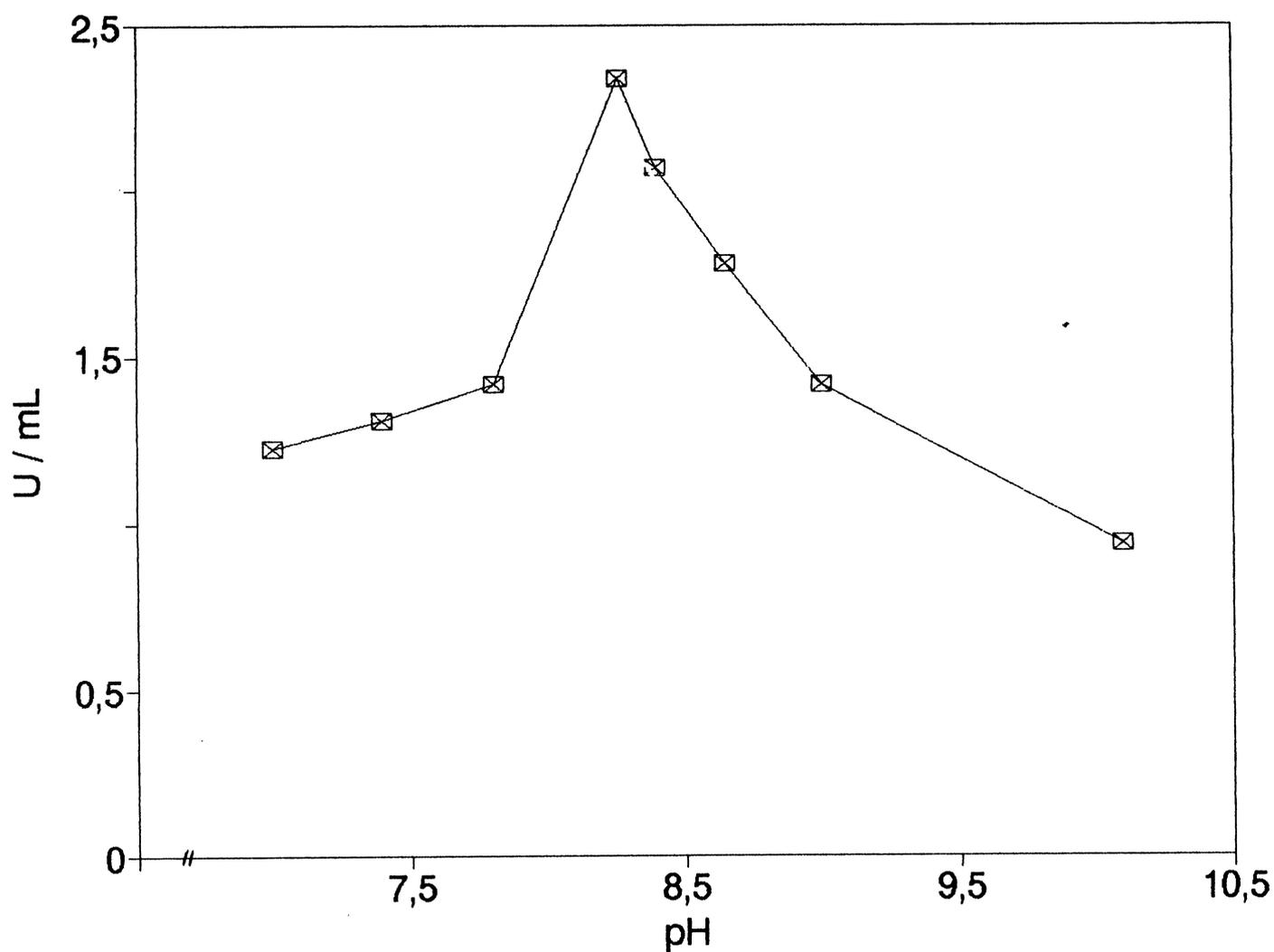


A eletroforese em gel na concentração de 10 % de poliacrilamida, contendo 0,1% de SDS foi realizada de acordo com o método descrito por WEBER & OSBORN, (1969), sendo aplicada amostra contendo 50 μg de proteína. Demais condições como descrito em materiais e métodos

A- Fração purificada de rim.

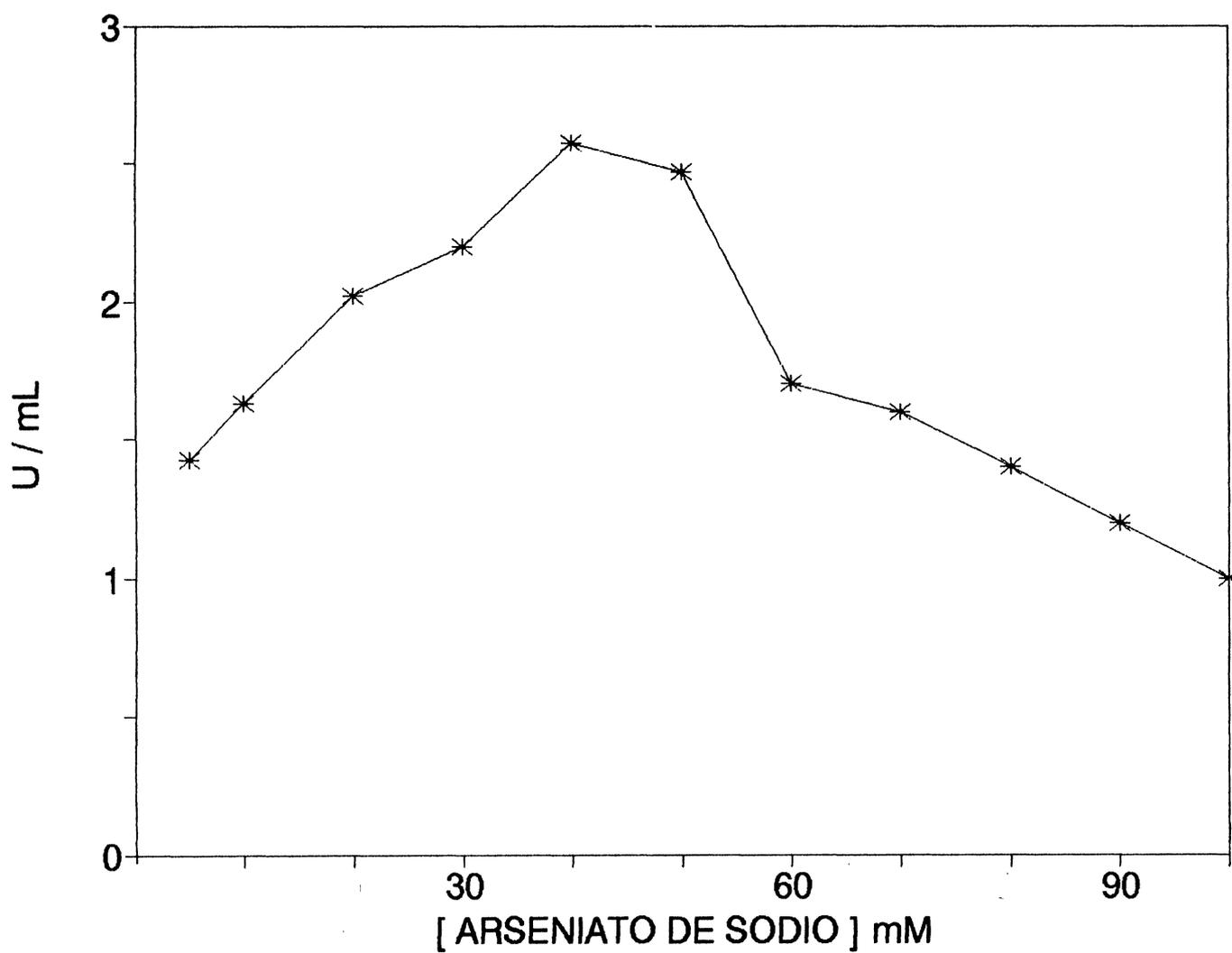
B- GPDH purificada de músculo de coelho (SIGMA) utilizada como padrão.

FIGURA 2 - EFEITO DO pH NA ATIVIDADE DA GPDH DE RIM HAMSTER



O sistema de incubação continha, em volume final de 1 mL: 13 μ g de enzima, NAD⁺ 1 mM, G3P 1 mM, arseniato de sódio 40 mM, EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1 mM. Os tampões (50 mM) utilizados foram: Tris-HCl (pH 7,0 - 9,0) e Bicarbonato de sódio (pH 9,2 - 10,0).

FIGURA 3 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ARSENIATO DE SÓDIO SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER



O sistema de incubação continha, em um volume final de 1 mL: 12 μ g de enzima, tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, NAD⁺ 1 mM, G3P 1 mM e quantidades variáveis de arseniato de sódio.

arseniato de sódio para a atividade da GPDH foi encontrada por FOUCAULT et al, (1978) e BARBOSA & NAKANO, (1987) para as GPDHs de levedura e de músculo de pato respectivamente. Valor mais baixo (10mM) foi encontrado por DAGHER & DEAL Jr., (1977) para a enzima de músculo de suíno.

3.2.3. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO 2-MERCAPTOETANOL SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM

A FIGURA 4 mostra o efeito da ativação da enzima quando incubada em presença de baixas concentrações de 2-mercaptoetanol. A concentração ótima para a ativação da enzima foi de 1 mM, semelhante ao encontrado por NAKANO et al, (1991) para a GPDH de músculo de *Anas sp.* Na ausência de 2-mercaptoetanol, a atividade da GPDH de rim é cerca de 25% do valor encontrado para 1mM do agente redutor.

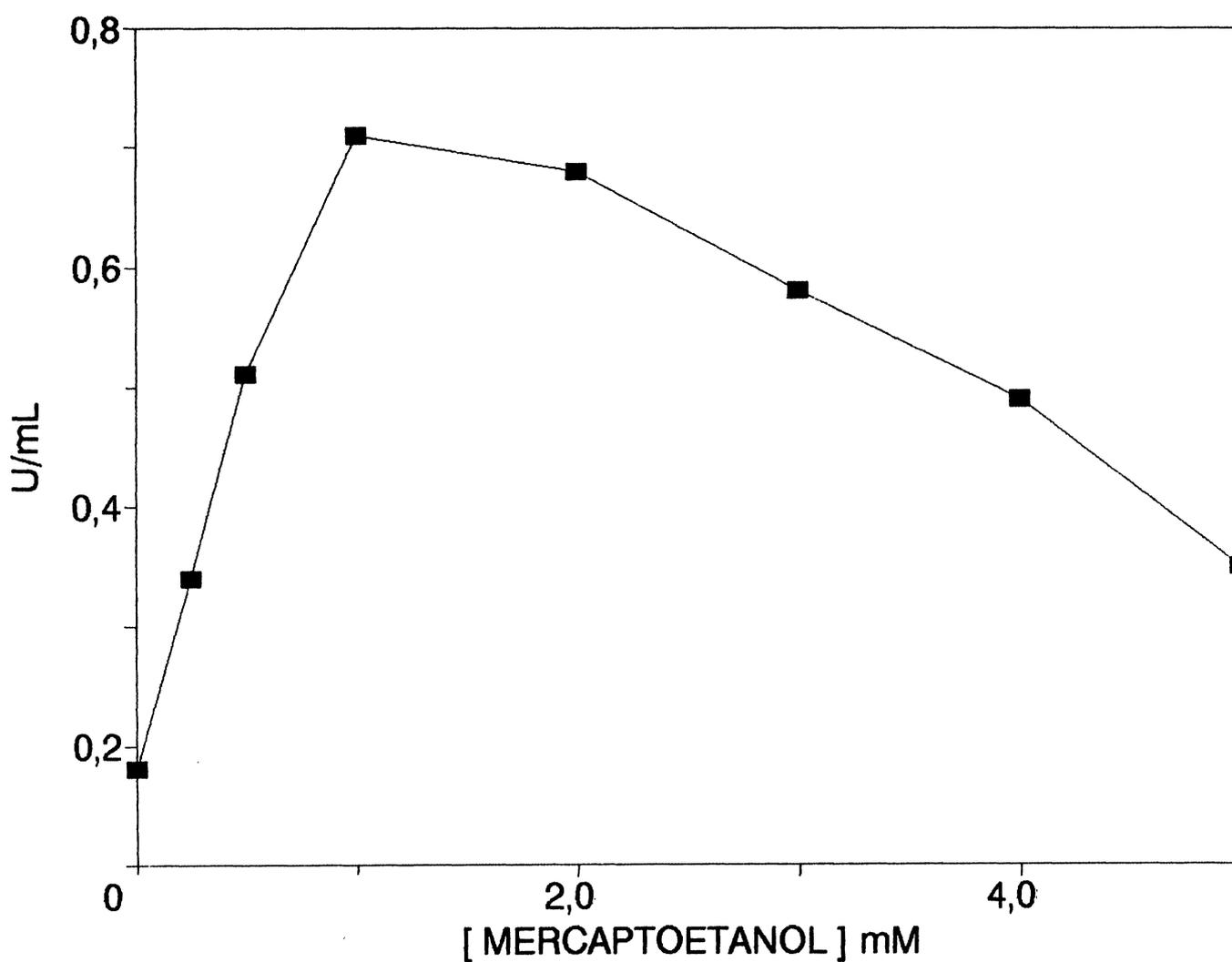
3.2.4. ESTABILIDADE DA GPDH DE RIM

A atividade (U/mL) da GPDH de rim de hamster purificada até a etapa de cromatografia em DEAE-Sephadex A-50 e mantida a 4°C foi medida, diariamente, no período de 15 dias sendo observada uma perda de cerca de 50% da mesma em aproximadamente 7 dias e de 90% ao final deste período.

