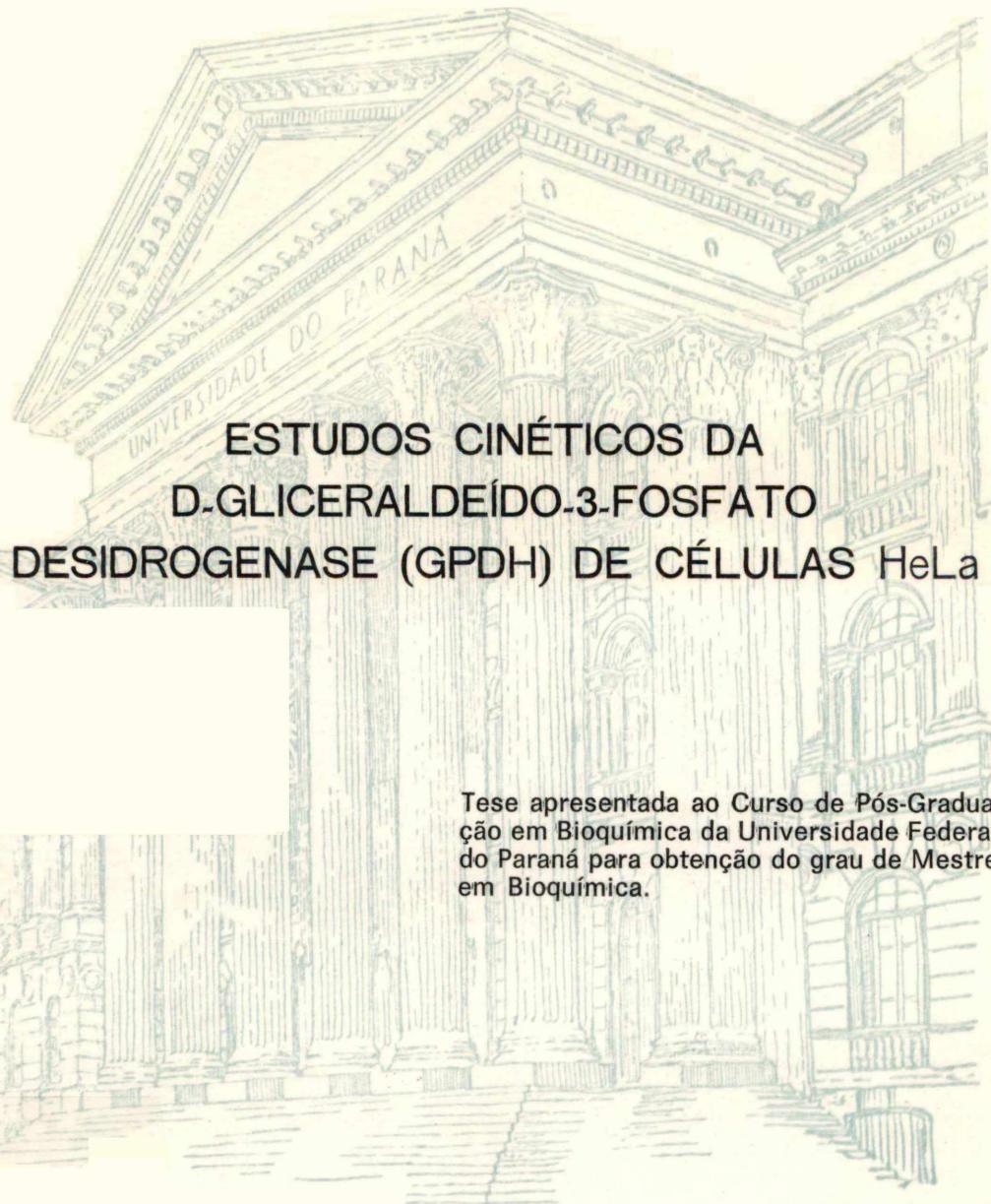


JULIANA MAURER MENESTRINA



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

CURITIBA

1993

ESTUDOS CINÉTICOS DA D-GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE
(GPDH) DE CÉLULAS HeLa

POR

JULIANA MAURER MENESTRINA

Tese aprovada como requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica no curso de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela banca examinadora formada pelas professoras:

Dra MOMOYO NAKANO

-orientadora-

Dra GLACI TEREZINHA ZANCAN

-banca-

Dra LIU UN RIGO

-banca-

TESE ORIENTADA PELA PROFESSORA DRA MOMOYO NAKANO

HOMENAGENS

Ao meu pai, João Carlos, "*in memoriam*", pelo exemplo dado em vida.

À minha mãe, Eunice, por sua dedicação e seu afeto.

E em especial ao meu marido, Sérgio, pelo amor, apoio e incentivo que me tem dado.

AGRADECIMENTOS

Especialmente, à professora Dra MOMOYO NAKANO, orientadora desta tese, trabalhar com ela só fez aumentar a admiração, a amizade e a estima que sinto por ela.

Aos professores Dr SHIGEHIRO FUNAYAMA e Dra MARIA BENIGNA MARTINELLI de OLIVEIRA, que participaram deste trabalho, obrigada pela amizade, colaboração e apoio.

Ao professor Dr AGUINALDO NASCIMENTO pelo grande auxílio na obtenção dos gráficos pelo computador.

À amiga e professora SUNG LIE BRUEL, pelo apoio e incentivo que muito ajudaram neste trabalho.

À professora Dra GLACI TEREZINHA ZANCAN, pelo empréstimo de materiais e pela amizade.

À amiga, HELENA, pelo apoio e pela amizade sincera.

À LIDILENE e MIRTES, pelo auxílio e pela amizade.

Ao colega ROBERTO, pelo auxílio no cultivo celular e pela amizade.

À amiga, ELISA, pela colaboração e pela amizade sempre presente.

Ao Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), pela obtenção das células da linhagem HeLa.

Às bibliotecárias TELMA T. STRESSER e MARIZA KAMPFERT pela correção das referências bibliográficas.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Bioquímica da UFPr, que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.

À Coordenação de Pós-graduação em Bioquímica, pelo apoio e incentivo.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
ESQUEMAS.....	xi
RESUMO.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
2.1. REAGENTES.....	8
2.2 CULTIVO CELULAR.....	8
2.2.1. Células.....	8
2.2.2. Procedimentos de esterilização.....	8
2.2.2.a. Material de vidro e acessórios.....	8
2.2.2.b. Soluções e meio de cultura.....	9
2.2.3. Procedimentos de cultivo celular.....	10
2.2.3.a. Repique e coleta das células HeLa.....	10
2.2.3.b Contagem e determinação da viabilidade celular.....	10
2.3. PURIFICAÇÃO DA D-GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE CÉLULAS HeLa.....	11
2.4. MANUTENÇÃO DA ENZIMA.....	13
2.5. PREPARO E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO.....	13
2.6. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE NAD ⁺ e NADH.....	14
2.7. DOSAGEM DE PROTEÍNA.....	14
2.8. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GPDH.....	15
2.9. UNIDADE DE ENZIMA.....	15
2.10. ESTUDOS CINÉTICOS.....	15
2.10.1. Efeito do 2-mercaptopetanol e do ditioeritritol sobre a atividade da GPDH de células HeLa	15
2.10.2. Efeito dos íons metálicos divalentes sobre a atividade da GPDH de células HeLa	16
2.10.3. Efeito de inibidores de grupos-SH sobre a atividade da GPDH de células HeLa.....	16
2.10.4. Inibição da GPDH de células HeLa pelo ρ -hidroximercuribenzoato	16
2.10.5. Inibição da GPDH de células HeLa por nucleotídeos	17
2.10.6. Efeito do NADH e do G3P na estabilidade da GPDH de células HeLa, a 37°C.....	17
2.10.7. Efeito do EDTA sobre a inativação da GPDH de células HeLa pelo NADH	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
3.1. ESTABILIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa	20
3.2. EFEITO DO 2-MERCAPTOETANOL E DO DITIOERITRITOL SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa	21
3.3. EFEITO DOS ÍONS METÁLICOS DIVALENTES SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa.....	23
3.4. EFEITO DOS INIBIDORES DE GRUPOS-SH SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa.....	25
3.5. INIBIÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa PELO ρ -HIDROXIMERCURIBENZOATO	29
3.6. INIBIÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa PELO ADP, 5'-AMP e 3'-5'AMPc	31
3.7. COMPARAÇÃO DO EFEITO DOS NUCLEOTÍDEOS (ATP, ADP, 5'-AMP, 3'-5'AMPc, UDP, CDP E CMP) SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa	35
3.8. EFEITO DO NADH SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa, A 37°C, EM FUNÇÃO DO TEMPO	41
3.9. EFEITO DO EDTA SOBRE A INATIVAÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa PELO NADH, A 37°C	44
3.10. EFEITO DO G3P SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa, A 37°C, EM FUNÇÃO DO TEMPO	46
4. DISCUSSÃO FINAL.....	49
5. CONCLUSÕES.....	53
6. ANEXO.....	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	adenosina 5'-difosfato
5'-AMP	adenosina 5'-monofosfato
3'-5'AMPc	adenosina 3'-5'-monofosfato cíclico
atm	atmosfera
ATP	adenosina 5'-trifosfato
BSA	soro albumina bovina
CDP	citidina difosfato
ρ -CMB	ρ -cloromercuribenzoato
CMP	citidina monofosfato
DEAE	dietil amino etil
DNA	ácido desoxirribonucléico
D.O.	densidade ótica
DTE	ditioeritritol
EDTA	etileno diaminotetracetato-sal dissódico
F6P	frutose-6-fosfato
G3P	D-gliceraldeído-3-fosfato
GPDH	D-gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HCl	ácido clorídrico
ρ -HMB	ρ -hidroximercuribenzoato
Ki	constante de inibição
Km	constante de Michaelis-Menten
NaAsO_4^{-2}	arsenato de sódio
NAD^+	β -nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	β -nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADP	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	sulfato de amônio
PBS	solução salina tamponada

R5P	ribose-5-fosfato
RNA	ácido ribonucléico
SDS	dodecil sulfato de sódio
STV	solução tripsina-verseno
Tris	Tris-hidroximetil amino metano
UDP	uridina difosfato

LISTA DE TABELAS

Tabela I - FONTES DE GPDHs.....	3
Tabela II - EFEITO DOS ÍONS METÁLICOS DIVALENTES SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa.....	24
Tabela III- EFEITO DOS INIBIDORES DE GRUPOS-SH SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa.....	27
Tabela IV - COMPARAÇÃO DO EFEITO DOS NUCLEOTÍDEOS SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa.....	40
Tabela V - EFEITO DO EDTA SOBRE A INATIVAÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa PELO NADH A 37°C, APÓS 6 HORAS DE INCUBAÇÃO.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - EFEITO DO 2-MERCAPTOETANOL E DO DITIOERITRITOL SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa.....	22
Figura 2a - MECANISMO DE REAÇÃO POR REAGENTES ALQUILANTES.....	28
Figura 2b - MECANISMO DE REAÇÃO POR REAGENTES OXIDANTES.....	28
Figura 2c - MECANISMO DE REAÇÃO POR REAGENTES FORMADORES DE MERCAPTÍDEOS.....	28
Figura 3a - INIBIÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa PELO ρ-HIDROXI-MERCURIBENZOATO	30
Figura 3b - MECANISMO DE REAÇÃO DA CYS-149 DA GPDH DE PORCO COM O ρ-HMB.....	29
Figura 4a - INIBIÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa PELO ADP	32
Figura 4b - INIBIÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa PELO ADP	55
Figura 5a - INIBIÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa PELO 5'-AMP.....	33
Figura 5b - INIBIÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa PELO 5'-AMP.....	56
Figura 6a - INIBIÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa PELO 3'-5'AMPc	34
Figura 6b - INIBIÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa PELO 3'-5'AMPc	57
Figura 7 - EFEITO DO ATP, ADP, 5'-AMP E 3'-5'AMPc SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa.....	37
Figura 8 - COMPARAÇÃO DO EFEITO DOS NUCLEOSÍDEOS DIFOSFATO SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa	38
Figura 9 - COMPARAÇÃO DO EFEITO DOS NUCLEOSÍDEOS MONOFOSFATO SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa	39

Figura 10a- EFEITO DO NADH (0,05 mM) SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa, A 37°C, EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	42
Figura 10b- EFEITO DO NADH (0,5 mM) SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa, A 37°C, EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	43
Figura 11a- EFEITO DO G3P (0,05 mM) SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa, A 37°C, EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	47
Figura 11b- EFEITO DO G3P (0,5 mM) SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa, A 37°C, EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	48

ESQUEMAS

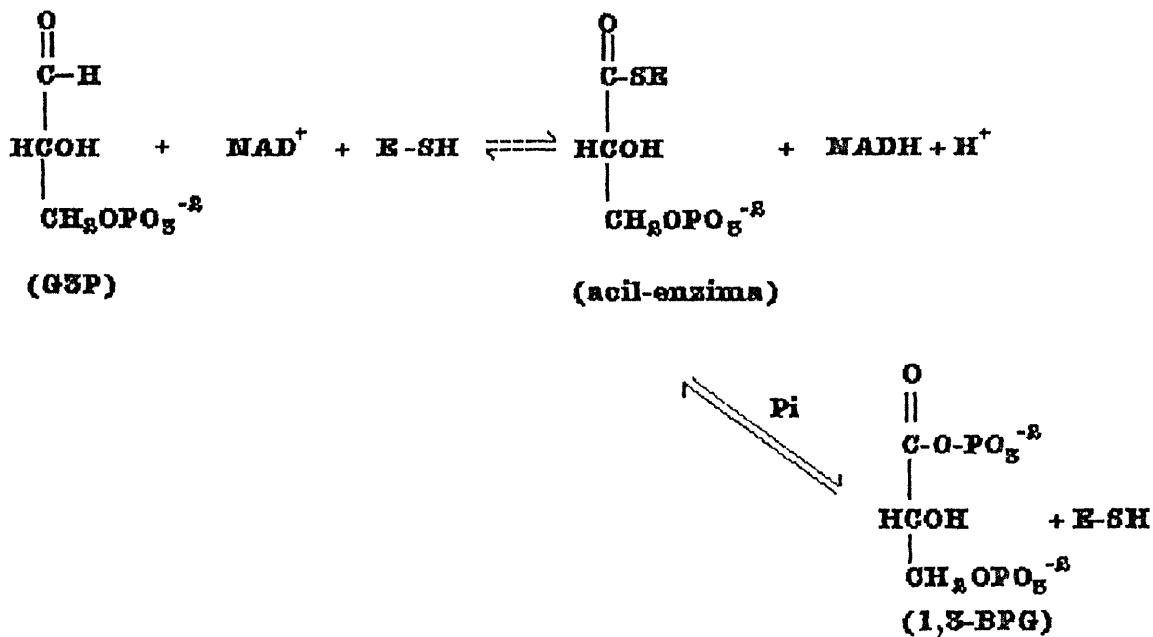
Esquema 1 - PURIFICAÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa.....	12
---	-----------

RESUMO

Pela importância da GPDH no metabolismo de carboidratos de células normais e tumorais e pelos poucos relatos na literatura sobre estudos cinéticos da enzima de fonte tumoral, foram realizados no presente trabalho alguns estudos cinéticos com a GPDH de células HeLa comparando os resultados com as de fontes normais já estudadas. A GPDH de células HeLa apresentou máxima ativação em presença de 2-mercaptopetanol ou ditioeritritol na concentração de 1 mM. A enzima foi totalmente inibida em presença de íons metálicos pesados como $HgCl_2$, $CuCl_2$ e $CdCl_2$ na concentração de 1 e 2 mM. Em relação aos inibidores de grupos-SH, a GPDH de células HeLa apresentou 100% de inibição na presença do ρ -CMB e do ρ -HMB [0,01 mM], e 80% de inibição na presença de iodoacetamida, N-etilmaleimida e 2-cloro 4-aminobenzoato [0,1 mM]. As inibições causadas pelo ρ -CMB e pelo ρ -HMB foram parcialmente revertidas por excesso de 2-mercaptopetanol (5 mM), porém as inibições por iodoacetamida e N-etilmaleimida foram irreversíveis. Os nucleotídeos ADP, 5'-AMP e 3'-5'AMPc inibem competitivamente a enzima em relação ao NAD^+ . Os K_i calculados pela relação de MASSEY, (1953) foram de 2,1, 1,0 e 0,6 mM para o ADP, 5'-AMP e 3'-5'AMPc, respectivamente. Dos nucleotídeos testados (ATP, ADP, 5'-AMP, 3'-5'AMPc, UDP, CDP e CMP) o mais potente inibidor da enzima foi o 3'-5'AMPc. A enzima [2,5 μ M] foi inativada quando incubada na presença de NADH ou G3P (0,05 e 0,5 mM), a 37°C. O 2-mercaptopetanol 1 mM protege a enzima da inativação pelo NADH e pelo G3P. O EDTA não afeta a estabilidade da enzima em relação à inativação pelo NADH. Em todos os estudos cinéticos realizados a GPDH de células HeLa apresentou comportamento semelhante ao das GPDHs de outras fontes já estudadas.

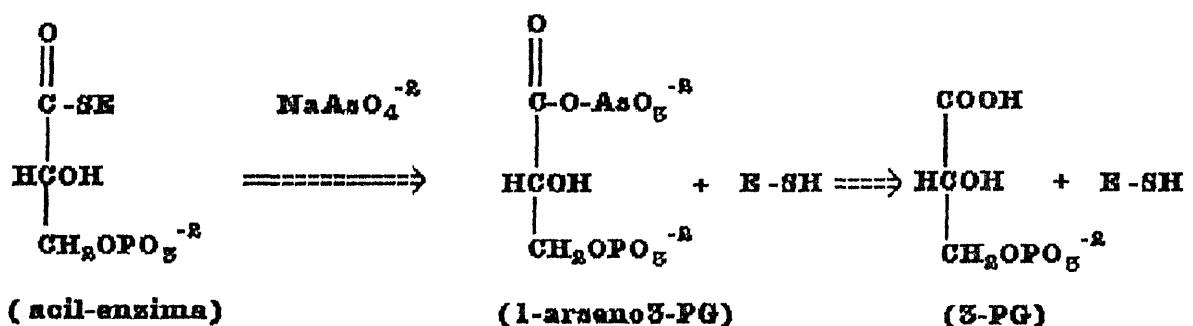
1. INTRODUÇÃO

A D-gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, (D-gliceraldeído-3-fosfato:NAD⁺ oxidoredutase), (E.C.1.2.1.12.), participa da via glicolítica e da gluconeogênese e catalisa reversivelmente a fosforilação oxidativa do D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-BPG), como mostrado abaixo:



Segundo FURFINE & VELICK, (1965), esta reação ocorre em duas etapas. Primeiramente, a enzima forma um complexo binário com o substrato (aldeído) formando a acil-enzima, com simultânea redução do NAD⁺. Na segunda etapa, a enzima é desacilada pelo fosfato, liberando o acil-fosfato.

Em estudos com a GPDH *in vitro*, o fosfato é freqüentemente substituído por seu análogo, o arseniato. A vantagem do método arsenolítico (FERDINAND, 1964) é que ele evita a inibição da GPDH pelo 1,3-bisfosfoglicerato (DUGGLEBY & DENNIS, 1982). A reação torna-se irreversível e o 1-arseno-3-fosfoglicerato é rápida e espontaneamente hidrolisado a 3-fosfoglicerato (3-PG), como mostra o esquema abaixo:



A GPDH é uma enzima tetramérica, com peso molecular aproximado de 144 kdaltons. Cada subunidade, com 36 kdaltons, possui cerca de 330 resíduos de aminoácidos. Uma molécula de NAD^+ está ligada a cada um dos monômeros (HARRIS & WATERS, 1976).

Foi isolada e cristalizada pela primeira vez por WARBURG & CHRISTIAN, (1939), a partir de levedura.

Está presente em abundância em muitos organismos (HARRIS & WATERS, 1976). Na Tabela I estão mostradas as várias fontes das quais a enzima já foi isolada. Segundo CORI et al, (1948), em músculo de coelho a GPDH constitui cerca de 10% do total de proteína solúvel e segundo KREBS et al, (1953), em levedura a GPDH constitui cerca de 5% do peso de células secas e 20% do total de proteína solúvel.

