

VALMA MARTINS BARBOSA

**Purificação e Propriedades da Gliceraldeído-3-Fosfato  
Desidrogenase de Músculo de *Anas sp* (pato)**

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

CURITIBA  
1985

TESE ORIENTADA PELA PROFESSORA

DRA. MOMOYO NAKANO

AO MEU MARIDO  
PELO SEU INCENTIVO

## AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Momoyo Nakano, pela orientação da tese e pela amizade.

Às professoras Dra. Kazuko Hishida do Nascimento, Dra. Maria Lúcia Wambier Kluppel e Liu Un Rigo pela revisão da tese.

Ao professor Celso Carnieri do Departamento de Matemática pela análise computacional.

Ao professor Guido Ferencz do Departamento de Farmácia pela realização das fotografias.

Ao Dr. João Caetano Fortes do Departamento de Morfologia pelo empréstimo do espectrofotômetro Perkin-Elmer.

À Dra. Muriel Mourão Vieira pelo auxílio e apoio.

À Sra. Ruth L. dos Santos pela revisão bibliográfica.

Aos professores, funcionários e amigos do Departamento de Bioquímica pela atenção e carinho.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica pela contribuição na confecção desse trabalho.

À CAPES pelo suporte financeiro.

## INDICE

LISTA DE FIGURAS E TABELAS .....	viii
ABREVIATURAS .....	x
RESUMO .....	xi
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	10
2.1 - Materiais .....	10
2.2 - Métodos .....	10
2.2.1 - Determinação de proteína .....	10
2.2.2 - Atividade enzimática .....	10
2.2.3 - Unidade de enzima .....	11
2.2.4 - Preparação e ensaio do gliceraldeído -3-fosfato .....	11
2.2.5 - Determinação da concentração do NAD e do NADH .....	12
2.2.6 - Processo de purificação .....	12
2.2.6.1 - Extração .....	13
2.2.6.2 - Fracionamento com sulfato de amônio .....	13
2.2.6.3 - Cromatografia em DEAE-Se - phadex A-50 .....	14
2.2.6.4 - Manutenção da enzima .....	14
2.2.7 - Eletroforese de zona em fitas de po- liacetato de celulose .....	15
2.2.8 - Eletroforese em gel de poliacrilami- da em presença de dodecil sulfato de sódio .....	15
2.2.9 - Eletroforese de disco em gel de po- liacrilamida .....	16
2.2.10- Cromatografia em gel sephadex G-150.	17

2.2.11 - Dosagem dos grupos -SH .....	18
2.2.11.1 - Dosagem dos grupos -SH "rápidos" .....	18
2.2.11.2 - Dosagem dos grupos -SH "totais" .....	19
 3. RESULTADOS	
3.1 - Purificação da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase .....	20
3.2 - Estabilidade da enzima .....	20
3.3 - Critérios de pureza .....	20
3.4 - Determinação do peso molecular .....	21
3.5 - Propriedades óticas e conteúdo em NAD .....	21
3.6 - Efeito do pH sobre a atividade enzimática ..	22
3.7 - Determinação da concentração ótima de arsênio .....	22
3.8 - Efeito da concentração do gliceraldeído-3-fosfato. Determinação da constante de Michaelis-Menten. ....	22
3.9 - Efeito da concentração do NAD. Determinação da constante de Michaelis-Menten .....	22
3.10- Efeito inibitório do produto da reação, NADH, sobre a atividade enzimática. ....	23
3.11- Efeito de íons metálicos divalentes sobre a atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. ....	23
3.12- Titulação dos grupos -SH .....	24
3.13- Efeito de reagentes sulfidrilas na atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de <u>Anas sp.</u> .....	24
 4. DISCUSSÃO .....	38

5.	CONCLUSÕES .....	44
6.	ANEXO .....	46
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### Figuras

- 1 - Eletroforese de disco em gel de poliacrilamida da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de Anas sp. ..... 28
- 2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de Anas sp. .... 29
- 3 - Determinação do peso molecular aparente da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de Anas sp por filtração em gel sephadex G-150. .... 30
- 4 - Determinação do peso molecular da subunidade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de Anas sp por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio. ... 31
- 5 - Espectro de absorção ultravioleta da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de Anas sp... 32
- 6 - O perfil da influência do pH na atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de Anas sp. ..... 33
- 7 - Efeito da concentração de arseniato de sódio sobre a atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de Anas sp. Determinação da concentração ótima de arseniato. .... 34
- 8 - Efeito da concentração de gliceraldeído-3-fosfato sobre a atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de Anas sp. Determinação da constante de Michaelis-Menten. .... 35

9 - Efeito da concentração do $\text{NAD}^+$ sobre a atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de <u>Anas sp.</u> . Determinação da constante de Michaelis-Menten. ....	36
10- Inibição da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de <u>Anas sp</u> por NADH. ....	37

### **Tabelas**

I - Sumário do processo de purificação da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de <u>Anas sp.</u> .....	25
II- Efeito dos íons metálicos divalentes sobre a atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de <u>Anas sp.</u> .....	26
III- Efeito de reagentes sulfidrila na atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de músculo de <u>Anas sp.</u> .....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS

GPDH	- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
G3P	- Gliceraldeído-3-fosfato
NAD	- $\beta$ -Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	- $\beta$ -Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
DPGA	- 1,3-difosfoglicerato
PGA	- 3-fosfoglicerato
P.M.	- Peso Molecular
K <sub>m</sub>	- Constante de Michaelis-Menten
K <sub>i</sub>	- Constante de Inibição
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
EDTA	- Etileno diaminotetraacetato-saldissódico
Tris	- Tris-hidroximetil amino metano
Nbs <sub>2</sub>	- Ácido 5,5' ditiobis (2-nitrobenzôico)
TNB <sup>-</sup>	- Íon tionitrobenzoato
-SH "rápidos"	- Número de grupos -SH determinado por extração no tempo zero da cinética da reação com Nbs <sub>2</sub> , em tampão tris-HCl 0,05 M, pH 8,2 contendo EDTA 1 mM.
-SH "totais"	- Número de grupos -SH da enzima determinado em presença de uréia 8 M.

## RESUMO

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase ( EC 1.2.1.12 ) de músculo de Anas sp (pato) foi purificada pelo método de Cori et al (15), com algumas modificações. A enzima foi demonstrada ser pura por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença e ausência de SDS e por eletroforese de zona em fitas de poliacetato de celulose. O peso molecular foi estimado em 140.000 para a enzima nativa e 36.000 para os monômeros. O pH ótimo encontrado foi de 8,2. Os valores de Km foram determinados para o gliceraldeído-3-fosfato e para o NAD sendo em torno de 240 µM e 80 µM, respectivamente. Foi demonstrado que o NADH é um inibidor competitivo em relação ao NAD, sendo o Ki de 17 µM. A adição de metais [  $2 \cdot 10^{-3} M$  ] como  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$  e  $Ca^{++}$  não alteraram significativamente a atividade de GPDH, enquanto  $Hg^{++}$ ,  $Cu^{++}$  e  $Zn^{++}$  inibiram totalmente a enzima. A titulação de grupos-SH com  $Nbs_2$  indicou 12,7 grupos -SH por mol de enzima mas apenas 4 são essencialmente reativos por tetrâmero de enzima. Dos reagentes sulfidrilas testados, o p-hidroxi-mercuribenzoato e o p-cloromercuribenzoato demonstraram ser potentes inibidores, mas a inibição foi totalmente revertida com a adição subsequente de excesso de 2-mercaptoetanol. A validade dos dados cinéticos foi analisada através de programas em linguagem BASIC.

## INTRODUÇÃO

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (D-gliceraldeído-3-fosfato: NAD oxidoreductase, E.C.1.2.1.12) é uma das enzimas chaves da via glicolítica e desempenha um papel essencial no metabolismo de carboidratos. Seu papel é a fosforilação oxidativa do gliceraldeído-3-fosfato em 1-3-difosfoglicerato (Fig. A).

A sequência de aminoácidos da GPDH já foi determinada para algumas espécies como B. stearothermophilus (55), Thermus aquaticus (34), levedura (36), músculo de lagosta (18), e músculo de porco (32). Através destes estudos concluiu-se que a GPDH, de modo geral, é uma proteína composta de quatro subunidades. Cada monômero compreende 330 resíduos de aminoácidos correspondendo a um peso molecular de 36.000, sendo a cisteína-149 sempre envolvida diretamente na atividade catalítica. Estudos cristalográficos (11,44) têm demonstrado que a estrutura da subunidade consiste de dois domínios. O primeiro domínio compreende os resíduos de 1 a 149 e é sobretudo o domínio de ligação do coenzima. O segundo, envolve os resíduos de 149 a 334, e corresponde ao domínio catalítico, que provê resíduos para catálise, especificidade e cooperatividade entre as subunidades. Segundo Olsen et al (44) a sequência de aminoácidos da GPDH é mais altamente conservada na região do domínio catalítico.

Dados de difração de raios-x mostram que os cristais da holoenzima exibem uma cor amarela característica, são ortorrômbicos (P 222) com o tetrâmero como unidade as-

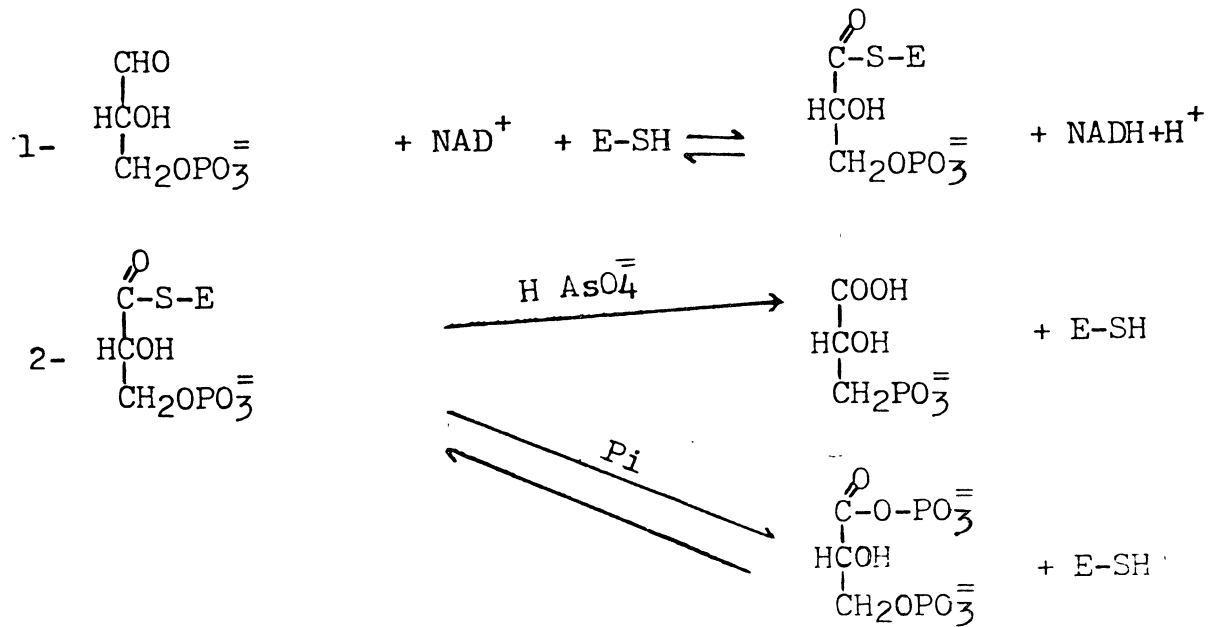


Fig. A - Esquema da reação da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. (53)

simétrica. Assumindo que as quatro subunidades são quimicamente equivalentes, mas cristalograficamente diferentes e com a ajuda da sequência de aminoácidos, pode-se fazer um mapa esquemático da GPDH (Fig. B).

Para definir a estrutura da GPDH tem sido usado um sistema de coordenadas de eixos P, Q e R similar ao utilizado para desidrogenase láctica (1), (Fig. C). O traço mais marcante na estrutura é que embora exibindo aparente simetria 222, o tetrâmero consiste funcionalmente de um dímero de dímero relacionados através do eixo Q. A região de maior interação entre as subunidades é através do eixo P. Os contatos relacionados ao eixo Q são relativamente poucos e não tão conservados, enquanto os contatos relativos ao eixo R são mais numerosos e mais conservados (11).

A GPDH é a única das desidrogenases na qual a preparação cristalina originária de músculo possui  $\text{NAD}^+$  firmemente ligado. Há aproximadamente 3 a 4 moles de  $\text{NAD}^+$  ligados por mol de enzima. Para a enzima de músculo, foi mostrado que a afinidade pelo  $\text{NAD}^+$  decresce com o aumento do número de moléculas ligadas, apresentando o que se chama cooperatividade negativa (9, 14). Em contraste, a enzima de levedura exhibe cooperatividade positiva e é cristalizada como apoenzima (37,38).

