

MARIA BENIGNA MARTINELLI DE OLIVEIRA

Estudo dos Efeitos do Metotrexato Sobre
Alguns Parâmetros Metabólicos em Células
Hela e em Fígado Perfundido

Tese apresentada ao Departamento de Bio-
química da Universidade Federal do Paraná,
visando a obtenção do Grau de Doutor em
Ciências.

CURITIBA
1986

Tese orientada pela Professora
Dra. MARIA LÚCIA WAMBIER KLÜPPEL

*Ao Dr. Benedito Valdecir de Oliveira,
meu esposo, com amor.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. MARIA LÚCIA WAMBIER KLÜPPEL, em especial, pela orientação segura, estímulo e amizade.

Ao Professor Dr. ANNIBAL DE PAIVA CAMPELLO, pelo apoio e estímulo, que viabilizou a metodologia de cultivo celular.

Ao Professor Dr. ADELAR BRACHT e demais membros do Laboratório de Metabolismo Hepático da Universidade Estadual de Maringá, pela acolhida em seu laboratório e auxílio prestado nos experimentos de perfusão.

À Professora Dra. GLACI T. ZANCAN, pelo exemplo científico, valiosas críticas, sugestões e revisão deste trabalho.

Ao Professor LUÍS CARLOS VIEIRA LOPES, pela leitura e sugestões apresentados.

À Professora Dra. ORIETA SILVEIRA, pelo auxílio técnico prestado nos experimentos de Warburg.

Ao Dr. MIGUEL RODRIGUEZ e à Bióloga EMA CHANDELIER pela colaboração na metodologia de Cultivo Celular.

Ao Professor Dr. SHIGEHIRO FUNAYAMA, pela colaboração nos experimentos de Cinética Enzimática.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação, Professores e Amigos do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pelo incentivo.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro (Proc. 405108/84 e 408333/85).

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO	v
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE TABELA E FIGURAS	x
RESUMO	xii
I. INTRODUÇÃO	1
I.1. Aspectos metabólicos de células neoplásicas	1
I.2. Estrutura e propriedades químicas do metotrexato	7
I.3. Farmacocinética e toxicidade	8
I.4. Transporte do metotrexato através da membrana celular	11
I.5. Farmacologia bioquímica do metotrexato..	13
I.6. Fatores que controlam a concentração do metotrexato nas células	15
I.7. Efeito do metotrexato sobre o metabolismo energético celular	17
I.8. Objetivo	19
II. MATERIAIS E MÉTODOS	20
II.1. Materiais	20
II.1.1. Reagentes	20
II.1.2. Perfusão de fígado isolado	22
II.1.2.1. Líquido de perfusão	22
II.1.2.2. Isolamento de fígado	22
II.1.3. Obtenção do homogenado de fígado de rato para determinação das atividades de glucose-6-fosfatase e glicogênio fosforilase	24
II.1.4. Cultivo celular	25
II.1.4.1. Procedimentos de esterilização de materiais de vidros e acessórios	25
II.1.4.2. Soluções	25
II.1.4.2.1. Solução de bicarbonato de sódio	25
II.1.4.2.2. Solução salina tamponada	25
II.1.4.2.3. Solução dispersante de células	26

11.1.4.3.	Meio de cultura	26
11.1.4.4.	Testes de esterilidade	26
11.1.4.5.	Células	27
11.1.4.6.	Condições de manutenção	27
11.1.4.7.	Cultivo celular	27
11.1.4.8.	Contagem	28
11.1.5.	Obtenção de células rompidas, para deter- minação de atividades enzimáticas	29
11.2.	Métodos	29
11.2.1.	Perfusão de fígado: Análises do perfusa- do	29
11.2.1.1.	Consumo de oxigênio	29
11.2.1.2.	Produção de lactato e piruvato	30
11.2.1.3.	Produção de glucose	31
11.2.2.	Determinação da viabilidade celular	31
11.2.2.1.	Efeito do metotrexato sobre a viabilida- de celular	32
11.2.3.	Determinação da atividade de ferriciane- to redutase e da ejeção de prótons trans- membrana plasmática	33
11.2.3.1.	Redução do ferricianeto	33
11.2.3.2.	Ejeção de prótons	33
11.2.4.	Avaliação da respiração celular e do e- feito Crabtree	34
11.2.5.	Efeito do metotrexato sobre a glicólise de células HeLa	35
11.2.5.1.	Consumo de glucose, produção de lac- tato e piruvato, por células in- tactas	35
11.2.5.2.	Dosagem de metabólitos intermediários...	36
11.2.5.2.1.	Determinação da glucose-6-fosfato, fruto- se-6-fosfato e ATP	37
11.2.5.2.2.	Determinação de dihidroxiacetona fosfato gliceraldeído-3-fosfato e frutose-1,6- bisfosfato	38
11.2.5.2.3.	Determinação de piruvato e fosfoenpiru- vato	38
11.2.5.2.4.	Determinação de ADP	39
11.2.6.	Medida das atividades enzimáticas de ho- mogenato de células HeLa	39
11.2.6.1.	Efeito do metotrexato sobre a atividade da Lactato Desidrogenase (E.C.1.1.1.27. L-lactato: NAD ⁺ oxidoreductase)	39
11.2.6.2.	Efeito do metotrexato sobre a atividade da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (E.C.1.2.1.12.D-gliceraldeído-3-fosfato: NAD ⁺ oxidoreductase)	40

11.2.6.3.	Efeito do metotrexato sobre a atividade da glucose-6-fosfato desidrogenase (E.C. 1.1.1.49 D-glucose-6-fosfato NADP ⁺ oxidoreductase)	41
11.2.6.4.	Efeito do metotrexato sobre a atividade da piruvato quinase (E.C. 2.7.1.40 piruvato fosfotransferase)	41
11.2.7.	Medida das atividades enzimáticas de homogenado de fígado de rato	42
11.2.7.1.	Efeito do metotrexato sobre a atividade de glicogênio fosforilase total de homogenado de fígado de rato (E.C.2.4.1.1)..	42
11.2.7.2.	Efeito de metotrexato sobre a atividade da glucose-6-fosfatase (E.C. 3.1.3.9 D-glucose-6-fosfato fosfohidrolase de homogenado de fígado de rato)	43
11.2.8.	Dosagem de Pi	43
11.2.9.	Dosagem de proteína	44
III.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
III.1.	Efeito do metotrexato em fígado de rato alimentado	45
III.2.	Efeito do metotrexato sobre a gliconeogênese	51
III.3.	Efeito do metotrexato sobre a atividade redox transmembrana plasmática	56
III.4.	Efeito do metotrexato sobre a respiração de células HeLa	61
III.5.	Efeito do metotrexato sobre a glicólise de células HeLa	66
IV.	DISCUSSÃO FINAL E CONCLUSÃO	84
V.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

LISTA DE ABREVIATURAS

A	-	Absorbância
ADP	-	Adenosina 5'difosfato
AMP	-	Adenosina 5'monofosfato
atm	-	Atmosfera
ATP	-	Adenosina 5'trifosfato
DAP	-	Dihidroxiacetona fosfato
DHF	-	Dihidrofolato
DHFR	-	Dihidrofolato redutase
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
dTMP	-	Desoxi timidina monofosfato
dUDP	-	Desoxi uridina difosfato
EC	-	Efeito Crabtree
EDTA	-	Ácido etileno diaminotetraacético
FGI	-	Fosfoglucoseisomerase
FeCN	-	Ferricianeto de potássio
F6P	-	Frutose-6-fosfato
F-1,6-P ₂	-	Frutose-1,6-bisfosfato
GAP	-	Gliceraldeído 3 fosfato
GDH	-	Glicérol fosfato desidrogenase
G1P	-	Glucose-1-fosfato
G6P	-	Glucose-6-fosfato
G6Pase	-	Glucose-6-fosfatase
G6PDH	-	Glucose-6-fosfato desidrogenase
G3P	-	Gliceraldeído-3-fosfato
G3PDH	-	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Gno	-	Glicogênio
Gno Fosf.	-	Glicogênio fosforilase

Hepes	- N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-Ácido Etanosulfônico
HK	- Hexoquinase
LDH	- Lactato desidrogenase
MTX	- Metotrexato
NAD ⁺	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo forma reduzida
NADP ⁺	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato forma reduzida
PEP	- Fosfoenolpurivato
6PG	- 6 Fosfogluconato
Pi	- Fosfato inorgânico
PK	- Piruvato quinase
PrK	- Proteína quinase
PRPP	- Fosforribosil pirofosfato
R-5-P	- Ribose-5-fosfato
Ru5P	- Ribulose-5-fosfato
TCA	- Ácido tricloroacético
TD	- Tampão para ensaios redox transmembrana plasmática
TIM	- Triose fosfato isomerase
THF	- Tetrahidrofolato
TMPDH	- Desidrogenase transmembrana plasmática
TRIS	- Tris(hidroximetil)aminometano

LISTA DE TABELA E FIGURAS

		Página
TABELA 1 -	Ação do metotrexato sobre o Efeito Crabtree	65
FIGURA 1 -	Efeito do metotrexato sobre o consumo de oxigênio, glicogenólise, produção de L-lactato e de piruvato, em perfusão de fígado isolado de rato	48
FIGURA 2 -	Efeito da concentração do metotrexato sobre a glicogenólise e consumo de oxigênio, em perfusão de fígado de rato	49
FIGURA 3 -	Efeito da concentração do metotrexato sobre a liberação de glucose em fígado perfundido	50
FIGURA 4 -	Efeito do MTX sobre a gliconeogênese, produção de L-lactato e consumo de oxigênio, em perfusão de fígado de rato	52
FIGURA 5 -	Efeito do metotrexato sobre as atividades de glicogênio fosforilase e glucose-6-fosfatase de homogenato de fígado de rato	53
FIGURA 6 -	Redução do ferricianeto por células HeLa...	58
FIGURA 7 -	Efeito do metotrexato sobre a atividade redox transmembrana plasmática	59
FIGURA 8 -	Efeito do metotrexato sobre a ejeção de prótons, induzida pelo ferricianeto em células HeLa	60
FIGURA 9 -	Efeito do metotrexato em pré-incubação sobre a respiração de células HeLa	63
FIGURA 10 -	Efeito da concentração do metotrexato sobre a respiração de células HeLa	64
FIGURA 11 -	Efeito do metotrexato sobre a produção de L-lactato, piruvato e consumo de oxigênio e glucose, por células HeLa	67
FIGURA 12 -	Efeito do metotrexato sobre a produção de metabólitos intermediários	71
FIGURA 13 -	Efeito do metotrexato sobre a atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de células HeLa	73

FIGURA 14	-	Efeito do metotrexato sobre a atividade da piruvato quinase de células HeLa	74
FIGURA 15	-	Efeito do metotrexato sobre a atividade da lactato desidrogenase de células HeLa(I)..	76
FIGURA 16	-	Efeito do metotrexato sobre a lactato desidrogenase de células HeLa (II)	77
FIGURA 17	-	Efeito do metotrexato sobre a atividade da glucose-6-fosfato desidrogenase	78
FIGURA 18	-	Efeito do metotrexato sobre a viabilidade celular	83
FIGURA 19	-	Esquema representativo do modelo de célula tumoral usando glucose como substrato..	88

RESUMO

Em concentrações de 0,4mM o metotrexato promove um aumento discreto do consumo de oxigênio em fígado perfundido de rato alimentado e em jejum; a esta concentração a glicogenólise é aumentada em 100% e em concentração de 0,8mM, o aumento é de 350% sendo o efeito reversível. Observa-se ainda acúmulo de piruvato (250%) e diminuição da relação NAD^+/NADH (60%). A droga não afeta a gliconeogênese, e quando se usa homogenato de fígado de rato, não se observa efeito sobre a glicogênio fosforilase e glucose-6-fosfatase. A droga (0,4mM) atua sobre células HeLa inibindo a atividade de ferricianeto redutase transmembrana plasmática (90%), o efluxo de prótons transmembrana plasmática (70%) e a respiração celular (10%) mantida por substratos endógenos, sendo este último efeito observado apenas após pré-incubação de dez minutos. Em presença de glucose como substrato, o metotrexato estimulou o consumo de oxigênio, reduziu a produção de lactato (25%) e duplicou a produção de piruvato; houve acúmulo dos metabólitos intermediários PEP, GAP, DAP; por outro lado, o consumo de glucose e os níveis de G6P e F6P não foram afetados, havendo discreta diminuição (13%) dos níveis de F-1,6-P₂. Em extrato livre de células HeLa, o MTX em todas as concentrações usadas inibe a atividade da lactato desidrogenase, sendo aparentemente uma inibição do tipo incompetitivo. Note-se que em concentração de até $4,6 \times 10^{-4}\text{M}$ o MTX estimula a atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase inibindo-a em concentrações superiores; efeito semelhante ocorre com a glucose-6-fosfato desidrogenase, sendo inibida a concentrações superiores a $2 \times 10^{-4}\text{M}$. A piruvato quinase, não é afetada diretamente pela droga. Os resultados sugerem que o metotrexato apresenta mais de um sítio de ação na via glicolítica e que a inibição da atividade redox transmembrana plasmática está integrada ao contexto metabólico sendo anterior àquele da dihidrofolato redutase.

I. INTRODUÇÃO

I.1. ASPECTOS METABÓLICOS DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS

Um dos marcadores fenotípicos mais consistentes das células neoplásicas, é o aumento nas velocidades de utilização de glucose e produção de ácido láctico, quando comparadas com células normais de tecidos de mesma origem (WARBURG, 1926; SINGH et al, 1974; BUSTAMANTE & PEDERSEN, 1977; PEDERSEN, 1978; BUSTAMANTE et al, 1981). Nestas células, o efeito Pasteur, um dos mecanismos básicos de controle metabólico, não opera com eficiência.

CRABTREE (1929), aplicando as técnicas de Warburg, ao estudo de células tumorais, demonstrou que a glucose ou um de seus metabólitos, atuava como repressor da respiração. A inibição da respiração pela glucose, é conhecida como efeito Crabtree, tendo sido estudada por vários pesquisadores (WU & RACKER, 1959; ERNSTER & DALLNER, 1963; PACKER & GOLDBERGER, 1960; GOSALVEZ et al, 1975; 1978; BUSTAMANTE et al, 1981 ; NAKASHIMA et al, 1986). Células normais da retina, medula renal e leucócitos, também exibem o efeito Crabtree (WENNER, 1979), enquanto que o desequilíbrio entre as velocidades da via glicolítica e respiração celular, não é observado em tumores hepáticos de crescimento lento (WEBER et al, 1961; LO et al, 1968; WEINHOUSE, 1972).

Os perfis enzimáticos de tecidos normais e de tecidos neoplásicos, tem sido exhaustivamente examinados, com o objetivo de serem esclarecidas as diferenças metabólicas existentes (GREENSTEIN, 1956; HERSFELD et al, 1978; SUN et al, 1981; SORA-

BY et al, 1983). No que se refere a atividade das enzimas envolvidas na via glicolítica e na respiração celular, tem-se observado uma ampla faixa de variação de níveis enzimáticos. Verificou-se que em tecidos neoplásicos, a atividade das enzimas da respiração celular corresponde aos menores valores encontrados nos tecidos normais equivalentes (do mesmo animal), enquanto que a atividade das enzimas da via glicolítica, corresponde aos maiores valores (GREENSTEIN, 1956; SHONK et al, 1965; KNOX, 1967; SUN et al, 1981). Tais observações, levaram alguns pesquisadores a afirmar que estes resultados não eram de relevância e que em termos bioquímicos não existiriam diferenças entre as células normais e neoplásicas (GREENSTEIN, 1956).

Entretanto, estudos realizados por WEBER (1977 a, b) em fígado sujeito às condições normais de proliferação (regeneração) ou em hepatomas com diferentes velocidades de crescimento, demonstram que em condições de regeneração não existe alterações das enzimas chave da via glicolítica, enquanto que, nas condições de neoplasia, em concomitância ao aumento dos níveis da hexoquinase, fosfofrutoquinase e piruvato quinase, ocorre diminuição dos níveis das enzimas determinantes da gliconeogênese. Assim, o desequilíbrio no metabolismo de carboidratos das células cancerosas, caracteriza-se por alterações quantitativas nas proporções de enzimas chave das vias metabólicas opostas e por alterações qualitativas, manifestada pelo aparecimento de isozimas que favorecem a glicólise. Tem sido descrito também, que a capacidade destas células acumularem glicogênio é diminuída (WEBER, 1977 a,b).

Em relação à hexoquinase, vários estudos sugerem que nas células cancerosas, esta enzima apresenta-se em níveis mais elevados, além de estar predominantemente associada à mitocô-

dria (BUSTAMANTE & PEDERSEN, 1977; BUSTAMANTE et al, 1981; NAKASHIMA et al, 1986). A associação ocorre com a membrana externa da mitocôndria, a qual apresenta uma proteína receptora para a ligação da hexoquinase (ROSE & WARMS, 1967; PARRY & PEDERSEN, 1983). Essa proteína, integral da membrana externa, parece ser a proteína formadora do poro mitocondrial (porina) (LINDEN et al, 1982; FIEK et al, 1982; NAKASHIMA et al, 1986). Paralelamente a essas observações, sabe-se que essa hexoquinase ligada à mitocôndria é menos sensível à inibição alostérica pela glucose-6-fosfato (SINGH et al, 1974; BUSTAMANTE & PEDERSEN, 1977) e, sua ligação com a mitocôndria poderia facilitar o acesso ao ATP gerado pela organela, sugerindo assim um envolvimento dessa enzima na alta velocidade da glicólise que estas células possuem.

Ao lado da hexoquinase, evidências experimentais obtidas por GOSALVEZ et al (1975, 1978), indicam que a piruvato quinase pode ser uma das enzimas determinantes do efeito Crabtree. A isozima que predomina em células cancerosas e também em linhagens de células derivadas de tumores, é do tipo M_2 (A ou K) (HAMMOND & BALINSK, 1978), que é regulada alostericamente. Entre os efetores negativos dessa enzima estão o ATP, alanina e outros aminoácidos, enquanto que os positivos são o fosfoenolpiruvato e frutose-1,6-bisfosfato (HERS & HUE, 1983). O envolvimento da piruvato quinase no efeito Crabtree foi consistentemente demonstrado por GOSALVEZ et al (1974, 1975), onde os pesquisadores sugerem que a piruvato quinase, pode competir, com sucesso, pelo ADP, com a mitocôndria. Por outro lado, quando administraram inibidores da piruvato quinase a células tumorais intactas, ocorreu aumento da velocidade respiratória, diminuição da velocidade glicolítica, com o conseqüente aumento do PEP intracelular

(GOSALVEZ et al, 1975).

A fosfofrutoquinase, é considerada a principal enzima reguladora da glicólise, sendo modulada por ATP, que atua como efetor alostérico negativo; frutose-6-fosfato, que atua liberando a inibição pelo ATP; frutose-1,6-bisfosfato e AMP, que atuam sinergicamente com frutose-6-fosfato; citrato e H^+ , que além de inibirem a enzima, atuam sinergicamente com o ATP (HERS et al, 1982). O ativador mais potente da fosfofrutoquinase, é a frutose-2,6-bisfosfato (SCHAFTINGEN et al, 1980) e, embora este metabólito esteja envolvido na regulação da glicólise de células normais, não está esclarecido se exerce funções reguladoras do efeito Pasteur e nem se é responsável pela alta velocidade glicolítica que ocorre em células cancerosas (HERS et al, 1982). Porém, foi sugerido por LOISEAU et al (1985), que os níveis de frutose-2,6-bisfosfato, além das enzimas glicolíticas, seriam fatores importantes na regulação da glicólise de células de hepatomas de rato, tratadas com glucocorticoides.

A isozima da fosfofrutoquinase predominante em células cancerosas é do tipo F (ou P), embora existam níveis significativos da isozima L. (VORA et al, 1985, OSKAN et al, 1985). Tem sido demonstrado que a isozima F de células Ehrlich, não é afetada por frutose-1,6-bisfosfato, sendo no entanto ativada por frutose-2,6-bisfosfato (BOSCA et al, 1982). Os mesmos pesquisadores mostraram que este tipo de fosfofrutoquinase é especificamente inibido por fosfoenolpiruvato, sendo sugerido que esta característica poderia ser útil como instrumento para caracterizar a isozima do tipo F. (BOSCA et al, 1982).

Ao longo deste trabalho, serão usadas células HeLa. Importante a ser salientado no metabolismo destas células, é que ape-

nas 5% da glucose metabolizada durante o seu crescimento, é oxidada no ciclo de Krebs (REITZER et al, 1979). Também, há observações de que a glutamina representa o principal combustível para as reações ao ciclo de Krebs em células HeLa (REITZER et al, 1979) e em outros tipos celulares (ZIELKE et al, 1984; DRANOFF et al, 1985), indicando que a função primordial da glicólise nestas células é garantir o suprimento de metabólitos para a via das pentoses.

O efeito da glutamina sobre a glicólise de células HeLa, foi recentemente investigado (MOJENA et al, 1985), demonstrando-se que este aminoácido promove uma diminuição dos níveis de frutose-2,6-bisfosfato. Entretanto, em contraste ao que ocorre nas células normais, a diminuição da frutose-2,6-bisfosfato não foi acompanhada da inibição da glicólise, sugerindo que a fosfofrutoquinase de células HeLa, que é do tipo F (VORA et al, 1985), é pouco sensível à regulação pelo metabólito.

Nestas células, foi demonstrado também a presença de piruvato quinase do tipo M_2 , hexoquinase do tipo I e II (não há relatos se estão associadas à mitocôndria) e lactato desidrogenase dos tipos M_4 , HM_3 e H_3M (HAMMOND & BALINSKY, 1978).

Quanto à capacidade de células HeLa acumularem glicogênio, existem controvérsias (RACKER, 1965), porém, evidências indicam que esta via metabólica é operante. Tem sido descrito que, menos de 1% da glucose consumida por estas células, é acumulada como glicogênio (REITZER et al, 1979).

O crescimento de células HeLa (SUN & CRANE, 1984) assim como de outros tipos celulares (ELLEM & KAY, 1983), parece ser regulado por uma atividade redox transmembrana plasmática. Esta atividade redox, é visualizada pela redução de oxidantes im-

permeáveis, como por exemplo o ferricianeto, por células intactas. A redução extracelular do ferricianeto existe em vários tipos de células estudados (CRANE et al, 1982(a); MISHRA & PASSOW, 1969; CLARK et al, 1981; CRANE et al, 1982(b), inclusive em células vegetais (CRAIG & CRANE, 1982)e, embora permaneça em aberto a natureza doador de elétrons, fortes evidências indicam que em células HeLa é o NADH (NAVAS et al, 1986). À atividade redox transmembrana plasmática, são atribuídas outras funções como: transporte de aminoácidos, açúcares, íons e movimento de prótons (GOLDENBERG, 1982).

A transferência de elétrons transmembrana plasmática, é mediada por uma desidrogenase de natureza glicoproteica (WANG & ALAUPOVIC, 1978), o que poderia favorecer a configuração transmembrana, da enzima. Tem sido sugerido que, pela face interna a enzima poderia reduzir o cit c e cit b5 e pelo lado externo, poderia reduzir o ferricianeto.

Drogas com atividade antitumoral, inibem a atividade redox da membrana plasmática de células HeLa (SUN & CRANE, 1982; 1985). A inibição do crescimento celular, poderia ser uma resposta à inibição do transporte de elétrons e da liberação de prótons transmembrana plasmática (SUN & CRANE, 1985).

Assim, células HeLa, por apresentarem características metabólicas similares à de células cancerosas, constituem um modelo experimental adequado para estudos com drogas, quando se pretende a compreensão dos seus efeitos citotóxicos. Também é de grande utilidade os sistemas de perfusão em órgão, como tem sido enfatizado por BRACHT et al (1984).

Muitas das drogas usadas em quimioterapia, atuam sobre alvos intracelulares (HUENNEKENS et al, 1979); assim, o meto-

trexato (ametofterina, ácido 4-amino-N¹⁰-metilpteroilglutâmico), droga utilizada ao longo deste trabalho, tem como alvo intracelular, a dihidrofolato redutase.

O metotrexato, medicamento introduzido na clínica em 1948 (FARBER et al, 1948), usado na quimioterapia do cancer (CHINAN et al, 1979; JOLIVET et al, 1983), e em outras patologias (WEINSTEIN, 1977; WILLKENS & WATSON, 1982), tem sido tema de numerosas publicações científicas, onde são abordados mecanismo de ação, efeitos colaterais, dosagens e farmacocinética, além dos principais tipos de neoplasia, onde o medicamento se mostra mais eficaz.

I.2. ESTRUTURA E PROPRIEDADES QUÍMICAS DO METOTREXATO

Sendo um composto análogo ao ácido fólico, o metotrexato apresenta em sua estrutura, os elementos que caracterizam os folatos, isto é, o anel pteridina ligado ao ácido para-aminobenzóico, que por sua vez está ligado ao ácido glutâmico. O metotrexato, difere do ácido fólico, por apresentar um grupo amino como substituinte do carbono C₄, ao invés da hidroxila, e pela presença de um grupo metil no nitrogênio N¹⁰ do ácido pteróico. (Figura A). A droga possui uma limitada solubilidade em lipídeos e, apresentando-se como um ácido orgânico fraco, está negativamente carregada a pH neutro.