3.2.5 EFEITO DA DILUIÇÃO DA GPDH SOBRE SUA ATIVIDADE CATALÍTICA

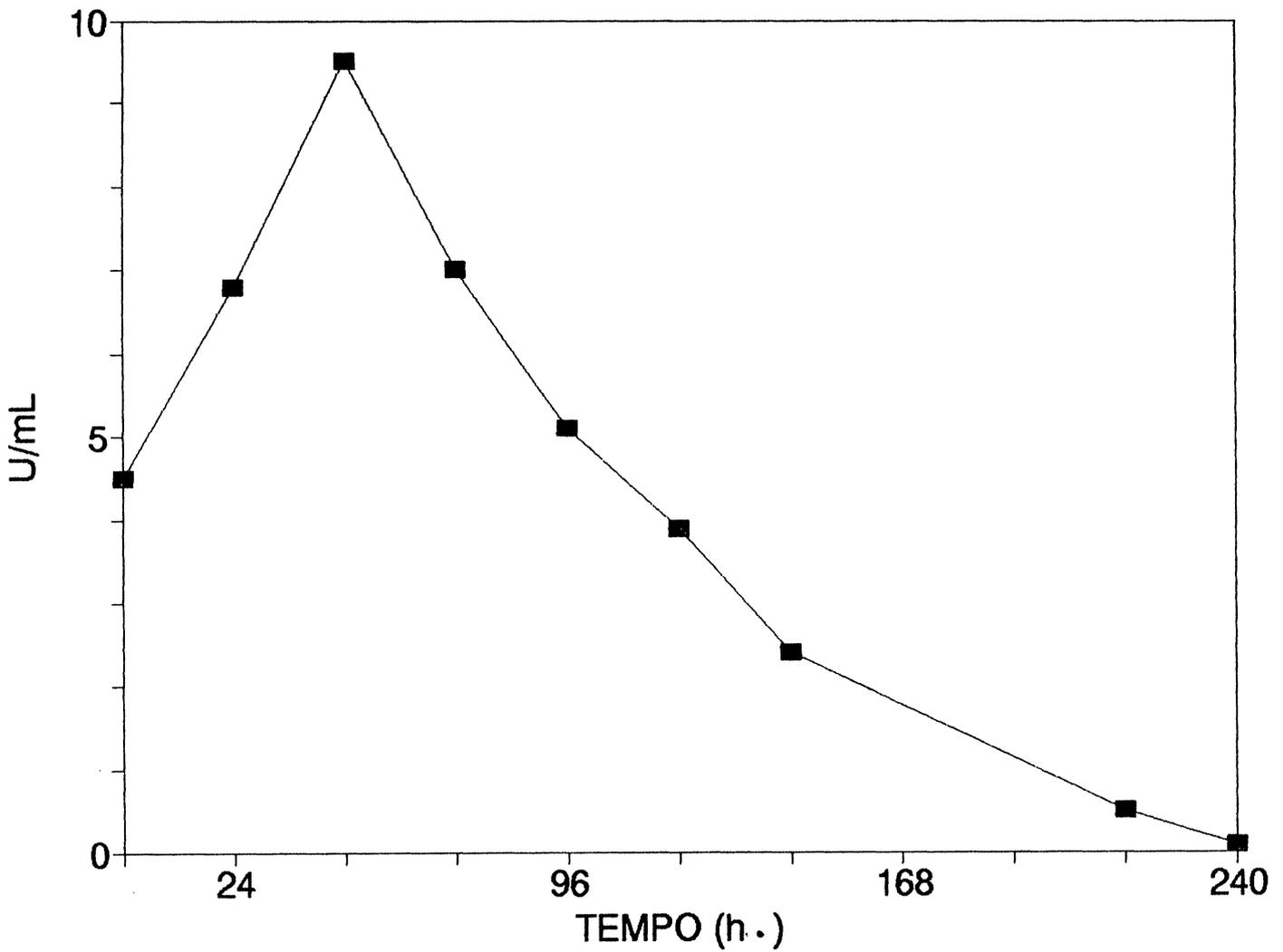
A GPDH de rim purificada e dialisada contra tampão Tris-HCl 1 mM, pH 8,2, contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM foi diluída 1:1 no mesmo tampão e sua atividade foi testada nos tempos descritos na FIGURA 5. Foi observado um curioso aumento de cerca de 110% na atividade da GPDH no período de 48h, sendo que somente 104 h. após a diluição, a atividade da enzima se igualava a do tempo normal. Este fato, embora repetitivo, não tem ainda uma explicação plausível, exigindo estudos posteriores mais aprofundados. Efeito semelhante foi observado por FERDINAND, (1964) com a GPDH de músculo de coelho, em que a enzima diluída 100 vezes

FIGURA 4 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE MERCAPTOETANOL NA ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER



O sistema de incubação continha em um volume final de 1 mL: 11 μ g de enzima, tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, contendo EDTA 1 mM, NAD^+ 1 mM, G3P 1 mM, arseniato de sódio 40 mM e quantidades variáveis de 2-mercaptoetanol conforme indicado na figura.

FIGURA 5 - EFEITO DA DILUIÇÃO SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER



O sistema de incubação continha em um volume final de 1 mL: tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,2) contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, arseniato de sódio 40 mM, NAD^+ 1mM, G3P 1 mM e 18 μg de enzima diluída 1:1 no mesmo tampão no tempo zero.

apresentava o dobro da atividade específica após 10 minutos da diluição. Após este período, o aumento na atividade específica estacionava e se mantinha estável. A explicação dada por FERDINAND, (1964) foi que há inicialmente uma imediata diminuição na atividade específica da enzima causada pela diluição. Com o tempo, um rearranjo molecular promoveria o aumento gradual da atividade específica, até a sua estabilização.

3.2.6 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM. DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN (K_m)

A FIGURA 6 apresenta o efeito da concentração do gliceraldeído-3-fosfato (G3P) sobre a atividade da GPDH de rim. O valor da constante de Michaelis-Menten calculado segundo o método de Lineweaver-Burk (LINEWEAVER & BURK, 1934) foi de 0,12 mM. O resultado obtido para a GPDH de rim foi comparável aos relatados para esta enzima isolada de outras fontes (FUJITA et al, 1976; FOUCAULT et al, 1978; DEPARADE et al, 1981; VIEIRA et al, 1983; BARBOSA & NAKANO, 1987; NAKANO et al, 1992).

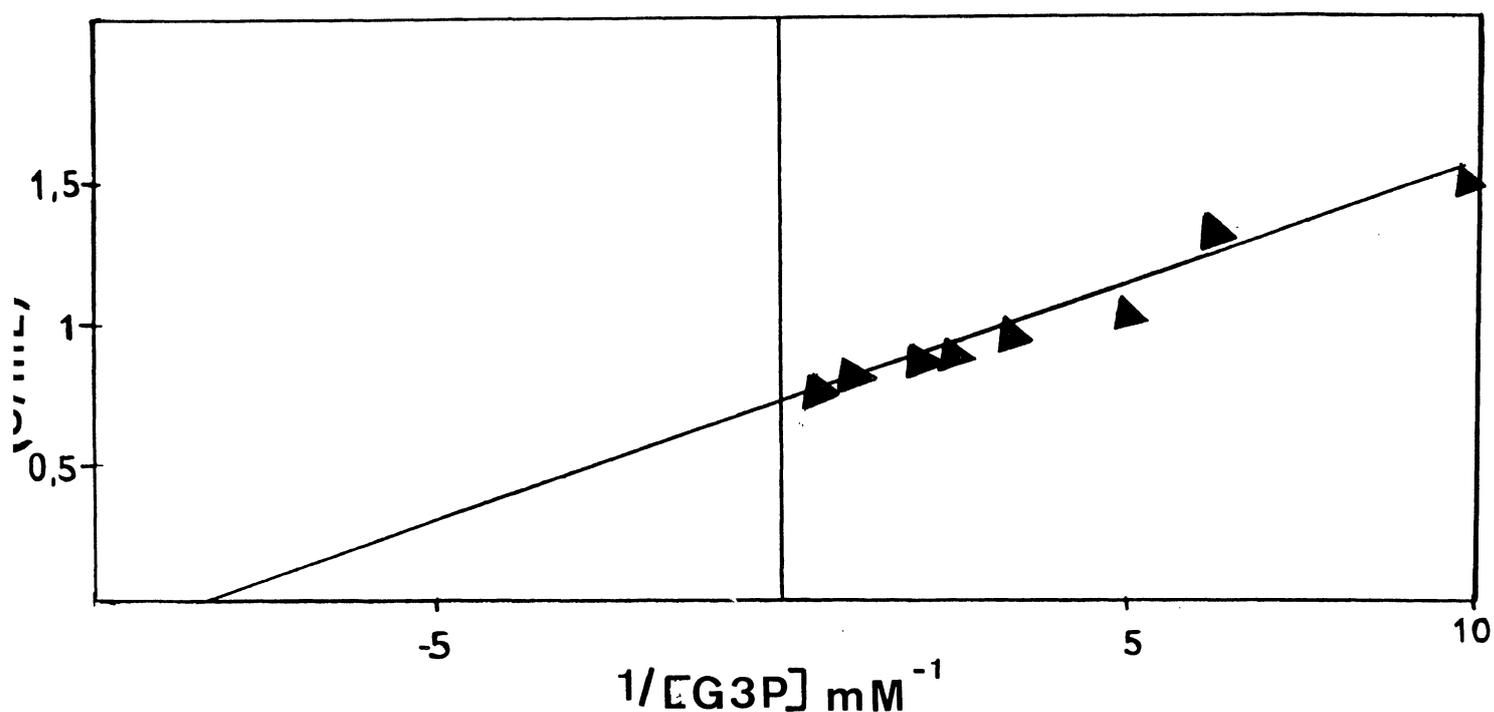
3.2.7 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO NAD⁺ SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM. DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN (K_m).

O efeito da concentração do coenzima (NAD⁺) sobre a velocidade da reação é mostrado na FIGURA 7. O valor de K_m encontrado para o NAD⁺ calculado segundo o método de Lineweaver-Burk foi de 0,05 mM. Este valor de K_m encontrado para o NAD⁺ é comparável aos valores encontrados para os das GPDHs de outras fontes citadas na literatura (FUJITA et al, 1976; FOUCAULT et al, 1978; DEPARADE et al, 1981; VIEIRA et al, 1983; BARBOSA & NAKANO, 1987; NAKANO et al, 1992).

3.2.8. EFEITO INIBITÓRIO DO PRODUTO DA REAÇÃO, NADH, SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

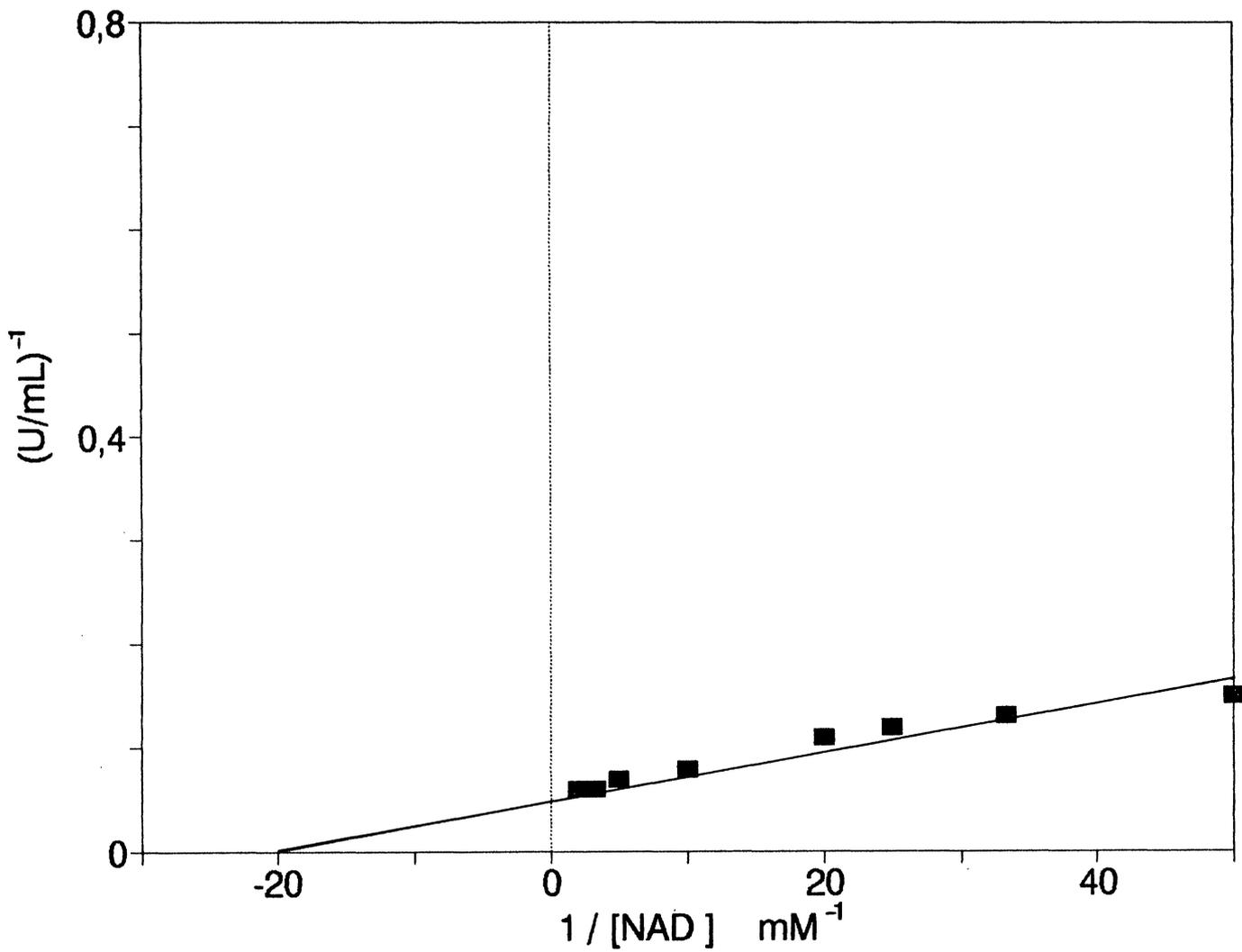
A FIGURA 8 mostra o efeito inibitório do NADH sobre a GPDH de rim de hamster. A

FIGURA 6 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO GLICERALDEÍDO-3- FOSFATO SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER



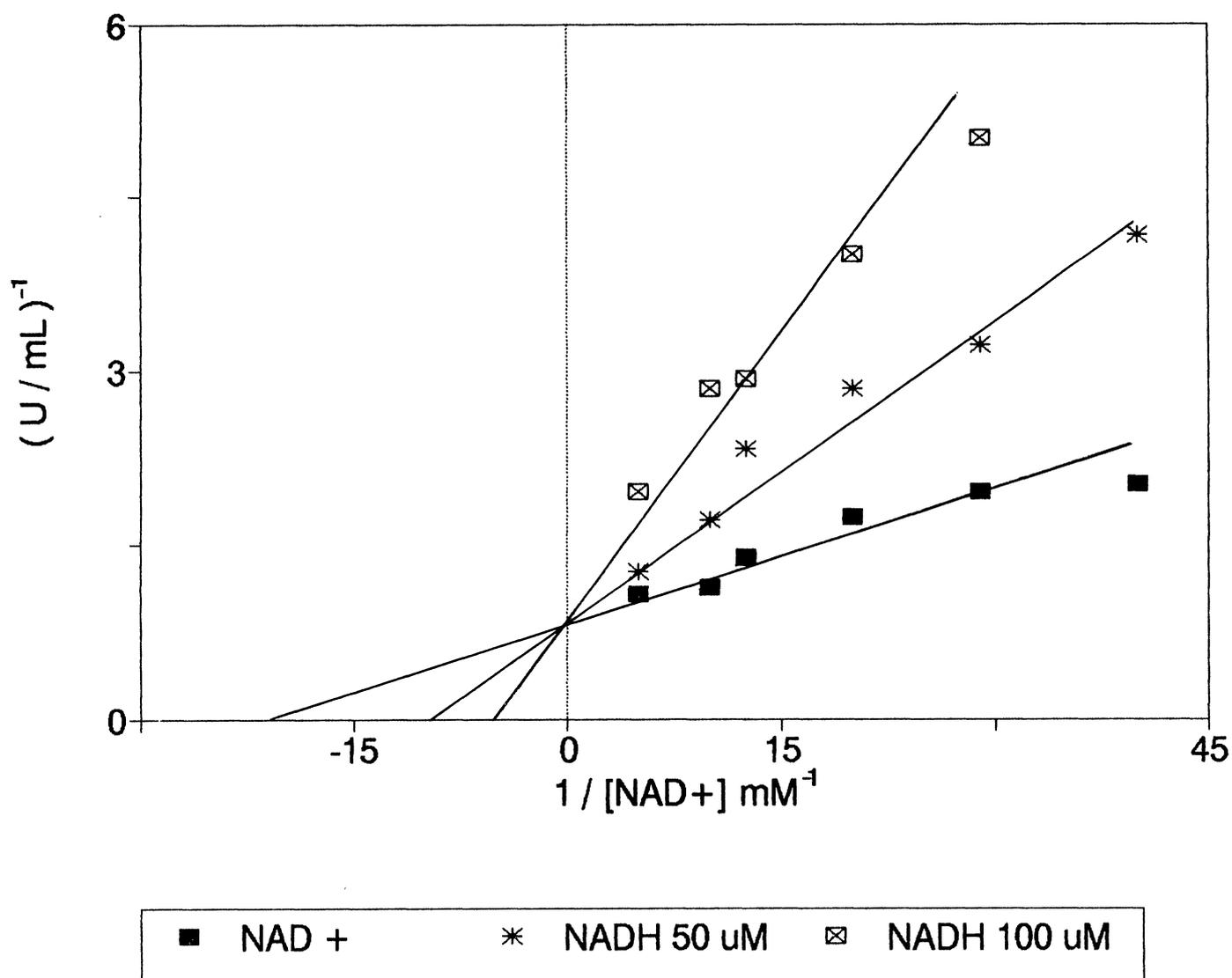
O sistema de incubação continha, em um volume final de 1 mL: 12 μ g de enzima, tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,2) contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, NAD⁺ 1 mM, arseniato de sódio 40 mM e quantidades variáveis de G3P. K_m encontrado para o G3P, 0,12 mM.