O sítio ativo da GPDH envolve o resíduo de cisteína-149 o qual em presença de  $\text{NAD}^+$  e de G3P forma um intermediário tio-éster acil-enzima (Fig. A). A GPDH é específica para o NAD; este coenzima não pode ser substituído pelo NADP que é incapaz de se ligar à enzima. Alguns análogos

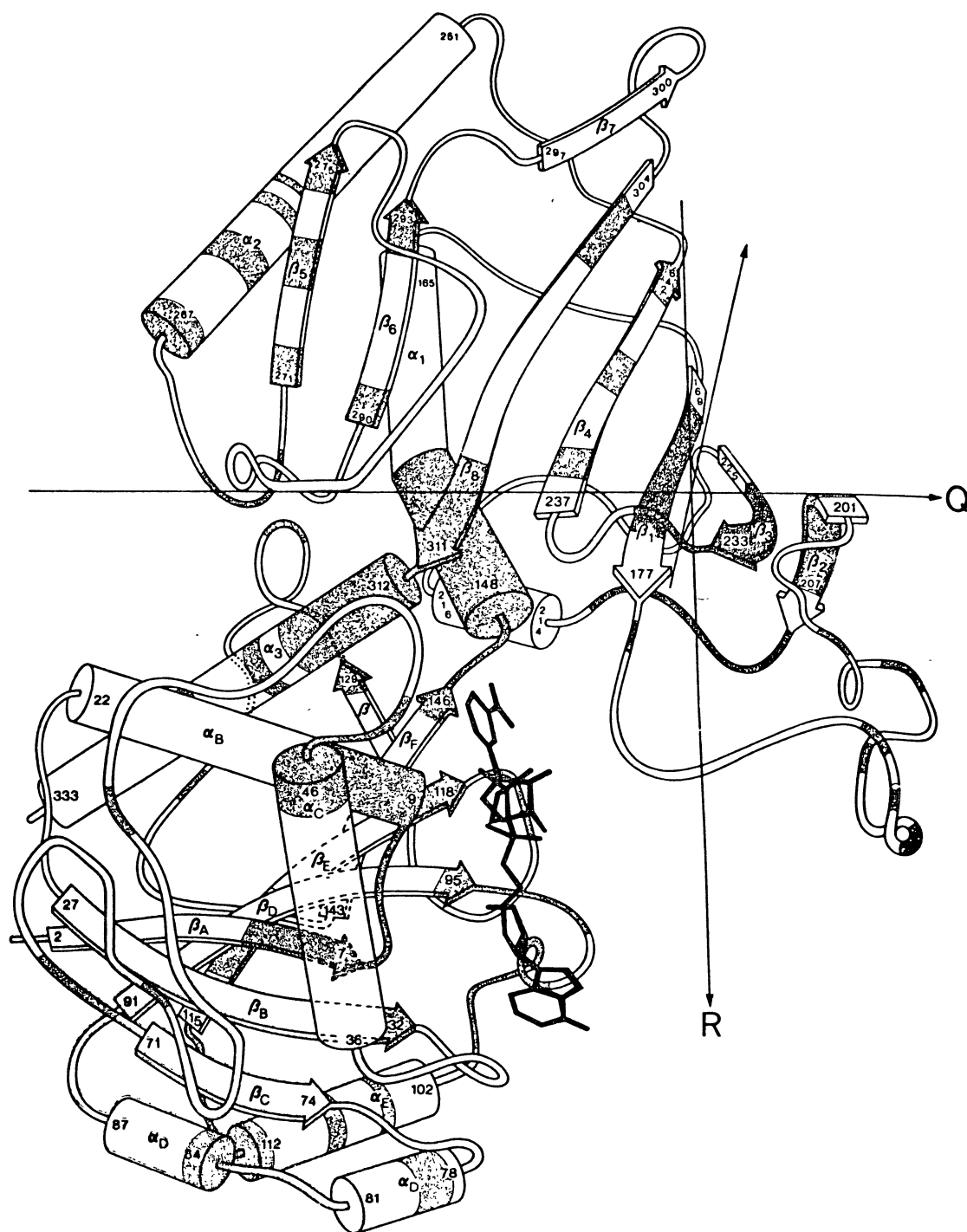


Fig. B - Mapa esquemático de uma subunidade da GPDH (55).

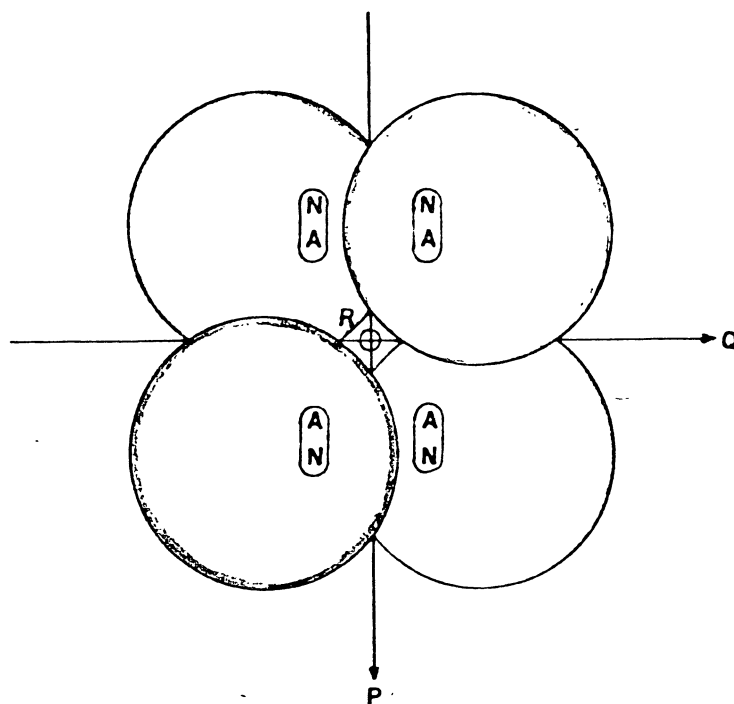


Fig. C - Diagrama da associação das subunidades na GPDH.

(11)

sintéticos do NAD como a tionicotinamida adenina dinucleotídeo, são reduzidos pela enzima mas não de forma tão efetiva como o NAD. Segundo Duggleby & Dennis (21) os substratos fisiológicos da GPDH (G3P, NAD, fosfato inorgânico), exercem algum grau de inibição assim como os produtos da reação DPGA e principalmente o NADH.

Para explicar a ação da GPDH tem sido proposto o mecanismo do tipo ping-pong, inicialmente sugerido por Segal & Boyer (48). Este mecanismo, esquematizado na Fig. D, foi revisto e confirmado por outros autores como Harrigan e Trentham (30) e Duggleby & Dennis (21). Recente trabalho de Cardon & Boyer (13) dá apoio a uma proposta que é compatível com o modelo que sugere a alternância de sítios catalíticos como esquematizado na Fig. E.

Geralmente, o isolamento da GPDH tem como etapa determinante o fracionamento com sulfato de amônio (15,17,25,33,47), já que o NAD ligado à enzima é altamente solúvel em elevadas concentrações desse sal. Extração por cromatografia de afinidade em NAD imobilizado foi utilizada para GPDH de bactérias com bastante êxito (31).

Nestes últimos anos, estudos comparativos têm sido feitos isolando-se a GPDH de vários tecidos de numerosas espécies. Devido ao fato dela conservar sua composição e sequência de aminoácidos por um longo período evolucionário esta enzima pode ser um ótimo instrumento para investigações filogenéticas e fisiológicas. As relações filogenéticas entre os seres vivos, interpretados somente à luz de métodos convencionais, tais como, análise morfológica de espécies vivas e fósseis, podem estar sujeitas a erros. Co

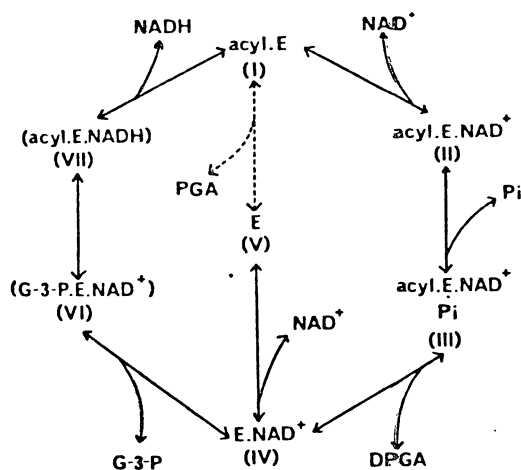


Fig. D - Mecanismo catalítico da GPDH esquematizado em forma cíclica (21).

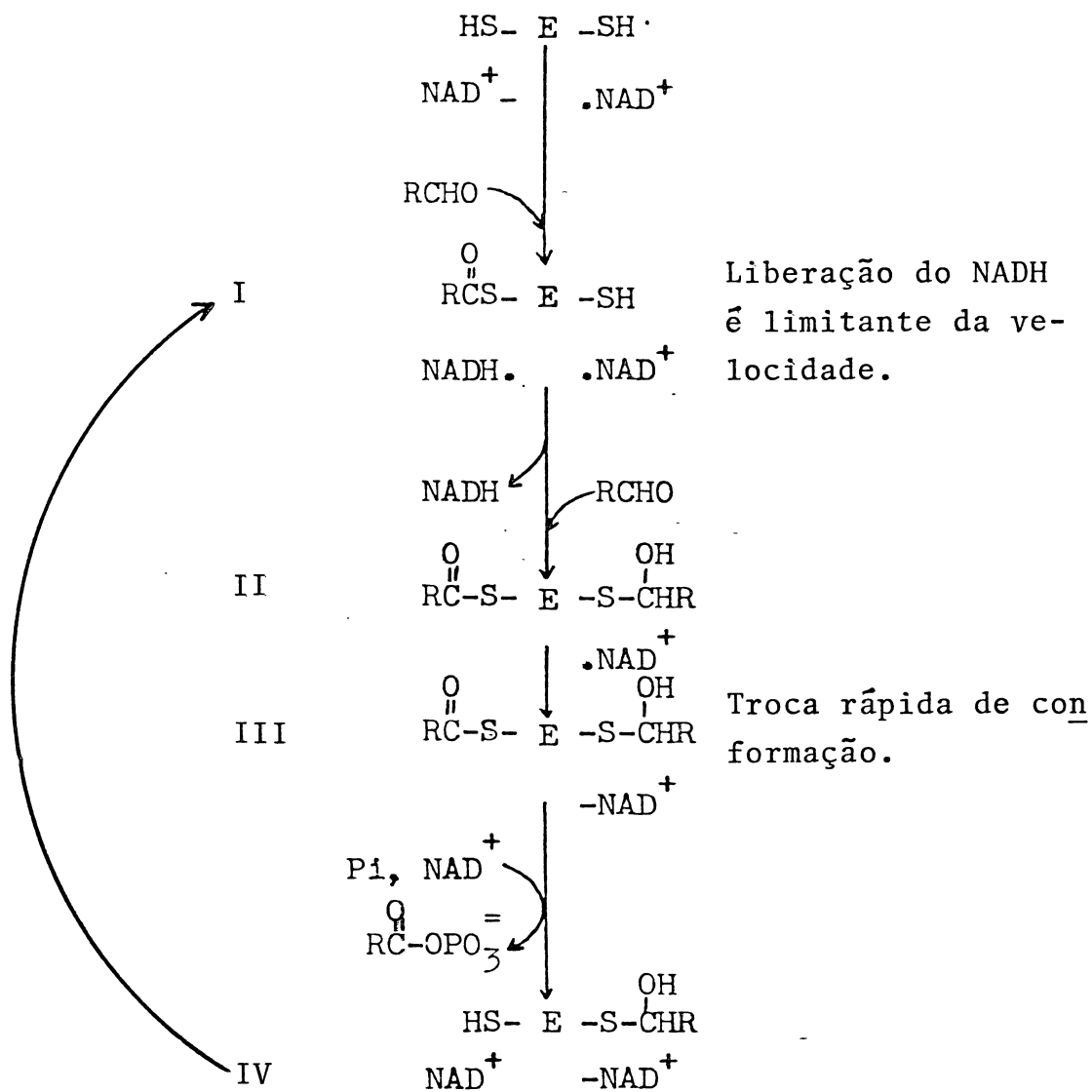


Fig. E - Esquema de catálise da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase com cooperatividade catalítica entre as subunidades (13).

mo alternativa de estudos destas relações filogenéticas, a análise estrutural de proteínas, de evolução lenta ou de evolução rápida, fornece valiosos subsídios para novas interpretações e estabelecimento de novas linhas filogenéticas (29).

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase já foi isolada e estudada em aves. Alisson & Kaplan (2) isolaram a GPDH de músculo de faisão, peru e galinha e realizaram estudos sobre constantes de sedimentação, composição de aminoácidos, reatividade dos grupos sulfidrilas e reatividade com os análogos do coenzima  $\text{NAD}^+$ . Todos os parâmetros estudados mostraram ser semelhantes para as três aves. Petell et al (45) relataram um processo de separação de sete principais enzimas da via glicolítica, incluindo a GPDH, que podem ser simultaneamente extraídas de uma mesma amostra de músculo esquelético de galinha. As enzimas foram julgadas puras através da análise de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS.

Estudos cinéticos referentes à GPDH de aves foram encontrados na literatura. Visando ampliar o estudo da GPDH em aves nosso trabalho se propôs, à purificação da enzima de Anas sp (pato) e ao estudo de algumas de suas propriedades físico-químicas. Tendo por objeto um melhor ajuste dos dados cinéticos foi elaborada também, uma análise estatística dos resultados.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. MATERIAIS

G3P, NAD, NADH, Nbs<sub>2</sub>, acrilamida, hemoglobina "cross-linked", catalase, aldolase, citocromo c e soro de albumina bovina foram obtidos da Sigma Chemical Co. DEAE- Sephadex A-50, Sephadex G-150 eram produtos da Pharmacia Fine Chemicals e as fitas de poliacetato de celulose da Chemetron.

Todos os outros produtos utilizados foram de grau analítico.

### 2.2. MÉTODOS

#### 2.2.1. DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA

A proteína foi determinada pelo método de Warburg & Christian (56) e também segundo Lowry et al (41), usando soro albumina como padrão.

#### 2.2.2. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase foi medida espectrofotometricamente a 25°C segundo o método de Dagher & Deal (17) com algumas modificações. A mistura de ensaio em um volume final de 1 ml continha: tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,2, EDTA 1 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, NAD 1,5 mM, gliceraldeído-3-fosfato 1,5 mM, arseniato de sódio 30 mM e 0,1 a 0,5 µg de proteína. A reação era iniciada pela adição de D-gliceraldeído-3-fosfato devido à sua instabilidade em soluções aquosas (17,52).

As velocidades de redução do NAD foram determinadas na velocidade inicial em intervalos de 10 a 30 segundos a 340 nm.

Durante o processo de purificação foi utilizado o espectrofotômetro Beckman DB. As propriedades físicas e cinéticas da enzima foram determinadas no espectrofotômetro Perkin-Elmer digital  $\lambda$  1 (u.v.-visível) com sensibilidade de resposta de um segundo.

### **2.2.3. UNIDADE DE ENZIMA**

Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a redução de 1  $\mu$ mol de NAD por minuto nas condições de ensaio, a 25°C.