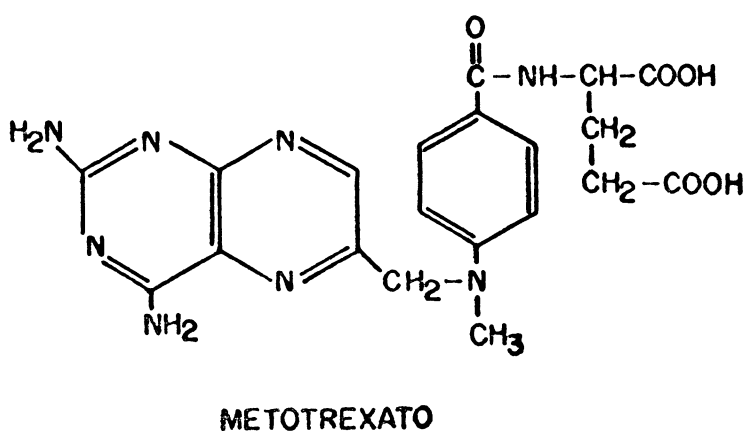
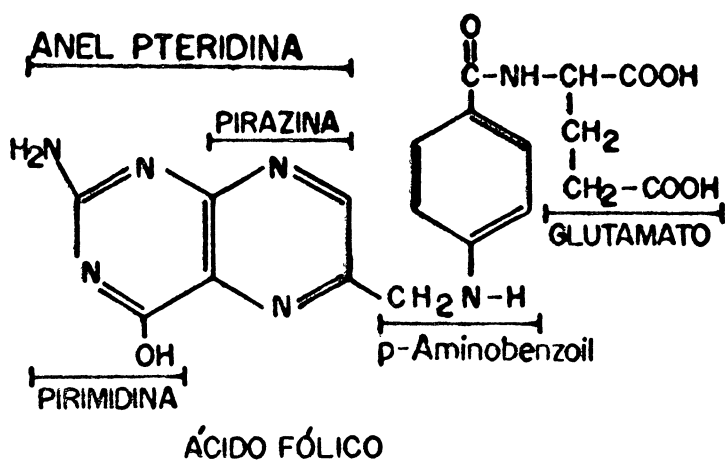


Figura A

1.3. FARMACOCINÉTICA E TOXICIDADE

O uso do metotrexato em altas doses, que permitam níveis plasmáticos de 10^{-5} a 10^{-3} M por períodos de 12 a 36 horas (JOLIVET et al, 1983), é uma prática que tem sido adotada a fim de superar ou retardar o desenvolvimento de resistência das células tumorais à droga.

A distribuição, concentração e o tempo de infusão do metotrexato, tem importantes implicações não só para o seu uso

clínico, como também para sua toxicidade (DJERASSI, 1975; JOLIVET et al, 1983).

Uma visão geral da distribuição da droga, é mostrada na Figura B.

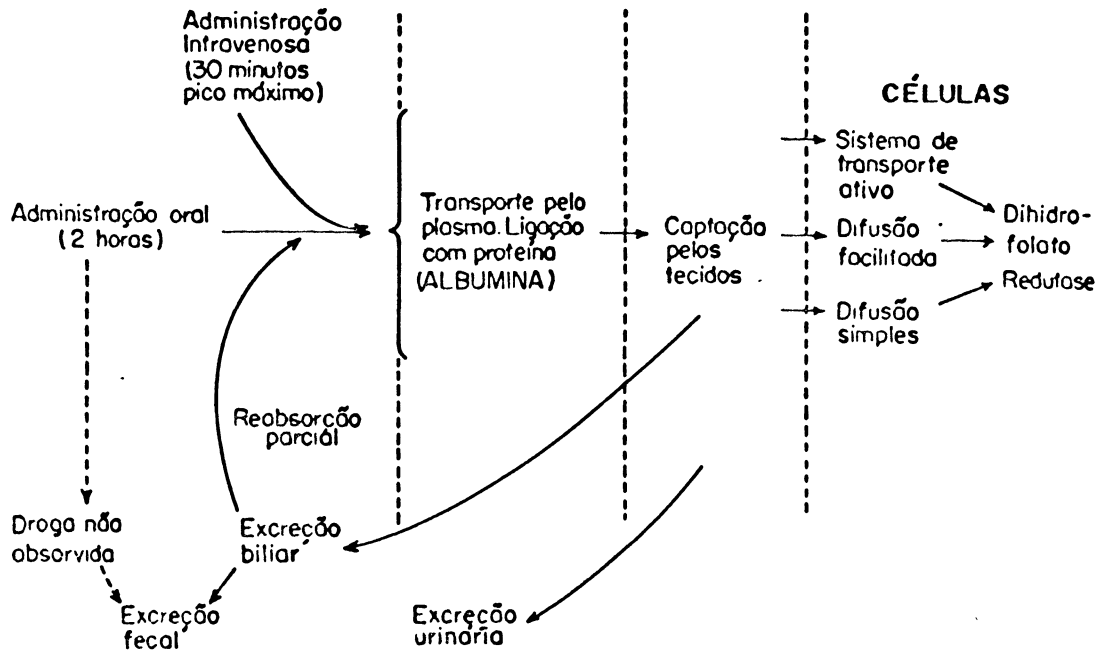


Figura B

Estudos de farmacocinética, mostram que após administração oral do metotrexato, a velocidade de absorção varia de uma a cinco horas e que a quantidade total da droga absorvida, permanece em níveis constantes durante seis horas (PINKERTON et al, 1982; 1983; BALIS et al, 1983).

Administrada por via intravenosa, a droga atinge rapidamente o fluido extracelular (volume teórico de 18% do peso corporal) porém, sua distribuição no fluido cerebrospinal e nas efusões pleurais é limitada pela baixa solubilidade em lipídeos (BLEYER, 1983).

Apesar do metotrexato não se ligar fortemente às proteínas plasmáticas (BLEYER, 1983), tem sido demonstrado que este medicamento pode ligar-se à albumina sérica (TAKAHASHI et al,

1980). Assim, GEWIRTZ & HOLT (1985) sugerem que a presença de albumina em modelos experimentais *in vitro*, daria uma melhor aproximação para a situação *in vivo*. Por outro lado, tem sido demonstrado que o metotrexato pode se acumular nos rins, baço, pele, intestino delgado (CONDIT et al, 1962; DARZYNKIEWICZ et al, 1966; HENDERSON et al, 1965 a,b) e principalmente no fígado (ZAHARKO et al, 1969).

No organismo, o metotrexato é metabolizado principalmente a 7-hidroxi metotrexato e a ácido 2-4 diamino N¹⁰ metilpteróico (BREITHAUPT et al, 1982), além de ser convertido a derivados poliglutamatos. (McGUIRE et al, 1980; McGUIRE & BERTINO, 1981).

A eliminação da droga do organismo, depende da filtração glomerular (LUI et al, 1985) e quando o metotrexato é administrado em altas doses (10^{-4} M ou superior no plasma) ocorre também secreção ativa pelas células tubulares renais (MONJANEL et al, 1979). A maior parte do metotrexato, é excretado inalterado, na urina. O fígado, também participa na remoção da droga plasmática (STEINBERG et al, 1982) e, quase toda a droga é excretada inalterada pela bile, ficando disponível para reabsorção pela mucosa intestinal, que representa uma via de reentrada para o plasma (STRUM & LIEM, 1977; BLEYER, 1983). A excreção fecal elimina menos de 2% da droga (HENDERSON et al, 1965 (b); HUFFMAN et al, 1973; WANG et al, 1974).

As toxicidades primárias deste medicamento são: mielossupressão, irritação das mucosas oral e intestinal, danos renais, hiper-transaminasemia e dermatite. (JOLIVET et al, 1983). Existe portanto, uma correlação entre a farmacocinética do metotrexato e seus efeitos colaterais, que como já foi mencionado, dependem da concentração que o medicamento atinge no plasma como

também do tempo de exposição ao medicamento. (DJERASSI, 1975).

Toxicidades agudas ao fígado e sistema nervoso central, bem como toxicidades renais, são observadas em indivíduos que ficaram expostos por alguns minutos a concentrações plasmáticas de 10^{-3} M; concentrações de 10^{-5} M, por algumas horas, promovem toxicidade à mucosa oral. Toxicidades à medula óssea, mucosa gastrointestinal e pele, estão relacionadas a um tempo de exposição de 48 horas, à concentração de 10^{-7} M e, concentrações situadas entre 10^{-8} e 10^{-9} M, por alguns dias, estão relacionadas com toxicidades crônicas, pulmonares e hepáticas (BLEYER, 1983).

I.4. TRANSPORTE DO METOTREXATO ATRAVÉS DA MEMBRANA CELULAR

O transporte do metotrexato através da membrana celular, é fundamental para que ele exerça seus efeitos citotóxicos (GOLDMAN, 1971; HUENNEKENS et al, 1979). Células com permeabilidade alterada à droga, são também resistentes aos seus efeitos (HILL et al, 1979; SIROTNAK et al, 1981), embora tal tipo de resistência ainda não esteja claramente documentado, em pacientes cujo tratamento não responde ao metotrexato (JOLIVET et al, 1983).

Várias evidências experimentais demonstram que as vias de entrada do metotrexato em células normais e tumorais diferem muito (GALIVAN, 1981; GALIVAN et al, 1981). Tem sido enfatizado por SIROTNAK (1985) que as células normais possuem uma multiplicidade de vias de entrada da droga, com propriedades cinéticas variáveis e, nem sempre usando os carreadores de folatos. Como por exemplo, resultados obtido em perfusão de fígado (STRUM

et al, 1978 a, b) e com hepatócitos normais, recém-isolados (GEWIRTZ et al, 1980) demonstram que o transporte do colato está relacionado ao do metotrexato. Em contraste, nas células tumorais a droga é transportada via sistema de transporte para folatos reduzidos, particularmente de 5-metil-tetrahidrofolato (NAHAS et al, 1972; HUENNEKENS et al, 1979; GALIVAN, 1981; SIROTNAK, 1985), que é a principal forma vitamínica presente no plasma. Tem sido demonstrado também que, nestas células existe um sistema de transporte distinto, para o ácido fólico (RADER et al, 1974; HORNBEAK & NAIR, 1978).

Assim, nas células tumorais, o metotrexato é transportado através da membrana celular por um carreador ou difusão facilitada (BENDER, 1975), no qual o acoplamento de energia é indireto (ou não é obrigatório). Se desacoplado, o carreador continua a operar pelo processo de difusão facilitada (SIROTNAK, 1985), isto é, a droga atravessa a membrana associada ao translocador, dissociando-se deste ao entrar para o meio intracelular. Nesta situação, a velocidade de entrada, depende da concentração extracelular da droga. Acredita-se que o sistema de influxo, que exhibe alta afinidade pelos derivados substituídos na posição 5, tanto do folato reduzido, como de análogos do folato, seja unidirecional (DEMBO & SIROTNAK, 1976; DEMBO et al, 1984). O efluxo dos análogos do folato, se deve à participação de uma bomba de efluxo, dependente de energia metabólica, provavelmente na forma de ATP (SIROTNAK, 1985).

Existe porém, um segundo mecanismo de entrada da droga, que opera quando esta se encontra em altas concentrações (acima de $20\mu\text{M}$) (WARREN et al, 1978; HILL et al, 1979). Esta ou-

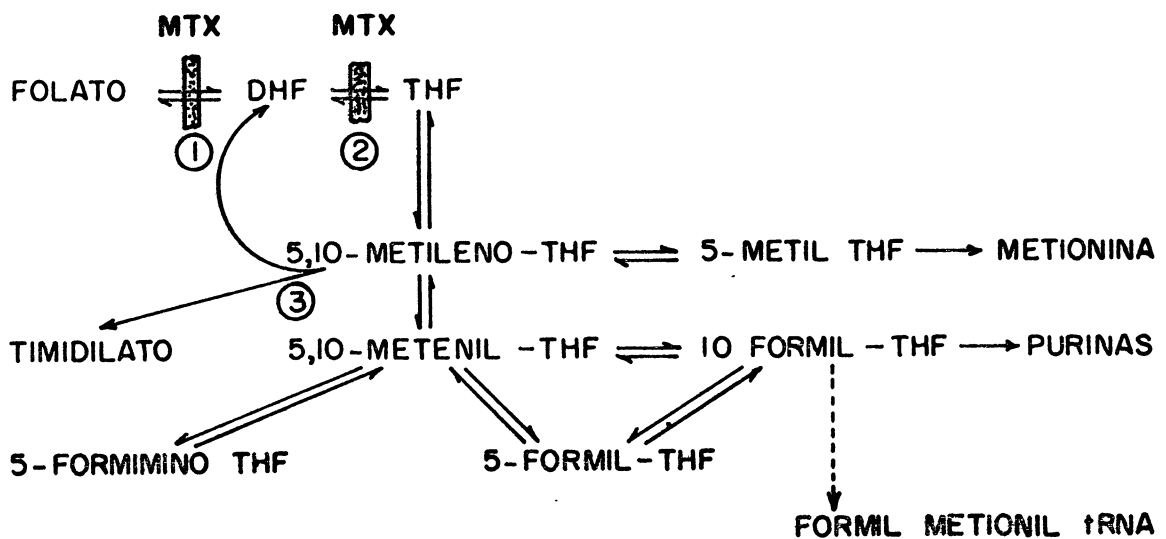
tra via, pouco compreendida, parece funcionar ou por difusão, ou por um transporte de baixa afinidade e, neste caso, a entrada da droga seria dependente não só da concentração extracelular, como também da permeabilidade da membrana. Considera-se que este processo de difusão, é a principal via de entrada da droga na célula, quando se usa o metotrexato em altas doses (JOLIVET et al, 1983).

I.5. FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA DO METOTREXATO

Uma visão geral da participação do ácido fólico no metabolismo celular, é importante, para a compreensão do mecanismo de ação do metotrexato, a nível molecular.

Para que o ácido fólico se torne bioquimicamente ativo, deve ser reduzido a ácido dihidrofólico e posteriormente a ácido tetrahidrofólico, sendo essas reações catalisadas pela dihidrofolato redutase. O ácido tetrahidrofólico por sua vez, será convertido a uma série de derivados, que atuarão como coenzimas em reações biossintéticas de transferência de um carbono, envolvendo a síntese de ácidos nucleicos e aminoácidos, as quais são essenciais para a vida e crescimento da célula (ROWE, 1978; SMITH et al, 1985). Dessas reações, deve-se destacar aquela catalisada pela timidilato sintetase, que usa o metileno tetrahidrofolato como transportador de carbono, bem como doador direto de hidrogênio, formando-se entre os produtos timidilato e dihidrofolato (SMITH et al, 1985). Quando o metotrexato está presente na célula em concentrações suficientes para inibir completamente a dihidrofolato redutase, não ocorre síntese de tetrahidrofolato, tendo como consequência o bloqueio da biossíntese de timidilato

(CHELLO et al, 1977; GOLDMAN, 1975; SIROTNAK & DONSBACH, 1974). Portanto, a inibição da dihidrofolato redutase pelo metotrexato, promove uma diminuição do "pool" de folatos reduzidos, afetando indiretamente a síntese de pirimidinas e purinas (CADMAN, 1983).



Esquema 1.5

A dihidrofolato redutase, isolada de diferentes tipos de células, liga-se ao metotrexato quase que estequiometricamente (WERKHEISER, 1961; 1963), sendo inibida com concentrações muito baixas da droga (10^{-9} M) (HUENNEKENS et al, 1976). Embora reversível, esta ligação é forte, principalmente na presença de NADPH (PERKINS & BERTINO, 1966; OTTING & HUENNEKENS, 1972; STONE & MORRISON, 1986) e em pH levemente ácido (BERTINO et al, 1964).

As concentrações intracelulares da dihidrofolato redutase, são em geral bastante baixas (GREADY, 1980) e, o aumento

dos níveis desta enzima, está relacionado com a resistência da célula ao metotrexato (BERTINO, 1979; JOLIVET et al, 1983). Atualmente, existem evidências de que a dihidrofolato redutase ocorre em formas que variam em afinidade pelo medicamento (CHINAN et al, 1979). Estudos realizados por KAMEN et al (1983), com dihidrofolato redutase purificada, mostraram que a enzima pode usar o NADH como agente redutor. Nesta situação, a afinidade da enzima pelo medicamento, parece diminuir, não se estabelecendo entretanto se tal observação é relevante *in vivo*, no desenvolvimento de uma resistência à droga.

Embora a dihidrofolato redutase seja inibida por concentrações muito baixas de metotrexato, vários estudos mostram que os níveis intracelulares da droga devem ser consideravelmente mais altos para suprimir a síntese do DNA (GOLDMAN, 1975), pois, na presença de síntese ativa de timidilato, ocorre um acúmulo de dihidrofolato, o qual em altas concentrações compete com o metotrexato para ligação na dihidrofolato redutase, o que poderia diminuir a eficácia do medicamento (COHEN et al, 1978; WHITE et al, 1975; WHITE, 1979) (Vide esquema 1.5). Assim, os efeitos citotóxicos do metotrexato, parecem estar relacionados à sua persistência na célula ou tecido (GOLDMAN, 1977; SIROTNAK, 1980), situação que pode ser alcançada com o uso da droga em altas doses, quando se atinge níveis plasmáticos de 0.1 a 1.0mM (CHABNER & SLAVIK, 1975).

I.6. FATORES QUE CONTROLAM A CONCENTRAÇÃO DO METOTREXATO NAS CÉLULAS

A capacidade das células acumularem quantidades su-

ficientes de metotrexato é dependente não só do transporte através da membrana celular, como também da metabolização posterior da droga a poliglutamatos (BAUGH et al, 1973; JACOBS et al, 1975; POSER et al, 1980; 1981; FRY et al, 1982; NIMEC & GALIVAN, 1983; GALIVAN, 1984).

A formação de poliglutamatos, ocorre também com folatos naturais; os múltiplos grupos do glutamato estão ligados através de ligações γ peptídicas (McGUIRE et al, 1980; McGUIRE & BERTINO, 1981) e nessa forma, parecem ser seletivamente retidos na célula em relação ao composto monoglutamato.

Como a toxicidade da droga depende da sua persistência na célula ou tecido e, considerando-se que os derivados poliglutamilados do metotrexato apresentam a mesma eficiência em inibir a dihidrofolato redutase (JACOBS et al, 1975; CLENDENIN et al, 1983), a retenção da droga nesta forma, poderia aumentar o seu potencial citotóxico (BALINSKA et al, 1981; FRY et al, 1982).

Entretanto, a conversão do metotrexato em derivados poliglutamilados, pode não ser um fenômeno muito simples, já que é catalisada pela mesma enzima que transforma os folatos naturais em poliglutamatos (McGUIRE & BERTINO, 1981). Isto poderia estar sujeito a mecanismos de regulação ainda desconhecidos. Evidências experimentais recentes, demonstram que a formação de poliglutamatos de folatos e seus análogos, em células de hepatoma H-35, pode ser influenciada por hormônios (GALIVAN, 1984) e, por outro lado, a liberação do metotrexato de hepatócitos normais, pode ser induzida por agentes α adrenérgicos (GEWIRTZ et al, 1985).

I.7. EFEITO DO METOTREXATO SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO CELULAR

Em contraposição aos estudos detalhados existentes em relação à farmacocinética e transporte do metotrexato, bem como quanto ao seu efeito sobre a dihidrofolato redutase, muito pouco é disponível na literatura, sobre a sua ação no metabolismo celular como um todo. Conforme foi enfatizado por GOLDMAN (1975), os esquemas de tratamento em altas doses, são capazes de afetar a massa tumoral, causando-lhe efeitos citotóxicos por inibição de outros processos metabólicos, além daqueles envolvidos com a dihidrofolato redutase.

Várias evidências experimentais, sugerem que o metotrexato pode atuar sobre o metabolismo energético. WOODS et al (1959), mostraram que o metotrexato e outros quimioterápicos, poderiam atuar como inibidores da glicólise de células tumorais. Foi demonstrado que a glicólise de células Ehrlich, crescidas na presença da droga é marcadamente reduzida (KAMINSKAS & NUSSEY, 1978), sendo afetada não só a captação da hexose, como também a sua fosforilação (KAMINSKAS, 1979). Nestas células foi também demonstrado que o metotrexato determina uma redução do número de sítios de ligação à citocalasina B (CHANG et al, 1983), sugerindo que as alterações na captação da glucose promovida pela droga, podem ser o resultado da diminuição da concentração dos translocadores da hexose, na membrana plasmática. Portanto, nestas condições a glicólise não foi o alvo direto da droga.

Células L1210 (KOUAMOUO et al, 1981), cultivadas com metotrexato em concentrações suficientes para inibir o crescimento sem interferir na viabilidade celular, apresentam uma al

teração no consumo de oxigênio, após três horas de cultivo. Após vinte e quatro horas de cultivo, os autores observaram uma relação entre a inibição do consumo de oxigênio e a diminuição do crescimento. As mitocôndrias isoladas dessas células, apresentaram inibição da respiração no estado III, quando o glutamato e o malato foram substratos oxidáveis, efeito este não observado quando o succinato era o substrato.

YAMAMOTO (1985), em estudo aprofundado sobre a ação do metotrexato em mitocôndrias de fígado de rato, demonstrou que os efeitos da droga sobre a função mitocondrial eram a nível da atividade de desidrogenases NAD^+ dependentes (glutamato, α -cetoglutarato, isocitrato e malato desidrogenases) sem afetar as FAD dependentes (succinato e glicerolfosfato desidrogenase), bem como a nível da condutividade iônica pela membrana mitocondrial interna. Anteriormente, VOGEL et al (1963) haviam demonstrado que o metotrexato inibe a lactato desidrogenase e glucose-6-fosfato desidrogenase, bem como a glutamato e malato desidrogenases, todas obtidas de fontes comerciais.

Levando em conta que o metotrexato atuará não só sobre as células tumorais, mas também sobre as células normais do hospedeiro (CADMAN, 1983) estas observações podem vir a ser relevantes na determinação dos efeitos citotóxicos desta droga. Por outro lado, as diferenças metabólicas existentes entre células normais e tumorais, não são apenas de caráter quantitativo, como também de caráter qualitativo, quando se considera as isozimas presentes (WEBER, 1977 a,b), existindo portanto, a possibilidade de o metotrexato afetar o metabolismo energético de células normais e neoplásicas, com consequências diferentes.

I.8. OBJETIVO

Considerando as evidências de que o metotrexato pode exercer efeitos sobre vias metabólicas não relacionadas com as reações catalisadas pela dihidrofolato redutase, este trabalho se propõe a estudar alguns dos efeitos bioquímicos colaterais e imediatos em células HeLa, usadas como modelo de células malignas.

Serão utilizadas altas doses da droga, pelo fato de esta, ser uma tendência clínica atual.

Será dada ênfase ao efeito do metotrexato sobre a glicólise de células HeLa, já que este aspecto, ainda não foi explorado. É portanto de interesse, saber se a droga pode afetar esta via metabólica, em um efeito direto.

Por outro lado, levando em conta que o fígado é um dos órgãos mais atingidos por efeitos tóxicos colaterais e considerando os efeitos promovidos por esta droga em mitocôndrias isoladas, este trabalho visa detectar possíveis alterações no metabolismo de carboidratos, no órgão intacto, usando-se o sistema de perfusão de fígado isolado.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

II.1. MATERIAIS

II.1.1. REAGENTES

Bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, fosfato de sódio, etanol absoluto, o-toluidina, glucose, tioglicolato de sódio e caldo casoy, foram obtidos da Merk.

Meio essencial mínimo de Eagle, foi fornecido por Flow Laboratórios.

Soro fetal bovino estéril, livre de vírus e micoplasma, foi fornecido por Laborclin.

Tripsina (1:250) e Sabouraud dextrose, foram de procedência Difco.

Foram obtidos da Sigma Chemical Co., piruvato quinase, tipo I (75U/mg de proteína); lactato desidrogenase, tipo I, (90U/mg de proteína); aldolase, tipo X (13,4U/mg de proteína) hexoquinase, tipo III (16U/mg de proteína); α -glicérfosfato desidrogenase-triose fosfato isomerase, tipo III (130U/mg de proteína -1080U/mg de proteína, respectivamente); trizma base; Hepes; NAD^+ ; NADH , NADP^+ ; ATP; ADP; G6P; F6P; PEP; piruvato de sódio; triton X-100; soroalbumina bovina.

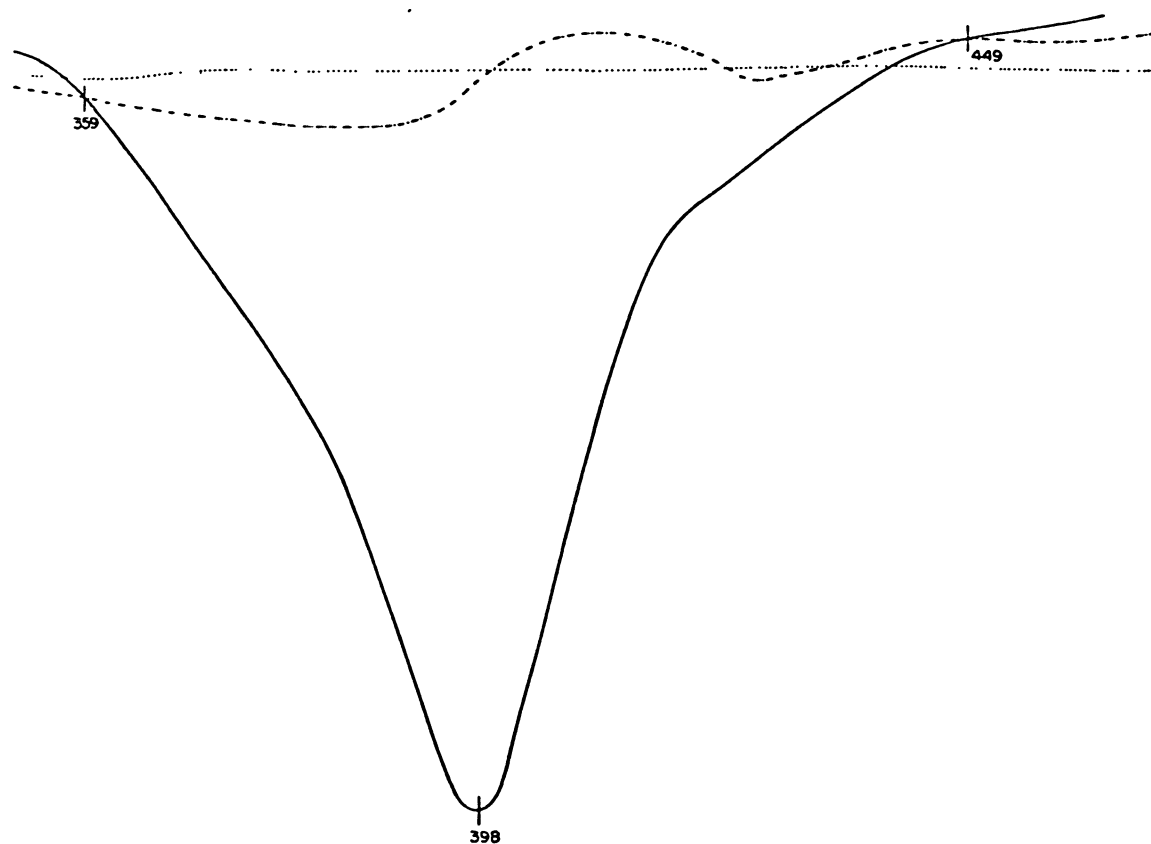
As seguintes enzimas, foram obtidas da Boehringer -Mannheim: Glucose-6-fosfato desidrogenase (1,0mg/ml) e fosfoglucoisomerase (10mg/ml).