FIGURA 7 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NAD⁺ SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER.



O sistema de incubação continha, em um volume final de 1mL: 18 μ g de enzima, tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, G3P 1 mM, arseniato de sódio 40 mM e quantidades variáveis de NAD⁺. K_m para o NAD⁺: 0,05 mM.

FIGURA 8 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NADH NA ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER



O sistema de incubação continha, em um volume final de 1 mL: 12 μ g de enzima, tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,2), contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, G3P 1 mM, arseniato de sódio 40 mM e quantidades variáveis de NAD⁺ e zero (■), 50 μ M (*) e 100 μ M (⊠) de NADH. O valor da constante de inibição (K_i), calculado pela relação de MASSEY (MASSEY, 1953) foi de 0,02 mM para o NADH.

inibição observada foi do tipo competitivo em relação ao NAD^+ e o valor da constante de inibição (K_i), calculado pela interseção com o eixo das abcissas foi de 0,02 mM semelhante ao encontrado por BARBOSA & NAKANO, (1987) para a enzima de Anas sp (pato).

Valores semelhantes para a inibição causada pelo NADH sobre a GPDH de diferentes fontes, foram descritos por vários autores (TUCKER & GRISOLIA, 1962; OGUCHI et al, 1973; VIEIRA et al, 1983; AITHAL et al, 1985; BARBOSA & NAKANO, 1987; NAKANO et al, 1992).

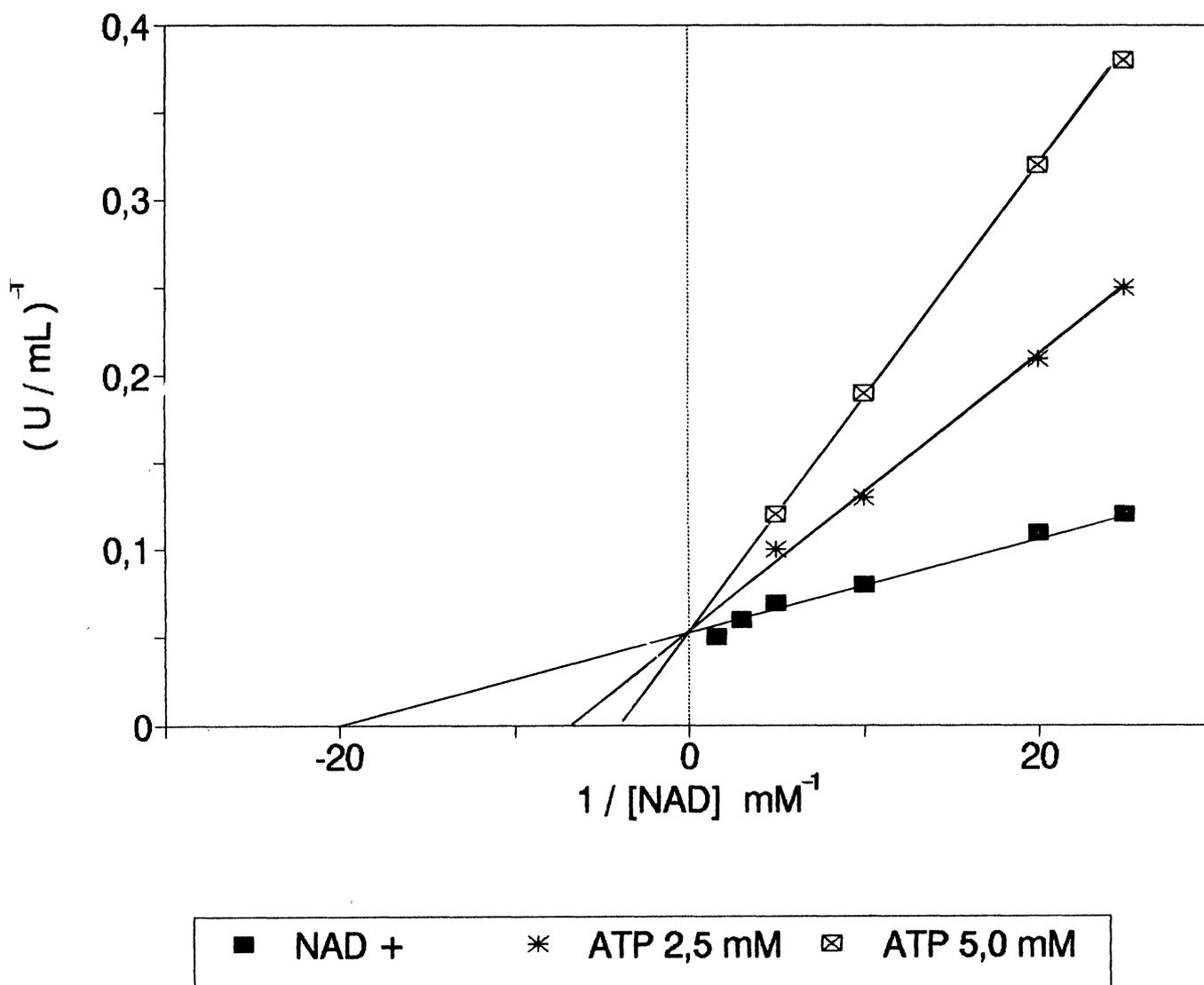
3.2.9. EFEITO INIBITÓRIO DE NUCLEOTÍDEOS SOBRE A GPDH DE RIM

As FIGURAS 9, 10, 11, 12, 13 e 14 e TABELA II, mostram o efeito inibitório dos nucleotídeos sobre a atividade da GPDH de rim. A inibição demonstrada foi do tipo competitivo e os valores de K_i calculados foram de 1,20 mM para o ATP, 0,65 mM para o ADP, 0,50 mM para o AMP e 0,21 mM para o AMPc. Estes valores foram semelhantes em ordem de grandeza aos valores encontrados para as GPDHs de músculo de coelho (YANG & DEAL Jr., 1969), músculo de jacaré (VIEIRA et al, 1983), músculo de pato (BARBOSA & NAKANO, 1987).

Concentrações de 20 mM dos inibidores (FIGURA 13) conduziram à perdas percentuais de 38% (ATP), 69% (ADP), 74% (AMP) e 78% (AMPc) na atividade da GPDH de rim, sendo estes valores mais baixos do que os encontrados para músculo de jacaré (VIEIRA et al, 1983) e músculo de pato (BARBOSA & NAKANO, 1987). Uma constante de inibição para o AMPc (0,11 mM) ainda um pouco mais baixa do que a encontrada para a GPDH de rim, foi relatada por YANG & DEAL Jr., (1969) para a enzima de levedura.

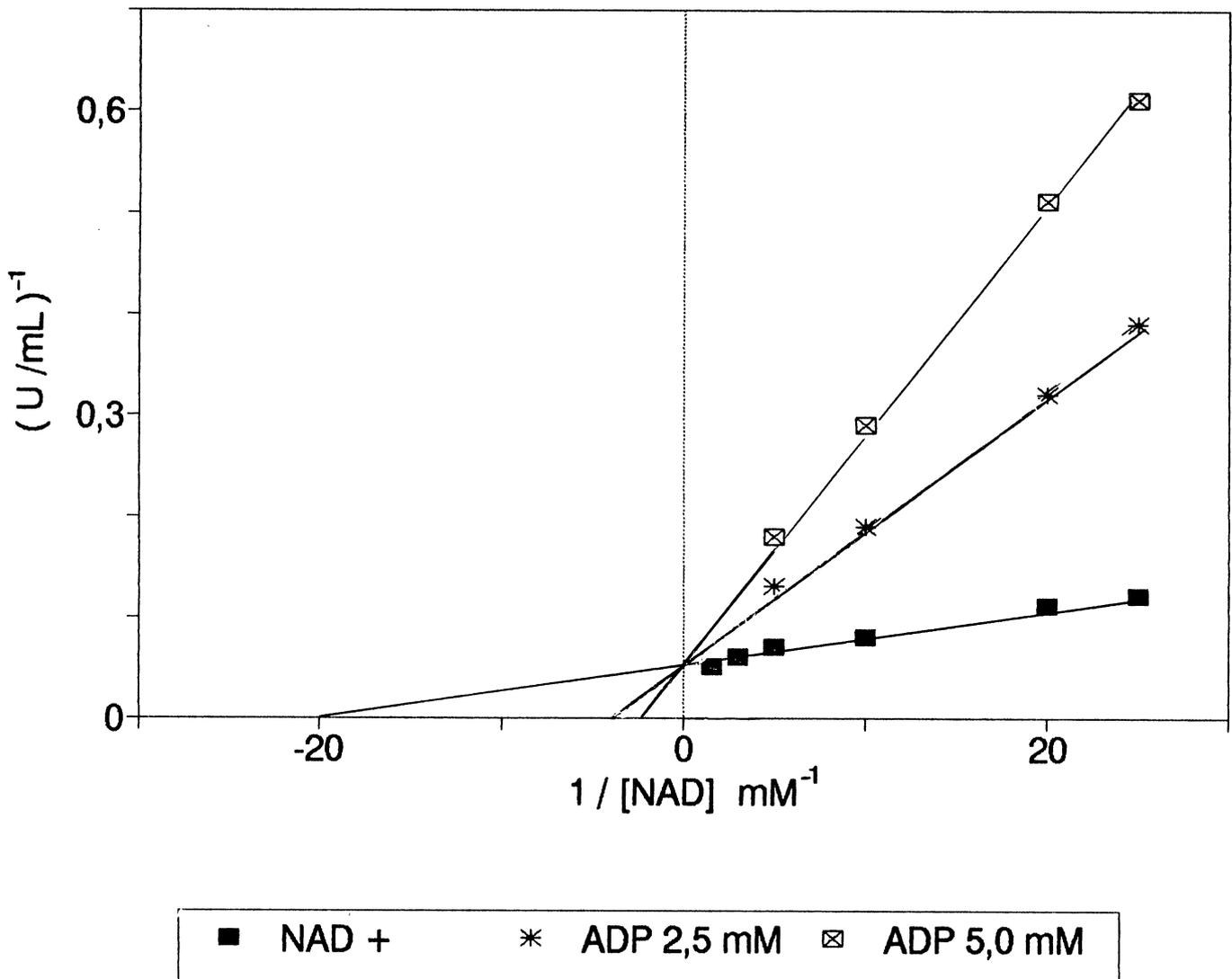
As atividades relativas percentuais da GPDH de rim em presença de concentrações crescente dos nucleotídeos CDP, CMP e UDP estão mostradas na FIGURA 14. Os valores percentuais de inibição encontrados para CDP, CMP e UDP à concentração 25 mM foram de 25%, 50% e 30% respectivamente. Estes nucleotídeos demonstraram ser inibidores fracos da atividade da GPDH de rim conforme classificação de YANG & DEAL Jr., (1969).

FIGURA 9 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ATP SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER



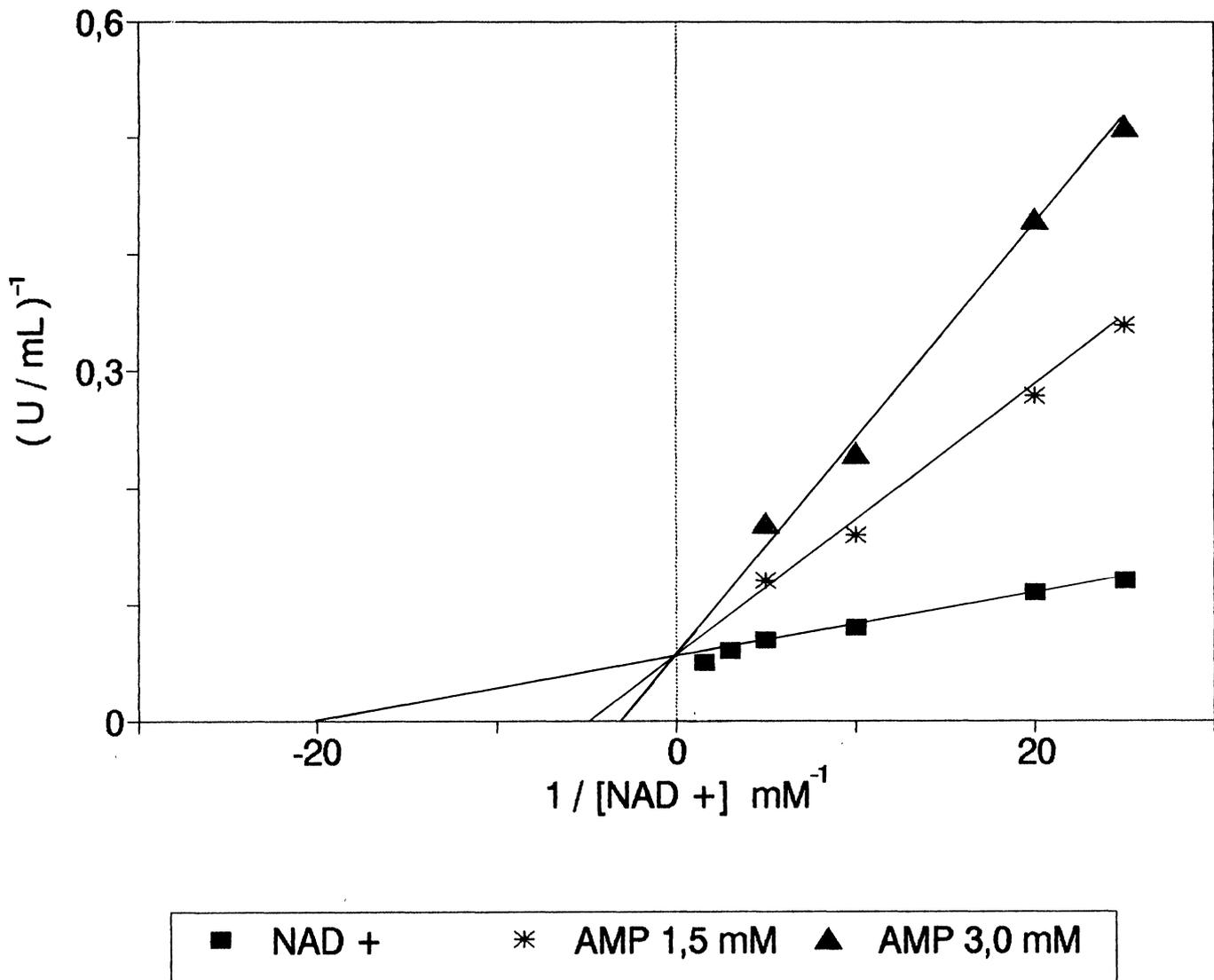
O sistema de incubação continha, em um volume final de 1 mL: 18 μ g de enzima, tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,2), contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, G3P 1 mM, arseniato de sódio 40 mM, quantidades variáveis de NAD⁺ e ATP nas concentrações indicadas no gráfico. O valor da constante de inibição (K_i) calculada pela relação de MASSEY (MASSEY, 1953) foi de 1,20 mM.