A atividade específica foi expressa como unidades de enzima por miligrama de proteína.

### **2.2.4. PREPARAÇÃO E ENSAIO DO GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO**

A solução de DL-gliceraldeído-3-fosfato foi preparada a partir do DL-gliceraldeído-3-fosfato dietilacetal sal de bário. O sal era dissolvido com vigorosa agitação em água deionizada contendo uma suspensão de Dowex 50 W X 4, resina catiônica (15 g resina/ g de sal, forma H<sup>+</sup>). A solução era aquecida em banho fervente por 3 minutos, resfriada em banho de gelo e filtrada através de Millipore para a separação da resina. A concentração do gliceraldeído-3-fosfato era de -

terminada enzimaticamente em presença de excesso de NAD, arseniato de sódio e GPDH, de acordo com o método de Dagher & Deal (17). A concentração de G3P era expressa em função do isômero ativo calculada pela seguinte equação:

$$\text{G3P mM} = \frac{\text{D.O. } 340 \text{ nm} \cdot \text{volume sistema}}{6,22 \cdot \text{volume amostra}}$$

Na hora do uso o pH era acertado para 7.0 com uma solução de KOH 15%.

#### 2.2.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO NAD E DO NADH

A determinação do NAD era feita espectrofotometricamente a 260 nm, usando-se o coeficiente de extinção molar  $17.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Uma alíquota de NAD era diluída em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,2 e a operação repetida pelo menos duas vezes.

$$\text{NAD mM} = \frac{\text{D.O. } 260 \text{ nm} \cdot \text{volume sistema}}{17,6 \cdot \text{volume amostra}}$$

A concentração de NADH foi determinada espectrofotometricamente da mesma maneira que para o NAD, usando-se o coeficiente de extinção molar  $6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (35).

#### 2.2.6. PROCESSO DE PURIFICAÇÃO

A GPDH de Anas sp foi purificada segundo o método de Cori et al (15) com algumas modificações. Todas as ope

rações foram efetuadas entre 0-4°C. O fracionamento com sulfato de amônio foi feito com adições vagarosas do sal sólido sob agitação suave. Em todas as etapas houve controle do pH e alíquotas foram retiradas para testes enzimáticos e dosagem de proteínas.

#### 2.2.6.1. EXTRAÇÃO

A ave foi morta por decapitação, rapidamente depenada e seu músculo picado e separado de nervos e gorduras. O músculo foi passado por um moedor de carne elétrico e a proteína foi extraída adicionando-se ao músculo moído (450 ml) o dobro do volume de KOH (900 ml) 0,03 N, contendo 2-mercaptoetanol 1 mM. A mistura permaneceu em repouso por 20 minutos e em seguida foi filtrada através de gaze.

#### 2.2.6.2. FRACIONAMENTO COM SULFATO DE AMÔNIO

Ao filtrado (750 ml) foi adicionado lentamente sulfato de amônio sólido de modo a ser obtida uma saturação de aproximadamente 52%. A mistura permaneceu em repouso durante 30 minutos e o precipitado foi removido por centrifugação a 7.800 g durante 30 minutos. Ao sobrenadante (740 ml) resultante foi adicionado sulfato de amônio sólido, visando uma saturação de 72%. A mistura foi centrifugada a 7.800 g durante 30 minutos e o precipitado desprezado por conter baixa atividade específica. O pH da fração sobrenadante (765 ml) foi ajustado para 8,4 com  $\text{NH}_4\text{OH}$  e deixado em repouso na câmara fria por aproximadamente 70 horas, na tentativa de cristalização da enzima. Não tendo sido obtido os cristais e, sim, um

precipitado amorfo, a solução foi centrifugada a 7.800 g durante 30 minutos. A solução sobrenadante foi desprezada e o precipitado foi suspenso em EDTA 5 mM, pH 7,6 e colocado para dialisar contra uma solução saturada de sulfato de amônio pH 8,4, contendo 2-mercaptoetanol 1 mM, com o objetivo de concentrar o material protéico para etapa seguinte de purificação.

#### **2.2.6.3. CROMATOGRAFIA EM DEAE-SEPHADEX A-50**

A solução de enzima da etapa anterior (50 ml) foi dialisada contra 500 volumes de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM por 24 h e cuidadosamente colocada numa coluna de DEAE-Sephadex A-50 (2,1 x 38 cm) equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, sendo a enzima eluída com o mesmo tampão. O fluxo da coluna era de 0,3 ml/min e frações de 3 ml foram coletadas. A absorbância foi medida a 280 e 260 nm. A enzima não foi retida nesta coluna (49) e saiu imediatamente após o volume morto (39 ml).

#### **2.2.6.4. MANUTENÇÃO DA ENZIMA**

As frações de maior atividade específica (26 ml) foram reunidas e dialisadas contra uma solução de sulfato de amônio saturada, pH 8,4 contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM. A solução de GPDH foi então, mantida a 4°C sem

perda sensível de atividade por vários meses. Mensalmente, o pH da solução enzimática era verificado e eram acrescentadas quantidades de 2-mercaptoetanol (1mM) e, de NAD (1mM) (3) para a proteção da atividade da enzima.

A cada experimento a enzima era dialisada contra tampão Tris HCl 0,05 M, pH 8,2, contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM num volume de 1:500, sendo a concentração de proteína determinada espectrofotometricamente a 280 nm usando coeficiente de extinção igual a  $1,0 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (47).

#### **2.2.7. ELETROFORESE DE ZONA EM FITAS DE POLIACETATO DE CELULOSE**

A eletroforese de zona em fitas de poliacetato de celulose foi efetuada em tampão acetato de amônio 0,025 M, pH 5,8. As fitas foram mergulhadas no tampão antes da aplicação da proteína (15-50  $\mu\text{g}$ ) sendo o ponto de aplicação da amostra equidistante dos eletrodos. A eletroforese foi corrida a 250 V, 2,5 mA por fita, durante 5 horas a 4°C. A banda de proteína foi fixada com ácido tricloroacético 10% e corada com azul de comassie brilhante R (6,25 mg do corante + 228 ml de metanol 50% v/v + 23 ml de ácido acético glacial). A mistura descolorante continha metanol, água e ácido acético (9,5:9,5: 1).

#### **2.2.8. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS**

O peso molecular das subunidades assim como a homoge

neidade da enzima foram verificados através de eletroforese em gel de poliacrilamida em SDS(58). Os géis a 10% em poliacrilamida, contendo 0,1% de SDS foram polimerizados em cilindros de vidro (0,6 x 9,5 cm). Para a calibração do gel foi utilizada a "hemoglobina cross-linked" como proteína marcadora, considerando pesos moleculares aproximados de 16.000, 32.000, 48.000 e 64.000, correspondendo respectivamente ao monômero, dímero, trímero e tetrâmero, de acordo com o boletim técnico nº MWS-877 da Sigma Chemical Co. A quantidade de GPDH utilizada variou de 10 a 40 µg. As bandas de proteínas foram localizadas imergindo o gel por aproximadamente 3 horas numa solução contendo 227 ml de azul de coomassie brilhante R. A descoloração foi feita numa solução de 25 ml de metanol, 37,5 ml de ácido acético glacial para 500 ml de água destilada.

#### **2.2.9. ELETROFORESE DE DISCO EM GEL DE POLIACRILAMIDA**

A eletroforese da GPDH nativa de músculo de pato foi efetuada pelo método de Kuchler (39) com algumas modificações, após inúmeras tentativas infrutíferas de utilização de métodos mais conhecidos (19,26,39). Os géis foram polimerizados em cilindros de vidro (0,6 x 9,5 cm). O gel separador era 2,5% em acrilamida (pH 5,9), enquanto o gel de corrida continha 6% de acrilamida. A riboflavina a 4% foi utilizada como catalisador na polimerização de ambos os géis. A eletroforese foi efetuada em tampão ácido acético-KOH 0,03 N, pH 4,3 com o qual também fora preparado o gel

de corrida. A quantidade de proteína aplicada variou de 20 a 100 µg. A separação foi feita usando uma corrente de 2 mA por tubo durante 4 horas em média. A proteína foi corada com azul de comassie brilhante G (8), sendo os géis mantidos nesta solução durante 48 horas e então conservados em H<sub>2</sub>O destilada.

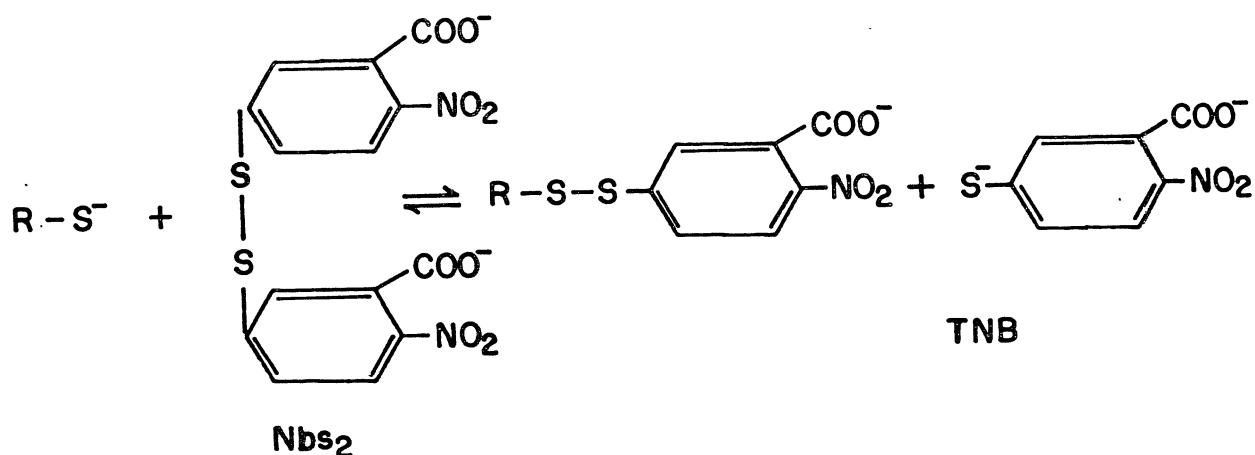
#### 2.2.10. CROMATOGRAFIA EM GEL SEPHADEX G- 150

O gel Sephadex G- 150 fino foi preparado de acordo com Andrews (5) e Curling (16) e foi utilizado com o objetivo de estimar o peso molecular da GPDH nativa. Uma coluna de 2,2 x 68 cm com um fluxo de 0,36 ml/min foi empacotada a 10°C em câmara fria onde também ocorreu o experimento, com uma pressão de operação de 10 cm em água. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM. As proteínas usadas como padrão foram identificadas ou através da absorbância ou através de ensaios enzimáticos. As proteínas foram diluídas em 2 ml no tampão de eluição. A amostra era constituída de azul de dextrana 2.000 (P.M.  $2 \cdot 10^{-6}$ ,  $\lambda$  max 625 nm) catalase (P.M. 240.000,  $\lambda$  max 405 nm), aldolase (P.M. 158.000, ensaio enzimático (50),  $\lambda$  max 340 nm), albumina (P.M. 67.000  $\lambda$  max 280 nm) e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase ensaio enzimático, como descrito em Materiais e Métodos. Frações de 3 ml foram separadas usando o coletor automático LKB 7000. O volume morto da coluna foi de 85 ml. O peso molecular da GPDH de Anas sp foi calculado de

acordo com o método de Andrews (5).

### 2.2.11. DOSAGEM DOS GRUPOS -SH

A titulação dos grupos -SH foi feita segundo o método de Ellman (23). O  $\text{Nbs}_2$  reage especificamente com os tióis a pH 8,0 dando um mol de tionitrobenzoato ( $\text{TNB}^-$ ) por mol de tiol, segundo a reação



O  $\text{Nbs}_2$  absorve a 330 nm e o produto, o  $\text{TNB}^-$ , colorido, apresenta um máximo de absorção a 412 nm.

#### 2.2.11.1. DOSAGEM DOS GRUPOS -SH "RÁPIDOS"

Para a dosagem de grupos -SH "rápidos", a enzima foi dialisada contra tampão Tris- HCl 0,05 M, pH 8,2, EDTA 1 mM, em ausência de 2-mercaptoetanol por aproximadamente 16 horas.

O sistema de incubação (1 ml) era constituído de enzima (5,2  $\mu\text{M}$ ), em presença de  $\text{Nbs}_2$  0,6 mM e tampão Tris HCl 0,05 M, pH 8,2. A reação foi completada em menos de um

minuto. Para o cálculo dos grupos -SH foi utilizado o coeficiente de extinção de  $13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para o  $\text{TNB}^-$ , a 412 nm.

#### 2.2.11.2 DOSAGEM DOS GRUPOS -SH "TOTAIS"

O sistema de incubação (1 ml) para a determinação dos grupos -SH totais da GPDH era constituído de enzima (2,1  $\mu\text{M}$ ), uréia 8M, tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,2. Essa mistura foi incubada por um minuto, à temperatura ambiente. A reação foi iniciada pela adição de  $\text{Nbs}_2$  0,6 mM e a titulação foi feita como na etapa 2.2.11.1. A absorbância foi lida após cinco minutos.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. PURIFICAÇÃO DA GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE

A GPDH de Anas sp foi purificada segundo o método de Cori et al (15) seguida apenas de uma cromatografia em DEAE Sephadex A-50. Os resultados de uma purificação típica estão resumidos na Tabela I. Foram obtidos 190 mg de enzima pura com alta atividade específica (203 U/mg). Embora a enzima não tenha sido cristalizada ela pode ser considerada homogênea por eletroforese em gel de poliacrilamida.

#### 3.2. ESTABILIDADE DA ENZIMA

A enzima purificada pelo método descrito demonstrou ser muito estável em solução saturada de sulfato de amônio, pH 8,4, contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM a temperatura de 4°C. Após 9 meses de sua purificação a GPDH de músculo de Anas sp ainda apresentava 90% da atividade inicial.