Metotrexato, foi fornecido por Cyanamid Química do

Brasil, Divisão Lederle. A droga, apresenta-se como um pó amarelo, sendo solúvel em água.

ESPECTRO DE ABSORÇÃO DO METOTREXATO

O espectro de absorção do metotrexato, foi feito em espectrotômetro Aminco-Chance Dual Wavelengths/Split Beam, acoplado a registrador. Usou-se solução de metotrexato 0,4mM, em água destilada, Metotrexato reduzido, foi obtido pela adição de ditionito de sódio (Figura C).



----- Oxidado x oxidado
 ——— Oxidado x reduzido
Linha de base

II.1.2. PERFUSÃO DE FÍGADO ISOLADO

Os experimentos de perfusão de fígado, foram realizados no Laboratório de Metabolismo Hepático, do Departamento de Farmácia e Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá, sendo utilizado aparelho de construção própria daquela Instituição.

II.1.2.1. LÍQUIDO DE PERFUSÃO

O líquido de perfusão utilizado foi o tampão de Krebs-Hanseleit-bicarbonato, assim constituído: 115mM de NaCl; 25mM de NaHCO₃; 5,90mM de KCl; 1,20mM de Na₂SO₄; 1,18mM de MgCl₂; 1,25mM de NaH₂PO₄; 2,5mM de CaCl₂ e 20mg% de soro albumina bovina. O pH deste tampão é de 7,6, porém, após a oxigenação com mistura de carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂), atinge 7,4.

II.1.2.2. ISOLAMENTO DO FÍGADO

Foram utilizados ratos da raça Wistar, alimentados ou submetidos a jejum de vinte e quatro horas, para se analisar

a glicogenólise ou a gliconeogênese, respectivamente.

Os animais foram anestesiados com nembutal sódico. (50mg/kg) e o seu fígado isolado.

O isolamento de fígado, bem como a sua retirada do animal, requer uma cuidadosa técnica cirúrgica, que foi realizada pelo Dr. Adelar Bracht, conforme técnica descrita por Bracht et al (1984).

Uma vez que o fígado isolado esteja na câmara de perfusão, o caminho do líquido que vai perfundir o órgão é descrito a seguir: o líquido de perfusão, mantido em um reservatório, é sugado por uma bomba peristáltica, sendo impulsionado através de um oxigenador, onde é oxigenado e aquecido. A seguir, passa para a câmara de perfusão, chegando ao fígado através de uma cânula inserida na veia porta. O líquido de perfusão, deixa o fígado, através de uma cânula inserida na veia cava, banha um eletrodo de platina (integrante do aparelho de perfusão) e atinge a câmara para coleta de amostras, que é feita em geral a cada dois minutos. As análises do metabólitos são feitas no perfusado, e o consumo de oxigênio é monitorado, durante todo o tempo em que transcorre o experimento.

A velocidade de infusão do líquido de perfusão foi de 35ml por minuto. Quando se desejar observar a glicogenólise, não foram adicionados substratos ao líquido de perfusão, porém, quando se observou a gliconeogênese, adicionou-se 5,0mM de piruvato.

Para a observação dos efeitos do metotrexato sobre a glicogenólise, glicólise e gliconeogênese, bem como sobre a respiração do órgão, a droga foi infundida no sistema, utilizando-se uma bomba de precisão. Essa bomba, pode ser calibrada para diferentes velocidades de infusão. Quando posicionada para injetar no sistema, 280 μ l por minuto, sendo o fluxo do líquido de perfusão, 35ml por minuto, a diluição da solução contendo a droga será de 125 vezes; portanto, para se alcançar uma concentração final de 0,4mM de metotrexato, preparou-se uma solução 50mM da droga.

II.1.3. OBTENÇÃO DO HOMOGENADO DE FÍGADO DE RATO PARA DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES DE GLUCOSE-6-FOSFATASE E GLICOGÊNIO FOSFORILASE

Para a obtenção do homogenado, ratos brancos Wistar, foram decapitados, seus fígados removidos e lavados com solução de sacarose 0,25M, que serviu também como líquido de extração. Em seguida, os fígados foram picados com tesoura, em pedaços o mais pequeno possível e homogeneizados em homogeneizador Van Potter Elvehjen, primeiro com pistilo frouxo e depois com pistilo normal.

A suspensão homogeneizada foi centrifugada para retirada de debris (1500 x g por 10 min a 4°C), sendo o sobrenadante usado como fonte de enzima.

II.1.4. CULTIVO CELULAR

II.1.4.1. PROCEDIMENTOS DE ESTERILIZAÇÃO DE MATERIAIS DE VIDROS E ACESSÓRIOS

Todo material de vidro usado nas culturas, foi esterilizado a seco, a 150°C, por 6 horas. Rolhas e tampas foram esterilizadas em autoclave a 120°C e 1 atm de pressão, por trinta minutos, e depois colocados a secar em estufa a 70°C.

II.1.4.2. SOLUÇÕES

Todas as soluções envolvidas no cultivo celular, foram preparadas com água bidestilada.

II.1.4.2.1. SOLUÇÃO DE BICARBONATO DE SÓDIO

A solução de bicarbonato de sódio, foi preparada à concentração de 7,5% (p/v) e distribuída em volume de dez mililitros, em tubos. Após esterilização feita em autoclave a 120°C e 1 atm de pressão, por trinta minutos, esta solução foi mantida à temperatura ambiente.

II.1.4.2.2. SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA

A solução salina tamponada a pH 7,4, foi preparada rotineiramente na forma de estoque cinco vezes concentrado, sendo nestas condições constituída de: 40,5mM de Na₂HPO₄ anidro; 680mM de NaCl; 7,3mM de KH₂PO₄ e 0,1g/l de vermelho de fenol.

Esta solução foi esterilizada em autoclave a 120°C, 1 atm de pressão e mantida a 4°C. A diluição, foi feita na hora do uso, com água bidestilada estéril.

II.1.4.2.3. SOLUÇÃO DISPERSANTE DE CÉLULAS

Esta solução, cuja finalidade é descolar as células do frasco de cultura, consiste de tripsina a 0,5%, em solução salina tamponada, pH 7,4. Quando necessário uma tripsinização mais branda, reduziu-se a concentração de tripsina para 0,25% ou 0,1%. A solução de tripsina, foi esterilizada por filtração, usando-se filtros marca Millipore e membranas de 0,22µm sendo estocada a -20°C.

II.1.4.3. MEIO DE CULTURA

O meio de cultura usado, foi o meio essencial mínimo de Eagle (Paul, 1973), disponível pronto na forma de pó. Após reconstituição em água bidestilada, o meio foi esterilizado por filtração em membranas de acetato de celulose de 142mm de diâmetro, com poros de 1,2µm (pré-filtro), 0,45 e 0,22µm, em aparelho marca Millipore.

II.1.4.4. TESTES DE ESTERILIDADE

Todas as soluções a serem usadas estéreis, foram submetidas a testes de esterilidade em meios tioglicolato Brewer, caldo caseína soja tripticase (Caldo Casoy) e Sabouraud dextrose (RIZZO et al, sd).

Os procedimentos de esterilização por filtração, bem como os testes de esterilidade, foram gentilmente realizados por Dr. Miguel Rodriguez do Setor de Virologia do Laboratório Geral da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná e pela Dra. Ema Chandelier, da Seção de Cultivo Celular - TECPAR.

II.1.4.5. CÉLULAS

Foram usadas células da linhagem HeLa, derivadas de carcinoma de cervix humano e com aparência epitelial. As células são procedentes da American Type Culture Collection e foram enviadas para este laboratório à passagem nº 104, pela Seção de Cultivo Celular do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

II.1.4.6. CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO

As células foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido, em sistema constituído de meio essencial mínimo de Eagle, pH 7,4 (80% v/v), glicerol (10% v/v) e soro fetal bovino (10% v/v), contendo aproximadamente 2×10^6 células por ml, em ampolas adequadas.

O congelamento das células foi gentilmente realizado pelo Dr. Miguel Rodriguez.

II.1.4.7. CULTIVO CELULAR

Todas as operações envolvendo o cultivo celular, foram realizadas em fluxo laminar horizontal.

Para o cultivo celular, foi usado meio essencial mínimo de Eagle, contendo glutamina e suplementado com soro fetal bovino (10% v/v) e bicarbonato de sódio, em quantidade adequada para acertar o pH em 7,4.

As células HeLa, desenvolvem-se na forma de monocamadas, sendo utilizadas garrafas de Roux ou frascos menores (frascos de diluição de leite), para o crescimento.

O repique das células, foi feito por tripsinização usando-se tripsina a 0,5% ou a 0,25%. Após a remoção do meio de cultivo, as culturas foram lavadas com solução salina tamponada, para remoção do meio residual, adicionando-se em seguida a solução de tripsina pré-quecida a 37°C. A tripsinização prolongou-se num intervalo de três a cinco minutos, após o qual removeu-se a tripsina e adicionou-se uma alíquota do meio de cultivo. O descolamento das células da superfície dos frascos foi feito com auxílio de pipeta equipada com pera. Após o descolamento, as células foram ressemeadas a uma concentração aproximada de 2×10^6 células por garrafa de Roux.

As culturas, desenvolveram-se à temperatura de 37°C e foram repicadas semanalmente. As monocamadas, foram observadas diariamente em microscópio invertido, marca Olympus, modelo CKC, Bi-1, pertencente ao TECPAR. Nessas condições, as culturas estavam confluentes com 72 a 96 horas de crescimento, sendo então padronizado o tempo de crescimento em 80 horas.

II.1.4.8. CONTAGEM

As células foram contadas em câmara de Neubauer, usando-se microscópio Wild Heerbrugg - Switzerland.

II.1.5. OBTENÇÃO DE CÉLULAS ROMPIDAS, PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

Células colhidas pelo procedimento já descrito, foram ressuspensas em meio gelado constituído de tampão fosfato de sódio 10mM, pH 7,4, contendo 5mM de KCl e 150mM de NaCl.

Para o rompimento, as células foram congeladas em nitrogênio líquido, descongeladas à temperatura ambiente e então passadas em homogeneizador de Van Potter-Elvehjem por três vezes, em banho de gelo. O homogenato assim obtido, foi usado diretamente como fonte das enzimas.

II.2. MÉTODOS

II.2.1. PERFUSÃO DE FÍGADO: ANÁLISES DO PERFUSADO

II.2.1.1. CONSUMO DE OXIGÊNIO

O consumo de oxigênio durante a perfusão do fígado, foi mediado através de polarógrafo de oxigênio, que é parte integrante do aparelho de perfusão. Este polarógrafo recebe o sinal do eletrodo de platina, que está inserido dentro da câmara do fígado e é banhado pelo perfusado. O sinal ampliado, vai para um registrador potenciométrico, que assinala as variações ocorridas na tensão de oxigênio.

A velocidade da respiração, foi expressa em μmol de O_2 consumido $\times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ de fígado, usando-se a fórmula:

O_2 consumido = $\frac{(CA - CV)F}{p}$ onde CA é a concentração arterial do

O_2 , que é constante e igual a 0,86mM, CV é a concentração venosa de oxigênio (mM), F é o fluxo através do órgão (em ml por minuto) e P, o peso do fígado (g). A calibração foi efetuada, sabendo-se que a concentração de O_2 em água a 37°C, é igual a 0,19mM, quando em ar atmosférico. O ponto nulo, foi determinado adicionando-se ditonito de sódio ao líquido de perfusão, o que o torna anaeróbico.

II.2.1.2. PRODUÇÃO DE LACTATO E PIRUVATO

A dosagem de L-lactato e piruvato, foi feita enzimaticamente em volume final de 1,0ml (GUTMAN & WAHLEFELD, 1974; CZOC & LAMPRECHT, 1974). O sistema para dosagem de lactato continha: tampão glicina 0,1M-hidrazina, 0,4M, pH 9.5, NAD^+ 1,5mM e 3U de lactato desidrogenase. A quantidade de NADH formado, foi determinada a 340nm, após 90 minutos de incubação.

O piruvato foi dosado em meio contendo: tampão tris-HCl 0,1M, pH 7,4; NADH 0.15mM e 0.1U de lactato desidrogenase.

A produção do metabólitos foi expressa em $\mu\text{moles} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ de fígado, sendo calculada pela seguinte fórmula:

$$FP \text{ e } FL = \frac{F.A.D.}{6,22 \times 10^3 \times P} \text{ onde FP e FL são respectivamente a produção de piruvato e lactato, F é o fluxo do líquido de perfusão através do órgão, A, a variação da absorbância, D, a diluição da amostra e P, o peso do fígado.}$$

Com a finalidade de se verificar a influência do metotrexato no método de dosagem destes metabólitos, padronizou-se as condições experimentais em presença de metotrexato, em concentrações similares às aquelas presentes no sistema de reação. O grá-

fico a seguir mostra que a dosagem de lactato, nas condições experimentais não é afetada pela presença da droga.



Curva de calibração para dosagem de L-lactato, na presença e ausência de metrotrexato.

- (○) L-lactato dosado na ausência da droga
 (●) L-lactato dosado na presença da droga

II.2.1.3. PRODUÇÃO DE GLUCOSE

As dosagens de glucose, foram feitas pelo método da o-toluidina, como descrito por DUBOWSKI (1962).

II.2.2. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular, foi determinada usando-se o corante vital azul de trypan (PHILLIPS, 1973), técnica que se baseia no fato de que células não viáveis se coram enquanto que células viáveis não. Por meio desta técnica, tem sido demonstrado que as células que se coram, não respiram, não glicolizam e nem desempenham qualquer outro processo metabólico.

A solução de azul de trypan foi preparada a 0,4%(p/v) em solução salina constituída de 5mM de KH_2PO_4 ; 140mM de NaCl e 25mg% de ácido benzóico como preservativo. O pH foi ajustado a 7,4. Para cada ml de suspensão celular, usou-se 0,1ml da solução do corante. A porcentagem de células viáveis foi calculada usando-se a relação:

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

sendo que as preparações apresentaram 90% de viabilidade por este método.

II.2.2.1. EFEITO DO METOTREXATO SOBRE A VIABILIDADE CELULAR

Para a determinação do efeito do metotrexato sobre a viabilidade celular, as células foram ressuspensas em tampão trizma 25mM, pH 7,4, contendo: 0,7mM de NaH_2PO_4 , 5mM de KCl, 140mM de NaCl e 2% de soro fetal. À proporção de 10^7 células por mililitro, as células foram incubadas na presença do metotrexato, em concentrações que variaram de 0 a 1,0mM, ficando expostas a ação da droga durante uma hora, em temperatura de 37°C e com agitação de 120 rotações por minuto. Após, o sistema foi diluído dez vezes com o tampão já descrito, gelado. As células foram colocadas em banho de gelo e foram avaliadas imediatamente quanto à viabilidade, com azul de trypan, em microscópio Carl Zeiss-Jena, equipado com contraste de fase.

II.2.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE FERRICIANETO REDUTASE E DA EJEÇÃO DE PRÓTONS TRANSMEMBRANA PLASMÁTICA

II.2.3.1. REDUÇÃO DO FERRICIANETO

Células HeLa, após colhidas e convenientemente lavadas, foram ressuspensas em tampão constituído de: 25mM de trizma base, 0,7mM de NaH_2PO_4 , 5mM de KCl, 140mM de NaCl, sendo o pH ajustado a 7,4 (TD).

A redução do ferricianeto por células intactas, foi registrada em 500-420nm à temperatura constante de 37°C, em espectrofotômetro Aminco-Chance Dual Wavelengths/Split Beam Recorder.

O sistema de incubação em um volume final de 3,0 ml, continha: 0,3mM de ferricianeto de potássio, células em quantidade adequada para cada experimento e o tampão TD, já descrito, pré-aquecido a 37°C. A atividade enzimática foi calculada, usando-se o coeficiente de extinção molar para o ferricianeto de $1040\text{cm}^{-1} \times \text{M}^{-1}$ (CREUTZ & SUTIN, 1973).

O efeito do metotrexato sobre este sistema, foi verificado pela adição da droga, após registro da atividade inicial.

II.2.3.2. EJEÇÃO DE PRÓTONS

A liberação de prótons, induzida pela adição do ferricianeto às células, foi determinada em potenciômetro E 520, Metrohm Herisau, acoplado a um registrador Recti-Riter, Texas Instruments Incorporated e associado a um expensor de escala, de tal

modo que, a escala inteira, corresponde a 0.2 unidades de pH. As células, colhidas após breve tratamento com tripsina, já descrito, foram suspensas em solução salina tamponada. As experiências foram desenvolvidas em volume final de 5,0ml, à temperatura de 33°C, e com agitação constante.

O meio de reação usado foi solução de sacarose 0,1M, contendo 10mM de KCl, 25mM de NaCl, 10mM de CaCl₂, e 1,0mM de fosfato de sódio. O pH desta solução foi ajustado a 7,4 com hidróxido de sódio, 1,5mM, no momento de usar. Quando o ensaio foi feito em presença de metotrexato, o ajuste de pH foi feito após a adição da droga. Uma vez acertado o pH, adicionou-se as células (8×10^5 células por ensaio), sendo a reação iniciada pela adição de 2,0mM de ferricianeto de potássio. O efeito do metotrexato sobre esse sistema, foi verificado após quatro minutos de pré-incubação das células, com a droga. Os resultados foram expressos em nanomoles de prótons liberados por minuto, nas condições experimentais.

II.2.4. AVALIAÇÃO DA RESPIRAÇÃO CELULAR E DO EFEITO CRABTREE

A respiração celular foi determinada a 30°C, em eletródio de oxigênio (Modelo Rank Brothers-Cambridge, England) acoplado a um registrador (Recti-Riter da Texas Instrumental Incorporated). As células foram suspensas em meio de Tyrode, assim constituído: 130mM de NaCl, 5mM de KCl, 1mM CaCl₂ · 2 H₂O; 0,5mM de MgSO₄ · 7 H₂O; 12 mM de NaH₂PO₄ · H₂O; 24mM de NaHCO₃, pH 7,4. Soro albumina bovina, foi adicionada a 25mg%.

As experiências foram desenvolvidas em volume de

2,0ml usando-se como meio de reação, a própria solução de Tyrode. Após o registro da respiração celular com substratos endógenos, o efeito Crabtree foi verificado pela adição de 1,0mM de glucose ao sistema de reação.

A porcentagem do efeito Crabtree, foi calculada usando-se a fórmula:

$$\% \text{ EC} = \frac{\text{Consumo } O_2 \text{ (endógeno)} - \text{Consumo } O_2 \text{ (glucose)}}{\text{Consumo } O_2 \text{ (endógeno)}} \times 100$$

(WENNER, 1979).

A ação do metotrexato foi verificada, adicionando-se a droga diretamente ao sistema.

Os experimentos foram feitos a 30°C. A velocidade da respiração celular foi calculada, considerando-se que a solubilidade do oxigênio a 30°C e 1 atm é de 241,6µM (ESTABROOK, 1967).

II.2.5. EFEITO DO METOTREXATO SOBRE A GLICÓLISE DE CÉLULAS HELA

II.2.5.1. CONSUMO DE GLUCOSE, PRODUÇÃO DE LACTATO E PIRUVATO, POR CÉLULAS INTACTAS

Células suspensas em solução de Tyrode, foram incubadas a 36°C, com agitação de 120 rotações por minuto (banho-maria Doudnoff). Ao tempo zero, adicionou-se glucose, enquanto que a droga, foi adicionada geralmente aos quinze minutos de incubação e à concentração de 0,4mM. Do sistema, foram retiradas alíquotas, a intervalos de tempo regulares e, as células foram separadas rapidamente por centrifugação a 5:000 x g, por três minutos

a 0-4°C, em centrífuga Beckman, Modelo J21B.

A produção de L-lactato e de piruvato, foi determinada no sobrenadante, usando-se a metodologia descrita em Materiais e Métodos, ítem 11.2.1.2. A concentração dos metabólitos, foi expressa em μ moles de lactato ou piruvato produzidos por ml da suspensão.

O consumo de glucose, foi determinado usando-se a metodologia descrita em Materiais e Métodos ítem 11.2.1.3.

Paralelamente, amostras da mesma suspensão de células, foram analisadas quanto ao consumo de oxigênio, pelo método de Warburg.

II.2.5.2. DOSAGEM DE METABÓLITOS INTERMEDIÁRIOS

Suspensão de células em salina tamponada a pH 7,4, foi dividida em duas porções, que foram pré-incubadas aerobicamente por dez minutos a 35°C, com agitação constante, na ausência (C) ou presença (D) de 0,4mM do metotrexato. Em seguida, adicionou-se 1,0mM de glucose às células retirando-se uma alíquota de cada amostra, que foi imediatamente inativada. As porções restantes, permaneceram incubadas por dez minutos, sendo após esse tempo, também desproteinizadas. Paralelamente, usando amostras da mesma suspensão, determinou-se a respiração das células, em eletródio de oxigênio.

A atividade metabólica das células, foi interrompida pela adição de ácido perclórico gelado, em concentração final de 0,5M. As amostras, foram neutralizadas com solução de hidróxido de potássio, na presença de solução de HEPES 0,2M e então cen-

trifugadas a 25.000 x g por quinze minutos.

Os metabólitos, foram determinados no sobrenadante por métodos enzimáticos, acompanhando-se a oxidação do NADH e do NADPH, ou a redução do NAD^+ e do NADP^+ , a 340nm. Em todos os casos, o branco era constituído da mistura de reativos, sobrenadante neutralizado, excluindo-se as enzimas envolvidas na dosagem. A leitura das absorbâncias, foi feita após um tempo pré-determinado de incubação com a(s) enzima(s), o que garantia o consumo total do metabólito.

Usou-se para tal, um espectrofotômetro Beckman, modelo DB, acoplado a registrador (Linear and Log Potentiometric Recorder) e a um expensor, ambos da Beckman e cubetas de 1cm de caminho ótico.

II.2.5.2.1. DETERMINAÇÃO DA GLUCOSE-6-FOSFATO, FRUTOSE-6-FOSFATO E ATP

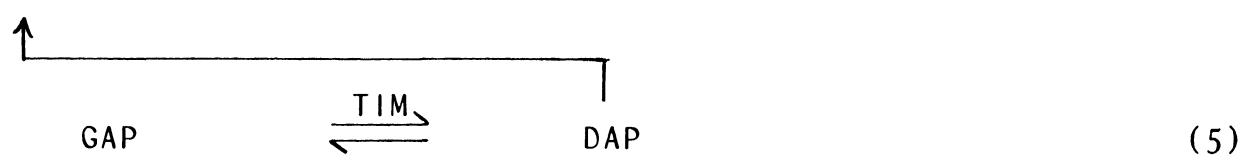


O sistema de incubação para dosagem de glucose-6-fosfato (reação 1) (LANG & MICHAL, 1974), em volume final de 1,0ml, era constituído de: tampão trietanolamina, 200mM, pH 7,6; 20mM de NADP^+ ; 5mM de MgCl_2 ; amostra de 3 $\mu\text{g/ml}$ de G6PDH.

A frutose-6-fosfato, foi determinada na sequência (reação (2)), adicionando-se 10 $\mu\text{g/ml}$ de FGI.

O ATP, foi determinado na mesma cubeta, pela adição de glucose (50mM) e hexoquinase 1,3U/ml (LAMPRECHT & TRAUTSCHOLD, 1974).

II.2.5.2.2. DETERMINAÇÃO DE DIHIDROXIACETONA FOSFATO, GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO E FRUTOSE-1,6 BISFOSFATO



A dosagem de dihidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-3-fosfato (MICHAL & BEUTLER, 1974), foi feita no seguinte sistema: tampão trietanolamina, 200mM, pH 7,6; NADH, 0,1mM; amostra; 2,6U de glicerol fosfato desidrogenase, 20U de triose fosfato isomerase (reações (4), (5)). Frutose-1,6-bisfosfato, foi determinada na mesma cubeta, adicionando-se 1,0U de aldolase (reação (6)).

II.2.5.2.3. DETERMINAÇÃO DE PIRUVATO E FOSFOENOLPIRUVATO

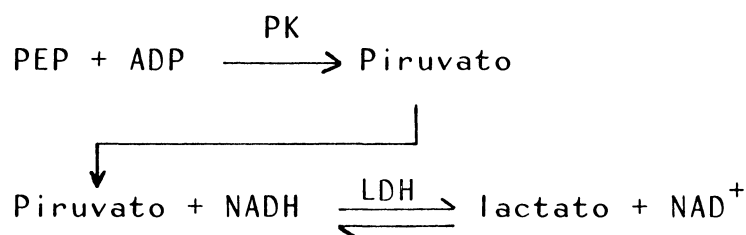


A dosagem de piruvato e de fosfoenolpiruvato, foi feita na mesma cubeta. O sistema de reação, para dosagem de piruva-

to, era assim constituído: tampão tris-HCl 100mM, pH 7,4; 0,15mM NADH, amostra e 0,1U de lactato desidrogenase. A reação embora rápida, foi desenvolvida em vinte minutos, a fim de se superar a inibição da lactato desidrogenase, em presença de metotrexato.

Na sequência, determinou-se o PEP com a adição de 3,0mM de ADP, 10mM de $MgSO_4$, 40mM de KCl e 0,17U de piruvato quinase (CZOK & LAMPRECHT, 1974).

II.2.5.2.4. DETERMINAÇÃO DE ADP



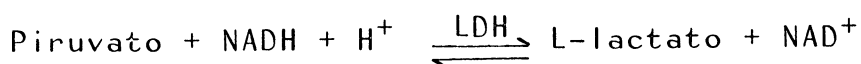
A determinação do ADP, foi feita em duas etapas. Inicialmente, foi removido todo o piruvato do sistema, pela lactato desidrogenase, em sistema constituído de tampão tris-HCl 100mM, pH 7,4; 0,15mM de NADH; amostra de 0,1U de lactato desidrogenase. Em seguida, o ADP foi determinado pela adição de 1mM de PEP, 10mM de $MgSO_4$, 40mM de KCl e 3,0U de piruvato quinase.

II.2.6. MEDIDA DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS DE HOMOGENATO DE CÉLULAS HELA.

A atividade das desidrogenases, foram determinadas através da variação na absorbância do NAD^+ ou $NADP^+$, a 340nm em temperatura de 28°C, usando-se um espectrofotômetro Aminco - Chance Dual Wavelengths/Split Beam, acoplado a registrador. O cálculo das atividades enzimáticas, foi feito usando-se o coeficiente de extinção de $6,22 \times 10^3 \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$.