FIGURA 10 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ADP SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH
DE RIM DE HAMSTER



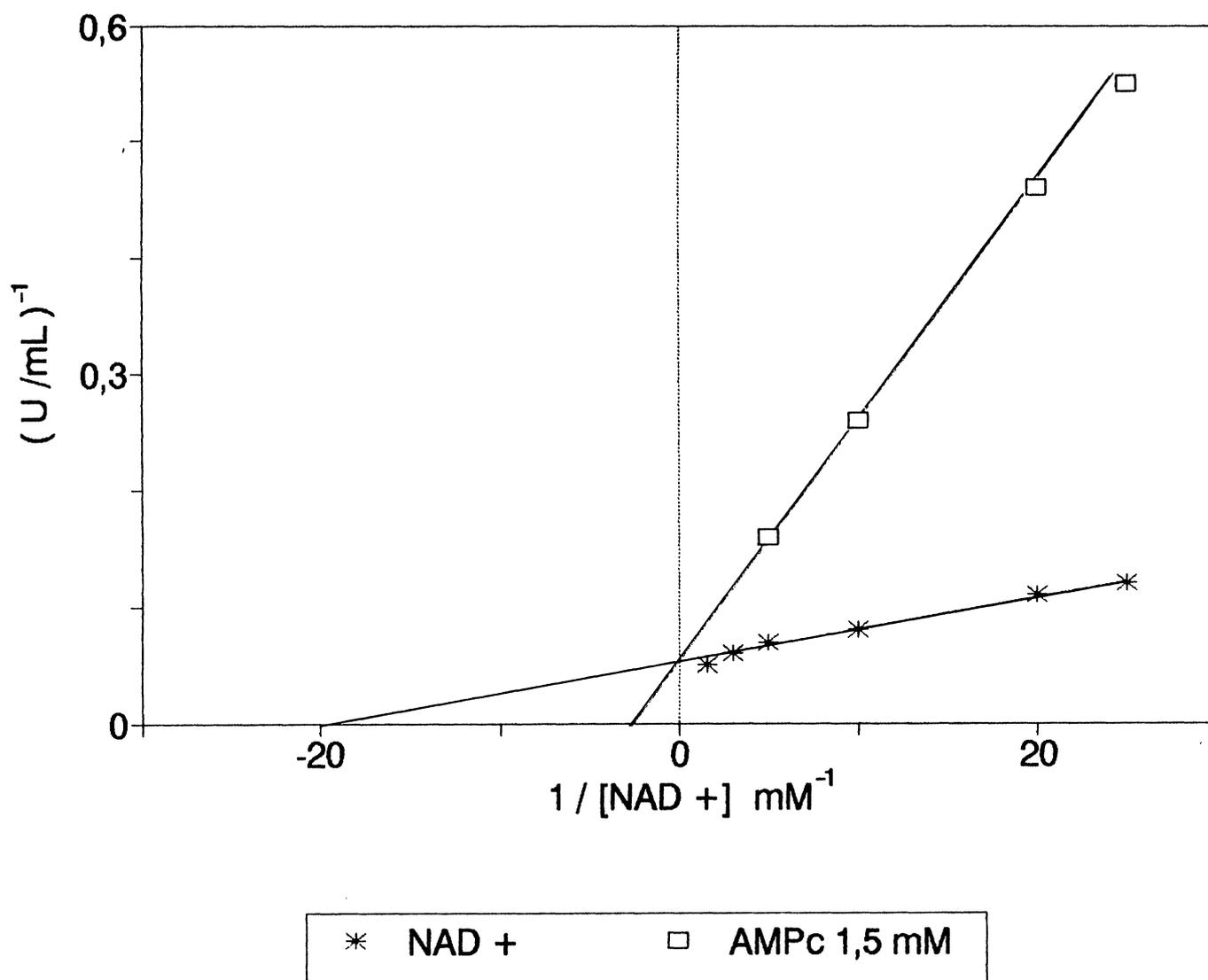
O sistema de incubação continha, em um volume final de 1 mL: 18 μ g de enzima, tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,2), contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, G3P 1 mM, arseniato de sódio 40 mM, quantidades variáveis de NAD⁺ e ADP nas concentrações indicadas no gráfico. O valor da constante de inibição (K_i) calculada pela relação de MASSEY (MASSEY, 1953) de 0,65 mM.

FIGURA 11 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AMP SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER



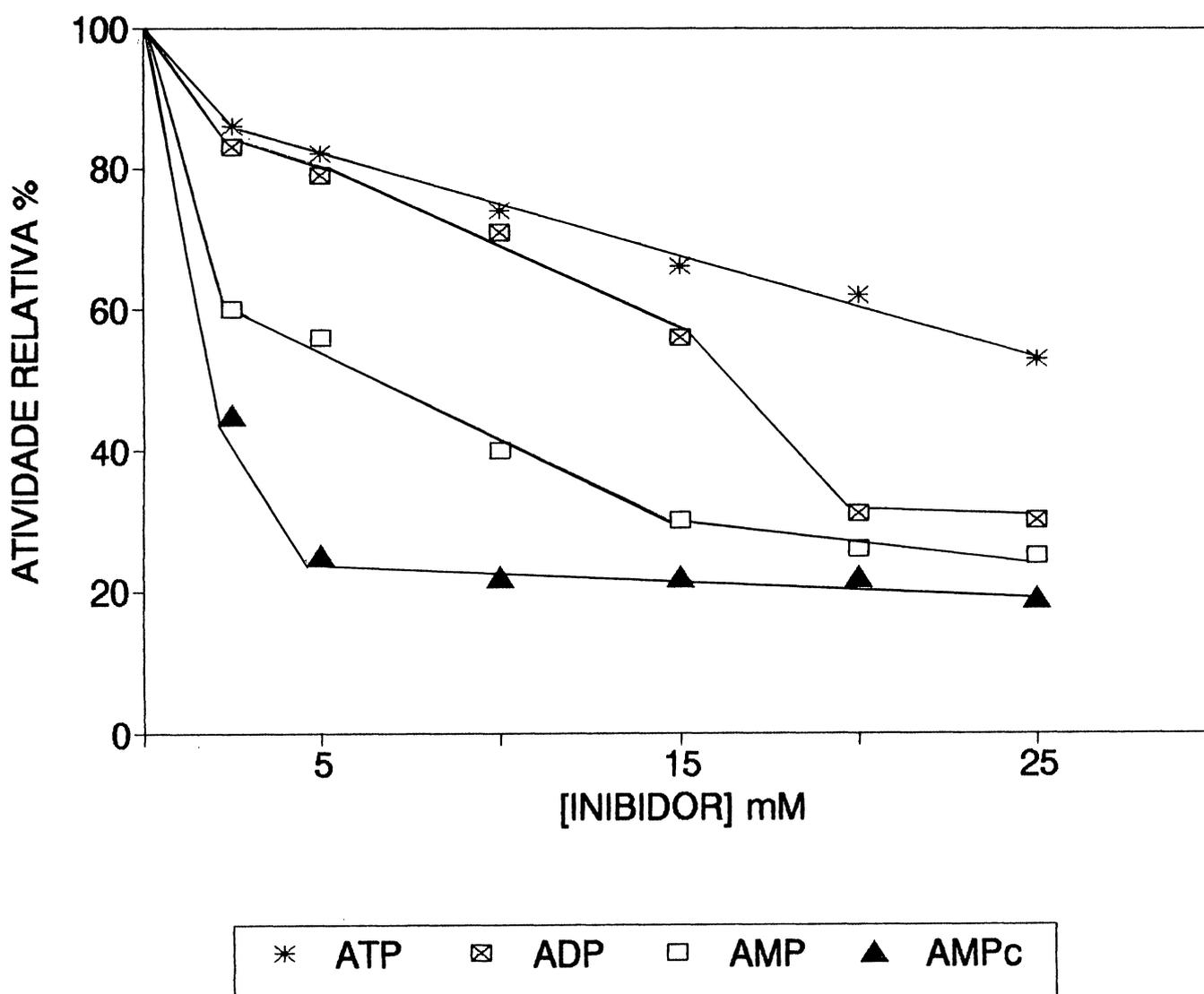
O sistema de incubação continha, em um volume final de 1 mL: 18 μg de enzima, tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, G3P 1 mM, arseniato de sódio 40 mM, quantidades variáveis de NAD^+ e AMP nas concentrações indicadas no gráfico. O valor da constante de inibição (K_i) calculada pela relação de MASSEY (MASSEY, 1953) foi de: 0,50 mM.

FIGURA 12 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AMP_c SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER



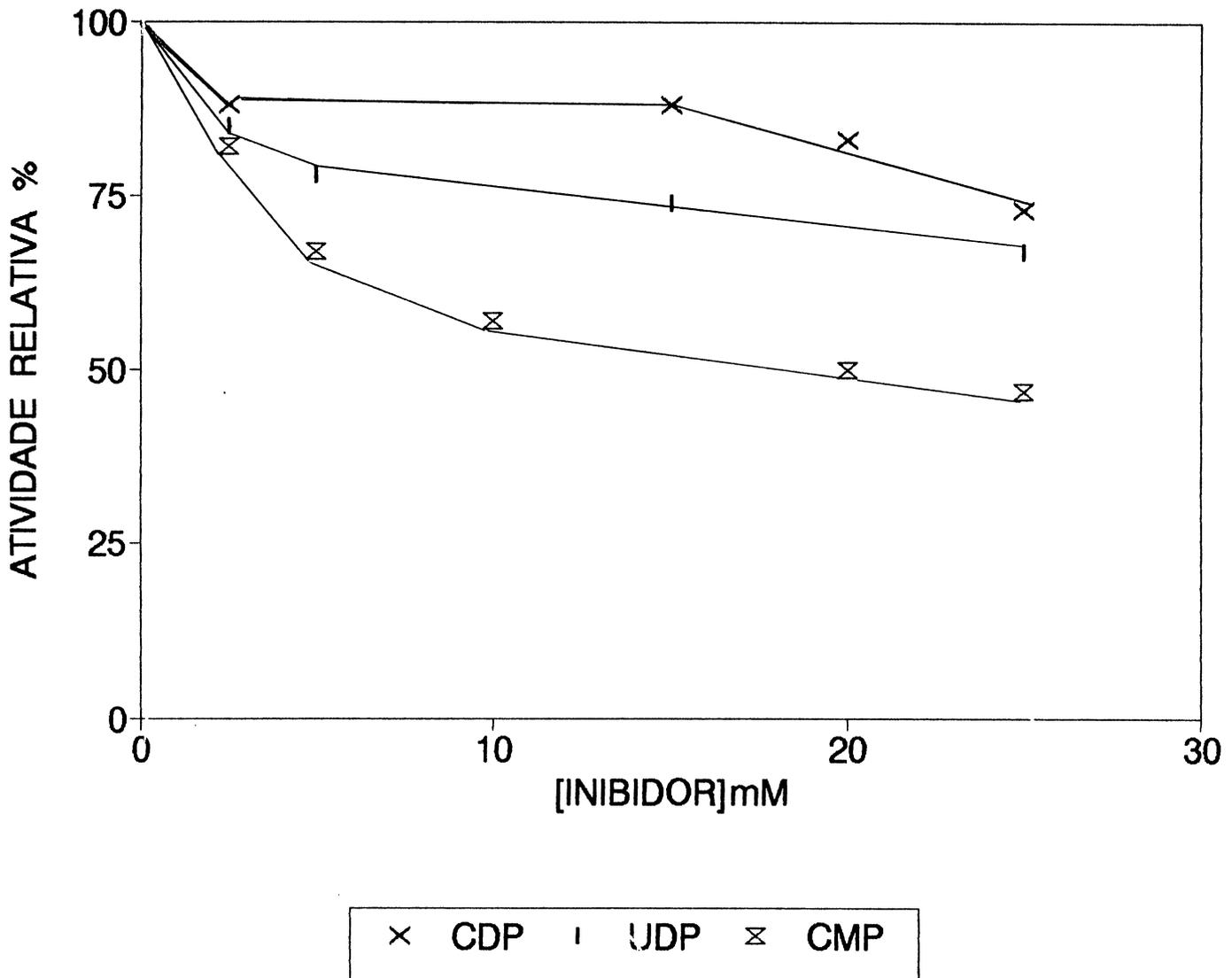
O sistema de incubação continha, em um volume final de 1 mL: 18 μ g da enzima, tampão Tris-HCl 1 mM (pH 8,2), contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, G3P 1 mM, arseniato de sódio 40 mM, quantidades variáveis de NAD⁺ e AMP_c na concentração indicada no gráfico. O valor da constante de inibição (K_i) calculada pela relação de MASSEY (MASSEY, 1953) foi de: 0,21 mM.

FIGURA 13 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS NUCLEOTÍDEOS DE ADENINA SOBRE
A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER



O sistema de incubação continha, em um volume final de 1 mL: 18 μ g de proteína, tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,2), contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, G3P 1 mM, arseniato de sódio 40 mM, NAD⁺ 1 mM e quantidades variáveis de nucleotídeos de adenina nas concentrações indicadas no gráfico.

FIGURA 14 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE CDP, UDP e CMP SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER



O sistema de incubação continha em um volume final de 1 mL: 18 μ g de proteína, tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,2), contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, NAD^+ 1 mM, G3P 1 mM, arseniato de sódio 40 mM e quantidades variáveis do inibidor conforme demonstrado no gráfico

TABELA II - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NUCLEOTÍDEO NA ATIVIDADE DA GPDH DE RIM NORMAL DE HAMSTER

INIBIDOR mM	NUCLEOTÍDEOS						
	CDP	UDP	ATP	CMP	ADP	AMP	AMP _c
	ATIVIDADE RESIDUAL (%)						
0,0	100	100	100	100	100	100	100
0,5	94	93	90	98	88	*	*
2,5	88	85	86	82	83	60	45
5,0	*	78	82	67	79	56	25
10,0	*	*	74	57	71	40	22
15,0	88	74	66	*	56	30	22
20,0	83	*	62	50	31	26	22
25,0	73	67	53	47	30	25	19

O sistema de incubação continha em um volume final de 1 mL: 18 μ g de proteína, tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, NAD⁺ 1 mM, G3P 1 mM, arseniato de sódio 40 mM e quantidades variáveis do inibidor conforme indicado na tabela.

3.2.10 EFEITO DE ÍONS METÁLICOS DIVALENTES SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM

Foi estudado o efeito de alguns íons metálicos (na concentração 1 mM) sobre a atividade da GPDH de rim. Os resultados apresentados na TABELA III mostram um leve aumento na atividade da enzima na presença dos íons Mg^{++} e Mn^{++} . Todavia a adição de $MgCl_2$ à enzima após uma semana de processo de purificação e mantida em geladeira, não melhorou a sua atividade, nem impediu a sua inativação que ocorreu após 15 dias da purificação. O mesmo sal foi também adicionado à GPDH de rim após 104 h. da diluição (FIGURA 5) e não houve reversão da atividade da enzima. Foi também mostrado um decréscimo acentuado (superior a 60%) da atividade na presença dos íons Ca^{++} e Cd^{++} e a inativação da GPDH de rim em presença dos íons Hg^{++} e Cu^{++} . A ação de íons de metais pesados como o Cu^{++} e Hg^{++} ocorre através de uma reação com os grupos tiólicos da GPDH que estão envolvidos em sua atividade enzimática, bastando apenas traços destes metais para uma total inibição da atividade enzimática (FERDINAND, 1964).

Resultados semelhantes foram encontrados por VIEIRA et al, (1983) para músculo de jacaré e BARBOSA & NAKANO, (1987) para músculo de pato.

3.2.11 EFEITO DE REAGENTES SULFIDRÍLICOS SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM

A TABELA IV mostra o efeito dos reagentes sulfidrílicos sobre a atividade da enzima e o efeito de 2-mercaptoetanol na reversão desta inibição.

Os inibidores p-cloromercuribenzoato e p-hidroximercuribenzoato causaram uma perda total da atividade, ocorrendo recuperação parcial da atividade em presença de 2-mercaptoetanol 5 mM. Embora a inibição pelo 2-cloro-4-aminobenzoato tenha sido um pouco menos intensa, a reativação da enzima pelo 2-mercaptoetanol foi menor com esse reagente.