TABELA I : FONTES DE GPDHs

FONTES	REFERÊNCIAS
BACTÉRIAS	
<i>B. stearothermophilus</i>	AMELUNXEN, (1967) SUZUKI & HARRIS, (1971)
<i>Escherichia coli</i>	D'ALESSIO & JOSSE, (1971)
<i>Thermus aquaticus</i>	HOCKING & HARRIS, (1973)
<i>B. cereus</i>	SUZUKI & IMAHORI, (1973)
<i>Thermus thermophilus</i>	FUJITA et al, (1976)
LEVEDURA	KREBS et al, (1953)
ALGAS	
<i>Anabaena variabilis</i>	HOOD & CARR, (1967)
PLANTAS	SCHULMAN & GIBBS, (1968) MELANDRI et al, (1970) SPERANZA & GOZZER, (1978) DUGGLEBY & DENNIS, (1974)
PROTOZOÁRIOS	
<i>Euglena gracilis</i>	GRISSON & KAHN, (1975)
PLATYHELMINTES	
<i>Ascaris suun</i>	KOCHMAN et al, (1975)
INSETOS	CARLSON & BROSEMER, (1971)
CRUSTÁCEOS	
músculo de lagosta	ALLISON & KAPLAN, (1964)

PEIXES	
esturjão	ALLISON & KAPLAN, (1964)
peixe da Antártida	GREENE & FEENEY, (1970)
celacanto	KOLB & HARRIS, (1972)
RÉPTEIS	
<i>Caiman sp</i>	VIEIRA et al, (1983)
AVES	
galinha, peru e faisão	ALLISON & KAPLAN, (1964)
<i>Anas sp</i>	BARBOSA & NAKANO, (1987)
MAMÍFEROS	
músculo de coelho	CORI et al, (1945)
	CAPUTTO & DIXON, (1945)
porco, gato e cachorro	ELÖIDI & SZORENYI, (1965)
músculo de boi	ALLISON & KAPLAN, (1964)
figado de porco	DAGHER & DEAL Jr., (1977)
músculo de rato	NAGRADOVA et al, (1978)
eritrócitos	EBY & KIRTLEY, (1979)

Devido a sequência de aminoácidos da GPDH ser altamente conservada, ela é considerada uma proteína de evolução lenta (GOODMAN, 1976), podendo, portanto ser usada como instrumento para estudos filogenéticos. Comparando-se a sequência de aminoácidos das GPDHs que já foram sequenciadas, como a de lagosta (DAVIDSON et al, 1967), de levedura (JONES & HARRIS, 1972) e de músculo de porco (HARRIS & PERHAM, 1968), observa-se que 60% dos resíduos de aminoácidos ocorrem em posições idênticas entre as três espécies estudadas. Outro exemplo, que constata a conservação da estrutura primária da GPDH entre dois organismos filogeneticamente distantes como a lagosta e a bactéria *Thermus aquaticus* é a observação que 50% das sequências de aminoácidos são idênticas sendo que os resíduos que estão envolvidos na catálise e nos contatos inter-subunidades são mais conservados que os demais (HARRIS & WATERS, 1976).

Embora as subunidades da GPDH sejam quimicamente idênticas a afinidade pelo NAD⁺ difere entre as subunidades. Nas GPDHs de músculo (CONWAY & KOSHLAND, 1968; SEYDOUX et al, 1973) foi demonstrado que a afinidade de ligação do NAD⁺ diminui com o número de moléculas ligadas, fenômeno denominado cooperatividade negativa, sendo proposto o modelo de ajuste induzido postulado por KOSHLAND e colaboradores. Em contraste, a enzima de levedura apresenta cooperatividade positiva com relação a ligação do NAD⁺ (KIRSCHNER et al, 1966; COOK & KOSHLAND, 1970; KIRSCHNER et al, 1971; KIRSCHNER, 1971; ELLENRIEDER et al, 1972) podendo ser descrita pelo modelo combinado de MONOD et al, (1965).

O mecanismo de ação do tipo ping-pong originalmente proposto por SEGAL & BOYER, (1953) para a GPDH foi também descrito por TRENTHAM & HARRIGAN para a enzima de porco (TRENTHAM, 1968, 1971; HARRIGAN & TRENTHAM, 1971) e por DUGGLEBY & DENNIS, (1974) para a enzima de *Pisum sativum*. Diferentemente, para a enzima de coelho ORSI & CLELAND, (1972) propuseram o mecanismo do tipo ordenado, caracterizado pela adição sequencial de NAD⁺, aldeído e fosfato ou arseniato e a liberação do ácido precedendo à liberação do NADH. Estudos posteriores realizados por WANG & ALAUPOVIC, (1980) com a

GPDH de eritrócitos humanos reforçaram o mecanismo proposto por ORSI & CLELAND, (1972).

Apesar da GPDH ter sido isolada de várias fontes (Tabela I), até a década de 80 pouco se conhecia sobre a enzima de fonte tumoral.

OHKUBO et al, (1986a), estudando tecidos tumorais humanos, mostraram a presença abundante de uma proteína de 37 kdaltons quando comparado com tecidos normais. Através de posteriores estudos bioquímicos e imunológicos (OHKUBO et al, 1986b) foi constatada a similaridade desta proteína com a GPDH de coelho.

Utilizando células HeLa como modelo experimental de tumor *in vitro*, NAKANO et al, (1992), isolaram e purificaram a GPDH e ainda estudaram algumas propriedades cinéticas básicas da enzima. Considerando a GPDH como uma proteína marcadora de evolução, os autores acima citados fizeram, pela primeira vez, estudos imunológicos comparativos da enzima de fonte tumoral com as outras da escala filogenética (GOMES et al, 1992).

Trabalhos realizados por WEBER, (1977a,b), sobre hepatoma humano e de rato mostraram várias alterações metabólicas, como o aumento na síntese proteíca, o aumento na velocidade da via glicolítica e o decréscimo na velocidade da via gluconeogênica. A via glicolítica apresentou um aumento nos seus intermediários, como a glucose-6-fosfato, a frutose-6-fosfato e o gliceraldeído-3-fosfato, que seriam desviados para a via das pentoses-fosfato, na formação da ribose-5-fosfato, o principal precursor para a biossíntese de DNA e RNA. A ribose-5-fosfato pode ser formada pelas partes oxidativa ou não-oxidativa da via das pentoses-fosfato (EIGENBRODT & GLOSSMAN, 1980). A parte oxidativa envolve a enzima glucose-6-fosfato desidrogenase, com concomitante produção de NADPH. A reoxidação do NADPH é um fator limitante para esta parte da via. Comparando as concentrações da relação NADPH/NADP entre células tumorais e não tumorais (EIGENBRODT & GLOSSMAN, 1980), observa-se que esta relação está muito diminuída nas células tumorais, e isto sugere que a redução do NADP é menor do que o consumo do NADPH. A parte não-oxidativa envolve as enzimas transcetolase e transaldolase.

Para a produção de 3 moles de R5P são necessários 2 moles de F6P e 1 mol de G3P não havendo produção de NADPH.

EIGENBRODT & GLOSSMAN, (1980), trabalhando com células tumorais incubadas com [¹⁴C]-glucose marcada mostraram que 80% das R5P eram formadas pela parte não-oxidativa da via das pentoses-fosfato.

Estudos de REITZER et al, (1979), em culturas de células HeLa incubadas com glucose 1 mM, mostraram que 80% da glucose era metabolizada pela via glicolítica até lactato e que apenas 4 a 5% entrava pelo ciclo de Krebs. Isto evidencia que o metabolismo da glucose está direcionado para produção da R5P e não essencialmente para a produção de ATP. Mostraram também que a glutamina é o principal combustível, fornecendo energia através do ciclo de Krebs. Quando a glucose está presente em altas concentrações, a glutamina fornece mais da metade da energia para a célula e quando a fonte de carboidrato é a frutose ou a galactose, este aminoácido fornece 98% da energia.

Pela importância da GPDH no metabolismo de carboidratos em células tumorais e pelos poucos dados sobre estudos cinéticos descritos na literatura, os objetivos da presente tese são:

1. Estudos cinéticos da GPDH de células HeLa.

Estudos cinéticos dão informações quantitativas sobre a velocidade das reações catalisadas por enzimas. Além disso, a cinética descreve a influência de fatores como pH, temperatura e inibidores sobre a velocidade da reação enzimática. Em relação aos estudos cinéticos com inibidores, é importante a utilização de diversas representações gráficas para ser mais preciso nas determinações de K_i e na caracterização do tipo de inibição.

2. Comparação dos resultados obtidos com a GPDH de células HeLa com os de outras enzimas da escala filogenética.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. REAGENTES

G3P, NAD⁺, NADH, ATP, ADP, 5'-AMP, 3'-5'AMPc, UDP, CDP, CMP, iodoacetamida, N-etilmaleimida, 2-cloro 4- aminobenzoato, p-cloromercuribenzoato, p-hidroximercuribenzoato, DTE, Trizma base, EDTA e DEAE Sephadex A-50 foram obtidos da Sigma Chemical Co..

Arsenato de sódio, bicarbonato de sódio, e íons metálicos divalentes, como MnCl₂, MgCl₂, CaCl₂, CdCl₂, CuCl₂, HgCl₂ foram obtidos da Merck.

Meio essencial mínimo de Eagle foi obtido dos Laboratórios Flow.

Soro fetal bovino estéril, livre de vírus e micoplasma, foi obtido da Laborclin.

Tripsina (1:250) foi de procedência da Difco.

Os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 CULTIVO CELULAR

2.2.1. Células

Neste trabalho foram utilizadas as células da linhagem HeLa. Estas células são derivadas de carcinoma de cérvix humano e crescem em monocamadas com aspecto epitelial. Foram cultivadas no laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica da UFPr. As linhagens das células HeLa foram obtidas do laboratório citado e do Tecpar.

2.2.2. Procedimentos de esterilização

2.2.2.a. Material de vidro e acessórios

Todos os materiais de vidro utilizados no cultivo celular, como as garrafas de Roux, vidros para armazenamento de meio de cultura e tripsina, frascos de despejo, etc., foram esterilizados à seco, em estufa Pasteur (FANEM), a 160°C,

por 6 horas. As rolhas, rosca e pipetas, devidamente embaladas, foram esterilizadas em autoclave (FANEM), a 120°C, por 30 minutos.

2.2.2.b. Soluções e meio de cultura

Todas as soluções e o meio de cultura foram preparados com água deionizada e bidestilada.

A *solução de bicarbonato de sódio* 7,5 mg% (p/v), usada para acertar o pH do meio de cultura, foi esterilizada em autoclave (FANEM), a 120°C, por 30 minutos, em tubos com 10 mL de solução e mantidos à temperatura ambiente.

A *solução salina tamponada (PBS)* pH 7,4 foi preparada como solução estoque, sendo constituída de Na_2HPO_4 anidro 40,5 mM, NaCl 680 mM e KH_2PO_4 7,3 mM. Esta solução foi esterilizada em autoclave (FANEM), a 120°C, por 30 minutos e mantida a 4°C. Para o uso, a diluição era feita em água bidestilada estéril.

O *soro fetal bovino* era inativado antes do uso em banho-maria, a 56°C, por 30 minutos.

A *solução de tripsina-verseno (STV)* usada nos processos de repique e coleta para o descolamento das células, era constituída de tripsina 0,05%, verseno 0,46 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36 mM, dextrose 5,55 mM, NaHCO_3 5,95 mM e 0,45 mg% de vermelho de fenol 1 g% (p/v). Esta solução foi esterilizada por filtração sob pressão em aparelho da marca Sartorio com membranas de acetato de celulose, com poros de 0,22 μm da marca Millipore ou Zeiss. A solução foi armazenada em freezer a -20°C.

O *meio de cultura* utilizado foi o meio mínimo de Eagle (PAUL, 1973), e após a reconstituição em água bidestilada, foi esterilizado do mesmo modo que a STV. O meio de cultura foi armazenado a 4°C.

Tanto para a STV como para o meio de cultura foram feitos testes de esterilidade para verificar a eficácia do procedimento de filtração esterilizante.

2.2.3. Procedimentos de cultivo celular

Nos procedimentos de cultivo celular foram utilizadas técnicas para células que se desenvolvem em monocamadas.

O cultivo celular foi realizado segundo o método de OLIVEIRA et al, (1989).

2.2.3.a. Repique e coleta das células HeLa

As células HeLa foram cultivadas em meio mínimo de Eagle (PAUL, 1973) enriquecido com 10% (v/v) de soro fetal bovino, adicionado na hora do uso. A solução de bicarbonato de sódio foi adicionada em quantidade suficiente para ajustar o pH para 7,4. Não foram utilizados antibióticos no meio de cultura.

Os repiques foram realizados em fluxo laminar horizontal, após a tripsinização, utilizando a STV que provoca o descolamento das células aderidas à parede da garrafa de cultivo. As células foram ressemeadas a uma concentração aproximada de 2×10^6 células por garrafa de Roux, contendo 100 mL de meio, crescidas em estufa a 37°C e repicadas em intervalos de 72 em 72 horas.

A coleta das células HeLa foi feita após a tripsinização e de maneira não estéril. Após o descolamento das células, estas foram lavadas 3 vezes com PBS e centrifugadas em centrífuga clínica a 2000 x g, por 1 minuto. As células foram ressuspensas em volume adequado de PBS e acondicionados em tubos plásticos tipo eppendorf, devidamente identificados e armazenadas a -70°C até o uso.

2.2.3.b Contagem e determinação da viabilidade celular

As células foram contadas em câmara de Neubauer, usando microscópio ótico (Olympus). A viabilidade celular foi determinada usando-se o corante vital azul de tripan (PHILLIPS, 1973). Para o cálculo de células viáveis foi usada a seguinte fórmula:

células não coradas

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

Foram usadas as preparações que apresentaram 95% de viabilidade.

2.3. PURIFICAÇÃO DA D-GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE CÉLULAS HeLa

A purificação da GPDH de células HeLa foi realizada segundo NAKANO et al, (1992), como mostrado no Esquema 1. Todas as manipulações feitas com a enzima foram realizadas em banho de gelo ou na câmara fria a 4°C.

ESQUEMA 1

PURIFICAÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa

Células HeLa

-Homogeneização das células em homogeneizador Van Poter Elvehjem

-Centrifugação a 4°C, 10.000 x g, por 15 minutos: **extrato bruto**

Fracionamento com sulfato de amônio (sólido)**Extrato bruto**

- Saturação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0-60%

- Centrifugação a 4°C, 10.000 x g, por 30 minutos: [sobrenadante e precipitado]

Sobrenadante 0-60%

- Saturação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 60-90%

- Centrifugação a 4°C, 10.000 x g, por 30 minutos: [sobrenadante e precipitado]

Cromatografia em DEAE Sephadex A-50

- Amostra: **precipitado** 60-90%

- Nas frações coletadas foram feitos testes de atividade (DAGHER & DEAL Jr., 1977) e dosagens de proteínas (WARBURG & CHRISTIAN, 1941).

- As frações mais ativas e com maior concentração de proteína foram reunidas e dialisadas contra solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 8,4 contendo 2-mercaptopetanol 1 mM, para redução do volume.

2.4. MANUTENÇÃO DA ENZIMA

A GPDH pura e homogênea de células HeLa foi mantida em solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 8,4, contendo 2-mercaptopetanol 1mM, a 4°C.

Para os experimentos cinéticos, a enzima era dialisada 12 a 15 horas contra tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2, contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptopetanol 1 mM.

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

O substrato livre foi obtido a partir de uma solução de DL-gliceraldeído-3-fosfato (sal de bário) dissolvido em água deionizada com a resina catiônica Dowex 50 W4 (Sigma), na proporção de 1,5 g da resina para 100 mg de G3P. A solução foi aquecida a 100°C por 3 minutos com agitação intermitente e resfriada em banho de gelo. Para o uso, o pH da solução do substrato foi acertado para 7,0, adicionando uma solução de KOH a 15%.

A concentração do substrato foi determinada enzimaticamente em presença de excesso de NAD^+ , arseniato de sódio e GPDH, de acordo com o método de DAGHER & DEAL Jr., (1977). O sistema de incubação, com um volume final de 1 mL continha, tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2, contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptopetanol 1 mM, arseniato de sódio 50 mM, NAD^+ 1 mM, enzima em excesso e 3 a 5 μL de G3P. O tubo Branco continha todos os componentes acima exceto o G3P, o qual foi substituído por igual volume de tampão. Zerado o espectrofotômetro, a reação foi iniciada pela adição de G3P. A reação foi acompanhada a 340 nm e após atingir o "plateau", foi calculada diferença entre as absorbâncias final e inicial. O cálculo da concentração do D-G3P foi feito segundo a seguinte equação:

D.O.(340 nm) x volume total do ensaio

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

Para o cálculo da concentração do G3P utilizou-se a média aritmética de duas leituras.

2.6. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE NAD⁺ e NADH

A concentração do NAD⁺ foi determinada espectrofotometricamente através da absorbância a 260 nm, utilizando-se a média de duas leituras. O coeficiente de extinção molar de 17600 M⁻¹ cm⁻¹ (Sigma Chemical Co. sd) foi usado para o cálculo da concentração do NAD⁺.

D.O. (260 nm) x volume total do ensaio

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

A concentração do NADH foi determinada espectrofotometricamente a 340 nm, utilizando-se a média de duas leituras e o coeficiente de extinção molar de 6220 M⁻¹ cm⁻¹ (HORECKER & KORNBERG, 1948).

2.7. DOSAGEM DE PROTEÍNA

As dosagens de proteína foram feitas pelo método de WARBURG & CHRISTIAN, (1941) e pelo método de LOWRY et al, (1951), utilizando a soro al- bumina bovina como padrão.

2.8. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GPDH

A atividade da GPDH foi determinada espectrofotometricamente, a 25°C, acompanhando a redução do NAD⁺ a 340 nm, segundo o método de DAGHER & DEAL Jr., (1977). As leituras foram feitas em intervalos de 15 segundos, utilizando o espectrofotômetro Varian Techtron modelo 635-D. O sistema de incubação, com um volume final de 1 mL continha, tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2, contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, G3P 1 mM, arseniato de sódio 50 mM, NAD⁺ 1 mM, quantidades variáveis de enzima. A reação foi iniciada pela adição do G3P devido a sua instabilidade em soluções alcalinas (DEAL Jr., 1969; DAGHER & DEAL Jr., 1977).

2.9. UNIDADE DE ENZIMA

Uma unidade de enzima foi considerada como a quantidade de enzima necessária para reduzir 1 μ mol de NAD⁺ por minuto, nas condições experimentais. A atividade específica foi expressa como a razão entre unidade de enzima e milígrama de proteína.

2.10. ESTUDOS CINÉTICOS

2.10.1. Efeito do 2-mercaptoetanol e do ditioeritritol sobre a atividade da GPDH de células HeLa

O estudo sobre o efeito de agentes redutores como o 2-mercaptoetanol e o ditioeritritol na atividade da GPDH de células HeLa foi realizado segundo VIEIRA et al., (1984).

A enzima (1,32 mg/mL) foi dialisada como descrito no item 2.4., na ausência de 2-mercaptoetanol. O sistema de incubação, com um volume final de 1 mL continha, tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2, contendo EDTA 1 mM, enzima 6,6

μ g, arseniato de sódio 50 mM, NAD^+ 1 mM, G3P 1 mM e quantidades variáveis do agente redutor.

2.10.2. Efeito dos íons metálicos divalentes sobre a atividade da GPDH de células HeLa

O estudo do efeito de vários íons metálicos divalentes na atividade da GPDH de células HeLa foi realizado segundo FUJITA et al, (1976). A enzima (13,2 μ g) foi incubada na presença do íon metálico divalente, nas concentrações de 1 e 2 mM e na ausência de G3P, a 25°C, por 10 minutos e a atividade enzimática testada.

2.10.3. Efeito de inibidores de grupos-SH sobre a atividade da GPDH de células HeLa

O experimento sobre o efeito de inibidores de grupos-SH na atividade da GPDH de células HeLa foi realizado segundo FUJITA et al, (1976).