II.2.6.1. EFEITO DO METOTREXATO SOBRE A ATIVIDADE DA LACTATO DESIDROGENASE (E.C.1.1.1.27. L-LACTATO:NAD OXIDOREDUCTASE)

Reação catalizada



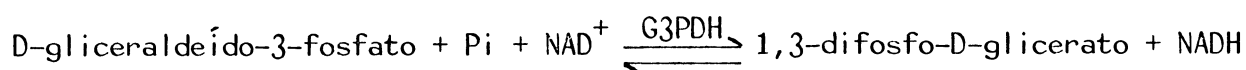
O sistema de reação continha: 0,33mM de piruvato de sódio, 0,13mM de NADH, 50mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,5 e quantidades de extrato, adequadas para cada experimento, num volume final de 3,0ml. A reação ocorreu a 25°C.

A droga foi adicionada ao sistema, após medida da velocidade inicial, em concentrações finais que variaram de 0,03 a 0,46mM.

Para se estudar o tipo de interação entre o metotrexato e o NADH, frente à lactato desidrogenase, a concentração de piruvato foi mantida em 0,35mM (10 vezes o Km determinado nas condições experimentais), realizando-se os experimentos frente a concentrações variáveis de NADH, em concentrações fixas de metotrexato. O mesmo ensaio, foi desenvolvido fixando-se a concentração de NADH e variando aquela do metotrexato. Os resultados foram analisados usando-se a metodologia dos mínimos quadrados (MELLOR, 1955) e lançados em gráfico conforme LINEWEAVER - BURK (1934), DIXON (1953) e CORNISH-BOWDEN (1974).

II.2.6.2. EFEITO DO METOTREXATO SOBRE A ATIVIDADE DA GLICERALDEÍDO 3-FOSFATO DESIDROGENASE (E.C.1.2.1.12.D-GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO: NAD OXIDOREDUCTASE)

Reação catalisada:



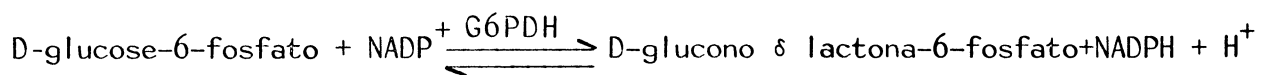
A atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, foi medida a 25°C, segundo o método arsenolítico de DAGHER & DEAL (1977).

O sistema de reação, em volume final de 3,0ml era

constituído de tampão tris-HCl, 50mM, pH 8,0, contendo 1,0mM de EDTA e 12mM de arseniato de sódio. NAD^+ foi adicionado ao sistema à concentração final de 1,0mM e gliceraldeído-3-fosfato à concentração final de 0,73mM. O extrato livre de células foi adicionado em quantidade adequada para cada experimento. Após a medida da velocidade inicial, a droga foi adicionada ao sistema em concentrações finais que variaram de 0,07 a 0,70mM.

II.2.6.3. EFEITO DO METOTREXATO SOBRE A ATIVIDADE DA GLUCOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (E.C.1.1.1.49 .D-GLUCOSE-6-FOSFATO NADP OXIDOREDUTASE)

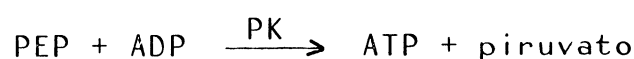
Reação catalisada:



O sistema de reação a 25°C, era constituído de: tampão trietanolamina 40mM, pH 7,6; NADP^+ 0,6mM, MgCl_2 , 6,0mM; G6P, 3,0mM e quantidade adequada de extrato. A atividade da glucose-6-fosfato desidrogenase, foi analisada frente a concentrações variáveis de metotrexato.

II.2.6.4. EFEITO DO METOTREXATO SOBRE A ATIVIDADE DA PIRUVATO QUINASE (E.C. 1.7.1.40. ATP:PIRUVATO FOSFOTRANSFERASE)

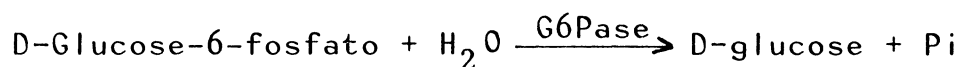
Reação catalisada:



A droga foi adicionada diretamente ao sistema. A reação ocorreu por quinze minutos a 37°C, sendo interrompida pela adição de 1ml de TCA a 10%, permanecendo por cinco minutos em banho de gelo. Após, adicionou-se 3,4ml de água deionizada e centrifugou-se a 12.000 x g por 15 minutos e o Pi liberado, foi medido no sobrenadante, conforme descrito em Materiais e Métodos, ítem 11.2.8.

II.2.7.2. EFEITO DO METOTREXATO SOBRE A ATIVIDADE DA GLUCOSE-6-FOSFATASE (E.C. 3.1.3.9. D-GLUCOSE-6-FOSFATO FOSFOHIDROLASE DE HOMOGENATO DE FÍGADO DE RATO)

Reação catalisada:



A atividade da glucose-6-fosfatase, foi medida em sistema de reação constituído de tampão ácido maleico/NaOH, 60mM pH 6,5; 20mM de G6P e homogenado em quantidade adequada. O efeito do metotrexato foi determinado pela introdução da droga diretamente ao sistema. A reação ocorreu por quinze minutos a 37°C, sendo interrompida pela adição de 1,0ml de TCA a 10% permanecendo em banho de gelo por cinco minutos. Após a adição de 1,0ml de água deionizada, centrifugou-se a 12.000 x g por 10 minutos e no sobrenadante efetuou-se a dosagem de Pi.

II.2.8. DOSAGEM DE PI

Para a dosagem de Pi, todo o material foi previamente

te tratado com HCl e exaustivamente lavado com água deionizada. A dosagem de Pi, foi feita com reagente de verde malaquita, conforme descrito por TASHIMA & YOSHIMURA (1975).

II.2.9. DOSAGEM DE PROTEÍNA

A dosagem de proteína foi feita pelo método de LOWRY et al (1951), usando-se como padrão, soroalbumina bovina.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

EFEITO DO METOTREXATO EM FÍGADO PERFUNDIDO

Em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, o metotrexato promove alterações que estão associadas à inibição das desidrogenases dependentes de NAD^+ e de NADP^+ (YAMAMOTO, 1985). Considerando que este medicamento pode se acumular no fígado (ZAHARKO et al, 1965), os experimentos cujos resultados são descritos a seguir, foram feitos a fim de se detectar possíveis reações adversas ao órgão intacto.

III.1. EFEITO DO METOTREXATO EM FÍGADO DE RATO ALIMENTADO

A figura 1, mostra o efeito do metotrexato quando perfundido em dose única (0,4mM) em fígado isolado de rato alimentado. Como não foi adicionado substrato ao líquido de perfusão, as atividades metabólicas do órgão são mantidas por mobilização de substratos endógenos, por exemplo, glicogênio e ácidos graxos. Nestes experimentos analisou-se o consumo de oxigênio, glicólise e glicogenólise.

Com a infusão da droga, aos dez minutos do experimento, o consumo de oxigênio que estava em $2,76 \mu\text{moles} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$, aumenta para $3,07 \mu\text{moles} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ (11%), chegando a $3,22 \mu\text{moles} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ (17%), aos vinte e oito minutos do experimento, quando então se interrompeu a infusão do metotrexato. Retirada a droga, o consumo de oxigênio retorna quase aos valores

iniciais ($3,0\mu\text{moles} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$) sugerindo uma ação reversível. O efeito do metotrexato em estimular o consumo de oxigênio, embora discreto, é reprodutível.

Pelos resultados apresentados nesta figura, verifica-se que o metotrexato promove alterações discretas na produção de lactato e piruvato. Logo no início da infusão da droga, a produção dos dois metabólitos aumenta, transitoriamente. Ao término da infusão do metotrexato, a produção de piruvato retorna a valores similares aos iniciais, enquanto que a produção de lactato cai para valores inferiores aos iniciais. Em termos quantitativos, considerando a glicólise como a somatória de lactato e piruvato (KIMMIG et al, 1983), no início do experimento, o valor observado estava em torno de $2,11\mu\text{moles} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$. Com a infusão da droga, este valor aumentou para $2,36\mu\text{moles} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$, isto é, um estímulo de 11%; aos vinte e oito minutos do experimento, a glicólise havia diminuído para $1,75\mu\text{moles} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ ou seja, 17% a menos em relação aos valores iniciais.

Enquanto as alterações observadas no consumo de oxigênio, produção de lactato e piruvato foram discretas, o efeito do metotrexato sobre a liberação de glucose, foi marcante. A produção deste metabólito duplica, assim que se inicia a infusão da droga, permanecendo em níveis elevados durante todo o tempo em que a droga é fornecida ao sistema. Como a perfusão foi realizada em sistema não recirculante não ocorre acúmulo de metabólitos (KIMMIG et al, 1983), sendo assim toda a glucose liberada pelo órgão, é proveniente do glicogênio.

Com a finalidade de verificar se o efeito do metotrexato sobre a liberação de glucose era dependente da concentração

usada da droga, foram realizados os experimentos cujos resultados estão apresentados na figura 2. Nestes experimentos, a concentração da droga foi gradualmente aumentada no decorrer da perfusão e como anteriormente, não se adicionou substratos ao meio. Os parâmetros analisados foram: consumo de oxigênio, produção de lactato, piruvato e de glucose.

Observa-se que por infusão gradativa, a droga praticamente não altera o consumo de oxigênio. Quanto à produção de lactato e piruvato, o comportamento foi aproximadamente o mesmo observado no experimento com a infusão da droga em dose única. À concentração de 0,08mM do metotrexato, ocorre um aumento transitório na produção dos dois metabólitos. No decorrer do experimento, enquanto que os níveis de piruvato liberado tendem a aumentar, os de lactato diminuem, sendo este efeito mais evidente à concentração de 0,8mM.

Em termos quantitativos, a liberação de glucose que no início do experimento ocorria à velocidade de $0,9 \mu\text{moles} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$, aumenta para $3,7 \mu\text{moles} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$, isto é, 4,1 vezes, à concentração de 0,8mM. O piruvato, liberado a uma velocidade de $0,2 \mu\text{moles} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$, antes da infusão da droga, aumenta para $0,5 \mu\text{moles} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$, ao se infundir 0,8mM de metotrexato, enquanto que o lactato a essa concentração da droga, apresenta-se em níveis similares aos iniciais ($0,75 \mu\text{moles} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$).

A figura 3 (média de três experimentos similares ao da figura 2), mostra que existe uma correlação bem definida entre a liberação de glucose e a concentração da droga. O perfil do gráfico, parece sugerir um processo saturável, em concentrações superiores a 0,8mM de metotrexato.

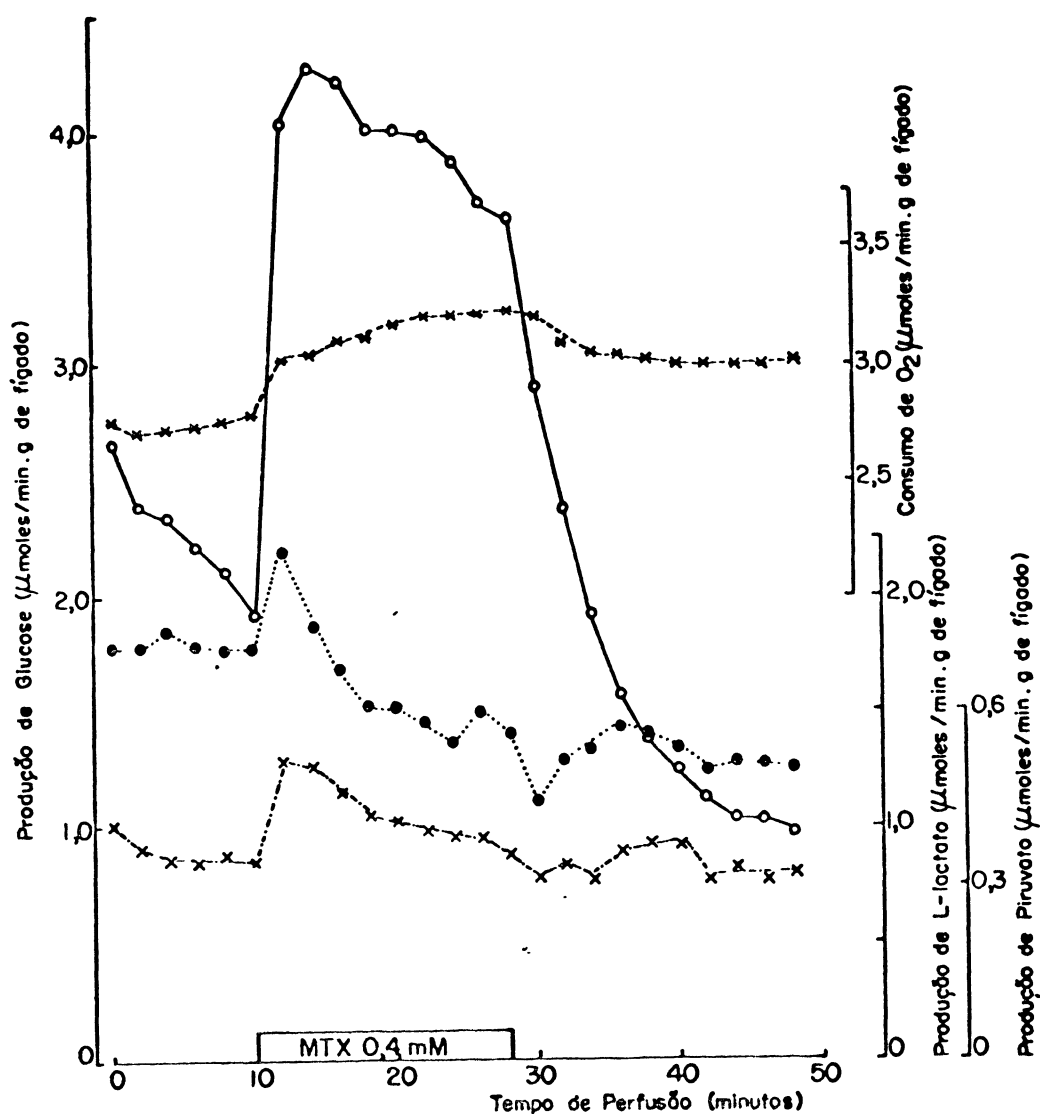


FIGURA 1. Efeito do metotrexato sobre o consumo de oxigênio, glicogenólise, produção de L-lactato e de piruvato, em perfusão de fígado isolado de rato.

Fígado de rato alimentado foi perfundido com Krebs-Henseleit-bicarbonato (pH 7,4) com fluxo de 35ml por minuto. O consumo de oxigênio foi medido polarograficamente. Aliquotas do perfusado foram coletadas para a dosagem de glucose, L-lactato e piruvato, conforme descrito em Materiais e Métodos.

A infusão do MTX, ocorreu entre os 10 e os 28 minutos do experimento.

- (o) Liberação de glucose
- (●) Produção de L-lactato
- (x) Produção de piruvato
- (*) Consumo de oxigênio

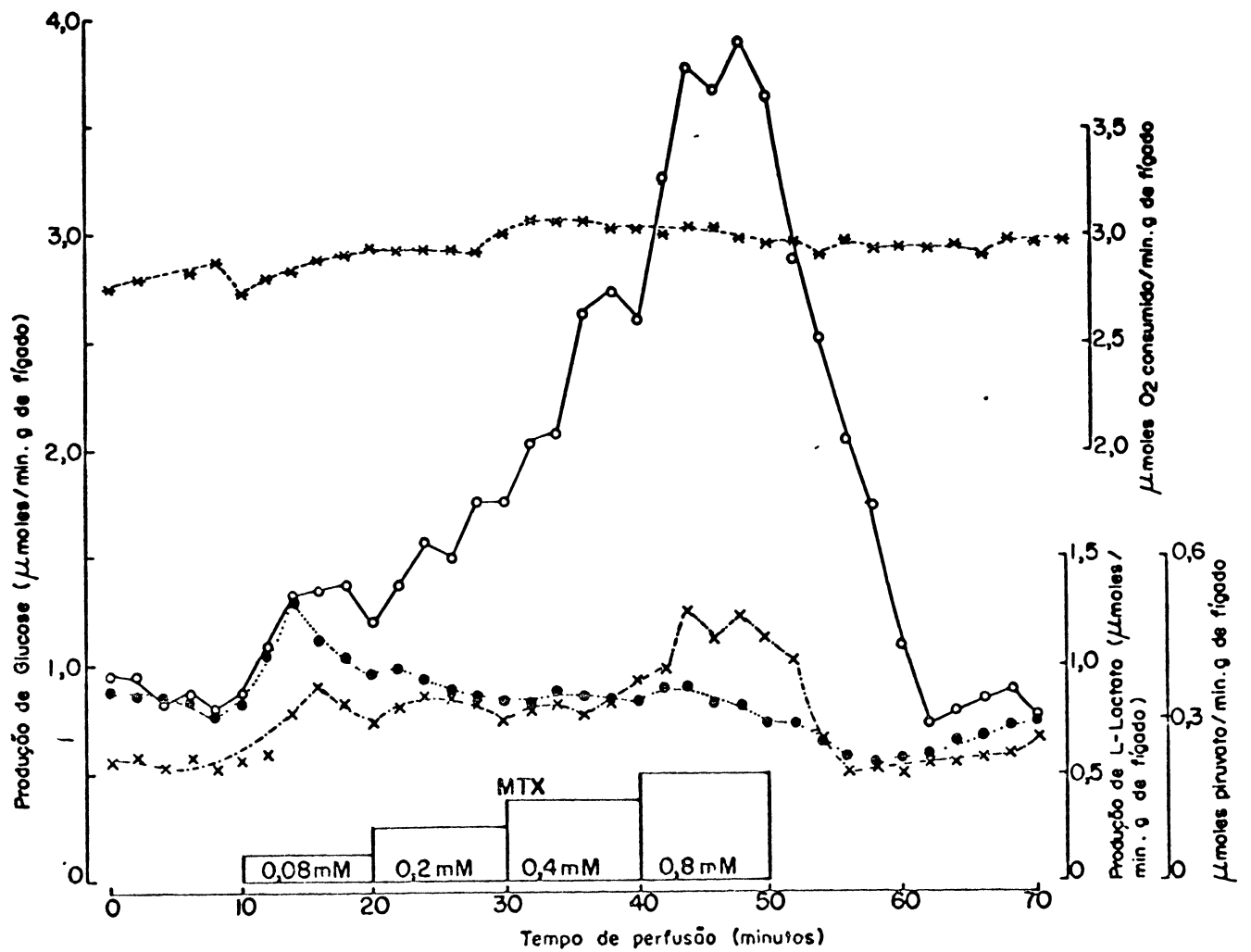


FIGURA 2. Efeito da concentração do metotrexato sobre a glicogenólise, glicólise e consumo de oxigênio, em perfusão de fígado isolado de rato.

Mesmas condições experimentais da Figura 9. MTX foi infundido no sistema com auxílio de uma bomba de precisão, nas concentrações e tempos indicados.

- (●) Produção de L-lactato
- (o) Produção de glicose
- (x) Produção de piruvato
- (*) Consumo de oxigênio

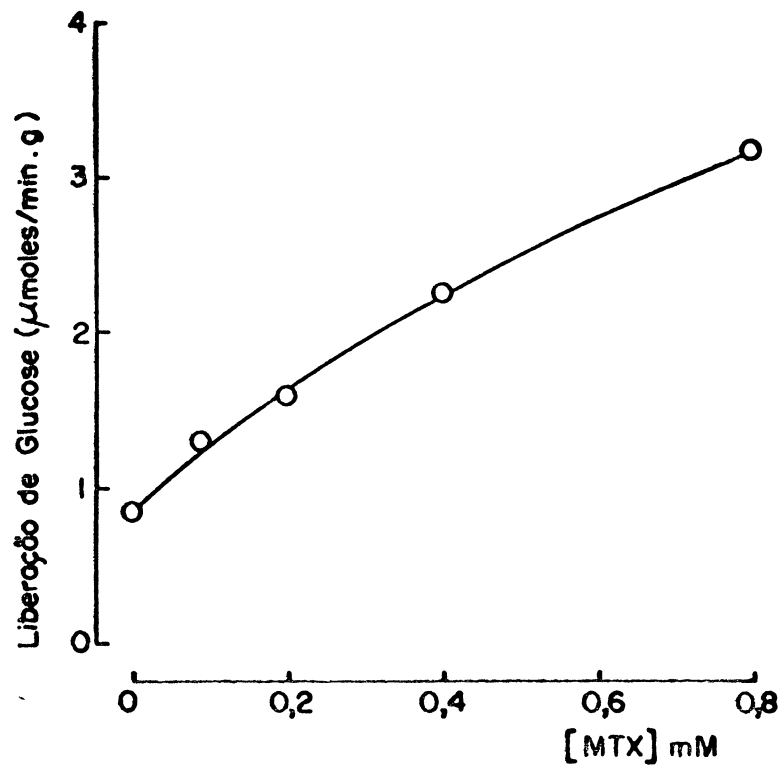


FIGURA 3. Efeito da concentração do metotrexato sobre a liberação de glicose em fígado perfundido.

Condições experimentais descritas na Figura 10.

III.2. EFEITO DO METOTREXATO SOBRE A GLICONEOGÊNESE

A fim de se observar o efeito do metotrexato sobre a gliconeogênese, foram realizados experimentos de perfusão da droga, em fígado isolado de rato submetido a jejum de vinte e quatro horas, situação onde a quantidade de glicogênio no órgão é baixa. Nesta situação, a liberação de glucose, promovida pela infusão de um substrato precursor da gliconeogênese, fornece uma boa aproximação do processo (KIMMIG et al, 1983).

Os resultados obtidos com a infusão de 5,0mM de piruvato e de metotrexato (dose única de 0,4mM), estão apresentados na figura 4. Os parâmetros analisados foram: consumo de oxigênio e a produção de lactato e glucose, a partir do piruvato infundido.

O consumo de oxigênio, foi discretamente estimulado com a infusão do metotrexato. Este efeito, similar àquele já observado em experimento anterior (figura 1), parece não depender do estado metabólico do órgão.

A produção de lactato, aumenta com a infusão do metotrexato, porém, nos minutos seguintes, após retirada da droga retorna para valores basais. O aumento na produção de glucose, foi interpretado como um estímulo na degradação de glicogênio, que, apesar do jejum, persiste no fígado.

A ação do metotrexato em fígado perfundido, parece ser única quando comparada com outros agentes glicogenolíticos. Inibidores respiratórios, como por exemplo o cianeto, por mecanismos não bem esclarecidos estimulam a glicogenólise (CONAGLEN et al, 1984), porém inibem o consumo de oxigênio, estimulam a

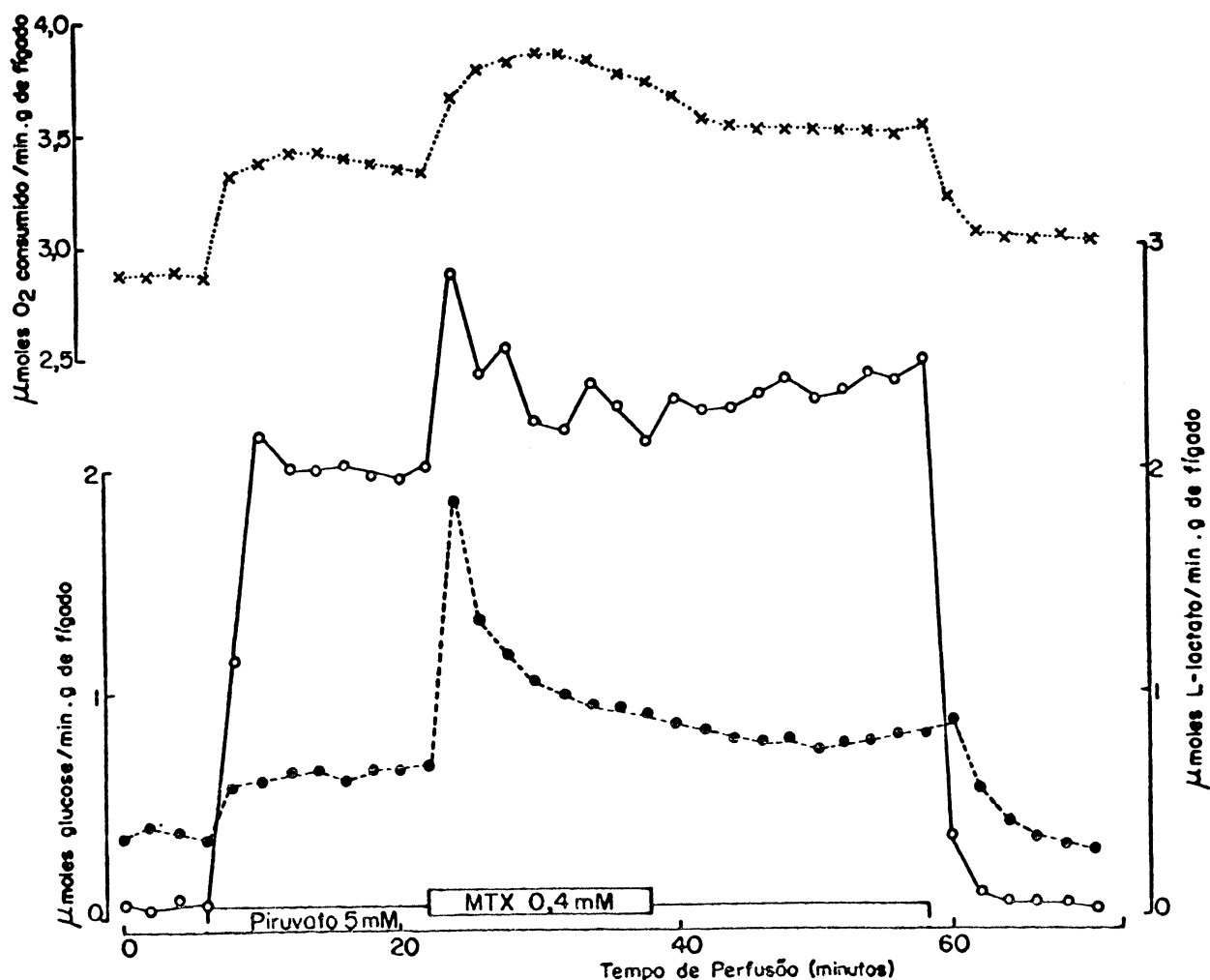


FIGURA 4. Efeito do MTX sobre a gliconeogênese, produção de L-lactato e consumo de oxigênio, em perfusão de fígado de rato.