#### 3.3. CRITÉRIOS DE PUREZA

Na eletroforese de zona em fitas de poliacetato de celulose em pH 5,8, a revelação registrou uma única banda, 4,1 cm distante da origem em direção ao catodo, demonstrando ser a GPDH de músculo de pato uma enzima básica.

A pureza e a homogeneidade da enzima foi também veri

ficada por eletroforese em gel de poliacrilamida na ausência de SDS em pH 4,3 (Fig. 1) e na presença de SDS (Fig. 2). Em ambas foi revelada uma única banda. Em pH 9,0 (19) a proteína-enzima não migrou, provavelmente devido ao seu alto ponto isoelétrico. Também em pH 7,5 (26) a GPDH praticamente não migrou, aparecendo uma única banda de proteína muito próxima à origem, coincidente com a banda detectada pelo teste de atividade da enzima.

#### 3.4. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR

O peso molecular da GPDH de Anas sp foi determinado por filtração em Sephadex G-150 e por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS. A enzima foi eluída em coluna de gel Sephadex G-150, sendo estimado para a mesma um peso molecular aparente de 140.000 daltons (Fig. 3).

O peso molecular das subunidades foi estimado por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS, indicando um valor de 36.000 (Fig. 4), sugerindo que a enzima de músculo de pato assim como verificado na maioria das outras espécies tem estrutura quaternária, tetramérica.

#### 3.5. PROPRIEDADES ÓTICAS E CONTEÚDO DE NAD

A holoenzima purificada apresenta um valor máximo de absorção a 278 nm (Fig. 5). A razão  $A_{280} : A_{260}$  encontrada para a GPDH de músculo de pato foi 1,16 e segundo Seydoux et al (49) sugere que esta holoenzima possui aproximadamente 3,7 moles de NAD ligados por mol de enzima.

### 3.6. EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O perfil da atividade da GPDH em função do pH é mostrado na Fig. 6. O pH ótimo foi estimado ser em torno de 8,2, usando-se um sistema com tampão Tris-HCl. Durante o processo de purificação da enzima os testes enzimáticos foram realizados em pH 8,0.

### 3.7. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ÓTIMA DO ARSENIATO

A concentração ótima de arseniato foi verificada no sistema de ensaio já descrito, variando apenas a concentração de arseniato. Como mostrado na Fig. 7, a concentração ótima do arseniato é de 30 mM.

### 3.8. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO. DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN

Para o estudo do efeito do G3P foi construído um gráfico, cuja variável era a concentração deste substrato (Fig. 8). O  $K_m$  obtido pelo método de Lineweaver-Burk (40), usando regressão linear foi de 218  $\mu\text{M}$  e por regressão não linear (28) de 240  $\mu\text{M}$ , em pH 8,2 e a 25°C.

### 3.9. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO NAD. DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN

Para o estudo do efeito da concentração do NAD sobre

a velocidade da reação foi construído um gráfico cuja variável era a concentração de NAD (Fig. 9). Os dados experimentais foram avaliados pelo método de Lineweaver-Burk(40), fornecendo um  $K_m$  de 85  $\mu\text{M}$  por regressão linear e de 80  $\mu\text{M}$  por regressão não linear (28), em pH 8,2 e a 25°C.

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

Os resultados mostraram que o NADH é um inibidor competitivo em relação ao NAD como substrato variável (Fig. 10) em presença de G3P em concentração saturante. Os gráficos de inibição foram analisados por regressão linear e não linear fornecendo um valor da constante de inibição ( $K_i$ ) de 30  $\mu\text{M}$  e 17  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

### 3.11. EFEITO DE ÍONS METÁLICOS DIVALENTES SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE MÚSCULO DE ANAS SP.

O efeito de vários íons metálicos, na concentração 2 mM, sobre a atividade da enzima foi estudado. Para os ensaios, a enzima foi pré-incubada por 10 minutos em presença do respectivo íon metálico, na ausência de G3P. Como mostra a Tabela II a GPDH foi totalmente inibida pelos íons mercúrio, cúprico e zinco. A atividade enzimática não foi significativamente afetada pelos íons  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mn}^{++}$ . A inibição por íons cúprico e mercúrio sugerem a presença de grupos sulfidrila no sítio ativo da enzima.

### 3.12. TITULAÇÃO DOS GRUPOS -SH

A titulação dos grupos -SH com  $\text{Nbs}_2$ , pelo método de Ellman (23) indicou que há quatro grupos -SH especialmente reativos por tetrâmero de enzima, correspondendo, provavelmente, aos quatro grupos sulfidrilas do sítio ativo da enzima. A titulação feita após desnaturação da enzima com uréia 8 M mostrou que a enzima possui um total de 12,7 grupos -SH por mol de enzima.

### 3.13. EFEITO DE REAGENTES SULFIDRILAS NA ATIVIDADE DA GPDH DE MÚSCULO DE ANAS SP

Para o estudo do efeito de reagentes sulfidrilas na atividade da GPDH de Anas sp, a enzima foi dialisada por 18 horas contra tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,2, contendo EDTA 1 mM, na ausência de 2-mercaptoetanol. A enzima foi incubada por 10 minutos no citado tampão e na presença dos respectivos reagentes sulfidrilas. A enzima foi totalmente inibida pelos ácidos p-cloro mercuribenzóico e p-hidroxi mercuribenzóico e parcialmente inibida pelos ácidos o-iodosobenzóico 2-cloro-4-amino-benzóico e pela iodoacetamida (Tabela III), mas a inibição foi totalmente revertida pela adição de 2-mercaptoetanol 5 mM, sendo exceção, o caso da inibição por iodoacetamida. Isto é esperado, uma vez que o mecanismo de inibição por iodoacetamida é diferente das anteriores, ligando-se o reagente covalentemente aos grupos -SH da enzima e, portanto, não sendo deslocado pelo agente redutor.

TABELA I - Sumário do processo de purificação da GPDH de Anas sp.

Fração	Volume (ml)	Unidades Totais	Proteína (mg/ml)	Atividade específica U/mg	Rendimento %	Purificação
Extração KOH 0,03 N	750	120.750	20	8	100	1
*1 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 52%	740	142.080	7,0	27	118	3,4
*2 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 72%	50	41.800	15	56	35	7,0
Cromatografia DEAE-Sephadex A-50	26	38.610	7,3	203	32	25

\*1 sobrenadante

\*2 precipitado

**TABELA II - Efeito de íons metálicos divalentes sobre a atividade da GPDH de músculo de Anas sp.**

<b>SAL (2 mM.)</b>	<b>ATIVIDADE RELATIVA %</b>
-	100,0
MgCl <sub>2</sub>	110,0
MnCl <sub>2</sub>	90,0
CaCl <sub>2</sub>	82,5
CuCl <sub>2</sub>	0
ZnCl <sub>2</sub>	0
HgCl <sub>2</sub>	0

A enzima foi pré-incubada em presença do íon metálico por 10 minutos a 25°C, na ausência de G3P e a seguir a atividade enzimática foi determinada em um sistema de incubação contendo em 1 ml: tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,2, EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, arseniato de sódio 30 mM, NAD<sup>+</sup> 1,5 mM, G3P 1,5 mM e 0,2 µg de proteína.

**TABELA III - EFEITO DE REAGENTES SULFIDRILICOS NA ATIVIDADE DA GPDH DE MÚSCULO DE ANAS sp.**

REAGENTES 0,1 mM	a) ATIVIDADE RELATIVA %	b) ATIVIDADE RELATIVA APÓS ADIÇÃO DE MER- CAPTOETANOL %
—	100	100
orto-iodosobenzoato	52	100
iodoacetamida	62	62
2-cloro-4-aminobenzoato	84	100
p-hidroxi-mercuribenzoato	0	100
p-cloro-mercuribenzoato	0	100

a- A enzima (0,2 mg) foi incubada por 10 minutos a 25°C em presença dos reagentes em tampão Tris-HCl, 0,05 M pH 8,2, contendo EDTA 1 mM. A atividade remanescente foi determinada pela adição de NAD 1,5 mM, arseniato de sódio 30 mM e G3P 1,5 mM.

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



Fig. 1

ELETROFORESE DE DISCO EM GEL DE POLIACRILAMIDA DA GLICERAL-  
DEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE MÚSCULO DE ANAS SP.

A eletroforese foi desenvolvida em gel de poliacri-  
lamida na concentração de 6,0%, pH 4,3, sendo de 30  $\mu$ g a amo-  
stra de proteína. Foi usado um sistema para proteína básicas  
como descrito em Materiais e Métodos.

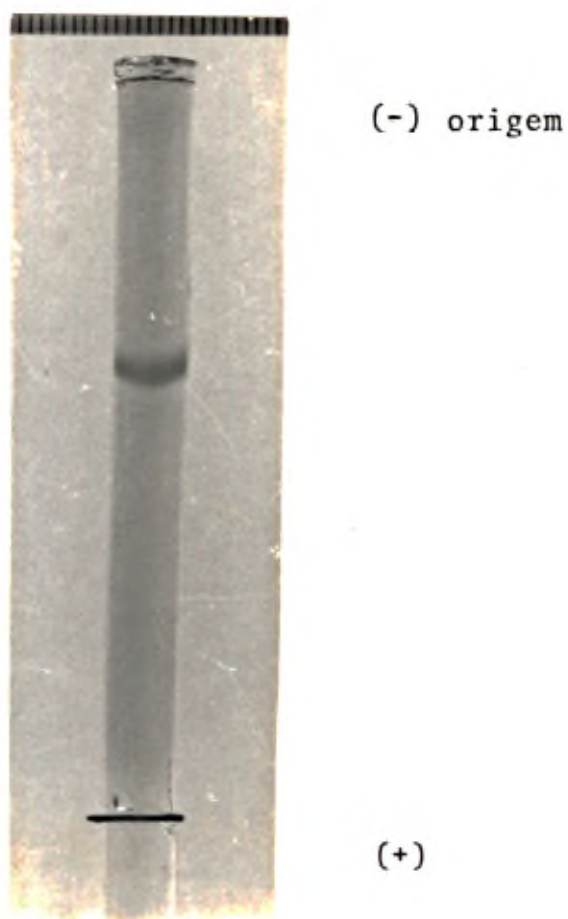


Fig. 2

ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS DA GLICERALDEIDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE MÚSCULO DE ANAS sp.

A eletroforese em gel, na concentração de 10% de poli-acrilamida, contendo 0,1% de SDS foi realizada de acordo com o método descrito por Weber & Osborn (58) sendo de 10  $\mu$ g a amostra de proteína.

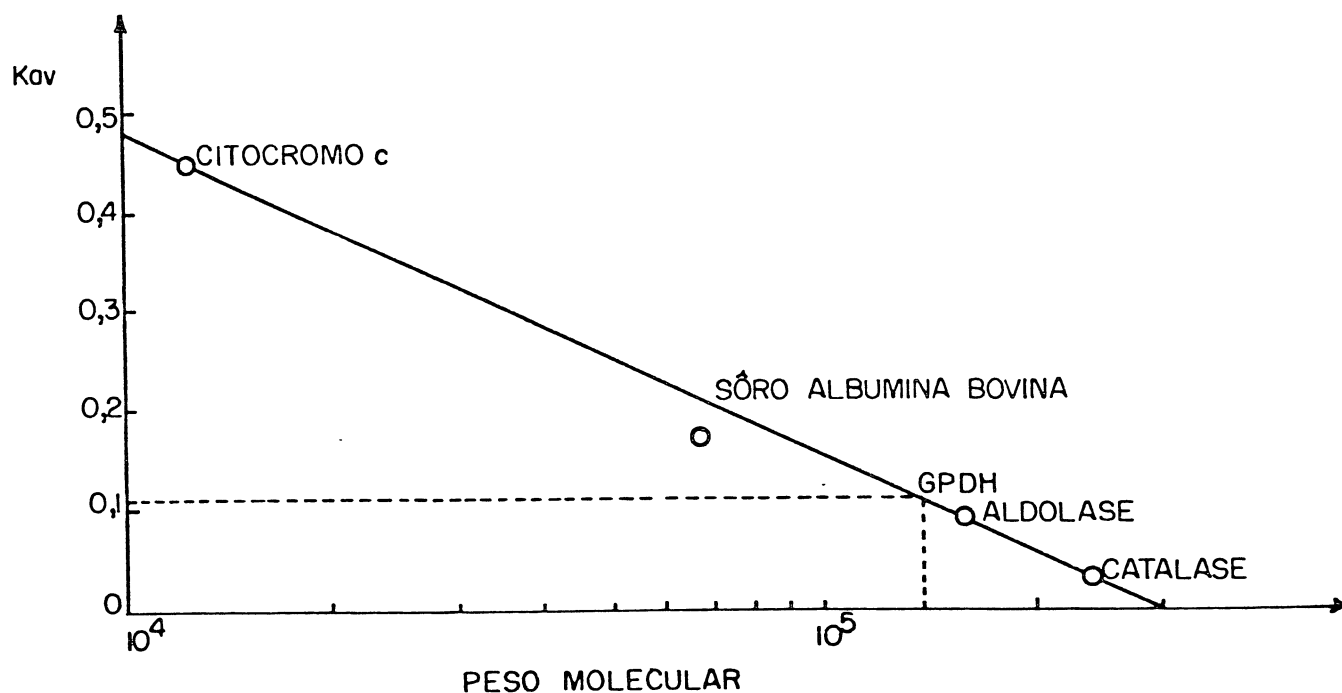


Fig. 3

DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR APARENTE DA GPDH DE MÚSCULO DE ANAS sp POR FILTRAÇÃO EM GEL SEPHADEX-150.

A cromatografia em gel sephadex G-150 foi efetuada conforme descrito em Materiais e Métodos. Os padrões de referência foram: citocromo c (P.M. 12.500), soro albumina bovina (P.M. 67.000), aldolase (P.M. 158.000) e catalase (240.000). O volume morto da coluna foi estimado através de azul de dextrana em 85 ml.