A enzima foi dialisada como citado no item 2.4., na ausência de 2-mercaptopoetanol. A GPDH (6,6 μ g) foi incubada em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2, contendo EDTA 1 mM, na presença dos inibidores de grupos-SH nas concentrações de 0,01 e 0,1 mM, a 25°C, por 10 minutos. A atividade enzimática foi medida adicionando-se à mistura, arseniato de sódio 50 mM, NAD^+ 1 mM, G3P 1 mM. Para o teste da reversão das inibições causadas pelos reagentes de grupos-SH, foi utilizada a mesma mistura descrita acima com adição de 2-mercaptopoetanol 5 mM, antes da medida da atividade da enzima.

2.10.4. Inibição da GPDH de células HeLa pelo ρ -hidroximercuribenzoato

O estudo de inibição da GPDH pelo ρ -hidroximercuribenzoato foi feito do mesmo modo que descrito acima, porém a enzima (9,6 μ g) foi incubada em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2, contendo EDTA 1 mM, com concentrações variáveis de ρ -HMB, de 0,005 a 50 μ M.

2.10.5. Inibição da GPDH de células HeLa por nucleotídeos

Os experimentos sobre a inibição da GPDH por nucleotídeos foram feitos segundo YANG & DEAL Jr., (1969a).

Os nucleotídeos utilizados foram ATP, ADP, 5'-AMP, 3'-5'AMPc, UDP, CDP, e CMP. A concentração dos nucleotídeos foi determinada espectrofotometricamente através da absorbância a 260 nm, do mesmo modo que para o NAD⁺, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 15400 M⁻¹ cm⁻¹ para os nucleotídeos de adenina, de 10000 M⁻¹ cm⁻¹ para o UDP e 7400 M⁻¹ cm⁻¹ para o CDP e CMP (DAWSON et al, 1986).

Para serem mais precisas as determinações do tipo de inibição e dos valores das constantes de inibição, foram utilizadas as representações gráficas de LINEWEAVER-BURK, (1934) e de HANES, (1932). Para a análise de regressão não-linear utilizou-se o método de Gauss e o programa estatístico para microcomputador, SEAG.

2.10.6. Efeito do NADH e do G3P na estabilidade da GPDH de células HeLa, a 37°C

Os estudos sobre o efeito do NADH e do G3P na estabilidade da GPDH de células HeLa foram realizados utilizando as condições descritas por TUCKER & GRISOLIA, (1962).

A enzima foi dialisada como descrito no item 2.4., na ausência de 2-mercaptoetanol. A GPDH [2,5 µM] foi incubada em um sistema (0,3 mL) contendo tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2, contendo EDTA 1 mM e NADH (0,05 e 0,5 mM) ou G3P (0,05 e 0,5 mM), a 37°C, por 6 horas. Às incubações acima foram adicionados NAD⁺ (0,05 e 0,5 mM) e/ou 2-mercaptoetanol 1 mM, afim de verificar seus efeitos junto ao NADH e ao G3P. Em intervalos de tempo de 1 em 1 hora, foram retiradas alíquotas (5 ou 10 µL) das incubações para o teste de atividade.

2.10.7. Efeito do EDTA sobre a inativação da GPDH de células HeLa pelo NADH

O efeito do EDTA sobre a inativação da GPDH pelo NADH foi determinado como descrito por TUCKER & GRISOLIA, (1962).

A enzima foi dialisada como citado no item 2.4., na ausência de 2-mercaptoproetanol e de EDTA. A GPDH [2,5 μ M] foi incubada em um sistema (0,3 mL) com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2, com e sem EDTA 1 mM, na presença de NADH 0,5 mM, a 37°C, por 6 horas. Também foram feitas incubações contendo NAD⁺ (0,5 mM) e/ou 2-mercaptoproetanol 1 mM. Nos tempos de 1, 3 e 6 horas de incubação foram retiradas alíquotas (10 a 25 μ L) para o teste de atividade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A GPDH de células HeLa apresentou nos extratos brutos uma atividade específica de 0,4 U/mg de proteína. Após a etapa da cromatografia em DEAE Sephadex A-50, a atividade específica foi para 32 U/mg, correspondendo a uma purificação de 80 vezes e com um rendimento de 38,5%. Estes resultados foram idênticos aos relatados por NAKANO et al, (1992).

A homogeneidade e a pureza da enzima foram verificadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em SDS, podendo portanto ser utilizada para os estudos cinéticos.

As propriedades cinéticas básicas da GPDH de células HeLa relatadas por NAKANO et al, (1992) foram: pH ótimo 8,2; concentração ótima de arseniato 50 mM; Km para o NAD⁺ 0,03 mM; Km para o G3P 0,1 mM; Ki para o NADH 0,03 mM e Ki para o ATP 2,65 mM.

3.1. ESTABILIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa

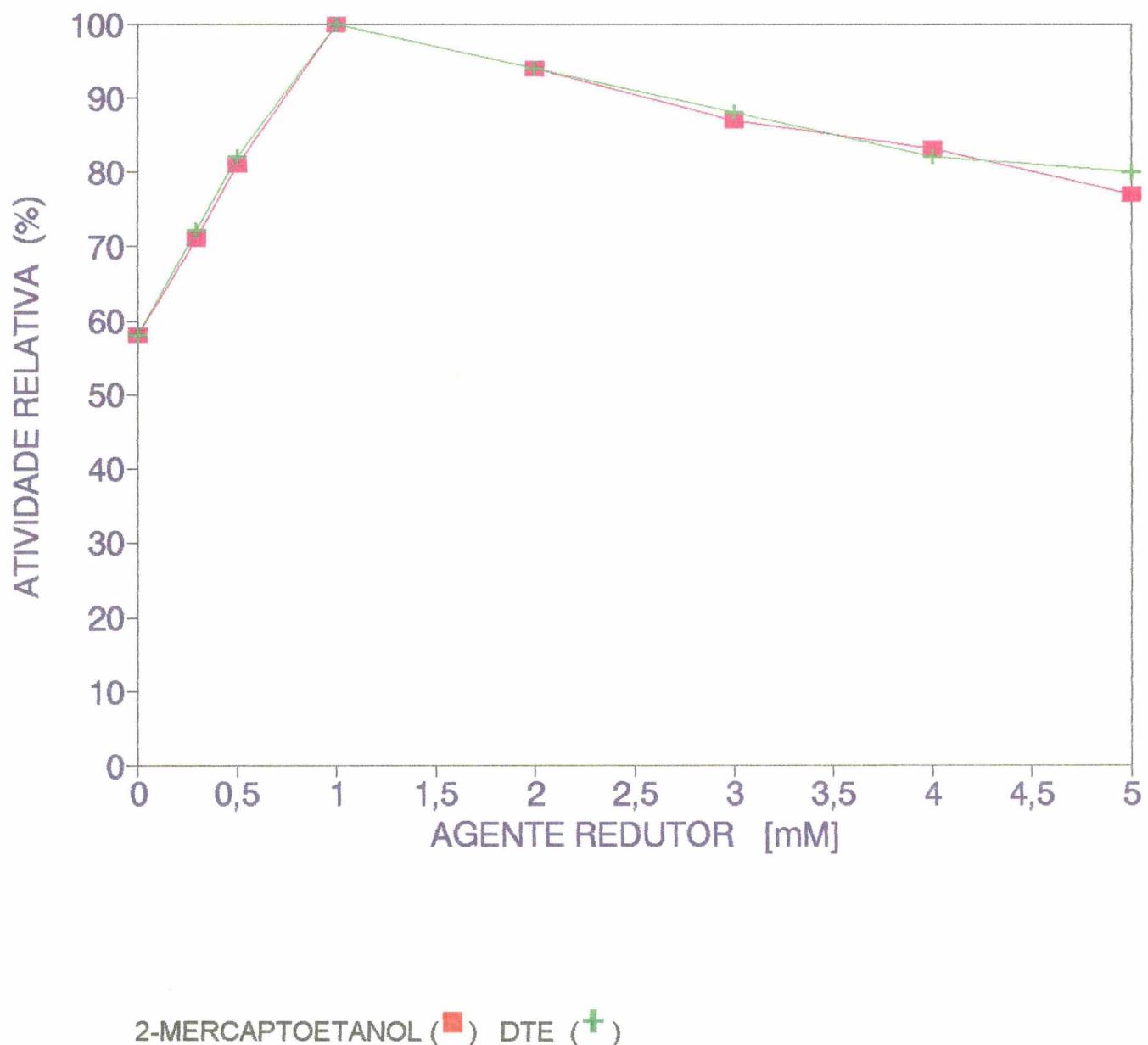
Foi verificado que após a cromatografia em DEAE Sephadex A-50 ocorre um aumento na estabilidade da GPDH de células HeLa. As frações com maior atividade enzimática quando em suspensão em solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pH 8,4 contendo 2-mercaptopropanoal apresentaram em torno de 40% de sua atividade inicial após 7 meses de armazenamento a 4°C. A mesma enzima purificada somente até a etapa de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ perdia em torno de 40% de sua atividade inicial após uma semana de armazenamento (NAKANO et al, 1992).

As GPDHs de diversas fontes, em soluções, tendem à desnaturação e à floculação à temperatura ambiente, porém podem ser conservadas por longos períodos em suspensão de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em baixas temperaturas (4°C). A estabilidade da GPDH pode ser afetada por diversos fatores como estabilidade dos grupos-SH, presença ou ausência do coenzima ligado, presença ou ausência de metais pesados, tipo e concentração de sal (VELICK & FURFINE, 1963 ; KREBS et al, 1979).

3.2. EFEITO DO 2-MERCAPTOETANOL E DO DITIOERITRITOL SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa

A GPDH de células HeLa é ativada em presença de baixas concentrações de 2-mercaptopetanol e ditioeritritol. A Figura 1 mostra que a ativação máxima é obtida na concentração de 1 mM tanto para o 2-mercaptopetanol como para o DTE. Observa-se também que na ausência do 2-mercaptopetanol ou do DTE a GPDH apresenta, aproximadamente 60% de sua atividade máxima. Em concentrações superiores a 1 mM observa-se uma leve diminuição da atividade enzimática. Segundo DEAL Jr., (1969) concentrações altas de agente redutor (100 mM) pode provocar modificações na estrutura da proteína-enzima com perda da atividade enzimática. A GPDH de células HeLa apresentou o mesmo comportamento frente aos agentes redutores que as enzimas de *Caiman sp* (VIEIRA et al, 1984) e *Anas sp* (NAKANO et al, 1991).

FIGURA 1 : EFEITO DO 2-MERCAPTOETANOL E DO DITIOERITRITOL
SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa



O sistema de incubação continha em um volume final de 1 mL: 6,6 μ g de enzima, tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2 contendo EDTA 1 mM, G3P 1 mM, arseniato de sódio 50 mM, NAD⁺ 1 mM e quantidades variáveis do agente redutor.

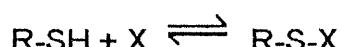
3.3. EFEITO DOS ÍONS METÁLICOS DIVALENTES SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa

A Tabela II mostra o efeito dos íons metálicos divalentes nas concentrações de 1 e 2 mM, sobre a atividade da GPDH de células HeLa.

Semelhante às GPDHs de músculo de coelho e levedura (VELICK & FURFINE, 1963) *Thermus thermophilus* (FUJITA et al, 1976), *Caiman sp* (VIEIRA et al, 1983), e *Anas sp* (BARBOSA & NAKANO, 1987), a GPDH de células HeLa foi completamente inibida pelos íons cobre e mercúrio, o que sugere a presença de grupos-SH no sítio ativo da enzima. O íon cádmio na concentração 1 mM inibiu 75% da atividade enzimática, enquanto que a 2 mM inibiu totalmente a enzima. A GPDH do *T. thermophilus* (FUJITA et al, 1976) foi totalmente inibida pelo cádmio na concentração 1 mM.

Os íons $MnCl_2$ e $MgCl_2$, na concentração 1 mM não afetaram a atividade da enzima, comportamento semelhante ao das outras GPDHs acima citadas.

Segundo WEBB, (1966a), a inibição por íons metálicos pesados como, Hg^{++} , Cu^{++} , e Cd^{++} , ocorre pela formação de mercaptídeos, como mostra o esquema abaixo:



X = íon metálico pesado

TABELA II : EFEITO DOS ÍONS METÁLICOS DIVALENTES SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa

SAL [1]	ATIVIDADE RELATIVA %	
	1 mM	2 mM
NENHUM	100	100
MnCl ₂	100	88
MgCl ₂	95	67
CaCl ₂	71	61
CdCl ₂	24	0
CuCl ₂	0	0
HgCl ₂	0	0

A enzima foi incubada a 25°C, por 10 minutos, em presença do íon metálico e na ausência de G3P. A atividade enzimática foi medida em um sistema de incubação com um volume final de 1 mL que continha: tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2 com EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, G3P 1 mM, arseniato de sódio 50 mM, NAD⁺ 1mM e 13,2 µg de enzima.

3.4. EFEITO DOS INIBIDORES DE GRUPOS-SH SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa

A Tabela III mostra o comportamento da GPDH de células HeLa frente aos diferentes tipos de inibidores de grupos-SH.

A GPDH de células HeLa foi inibida cerca de 80%, na presença de reagentes alquilantes como iodoacetamida e N-etilmaleimida sendo a inibição irreversível. A reação (Figura 2a) é considerada irreversível por que os reagentes formam uma ligação covalente com os grupos-SH da enzima e não são deslocados pelo agente redutor.

A enzima apresentou em torno de 80% de inibição frente ao agente oxidante 2-cloro 4-aminobenzoato. A presença de 2-mercaptoetanol em excesso (5 mM) não foi suficiente para reverter a inibição.

No mecanismo de inibição por agentes oxidantes, (Figura 2b), ocorre a formação de pontes dissulfeto intramoleculares e em presença do agente redutor há possibilidade da quebra destas pontes. Porém, segundo VELICK, (1953), podem ocorrer alguns tipos de inibição envolvendo a formação de ligações dissulfeto que não são revertidas instantaneamente pela adição do agente redutor, sendo necessário incubações por longos períodos de tempo.

Resultados semelhantes foram obtidos com as enzimas de músculo de coelho (VELICK, 1953), *T. thermophilus* (FUJITA et al, 1976), *Caiman sp* (VIEIRA et al, 1983) e *Anas sp* (BARBOSA & NAKANO, 1987) tanto para os reagentes alquilantes como para os agentes oxidantes.

A GPDH de células HeLa foi totalmente inibida por ρ -cloro e ρ -hidroximercúribenzoato, mas a inibição foi parcialmente (50%) revertida em presença de agente redutor em excesso (5 mM). Os reagentes formadores de mercaptídeos, ρ -CMB e ρ -HMB, reagem com a enzima como mostra a Figura 2c. Segundo VELICK, (1953), a atividade da enzima é completamente restaurada pela adição do agente redutor, porém poderá ocorrer modificações da estrutura proteína-enzima principalmente se houver demora na adição do agente redutor. As GPDHs de músculo de coelho

(VELICK, 1953), *Caiman sp* (VIEIRA et al, 1983), e *Anas sp* (BARBOSA & NAKANO, 1987) apresentaram reversão total da inibição causada pelo ρ -CMB e pelo ρ -HMB na presença de mercaptoetanol 5 mM, enquanto que a GPDH de células HeLa apresentou reversão parcial nas mesmas condições. Este comportamento diferente não reflete necessariamente algum mecanismo de inibição diferente. Pode ser que os reagentes ρ -CMB e ρ -HMB além de atingir os grupos-SH importantes para a atividade da enzima, poderiam estar reagindo com outros grupos funcionais que seriam importantes para a manutenção da conformação tridimensional da enzima.

TABELA III : EFEITO DOS INIBIDORES DE GRUPOS-SH SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa

INIBIDOR	ATIVIDADE RELATIVA ^a	ATIVIDADE RELATIVA ^b %	
		%	5 mM
0,1 mM			
NENHUM	100		100
IODOACETAMIDA	20		23
N-ETILMALEIMIDA	11		19
2-CLORO 4-AMINOBENZOATO	22		44
0,01 mM			
<i>p</i> -CLOROMERCURIBENZOATO	0		50
<i>p</i> -HIDROXIMERCURIBENZOATO	0		50

*2-MSH - 2-mercaptopetanol

a) A enzima (6,6 µg) foi incubada a 25° C, por 10 minutos, na presença do inibidor de grupo-SH em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2 contendo EDTA 1 mM. A atividade enzimática foi medida adicionando ao sistema G3P 1 mM, arseniato de sódio 50 mM e NAD⁺ 1 mM.

b) O sistema de incubação foi o mesmo que (a), exceto que foi adicionado 2-mercaptopetanol 5 mM imediatamente antes da medida da atividade enzimática.

FIGURA 2a - Mecanismo de reação por reagentes alquilantes

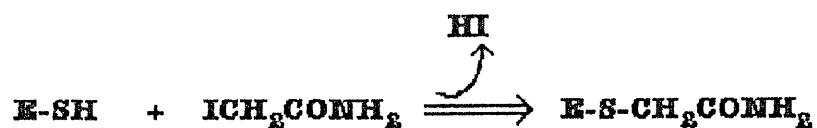
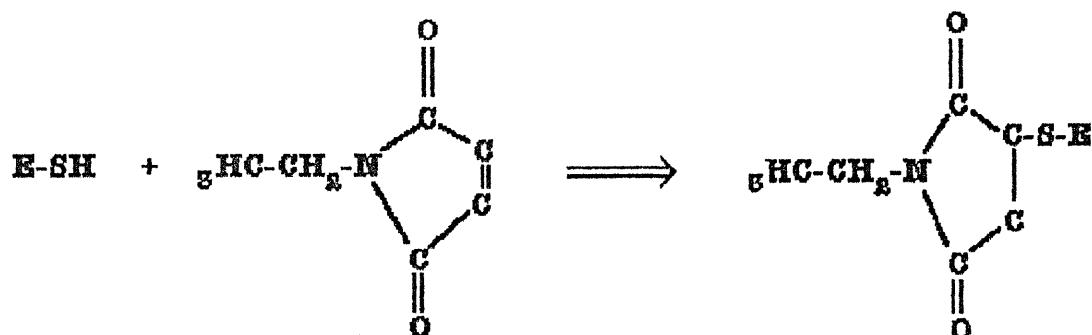
IODOACETAMIDA**N-ETILMALEIMIDA**

FIGURA 2b - Mecanismo de reação por reagentes oxidantes

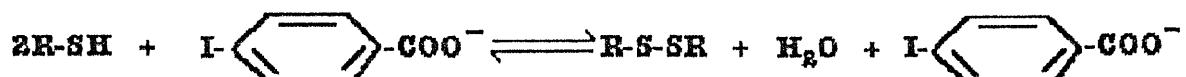
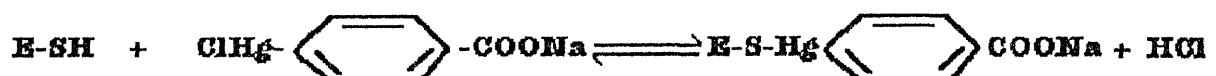
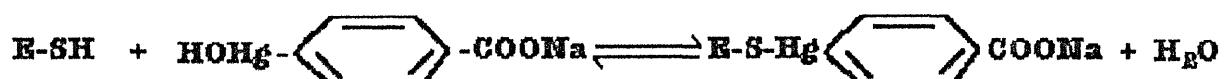
IODOSOBENZOATO

FIGURA 2c - Mecanismo de reação por reagentes formadores de mercaptídeos

p*-CMB**p*-HMB**

3.5. INIBIÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa PELO ρ -HIDROXIMERCURI-BENZOATO

A Figura 3a mostra a inibição da GPDH de células HeLa pelo ρ -HMB. A enzima foi totalmente inibida pelo ρ -HMB nas concentrações de 10 e 50 μ M. Nas concentrações de 0,005 e 5 μ M do inibidor a GPDH apresentou 53 e 2% de atividade enzimática, respectivamente. Na presença de excesso de 2-mercaptopetanol (5 mM) ocorreu reversão parcial da atividade da enzima (50%) em todas as concentrações testadas, exceto na concentração 0,005 μ M onde a reversão foi de 73% da atividade enzimática.