Fígado de rato submetido a jejum de 24 horas, foi perfundido com Krebs-Henseleit-bicarbonato (pH 7,4) com fluxo de 35 ml por minuto. Piruvato foi infundido de 6 a 58 minutos e MTX (0,4mM) foi infundido de 22 a 38 minutos do experimento. Demais condições experimentais como na Figura 9.

- (x) Consumo de oxigênio
- (o) Produção de L-lactato
- (●) Liberação de glicose

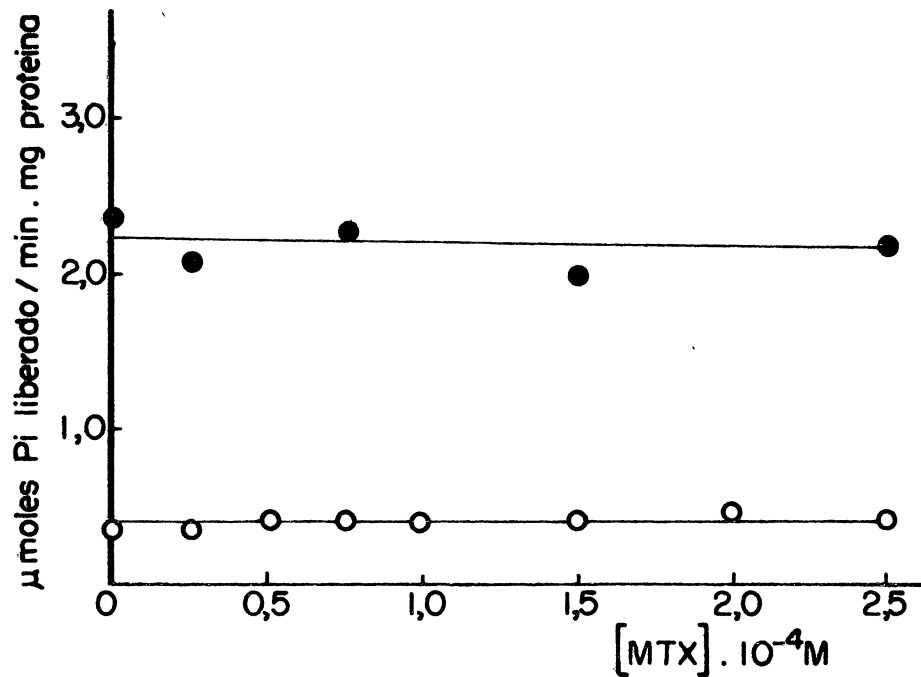


FIGURA 5. Efeito do metotrexato sobre as atividades de glicogênio fosforilase e glucose-6-fosfatase de homogenato de fígado de rato.

Os sistemas de reação eram constituídos de:

a) glucose-6-fosfatase: tampão ácido maleico - NaOH 60mM pH 6,5; 20mM de glucose-6-fosfato; 1,4 mg de proteína do homogenato de fígado e MTX nas concentrações indicadas.

b) Glicogênio fosforilase: glicogênio 2,5mg; 1,67mM de AMP; 0,11mM de glucose-1-fosfato; 0,17M de NaF; 0,72 mg de proteína de homogenato de fígado, pH 6,1 e MTX nas concentrações indicadas.

As incubações foram feitas a 37°C durante 15 minutos, interrompendo-se as reações com TCA. A concentração de Pi liberado foi determinada conforme descrito em Materiais e Métodos.

(○) Glucose-6-fosfatase

(●) Glicogênio fosforilase

glicólise e inibem a gliconeogênese, efeitos que de modo algum se assemelham àqueles observados com o metotrexato.

Um agente glicogenolítico bastante conhecido, é o glucagon. Este hormônio, tem a sua ação mediada por aumento dos níveis de AMP cíclico, o que ocasiona uma série de interconversões enzimáticas que culminam com a ativação da glicogênio fosforilase e degradação do polissacarídeo. Coordenadamente, se observa uma inibição da glicólise, que é relacionada com a diminuição dos níveis de frutose-2,6-bisfosfato, promovida pela ação do hormônio. Estes efeitos, são acompanhados pelo estímulo no consumo de oxigênio e de um favorecimento à gliconeogênese (KIMMIG et al, 1983; HERS et al, 1982).

Os resultados obtidos nestes experimentos, indicam que o metotrexato em fígado, atua de modo específico sobre a glicogenólise. Sua ação discreta sobre a glicólise e consumo de oxigênio, bem como a ausência de efeitos sobre a gliconeogênese, parece excluir um mecanismo de ação similar ao desse hormônio.

Por outro lado, um efeito direto sobre a glicogênio fosforilase ou glucose-6-fosfatase, pode ser excluído, já que a droga não interfere na atividade destas enzimas em homogenato de fígado de rato (figura 5).

Em contraste às observações feitas em mitocôndrias isoladas (YAMAMOTO, 1985), os efeitos do metotrexato no órgão isolado, não parecem estar relacionados primariamente à inibição de desidrogenases; porém, pode ser sugerido um efeito da droga sobre a lactato desidrogenase, a partir da observação do piruvato acumulado à concentração de 0,8mM de metotrexato (figura 2). Além disso, a droga promove uma diminuição na razão lactato/piruvato, observada tanto nos experimentos de dose única, como tam-

bém nos experimentos onde se usou mais de uma concentração da droga. A razão lactato/piruvato, tem sido tomada como um indicador do estado redox citoplasmático, referente à relação NAD^+/NADH (WILLIAMSON et al, 1967).

Entre as várias funções, o fígado detém o papel central na regulação da glucose sanguínea, acumulando glicogênio e distribuindo glucose, quando necessário (JEFFRIES, 1973). Assim, o metotrexato estimulando a glicogenólise, em concentrações similares àsquelas usadas em clínica, altera uma das funções básicas do órgão, que poderia estar associada a importantes implicações, ao uso da droga.

EFEITO DO METOTREXATO EM CÉLULAS HELA

Enquanto que no fígado, a capacidade em acumular glicogênio está associada a uma das principais funções deste órgão, células HeLa (REITZER et al, 1979), a exemplo de outras células tumorais (WEBER, 1977b) possuem uma capacidade limitada em acumular o polissacarídeo, provavelmente por exibirem um alto fluxo glicolítico. Portanto, seria pouco provável, visualizar efeitos do metotrexato, a nível da glicogenólise, nestas células.

Assim, os experimentos cujos resultados são descritos a seguir, foram feitos a fim de detectar em células HeLa, possíveis alterações metabólicas imediatas, promovidas pela droga.

III.3. EFEITO DO METOTREXATO SOBRE A ATIVIDADE REDOX TRANSMEMBRANA PLASMÁTICA

Drogas com atividade antitumoral, com alvos intracelulares bem definidos, podem atuar sobre a atividade redox da membrana plasmática de células HeLa (SUN & CRANE, 1982, 1985) e embora essa atividade da membrana plasmática não tenha papel completamente definido, parece poder regular a função celular. A atividade redox transmembrana plasmática, é avaliada através da redução do ferricianeto e pela ejeção de prótons, induzida pela adição deste oxidante a células intactas (CRANE et al, 1985 a,b).

Com o objetivo de verificar o efeito do metotrexato sobre esse sistema, caracterizou-se a atividade de ferricianeto redutase transmembrana plasmática.

A figura 6a, mostra a redução do ferricianeto por células HeLa. Observa-se que nas condições experimentais não ocorreu variação na absorção do sistema a 500-420nm, na ausência de células ou de ferricianeto. Com a adição de ferricianeto às células, verificou-se que a redução deste ocorre com uma velocidade inicial rápida, seguida de uma velocidade mais lenta, por vários minutos. Este comportamento, além de observado em células HeLa (SUN & CRANE, 1985), é verificado também em hepatócitos isolados (CLARK et al, 1981). Como no fígado intacto o ferricianeto é predominantemente reduzido em uma só velocidade, sugeriu-se que a velocidade inicial de redução do ferricianeto, seria devido à presença de células danificadas na preparação. Os hepatócitos são obtidos por digestão enzimática do tecido e, as células usadas por SUN & CRANE (1985) bem como as células usadas

neste trabalho, foram colhidas por tripsinização, o que poderia causar algum dano à membrana celular. Entretanto, SUN & CRANE (1985), visando esclarecer qualquer efeito do tratamento de tripsina, usado para liberar as células, examinaram a redução do ferricianeto em linhagem HeLa S-3, clone que se desenvolve em suspensão e que para serem colhidas, não são tripsinizadas. Estas células, reduziram o ferricianeto de modo similar e a tripsinização não modificou a resposta, indicando que a ocorrência de duas velocidades de redução do ferricianeto não é necessariamente devido à presença de células danificadas na preparação.

A figura 6b, apresenta o efeito do metotrexato, sobre a redução do ferricianeto. Observa-se uma inibição acentuada, que é revertida pela adição de triton. Considerando que o efeito detergente do triton libera ferricianeto redutases compartimentalizadas na célula, sobre as quais, provavelmente a droga não atua (YAMAMOTO, 1985), a inibição observada seria devido a uma ação específica do metotrexato sobre a ferricianeto redutase transmembrana plasmática.

A resposta da ferricianeto redutase transmembrana plasmática, frente a diferentes concentrações de metotrexato, está apresentada na figura 7.

Verifica-se que o efeito é dependente da concentração usada da droga, atingindo-se 50% de inibição à concentração de 0,06mM.

O efeito do metotrexato sobre a ejeção de prótons, induzida pela adição de ferricianeto, é demonstrado na figura 8. Observa-se que a droga inibe esta atividade, em um efeito que depende da concentração usada. Inibição de 50%, ocorre em concentração de 0,3mM. Entretanto, a inibição máxima obtida foi de 70%

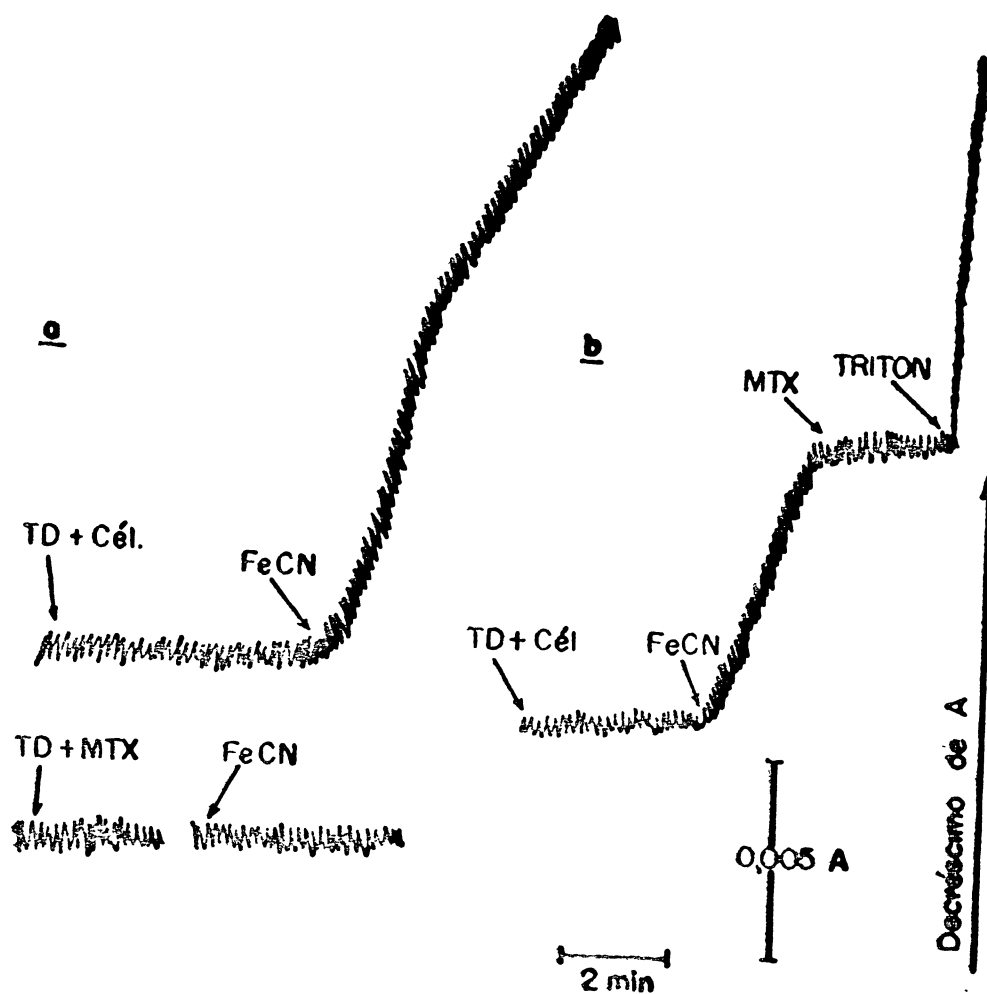


FIGURA 6. Redução do ferricianeto por células HeLa.

A redução do ferricianeto foi seguida espectrometricamente conforme descrito em Materiais e Métodos. O sistema de reação era constituído de: células HeLa (5×10^5) suspensas em tampão TD pré-aquecido a 37°C . O volume final do sistema era de 3ml, sendo adicionado na ordem indicada: FeCN 0,33mM, MTX 0,4mM e Triton X-100 0,033% (v/v).

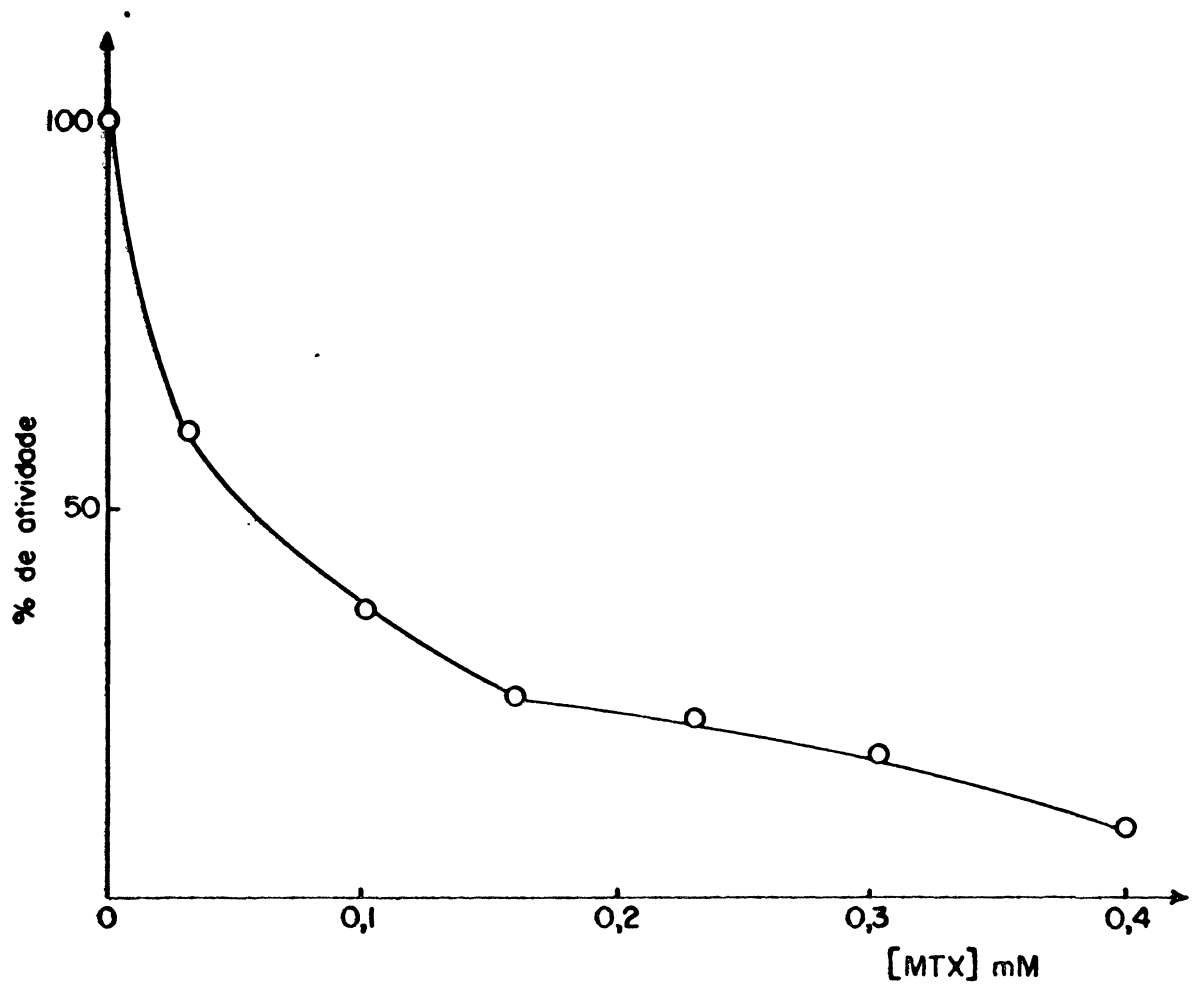


FIGURA 7. Efeito do metotrexato sobre a atividade redox transmembrana plasmática.

O sistema de reação em volume final de 3,0ml e a 37°C, era constituído de 5×10^5 células em tampão TD e 0,33mM de ferriicianeto de potássio. A reação foi seguida espectrofotometricamente em 500-420nm. Após o registro da atividade inicial (que serviu como controle de cada experimento) adicionou-se a droga nas concentrações indicadas.

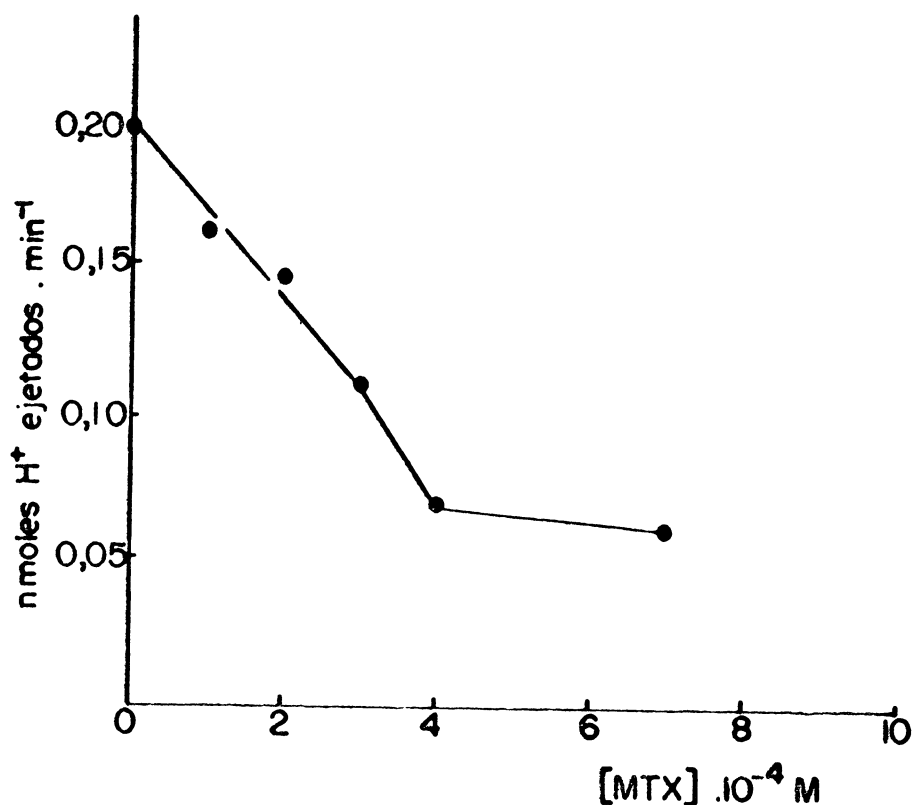


FIGURA 8. Efeito do metotrexato sobre a ejeção de prótons, induzida pelo ferricianeto em células HeLa.

A ejeção de prótons foi determinada conforme descrito em Materiais e Métodos. O sistema de reação em volume final de 5,0ml continha: 0,1M de sacarose, 1,0mM de KCl, 10mM de NaCl, 10mM de CaCl₂, 1,0mM de tampão fosfato, pH 7,4. Células HeLa (8×10^5), foram pré-incubadas com as concentrações indicadas de MTX, por quatro minutos, com agitação constante e a 33°C. A reação foi iniciada com a adição de 2,0mM de FeCN.

em concentração de 0,7mM, o que contrasta com o observado na redução do ferricianeto, quando se atingiu uma inibição de 90% à concentração de 0,4mM. Porém, como os experimentos de ejeção de prótons foram feitos em meio diferente daquele usado para a redução do ferricianeto, as velocidades relativas dos dois experimentos, não podem ser comparáveis.

Embora não se conheça qual o significado funcional do transporte de elétrons e da ejeção de prótons transmembrana plásmática, evidências recentes indicam que em células HeLa, o doador de elétrons intracelular, é o NADH (NAVAS et al, 1986). Por outro lado, a ejeção de prótons, tem sido relacionada com o controle do pH intracelular (CRANE et al, 1985b). Portanto, a inibição do transporte de elétrons e da ejeção de prótons promovida pelo metotrexato, poderia estar associada com outras alterações metabólicas, como resposta ao aumento dos níveis de NADH e diminuição do pH intracelular.

III.4. EFEITO DO METOTREXATO SOBRE A RESPIRAÇÃO DE CÉLULAS HELA

A análise do consumo de oxigênio, por células intactas em presença de metotrexato, foi efetuada com a finalidade de se determinar possíveis efeitos da droga, no metabolismo oxidativo.

A figura 9, mostra o resultado de experiências, em que o consumo de oxigênio foi medido polarograficamente, após diferentes tempos de pré-incubação das células, com 0,4mM de metotrexato. Como não foi adicionado substratos, analisou-se a respiração celular mantida por substratos endógenos.

O efeito do metotrexato sobre o consumo de oxigênio, não é muito pronunciado. Verifica-se que quando as células utilizam substratos endógenos, a respiração foi inibida em 10%, após dez minutos de pré-incubação, sendo que esta inibição quase não se altera, até trinta minutos de pré-incubação.

A figura 10, apresenta os resultados de experiências em que a respiração celular foi analisada sob o efeito de diferentes concentrações de metotrexato. Em condições imediatas, isto é, sem pré-incubação, não ocorre alterações no consumo de oxigênio, nas concentrações testadas. Por outro lado, observa-se que, em células pré-incubadas com a droga, em concentrações superiores a $10^{-4}M$, ocorre diminuição do consumo de oxigênio, observando-se em $10^{-3}M$ uma inibição de 30%, em relação ao controle.

O efeito do metotrexato sobre a respiração celular, foi também avaliado, na presença de glucose, sendo os resultados apresentados na tabela 1. Estes resultados foram analisados, considerando-se 100%, a respiração mantida por substratos endógenos. Observa-se na presença de glucose, uma inibição de 40% no consumo de oxigênio, o que caracteriza um efeito Crabtree, acentuado nestas células. Este valor, é compatível com o descrito para células Ehrlich (45%) (GOSALVEZ et al, 1975), linhagens derivadas de linfomas de Burkitt (46%) e linhagens linfoblastóides derivadas do cordão umbilical (45%) (SORABY et al, 1983). Com a adição da droga, observou-se um aumento no consumo de oxigênio, que foi dependente da concentração da droga, sugerindo este resultado, que o metotrexato aparentemente promove uma reversão no efeito Crabtree.

Considerando que alterações no consumo de oxigênio

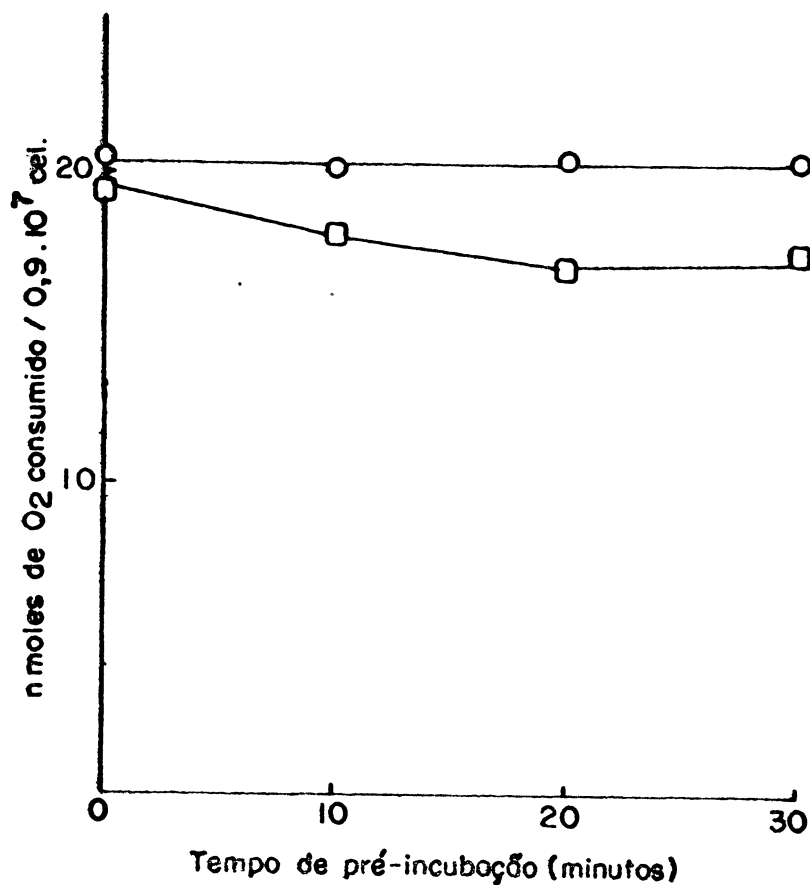


FIGURA 9. Efeito do metotrexato em pré-incubação sobre a respiração de células HeLa.

Sistema: Células suspensas em solução de Tyrode foram incubadas na presença ou ausência MTX, a 32°C, nos tempos indicados. Após a pré-incubação registrou-se a respiração mantida por substratos endógenos.

(□) Consumo de oxigênio na presença de 0,4mM de MTX.

(o) Controle.