A inibição por alquilação na presença de iodoacetamida e N-etilmaleimida foi total e não foi revertida em presença do agente redutor na mesma concentração. VIEIRA et al, (1983) trabalhando com a GPDH de *Caiman sp* encontraram os mesmos resultados com inibição total da atividade enzimática e irreversibilidade da mesma. RAPKINE, (1938) trabalhando com agentes oxidantes, concluiu que é necessário um estado de oxidação e redução para as atividades das desidrogenases que fica altamente prejudicado quando agentes oxidantes ou alquilantes reagem com seus grupamentos tiólicos.

TABELA III - EFEITO DE ÍONS METÁLICOS DIVALENTES SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER

SAL 1mM	ATIVIDADE RELATIVA %
NENHUM	100
MgCl ₂	119
MnCl ₂	108
CaCl ₂	36
CdCl ₂	26
CuCl ₂	0
HgCl ₂	0

A enzima foi pré-incubada em presença do íon metálico, por 10 minutos, a 25⁰C na ausência de G3P e a seguir a atividade enzimática foi determinada em um sistema de incubação contendo em um volume final de 1 mL: tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2 contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, NAD⁺ 1 mM, G3P 1 mM, arseniato de sódio 40 mM e 18 µg de enzima.

TABELA IV - EFEITO DOS REAGENTES SULFIDRÍLICOS SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE RIM DE HAMSTER.

REAGENTE 0,10 Mm	ATIVIDADE RELATIVA % <i>a</i>	ATIVIDADE RELATIVA % EM PRESENÇA DE MERCAPTOETANOL (5mM) <i>b</i>
NENHUM	100	100
2-CLORO 4-AMINO- BENZOATO	11	33
iodoacetamida	0	0
N-ETILMALEIMIDA	0	0
REAGENTE 0,01 mM		
p-CLOROMERCU- RIBENZOATO	0	56
p-HIDROXIMERCU- RIBENZOATO	0	45

a- A enzima foi pré-incubada em presença do inibidor por 10 minutos, a 25°C, na ausência de G3P e a seguir a atividade enzimática foi determinada em um sistema de incubação contendo em um volume final de 1 mL: tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, contendo EDTA 1 mM, arseniato de sódio 40 mM, NAD⁺ 1 mM, G3P 1 mM e 18 µg de proteína.

b- A mistura de incubação foi a mesma que em *a*, porém 2-mercaptoetanol na concentração 5 mM foi adicionado ao sistema imediatamente antes do ensaio da atividade enzimática.

3.3. PURIFICAÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS BHK-21

Na purificação da GPDH de células BHK-21 foram utilizadas células coletadas quando as culturas encontravam-se confluentes (FIGURA 15). Para a purificação da GPDH de células BHK-21 foram adotados os mesmos procedimentos descritos para as enzimas de células HeLa (NAKANO et al, 1992). Estas metodologias foram escolhidas porque as células BHK são derivadas de rim, e por outro lado, à semelhança de células HeLa, são cultivadas "in vitro". Devido à baixa quantidade de proteína já no extrato bruto de células BHK-21 e do alto custo da produção das células, além do tempo de obtenção das mesmas, a GPDH foi purificada até a etapa de saturação de 90% com sulfato de amônio, para alguns estudos de caracterização da enzima. Na TABELA V estão descritas as etapas de purificação da GPDH obtida das células BHK, onde se observa uma purificação de 21 vezes com um rendimento de 17%.

3.4. PROPRIEDADES CINÉTICAS DA GPDH DE CÉLULAS BHK-21

3.4.1 EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS BHK-21

A FIGURA 15 mostra o efeito do pH sobre a atividade da GPDH de células BHK-21. O pH ótimo encontrado para a atividade da enzima foi de 8,4 sendo um pouco mais elevado do que o encontrado para a GPDH de rim (pH 8,2). Ambas as enzimas demonstraram atividades bem mais baixas em valores de pH próximos ao fisiológico. Estes valores são semelhantes aos citados para as GPDHs de outras fontes (VELICK & FURFINE, 1963; DAGHER & DEAL Jr., 1973; VIEIRA et al, 1983; BARBOSA & NAKANO, 1987; NAKANO et al, 1992).

TABELA V - PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS BHK-21

FRAÇÃO	VOLUME (mL)	ATIVIDADE (U/mL)	UNIDADE TOTAL	PROTEÍNA (mg/mL)	PROTEÍNA TOTAL (mg)	ATIV. ESP. (U/mg)	RENDIMENTO (%)	PURIFICAÇÃO
EXTRATO BRUTO	13,0	1,1	14,3	5,0	65,0	0,2	100,0	1,0
SULFATO DE AMÔNIO pp.60.90%	1,0	2,5	2,5	0,6	0,6	4,2	17,5	21

FIGURA 15 - CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS BHK-21 EM MEIO DE EAGLE

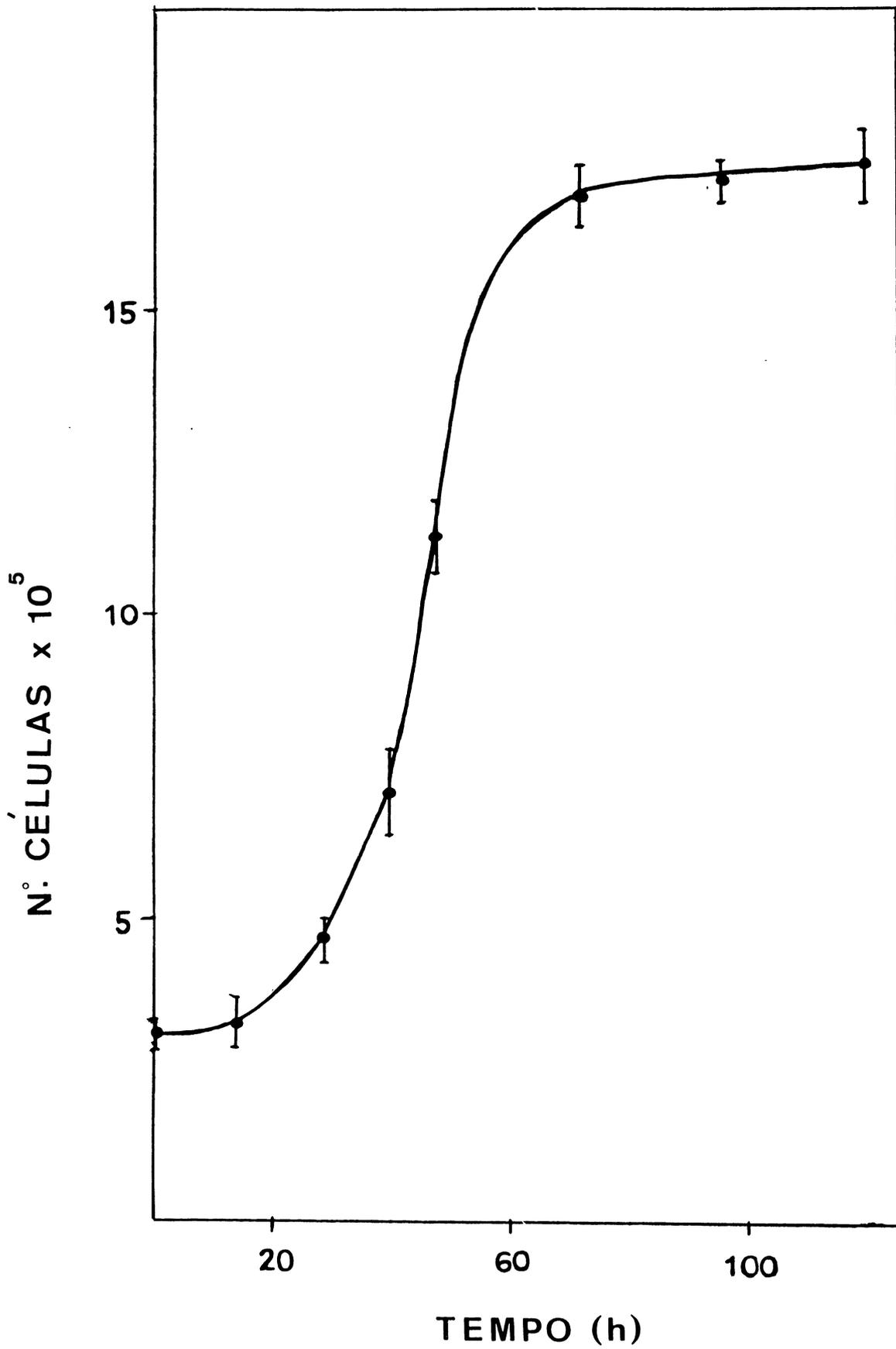
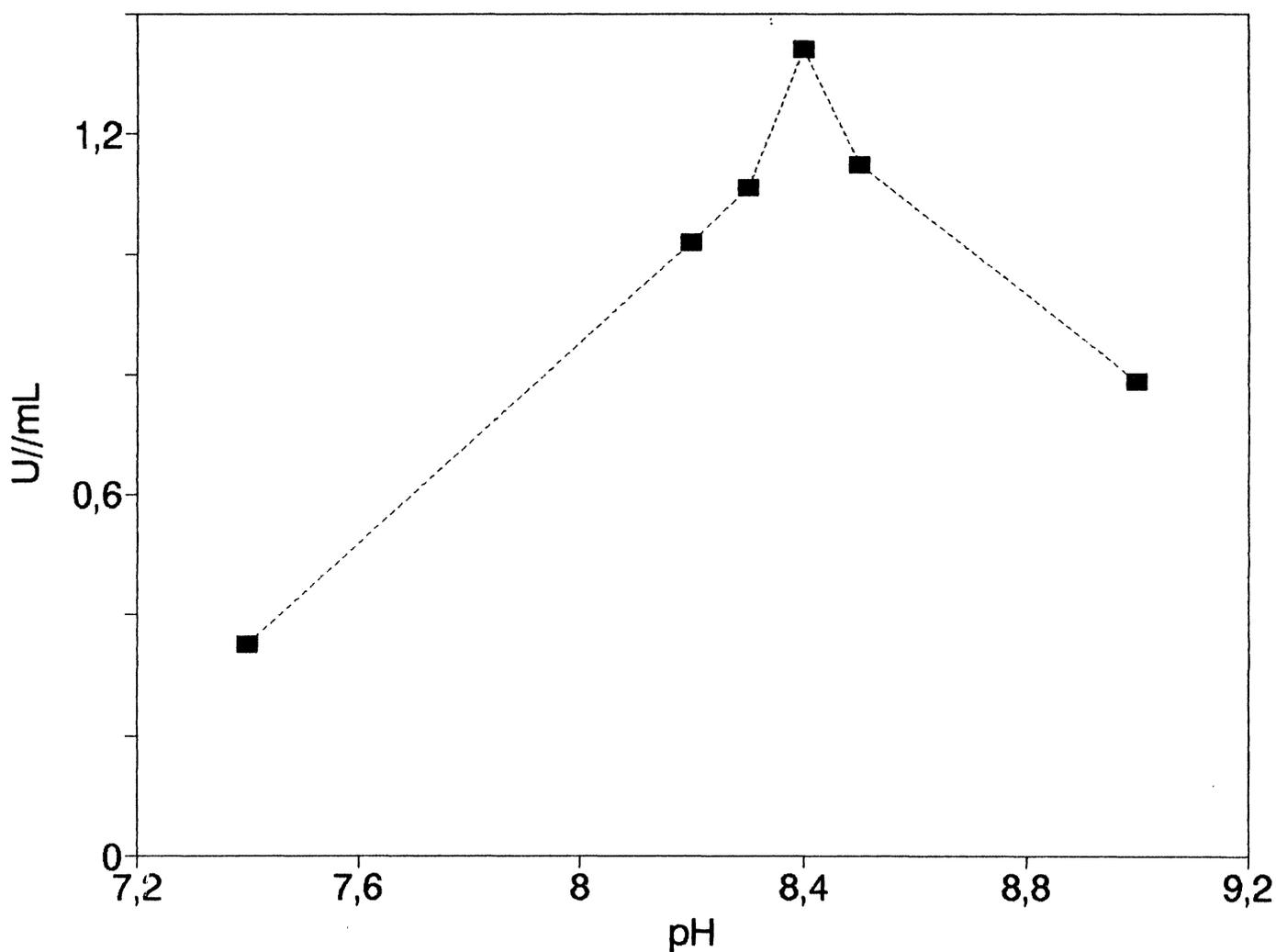


FIGURA 16 - EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS BHK-21



O sistema de incubação continha, em um volume final de 1 mL: 13 μg de enzima, NAD^+ 1 mM, G3P 1 mM, arseniato de sódio 30 mM, EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM. O tampão (50 mM) utilizado foi Tris-HCl (pH 7,4 - 9,0).

3.4.2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO ARSENIATO DE SÓDIO SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS BHK-21

A influência da concentração do arseniato de sódio sobre a atividade da GPDH de células BHK-21 está mostrada na FIGURA 16. Pode-se observar um perfil diferente daquele encontrado para a GPDH de rim de hamster demonstrando uma queda de 27% na atividade da enzima na concentração de arseniato subsequente àquela encontrada como ótima para a atividade da enzima (30 mM). O valor encontrado para a GPDH de células BHK, foi idêntico ao encontrado por FOUCAULT et al, (1978) e BARBOSA & NAKANO, (1987) para as GPDHs de levedura e de músculo de pato, respectivamente.

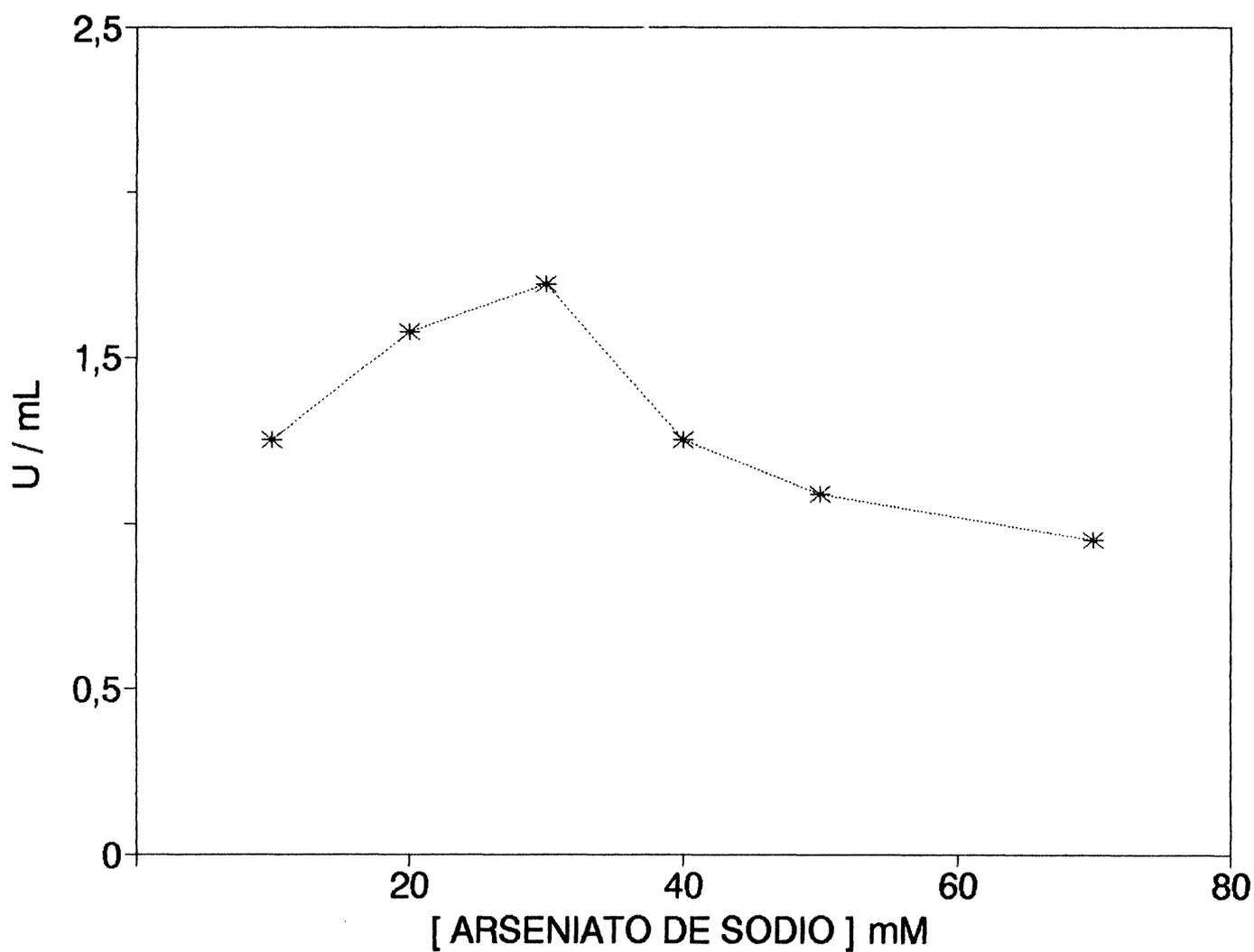
3.4.3 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO COENZIMA SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS BHK-21. DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN (K_m)

A FIGURA 17 mostra o efeito da concentração do NAD^+ sobre a atividade da GPDH de células BHK-21. O valor de K_m encontrado foi calculado pelo método de Lineweaver-Burk. Valores semelhantes são descritos para GPDHs de outras fontes (FUJITA et al, 1976; FOUCAULT et al, 1978; DEPARADE et al, 1981; VIEIRA et al, 1983; NAKANO et al, 1992). Foi estimado um K_m de 0,05 mM sendo este valor, idêntico ao encontrado para a enzima de rim.