Trabalhando com GPDH de músculo de coelho, VELICK (1953), relatou que o bloqueio da cys-149 pelo ρ -HMB era seguido pela liberação do coenzima (NAD $^+$) ligado.

O mecanismo dessa reação foi estudado na GPDH de músculo de porco por BATKE et al, (1974). Segundo os autores tanto a formação da ligação-mercaptídeo como a liberação do coenzima demonstraram uma cinética de primeira ordem bifásica, indicando que existem diferenças na reatividade dos resíduos de cys-149 e entre os sítios de ligação do NAD⁺ dentro das subunidades da GPDH. O esquema da reação (Figura 3b), mostra que há formação de um complexo ternário seguida da formação da ligação-mercaptídeo e a liberação do NAD⁺.

FIGURA 3b- Mecanismo de reação da cys-149 da GPDH de porco com o β -HMB

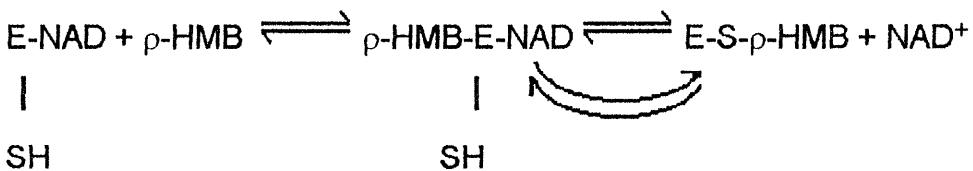
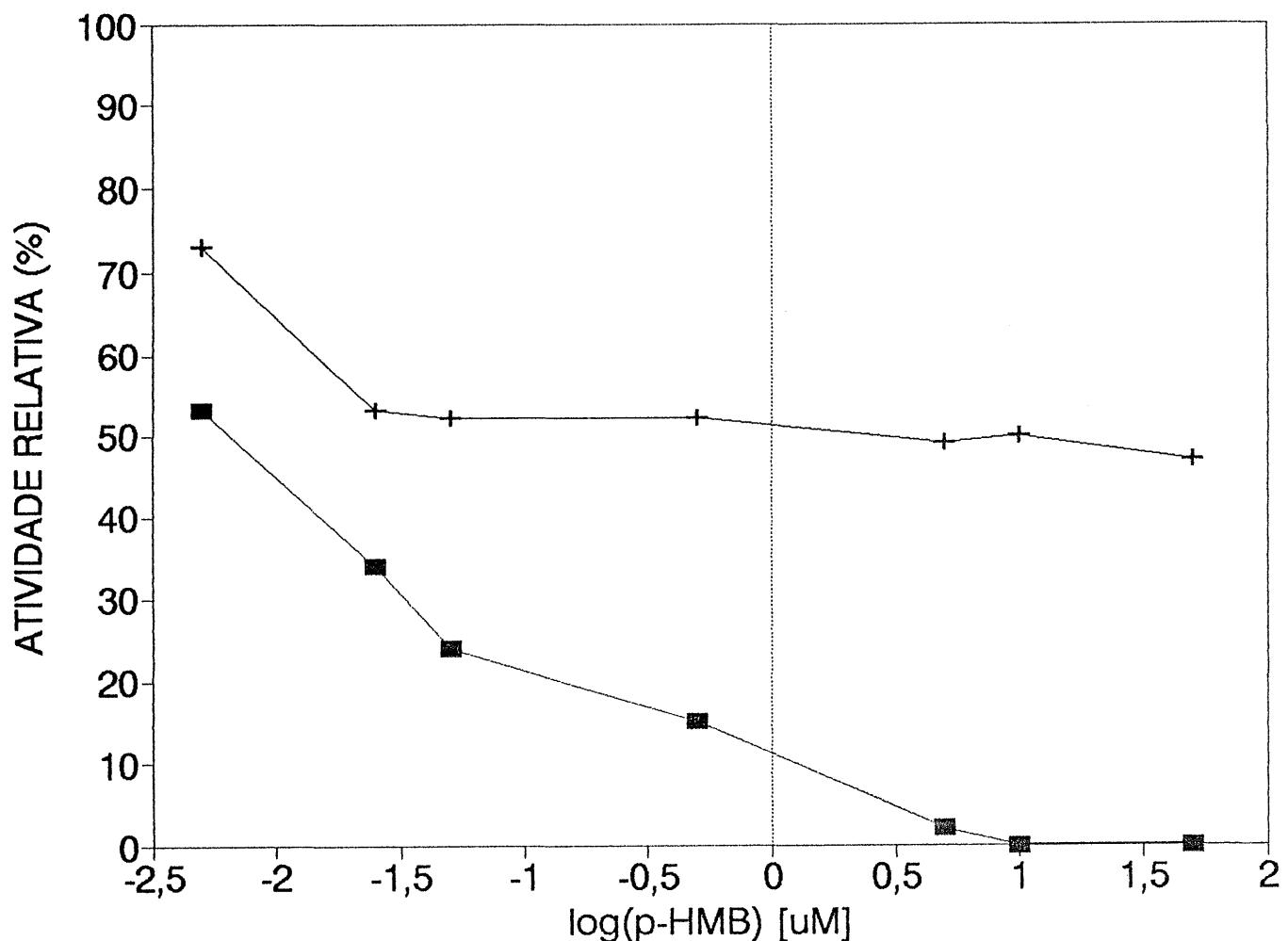


FIGURA 3a: INIBIÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa PELO ρ -HIDROXIMERCURIBENZOATO



INIBIÇÃO (■)
REVERSÃO DA INIBIÇÃO (+)

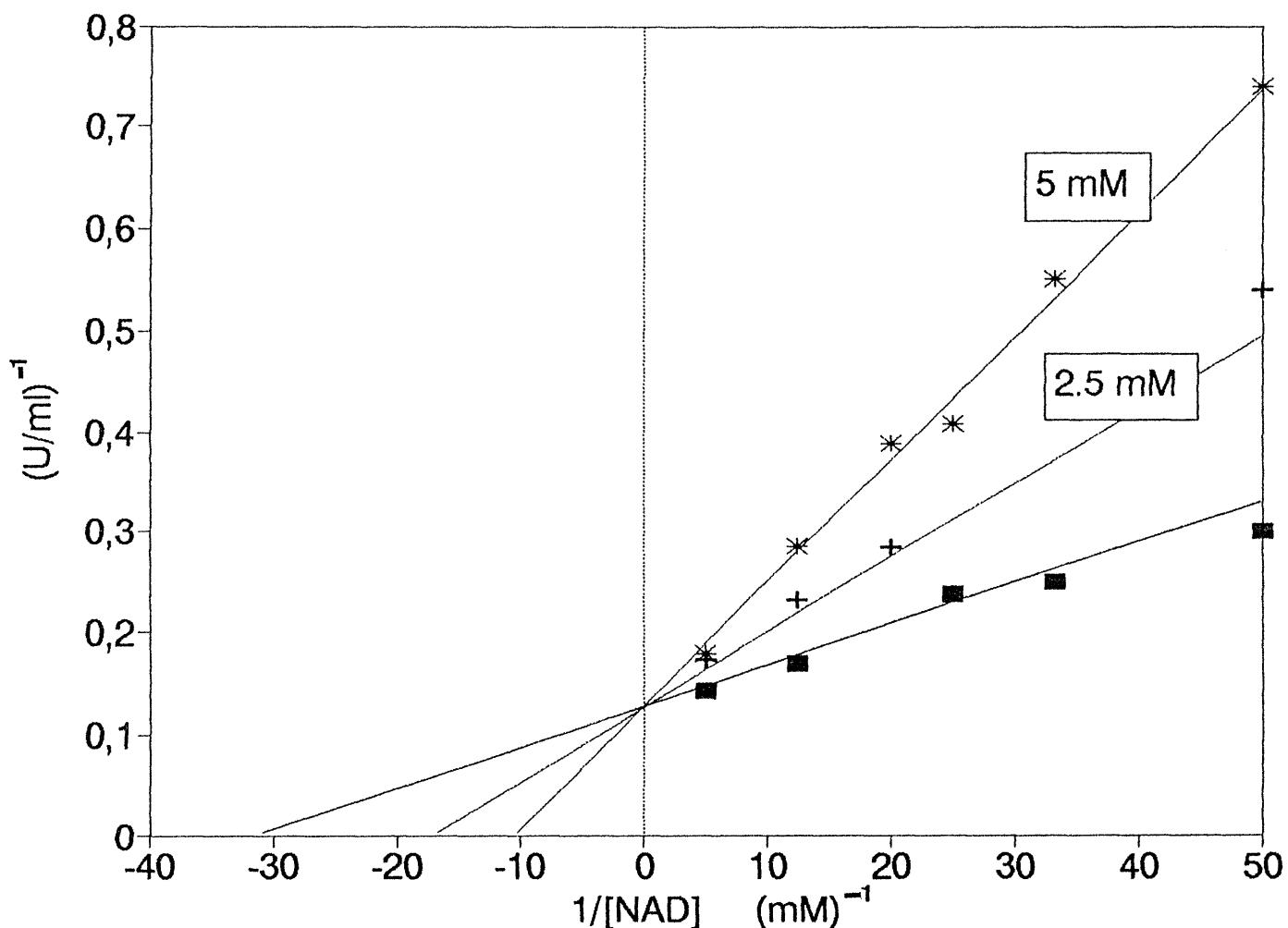
O procedimento experimental está descrito na legenda da Tabela III.

3.6. INIBIÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa PELO ADP, 5'-AMP e 3'-5'AMPc

Os efeitos do ADP, 5'-AMP e do 3'-5'AMPc sobre a atividade da GPDH de células HeLa foram examinados devido às características estruturais comuns ao NAD⁺.

As Figuras 4a, 5a e 6a mostram os gráficos de inibição da GPDH pelo ADP, 5'-AMP e o 3'-5'AMPc, respectivamente, em duas concentrações diferentes para cada nucleotídeo, segundo o método de LINEWEAVER-BURK (1934). Os valores de Ki calculados a partir da relação de MASSEY (1953) foram de 2,1 mM, 1,0 mM e 0,6 mM para o ADP, 5'-AMP e 3'-5'AMPc, respectivamente. No Anexo estão os gráficos segundo o método de HANES (HANES, 1932) para os três nucleotídeos testados com seus respectivos Ki (Figuras 4b, 5b e 6b). A análise desses gráficos ratifica o tipo de inibição e os valores de Ki determinados pelo método de LINEWEAVER & BURK (1934). Do mesmo modo que para o ATP verificou-se que em todos os casos a inibição foi do tipo competitivo em relação ao NAD⁺ (NAKANO et al, 1992). O 3'-5'AMPc mostrou-se o mais potente inibidor da GPDH de células HeLa, quando comparado com os outros nucleotídeos testados. Este comportamento é semelhante aos descritos para as GPDHs de levedura (YANG & DEAL Jr., 1969a), *Caiman sp* (VIEIRA et al, 1983) e *Anas sp* (NAKANO et al, 1991).

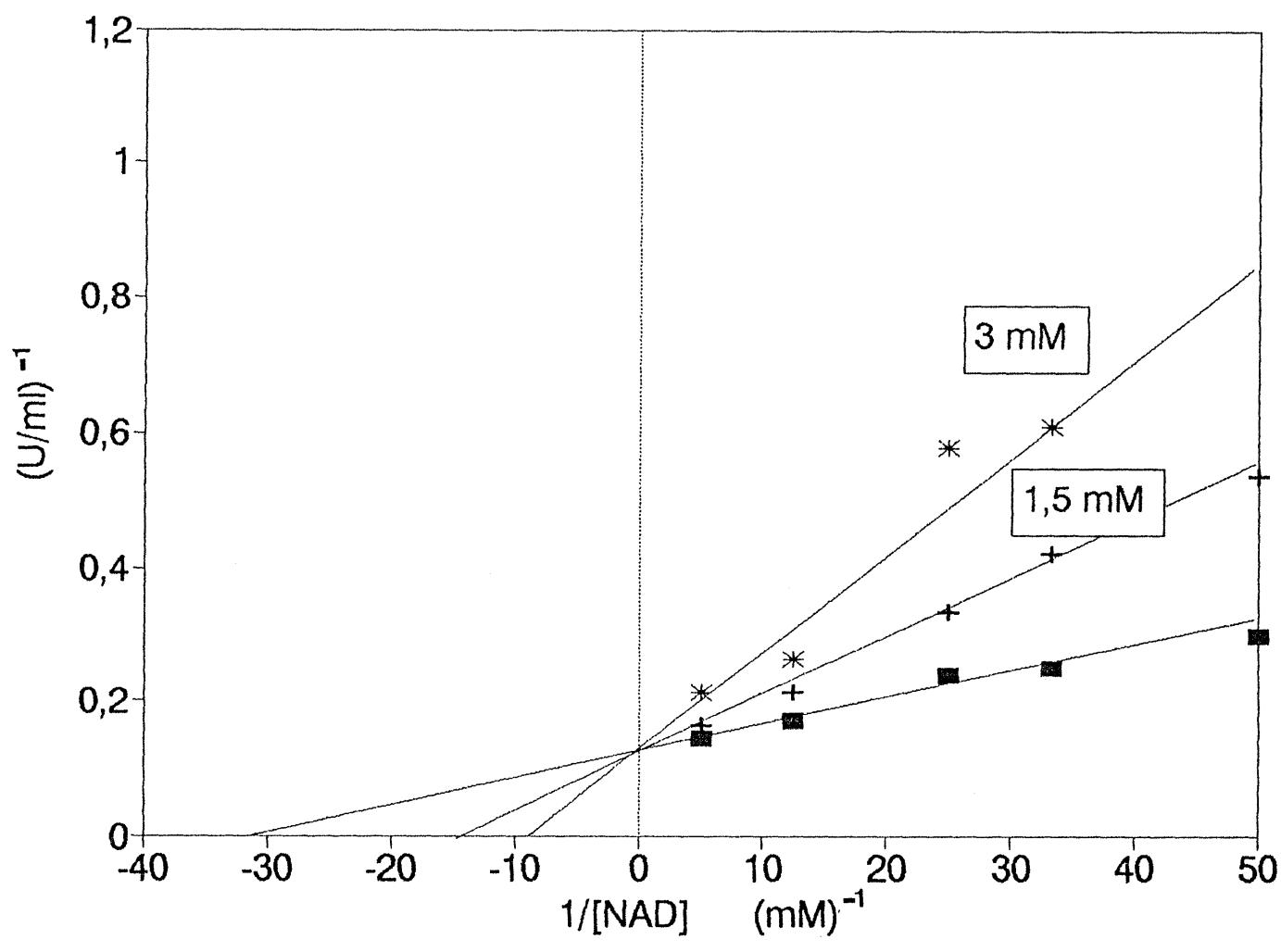
FIGURA 4a : INIBIÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa PELO ADP



CONTROLE (■) ADP (+) (*)

O sistema de incubação continha em um volume final de 1 mL: 6,6 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 50 mM, quantidades variáveis de NAD⁺ e ADP nas concentrações indicadas no gráfico.

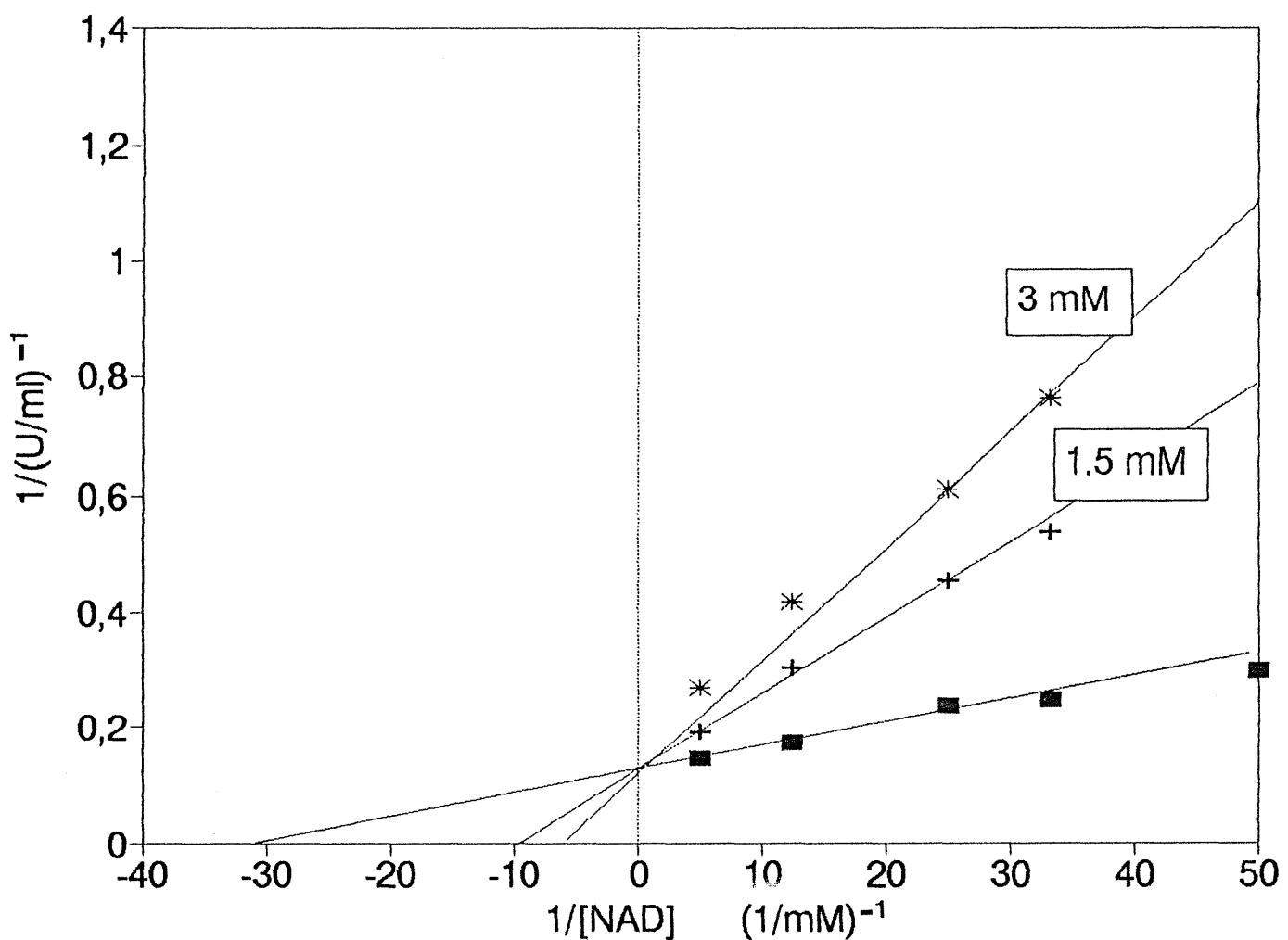
FIGURA 5a : INIBIÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa PELO 5'AMP



CONTROLE (■) 5'-AMP (+) (*)

O sistema de incubação continha em um volume final de 1 mL: 6,6 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 50 mM, quantidades variáveis de NAD⁺ e 5'-AMP nas concentrações indicadas no gráfico.

FIGURA 6a : INIBIÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa PELO 3'-5'AMPc



O sistema de incubação continha em um volume final de 1 mL: 6,6 μ g de enzima, tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2, contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptopropano 1 mM, G3P 1 mM, arseniato de sódio 50 mM, quantidades variáveis de NAD^+ e 3'-5'AMPc nas concentrações indicadas no gráfico.

3.7. COMPARAÇÃO DO EFEITO DOS NUCLEOTÍDEOS (ATP, ADP, 5'-AMP, 3'-5'AMPc, UDP, CDP E CMP) SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa

A Figura 7 mostra o efeito dos nucleotídeos de adenina sobre a atividade da GPDH de células HeLa. Observa-se novamente que o 3'-5'AMPc foi o mais potente inibidor. Comparando o ATP com o 3'-5'AMPc, na concentração de 10 mM, o primeiro inibiu 21% enquanto que o segundo inibiu 71% da atividade da enzima.