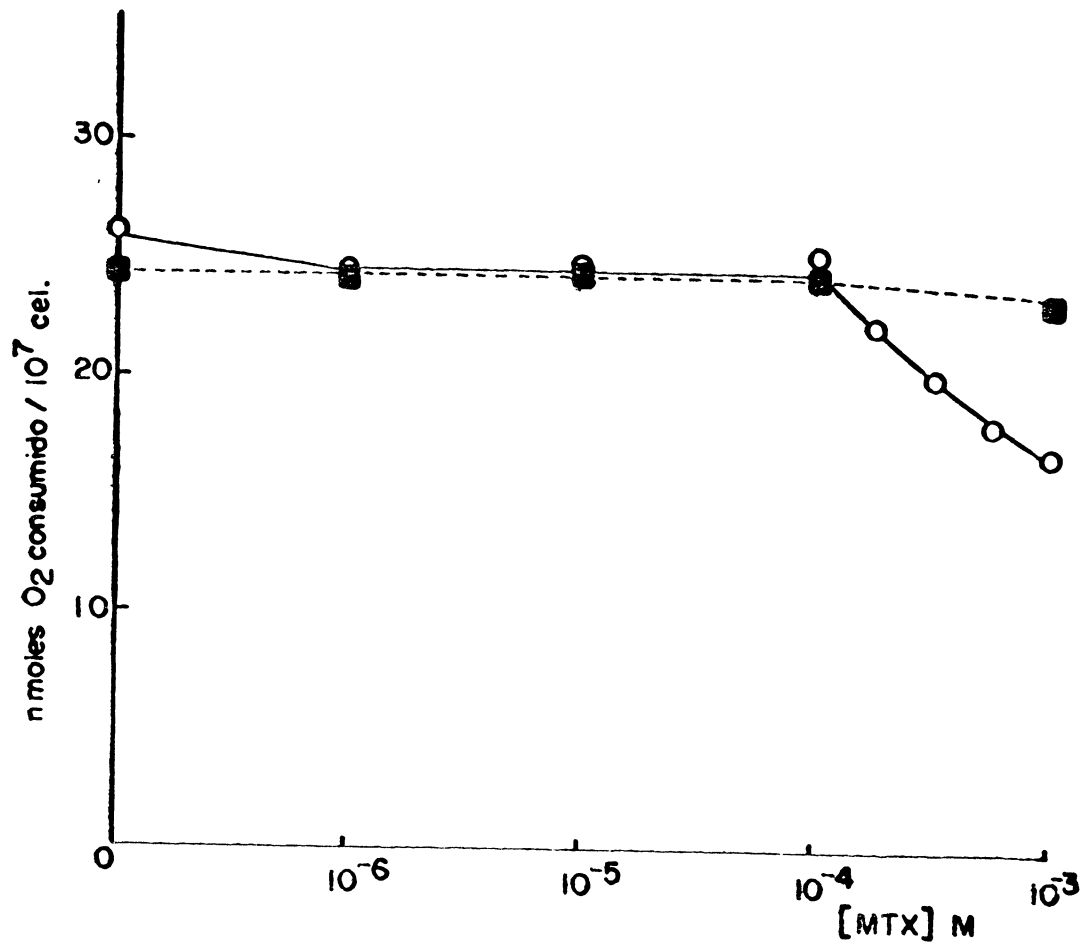


FIGURA 10. Efeito da concentração do metotrexato sobre a respiração de células HeLa.

A respiração celular foi determinada polarograficamente conforme descrito em Materiais e Métodos.

Células HeLa, suspensas em solução de Tyrode, foram analisadas diretamente (■), ou pré-incubadas por dez minutos com as concentrações de MTX (o).

TABELA I. Ação do metotrexato sobre o Efeito Crabtree.

Adições	nmoles de O_2 Consumidos/ min. $0,9 \cdot 10^7$ Cél.	% de Respiração em relação ao endógeno
ENDÓGENO	18,50	100
GLUCOSE (2mM)	11,10	60,0
0,125mM MTX	13,60	73,5
0,250mM MTX	14,90	80,5
0,500mM MTX	16,30	88,1
0,750mM MTX	16,00	86,5

A respiração celular foi avaliada medindo-se inicialmente o consumo de oxigênio mantido por substratos endógenos (considerada como 100% para cada experimento), seguindo-se o registro da respiração em presença de glucose, após o que adicionou-se MTX nas concentrações indicadas.

Demais condições experimentais descritas em Materiais e Métodos.

mantido por substrato endógenos, só foram obtidas em condições de pré-incubação, o estímulo no consumo de oxigênio observado na presença de glucose, poderia ser devido a um efeito da droga, sobre a via glicolítica.

III.5. EFEITO DO METOTREXATO SOBRE A GLICÓLISE DE CÉLULAS HELA

Para se verificar uma possível ação da droga a nível da via glicolítica, células HeLa foram incubadas com 9mM de glucose, na presença ou ausência de 0,4mM de metotrexato, introduzido no sistema, aos quinze minutos do experimento. Foram avaliados o consumo de glucose, produção de lactato e piruvato e consumo de oxigênio.

Verifica-se na figura 11a, que a quantidade total de glucose consumida foi de 3,4 μ moles, sendo que a presença de metotrexato não interferiu na captação da hexose.

Concomitantemente ao consumo de glucose, foram analisadas a produção de lactato e piruvato pelas células. Os resultados estão apresentados na figura 11b. Em linhas gerais, verifica-se que em presença da droga, a produção de lactato diminuiu, enquanto que a produção de piruvato apresentou uma tendência em aumentar. Em termos quantitativos, no final do experimento, a produção de lactato em presença da droga era 75% daquela observada nas células controle, enquanto que a produção de piruvato que se manteve em níveis baixos nas células controle, em presença o metotrexato, ao final do experimento, havia duplicado.

Considerando a atividade glicolítica como a somatória de lactato e piruvato produzidos, ao final do experimento, as células controle apresentavam um fluxo de 2,65 μ moles/hora, en-

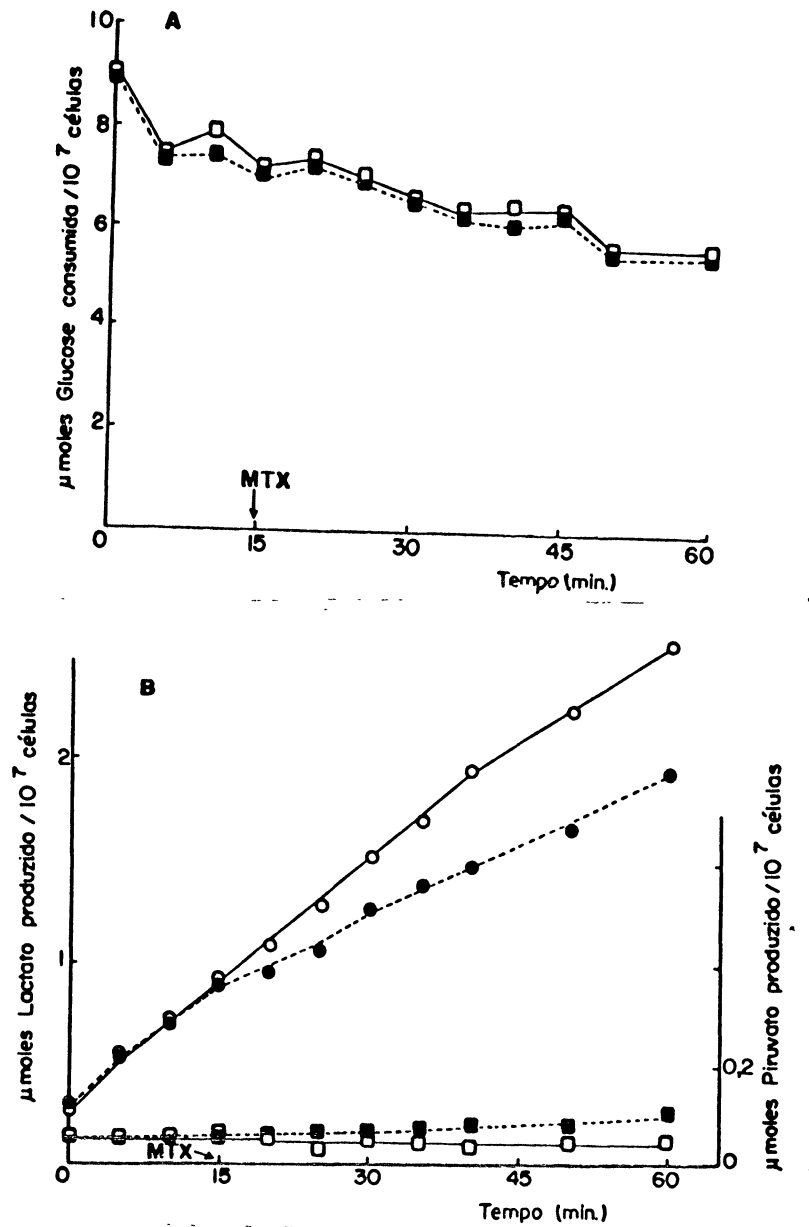


FIGURA 11. Efeito do metotrexato sobre a produção de L-lactato, piruvato e consumo de oxigênio e glicose, por células HeLa.

Células HeLa (10^7 cel/ml) suspensas em solução de Tyrode foram incubadas na presença de 9mM de glicose, com agitação. Aos 15 minutos, adicionou-se 0,4mM de MTX. Nos tempos indicados foram retiradas alíquotas para dosar L-lactato, piruvato e glicose, conforme descrito em Materiais e Métodos. Num experimento paralelo, dosou-se o consumo de oxigênio, através da metodologia de Warburg.

a. Consumo de glicose

(□) Controle

(■) Presença de 0,4mM de MTX

b. Produção de lactato e piruvato

(○) lactato e (□) piruvato (controle)

(●) lactato e (■) piruvato (MTX)

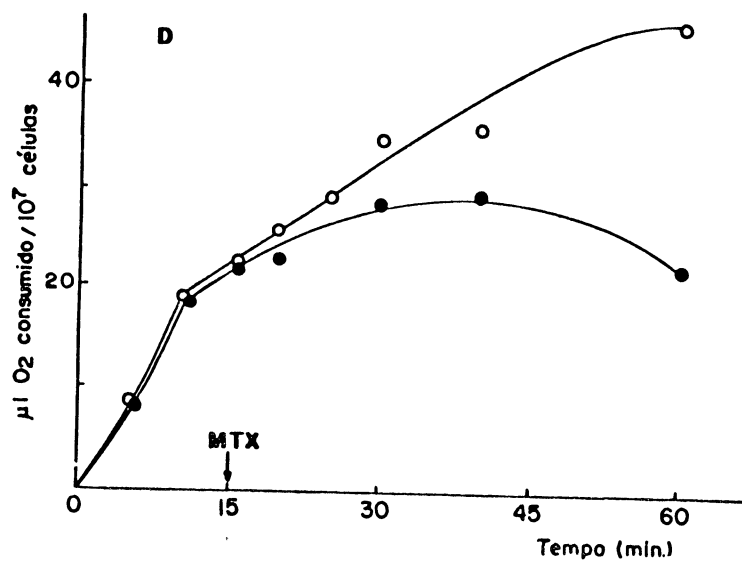
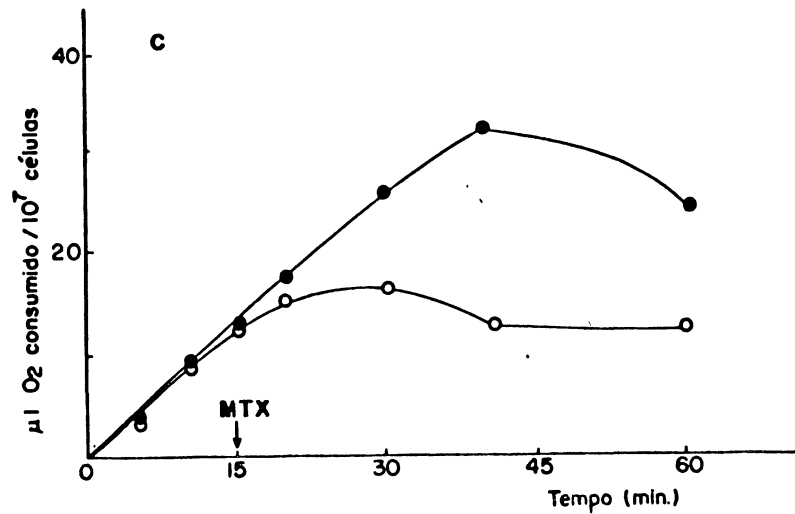


FIGURA 11.

- c. Consumo de oxigênio na presença de glucose
 (o) Controle
 (●) Presença de MTX
- d. Consumo de oxigênio na ausência de glucose
 (o) Controle
 (●) Presença de MTX

quanto que, em presença da droga, este valor caiu para $2,0\mu\text{moles}$ hora, verificando-se uma diminuição de aproximadamente 25%.

Destes resultados, pode-se também extrapolar a relação NAD^+/NADH do citosol, através da razão lactato/piruvato. Verifica-se que ao término do experimento, a razão lactato/piruvato nas células controle era 52 enquanto que nas células tratadas com a droga cai para 19 isto é, um decréscimo de 2,7 vezes. Este efeito poderia sugerir um envolvimento a nível de desidrogenases.

O consumo de oxigênio, mostrado na figura 11c, foi determinado em experimento paralelo, através da metodologia de WARBURG, usando-se amostras da mesma suspensão de células.

Confirmando as observações feitas em eletródio, o consumo de oxigênio em presença de glucose, foi estimulado pela adição da droga (figura 11c), porém foi um estímulo transitório, já que, ao término do experimento, o consumo de oxigênio cai. A respiração endógena (figura 11d) é inibida com a adição de metotrexato.

Uma redução do fluxo glicolítico, promovido pela droga poderia justificar o aumento no consumo de oxigênio observado. Uma outra possibilidade, seria um colapso parcial do potencial da membrana mitocondrial interna, provocado pelo metotrexato, alternativa válida, dadas as observações de YAMAMOTO (1985). Também não pode ser excluída a possibilidade que este efeito seja uma consequência da inibição do sistema redox da membrana plasmática, que alteraria o potencial desta membrana (CRANE et al, 1985b).

A inibição da glicólise em uma de suas etapas, seria

acompanhada do acúmulo de metabólitos, intermediários; assim, foram realizados experimentos, com a finalidade de se encontrar um possível ponto de estrangulamento desta via metabólica. Os resultados apresentados na Figura 12, representam a média de 5 determinações.

Foram analisados o consumo de glucose e os níveis de glucose-6-fosfato, frutose-6-fosfato, frutose-1,6-bisfosfato, gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato, fosfoenolpiruvato, piruvato e lactato, além dos níveis de ATP e ADP. O experimento foi realizado em células pré-incubadas aerobicamente por dez minutos na presença ou ausência de 0,4mM de metotrexato, seguindo-se a adição de 1,0mM de glucose. Os níveis dos metabólitos, referem-se à diferença encontrada entre o tempo zero e dez minutos após a adição de glucose.

Verifica-se que a quantidade de glucose consumida pelas células controle e células tratadas com a droga, foi de 343,8 e 346,8 nanomoles por ml de suspensão, respectivamente. Os níveis de glucose-6-fosfato das células tratadas com metotrexato, foram similares ao de células controle. A mesma observação é verdadeira para frutose-6-fosfato.

Os níveis de frutose-1,6-bisfosfato, apresentaram uma diminuição de 13% em relação ao controle.

Contrastando com o observado nas hexose fosfato, os níveis das trioses foram alterados pela presença da droga. Verifica-se que dihidroxiacetona-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, aumentaram em 53%, enquanto que os níveis de fosfoenolpiruvato duplicaram.

Como anteriormente observado, ocorreu um acúmulo de

piruvato (45%) nas células tratadas com metotrexato, enquanto que os níveis de lactato diminuíram (30%).

O perfil obtido para o acúmulo de metabólitos intermediários da via glicolítica, sugere que o metotrexato possa estar atuando em mais de um sítio nesta via metabólica, após a etapa das hexoses-fosfato.

Assim, com o propósito de se detectar alvos potenciais para a ação da droga, foram avaliados o comportamento de algumas enzimas de células HeLa, frente ao metotrexato. A análise foi feita em extrato livre de células.

A Figura 13, mostra o efeito do metotrexato sobre a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Verifica-se que a atividade desta enzima foi estimulada por baixas concentrações da droga. Com o uso de concentrações maiores de metotrexato, a atividade foi diminuindo, chegando a ser inibida. Em termos quantitativos, a atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, (30 nanomoles de NADH \times min⁻¹ \times mg⁻¹ de proteína), triplicou quando se usou 0,13mM de metotrexato, porém, em concentração de 0,4mM, (usada nos experimentos com células intactas) apresenta-se ainda estimulada em 37%. Inibição da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase foi verificada apenas em concentrações superiores a 0,5mM da droga.

O efeito do metotrexato sobre a atividade da piruvato quinase, está apresentado na Figura 14. Esta enzima, presente nos extratos de células HeLa com atividade específica de 0,2 μ moles \times min⁻¹ \times mg⁻¹ de proteína, não sofre ação direta da droga, observação que desperta interesse, diante do acúmulo de fosfoenolpiruvato observado, sugerindo que a droga, possa alterar os mecanismos de regulação desta enzima.

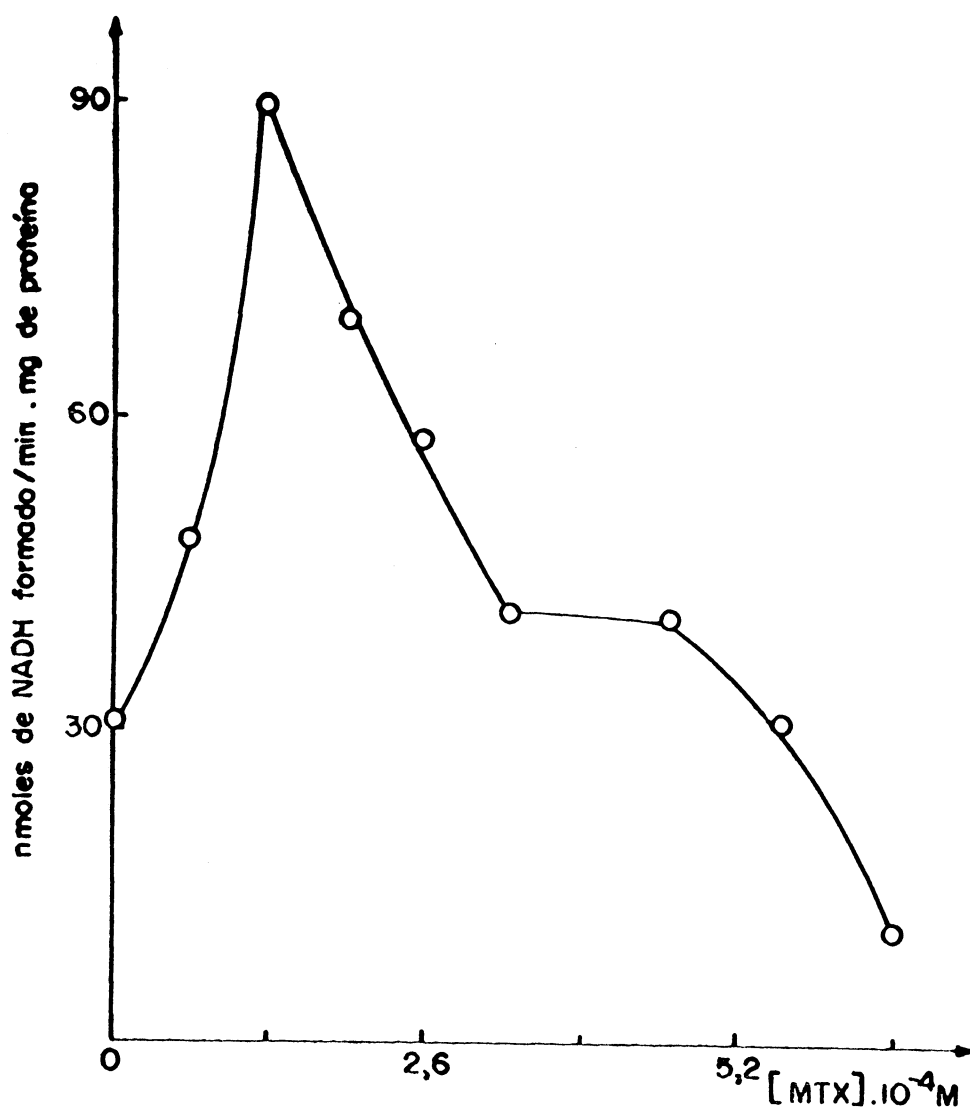


FIGURA 13. Efeito do metotrexato sobre a atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de células HeLa.

Sistema de reação: tampão TRIS-HCl 50mM, pH 8,0, contendo 1mM de EDTA; gliceraldeído-3-fosfato, 0,73mM, NAD^+ 0,43mM; arseniato de sódio 12mM e 18,6 μg de proteína do extrato bruto. O metotrexato foi usado nas concentrações indicadas.

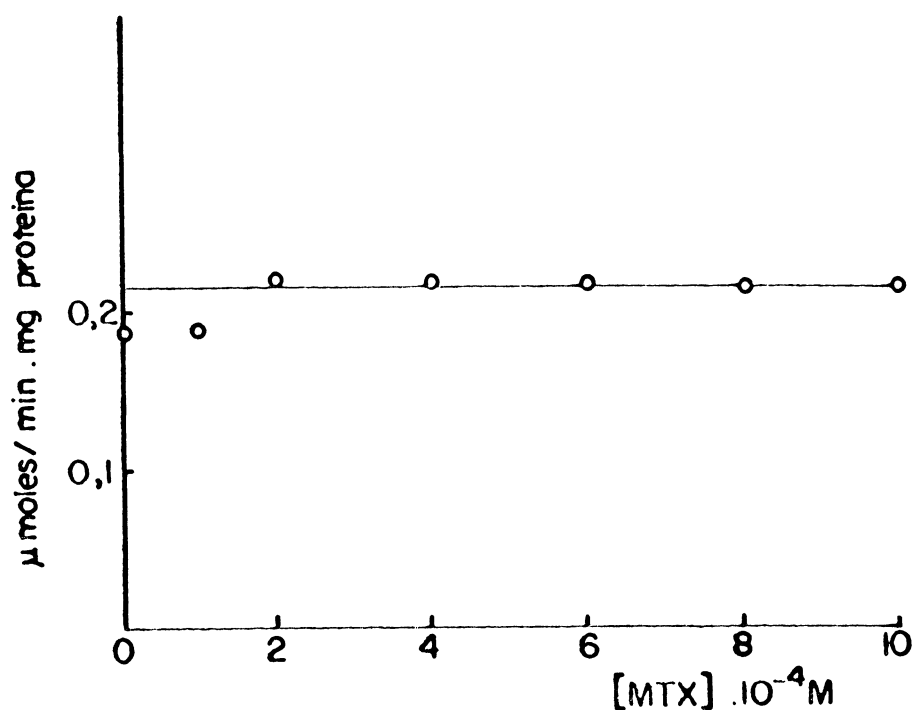


FIGURA 14. Efeito do metotrexato sobre a atividade da piruvato quinase de células HeLa.

A atividade da piruvato quinase foi medida em sistema de reação constituído de: 0,43mM de PEP, 8,5mM de KCl, 2,14mM de MgSO₄, 4,27mM de ADP e tampão trietanolamina 70mM, pH 8,5, contendo 17,5mM de EDTA. O piruvato formado foi determinado como descrito em Materiais e Métodos.

Na Figura 15, está apresentada a resposta da lactato desidrogenase frente a diferentes concentrações de metotrexato. A atividade específica da lactato desidrogenase nos extratos de células HeLa era $144 \text{ nmoles de NAD}^+ \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ de proteína. A enzima foi inibida pela droga, um efeito dependente da concentração usada.

Embora não se pretendesse efetuar estudos cinéticos muito elaborados e se tenha trabalhado com preparações brutas da enzima, os resultados foram lançados em gráfico, usando-se os "plots" de LINEWEAVER-BURK (1934), DIXON (1953) e CORNISH-BOWDEN (1974), apresentados respectivamente nas Figuras 16a,b, c. Pelos três tipos de gráficos, observou-se uma característica de inibição do tipo incompetitiva. A constante de inibição aparente, determinada no gráfico de CORNISH-BOWDEN é de 10^{-4} M .

Os resultados obtidos para a lactato desidrogenase de células HeLa, são semelhantes aos que VOGEL et al (1963) obtiveram para a enzima de preparações comerciais, porém, os autores relatam ser de $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ a concentração da droga que promoveu 50% de inibição, enquanto que a enzima de células HeLa, estava 50% inibida em concentração de $0,66 \times 10^{-4} \text{ M}$. Esta observação, pode sugerir que a lactato desidrogenase de células HeLa é mais sensível à inibição pela droga do que a enzima de preparações comerciais. A inibição foi parcial, não se atingindo em nossas condições experimentais, 100% de inibição.

VOGEL et al (1963), relatam que o metotrexato é também inibidor da glucose-6-fosfato desidrogenase; assim, verificou-se o efeito da droga sobre esta enzima, nos extratos de células HeLa; os resultados estão apresentados na Figura 17.

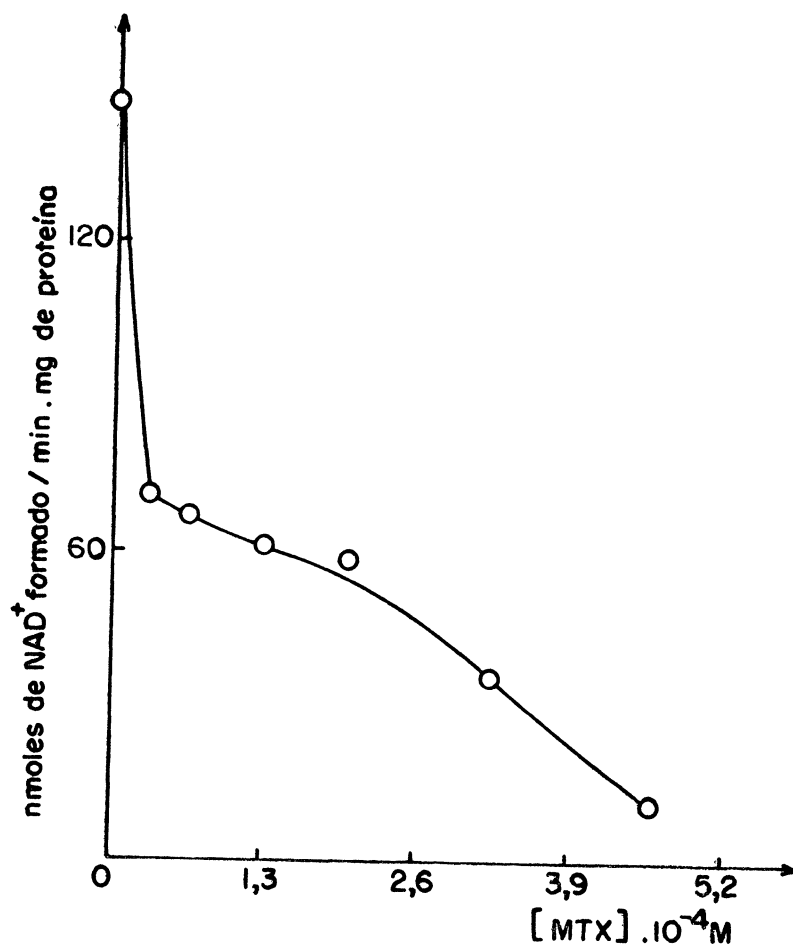


FIGURA 15. Efeito do metotrexato sobre a atividade da lactato de_sidrogenase de células HeLa (1).