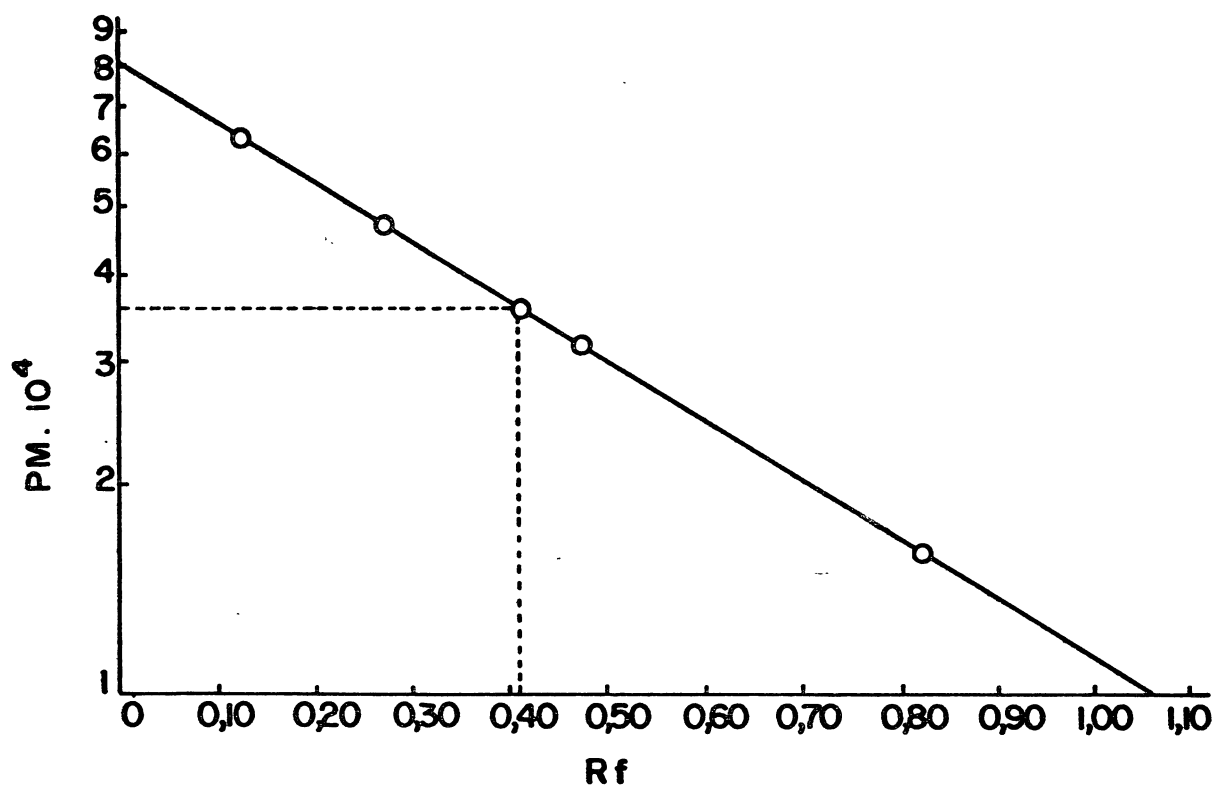


Fig. 4

DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR DA SUBUNIDADE DA GPDH DE MÚSCULO DE ANAS sp POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS.

Após eletroforese a 230 V e 8mA/gel durante 5 horas, as proteínas foram reveladas com azul de comassie brilhante R como descrito em Materiais e Métodos. Como proteína marcadora foi utilizada a hemoglobina "cross-linked" sendo considerado os pesos moleculares dos monômeros: 16.000, 32.000, 48.000 e 64.000.

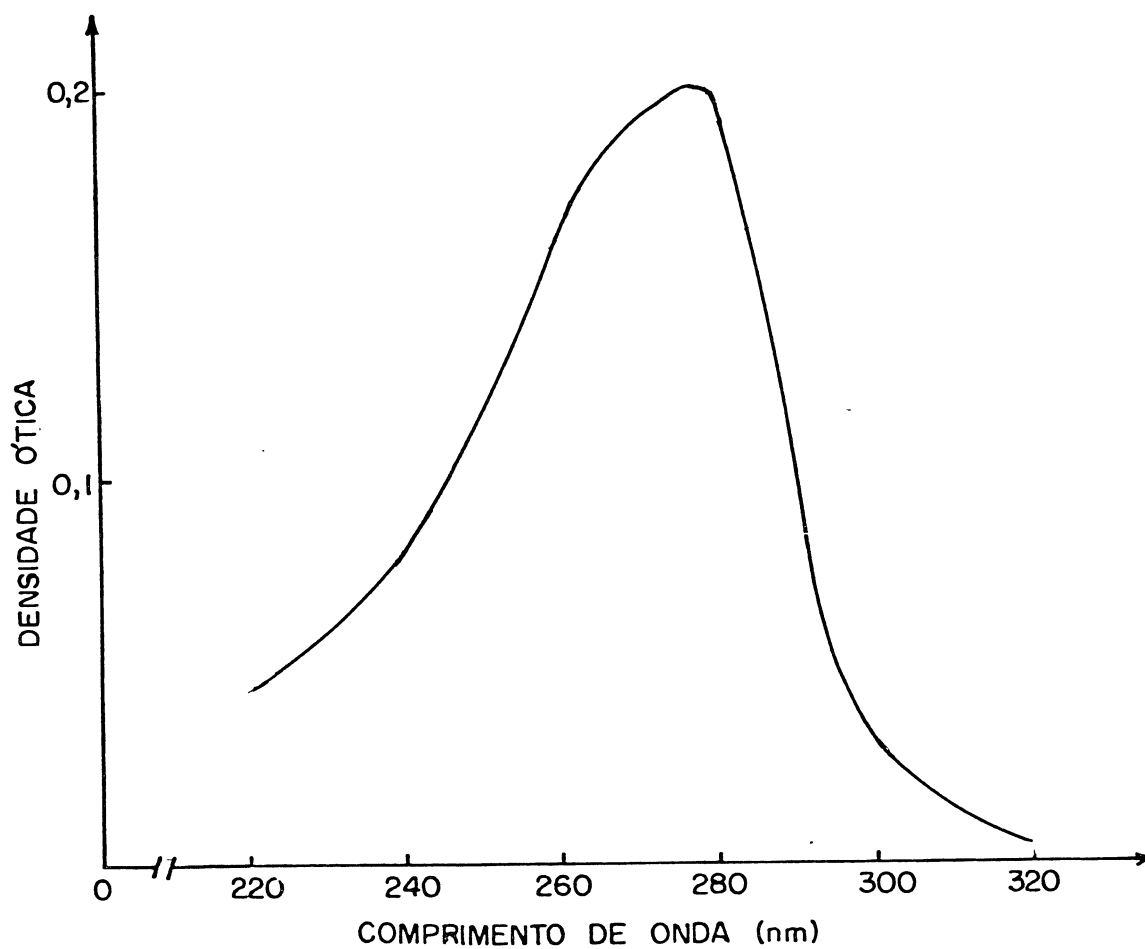


Fig. 5

ESPECTRO DE ABSORÇÃO ULTRAVIOLETA DA GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO  
DESIDROGENASE DE MÚSCULO DE ANAS sp.

No sistema de ensaio (1 ml) foi utilizada 180  $\mu$ g de enzima, tampão Tris-HCl pH 8,2 EDTA 1 mM, a 25°C.

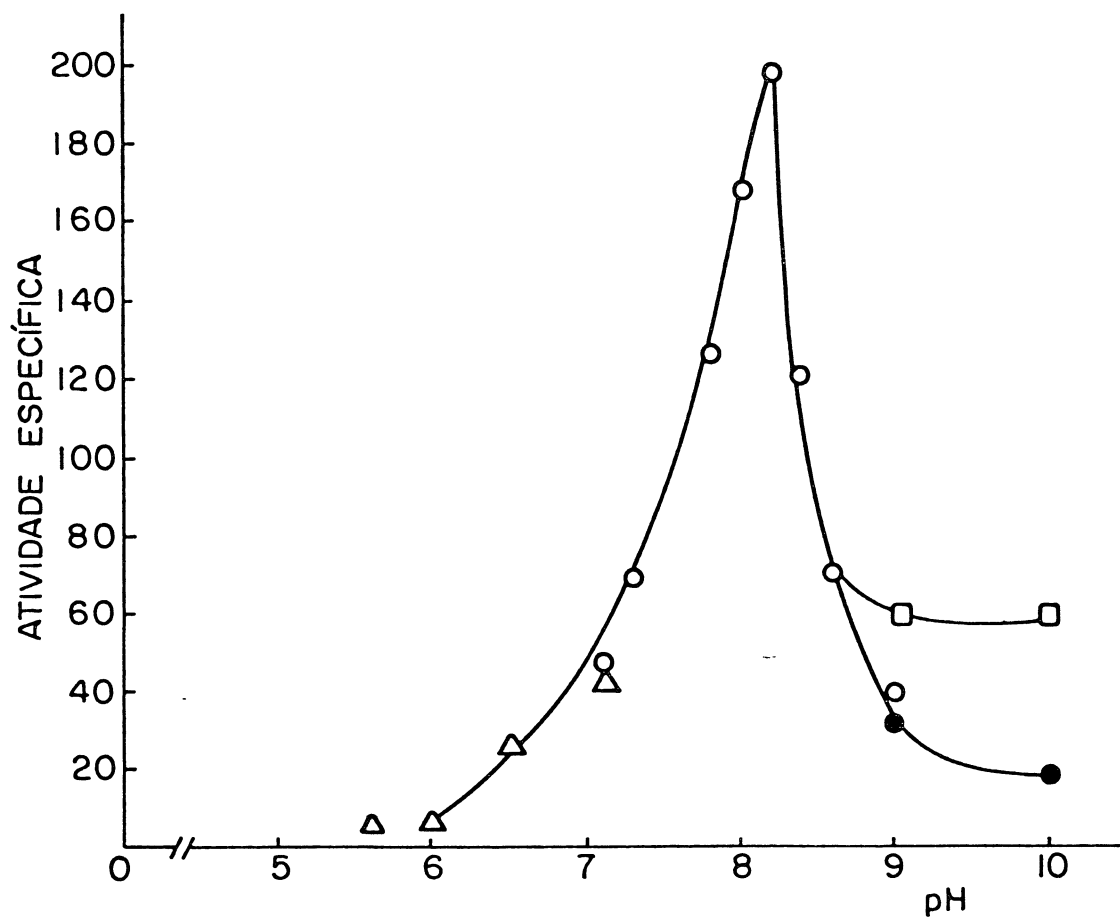


Fig. 6

O PERFIL DA INFLUÊNCIA DO pH NA ATIVIDADE DA GPDH DE MÚSCULO DE ANAS sp.

No sistema de ensaio (1 ml) foi utilizado 0,4  $\mu$ g de proteína, NAD 1,5 mM, G3P 1,5 mM, arseniato de sódio 30 mM, EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM. Os tampões [50 mM] utilizados foram: Tris-maleato ( $\Delta$ ) (pH 5,2-7,3), Tris-HCl ( $\circ$ ) (pH 7,3-8,5), glicina NaOH ( $\square$ ) e carbonato-bicarbonato de sódio ( $\bullet$ ) (pH 9,0-10,0).

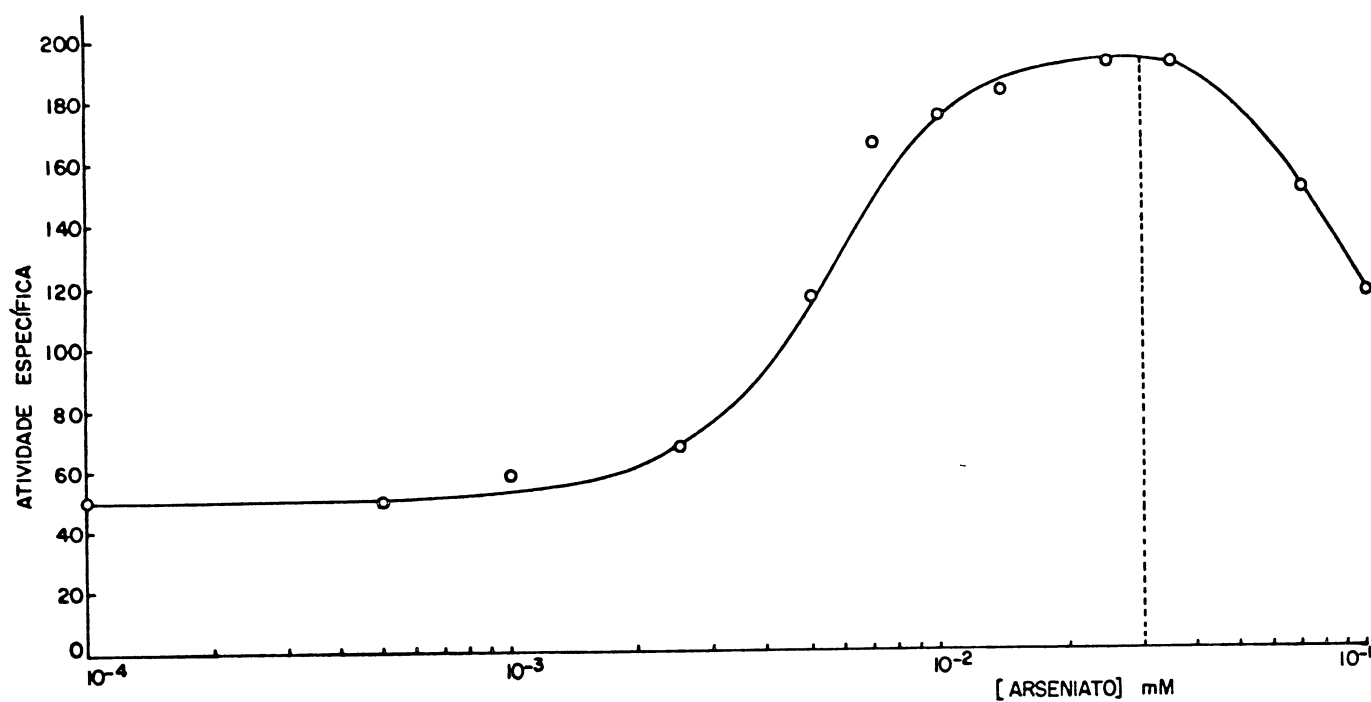


Fig. 7

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ARSENIATO DE SÓDIO SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE MÚSCULO DE ANAS sp. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ÓTIMA DE ARSENIATO.