YANG & DEAL Jr., (1969a), realizaram experimentos com GPDH de levedura e vários compostos de adenina como ATP, ADP, 5'-AMP e adenosina, e comparando os valores de K_i obtidos sugeriram que a ligação do monofosfato, do difosfato e do trifosfato na posição 5' da adenosina não apresentava pronunciado efeito na ligação no sítio do NAD^+ .

A Figura 8 mostra o efeito dos nucleosídeos difosfato como ADP, UDP e CDP sobre a atividade da GPDH de células HeLa. Os dados do 3'-5'AMPc, o mais potente inibidor da enzima, foram incluídos para comparação. O ADP inibiu mais a enzima quando comparado com os outros nucleotídeos. Na concentração de 30 mM o ADP inibiu 52%, enquanto que o UDP e o CDP inibiram 27 e 28%, respectivamente.

A Figura 9 mostra o efeito dos nucleosídeos monofosfato (5'-AMP, 3'-5'AMPc e CMP), sobre a atividade da enzima. Observa-se que o 5'-AMP na concentração 30 mM inibiu 56% da atividade enzimática enquanto que o CMP inibiu 39%, na mesma concentração. O 3'-5'AMPc tanto em relação aos nucleosídeos monofosfato como aos outros nucleotídeos testados foi o que apresentou maior efeito inibitório sobre a GPDH de células HeLa.

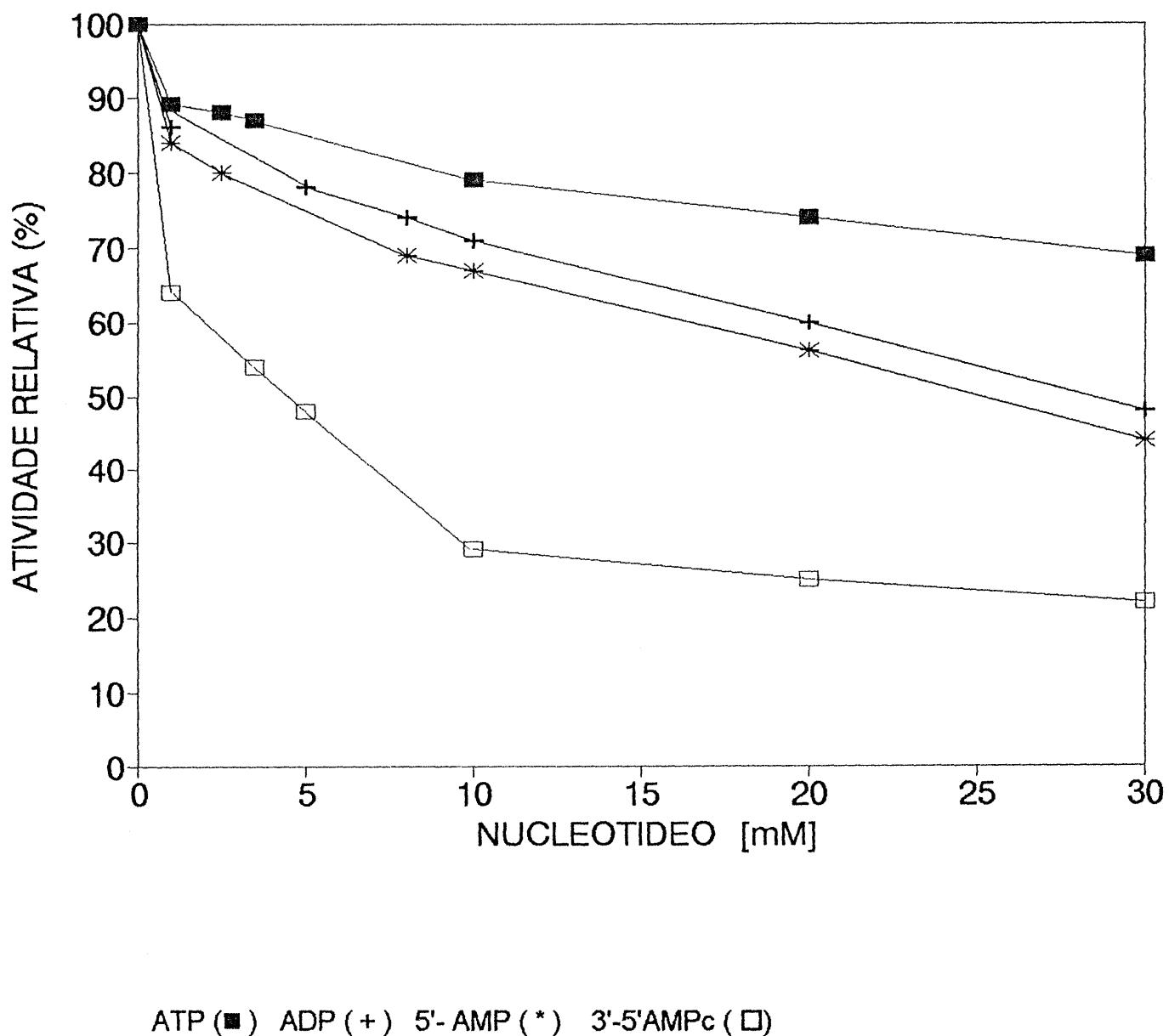
YANG & DEAL Jr., (1969a) em estudos realizados com GPDH de levedura, mostraram que a enzima era pouco inibida por UTP e CTP quando comparado ao ATP e sugeriram que existe uma pronunciada especificidade pela base adenina do que por outras bases. Portanto, sugere-se que a GPDH de células HeLa, semelhante à de levedura apresentaria especificidade por nucleotídeos de adenina uma vez que estes inibiram mais a enzima do que os nucleotídeos de outras bases.

A Tabela IV mostra o efeito de todos os nucleotídeos testados na atividade da GPDH de células HeLa, e suas constantes de inibição. De acordo com a porcentagem de inibição, estes nucleotídeos foram divididos em 3 classes (YANG & DEAL Jr., 1969a):

- a) *Classe dos inibidores fortes*, que produzem mais de 50% de inibição na concentração de 10 mM;
- b) *Classe dos inibidores moderados*, que produzem de 21 a 50% de inibição na concentração de 10 mM;
- c) *Classe dos inibidores fracos*, que produzem 20% ou menos de inibição na concentração de 10 mM.

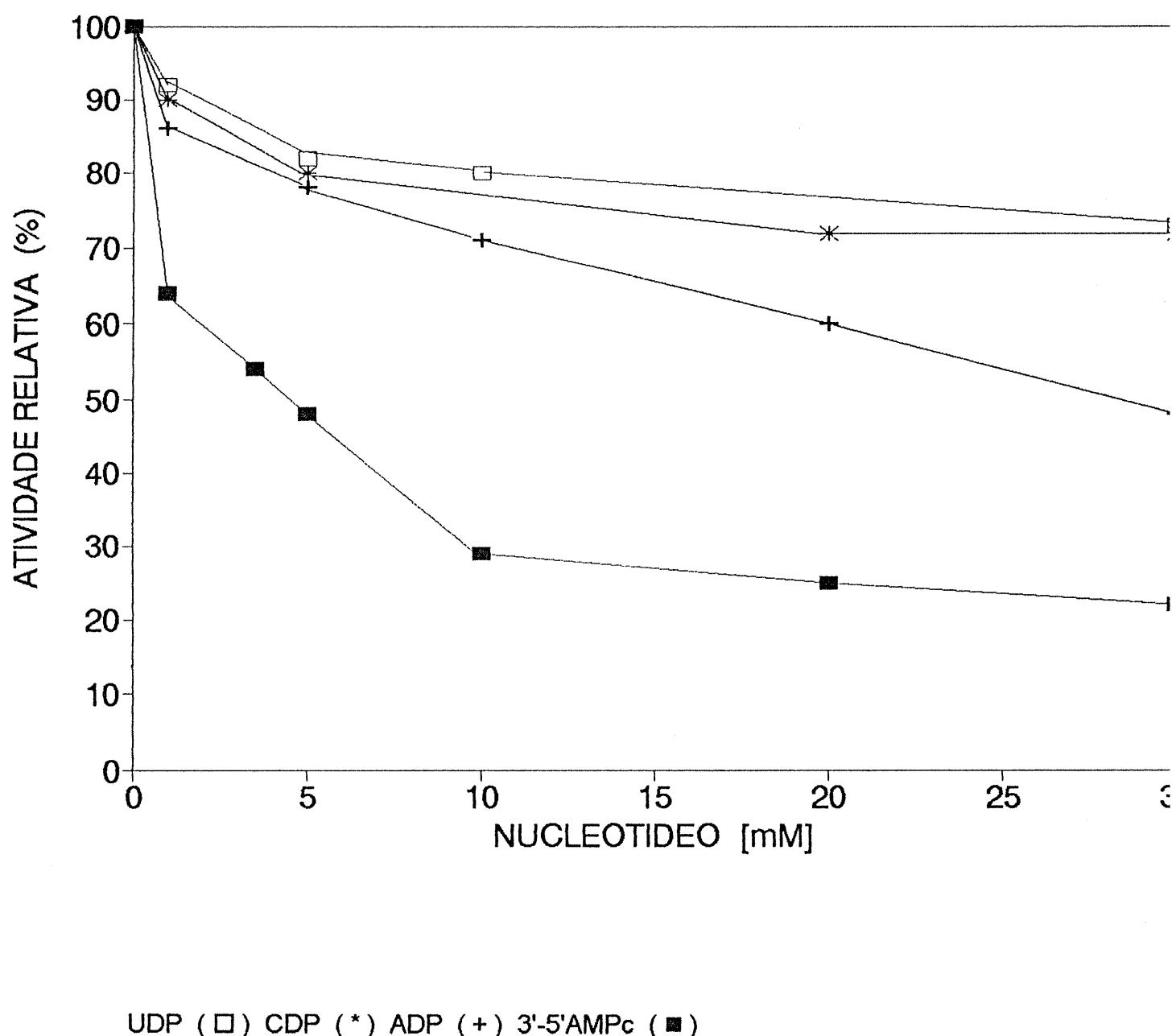
De acordo com este critério, o 3'-5' AMPc foi considerado como um inibidor forte uma vez que produziu 71% de inibição. O ATP, CMP, ADP e o 5'-AMP foram considerados como inibidores moderados pois inibiram de 21 a 33% da atividade enzimática. O UDP e o CDP foram considerados fracos pois inibiram 20% da atividade da enzima. Em virtude da porcentagem de inibição do ATP, UDP e CDP serem muito próximas, o ATP poderia ser considerado como um inibidor fraco ou o UDP e o CDP considerados como inibidores moderados. Estes resultados foram semelhantes aos descritos para a GPDH de levedura (YANG & DEAL Jr., 1969a).

FIGURA 7: EFEITO DO ATP, ADP, 5'-AMP E 3'-5'AMPc SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa



O sistema de incubação continha em um volume final de 1 mL: 6,6 µg de enzima, tampão Tris-HCl mM pH 8,2, contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptopetanol 1 mM, G3P 1 mM, arseniato de sódio 50 mM, NAD⁺ 1 mM e quantidades variáveis do nucleotídeo.

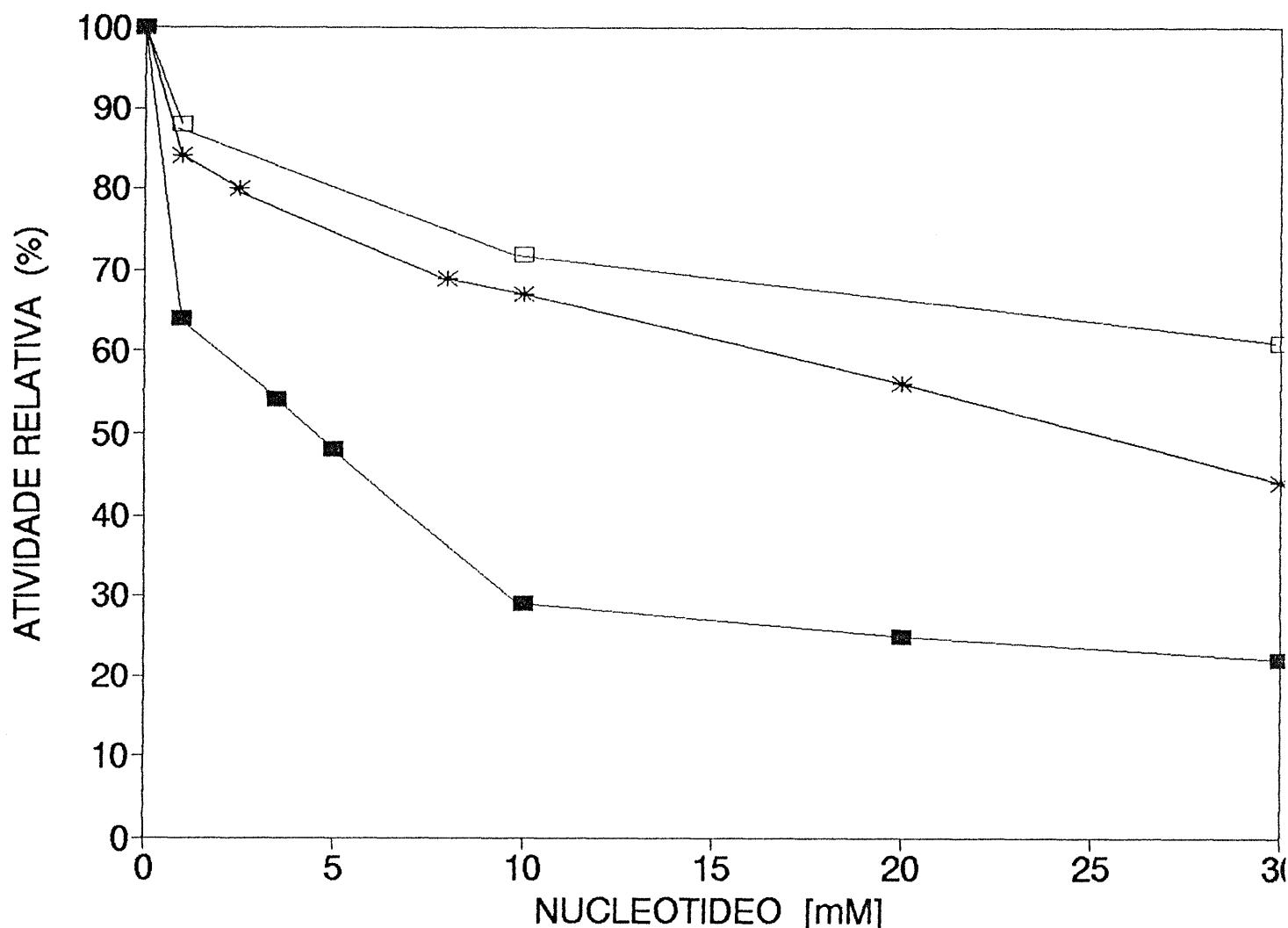
FIGURA 8 : COMPARAÇÃO DO EFEITO DOS NUCLEOSÍDEOS DIFOSFATO SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa



UDP (□) CDP (*) ADP (+) 3'-5'AMPc (■)

O procedimento experimental está descrito na legenda da Figura 7. Os dados do 3'-5'AMPc foram incluídos para comparação.

FIGURA 9 : COMPARAÇÃO DO EFEITO DOS NUCLEOSÍDEOS MONOFOSFATO SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa



CMP (□) 5'AMP (*) 3'-5'AMPc (■)

O procedimento experimental está descrito na legenda da Figura 7.

TABELA IV : COMPARAÇÃO DO EFEITO DOS NUCLEOTÍDEOS SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa

NUCLEOTÍDEOS classe dos inibidores	Ki (mM)	INIBIÇÃO %		
		1 mM	10 mM	30 mM
fortes				
3'-5'AMPc	0,6	36	71	78
moderados				
ATP	2,65 ^a	11	21	31
CMP	----	12	28	39
ADP	2,1	13,5	29	52
AMP	1,0	16	33	56
fracos				
UDP	----	8	20	27
CDP	----	10	20	28

O procedimento experimental está descrito na legenda da figura 7.

a) NAKANO et al, (1992)

3.8. EFEITO DO NADH SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa, A 37°C, EM FUNÇÃO DO TEMPO

As Figuras 10a e 10b mostram o efeito do NADH sobre a atividade da GPDH de células HeLa, a 37°C. Observa-se que a GPDH [2,5 μ M] de células HeLa é inativada na presença de NADH, nas concentrações de 0,05 e 0,5 mM, a 37°C. A Figura 10a mostra o efeito protetor do NAD⁺ 0,05 mM na inativação pelo NADH, em concentração equimolar, o que não é observado na concentração de NADH 0,5 mM (Figura 10b). As Figuras mostram também o efeito protetor do 2-mercaptopetanol 1 mM. A maior proteção é verificada quando a enzima foi incubada na presença tanto do NAD⁺ como do 2-mercaptopetanol.

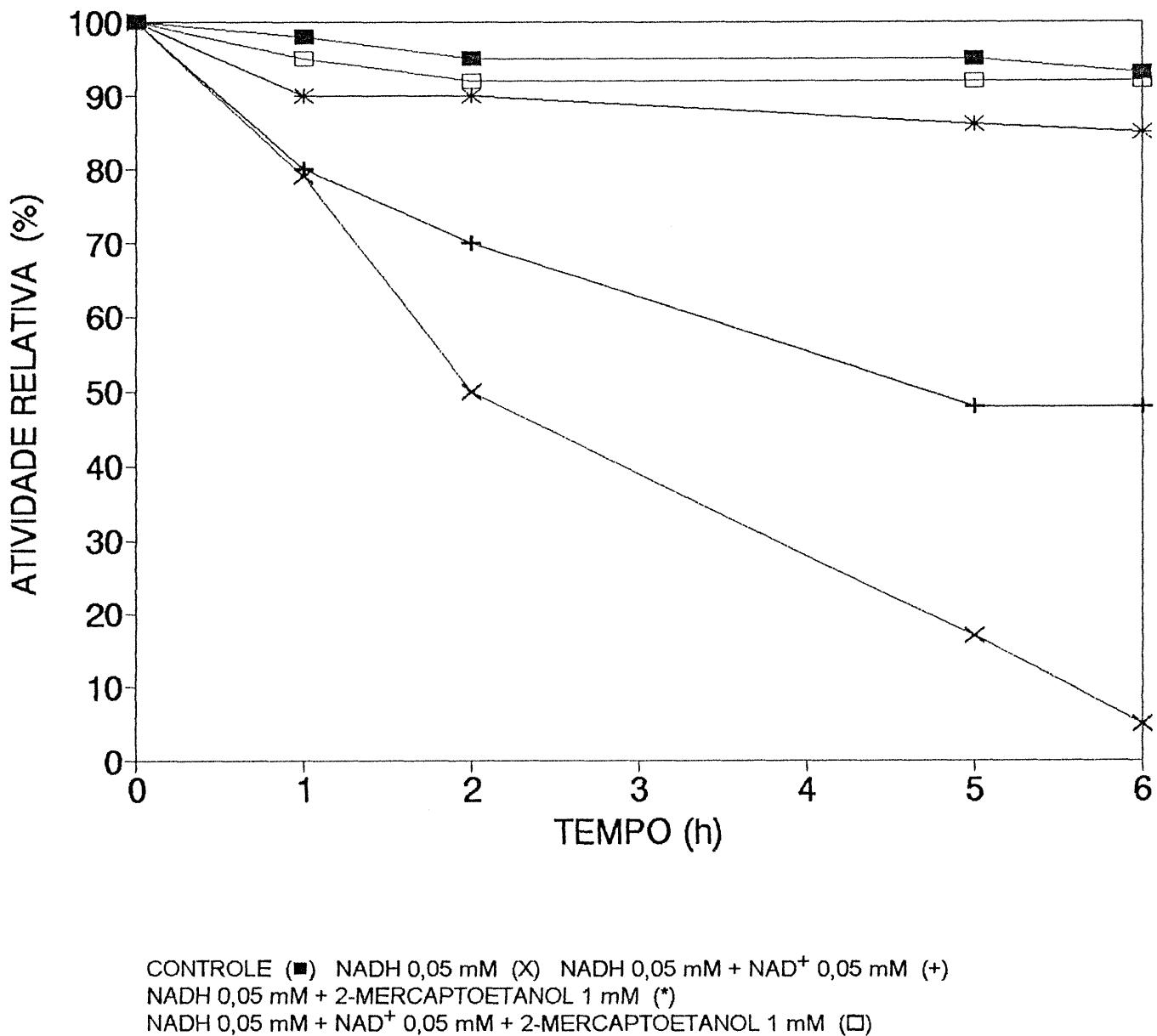
A GPDH de células HeLa apresentou cerca de 95% de inativação após 6 horas de incubação com NADH, enquanto que as enzimas de músculo de coelho (TUCKER & GRISOLIA, 1962), *Caiman sp* (VIEIRA et al, 1984) e *Anas sp* (NAKANO et al, 1991) apresentaram uma inativação em torno de 80% nas mesmas condições.