3.4.4 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS BHK-21. DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN (K_m)

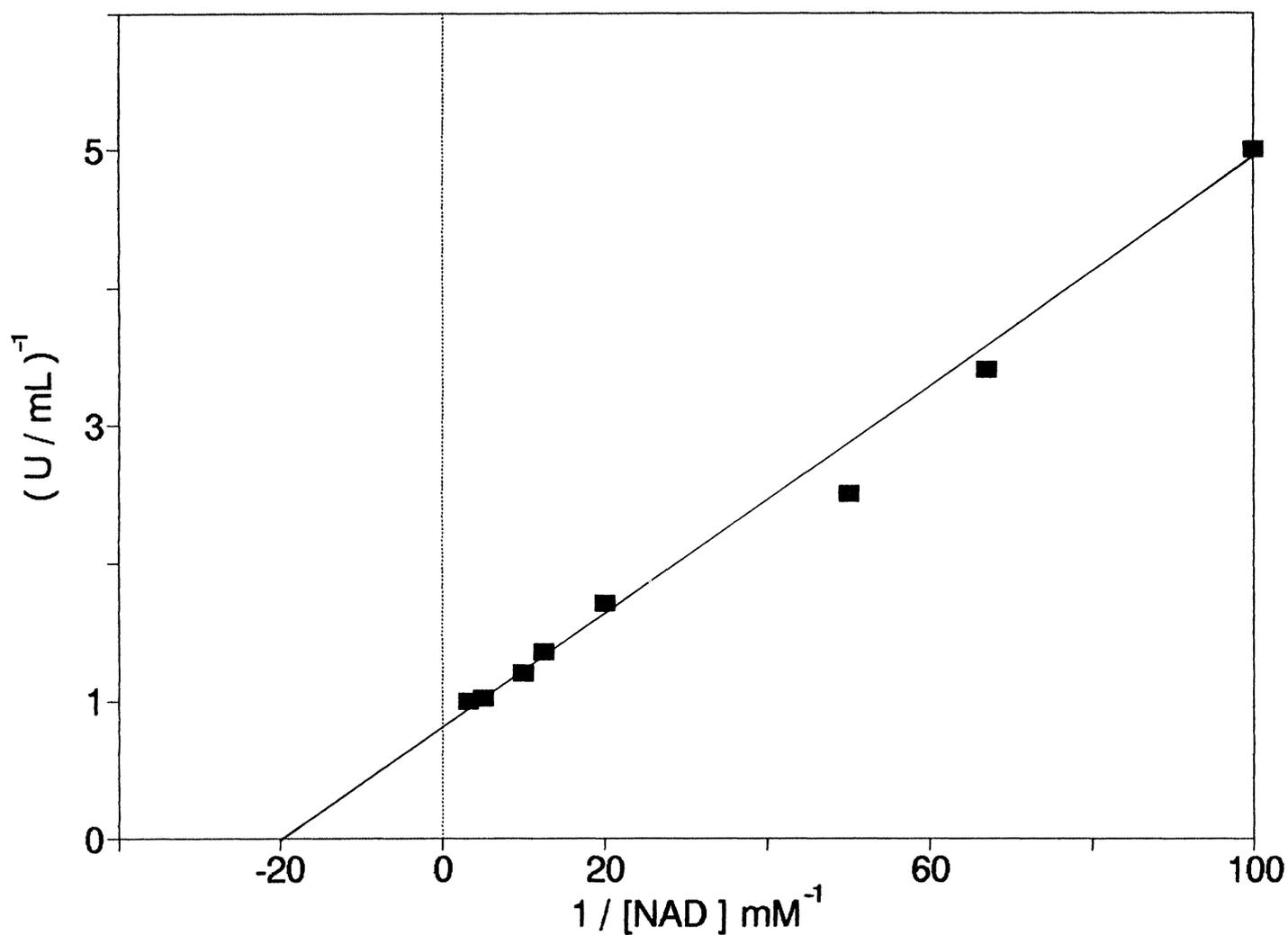
A FIGURA 18 mostra o efeito da concentração do G3P sobre a atividade da enzima de células BHK-21. O valor de K_m calculado pelo método de Lineweaver-Burk foi de 0,12 mM valor este, idêntico ao encontrado para a GPDH de rim. Valores semelhantes foram relatados para enzimas isoladas de outras fontes (FUJITA et al, 1976; FOUCAULT et al, 1978; DEPARADE et al, 1981; VIEIRA et al, 1983; NAKANO et al, 1992).

FIGURA 17 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ARSENIATO DE SÓDIO SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS BHK-21



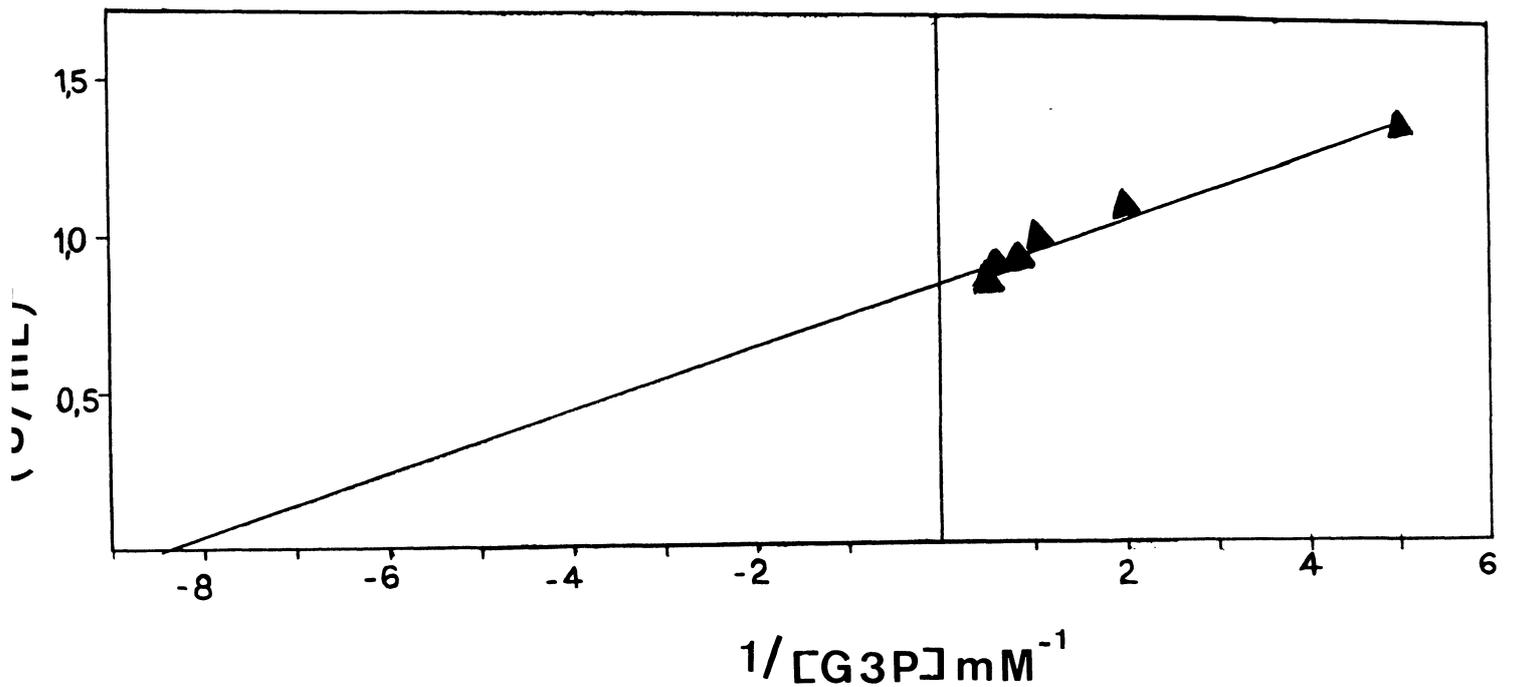
O sistema de incubação continha em um volume final de 1 mL: 13 μ g de enzima, tampão Tris-HCl (pH 8,4), contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, NAD^+ 1 mM, G3P 1 mM e quantidades variáveis de arseniato de sódio.

FIGURA 18 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO NAD⁺ SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS BHK-21.



O sistema de incubação continha em um volume final de 1 mL: 13 μg de proteína, tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,4) contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, G3P, arseniato de sódio 30 mM e quantidades variáveis de NAD⁺. Km para o NAD⁺ 0,05 mM.

FIGURA 19 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO (G3P) SOBRE A
ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS BHK-21.



O sistema de incubação continha, em um volume final de 1 mL: 13 μg de enzima, tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,4), contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, NAD^+ 1 mM, arseniato de sódio 30 mM e quantidades variáveis de G3P. K_m para o G3P 0,12 mM.

4- DISCUSSÃO FINAL

Neste trabalho, as GPDHs de origem renal (rim de hamster e células BHK-21) foram purificadas e algumas de suas propriedades cinéticas estudadas, comparativamente às enzimas isoladas de outras fontes. As GPDHs foram purificadas por dois fracionamentos sucessivos com sulfato de amônio. A última etapa, que corresponde a 90% fornece a enzima. É interessante notar que todas as GPDHs citadas na literatura têm comportamento semelhante, o que sugere similaridade na estrutura geral destas enzimas. Embora o crescimento de células BHK tivesse sido feito em grande escala (5,5L) a quantidade de proteínas obtidas no extrato bruto (65mg) não permitiu prosseguimento no processo de purificação, sendo portanto os estudos cinéticos básicos realizados com a fração de sulfato de amônio. A GPDH de rim foi submetida à posterior passagem pela coluna de DEAE-Sephadex A-50.

A baixa concentração de proteínas no extrato bruto de rim de hamster, pode ter sido, um dos fatores responsáveis pela baixa estabilidade da enzima que, quando purificada à homogeneidade, perdeu 90% de sua atividade após 15 dias. Outro fator supostamente possível, seria um baixo conteúdo em NAD^+ ligado à GPDH de tecido renal, como sugerido por DEAL Jr., (1969) e KREBS et al, (1979) para a enzima de levedura. Segundo os autores, além da sequência de aminoácidos seria necessário o coenzima ligado para o correto dobramento dos polipeptídeos. Por outro lado, GANTER & PLÜKTHUN, (1990), mostraram que a troca de uma glicina por uma alanina na região central de uma subunidade da GPDH de músculo de galinha, aumentou fortemente a estabilidade da enzima, fato este que pode sugerir uma possível diferença em um ou mais aminoácidos na GPDH de rim em trechos importantes da enzima conduzindo a este comportamento.

Os resultados das análises cinéticas obtidos neste trabalho mostram que as GPDHs de origem renal são semelhantes à enzima proveniente de outras fontes. Aspectos semelhantes por exemplo, são os valores de K_m para o G3P e o NAD^+ , bem como valores de pH ótimo e concentração de arseniato para a atividade das enzimas.

O valor da atividade específica obtido para o extrato bruto de rim de hamster (0,9) foi semelhante ao encontrado para as enzimas de outras fontes (1,0) (VIEIRA et al, 1983; BARBOSA & NAKANO, 1987). Já o valor da atividade específica encontrado para o extrato bruto de células

BHK-21 (0,2) foi mais compatível com o descrito para células HeLa (0,4) por NAKANO et al, (1992), talvez devido às alterações metabólicas das células cultivadas em relação aos tecidos de origem. A alta atividade específica encontrada no extrato bruto de tecidos normais, é explicada pelo fato de que em alguns tecidos, como o muscular, a GPDH constitui até 10% da proteína total solúvel (CORI et al, 1948). O fato da GPDH apresentar atividade específica relativamente alta não justificaria, portanto, sua existência em tão altas concentrações. Entretanto, foi demonstrado por CORI et al, (1948) que em pHs baixos encontrados nas células musculares, a atividade catalítica da GPDH é somente uma fração de sua atividade máxima em pHs altos. Isto poderia explicar a abundância desta enzima no músculo (YANG & DEAL Jr., 1969). Considerando as informações da literatura, pode-se sugerir que a atividade da GPDH esteja regulada pelo pH. Alterações transitórias do pH intracelular poderiam estar associadas às alterações na atividade desta enzima, cujo pH ótimo é bastante alcalino.

RAPKINE, (1938) relatou pela primeira vez a importância dos grupos -SH da GPDH de músculo de coelho em estudos de inibição por ácido iodoacético e CuO_2 e posterior reversão da atividade com H_2S , cisteína e glutation reduzido. O ácido iodoacético reage com outros grupos além do -SH, mas a velocidade de sua reação é muito maior, com os grupos tiólicos conferindo a especificidade. O mesmo acontece em relação ao CuO_2 , sendo que a única diferença resulta em que a enzima completamente inativada pelo reagente pode ser totalmente reativada pelo H_2S enquanto que a inativação pelo ácido iodoacético é irreversível. A GPDH de rim de hamster semelhante às enzimas das demais fontes foi totalmente inibida pelos íons Cu^{++} , Hg^{++} e Cd^{++} . Segundo WEBB, (1966) a inibição por íons metálicos ocorreria devido à formação de mercaptídeos.

No presente trabalho entre os inibidores de grupos -SH foram utilizados três classes de reagentes: os alquilantes, iodoacetamida e N-etilmaleimida; o oxidante, 2-cloro-4-aminobenzoato e os formadores de mercaptídeos, p-cloromercuribenzoato e p-hidroximercuribenzoato. Os resultados mostraram que os alquilantes inibiram totalmente a atividade da enzima que não foi revertida em presença do agente redutor em excesso (5 mM). O mecanismo dessa reação irreversível envolve a formação de uma ligação covalente com os grupos -SH da enzima, não quebrada pelo agente redutor.