A mistura de incubação continha, em volume final de 1 ml: 0,5 µg de enzima; tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2, contendo EDTA 1 mM e 2-mercaptoetanol 1 mM, NAD 1,5 mM, G3P 1,5 mM e quantidades variáveis de arseniato de sódio.

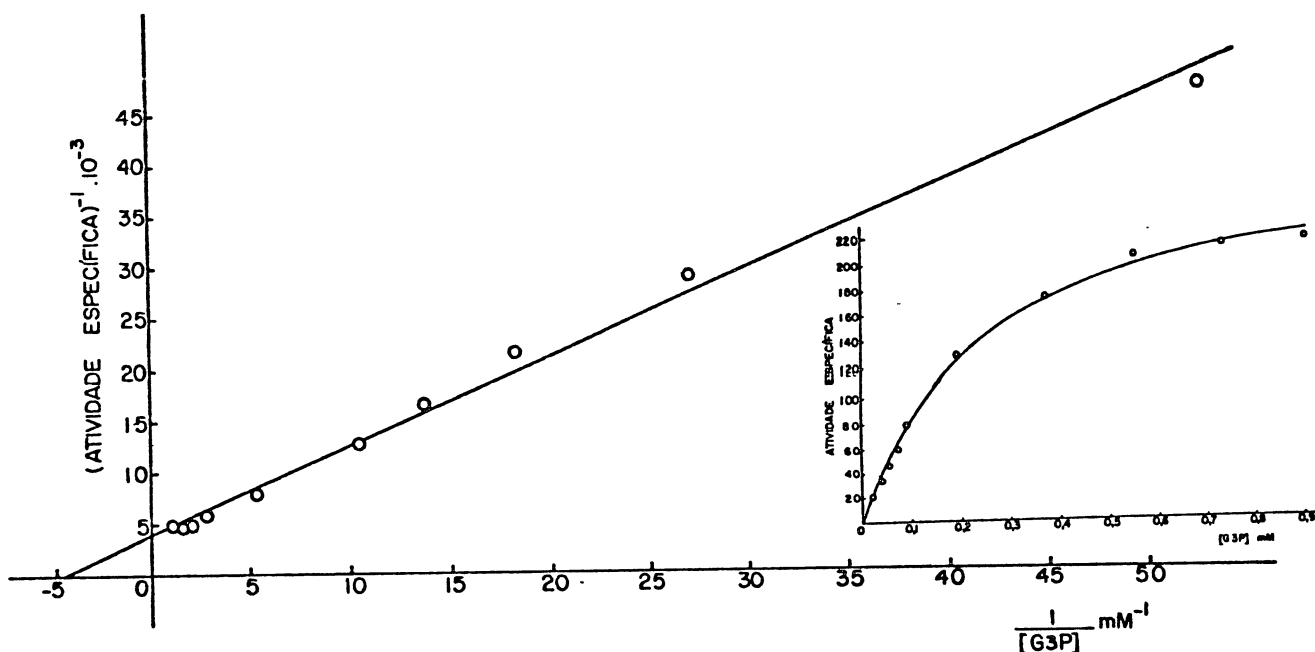


Fig. 8

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE MÚSCULO DE ANAS sp. DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN.

A mistura de incubação continha, em um volume final de 1 ml; 0,5  $\mu$ g de proteína, tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2, EDTA 1 mM e 2 mercaptoetanol 1 mM, arseniato de sódio 30 mM, NAD 1,5 mM e quantidades variáveis de G3P.

O erro padrão foi de  $3,05 \cdot 10^{-4}$  e o coeficiente de correlação de 1,13 calculados de acordo com Toledo (51).

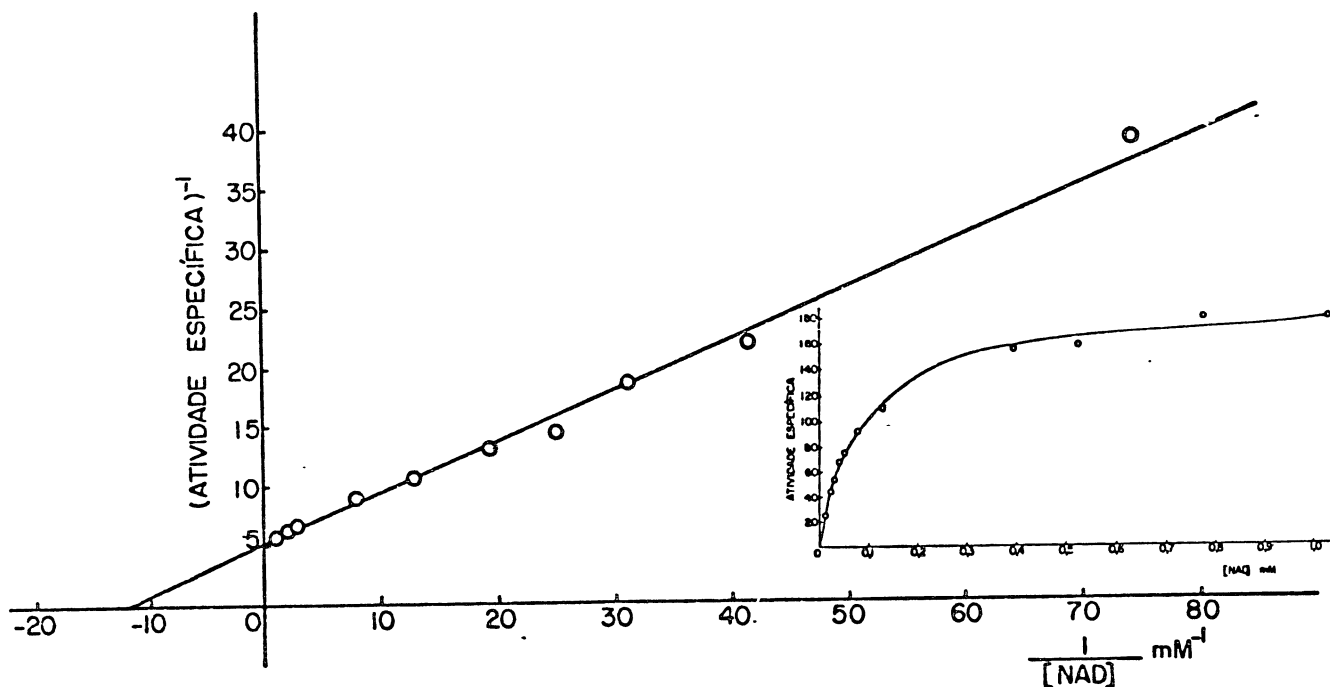


Fig. 9

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO  $\text{NAD}^+$  SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE MÚSCULO DE ANAS sp. DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN.

A mistura de incubação continha, em volume final de 1 ml: 0,5  $\mu\text{g}$  de proteína, tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,2, EDTA 1 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, arseniato de sódio 30 mM, G3P 1,5 mM e quantidades variáveis de NAD.

O erro padrão foi de  $1,5 \cdot 10^{-4}$  e o coeficiente de correlação de 1,04 calculados de acordo com Toledo (51).

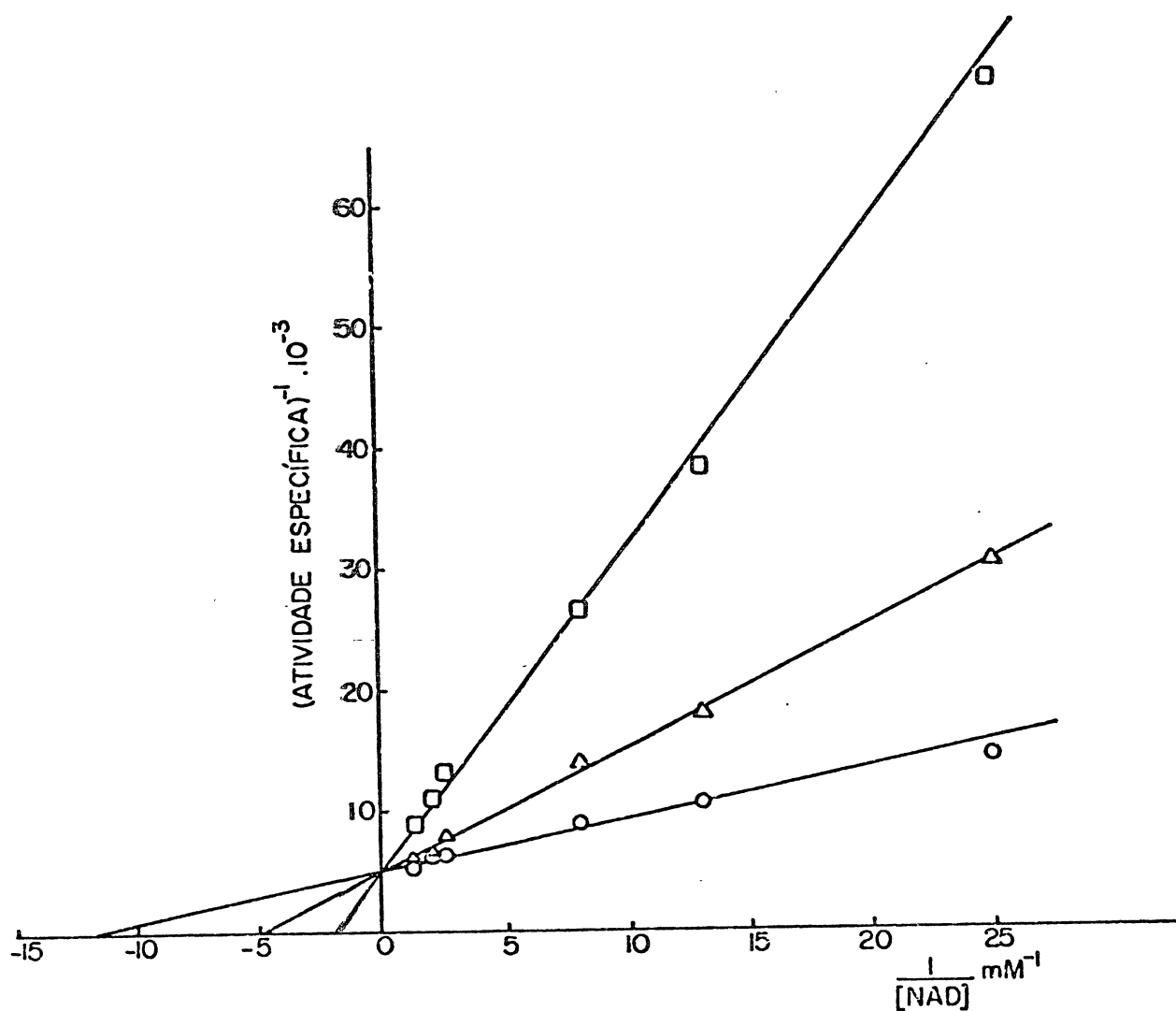


Fig. 10

INIBIÇÃO DA GLICERALDEIDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE ANAS sp POR NADH.

A mistura de incubação continha, em volume final de 1 ml: 0,5  $\mu\text{g}$  de proteína, tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, EDTA 1 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, G3P 1,5 mM, arseniato de sódio 30 mM e quantidades variáveis de NAD. As concentrações de NADH foram: zero (○), 0,24 mM (Δ) e 0,72 mM (□), sendo obtidos os valores de erro padrão de  $1,5 \cdot 10^{-4}$ ;  $5,07 \cdot 10^{-4}$  e  $1,28 \cdot 10^{-3}$  e os de coeficiente de correlação 1,04; 1,03 e 0,99, respectivamente (51).

#### 4. DISCUSSÃO

A GPDH é uma enzima relativamente fácil de ser obtida na forma pura e com bom rendimento (2,4,15,33,47). Em nosso trabalho a enzima foi purificada à homogeneidade e algumas de suas propriedades foram estudadas. A GPDH de músculo de pato não apresentou diferença considerável quando comparada às GPDHs de outras fontes nos estudos realizados.

A GPDH de músculo de Anas sp foi purificada por fracionamento com sulfato de amônio. Semelhante às enzimas de Thermus thermophilus (25), jacaré (54) e músculo de coelho (47) dentre outras, ela precipitou a uma saturação em torno de 70% em sulfato de amônio. Uma cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50 foi suficiente para que a enzima demonstrasse ser pura por eletroforese em gel de poliacrilamida (Fig. 1) tanto para a enzima nativa como para a enzima dissociada em seus monômeros (Fig. 2).

A atividade enzimática da GPDH pode ser ensaiada de várias formas. Sendo uma enzima de cinética rápida, facilmente reversível e que sofre inibição pelos produtos (21) deve-se procurar um método que contorne estas propriedades e facilite a medida da velocidade inicial de tal maneira que os dados sejam fidedignos. O método utilizado neste trabalho foi o arsenolítico. O uso do arseniato em lugar do fosfato (24) possui efeito semelhante, e resulta na formação do 1-arseno-3-fosfoglicerato, que é rápido e não enzimaticamente hidrolisado

a 3-fosfoglicerato. Este método evita a reversibilidade da reação e a inibição por 1-3-difosfoglicerato, sendo considerado um método sensível para a análise de estudos cinéticos (12,17). A GPDH exibe outras atividades, embora não fisiológicas e que contribuem para elucidar o mecanismo de ação da atividade fisiológica. Segundo Duggleby e Dennis (21) o melhor método é aquele no qual se emprega fosfato inorgânico e fosfogliceratoquinase que dá continuidade à reação, consumindo o ácido 1-3- difosfoglicérico. Neste caso, a linearidade é mantida por um período de tempo maior do que quando se emprega o método arsenolítico. De acordo com Byers et al (12) a estreita faixa linear no método arsenolítico é devido à contaminação por fosfato, podendo o nível de contaminação menor que 25% ser tolerado. Para amenizar a possível contaminação por fosfato foram sempre utilizadas soluções de G3P recentes e este era colocado por último no sistema de ensaio, pois como já mencionado, este substrato sofre hidrólise em curto espaço de tempo (17,52). Em nossas condições de trabalho, a concentração ótima para o arseniato foi de 30 mM (Fig. 7), sendo que, para a GPDH de músculo de jacaré (54) e músculo de coelho (24) foi encontrado o valor de 50 mM para a concentração ótima de arseniato e de 10 mM para a enzima de fígado de porco (17).