De acordo com CARR et al, (1965), o NADH modifica a conformação da enzima e os grupos-SH ficam suscetíveis à oxidação pelo oxigênio molecular. O mecanismo de inativação da GPDH pelo NADH (AMELUNXEN & GRISOLIA, 1962) (CARR et al, 1965) pode ocorrer pelos seguintes passos:

- Troca do NAD⁺ ligado pelo NADH;
- Exposição e oxidação dos grupos-SH com a formação do H₂O₂;
- Destrução da atividade da enzima.

Segundo os autores citados anteriormente, a perda de grupos -SH tituláveis pode ser impedida se for adicionado à mistura de incubação ditioeritritol ou cisteína. Em experimentos realizados em condições anaeróbicas ou em presença de nitrogênio (CARR et al, 1965) a enzima não apresentou inativação.

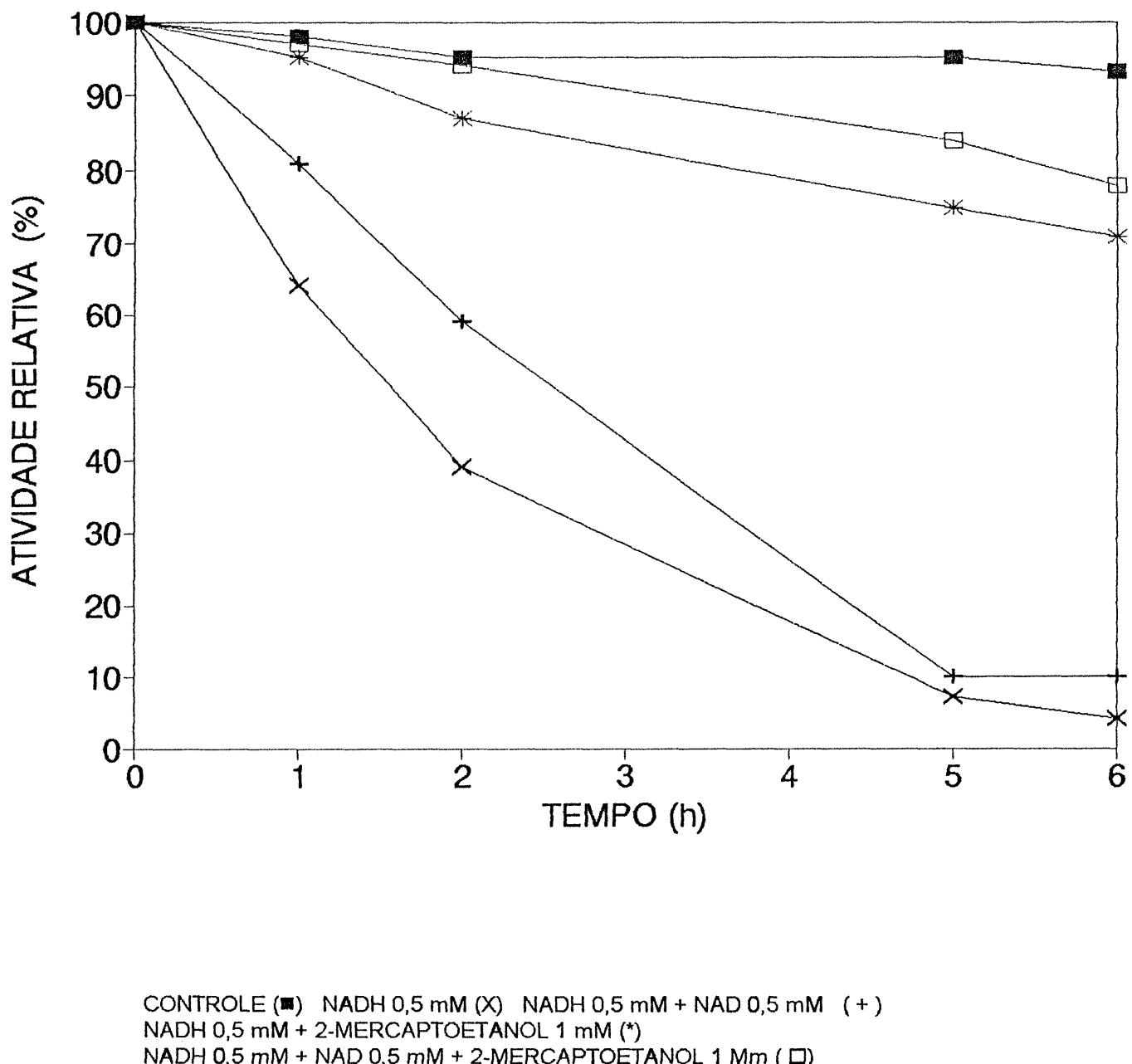
FIGURA 10a : EFEITO DO NADH (0,05 mM) SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa, A 37°C, EM FUNÇÃO DO TEMPO.



CONTROLE (■) NADH 0,05 mM (X) NADH 0,05 mM + NAD⁺ 0,05 mM (+)
 NADH 0,05 mM + 2-MERCAPTOETANOL 1 mM (*)
 NADH 0,05 mM + NAD⁺ 0,05 mM + 2-MERCAPTOETANOL 1 mM (□)

A enzima [2,5 μ M] foi incubada a 37°C em um sistema (0,3 mL) com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2 e EDTA 1 mM na presença de NADH 0,05 mM. A atividade enzimática foi medida em um sistema de incubação com um volume final de 1 mL: tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2 contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptopetanol 1 mM, G3P 1 mM, arseniato de sódio 50 mM, NAD⁺ 1 mM e 0,04 umol de enzima.

FIGURA 10b : EFEITO DO NADH (0,5 mM) SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa, A 37° C, EM FUNÇÃO DO TEMPO



A enzima [2,5 μ M] foi incubada a 37°C em um sistema (0,3 mL) com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2 e EDTA 1 mM na presença de NADH 0,5 mM. A atividade enzimática foi medida como descrito na Figura 10a.

3.9. EFEITO DO EDTA SOBRE A INATIVAÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa PELO NADH, A 37°C

A Tabela V mostra o efeito do EDTA sobre a inativação da enzima pelo NADH, a 37°C, após 6 horas de incubação. Verifica-se que a GPDH [2,5 μ M] na presença de NADH 0,5 mM apresenta cerca de 95% de inativação tanto na presença quanto na ausência de EDTA 1 mM. Este resultado sugere que não há relação entre a inativação por NADH e a presença de metais pesados. Os metais pesados presentes na solução tampão não estariam envolvidos desde que são sujeitos a controle, mas a possibilidade de que o NADH contivesse metais pesados não poderia ser excluída. As GPDHs de músculo de coelho (TUCKER & GRISOLIA, 1962) e de *Caiman sp* (VIEIRA et al, 1984) também apresentaram resultados semelhantes pois o EDTA não influenciou na inativação enzimática induzida pelo NADH.

De acordo com VELICK, (1958), o EDTA estabiliza a enzima durante o processo de purificação e também protege a sua atividade dos efeitos de íons metálicos pesados.

TABELA V: EFEITO DO EDTA SOBRE A INATIVAÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa PELO NADH A 37°C,
APÓS 6 HORAS DE INCUBAÇÃO

	% INATIVAÇÃO (*)				
	CONTROLE		NADH 0,5 mM	NADH 0,5 mM + NAD ⁺ 0,5 mM	NADH 0,5 mM + 2-MSH* 1mM
	A	B	C		
TRATAMENTO 1	7	24	--	95	90
TRATAMENTO 2	--	--	22	96	93
					30
					27

* 2-MSH: 2-mercaptoetanol

CONTROLE A: enzima [2,5 μ M] + tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2 contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1mM.

CONTROLE B: enzima [2,5 μ M] + tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2 contendo EDTA 1mM.

CONTROLE C: enzima [2,5 μ M] + tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2.

TRATAMENTO 1: A enzima [2,5 μ M] foi incubada em um sistema (0,3 mL) contendo tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2, com EDTA 1 mM e as adições indicadas acima.

TRATAMENTO 2: O sistema de incubação foi o mesmo do TRATAMENTO 1, porém o EDTA foi omitido.

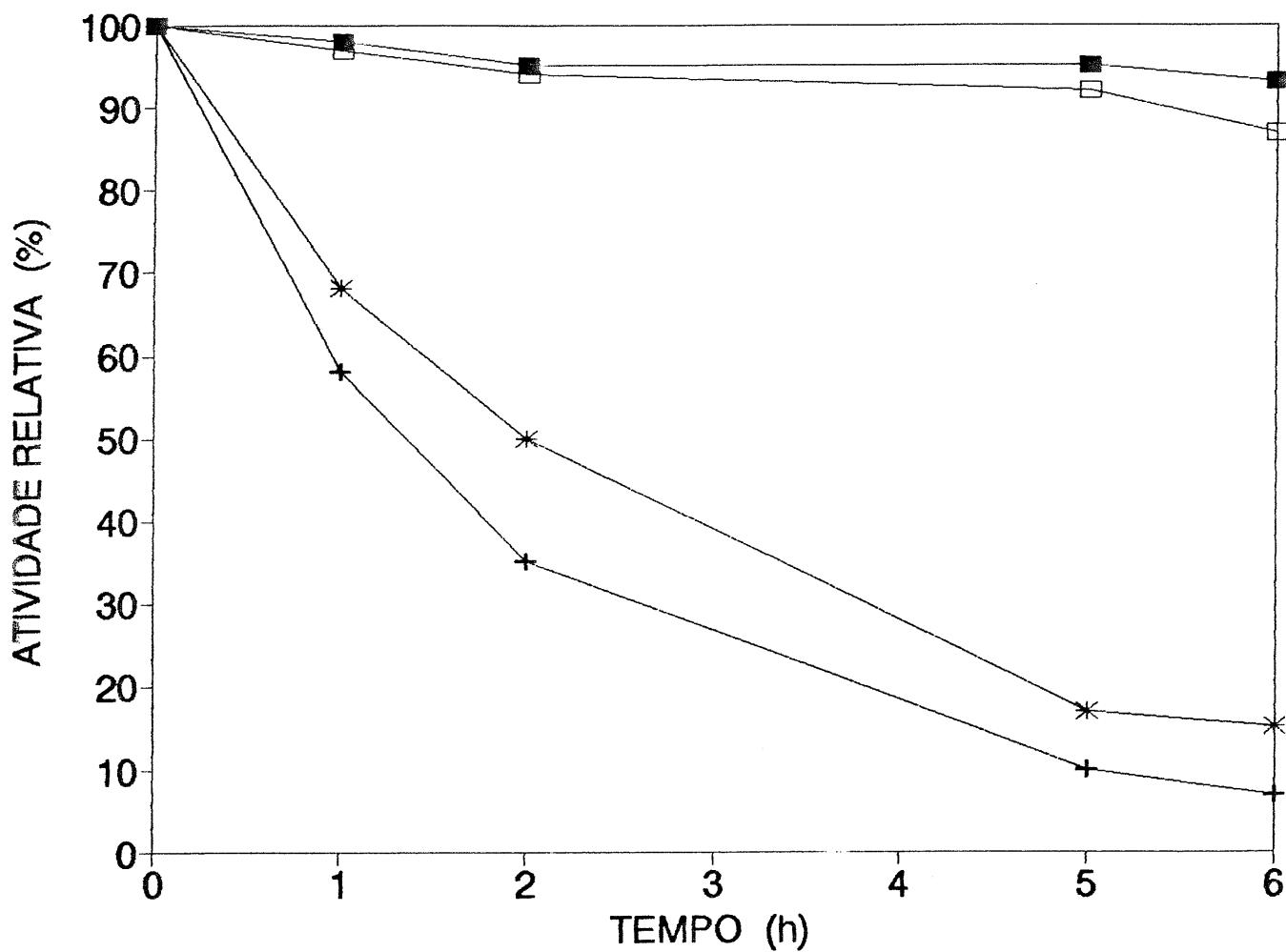
(*) A porcentagem de inativação foi determinada em relação ao tempo zero de incubação. A atividade enzimática foi determinada segundo DAGHER & DEAL Jr., (1977).

3.10. EFEITO DO G3P SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa, A 37 °C, EM FUNÇÃO DO TEMPO

As Figuras 11a e 11b mostram o efeito do G3P sobre a atividade da GPDH de células HeLa, a 37°C. A enzima [2,5 μ M] foi inativada na presença de G3P (0,05 e 0,5 mM). Ao contrário da inativação pelo NADH, o NAD⁺ não apresentou efeito protetor contra a inativação pelo G3P, porém, o 2-mercaptoetanol 1 mM mostrou proteção contra a inativação pelo G3P principalmente na concentração 0,05 mM. A GPDH de células HeLa mostrou-se mais lável quando incubada com o G3P em comparação com as enzimas de músculo de coelho (TUCKER & GRISOLIA, 1962), *Caiman sp* (VIEIRA et al, 1984) e *Anas sp* (NAKANO et al, 1991).

Segundo CARR et al, (1964), o mecanismo de inativação da GPDH pelo G3P não é o mesmo que o do NADH. Os experimentos dos autores mostraram que a enzima era inativada pelo G3P porém não foi verificado perda dos grupos-SH. Em outros experimentos (CARR et al, 1964) incubando a enzima na presença de G3P e NADH, mostraram que o G3P diminui a estabilidade da enzima e potencializa o efeito do NADH.

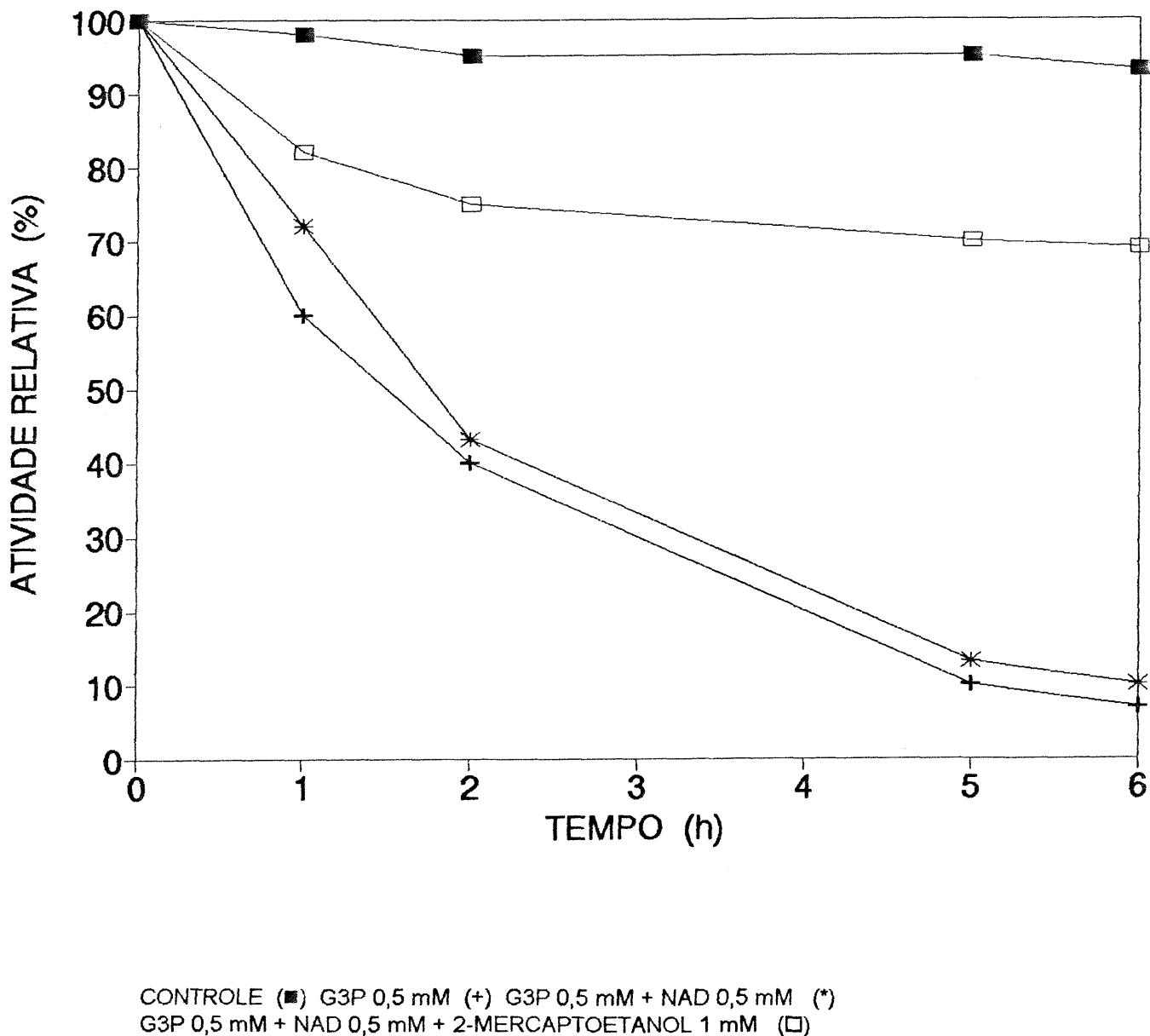
FIGURA 11a : EFEITO DO G3P (0,05 mM) SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa A 37°C, EM FUNÇÃO DO TEMPO



CONTROLE (■) G3P 0,05 mM (+) G3P 0,05 mM + NAD 0,05 mM (*)
 G3P 0,05 mM + NAD 0,05 mM + 2-MERCAPTOETANOL 1 mM (□)

A enzima [2,5 μ M] foi incubada a 37°C em um sistema (0,3 mL) com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2 com EDTA 1 mM em presença de G3P 0,05 mM. A atividade enzimática foi medida em um sistema de incubação com um volume final de 1 mL: tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2 contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptopetanol 1 mM, G3P 1 mM, arseniato de sódio 50 mM, NAD⁺ 1 mM e 0,04 umol de enzima.

FIGURA 11b : EFEITO DO G3P (0,5 mM) SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa A 37°C, EM FUNÇÃO DO TEMPO.



A enzima [2,5 μ M] foi incubada a 37°C em um sistema (0,3 mL) com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2 com EDTA 1 mM em presença de G3P 0,5 mM. A atividade enzimática foi medida como descrito na Figura 11a.

4. DISCUSSÃO FINAL

Em virtude dos poucos relatos na literatura sobre estudos cinéticos de GPDH de fonte tumoral e considerando a importância desta enzima no metabolismo de carboidratos, foram realizadas no presente trabalho algumas análises cinéticas sobre a enzima de células HeLa. Os resultados dessas análises foram comparados com os das outras GPDHs relatadas na literatura.

Para verificar a importância dos grupos-SH na atividade da GPDH de células HeLa foram realizados estudos cinéticos utilizando agentes redutores, íons metálicos divalentes e inibidores de grupos-SH. A presença de grupos-SH na atividade da GPDH foi primeiramente descrito por RAPKINE, (1938), que mostrou a sensibilidade da enzima pela inibição por iodoacetato e metais pesados.

CORI et al, (1948), relataram que a enzima de músculo de coelho era ativada por cisteína. KREBS et al, (1953), mostraram que a GPDH de levedura apresentava atividade máxima somente em presença de agente redutor, o que também foi observado para a GPDH de células HeLa.