O agente oxidante 2-cloro-4-aminobenzoato inibiu 90% da atividade da GPDH de rim de hamster, mas a adição do agente redutor reverteu parcialmente a inibição. O mecanismo de

reação seria a formação de pontes dissulfeto intramolecular que poderiam ser quebradas em presença do agente redutor desde que não houvesse muita demora na sua adição (VELICK, 1953).

Os reagentes formadores de mercaptídeos como o p-CMB e p-HMB inibiram totalmente a atividade enzimática, mas com recuperação parcial após adição do agente redutor. Recuperação total da atividade foi relatada na literatura para as GPDHs de músculo de coelho (VELICK, 1953) levedura (KREBS et al 1953), Caiman sp (VIEIRA et al, 1983). Embora os resultados na recuperação da atividade não tenham sido iguais não há reflexo de que o mecanismo de ação dos agentes inibidores tenha sido diferente. É possível que além dos grupos -SH importantes para a atividade da enzima os reagentes tenham também modificado outros grupos funcionais importantes na manutenção da conformação tridimensional da proteína (VELICK, 1953).

Outro parâmetro estudado com a GPDH de rim de hamster foi a inibição pelo NADH, produto da reação, inibidor competitivo em relação ao NAD^+ . O K_i determinado (0,02 mM) foi da mesma ordem da grandeza que os relatados para as demais fontes da enzima. Segundo CARR et al, (1965) o NADH formado modifica a conformação da GPDH, expondo os grupos -SH que ficam suscetíveis à oxidação pelo oxigênio molecular.

No presente trabalho foi estudada a inibição da enzima de rim por nucleotídeos. O significado fisiológico dessas inibições é ainda controverso. Embora *in vitro*, nucleotídeos como ADP, AMP e AMPc sejam inibidores, sua significância biológica é menor uma vez que os níveis celulares destes inibidores não são suficientes para causar inibições. Somente o ATP estaria em concentração celular suficiente para causar alguma inibição (YANG & DEAL Jr., 1969; HARRIS & WATERS, 1976). Em relação à GPDH de rim, o ATP mostrou ser inibidor competitivo com relação ao NAD^+ . O mecanismo de reação desta inibição seria uma repulsão eletrostática entre os grupos fosfato carregados negativamente e os grupos carregados negativamente do sítio ativo da enzima, que ocasionariam mudanças na conformação da proteína-enzima com conseqüente dissociação. A inibição causada pelo ATP em concentrações fisiológicas é dependente de pH, sendo 37% em pH 6,8, 67% em pH 7,4 e 20% em pH 8,1. Explicaria em parte os altos níveis da GPDH no músculo, protegeria contra a acidez excessiva pela produção de ácido láctico, limitaria o fluxo glicolítico máximo e modificaria o turnover da enzima. CONSTANTINIDES & DEAL Jr., (1969) e YANG & DEAL Jr. (1969) relataram que os nucleotídeos de adenina inibem a desidrogenase competindo com o NAD^+ ou dissociando as subunidades do tetrâmero. O mecanismo de inibição

foi depois elucidado por FRANCIS et al, (1971) que examinaram os efeitos de adenina nucleotídeos nas etapas individuais na catálise e em outras funções da enzima como atividades de esterase e fosfatase. Foi relatado que ATP e ADP não só inibem a ligação ao [^{14}C] NAD^+ como também bloqueia a formação do complexo enzima-substrato e do produto fosforilado de alta energia.

No presente trabalho, em presença de concentrações crescentes dos nucleotídeos o AMPc mostrou ser o mais potente inibidor da atividade enzimática.

Experimentos de YANG & DEAL Jr., (1969) com a GPDH de levedura e compostos de adenina como ATP, ADP, AMP e adenosina mostraram que a ligação 5' da adenosina não apresenta efeito na ligação do sítio do NAD^+ . Pelos dados de inibição obtidos com UDP, CDP e CMP sobre a GPDH de rim de hamster nossos resultados concordam com os de YANG & DEAL Jr., (1969) quando sugeriram que a especificidade era maior pela base adenina.

Alguns estudos de sequenciamento de aminoácidos além de outras análises da estrutura química da enzima seriam dados importantes para o esclarecimento do comportamento da GPDH de rim e de células renais cultivadas.

5- CONCLUSÕES

- 5.1 A GPDH de rim hamster foi purificada 155 vezes com um rendimento de 17% e mostrou ser homogênea por eletroforese em gel de poliacrilanida.
- 5.2 A enzima purificada de rim apresentou perda de cerca de 90% de atividade no período de duas semanas quando armazenada a 4⁰C.
- 5.3. O pH ótimo encontrado para a atividade da enzima de rim em tampão Tris-HCl foi 8,2.
- 5.4. A GPDH de rim é ativada pelo arseniato, sendo 40 mM a concentração ótima para a ativação.
- 5.5. A concentração ideal de 2-mercaptoetanol para a atividade enzimática da GPDH de rim foi de 1 mM.
- 5.6. Os valores de Km para a GPDH de rim foram de 0,05 mM para o NAD⁺ e 0,12 mM para o G3P em pH 8,2 e a 25⁰C.
- 5.7. O NADH é inibidor competitivo em relação ao NAD⁺ sendo encontrado um valor de Ki de 0,02 mM para a GPDH de rim.
- 5.8. ATP, ADP, AMP e AMPc são inibidores competitivos com relação ao NAD⁺ sendo encontrados Kis de 1,20 mM; 0,65 mM; 0,50 mM e 0,21 mM respectivamente, para a GPDH de rim.
- 5.9. Nucleotídeos outros como CDP, CMP e UDP inibiram a atividade da GPDH de rim, levando à perda de 25, 30 e 50% da atividade enzimática respectivamente.

- 5.10 Dentre os nucleotídeos, os de adenina se comportaram como inibidores mais potentes levando à perdas de atividade maiores conforme o aumento de suas concentrações no sistema de incubação.
- 5.11 Entre os nucleotídeos ensaiados, o CDP foi o inibidor menos potente e o AMPc o que levou à inibição mais acentuada.
- 5.12 Os sais cloreto de cálcio e cloreto de cádmio 1 mM inibiram aproximadamente 60 e 70% respectivamente a atividade da GPDH de rim.
- 5.13 Os sais cloreto de magnésio e cloreto de manganês 1 mM causaram um leve aumento na atividade da GPDH de rim.
- 5.14 O cloreto de cobre e cloreto de mercúrio 1 mM inibiram totalmente a enzima.
- 5.15 2-Cloro-4-aminobenzoato 0,10 mM, iodoacetamida 0,10 mM, N-etilmaleimida 0,10 mM, p-cloromercuribenzoato 0,01 mM e p-hidroximercuribenzoato 0,01 mM reagiram com os grupamentos sulfidrílica da enzima reduzindo 90% de sua atividade no caso do primeiro e inibindo totalmente a enzima no caso dos demais.
- 5.16 Após adição de 2-mercaptoetanol 5 mM ao sistema contendo os reagentes sulfidrílicos, ocorreu recuperação parcial da atividade enzimática no caso de três reagentes: 2-cloro-4-aminobenzoato, p-cloromercuribenzoato e p-hidroximercuribenzoato; com os demais a GPDH de rim permaneceu inativa.
- 5.17 A diluição da enzima (1:1) em tampão Tris-HCl, produz um aumento superior a 100% na atividade da GPDH de rim de hamster num período de 48h.
- 5.18 A GPDH de células BHK-21 foi purificada 21 vezes com um rendimento de 17,5%.

- 5.19 Após etapa de saturação até 90% com sulfato de amônio, a enzima perdeu 65% da atividade quando dialisada por 12 h. contra tampão Tris-HCl.
- 5.20 O pH ótimo encontrado para a atividade da GPDH de células BHK-21 foi de 8,4.
- 5.21 A GPDH de células BHK-21 é ativada pelo arseniato de sódio sendo 30 mM a concentração ótima para a sua ativação.
- 5.22 Os valores de Km encontrados para a GPDH de células BHK-21 foram de 0,05 mM para o NAD⁺ e 0,12 mM para o G3P em pH 8,4.
- 5.23 As GPDHs de célula BHK-21 e de rim de hamster mostraram semelhanças em suas propriedades físico-químicas e não demonstraram diferenças significativas em relação às de outras fontes já descritas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ABSHER, M. ; WOODCOCK-MITCHELL, J. ; BALDOR, L.; WARSHAW, D. Characterization of vascular smooth-muscle cell phenotype in long-term culture. In Vitro Cell. Dev. Biol., Rockville, v.25, p. 183-192, 1989.
- 2- ADAMS, M. J. ; Mc PHERSON Jr. , A. ; ROSSMANN, M. G. ; SCHEVITZ, R. W. ; WONACOTT, A. J. The structure of the nicotinamide-adenine dinucleotide coenzyme when bound to lactate dehydrogenase. J. Mol. Biol., London, v.51, p. 31-38, 1970.
- 3- AITHAL, H. N.; WALSH-REITZ, M. M.; TOBACK, F. G. Appearance of a cytosolic protein that stimulates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity during initiation of renal epithelial cell growth. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Whashington, v. 80 , p. 2941-2945, 1983.
- 4- ----- . Regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by a cytosolic protein. Am. J. Physiol., Bethesda, v. 249, C111-C116, 1985.
- 5- AITHAL, H. N. ; WALSH-REITZ, M. M. ; KARTHA, S. ; GLUCK, S. L. ; FRANKLIN, W. A. ; KNIGE, K. M. ; TOBACK, F. G. Kinetics of a novel cytosolic protein during the onset of renal epithelial cell growth. Am. J. Physiol., Bethesda, v. 255, F868-F873, 1988.
- 6- ALLISON, W. S. ; KAPLAN, N. O. The comparative enzymology of triosephosphate dehydrogenase. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 239, p. 2140-2152, 1964.
- 7- AMELUXEN, R. E. Some chemical and physical properpies of thermostable glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Bacillus stearothermophilus. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 139, p. 24-32, 1967.

- 8- AMELUXEN, R. E. ; GRISOLIA, 3. The mechanism of triosephosphate dehydrogenase inactivation by reduced diphosphopyridine nucleotide. J. Biol. Chem. , Baltimore, v. 237, p. 3240-3244, 1962.
- 9- AMELUXEN, R. E.; NOELKEN, M.; SINGLETON Jr.; R. Studies on the subunit structure of thermostable glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Bacillus stearothermophilus. Arch. Biochem. Biophys., Duluth, v. 141, p. 447-455, 1970.
- 10- BARBOSA, V. ; NAKANO, M. Muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Anas sp. I. Purification and properties of the enzyme. Comp. Biochem. Physiol., Oxford, v. 88B , n .2, p. 563-568, 1987.
- 11- BUEHNER, M. ; FORD, G. C. ; MORAS, D. ; OLSEN, K. W. ; ROSMANN , M. G. D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: three -dimensional structure and evolutionary significance. Proc. Nat.Acad. Sci. USA., Whashington, v. 70, p. 3052-3054, 1973.
- 12- -----, Three-dimensional structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J. Mol. Biol., London, v. 90, p. 25-49, 1974.
- 13- BYERS, L.D. ; SHE, H. S. ALAIOFF. , A. Interaction of phosphate analogues with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry, Washington, v. 18, n. 12, p. 2471-2480, 1979.
- 14- CAPUTTO , R. ; DIXON , M. Crystallization and identity of the triose and triosephosphate dehydrogenase of muscle. Nature, London, v. 156, p. 630-631, 1945.
- 15- CARDON, J. W. ; BOYER, P. D. Subunit interaction in catalysis. Some experimental and theoretical approaches with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 257, p. 7615-7622, 1982.

- 16- CARLSON, C. W. ; BROSEMER, R. W. Comparative structural properties of insect triosephosphate dehydrogenase. Biochemistry, Washington, v. 10, p. 2113-2119, 1971.
- 17- CARR, D. O. ; AMELUXEN, R. ; GRISOLIA, S. Coenzyme binding to glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase after modification by substrate and coenzyme. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 110, p. 507-512, 1965.
- 18- COHEN, J. J. Is the function of renal papilla coupled exclusively to anaerobic pattern of metabolism? Am. J. Physiol., Bethesda, v. 236, p. 423-433, 1979
- 19- CONSTANTINIDES, S. M. 7 DEAL Jr., W. C. Reversible dissociation of tetrameric rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase into dimers on monomers by ATP. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 244, p. 5695-5702, 1969..
- 20- CORI, G. T.; SLEIN, M. W.; CORI, C. F. Isolation and crystallization of D-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from rabbit muscle . J. Biol. Chem., Baltimore, v. 159, p. 565-566, 1945.
- 21- ----- Crystalline D-glyceraldehyde-3-phosphate from rabbit muscle. J. Biol. Chem. , Baltimore, v.173, p. 605-618, 1948.
- 22- CRABB, J. W.; MURDOCK, A. L.; AMELUXEN, R. E. Purification and characterization of thermolabile glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the facultative thermophile Bacillus coagulans KU. Biochemistry, Washington, v. 16, p. 4840-4847. 1977.
- 23- DAGHER, S. M. ; DEAL Jr. , W. C. Pig liver glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Purification, crystallization and characterization. Arch. Biochem. Biophys., Duluth, v. 179,p. 643-653, 1977.

- 24- D'ALESSIO, G. ; JOSSE, J. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; phosphoglycerate kinase and phosphoglyceromutase of Escherichia coli. J. Biol. Chem., Baltimore, v.246, p. 4319-4325,1971.
- 25- DEAL Jr., W. C. Metabolic control and structure of glycolytic enzymes. IV. Nicotinamide-adenine dinucleotide dependent in vitro reversal of dissociation and possible in vivo control of yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase synthesis. Biochemistry, Washington, v. 8, p. 2795-2805, 1969.
- 26- DEPARADE, M. P. ; GLÖGGER, K. ; TROMMER, W. E. Isolation and properties of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from a sturgeon from the Caspian Sea and its interaction with spin-labeled NAD⁺ derivatives. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 659, p. 422-433, 1981.
- 27- DUGGLEBBY, R. S. ; DENNIS, D. T. Nicotinamide adenine dinucleotide-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Pisum sativum. Purification and characterization. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 249, p. 162-166, 1974.
- 28- EBY, D. ; KIRTLEY, M. E. Isolation and characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes membranes. Arch. Biochem. Biophys. , Duluth, v. 198, p. 608-613, 1979.
- 29- ELODI, O. ; SZORENYI, E. Crystallization and comparative studies of D-3-phosphoglyceraldehyde dehydrogenase from muscle of various mammals. Acta Physiol. Acad. Sci. Hung., Budapest, v. 9, p. 339-350, 1965.
- 30- FAGER, G. ; HANSSON, G. K. ; GOWN, A. M. ; LARSON, D. M. ; SKALLI, O. , BONDJERS, G. Human arterial smooth-muscle cells in culture: inverse relationship between proliferation and expression of contractile proteins. In Vitro Cell & Dev. Biol., Rockville, v. 25, p. 502-511, 1989.

- 31- FERDINAND, W. The isolation and specific activity of rabbit-muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochem. J., London, v. 92, p. 578-585, 1964.
- 32- FERGUSSON, A. Higher-category systematics. In -----, Biochemical systematics and evolution. Glasgow: Blackie, 1980. p. 131-150.
- 33- FORT, P. ; MARTY, L. ; PIECHACZYK, M.; SABOUTY, S. E.; DANL, C.; JEANTEUR, P.; BLANCHARD, J. M. Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase multigenic family. Nucleic Acids Res., Oxon, v.13, p. 1431-1442, 1985.
- 34- FOUCAULT, G. ; NAKANO, M.; PUDDLES, J. Role of lysine-183 in D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. Eur. J. Biochem., Heidelberg, v. 83, p. 1113-123, 1978.
- 35- FRANCIS, S. H. ; MERIWETHER, B. P. ; PARK, J. H. Interaction between adenine nucleotides and 3-phosphoglyceraldehyde dehydrogenase. I. Inhibition of the hydrolysis of S-acetyl-enzyme intermediate in the esterase activity. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 246, p. 5427-5432, 1971
- 36- FRANK, E. D. ; TUSZYNSKI, P. ; WARDEN, L. Localization of vimentin and desmin in BHK-21/ C13 cells in baby hamster kidney. Exp. Cell Res., Duluth, v. 139, p. 235-247, 1982.
- 37- FRESHNEY, R. I. ; Culture of animals cells. A manual of basic techniques. 2 ed. New York: Alan R. Liss Inc., 1987, 397 p.
- 38- FUJITA, S. C. ; OSHIMA, T. ; IMAHORI, K. Purification and properties of D-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from an extreme thermophile, Thermus thermophilus, strain HB8. Eur. J. Biochem., Heidelberg, v. 64, p. 57-58, 1976.