Sistema de reação. Tampão fosfato de sódio, 50mM, pH 7,5; piruvato de sódio 0,33mM; NADH 0,13mM; 17 μ g de proteínas do extrato bruto e MTX nas concentrações indicadas, em volume final de 3,0ml. A reação ocorreu a 25°C.

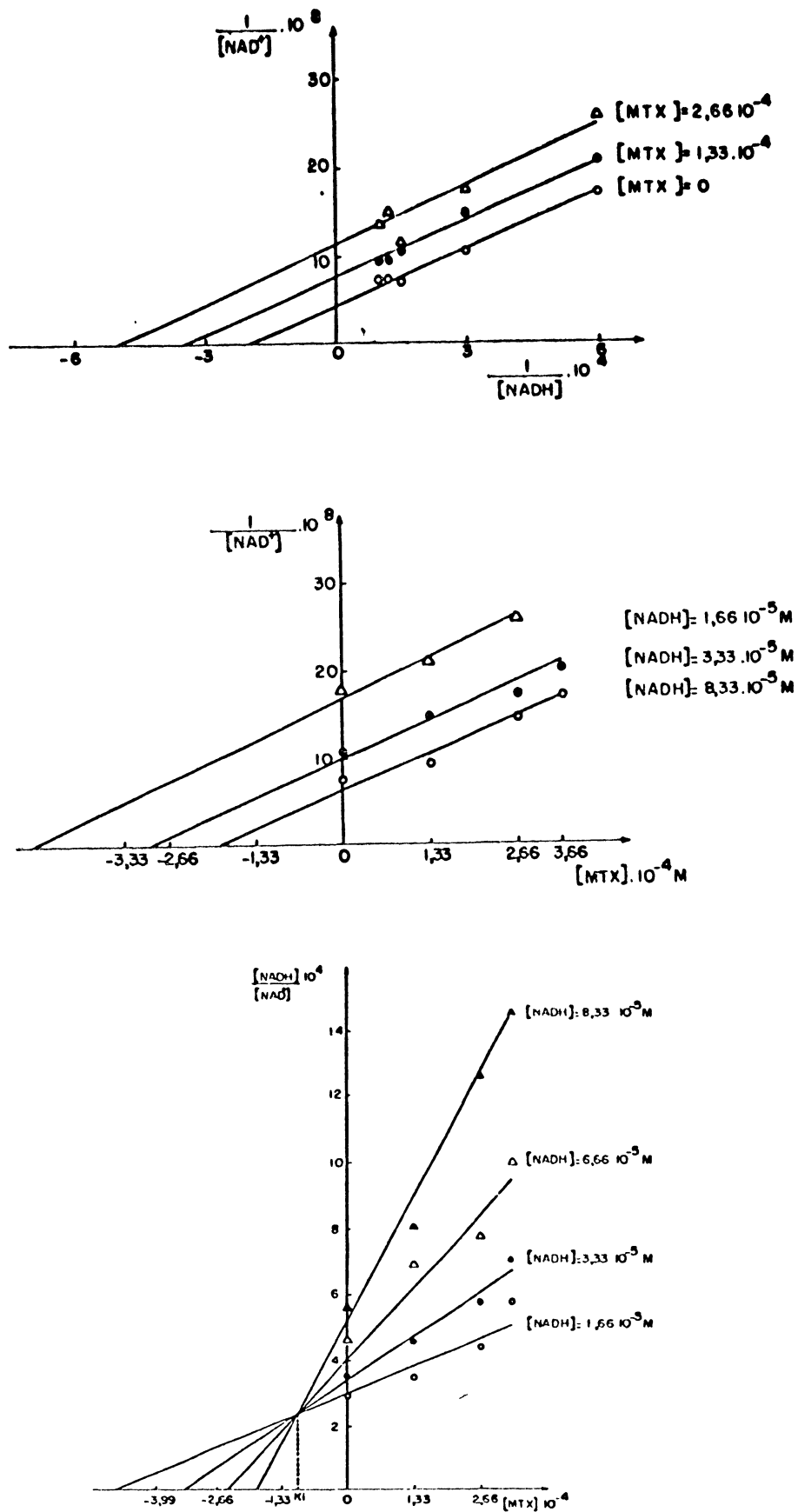


FIGURA 16. Efeito do metotrexato sobre a lactato desidrogenase de células HeLa (II).

- a. Gráfico de LINEWEAVER-BURK b. Gráfico de DIXON
 c. Gráfico de CORNISH-BOWDEN

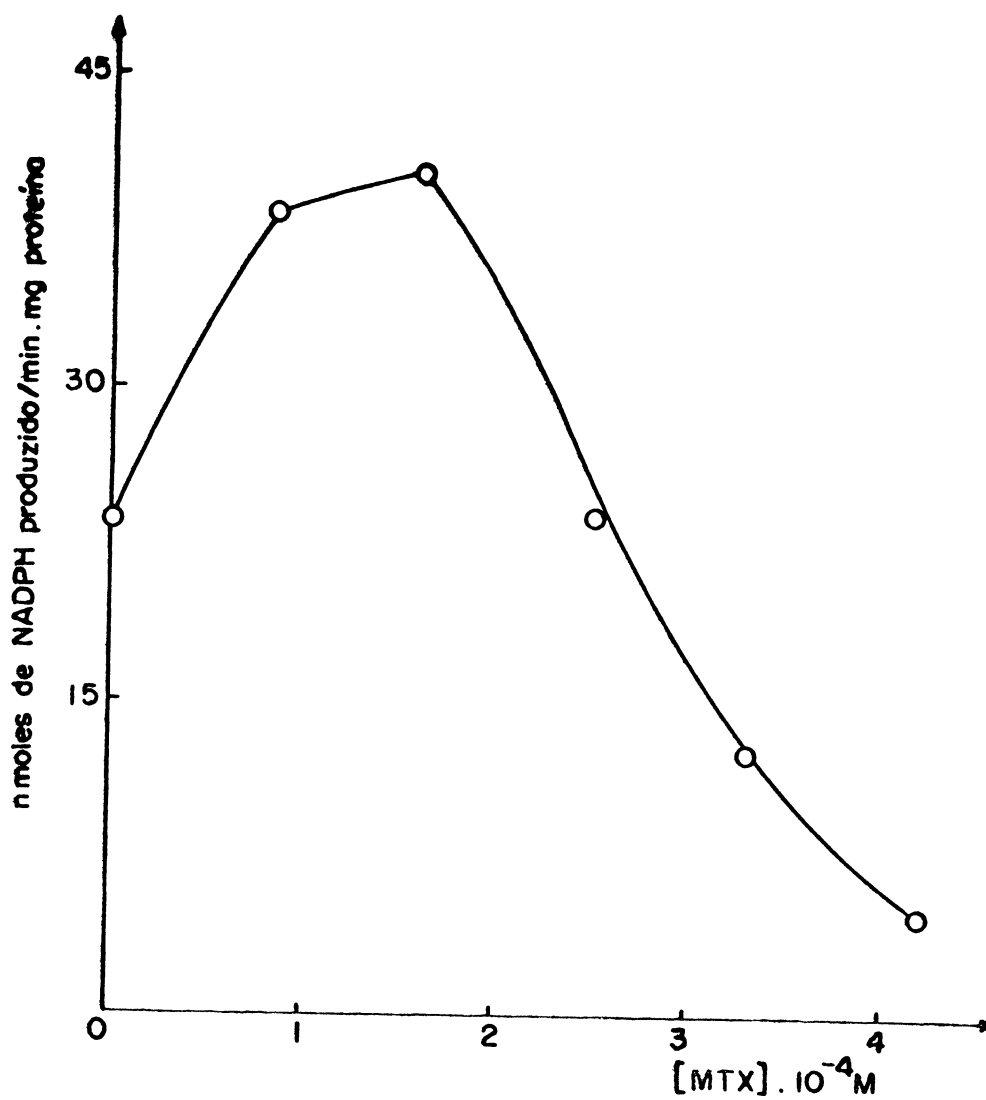


FIGURA 17. Efeito do metotrexato sobre a atividade da glucose-6-fosfato desidrogenase.

Sistema de reação: Tampão trietanolamina, 40mM; pH 7,6; glucose-6-fosfato 0,3mM; NAD^+ 0,6mM e 189 μg de proteína do extrato bruto, em volume final de 3,0ml. Metotrexato foi adicionado nas concentrações indicadas.

A glucose-6-fosfato desidrogenase, apresentou-se com atividade específica de 23 nanomoles. de NADPH \times min⁻¹ \times mg⁻¹ de proteína.

Verifica-se que a droga, inicialmente promove uma ativação desta enzima (76% em concentração de $1,6 \times 10^{-4}$ M), seguida por um acentuado efeito inibidor. Em concentração de 0,4mM, a enzima apresenta-se com apenas 20% da atividade inicial.

Analisando os resultados obtidos nos experimentos mostrados nas Figuras 11 e 12, verifica-se que o metotrexato na concentração usada, não apresenta efeitos imediatos sobre o consumo de glucose. Entretanto, em células Ehrlich, foi observado que a droga pode promover uma diminuição na captação da hexose em efeito bastante pronunciado após vinte e quatro horas de pré-incubação (KAMINSKAS & NUSSEY, 1978; KAMINSKAS, 1979). Os resultados aqui apresentados foram obtidos pela adição da droga diretamente ao sistema, ou em um tempo máximo de pré-incubação de dez minutos e portanto, não podem ser comparáveis àqueles de células Ehrlich (KAMINSKAS, 1979).

A atividade da hexoquinase frente ao metotrexato, não foi determinada nos extratos de células HeLa. Porém, os valores encontrados para os níveis de glucose-6-fosfato, similares para células controles e tratadas com a droga (Figura 12), parecem excluir um efeito imediato do metotrexato ao nível desta enzima.

Considera-se que o controle da via glicc'ítica, é feito principalmente pela fosfofrutoquinase, sendo que a hexoqui nase e a piruvato quinase, também representariam pontos de controle (SEUBERT & SCHONER, 1971; HERS et al, 1982).

Em células normais, a atividade da fosfofrutoquinase

é regulada pelos níveis de frutose-2,6-bisfosfato (HERS et al, 1982). Os níveis deste metabólito não foram determinados neste trabalho, porém publicações recentes (MOJENA et al, 1985) demonstram que a fosfofrutoquinase de células HeLa não é muito sensível à alterações deste modulador. Entretanto, como os níveis de frutose-1,6-bisfosfato apresentaram-se discretamente diminuídos, é possível que haja uma diminuição na atividade desta enzima, promovida pela droga. Tem sido relatado que os íons H^+ são um dos reguladores da atividade desta enzima (HERS et al, 1982). Como a droga inibe a ejeção de prótons transmembrana plasmática, existe a possibilidade de que este efeito possa contribuir com aumento da concentração de H^+ intracelular e assim, a diminuição dos níveis de frutose-1,6-bisfosfato, embora discreta, poderia ser uma resposta da fosfofrutoquinase à diminuição do pH intracelular.

Chama a atenção, o efeito do metotrexato em estimular a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase nos extratos livres de células (Figura 13), particularmente, quando em baixas concentrações. Este resultado deve ser analisado com cuidado, quando se extrapola para a célula intacta, considerando as evidências de que em células HeLa, o NADH é o doador de elétrons intracelular para a redução do ferricianeto (NAVAS et al, 1986). Assumindo que a inibição do sistema redox transmembrana plasmática contribui para o aumento dos níveis intracelulares de NADH, o efeito do metotrexato, sobre a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase na célula intacta, deveria ser inibitório, já que esta enzima é fortemente inibida por NADH (DUGGLEBY & DENNIS, 1974; VIEIRA et al, 1983).

A diminuição dos níveis de lactato e aumento dos níveis de piruvato (Figuras 11 e 12), sugerem que o metotrexato atinge concentrações intracelulares suficientes para inibir a lactato desidrogenase, contribuindo também para o aumento dos níveis de NADH. Esta hipótese, é validada pela diminuição da relação NAD^+/NADH , observada.

Concomitante a estes efeitos, verificou-se um estímulo no consumo de oxigênio (Figura 11c), simulando uma reversão no efeito Crabtree. A ocorrência do efeito Crabtree, está relacionada à competição pelo ADP entre a piruvato quinase e a mitocôndria (GOSALVEZ et al, 1975, 1978). O estímulo no consumo de oxigênio observado, deve compensar a célula em termos energéticos já que não foi detectado alterações imediatas dos níveis de ATP (Figura 12), nas células tratadas com a droga; por outro lado, com o estímulo da atividade mitocondrial, poderia ocorrer diminuição dos níveis citoplasmáticos de ADP, ocasionando portanto uma redução na atividade da piruvato quinase, que justificaria o aumento dos níveis de fosfoenolpiruvato, observado.

A elevação dos níveis do fosfoenolpiruvato, pode contribuir também para a redução do fluxo glicolítico destas células, já que este metabólito inibe a fosfofrutoquinase de células cancerosas, mas não de células normais (BOSCA et al, 1982). Pode-se sugerir que a aparente ação do metotrexato sobre a piruvato quinase seja transitória, se considerarmos que em período mais longo de incubação (Figura 11c), a droga inibiu o consumo de oxigênio; porém, não se pode excluir um efeito do metotrexato sobre os outros mecanismos envolvidos na regulação desta enzima.

É difícil se estabelecer a causa da inibição da res-

piração mantida por substratos endógenos, após pré-incubação das células com o metotrexato; nestas condições, não se sabe qual substrato está sendo utilizado. Entretanto, são relevantes as observações de KOUAMOUO et al (1981) e de YAMAMOTO (1985) feitas respectivamente em mitocôndrias isoladas de células Ehrlich e de fígado de rato, que o metotrexato promove alterações na organela relacionadas com a oxidação de substratos NAD⁺ dependentes, em função do tempo de exposição da organela, à droga.

Os resultados aqui apresentados, indicam que o metotrexato promove primeiro as alterações a nível da membrana plasmática e citosol, para posteriormente, atingir a mitocôndria, já que os efeitos sobre a organela são dependentes de pré-incubação. Isto poderia ser um reflexo da barreira imposta pela membrana mitocondrial, dificultando o acesso da droga.

Por outro lado, conforme observado na Figura 18, as células permaneceram viáveis nas condições experimentais, num tempo de exposição de uma hora a altas concentrações da droga, indicando que os efeitos observados não são decorrentes da perda da viabilidade celular.

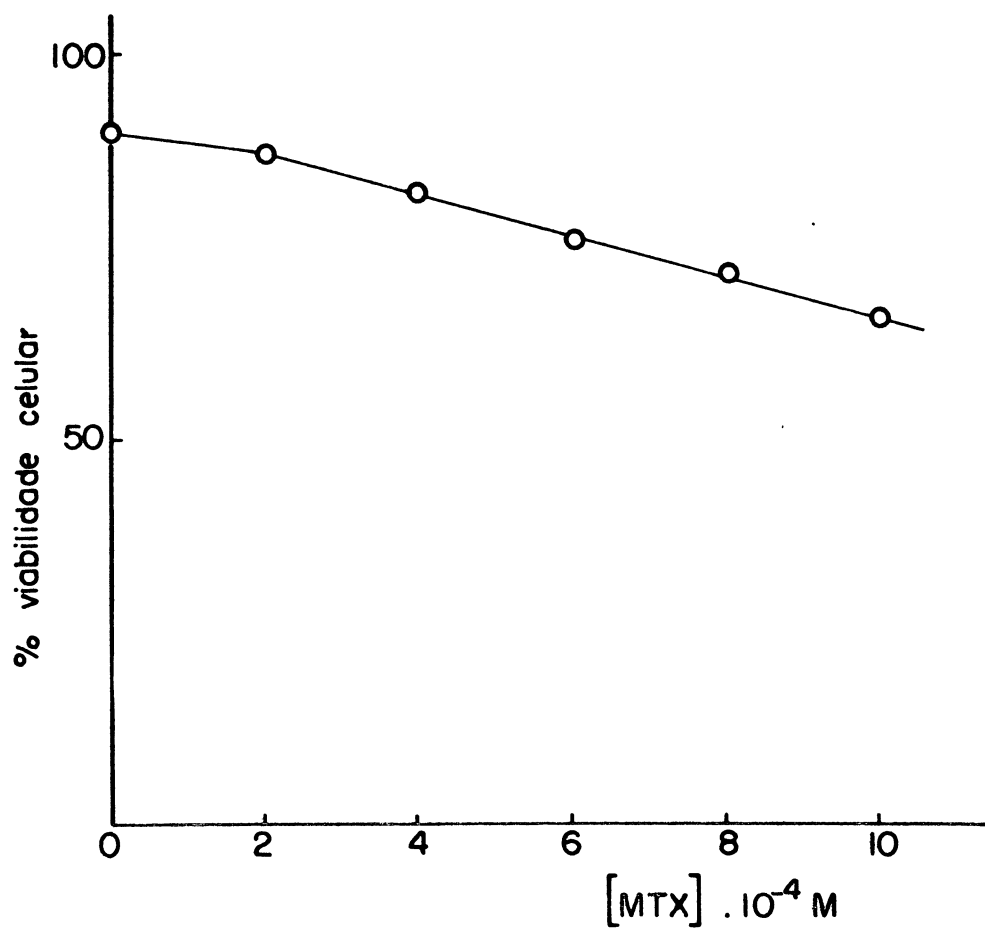


FIGURA 18. Efeito do metotrexato sobre a viabilidade celular.

Células HeLa suspensas em tampão TD (6×10^5 /ml), em presença de 2% de soro fetal (v/v), foram incubadas com as concentrações indicadas de metotrexato por uma hora a 37°C e com agitação de 120 rpm.

A viabilidade celular foi determinada com azul de trypan, como descrito em Materiais e Métodos.

IV. DISCUSSÃO FINAL E CONCLUSÃO

O efeito citotóxico do metotrexato é atribuído à sua ligação à dihidrofolato redutase, que representa o alvo de maior afinidade para a droga, dentro da célula. A inibição desta enzima, está relacionada com a diminuição da síntese de timidilato e de purinas, bloqueando a síntese de DNA e em consequência, a proliferação celular (CADMAN, 1983).

Hoje está bem estabelecido que os esquemas de tratamento am altas doses, permitem que a droga se acumule no citoplasma das células, em níveis maiores do que o necessário para saturar a dihidrofolato redutase, podendo então nesta situação, afetar outras vias metabólicas (GOLDMAN, 1975). Os resultados obtidos neste trabalho, mostram que isto é possível.

Os aspectos verificados em fígado intacto foram: ausência de efeitos sobre a gliconeogênese, estímulo reversível da glicogenólise, diminuição da relação NAD^+/NADH e discreto estímulo no consumo de oxigênio independente da condição metabólica do animal.

O efeito do metotrexato em fígado perfundido foi surpreendente, não só porque não havia relatos anteriores referentes à droga estimular a glicogenólise, como também pelo modo singular que esta ação é exercida, não se comparando a vários agentes glicogenolíticos conhecidos. Portanto, os resultados aqui apresentados, abrem perspectivas para uma série de novos estudos, visando não só o esclarecimento do mecanismo pelo qual o metotrexato exerce a ação glicogenolítica, como também, a relevância de tais observações para situações "in vivo". Considerando que o metotrexato não altera a liberação de glucose quando os níveis

de glicogênio hepático são baixos, as implicações clínicas relacionadas a prováveis alterações na glicemia, poderiam ser evitadas através do uso da droga, em jejum.

A diminuição da razão lactato/piruvato, sugere que a droga pode exercer efeitos sobre desidrogenases, os quais porém não estão relacionados com a ação glicogenolítica. Seria necessário a realização de experimentos em que o tempo de exposição à droga fosse maior, a fim de se verificar o significado destas observações, quanto ao funcionamento do órgão. A diminuição da razão lactato/piruvato foi o ponto de relação entre os efeitos promovidos pela droga no fígado e em células HeLa.

Os aspectos verificados nestas células foram: inibição do transporte de elétrons e da ejeção de prótons transmembrana plasmática; diminuição da produção de lactato, com acúmulo de piruvato, PEP, GAP e DAP; inibição da lactato desidrogenase e da glucose-6-fosfato desidrogenase; estímulo a baixas concentrações e inibição a altas concentrações da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e um discreto, porém complexo efeito sobre o consumo de oxigênio, que foi dependente da condição experimental usada.

A tendência da droga em inibir desidrogenases já havia sido observada anteriormente (VOGEL et al, 1963; YAMAMOTO, 1985). Como não foi obtida nenhuma evidência "in vitro", de que esta droga sofra processo enzimático de oxi-redução preferencialmente ao NAD^+ ou NADP^+ , poder-se-ia sugerir que houvesse ligação do metotrexato a algum ponto da superfície destas enzimas, promovendo alterações conformacionais que resultariam nas inibições enzimáticas observadas.

Foi demonstrado neste trabalho, que o metotrexato es-

trangula o fluxo glicolítico ao nível da produção das trioses; e feito este que é anterior a alterações na velocidade de captação de glucose pela célula.

Células HeLa, apresentam um alto fluxo glicolítico, o qual é responsável não só por parte da produção energética como também por alimentar a via das pentoses-fosfato, com intermediários precursores (REITZER et al, 1979). Vale a pena ressaltar neste aspecto, que os níveis de glucose-6-fosfato não se alteraram em presença da droga, o que estaria de acordo com uma inibição da glucose-6-fosfato desidrogenase, conforme foi observado em extrato livre de células.

Existe porém a possibilidade de o ciclo operar pela parte não oxidativa, utilizando as reações da transcetolase e transaldolase, drenando frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato. Porém, a mobilização destes metabólitos por essa via, seria acompanhada de uma diminuição de seus níveis, o que não ocorreu. Embora estes resultados não indiquem uma ação da droga a nível da via das pentoses, seria de interesse aprofundar estes estudos direcionando-os para a integração glicólise-via das pentoses, já que é uma via indispensável nestas células.

Finalmente, chama a atenção o efeito do metotrexato a nível de ferricianeto redutase e da ejeção de prótons transmembrana plasmática. Embora este sistema enzimático não tenha o seu papel bem definido no contexto do metabolismo celular, os resultados obtidos neste trabalho, somam o metotrexato aos demais agentes antineoplásicos (CRANE et al, 1980; SUN & CRANE, 1981 ; SUN & CRANE, 1985), capazes de interferir neste sistema, que representaria um alvo anterior àquele da dihidrofolato redutase.

Tem sido enfatizado que a atividade redox transmembrana plasmática, contribui com o movimento de prótons para fora da célula e, evidências recentes demonstram que o início dos eventos mitóticos, está relacionado a um aumento no pH citossólico (GERSON et al, 1982; BRAVO & MACDONALD BRAVO, 1986). A inibição deste sistema enzimático, implicaria em um decréscimo do pH intracelular, o que poderia contribuir para a sua ação antineoplásica.

Os efeitos do metotrexato não podem ser considerados letais à célula, em curto prazo, porém, como a ação citotóxica deste medicamento tem sido relacionada ao tempo de exposição das células à droga, a longo prazo os efeitos sobre a função mitocondrial devem se fazer presentes e como consequência o rendimento energético celular poderia vir a ser comprometido.

Os aspectos considerados na discussão deste trabalho, estão apresentados na Figura 19.