SEGAL & BOYER em 1953, estabeleceram a importância dos grupos-SH na atividade da GPDH, demonstrando a formação do intermediário acil-enzima na catálise. Os experimentos foram realizados incubando a enzima com iodoacetato na presença e ausência do substrato (G3P). Foi verificado que o G3P protegia a enzima contra a inibição pelo iodoacetato e concluiram que a combinação do grupo aldeído do G3P com o grupo-SH da enzima formava o acil-enzima.

Comparando os resultados obtidos com a enzima de células HeLa e as outras GPDHs observa-se um comportamento semelhante frente aos agentes redutores, aos íons metálicos divalentes e aos inibidores de grupos-SH. Devido ao fato da GPDH manter sua estrutura primária, principalmente os aminoácidos do sítio catalítico em especial a cys-149, nos estudos cinéticos que envolveram este aminoácido esperava-se que mesmo a enzima originada de uma fonte que regrediu para um estado indiferenciado apresentaria um comportamento semelhante a de

outras enzimas. A manutenção da estrutura da GPDH possivelmente está relacionada com sua grande importância no metabolismo de carboidratos.

No presente trabalho foi verificada a inibição da GPDH de células HeLa por nucleotídeos como ATP, ADP, 5'AMP, 3'-5'AMPc, UDP, CDP e CMP. O significado fisiológico da inibição causada pelos nucleotídeos é tema controverso. Muitos autores (YANG & DEAL Jr, 1969a) (HARRIS & WATERS, 1976) (VIEIRA et al, 1984) (NAKANO et al, 1991) mostraram que o ADP, 5'AMP e o 3'-5'AMPc são inibidores da GPDH *in vitro*, porém com pequena significância fisiológica já que os níveis celulares destes nucleotídeos não são suficientes para causar inibições. Somente o ATP apresentaria concentrações altas suficientes para causar alguma inibição (YANG & DEAL Jr, 1969a) (HARRIS & WATERS, 1976). As concentrações fisiológicas de ATP variam de 1 a 8 mM dependendo da fonte (YANG & DEAL Jr, 1969a).

FRANCIS et al, (1971) elucidaram o mecanismo de inibição dos nucleotídeos de adenina examinando o efeito dos mesmos em cada passo da catálise da enzima, e também nas atividades de esterase e fosfatase da GPDH. Os autores demonstraram que o ATP e o ADP não somente competiam com o sítio de ligação do NAD⁺ , mas também bloqueavam a formação dos intermediários enzima-substrato e a fosforilação do complexo acil-enzima.

Segundo STANCEL & DEAL Jr., (1969), a inibição pelo ATP é tempo dependente e causa a dissociação da enzima em monômeros. Os autores sugerem que a repulsão eletrostática entre as cargas negativas do fosfato e os grupos carregados negativamente do centro ativo da enzima causam as mudanças conformativas que ocasionam a dissociação de enzima.

YANG & DEAL Jr., (1969b), mostraram que quando a GPDH de levedura era incubada com ATP, aumentava a sua suscetibilidade por enzimas proteolíticas. Tanto a dissociação como a suscetibilidade causadas pelo ATP são processos inibidos por NAD (STANCEL & DEAL Jr., 1968), o que sugere o papel deste coenziema no aumento da velocidade da síntese da enzima (DEAL Jr., 1969).

De acordo com OGUCHI et al, (1973), a inibição causada pelo ATP é extremamente dependente de pH. Foram feitos experimentos em concentrações fisiológicas de ATP, NAD⁺ e ortofosfato; e a reação da desidrogenase foi inibida 87% em pH 6,8 , 67% em pH 7,4 e somente 20% em pH 8,1.

YANG & DEAL Jr., (1969a), demonstraram que a GPDH de levedura era inibida por vários nucleotídeos e os resultados levaram à elucidação de algumas características principais no mecanismo de ligação do coenzima NAD⁺. Segundo os autores, as duas metades da nicotinamida-adenina tem funções separadas, a metade nucleotídeo-adenina está principalmente envolvida na ligação enquanto que a metade nucleotídeo-nicotinamida estaria envolvida na catálise. O grupo 6-amino da metade nucleotídeo-adenina e o grupo hidroxila-2' da ribose são essenciais para a ligação. A importância do anel adenina na ligação do NAD⁺ foi demonstrada para outras desidrogenases, como a álcool desidrogenase de levedura (HOCH et al, 1960; ANDERSON et al, 1965) e de fígado (THEORELL & YONETANI, 1964).

A GPDH de células HeLa, semelhante às outras enzimas descritas na literatura foi inativada por NADH e G3P, a 37° C. Nos experimentos foram utilizadas as concentrações fisiológicas de NADH [0,1 a 0,5 mM] encontradas em músculo (GLOCK & McLEAN, 1955). Segundo TUCKER & GRISOLIA, (1962) o aumento da instabilidade das enzimas na presença dos substratos ou coenzimas em condições *in vitro* poderia ter significado fisiológico. Porém deve-se considerar que a dinâmica do metabolismo da célula tumoral difere das células normais principalmente na via glicolítica. Uma das características importantes das células tumorais, como as células HeLa, é o aumento da capacidade glicolítica e o aumento na formação de lactato pela glucose na presença de oxigênio (EIGENBRODT & GLOSMANN, 1980). O NADH citossólico formado é removido pela lactato desidrogenase presente em alta atividade (OLIVEIRA, 1986), pela lançadeira de equivalentes redutores no citossol para a mitocôndria, malato-aspartato (BASTOS et al, 1990) e pelo sistema redox transmembrana plasmática (NAVAS et al, 1986; OLIVEIRA et al, 1989). Tais atividades juntas poderiam aumentar a razão NAD⁺ /NADH do citossol, tor-

nando sem significado *in vivo* a inativação pelo NADH observada *in vitro*, na GPDH.

O controle do nível e da atividade da GPDH são questões relevantes que podem ser analisadas. A GPDH está presente em abundância em muitos tecidos como músculo de coelho (CORI et al, 1948) constituindo 10% da proteína solúvel e em levedura (KREBS et al, 1953) constituindo 20% do total de proteína solúvel. Entretanto foi demonstrado por CORI et al, em 1948 que em pHs baixos encontrados nas células musculares, a atividade catalítica da GPDH parece ser somente uma fração da sua atividade máxima em pHs alcalinos. Isto poderia explicar a abundância desta enzima no músculo (YANG & DEAL Jr., 1969a). Outros autores (GERSON et al, 1982; BRAVO & MAC DONALD-BRAVO, 1986) relataram que no início dos eventos mitóticos ocorre alcalinização do citoplasma que é seguido por um estímulo da via glicolítica (ROSENGURT, 1980), e essas mudanças de pH poderiam alterar a atividade da GPDH.

Informações recentes encontradas na literatura, mostram que os grupos-SH da GPDH, essenciais para a atividade enzimática, estão também envolvidos na regulação desta atividade. STAMLER e colaboradores mostraram que a S-nitrosilação de grupos tióis livres pode modular a atividade de certas enzimas (STAMLER et al, 1992) (STAMLER et al, 1992) (STAMLER et al, 1992). Outros autores (MOLINA Y VEDIA et al, 1992) sugeriram que uma nova e importante ação do óxido nítrico (NO), *in vivo*, seria a S-nitrosilação da GPDH, a qual produziria a inibição da sua atividade enzimática. O nitrosil tem também sido implicado na inibição de outras enzimas SH-dependente (DEMASTER et al, 1984).

Os resultados dos estudos cinéticos realizados neste trabalho mostraram que a GPDH de células HeLa apresentou comportamento semelhante às outras GPDHs estudadas.

5. CONCLUSÕES

5.1. Com relação aos estudos cinéticos que envolvem grupos-SH da enzima pode-se concluir que a GPDH de células HeLa, semelhante às outras já estudadas, é uma enzima SH-dependente em virtude de

- a) apresentar ativação máxima somente em presença de 2-mercaptopetanol ou ditioglicol [1 mM];
- b) ser totalmente inibida por íons metálicos divalentes HgCl_2 , CuCl_2 e CdCl_2 [1 e 2 mM];
- c) apresentar inibição total na presença de ρ -CMB e ρ -HMB [0,01 mM];
- d) e apresentar cerca de 80% de inibição frente a outros inibidores de grupos-SH (iodoacetamida, N-etilmaleimida e 2-cloro 4-aminobenzoato) [0,1 mM].

5.2. Os nucleotídeos ADP, 5'-AMP e 3'-5'AMPc inibem competitivamente a enzima em relação ao NAD^+ e os valores de K_i encontrados para estes nucleotídeos foram 2,1, 1,0 e 0,6 mM, respectivamente.

5.3. Comparando o efeito dos nucleotídeos testados (ATP ADP, 5'-AMP, 3'-5'AMPc, UDP, CDP e CMP) sobre a atividade da GPDH de células HeLa, pode-se concluir:

- a) que o 3'-5'AMPc é o mais potente inibidor da enzima, *in vitro*;
- b) que a GPDH apresenta uma pronunciada especificidade por bases adenina, já que estas inibiram mais a enzima do que os nucleotídeos de outras bases.

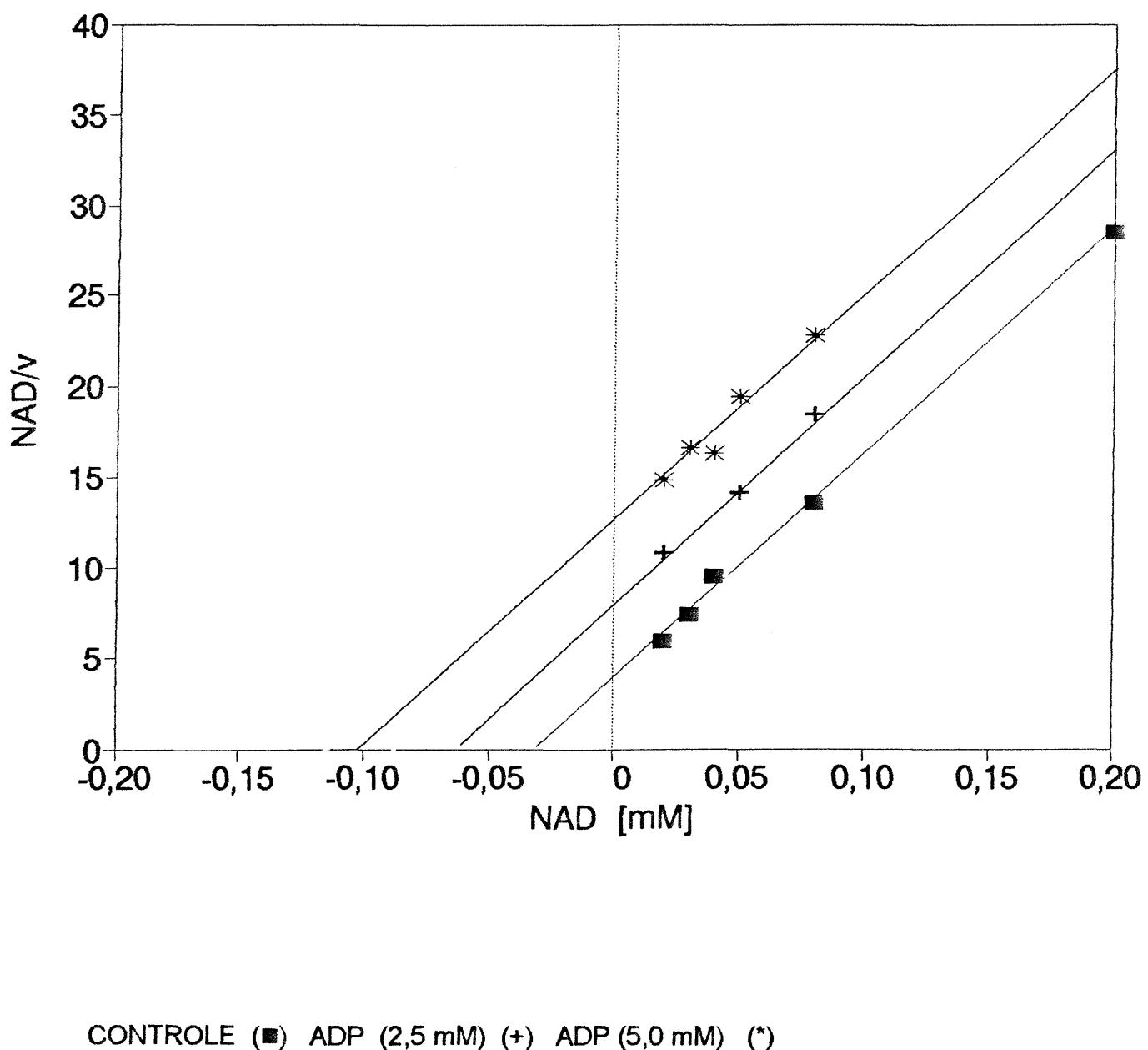
5.4. A GPDH de células HeLa [2,5 μM] foi inativada quando incubada com NADH ou G3P (0,05 e 0,5 mM), a 37°C, em condições aeróbicas. O 2-mercaptopetanol (1 mM) protegeu a enzima contra a inativação pelo NADH e pelo G3P.

5.5. O EDTA não afeta a estabilidade da enzima em relação à inativação pelo NADH, mostrando que não há relação entre a inativação pelo NADH e a presença de metais pesados.

5.6. Em relação aos estudos cinéticos realizados, a GPDH de células HeLa (fonte tumoral) apresentou um comportamento semelhante ao das outras GPDHs de fonte normais já estudadas.

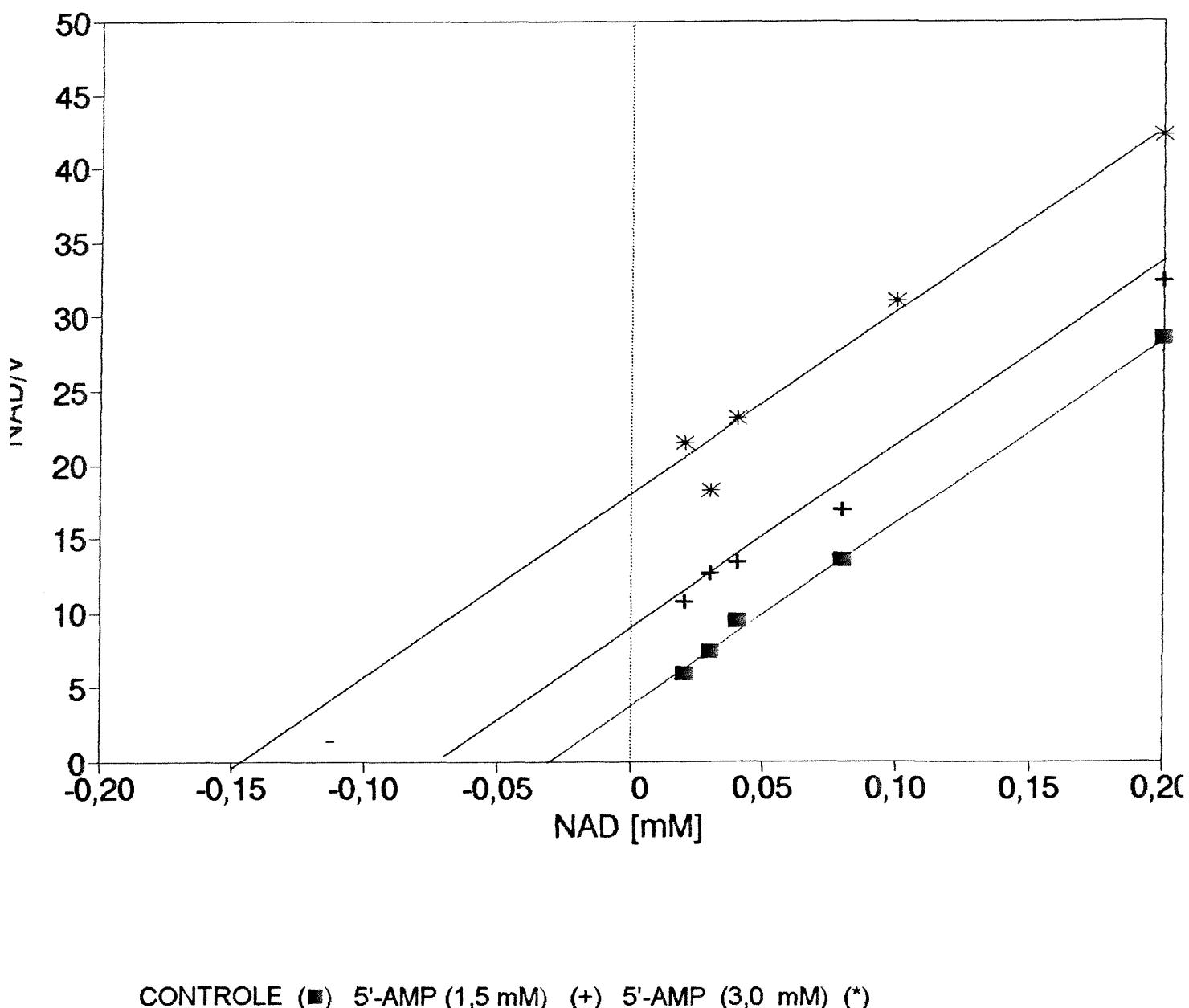
6. ANEXO

FIGURA 4b : INIBIÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa PELO ADP



O procedimento experimental está descrito na legenda da Figura 4a.
 O valor da constante de inibição (K_i) calculado a partir da relação de MASSEY (1953) é de 2,1 mM.

FIGURA 5b : INIBIÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa PELO 5'-AMP

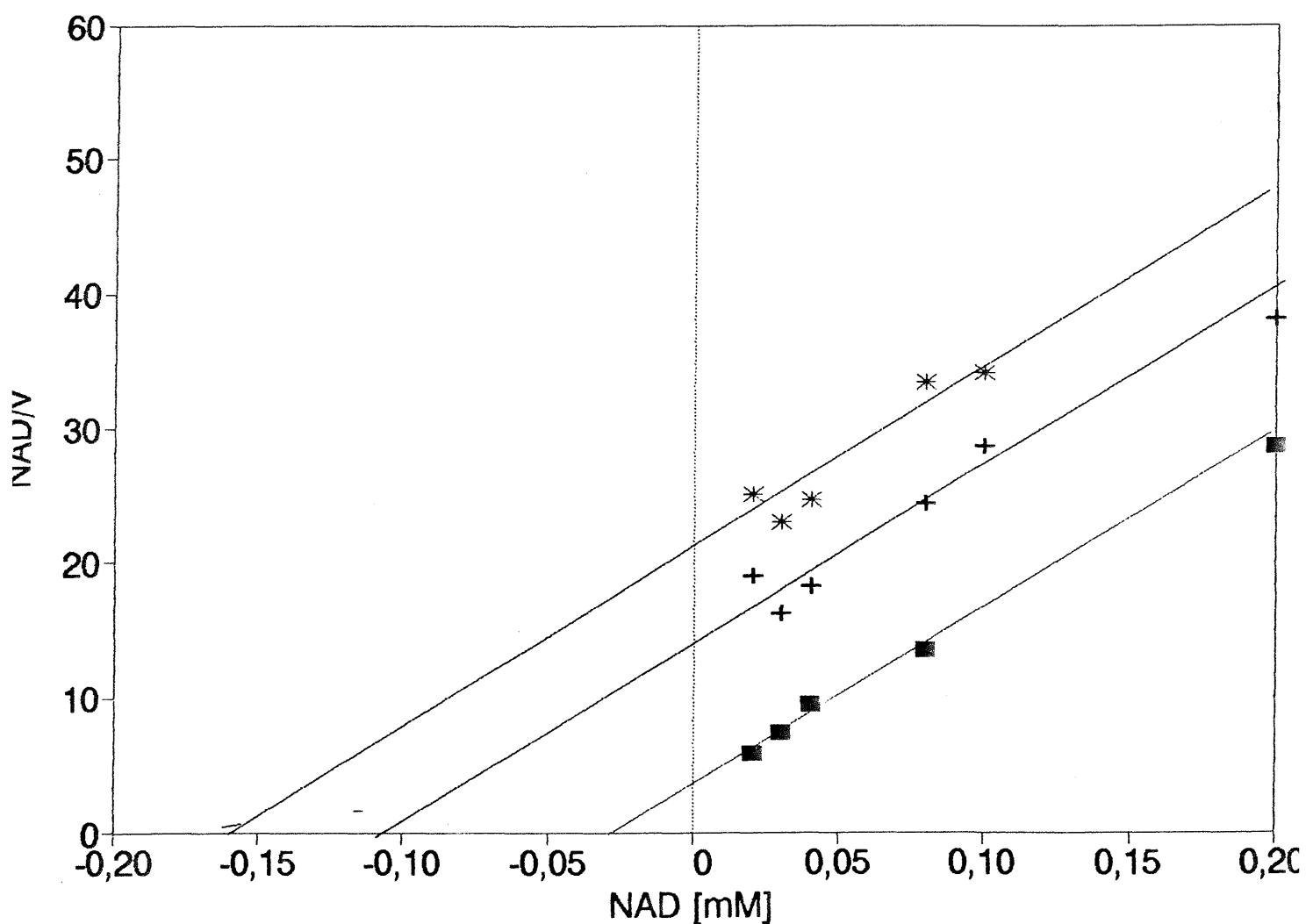


CONTROLE (■) 5'-AMP (1,5 mM) (+) 5'-AMP (3,0 mM) (*)

O procedimento experimental está descrito na legenda da Figura 5a.