Não foi conseguida a cristalização da enzima; esta foi obtida como um precipitado amorfo em solução de sulfato de amônio. A enzima foi purificada 25 vezes com um rendimento de 32%, isto é, aproximadamente um terço da atividade inicial foi recuperada. A preparação enzimática foi obtida

com uma atividade específica relativamente alta de 203 unidades por miligrama de proteína. Allison e Kaplan (2) obtiveram uma atividade específica de aproximadamente 25 U/mg de proteína para a GPDH de músculo de faisão, peru e galinha ; provavelmente as condições de ensaio empregadas não eram as ideais. Duggleby e Dennis (22), obtiveram uma atividade específica de 200 U/mg de proteína para a GPDH de Pisum sativum (ervilha). Usando refinada técnica de purificação e sistema de ensaio enzimático de Ferdinand (24), Bloch et al(9) obtiveram 194 U/mg de proteína para a enzima de músculo de coelho. Para as GPDHs de músculo de jacaré (54) e fígado de porco (17) foram obtidas 80 U/mg de proteína e 150 U/mg de proteína respectivamente, pelo método arsenolítico. Os resultados da atividade específica obtidos para a GPDH de músculo de pato (203 U/mg prot.), usando o método arsenolítico é relativamente alto, sugerindo que houve boa purificação da enzima. Após 9 meses a enzima purificada mantinha ainda 90% da atividade inicial.

A GPDH de músculo de Anas sp purificada tem o pico máximo de absorção a 278 nm, apresentando NAD fortemente ligado, assemelhando-se à maioria das GPDHs estudadas. A relação  $A_{280\text{nm}} : A_{260\text{nm}}$  foi de 1,16 e de acordo com Seydoux et al (49) indica que a enzima possui 3,7 moles de NAD por mol de enzima. Normalmente a maioria das GPDHs isoladas possuem de 3 a 4 moles de NAD fortemente ligados como relatado para músculo de coelho (47), músculo de jacaré (54) e Bacillus stearothermophilus (31). A enzima de levedura (37) difere das GPDHs anteriormente citadas, não apresentando NAD ligado , sendo

a razão  $A_{280} : A_{260}$  de 2,1.

O peso molecular da enzima nativa foi estimado em torno de 140.000 e os monômeros 36.000, o que indica ser a GPDH um tetrâmero de unidades se não idênticas, bastante si milares. Valores semelhantes foram encontrados para a maioria das GPDHs estudadas. Para a enzima de músculo de coelho o peso molecular foi de 145.000 (47), para o músculo de réptil de 140.000 (54), sendo em torno de 142.000 para músculo de galinha, faisão e peru (2) e de 144.000 para B. stearothermophilus (31); todas demonstraram ser tetraméricas.

O pH ótimo encontrado para a máxima atividade catalítica foi de 8,2 com aproximadamente metade da atividade para os pH 7,6 e 8,5. O decréscimo da atividade para uma faixa de pH mais elevada não é tão acentuada quanto àquela descrita por Bondi et al (10) para diversos tecidos de coelho. Nossos resultados se assemelham aos resultados obtidos para músculo de réptil (54) e fígado de porco (17).

Os valores de  $K_m$  e  $K_i$  foram obtidos através do método de Lineweaver & Burk (40), cuja linearidade dos gráficos foi avaliada pelo método dos mínimos quadrados. O método de Lineweaver-Burk, muito utilizado pelos bioquímicos, vem sofrendo críticas devido ao fato da inversão das variáveis distorcer a estrutura dos erros (28). É sabido que as concentrações de substrato para construir o gráfico recíproco devem ser próximas ao valor de  $K_m$ . Se estas concentrações forem muito maiores que o valor de  $K_m$  a curva se tornará horizontal; o valor de  $V_m$  poderá ser determinado mas a inclinação se aproximará de zero. Se as concentrações forem mui-

to menores que o valor de  $K_m$  a curva interceptará ambos os eixos em pontos muito próximos à origem, não podendo ser determinados nem  $V_{max}$  nem  $K_m$ . Face a esta discussão os dados foram também analisados através de regressão não linear, onde o modelo matemático Michaelis-Menten (42) foi usado sem prévia manipulação.

Segundo Oestreicher & Pinto (43) a análise gráfica dos dados pode dar resposta adequada para alguns propósitos. Para uma análise mais segura dos resultados é necessário lembrar que as cinéticas enzimáticas envolvem certo número de parâmetros como pH, temperatura, inibidor, ativador íons metálicos e é essencial que estas estejam livres de tendências subjetivas, para que a estimação dos dados seja seguramente avaliada e isto só se alcança através de um método estatístico.

Os valores de  $K_m$  encontrados para a GPDH de Anas sp foram altos tanto para o NAD como para o G3P e assemelham-se aos encontrados para a enzima de músculo de esturjão (20) e Thermus thermophilus (25).

Os resultados mostraram que o NADH é um poderoso inibidor competitivo com relação ao NAD como substrato variável (Fig. 10). Isto pode ser devido a formação de um complexo, com o NADH combinando com o sítio de NAD na enzima (21).

A GPDH de músculo de pato demonstrou ser similar às demais enzimas de outras fontes quanto ao número de grupos -SH por sítio ativo, estimado em quatro, assim como para músculo de jacaré (54), músculo de rato (27), coelho (47). O número de grupos -SH totais, 12,7 para a GPDH de Anas sp,

também ficou dentro da faixa normalmente encontrada. Por exemplo, foi encontrado o valor de 11,8 grupos -SH totais para a enzima de esturjão (49), 16 para a GPDH de jacaré (54), utilizando-se o mesmo método. Gafni (27) também utilizou  $\text{Nbs}_2$  para determinar -SH totais, mas não utilizou uréia e encontrou um valor entre 9,3 e 10 grupos -SH para músculo de rato. Posteriormente fazendo uma análise de aminoácidos, foi detectado um valor de 20 grupos -SH por tetrâmero.

A inibição por iodoacetamida e também por íons mercúrio e cúprico indica a presença de grupos sulfidrilas essenciais no sítio catalítico da enzima (46), como em todas as outras GPDHs. A inibição por iodoacetamida, como era de se esperar, não foi revertida por excesso de mercaptoetanol pois o mecanismo de inibição é por alquilação (57). A inibição por 2-cloro-4-aminobenzoato e ortoiodosobenzoato foi parcial mas totalmente revertida por redução subsequente com 2-mercaptoetanol. A inibição por estes agentes oxidantes é devido à formação de pontes dissulfeto intramolecular (18). Segundo Batke et al (6) a inibição total da GPDH de músculo de porco por mercuriais como p-hidroximercuri-benzoato é devido ao bloqueio dos grupos -SH da cisteína-149 com a formação de mercaptídeos. A formação do mercaptídeo é seguida da liberação do NAD, cujo mecanismo segue uma reação de 1º ordem com a formação de um complexo ternário. A inibição, entretanto, é totalmente revertida pela ação de 2-mercaptoetanol.

## 5. CONCLUSÕES

- 5.1. A GPDH de Anas sp foi purificada 25 vezes com um rendimento de 32% e com alta atividade específica (203 U/mg proteína).
- 5.2. Após 9 meses de armazenamento a GPDH de Anas sp mantinha 90% de atividade inicial.
- 5.3. O pH ótimo da enzima é 8,2. A atividade enzimática diminui notadamente quando o pH é deslocado do pH ótimo.
- 5.4. A GPDH é uma enzima tetramérica com peso molecular de 140.000 para a enzima nativa e 36.000 para as subunidades.
- 5.5. Quatro moles de NAD são ligados por mol de enzima. O pico de absorção máxima da GPDH é em 278 nm.
- 5.6. A GPDH possui 4 grupos -SH altamente reativos e 12,7 grupos -SH totais.
- 5.7. A GPDH foi totalmente inibida por íons  $Hg^{++}$  e  $Cu^{++}$ , e pelos reagentes sulfidrilas p- cloromercuribenzoato e p-hidroxi-mercuribenzoato confirmando a dependência de grupos -SH para a atividade enzimática.

- 5.8. Os valores de  $K_m$  foram de 240  $\mu\text{M}$  para o G3P e 80  $\mu\text{M}$  para o NAD a pH 8,2 e a 25°C.
- 5.9. O NADH é um potente inibidor competitivo com o NAD sendo o  $K_i$  igual a 17  $\mu\text{M}$ .
- 5.10. Não houve diferença significativa para os valores de  $K_m$  e  $K_i$ , quando calculados pelos métodos de regressão linear e regressão não linear o que atesta a confiabilidade dos dados experimentais.
- 5.11. A GPDH de Anas sp mostrou ser semelhante às GPDHs de outras fontes em relação aos experimentos efetuados neste trabalho.

## 6. ANEXO

**Método de regressão não linear aplicado ao modelo matemático de Michaelis-Menten.**

Os valores de  $V_m$  e  $K_m$  da função,  $v = V_m \cdot |S| / (K_m + |S|)^{-1}$  que melhor se ajustam aos dados experimentais foram calculados através de regressão não linear. Assim, foram calculados os valores de  $V_m$  e  $K_m$  que minimizam a função

$$f(V_m, K_m) = \sum_{i=1}^n \left[ V_i - \frac{V_m \cdot S_i}{K_m + S_i} \right]^2,$$

a qual representa a soma dos quadrados dos erros, e onde  $V_i$  e  $S_i$  correspondem aos valores experimentais. Para tanto foi desenvolvido um programa em linguagem "basic".

O programa é baseado no método das coordenadas cíclicas (7); é um método iterativo, comumente chamado "método de busca" (28).

O processo de busca desenvolve-se matematicamente de maneira não trivial; tentaremos entretanto introduzi-lo de forma simplificada (Fig. 1).

Toma-se um sistema de coordenadas cartesianas e inicialmente parte-se de um par ordenado  $(V_m', K_m')$ , arbitrários. Dá-se então, um passo na horizontal para obter o ponto  $(K_m' + H, K_m')$ , que pode ser tanto para a direita como para a esquerda. Se neste ponto o valor da função for menor do que  $f(V_m', K_m')$ , dá-se mais um passo nessa direção. Se se encontrar um valor maior, fica-se então com o penúltimo ponto

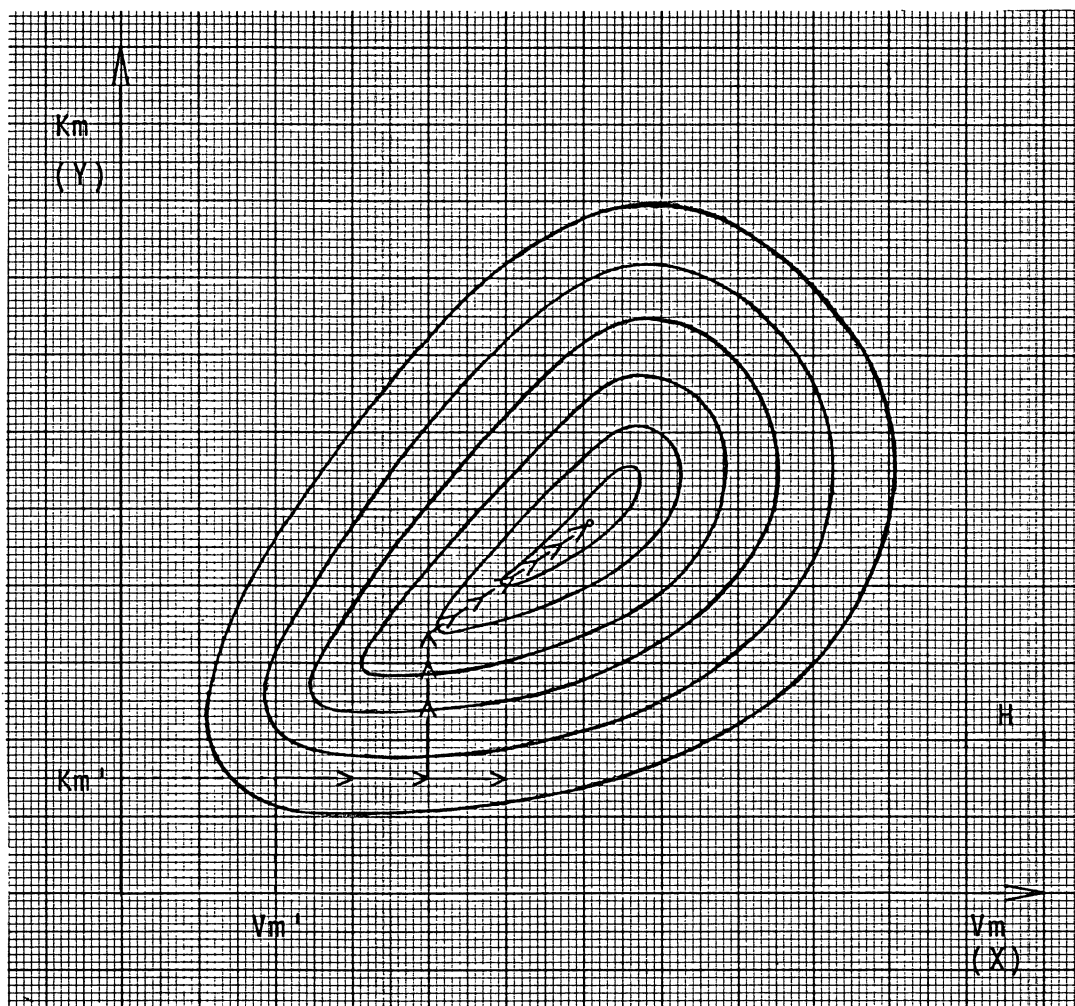


Fig. 1.