- 39- FURFINE, C. S. ; VELICK, S. F. The acyl-enzyme intermediate and the kinetic mechanism of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase reaction. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 240, p. 844-855, 1965.
- 40- GANTER, C. ; PLÜCKTHUN, A. Glycine to alanine substitutions in the helices of glyceraldehyde-3-phosphate hydrogenase: Effects on stability. Biochemistry, Washington, v. 29, p. 9395-9402, 1990.
- 41- GREENE, F. C. ; FEENEY, R. E. Properties of muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from cold adapted Antarctic fish Dissostichus mansonii. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v.220 , p. 430-442, 1970.
- 42- GRISSON, F. E. ; KAHN, J. S. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Euglena gracilis. Arch. Biochem. Biophys., Duluth, v. 171, p. 444-458, 1975.
- 43- HALÁSZ, P. ; POLGAR, L. Lack of assymetry in the active sites of tetrameric D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase during alkylation in the crystalline state. FEBS Lett., Amsterdam, v. 143, n. 1, p. 93-95, 1982.
- 44- HARRIS, J. I. ; MERIWETHER, B. P.; PARK, J. H. Chemical nature of the catalytic sites in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Nature, London, v. 198, p. 154-157, 1963.
- 45- HARRIS, J; I. ; PERHAM, R. N. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. I. The protein chains in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from pig muscle. J. Mol. Biol., London, v. 13, p. 876-884, 1965.
- 46- ----- Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from pig muscle. Nature, London, v. 213, p. 1025-1028, 1968.

- 47- HARRIS, J. I. ; WATERS, M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. In: BOYER, P. D. ed. Oxidation-Reduction, PART C: Dehydrogenase (II) Oxidases (II) Hydrogen peroxidase cleavage. 3 ed. New York: Academic, 1976. p. 1-49. (The Enzymes, 13).
- 48- HARRIGAN, D. J. ; TRENTAM, D. R. Reactions of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with chromophoric thiol reagents. Biochem. J., London. v. 124, p. 573-580, 1971.
- 49- ----- Kinetic studies of the acylation of pig muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by 1-3-diphosphoglycerate and of proton uptake and release in the overall enzyme mechanism. Bio-chem. J., London, v. 135, p. 695-703, 1973.
- 50- HOCKING, J. O.; HARRIS, J. I. Purification by affinity chromatography of thermostable glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Thermus aquaticus. FEBS Lett., Amsterdam, v. 34, p. 280-284, 1973.
- 51- HOOD, W. ; CARR, N.G. A single glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase active with NAD and NADP in Anabaena variabilis. Biochem. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 146, p. 309-311, 1967.
- 52- HORECKER, B. L. ; KORNBERG, A. The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 175, p. 385 - 390, 1948.
- 53- JAENICKE, R. ; KREBS, H. ; RUDOLF, R. ; WOENCKHAUS, C. Rate enhancement of reconstitution of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by a covalent bound coenzyme analog. Proc. Nat. Acad. Sci. USA , Washington, v. 77, n. 4, p. 1966-1969, 1980.

- 54- JONES, G. M. T. ; HARRIS, J. I. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: aminoacid sequence of enzyme from baker's yeast. FEBS Lett, Amsterdam, v. 22, p. 185-189, 1972.
- 55- KOCHMAN, M.; RUTTER, W. J. The similarity of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isolated from rabbit brain and muscle. Biochemistry, Washington, v. 7, p. 1671-1677, 1968.
- 56- KOLB, E. ; HARRIS, J. I. Purification and properties of glycolytic cycle enzymes from coelacanth (Latimeria chalumnae) muscle. Biochem.J., London, v. 130, p. 26, 1972.
- 57- KREBS, E. G. ; RAFTER, G. W. ; JUNCOS, J. M. Yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. II Yeast protein. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 200, p. 479-492, 1953,
- 58- KREBS, H. A. Renal Gluconeogenesis. Adv. Enzyme Regul., Oxford. v. 1, p. 385-401, 1963.
- 59- KREBS, H. A. ; LUND, P. Formation of glucose from hexoses, pentoses, polyols and related substances in kidney cortex. Biochem. J., London, v. 98, p. 210-214, 1966.
- 60- KREBS, H. ; RUDOLPH, R. ; JAENICKE, R. Influence of coenzyme on the refolding and reassociation in vitro of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from yeast. Eur. J. Biochem Heidelberg, v. 100, p. 359-364, 1979.
- 61- KRUSTEVA, N. ; GEORGIEVA, M. ; TOMOYA, N. Purification, molecular weight and subunit structure of NAD (NADP) dependent GPDH from Chlorella. Biokhimiya, v. 46, p. 1740-1747, 1981.

- 62- LAMBERT, J. M. ; PERHAM, R. N. A comparison of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from ox muscle and liver. FEBS Lett., Amsterdam, v. 40, p. 305-308, 1974.
- 63- LEE, J. B. ; VANCE, V. K. ; CAHILL Jr. ; G. F. Metabolism of C¹⁴-labeled substrates by rabbit kidney cortex and medulla. Am. J. Physiol., Bethesda, v. 203, n. 1, p. 27-36, 1962.
- 64- LINEWEAVER, H. ; BURK, D. The determination of the enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc., Washington, v. 56, p. 658-666, 1934.
- 65- LOWRY, O. H. ; ROSEBROUGHT, N. J. ; FARR, A. L. ; RANDALL, R. J. Protein measurements with the Folin phenol reagents. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 193, p. 265-275. 1951.
- 66- MAC PHERSON, I., Characteristics of hamster cell clone transformed by polyoma virus. J. Nat. Cancer Res., Washington, v. 30, p. 795-815, 1963.
- 67- MAC PHERSON, I. ; STOCKER, M. Polyoma transformation of hamster cell clones: an investigation of genetic facts affecting cell competence. Virology, Duluth, v. 16, p. 149-151, 1962.
- 68- MASSEY, V. Studies on fumarase. 4 The effects of inhibitors on fumarase activity. Biochem. J., London, v. 55 p. 172-177, 1953.
- 69- MELANDRI, B. A. ; PUPILLO, P. ; BACCARINI-MELANDRI, A. D-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in photosynthetic cells. I. The reversible light-induced activation in vivo of NADP dependent enzyme and its relationship to NAD-dependent activities. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v, 220, p. 178-189, 1970.

- 70- NAGRADOVA, N. K. SAFRANOVA, M. I.; BARATOVA, L. A. Structural studies on glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from rat skeletal muscle. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 532, p. 1-5, 1978.
- 71- NAKANO, M. ; ESTEVES, R. P. ; BRUEL, S. L. Muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase from Anas sp.2. New data on enzyme characterization. Comp. Biochem. Physiol., Oxford, v. 98B, n. 1, p. 29-32, 1991.
- 72- NAKANO, M.; FUNAYAMA, S. ;OLIVEIRA, M. B. M. ; BRUEL, S.L.; GOMES, E. M. D-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from HeLa cells. I. Purification and properties of the enzyme. Comp. Biochem. Physiol., Oxford, v. 102-B, n.4 p.873-877, 1992.
- 73- OGUCHI, M. , MERIWETHER, B. P. ; PARK. J. H. Interaction between adenosine triphosphate and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. III. Mechanism of action and metabolic control of the enzyme under simulated in vivo conditions. J. Biol. Chem. Baltimore, v. 248, p. 5562-570, 1973.
- 74- -----Regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by phosphocreatine and adenosine triphosphate. IV. Factors affecting in vivo control of enzymatic activity. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 248, p. 5571-5576, 1973.
- 75- OHKUBO, M. ; NAKAMURA. Y.; TOMUNADA, K.; SAKIYAMA, S. Similarity between glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and a 37,000 dalton protein which is abundantly expressed in human lung cancers. JPN. J. Cancer Res., Tokyo, v. 71, p. 554-559, 1986.
- 76- ORSI, B. A. ; CLELAND, W. W. Inhibition and kinetic mechanism of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry, Washington, v. 11, p. 102-109, 1972.

- 77- PAUL, P. L. Tumor mitochondria and bioenergetics of cancer cells. Prog. Exp. Tumor Inst., Basel, v. 22, p. 190-274, 1973.
- 78- PHILLIPS, H. J. Dye exclusion tests for cell viability. In: KRUSE, M. K. Tissue Culture, methods and applications. New York: A.P., 1973. p. 406-408.
- 79- PIECHACZYK, M. ; BLANCHARD, J. M. ; MARTY, L.; DANL, C.; PANABIERES, F.; SABOUTY, S. E. ; FORT, P. ; JEANTEUR, P. Post-transcriptional regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in rat tissue. Nucleic Acids Res., Oxon, v.12, p.6951-6953, 1984.
- 80- RAPKINE, L. Sulphydryl groups and oxido-reduction. Biochem. J., London, v. 32, p. 1729-1739, 1938.
- 81- RENAL substrate metabolism and renal function. In: RENAL PHYSIOLOGY: Section 8. Washington: American Physiological Society, 1973. p. 961-1001. (Handbook of Physiology).
- 82- ROSSMANN, M. G. ; ADAMS, M. J.; BUEHNER, M.; FORD, G.C.; HACKERT, M. L.; LILJAS, A.; RAO, S. T.; BANSZAK, L. J.; HILL, E.; TSEKNOGLOU, D.; WEBB, L. Molecular symmetry axes and subunit interfaces in certain dehydrogenases. J. Mol. Biol., London, v. 76, p. 533-537, 1973.
- 83- SALEEMUDDIN, M. ; ZIMMERMANN, U, Use of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-depleted human erythrocyte ghosts as specific high affinity adsorbents for the purification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from various tissues. Biochim. Biophys. Acta. Amsterdam, v. 527, p. 182-192, 1978.

- 84- SCHULMAN, M. D. ; GIBBS, M. D-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of higher plants. Plant Physiol., Bethesda, v. 43, p. 1805-1812, 1968.
- 85- SEGAL, H. L. ; BOYER, P. D. The role of sulphhydryl groups in the activity of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J. Biol. Chem. Baltimore, v. 204, p. 265-281, 1953.
- 86- SIGMA CHEMICAL COMPANY. Beta-Diphosphopyridine nucleotide assay data. St. Louis, (s.d). 1p.
- 87- SPERANZA, M. L. ; GOZZER, C. Purification and properties of NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from spinach leaves. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. 522, p. 32-42, 1978.
- 88- STARGER, J. M. ; GOLDMAN, R. D. Isolation and preliminary characterization of 10 nm filaments from baby hamster kidney (BHK-21) cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., Washington, v. 74, p. 2422-2426, 1977.
- 89- STEINERT ; P. M. ; IDLER, W. W. ; GOLDMAN, R. D. Intermediate filaments of baby hamster kidney (BHK-21) cells and bovine epidermal keratinocytes have similar ultrastructures and subunit domain structures. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., Washington, v. 77, p. 4534-4538, 1980.
- 90- SUZUKI, K. ; HARRIS, J. I. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Bacillus stearothermophilus. FEBS Lett., Amsterdam, v. 13, p. 217-220, 1971.
- 91- SUZUKI, K.; IMAHORI, K. Isolation and some properties of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from vegetative cells of Bacillus cereus. J. Biochem. Tokyo, v. 73, p. 97-106, 1973.

- 92- TRENTHAM, D. R. Aspects of chemistry of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochem. J., London, v. 109, p. 603-612, 1968.
- 93- -----. Reactions of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase facilitated by oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide. Biochem. J., London, v. 122, p. 59-69, 1971.
- 94- -----. Rate-determining process and the number of simultaneously active sites of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochem. J., London, v. 122, p. 71-77, 1971.
- 95- TUCKER, D. ; GRISOLIA, S. Inactivation of muscle triosephosphate dehydrogenase by reduced diphosphopyridine nucleotide at physiological concentrations. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 237, p. 1068-1073, 1962.
- 96- TUSZYNSKI, G. P. ; FRANK, E. D. ; DAMSKY, C. H.; BUCK, C. A.; WARREN, L. The detection of smooth muscle desmin-like protein in BHK 21/C 13 fibroblasts. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 254, p. 6138-6143, 1979.
- 97- VELICK, S. F. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from muscle. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 203, p. 401-415, 1953.
- 98- VELICK, S. F. ; FURFINE, C. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. In: BOYER, P. D.; LARDY, H. ; MYRBACK, K. ed. Oxidation and Reduction; PART A: Nicotinamide Nucleotide-linked enzymes, Flavin nucleotide-linked enzymes. 2 ed. New York: Academic, 1963. p. 243-273.(The Enzymes, 7)
- 99- VELTRI, R. W. ; MENGOLI, H. F. ; MAXIM, P. E. ; WESTFALL, S. ; GOPO, J. M. ; HUANG, C. W. ; SPRINKLE, P. M. Isolation and identification of human lung tumor-associated antigens. Cancer Res., Baltimore, v. 37, p. 1313-1322, 1977.

- 100- VIEIRA, M. M. ; VEIGA, L. A. ; NAKANO, M. Muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Caiman sp. I. Purification and properties of the enzyme. Comp. Biochem. Physiol., Oxford, v. 743, n. 4, p. 781-790, 1983.
- 101- YANG, S. T. ; DEAL Jr. , W. C. Metabolic control and structure of glycolytic enzymes. VI. Competitive inhibition of yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by cyclic adenosine-monophosphate, adenosine triphosphate, and other adenine-containing compounds. Biochemistry, Washington, v. 8, n. 7, p. 2806-2813, 1969.
- 102- YONUSCHOT, G. R.; ORTWERTH, B. J.; KOEPPE, O. J. Purification and properties of a nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-requiring glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from spinach leaves. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 108, p. 549-565, 1970.
- 103- WALDMAN, R. H. ; BURCH, H. B. Rapid method for study of enzyme distribution in rat kidney. Am. J. Physiol., Bethesda, v. 204, n. 5, p. 749-752, 1963.
- 104- WALKER, J. E. ; CARNE, A. F. ; RUNSWICK, M. J. ; BRIDGEN, J. ; HARRIS, J. I.; D-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Complete amino-acid sequence of the enzyme from Bacillus stearothermophilus. Eur. J. Biochem., Heidelberg, v. 108, n.2, p. 549-565, 1980.
- 105- WANG, C. S.; ALAUPOVIC, P. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human erythrocyte membranes. Kinetic mechanism and competitive substrate inhibition by glyceraldehyde-3-phosphate. Arch. Biochem. Biophys., Duluth, v. 205, p. 136-145, 1980.
- 106- WARBURG, O. ; CHRISTIAN, H. Isolierung und kristallisations des garungs ferments enolase. Biochem. Z., Brunswick, v. 310. p. 384-421, 1941.

- 107- WEBB, J. L. Iodoacetate and Iodoacetamide In: Enzyme and metabolic inhibitions. New York, Academic Press, 1966, v.3, p. 1-283.
- 108- WEBER, K. ; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecil sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem., Baltimore, v. 244, p. 4406-4412, 1969.