O valor da constante de inibição calculado a partir da relação de MASSEY (1953) é de 0,9 mM.

FIGURA 6b : INIBIÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa PELO 3'-5AMPc



CONTROLE (■) 3'-5'AMPc (1,5 mM) (+) 3'-5'AMPc (3,0 mM) (*)

O procedimento experimental está descrito na legenda da Figura 6a.

O valor da constante de inibição (K_i) calculado a partir da relação de MASSEY (1953) é de 0,6 mM.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLISON, W.S.; KAPLAN, N.O. The comparative enzymology of triosephosphate dehydrogenase. J.Biol.Chem., Baltimore, v.239, p.2140-2152, 1964.
2. AMELUNXEN, R. E.; GRISOLIA, S. The mechanism of trisephosphate dehydrogenase inactivation by reduced diphosphopyridine nucleotide. J. Biol Chem., Baltimore, v. 237. p. 3240-3244, 1962.
3. AMELUNXEN, R.E. Some chemical and properties of thermostable glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. Biochim.Biophys.Acta, Amsterdam, v.139, p.24-32, 1967.
4. ANDERSON, B.M.; REYNOLDS, M.L.; ANDERSON, C.D. Hydrophobic interactions of inhibitors with yeast alcohol dehydrogenase. Biochim.Biophys.Acta, Amsterdam, v.99, p.46-55, 1965.
5. 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.
6. BASTOS, M.T.; OLIVEIRA, M.B.M.; CAMPELLO, A.P.; KLUPPEL, M.L.W. Methotrexate studies on cellular metabolism. IV. Effect on the mitochondrial oxidation of cytosolic reducing equivalents in HeLa cells. Cell Biochem.Function, Chichester, v.8, p.194-203, 1990.
7. BATKE, J.; KELETI, T.; FISCHER, E. The mechanism of reaction of cys-149 of D-glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase with p-hidroxymercuribenzoate. Eur.J.Biochem., Heidelberg, v.46, p.307-315, 1974.

8. BRAVO, R.; MAC DONALD-BRAVO, H. Effect of pH on the induction of competence and progression to the S-phase in mouse fibroblasts. FEBS Lett., Amsterdam, v.195, p.309-312, 1986.
9. CAPUTTO, R.; DIXON, M. Crystallization and identity of the Triose and Triosephosphate dehydrogenase of muscle. Nature, London, v.156, p.630-631, 1945.
10. CARLSON, C. W.; BROSEMER, R. W. Comparative structural properties of insect triosephosphate dehydrogenase. Biochemistry, Washington, v.10, p.2113-2119, 1971.
11. CARR, D. O.; AMELUNXEN, R.; CURRAN, G.; GRISOLIA, S. Mechanism of DPNH induced decrease in stability of triosephosphate dehydrogenase. Fed. Proc., Bethesda, v.23, p.277, 1964.
12. CARR, D.O.; AMELUNXEN, 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.
13. CONWAY, A.; KOSHLAND Jr., D.E. Negative cooperativity in enzyme action. The binding of diphosphopyridine nucleotide to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry, Washington, v.7, p.4011-4022, 1968.
14. COOK, R.A.; KOSHLAND Jr., D.E. Positive and negative cooperativity in yeast glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase. Biochemistry, Washington, v.9, p.3337-3342, 1970.

15. 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.
16. CORI, G.T.; SLEIN, M.W.; CORI, C.F. Crystalline D-glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase from rabbit muscle. J.Biol.Chem., Baltimore, v.173, p.605-618, 1948.
17. DAGHER, S.M.; DEAL Jr., W.C. Pig liver glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase: Purification, cristallization and characterization. Arch.Biochem.Biophys., Duluth, v.179, p.643-653, 1977.
18. 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.
19. DAVIDSON,B.E.;SAJGO, M.; NOLLER, H.F.; HARRIS, J.I. Aminoacid sequence of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from lobster muscle. Nature, London, v.216, p.1181-1185, 1967.
20. DAWSON, R.M.C.; ELLIOTT,D.C.; ELLIOTT, W.H.; JONES, K.M. Data for biochemical research. 3.ed. New York: Oxford Science publications, p. 580, 1986.
21. 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.

22. DEMASTER, E.G.; SHIROTA, F.N.; NAGASAWA, H.T. The metabolic activation of cyanamide to an inhibitor of aldehyde dehydrogenase is catalyzed by catalase. Biochim.Biophys.Res.Comm., Duluth, v.122, n.1, p.358-365, 1984.
23. DUGGLEBY, R.G.; 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.
24. DUGGLEBY, R.G.; DENNIS, D.T. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from pea seeds. Methods Enzymol., New York, v.89, p.320-321, 1982.
25. EBY, D.; KIRTLEY, M.E. Isolation and characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human erythrocyte membranes. Arch.Biochem.Biophys., Duluth, v.198, p.608-613, 1979.
26. EIGENBRODT, E.; GLOSSMAN, H. Glycolysis-one of the keys to cancer ? Trends Pharmacol.Sci., Cambridge, v.9, p.240-245, 1980.
27. ELLENRIEDER, G.; KIRSCHNER, K.; SCHUSTER, I. The binding of oxidized and reduced nicotinamide adenine-dinucleotide to yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Eur.J.Biochem., Heidelberg, v.26, p.220-236, 1972.
28. ELÖDI, 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.

29. FERDINAND, W. The isolation and specific activity of rabbit-muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochem.J., London, v.92, p. 578-585, 1964.
30. 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.
31. FUJITA, S.C.; OSHIMA, T.; IMAHORI, K. Purification and properties of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*, strain HB 8. Eur.J.Biochem., Heidelberg, v.64, p.57-68, 1976.
32. FURFINE, C.S.; VELICK, S.F. The acyl-enzyme Intermediate and kinetic mechanism of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase reaction. J.Biol.Chem., Baltimore, v.240, p. 844-855, 1965.
33. GERSON, D.F.; KIEFER, H.; EUFE, W. Intracellular pH of mitogen stimulated lymphocytes. Science, Washington, v.216, p.1009-1010, 1982.
34. GLOCK, G. E., McLEAN, P. Levels of oxidized and reduced diphosphopyridine nucleotide and triphosphopyridine nucleotide in animal tissues. Biochem. J., v. 61, p. 388-390, 1955.
35. GOMES, E.M.; FUNAYAMA, S.; OLIVEIRA, M.B.M.; BRUEL, S.L.; NAKANO, M. D-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from HeLa cells II. Immunological characterization. Comp.Biochem.Physiol.,Oxford, v.102B, n.4, p.879-884,1992.

36. GOODMAN, M. Protein sequence in phylogeny. In.: AYALA, F.J. ed. Molecular evolution. Sunderland: Sinauer, 1976. p.141-159.
37. GREENE, F.C.; FEENEY, R.E. Properties of muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from cold adapted Antarctic fish *Dissostichus mawsoni*. Biochim.Biophys.Acta, Amsterdam, v.220, p.430-442, 1970.
38. GRISSON, F.E.; KAHN, J.S. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Euglena gracilis*. Arch. Biochem. Biophys., Duluth, v.171, p.444-458, 1975.
39. HANES, C.S. Studies on plant amylases. I. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. Biochem.J., v.26, p.1406-1421, 1932.
40. HARRIGAN, P.J.; TRENTHAM, D.R. Reactions of D- glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with chromophoric thiol reagents. Biochem.J., London, v.124, p.573-580, 1971.
41. HARRIS, J.I.; PERHAM, R. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from pig muscle. Nature, London, v.219, p.1025-1028, 1968.
42. HARRIS, J.I.; WATERS, M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase In: BOYER, P.D. ed. Oxidation-Reduction; Part C: Dehydrogenase (II) Oxidases (II) Hydrogen peroxidases cleavage. 3.ed. New York: Academic, 1976. p.1-49. (The enzymes, 13).
43. HOCH, F.L.; MARTIN, R.G.; WACKER, W.E.C.; VALLEE, B.L. Adventitious inhibition of yeast alcohol dehydrogenase. Arch.Biochem.Biophys., Duluth, v.91, p.166-172, 1960.

44. 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.
45. HOOD, W.; CARR, N.G. A single glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase active with NAD⁺ and NADP in *Anabaena variabilis*. Biochim.Biophys.Acta, Amsterdam, v.146, p.309-311, 1967.
46. 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.
47. JONES, G.M.T.; HARRIS, J.I. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: aminoacid sequence of enzyme from backer's yeast. FEBS Lett., Amsterdam, v.22, p.185-189, 1972.
48. KIRSCHNER, K.; EIGEN, M.; BITTMAN, R.; VOIGT, B. The binding of nicotinamide-adenine dinucleotide to yeast glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase : temperature-jump relaxation studies on the mechanism of allosteric enzyme. Proc.Nat.Acad.Sci.USA., Washington, v.56, p.1661-1667, 1966.
49. KIRSCHNER, K.; GALLEGOS, E.; SCHUSTER, I.; GOODALL, D. Cooperative binding of nicotinamide-adenine dinucleotide to yeast glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase. I. Equilibrium and temperature-jump studies at pH 8,5 and 40°C. J.Biol.Chem., Baltimore, v.58, p.29-50, 1971.

50. KIRSCHNER, K. Cooperative binding of nicotinamide-adenine dinucleotide to yeast glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase. II. Stopped-flow studies at pH 8,5 and 40°C J.Biol.Chem., Baltimore, v.58, p.51-68, 1971.
51. KOCHMAN, M.; GOLEBIOWSKA, J.; BARANOWSKI, T.; DEDMAN, J.R.; FODGE, D.W.; HARRIS, B.G. Studies on enzymes from parasitic helminthes- V. Purification and characterization of glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase from *Ascaris suun* muscle. Comp.Biochem.Physiol., Oxford, v.52B, p.301-306, 1975.
52. KOLB,E.; HARRIS, J.I. Purification and properties of glycolytic cycle enzymes from coelacanth (*Latimeria chalumnae*) Biochem.J., London, v.130, p.26, 1972.
53. KREBS, E.G.; RAPTER, G.W.; JUNGE, J.M. Yeast- glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. II. Yeast protein. J.Biol.Chem., Baltimore, v.200, p.479-492, 1953.
54. 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.10, p.359-364, 1979.
55. LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of the enzyme dissociation constants. J.Am.Chem.Soc., Washington, v.56, p.658-666, 1934.
56. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem., Baltimore, v.193, p.265-275, 1951.

57. MASSEY, V. Studies on fumarase. 4. The effects of inhibitors on fumarase activity. Biochem.J., London, v.55, p.172-177, 1953.
58. 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.
59. MOLINA Y VEDIA, L.; MC DONALD, B.; REEP, B.; BRÜNE, B.; DI SILVIO, M.; BILLIAR, T.R.; LAPETINA, E.G. Nitric Oxide-induced S-nitrosylation of glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADP-ribosylation. J.Biol.Chem., Baltimore, v.267, n.35, p.24929-24932, 1992.
60. MONOD, J.; WYMAN, J.; CHANGEUX, J.P. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. J.Mol.Biol., London, v.12, p.88-118, 1965.
61. NAGRADOVA, N.K.; SAFRONOVA, 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.
62. NAKANO, M.; ESTEVES, R.P.; BRUEL, S.L. Muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Anas sp.* II- New data on enzyme characterization. Comp.Biochem.Physiol., Oxford, v.98B, n.1, p.29-32, 1991.

63. 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.102B, n.4, p.873-877, 1992.
64. NAVAS, P.; SUN, I.L.; MORRÉ, D.J.; CRANE, F.L. Decrease of NADH in HeLa cells in the presence of transferrin or ferricyanide. Biochim.Biophys Res.Comm., Duluth, v.135, p.110-115, 1986.
65. 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.5562-5570, 1973.
66. OLIVEIRA, M.B.M. Estudos dos efeitos de metotrexato sobre alguns parâmetros metabólicos em células HeLa e em fígado perfundido. Curitiba, 1986. 107p. Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade Federal do Paraná.
67. OLIVEIRA, M.B.M.; CAMPOLLO, A.P.; KLUPPEL, M.L.W. Methotrexate: Studies on cellular metabolism. II. Effect on transplasma redox activity and on ferricyanide induced proton extrusion by HeLa cell. Cell Biochem.Function, Chichester, v.7, p.135-137, 1989.
68. OHKUBO, M.; SAWADA, K.; SAKIYAMA, S. Enhanced expression of 37,000 dalton protein in human lung cancers. JPN.J.Cancer Res., Tokyo, v.77, p.546-553, 1986a.

69. OHKUBO, M.; NAKAMURA, Y.; TOKUNAGA, 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.77, p.554-559, 1986b.
70. 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.
71. PAUL, J. Media for culturing cells and tissues in Cell and Tissue Culture. 4.ed. London: Churchill Livingstone, 1973. p.86-119.
72. PHILLIPS, H.J. Dye exclusion tests for cell viability. In: KRUSE, M.K. ed Tissue Culture, methods and applications. New York: Academic Press, 1973. p.406-408.
73. RAPKINE, L. Sulphydryl groups and enzymic oxido-reduction. Biochem.J., London, v.32, p.1729-1739, 1938.
74. REITZER, L.J.; WICE, B.M.; KENNEL, D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy sources for cultured HeLa cells. J.Biol.Chem., Baltimore, v.254, p.2669-2676, 1979.
75. ROSENGURT, E. Stimulation of DNA synthesis in quiescent cultured cells: exogenous agents internal signals and early events. In: HORECKER, B.L.; STADMEN, E.R. ed Current Topics in Cellular Regulation. New York: Academic Press. 1980. v.17, p.59-88.

76. SCHULMAN, M.D.; GIBBS, M. D-Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase of higher plants. Plant physiol., Bethesda, v.43, p.1805-1812, 1968.
77. SEGAL, H.L.; BOYER, P.D. The role of the sulphydryl groups in the activity of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J.Biol.Chem., Baltimore, v.204, p.265-281, 1953.
78. SEYDOUX, F.; BERNHARD, S.; PFENNINGER, O.; PAYNE, M.; MALHOTRA, O.P. Preparation and active site specific properties of sturgeon muscle glyceraldehyde-3 -phosphate dehydrogenase. Biochemistry, Washington, v.12, p.4290-4300, 1973.
79. 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.
80. STAMLER, J.S.; SIMON, D.I.; OSBORNE, J.A.; MULLINS, M.; JARAKI, O.; MICHEL, T.; SINGEL, D.; LOSCALZO, J. S-Nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. Proc.Natl.Acad.Sci.USA., Washington, v.89, p.444-448, 1992.
81. STAMLER, J.S.; SIMON, D.I.; JARAKI, O.; OSBORNE, J.A.; FRANCIS, S.; MULLINS, M.; SINGEL, D.; LOSCALZO, J. S-Nitrosylation of tissue-type plasminogen activator confers vasodilatory and antiplatelet properties on the enzyme. Proc.Natl.Acad.Sci.USA., Washington, v.89, p.8087-8091, 1992.
82. STAMLER, J.S.; SINGEL, D.; LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. Science, Washington, v.258, p.1898-1902, 1992.

83. STANCEL, G.M. ; DEAL Jr., W.C. Metabolic control and structure of glycolytic enzymes. V. Dissociation of yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase into subunits by ATP. Biochim.Biophys Res.Comm., Duluth, v.31, p.398-403, 1968.
84. STANCEL, G.M. ; DEAL Jr., W.C. Reversible dissociation of yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by adenosine triphosphate Biochemistry, Washington, v.8, p.4005-4011, 1969.
85. SUZUKI, K.; HARRIS, J.I. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* FEBS Lett., Amsterdam, v.13, p.217-220, 1971.
86. 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.
87. THEORELL, H.; YONETANI, T. Studies on liver alcohol dehydrogenase complexes. IV. Spectrophotometric observations on the enzyme complexes. Arch.Biochem.Biophys., Duluth, v.106, p.252-258, 1964.
88. TRENTHAM, D.R. Aspects of chemistry of D-glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase. Biochem.J., London, v.109, p.603-612, 1968.
89. TRENTHAM, D.R. Reactions of D-glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase facilitated by oxidized nicotinamide-adenine- dinucleotide., Biochem.J., London, v.122, p.59-69, 1971.

90. TUCKER, D.; GRISOLIA, S. Inactivation of muscle triosephosphate dehydrogenase by diphosphopyridine nucleotide at physiological concentrations. J.Biol.Chem., Baltimore, v.237, p.1068-1073, 1962.
91. VELICK, S.F. Coenzyme binding and thiol groups of glyceradehyde-3-phosphate dehydrogenase. J.Biol.Chem., Baltimore, v.203, p.563-573, 1953.
92. VELICK, S.F. Fluorescence spectra and polarization of glyceradehyde-3-phosphate dehydrogenase and lactic dehydrogenase coenzyme complexes. J.Biol.Chem., Baltimore, v.233, p.1455-1467, 1958.
93. VELICK, S.F.; FURFINE, C. Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase. In: BOYER, P.D.; LARDY, H.; MYRBACK, K. eds. Oxidation and Reduction; Part A: Nicotinamide Nucleotide-linked enzymes. Flavin nucleotide-linked enzymes. 2 ed. New York, Academic Press, 1963, p.243-273. (The Enzymes, 7).
94. 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.74B, n.4, p.781-790, 1983.
95. VIEIRA, M.M.; VEIGA, L.A.; NAKANO, M. Muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Caiman sp.* II. New data for enzyme characterization. Comp.Biochem.Physiol., Oxford, v.79B, n.3, p.427-433, 1984.

96. 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, p.2806-2812, 1969a.
97. YANG, S.T., DEAL Jr., W.C. Metabolic control and structure of glycolytic enzymes. VII. Destabilization and inactivation of yeast glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase by adenosine phosphates and chymotrypsin. Biochemistry, Washington, v.8, p.2814-2820, 1969b.
- 98.-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.
99. WARBURG, O.; CHRISTIAN, H. Isolierung und kristallisation des proteins des oxydierenden garungs ferment. Biochem.Z., Brunsurck, v.303, p.40-68, 1939.
100. WARBURG, O.; CHRISTIAN, H. Isolierung und kristallisation des garungs ferment enolase. Biochem.Z., Brunsurck, v.310, p.384-421, 1941.
101. WEBB, J.L. Enzyme and metabolic inhibitors. New York: Academic Press, 1966a. v.2, p.635-653, 701-721, 729-874.
102. WEBB, J.L. Enzyme and metabolic inhibitors. New York: Academic Press, 1966b. v.3, p.1-167, 337-373.

103. WEBER, G. Enzymology of cancer cells. First of two parts. N.Eng.J.Med., London, v.296, p.486-493, 1977a.
104. WEBER, G. Enzymology of cancer cells. Second of two parts. N.Eng.J.Med., London, v.296, p.541-551, 1977b.