$(V_m^P, K_m')$  que é  $(V_m' + p.H, K_m')$  onde  $p$  representa o número de passos dados. A seguir dá-se um passo na vertical obtendo-se o ponto  $(V_m^P, K_m' + H)$  e repete-se o mesmo processo até um ponto  $(V_m^P, K_m^P)$  cujo valor da função seja menor que  $(V_m', K_m')$ . Em seguida reduz-se o passo pela metade e faz-se o mesmo processo até que o passo  $H$  seja menor do que um determinado  $\epsilon$ , valor previamente estipulado de acordo com a precisão desejada. O programa foi também desenvolvido de modo a caminhar na diagonal.

Os dados que devem ser fornecidos ao computador, além de  $S_i$ ,  $V_i$  (valores experimentais) são:  $M$ , o número de pontos experimentais;  $H$ , o passo inicial;  $\epsilon$ , valor que limita a dimensão do passo e  $V_m'$ ,  $K_m'$  o par ordenado inicial.

Com os valores de  $V_m$  e  $K_m$  obtidos pelo processamento, foi construída a curva de Michaelis-Menten que melhor se ajusta aos dados experimentais.

A listagem do programa, codificado em "basic" foi processado no sistema DEC-10 do centro de computação eletrônica da UFPr.

```

*ST0020 DIM A(20),B(20),X(100),Y(100)
00030 INPUT M,H,E,X,Y
00040 FOR I=1 TO M
00050 INPUT A(I),B(I)
00060 NEXT I
00070
00100 IF FNM(X+H,Y)<FNM(X,Y) GO TO 120
00110 H=-H
00115 IF FNM(X+H,Y)>=FNM(X,Y) GO TO 150
00120 X=X+H
00125 PRINT "HORIZ.",X,Y
00130 IF FNM(X+H,Y)>=FNM(X,Y) GO TO 150
00140 GO TO 120
00150 IF FNM(X,Y+H)<FNM(X,Y) GO TO 170
00160 H=-H
00165 IF FNM(X,Y+H)>=FNM(X,Y) GO TO 200
00170 Y=Y+H
00175 PRINT "VERT.",X,Y
00180 IF FNM(X,Y+H)>=FNM(X,Y) GO TO 200
00190 GO TO 170
00200 IF FNM(X+H,Y+H)<FNM(X,Y) GO TO 206
00201 IF FNM(X-H,Y-H)<FNM(X,Y) GO TO 209
00202 IF FNM(X+H,Y-H)<FNM(X,Y) GO TO 212
00204 IF FNM(X-H,Y+H)<FNM(X,Y) GO TO 215
00205 GO TO 220
00206 X=X+H
00207 Y=Y+H
00208 GO TO 100
00209 X=X-H
00210 Y=Y-H
00211 GO TO 100
00212 X=X+H
00213 Y=Y-H
00214 GO TO 100
00215 X=X-H
00216 Y=Y+H
00217 GO TO 100
00220 H=H/2
00230 IF ABS(H)>F GO TO 100
00250 DEF FNM(X,Y)
00260 LET FNM=0
00270 FOR I=1 TO M
00280 LET FNM=FNM+(B(I)-X*A(I)/(Y+A(I)))**2
00290 NEXT I
00300 FNMEND
00304 PRINT "X=";X,"Y=";Y
00306 PRINT "F=";FNM(X,Y)
00310 END

```

SEND0: Vi = B, Vm = X

Si = A, Km = Y

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, M.J.; McPHERSON, J.R.; ROSSMANN, M.G.; SCHEVITZ, R.W.; WONACOTT, A.J. The structure of the nicotinamide adenine dinucleotide coenzyme when bound to lactate dehydrogenase. J.Mol.Biol, 51: 31-38, 1970.
2. ALLISON, W.S.; KAPLAN, N.O. The comparative enzymology of triose-phosphate dehydrogenase. J.Biol.Chem, 239 (7): 2140-51, 1964.
3. ALLISON, W.S. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-crystalline. In: WOOD, A.W. ed. Carbohydrate Metabolism. New York, Academic Press, 1966. p.210-15 (Methods in Enzymology, 9).
4. AMELUNXEN, R.E. & CARR, D.O. The crystallization and properties of GPDH isolated from rabbit muscle by a simplified procedure. Biochim.Biophys.Acta, 132: 256-259, 1967.
5. ANDREWS, P. The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weight over a wide range. Biochem.J., 96: 595-606, 1965.
6. BATKE, J.; KELETI, T.; FISCHER, E. The mechanism of reaction of Cys-149 of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with p-hydroxy-mercuri benzoate. Eur. J. Biochem., 46: 307-315, 1974.
7. BAZARRA, M.S. & SHETTY, C.M. Cyclics coordenates In: Non linear programming. Theory and algorithms, New York, John Wiley & Sons, 1979. p.271-274.

8. BLAKESLEY, R.W. & BOEZI, J.A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using coomassie brilliant blue G,250. Anal.Biochem., 82: 580-582, 1977.
9. BLOCK, W.; MACQUARRIE, R.A.; BERNHARD, S.A. The nucleotide and acyl groups content of native rabbit muscle GPDH. J.Biol.Chem., 246: 780-790, 1971
10. BONDI, E.; WATKINS, J.; KIRTLEY, M.E. Comparison of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in rabbit tissues. Biochim.Biophys.Acta., 185: 305-309, 1969.
11. BUEHNER, M.; FORD, G.C.; MORAS, D.; OLSEN, K.W.; ROSSMANN, M.G. Three-dimensional structure of GPDH. J. Mol.Biol., 90: 25-49, 1974.
12. BYERS, L.D.; SHE, H.S.; ALAYOFF, A. Interaction of phosphate analogues with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry, 18 (12): 2471-2480, 1979.
13. CARDON, J.W. & BOYER, P.D. Subunit interaction in catalysis. Some experimental and theoretical approaches with GPDH. J.Biol.Chem., 257: 7615-7662, 1982.
14. CONWAY, A. & KOSHLAND Jr, D.E. Negative cooperativity in enzyme action. The binding of DPN to GPDH. Biochemistry, 7: 4011-4029, 1968.
15. CORI, G.T.; SLEIN, M.W.; CORI, C.F. Crystalline D-GPDH from rabbit muscle. J.Biol.Chem., 173: 605-618, 1948.

16. CURLING, J. The use of sephadex in the separation, purification and characterization of biological materials. Exp.Physiol.Biochem., 3: 417-484, 1970.
17. DAGHER, S.M. & DEAL, W.C. Pig liver glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: purification, crystallization and characterization. Arch. Biochem. Biophys., 179: 643-653, 1977.
18. DAVIDSON, B.E.; SAJGÓ, M.; NOLLER, H.F.; HARRIS, J.I. Amino acid sequence of GPDH from lobster muscle. Nature (Lond), 216: 1181-1185, 1967.
19. DAVIS, B.J. Disc electrophoresis methods and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad.Sci., 121: 407-427, 1964.
20. DEPARADE, M.P. & GLÖGGLER. Isolation and properties of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from a sturgeon from the Caspian Sea and its interaction with spin-labeled NAD<sup>+</sup> derivatives. Biochim.Biophys. Acta, 659: 422-433, 1981.
21. DUGGLEBY, R.G. & DENNIS, D.T. Nicotinamide Adenine dinucleotide-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Pisum sativum. Assay and steady state kinetics. J.Biol.Chem., 249: 167-174, 1974.
22. DUGGLEBY, R.G. & DENNIS, D.T. Nicotinamide adenine dinucleotide-specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Pisum sativum. Purification and characterization. J.Biol.Chem., 249: 162-166, 1974.
23. ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. Arch.Biochem.Bioph., 82: 70-77, 1959.

24. FERDINAND, W. The isolation and specific activity of rabbit-muscle glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. Biochem.J., 92: 578-85, 1964.
25. FUJITA, S.C.; OSHIMA, T.; IMAHORI, K. Purification and properties of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from an Extreme Thermophile., Thermus thermophilus strain HB8. Eur.J.Biochem 64: 57-68, 1976.
26. GABRIEL, O. Analytical disc gel electrophoresis. In: JAKOBY, W.B. eds: Enzyme purification and related techniques. New York, Academic Press, 1971. p. 565-577. (Methods in Enzymology, 22).
27. GAFNI, A. Purification and comparative study of GPDH from the muscles of young and old rats. Biochemistry, 20 (21): 6035-6040, 1981
28. GARFINKEL, D. & FEGLEY, K.A. Fitting physiological models to data. Am.J.Physiol., 246: R 641-R650, 1984.
29. GOODMAN, M. Protein sequences in phylogeny. In: AYALA, F.J. ed. Molecular evolution. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1976. p. 141-159.
30. HARRIGAN, P.J. & TRENTAM, D.R. Kinetic studies of the acylation of pig muscle GPDH by 1-3-diphosphoglycerate and of proton uptake and release in the overall enzyme mechanism. Biochem.J., 135: 695-703, 1973.
31. HARRIS, J.I.; HOCKING, J.D.; RUNSWICK, M.J.; SUZUKI, K.; WALKER, J.E. D-GPDH. The purification and characterization of the enzyme from thermophiles Bacillus stearothermophilus and Thermus aquaticus. Eur.J.Biochem., 108: 535-547, 1980.

32. HARRIS, J.I. & PERHAM, R. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from pig muscle. Nature, (Lond), 210: 1025-28, 1968.
33. HEINZ, F. & FREIMÜLLER, B. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human tissues. In: Wood, W.A. ed. Carbohydrate metabolism. New York, Academic Press, 1982. p.301-305 (Methods in Enzymology, 89).
34. HOCKING, J.D. & HARRIS, J.I. D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase amino acid sequence of the enzyme from the extreme thermophile Thermus aquaticus. Eur.J.Biochem.; 108: 567-579, 1980.
35. HORECKER, B.L. & KORNBERG, A. The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. J. Biol.chem.; 175: 385-390, 1948.
36. JONES, G.M.T. & HARRIS, J.I. GPDH: amino acid sequence of enzyme from baker's yeast. FEBS Lett., 22: 185-189, 1972.
37. KIRSCHNER, K. Co-operative binding of nicotinamide adenine dinucleotide to yeast GPDH. J.Mol.Biol., 58: 51-68, 1971.
38. KIRSCHNER, K.; GALLEG0, E.; SCHUSTER, I.; GOODALL, D. Co-operative binding of nicotinamide-adenine dinucleotide to yeast GPDH. J.Mol.Biol., 58: 29-50, 1971.
39. KUCHLER, R.J. Polyacrylamide gel electrophoresis. In: UMBREIT, W.W.; BURRIS, R.H.; STANFEER, J.F. eds. Manometric and biochemical techniques. 5ed. Minneapolis, Burgees, 1972. p.342-356.

40. LINEWEAVER, H. & BURK, D. The determination of the enzyme dissociation constants, J.Am.Chem.Soc., 56: 658-666, 1934.
41. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 193: 265-275, 1951.
42. MICHAELIS, L. & MENTEN, M.L. Kinetics of invertase action, Biochem Z., 49: 333-369, 1913.
43. OESTREICHER, E.G. & PINTO, G.F. Pocket computer program for fitting the Michaelis-Menten equation. Comput.Biol.Med., 13(4): 309-315, 1983.
44. OLSEN, K.W.; MORAS, D.; ROSSMANN, M.G.; HARRIS, J.I. Sequence variability and structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J.Mol.Biol., 205(24): 9313-9321, 1975.
45. PETELL, J.K.; SARDO, M.J.; LEBHERZ, H.G. A simple procedure for the isolation of seven abundant muscle enzymes. Prep.Biochem., 11 (1): 69-89, 1981.
46. RAPKINE, L. Sulfhydryl groups and enzymic oxidation-reduction. Biochem.J. 32: 1729-1739, 1938.
47. SCHEEK, R.M. & SLATER, E.C. Preparation and properties of rabbit-muscle GPDH with equal binding parameters for the third and fourth  $\text{NAD}^+$  molecules. Biochim.Biophys.Acta., 526: 13-24, 1978.
48. SEGAL, H.L. & BOYER, P.D. The role of sulfhydryl groups in the activity of D-GPDH. J.Biol.Chem., 204: 265-281, 1953.

49. SEYDOUX, F.; BERNHARD, S.; PFENNINGER, O.; PAYNE, M.; MALHOTA, O.P. Preparation and active-site specific properties of sturgeon muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry, 12(21): 4290-4300, 1973.
50. TAYLOR, J.F. Aldolase from muscle. In: Preparation and Assay of Enzymes. New York, Academic Press, 1955. p.310-315 (Methods in Enzymology, 1).
51. TOLEDO, G.L. & OVALLE, I.I. Regressão e Correlação em: Estatística básica. São Paulo, Atlas, 1981, p. 406.
52. TRENTHAM, D.R.; McMURRAY, C.H.; POGSON, C.I. The active chemical state of D-glyceraldehyde-3-phosphate in its reactions with D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, aldolase, and triose phosphate isomerase. Biochem.J., 114: 19-33, 1969.
53. VELICK, S.F. & FURFINE, C. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. In: BOYER, P.D.; LARDY, H.; MYRBACK, eds. Oxidation and reduction; Part A: Nicotinamide nucleotide-linked enzymes. Flavin nucleotide-linked enzymes. 2ed. New York, Academic Press, 1963. p. 243-273 (The Enzymes, 7).
54. 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., 743(4): 781-90, 1983.
55. WALKER, J.E.; CARNE, A.F.; RUNSWICK, M.J.; BRIDGEN, J.; HARRIS, J.I. D-GPDH. Complete amino acid sequence of the enzyme from Bacillus stearothermophilus. Eur.J.Biochem., 108: 549-565, 1980.

56. WARBURG, O. & CHRISTIAN, H. Isolierung und kristallisation des gärungsferments enolase. Biochem. Z., 310: 384-421, 1941.
57. WEBB, J.L. Iodoacetate and Iodoacetamide In: Enzyme and metabolic inhibitions. New York, Academic Press, 1966. V.3, p. 1-283.
58. WEBER, K. & OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J.Biol.Chem., 244: 4406-4412, 1969.