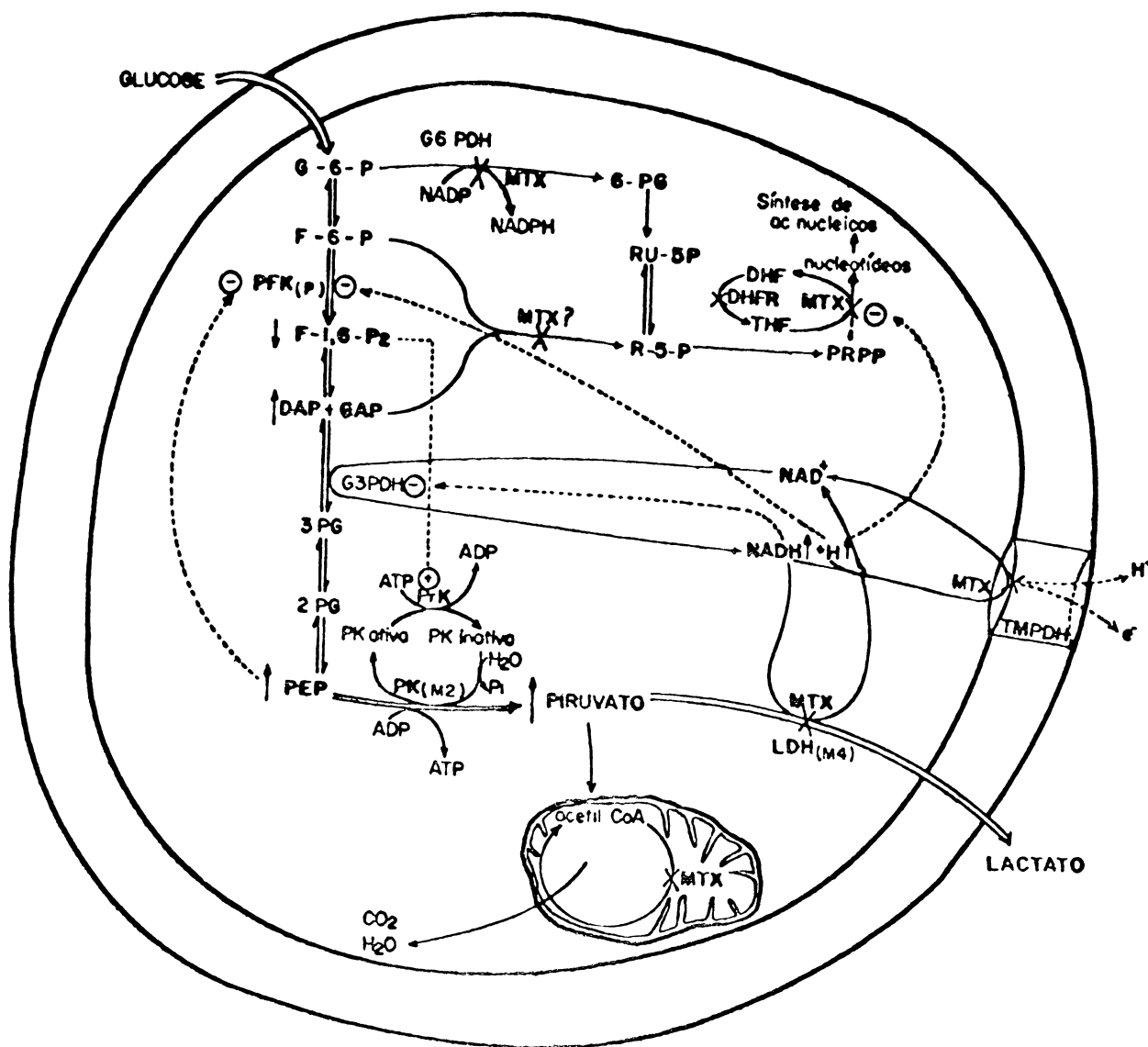


FIGURA 19. O esquema representa um modelo de célula tumoral usando a glicose como substrato. A necessidade de ribose destas células é maior, portanto a via das pentoses ocorre no sentido reverso daquele das células normais. Transaldolase e transcetolase convertem duas moléculas de frutose-6-fosfato e uma de gliceraldeído 3-fosfato, em três moléculas de ribose-5-fosfato (STRYER, 1976). O modelo é uma modificação daquele proposto por EIGENBRODT & GLOSSMAN (1980), sendo introduzida a atividade redox transmembrana plasmática conforme CRANE et al (1985a). Estão indicados os prováveis sítios de ação do metotrexato, conforme sugerido neste trabalho e por informações da literatura.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAUGH, C.M.; KRUMDIECH, C.L.; NAIR, M.G. Polygammaglutamyl metabolites of methotrexate. Biochem. Biophys. Res. Commun. 52: 27-34, 1973.
- BALINSKA, M.; GALIVAN, J.; COWARD, J.K. Efflux of methotrexate and its polyglutamate derivatives from hepatic cells in vitro. Cancer Res. 41:2751-2756, 1981.
- BALIS, F.M.; SAVITCH, J.L.; BLEYER, W.A. Pharmacokinetics of oral methotrexate in children. Cancer Res. 43:2342-2345, 1983.
- BENDER, R.A. Membrane transport of MTX (NSC - 740) in human neoplastic cells. Cancer Chemoth. Rep. 6: 73-82, 1975.
- BERTINO, J.R.; BOOTH, B.A.; BIEBER, A.L.; CASHMORE, A. and SARTORELLI, A.C. Studies on the inhibition of dihydrofolate reductase by folate antagonists. J. Biol. Chem. 239:479-485, 1964
- BERTINO, J.R. Toward improved selectivity in cancer chemotherapy: The Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture. Cancer Res. 39: 293-304, 1979.
- BLEYER, W.A. Clinical Pharmacology: Guidelines for the clinical use of methotrexate in HALL, R.R. A comprehensive guide to the therapeutic use of methotrexate in bladder cancer. Pharmanal, pp. 51-69, 1983.
- BOSCÁ, L., ARAGÓN, J.J. and SOLS, A. Specific Activation by fructose-2,6-bisphosphate and inhibition by P-enol - pyruvate of ascites tumor phosphofructokinase. Biochem. Biophys. Res. Comm: 106:486-91, 1982.
- BRACHT, A.M.K.; ISHII, E.L.; ANDRADE, P.V.M. e BRACHT, A. Construção de aparelho de perfusão de fígado para estudos de regulação do metabolismo e de mecanismos de ação de drogas. Arq. Biol. Tecnol. 27:419-438, 1984.

- BRAVO, R. and MACDONALD-BRAVO, H. Effect of pH on the induction of competence and progression to the S-phase in mouse fibroblasts. FEBS Letters, 195: 309-312, 1986.
- BREITHAUPT, H.; KÜENZLEN, E., and GOEBEL, G. Rapid high-pressure liquid chromatographic determination of methotrexate and its metabolites 7-hydroxymethotrexate and 2,4 diamino-N¹⁰-methylptericoic acid in biological fluids. Anal. Biochem. 121:103-113, 1982.
- BUSTAMANTE, E. and PEDERSEN, P.L. High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: Role of mitochondrial hexokinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 3735-3739, 1977.
- BUSTAMANTE, E.; MORRIS, H.P. and PEDERSEN, P.L. Energy metabolism of tumor cells. Requirement for a form of hexokinase with a propensity for mitochondrial binding. J. Biol. Chem. 256: 8699-8704, 1981.
- CADMAN, E. Scientific rationale for the combined use of methotrexate and 5-Fluorouracil. In: BERTINO, J.R. ed. Current status and potential role of Methotrexate and 5-Fluorouracil. Chicago, Pharmalibri, 1983. 120p. p. 81-108.
- CHABNER, B.A., SLAVIK, M. Perspectives on high-dose Methotrexate (NSC-740) therapy. Cancer Chemoth. Rep. 6:1-2, 1975.
- CHANG, T.W., FUNG, K.P., CHOY, Y.M. and LEE, C.Y. Glucose transport in developing Ehrlich ascites tumor cells. Parallel changes in the rate of glucose uptake and cytochalasin B, binding activity during tumor development and methotrexate treatment. Arch. Biochem. Biophys. 225:458-66, 1983.
- CHELLO, P.L.; SIROTNAK, F.M., DORICK, D.M. and DONSBACH, R.C. Therapeutic relevance of differences in the structural specificity of the transport systems for folate analogs in L1210 tumor cells and in isolated murine intestinal epithelial cells. Cancer Res. 37:4297-4308, 1977.

- CHINAN, V.F.; VITOLS, K.S. and HUENNEKENS, F.M. Inhibition of dihydrofolate reductase by methotrexate: A new look at an old problem. Adv. Enzyme Regulation. 18: 41-52, 1979.
- CLARK, M.G.; PARTICK, E.J.; PATTEN, G.S.; CRANE, F.L.; LOW, H.; GREBING, C. Evidence for the extracellular reduction of ferricyanide by rat liver. Biochem. J. 200: 565-572, 1981.
- CLENDENINN, N.J.; COWAN, K.H.; KAUFMAN, B.T.; NADKARNI, M.V. ; CHABNER, B.A. Dihydrofolate reductase from a methotrexate-resistant human breast cancer cell line: purification, properties, and binding of methotrexate and polyglutamates. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 24: 276, 1983 (ABSTRACT).
- COHEN, M.; BENDER, R.A.; DONEHOWER, R.C.; MYERS, C.E.; CHABNER, B.A. Reversibility of high-affinity binding of methotrexate in L1210 murine leukemia cells. Cancer Res. 38:2866-70,1978.
- CONAGLEN, V.; MALTHUS, R.S.; REDSHAW-LOTEN J., and SNEYD, J.G.T. The action of anoxia and cyanide on glycogen breakdown in the liver of the gsd/gsd rat. Eur. J. Biochem. 145: 323-327,1984.
- CORNISH-BOWDEN, A. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. Biochem. J. 137: 143-144, 1974.
- CONDIT, P.T.; SHINDER, B.I.; OWENS, A.H.J. Studies on the folic acid vitamins. VII. The effects of large doses of amethopterin in patients with cancer. Cancer Res. 22: 706-712, 1962.
- CRABTREE, H.G. Observations on the carbohydrate metabolism of tumors. Biochem. J. 23: 536-545, 1929.
- CRAIG, T.A. and CRANE, F.L. Transplasma membrane electron transport shows hormonal control and produces membrane hyperpolarization. Plant Physiol. 69:(suppl):151, 1982.

- CRANE, F.L.; MACKELLAR W.C.; MORRÉ, D.J.; RAMASARMA, T.; GOLDENBERG, A.; GREBING, C.; LOW, H. Adriamycin affects plasma membrane redox functions. Biochem. Biophys. Res. Commun. 93: 746-754, 1980.
- CRANE, F.L.; CRANE, H.E.; SUN, I.L.; MACKELLAR, W.C.; GREBING, C. and LÖW, H. Insulin. Control of a transplasma membrane NADH dehydrogenase in erythrocyte membranes. J. Bioenerg. and Biomembr., 14:425-433, 1982a.
- CRANE, F.L.; ROBERTS, H.; LINNANE, A.W. and LÖW, H. Transmembrane ferricyanide reduction by cells of the yeast Saccharomyces cerevisiae. J. Bioenerg. Biomembr. 14:191-205, 1982b.
- CRANE, F.L.; LOW, H.; CLARK, M.G. Plasma membrane redox enzymes. In: MANTONOSI, A.N. ed. The enzymes of biological membranes. 2 ed. New York Plenum, 1985a, V.4. 586p. p. 465-510.
- CRANE, F.L.; SUN, I.L.; CLARK, M.G.; GREBING, C. and LÖW, H. Transplasma-membrane redox systems in grow and development. Biochim. Biophys. Acta. 811:233-264, 1985b.
- CREUTZ, C. & SUTIN, N. Reduction of ferricytochrome c by dithionite ion: electron transfer by parallel adjacent and retome pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70:1701-1703, 1973.
- CZOK, R.; LAMPRECHT, W. Pyruvate, phosphoenolpyruvate and D-glycerate-2-phosphate. In: BERGMAYER, H.U., ed. Methods of enzymatic analysis. 2 ed. New York A.P., 1974. V.3. 1624p. p:1446-1451.
- DAGHER, S.M. & DEAL, W.C. Pig liver glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: purification, crystallization and characterization. Arch. Biochem. Biophys. 179: 643-653, 1977.
- DARZYNKIEWICZ, Z.; ROGERS, A.W.; BERNARD, E.A. Autoradiography with tritiated methotrexate and cellular distribution of folate reductase. Science, 151: 1528-1539, 1966.

- DEMBO, M. and SIROTNAK, F.M. Antifolate transport in L1210 leukemia cells. Kinetic evidence for the non-identity of carriers for influx and efflux. Biochim. Biophys. Acta. 448: 505-516, 1976.
- DEMBO, M.; SIROTNAK, F.M.; and MOCCIO, D.M. Effects of metabolic deprivation on methotrexate transport in L1210 leukemia cells: further evidence for separate influx and efflux systems with different energetic requirements. J. Membr. Biol. 78: 9-17, 1984.
- DIXON, M. The determination of enzyme inhibitors constants. Biochem. J. 55: 170-171, 1953.
- DJERASSI, I. High-dose methotrexate (NSC-740) and citrovorum factor (NSC-3590) rescue: background and rationale. Cancer Chemoth. Rep. 6: 3-6, 1975
- DRANOFF, G.; ELION, G.B.; FRIEDMAN, H.S.; CAMPBELL, G.L.M.; BIGNER, D.D. Influence of glutamine on the growth of human glioma and medulloblastoma in culture. Cancer Res. 45: 4077-4081, 1985.
- DUBOWSKI, K.M. An o-toluidine method for body fluid glucose determination. Clin. Chem. 8: 215-235, 1962.
- DUGGLEBY, R.G. & DENNIS, D.T. Nicotinamide Adenine dinucleotide - specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Pisum sativum*. J. Biol. Chem., 249:167-174, 1974.
- EIGENBRODT, E. & GLOSSMAN, H. Glycolysis-one of the keys to cancer? Trends Pharmacol. Sci. 9: 240-245, 1980.
- ELLEM, K.A. and KAY, G.F. Ferricyanide can replace pyruvate to stimulate growth and attachment of serum restricted human melanoma cells. Biochem. Biophys. Res. Comm. 112:183-190, 1983.

- ERNSTER, L. and DALLNER, G. Effects of dinitrophenol and arsenate on the respiration and phosphorylation of Ehrlich Ascites Tumor Cells and the mechanism of the Crabtree effect. Acta. Chem. Scand. 17: 879-880, 1963.
- ESTABROOK, R.W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios. In ESTABROOK, R.W. & PULLMAN, M.E. eds. Meth. Enzymol: Oxidation and phosphorylation. New York, A.P. 1967. V.X. p. 41-47.
- FARBER, S.; DIAMOND, L.K.; MERCER, R.D.; SYLVESTER, R.F. Jr. ; WOLFF, J.A. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid (aminopterin). N. Engl. J. Med. 238:787-793, 1948.
- FIEK, C.; BENZ, R.; ROOS, N. & BRDICZKA, D. Evidence for identity between the hexokinase-binding protein and the mitochondrial porin in the outer membrane of rat liver mitochondria. Biochim. Biophys. Acta, 688:429-440, 1982.
- FRY, D.W. YALOWICH, J.C.; GOLDMAN, I.D. Rapid formation of poly γ -glutamyl derivatives of methotrexate and their association with dihydrofolate reductase as assessed by high pressure liquid chromatography in the Ehrlich ascites tumor cell in vitro. J. Biol. Chem. 257: 1890-6, 1982.
- GALIVAN, J. Transport of methotrexate by primary cultures of rat hepatocytes: stimulation of uptake in vitro by the presence of hormones in the medium. Arch. Biochem. Biophys. 206: 113-121, 1981.
- GALIVAN, J. Hormonal alteration of methotrexate and folate polyglutamate formation in cultured hepatoma cells. Arch. Biochem. Biophys. 230:355-62, 1984.
- GALIVAN, J.; BALINSKA, M.; NIMEC, Z. and FOX, M.P. Factors controlling the concentrations of methotrexate in cultured hepatic cells. Adv. Enzyme Req. 20:111-121, 1981.

- GERSON, D.F.; KIEFER, H.; EUFFE, W. Intracellular pH of mitogen stimulated lymphocytes, Science, 216:1009-1010, 1982.
- GEWIRTZ, D.A.; RANDOLPH, J.K. and GOLDMAN, I.D. Potent bile salt and organic anion inhibition of methotrexate uptake and accumulation in the freshly isolated hepatocytes. Cancer Res. 40: 1852-1857, 1980.
- GEWIRTZ, D.A.; RANDOLPH, J.K. and JARAMILLO, M. Induction of methotrexate release from rat hepatocytes in suspension by α adrenergic agents: involvement of calcium and metabolic energy. Arch. Biochem. Biophys. 237: 237-243, 1985.
- GEWIRTZ, D.A. and HOLT, S.A. Protein binding as a component of drug interaction in cellular pharmacokinetic studies. Biochem. Pharmacol. 34: 747-754, 1985.
- GOLDENBERG, H. Plasma redox activities. Biochim. Biophys. Acta. 694: 203-223, 1982.
- GOLDMAN, I.D. The characteristics of membrane transport of amethopterin and naturally occurring folates. Ann. N.Y. Acad. Sci. 186: 401-422, 1971.
- GOLDMAN, I.D. Analysis of the cytotoxic determinants for methotrexate (NSC-740): a role for free intracellular drug. Cancer Chemoth. Rep. 6: 51-61, 1975.
- GOLDMAN, I.D. Effects of MTX on cellular metabolism. Some critical elements in drug cell interaction. Cancer Ther. Rep. 61: 549-558, 1977.
- GOSALVEZ, M.; BLANCO, M.; HUNTER, M.M.; CHANCE, B. Effects of anticancer agents on the respiration of isolated mitochondria and tumor cells. Eur. J. Cancer. 10: 567-5-4; 1974.
- GOSALVEZ, M.; LOPEZ-ALARCON, L.; SUAREZ, S.G.; MONTALVO, A. and WEINHOUSE, S. Stimulation of tumor cell respiration by inhibitors of pyruvate kinase. Eur. J. Biochem. 55:315-321, 1975.

- GOSALVEZ, M.; GARCIA-SUAREZ, S.; LOPEZ-ALARCON, L. Metabolic control of glycolysis in normal and tumor permeabilized cells. Cancer Res., 38:142-148, 1978.
- GREADY, J.E. Dihydrofolate reductase: binding of substrates and inhibitors and catalytic mechanism. Adv. Pharmac. Chemoth. 17: 37-102. 1980.
- GREENSTEIN, J.P. Some biochemical characteristics of morphologically separable cancers. Cancer Res. 16: 641-643, 1956.
- GUTMANN, I. and WAHLEFELD, A.W. L-lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD. In: BERGMEYER, H.U., ed. Methods of enzymatic analysis. 2.ed. New York A.P., 1974. V.3. 1624p. p.1464-1468.
- HAMMOND, K.D. and BALINSKY, D. Isozyme studies of several enzymes of carbohydrate metabolism in human adult and fetal tissues, tumor tissues and cell cultures. Cancer Res. 38: 1323-1328, 1978.
- HENDERSON, E.S.; ADAMSON, R.D.; DENHAM, C. The metabolic fate of methotrexate I. Absorption, excretion and distribution in mice, dogs, and monkeys. Cancer Res. 25: 1008-1017, 1965a.
- HENDERSON, E.S.; ADAMSON, R.H.; OLIVERIO, V.T. The metabolic fate of tritiated methotrexate II. Absorption and excretion in man. Cancer Res. 25:1018-1024, 1965b.
- HERS, H.G.; HUE, L. and VAN SCHAFTINGEN, E. Fructose 2,6-bisphosphate. Trends Biochem. Sci. 7:329-331, 1982.
- HERS, H.G. and HUE, L. Gluconeogenesis and related aspects of glycolysis. Ann. Rev. Biochem. 52:617-53, 1983.
- HERZFELD, A.; LEGG, M.A.; GEENGARD, O. Human colon tumors: enzymic and histological characteristics. Cancer 42:1280, 1978.

- HILL, B.T.; BAILEY, B.D.; WHITE, J.C.; GOLDMAN, I.D. Characteristics of transport of 4-amino antifolates and folate compounds by two lines of L5178 y lymphoblasts, one with impaired transport of methotrexate. Cancer Res. 39:2240-2246,1979.
- HORNBEAK, H.R. and NAIR, M.G. Transport and inhibitory activity of new folate analogues in HeLa cells. Mol. Pharmacol. 14: 299-305, 1978.
- HUENNEKENS, F.M.; VITOLS, K.S.; WHITELEY, J.M. and NEEF, Y.G. Dihydrofolate reductase in Meth. in Cancer Res. 13: 199 - 225 , 1976.
- HUENNEKENS, F.M.; VITOLS, K.S. and HENDERSON, G.B. Transport of folate compounds in bacterial and mammalian cells. Adv. in Enzymol. 47: 313-346, 1979.
- HUFFMAN, D.H.; WAN, S.H.; AZARNOFF, D.L.; HOOGSTRATEN, B. Pharmacokinetics of methotrexate. Clin. Pharmacol. Therap. 14: 572-579, 1973.
- JACOBS, S.A.; ADAMSON, R.H.; CHABNER, B.A.; DERR, C.J.; JOHNS, D.G. Stoichiometric inhibition of mammalian dihydrofolate reductase by γ Glutamyl metabolite of methotrexate: 4-amino-4-deoxy-N¹⁰-methylpteroyl glutamyl- γ -glutamate. Biochem. Biophys. Res. Comm. 63: 692-698, 1975.
- JEFFRIES, G.H. Doenças do sistema hepático-Doenças do fígado in BEENSON, P.B., McDERMOTT, W. (ed.) Cecil-Loeb Tratado de Medicina. Tomo II 1369-1396, 13ª ed. (Trad.) Guanabara - Koo-gan 1973; 1899p.
- JOLIVET, J.; COWAN, K.H.; CURT, G.A.; CLENDENINN, N.J. and CHABNER, B.A. The pharmacology and clinical use of methotrexate. N. Engl. J. Med. 309:1094-1104, 1983.

- KAMEN, B.A.; WHYTE-BAUER, W. and BERTINO, J.R. A mechanism of resistance to metotrexate. NADPH but not NADH stimulation of methotrexate binding to dihydrofolate reductase. Biochem. Pharmacol. 32:1837-1841, 1983.
- KAMINSKAS, E. and NUSSEY, A.C. Effects of methotrexate and environmental factors on glycolysis and metabolic energy state in cultured Ehrlich ascites carcinoma cells. Cancer.Res. 38: 2989-2996, 1978.
- KAMINSKAS, E. Inhibition of sugar uptake by methotrexate in cultured Ehrlich ascites carcinoma cells. Cancer Res. 39:908-95, 1979.
- KIMMIG, R.; MAUCH, T.J.; KERZL, W. & SCHWABE, V. and SCHOLZ, R. Actions of glucagon on flux rates in perfused rat liver. 1. Kinetics of the inhibitory effect on glycogenolysis. Eur. J. Biochem. 136: 609-613, 1983.
- KNOX, W.E. The enzymic pattern of neoplastic tissue. Adv. Cancer Res. 10:117-129, 1967.
- KOUAMOUCO, J.; TRENTESAUX, C.; DESOIZE, B.; CAPENTIER, Y.; JARDILLIER, J.C. Effects du methotrexate sur la consommation d'oxygene des cellules L1210 et de leurs mitochondries isolees. C. R. Acad. Sci. Paris. 292:485-490, 1981.
- LANG, G. & MICHAL, G. D-glucose-6-phosphate and D-fructose 6-phosphate in BERGMAYER, H.U. (ed.) Meth. Enzymatic Analysis.3: 1238-1241, 1974.
- LAMPRECHT, W. & TRAUTSCHOLD, I. ATP-determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase, in BERGMAYER., H.U. Meth. Enzymatic Analysis 4:2101-2110, 1974.
- LINDEN, M.; GELLERFORS, P. & NELSON, B.D. Pore protein and the hexokinase-binding protein from the outer membrane of rat liver mitochondria are identical. FEBS Lett. 141:189-192, 1982.

- LINEWEAVER, H. & BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc. 56:656-658, 1934.
- LO, C.; CRISTOFALO, V.J.; MORRIS, H.P. Studies on respiration and glycolysis in transplanted hepatic tumors of the rat. Cancer Res. 28: 1-10, 1968.
- LOISEAU, A.M.; ROUSSEAU, G.; HUE, L. Fructose -2,6- phosphate and control of glycolysis by glucocorticoides and by other agents in rat hepatoma cells. Cancer Res. 45:4263-69, 1985.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.C.; RANDAL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1951.
- LUI, C.Y.; LEE, M.G. and CHIOU, W.L. Clearance studies of methotrexate in dogs after multiple rate infusion. Cancer Res., 45:1545-1548, 1985.
- McGUIRE, J.J.; HSIEH, P.; COWARD, J.K.; BERTINO, J.R. Enzymatic synthesis of folylpolyglutamates: characterization of the reaction and its products. J. Biol. Chem. 225:5776-5788, 1980.
- McGUIRE, J.J.; BERTINO, J.R. Enzymatic synthesis and function of folylpolyglutamates. Mol. Cell. Biochem. 38:19-48, 1981.
- MELLOR, J.W. Higher mathematics for students of chemistry and physics. Fourth ed Dover Publications Inc. New York, 326-330, 641 p., 1955.
- MICHAL, G. & BEUTLER, H.O. D-fructose-1,6-diphosphate, dihydroxiacetone phosphate and D-glyceraldehyde-3-phosphate in BERGMEYER, H.U. ed. Meth. Enzymatic Analysis 3: 1314-19, 1974.
- MISHRA, R.K. and PASSOW, H. Induction of intracellular ATP synthesis by extracellular ferricyanide in human red blood cells J. Membr. Biol. 1:214-224, 1969.

- MOJENA, M.; BOSCÁ, L. and HUE, L. Effect of glutamine on fructose 2,6-bisphosphate and on glucose metabolism in HeLa cells and chick-embryo fibroblasts. Biochem. J., 232:521-527, 1985.
- MONJANEL, S.; REGAULT, T.P.; CANO, J.P.; CARCASSONNE, Y.; FAVRE, R. High-dose methotrexate: preliminary evaluation of a pharmacokinetic approach. Cancer Chemoth. Pharmacol. 3: 189-196, 1979.
- NAHAS, A.; NIXON, P.F. and BERTINO, J.R. Uptake and metabolism of N 5-formyltetrahydrofolate by L1210 leukemia cells. Cancer Res. 32:1416-1421, 1972.
- NAKASHIMA, R.A.; MANGAN, P.S.; COLOMBINI, M. and PEDERSEN, P.L. Hexokinase receptor complex in hepatoma mitochondria: Evidence from N.N'-Dicyclohexylcarbodiimide-labeling studies for the involvement of pore-forming protein VDAC. Biochemistry , 25:1015-1021, 1986.
- NAVAS, P.; SUN, I.L.; MORRÉ, D.J. and CRANE, F.L. Decrease of NADH in HeLa cells in the presence of transferrin or ferricyanide. Biochem. Biophys. Res. Comm. 135: 110-115, 1986.
- NIMEC, Z. and GALIVAN, J. Regulatory aspects of the glutamylation of methotrexate in cultured hepatoma cells. Arch. Biochem. Biophys. 226:671-80, 1983.
- OSKAN, R.; VORA, S.; RIJKSEN, G. and STAAL, G.E.J. Isozymic composition and regulatory properties of phosphofructokinase from well-differentiated and anaplastic medullary thyroid carcinomas of the rat. Cancer Res. 45:135-142, 1985.
- OTTING, F. and HUENNEKENS, F.M. TPNH-dependent binding of amethopterin by dihydrofolate reductase from *Lactobacillus Casei*. Arch. Biochem. Biophys. 152: 429-431, 1972.
- PACKER, L. and GOLDBERGER, R.H. Correlation of structural and metabolic changes accompanying the addition of carbohydrates to Ehrlich ascites tumor cells. J. Biol. Chem. 235:1234-1240, 1960.

- PARRY, D.M. and PEDERSEN, P.L. Intracellular localization and properties of particulate hexokinase in the Novikoff ascites tumor. J. Biol. Chem. 258:10904-10912, 1983.
- PAUL, J. Media for culturing cells and tissues in Cell and Tissue Culture, 4^a ed. Churchill Livingstone, London, pp. 86-119, 1973, 430 p.
- PEDERSEN, P.L. Tumor mitochondria and bioenergetics of cancer cells. Progr. Exp. Tumor Res. 22:190-274, 1978.
- PERKINS, J.P. and BERTINO, J.R. Dihydrofolate reductase from L1210R murine lymphoma: fluorimetric measurements of the interactions of the enzymes with coenzymes substrates and inhibitors. Biochemistry, 5: 1005-1012, 1966.
- PHILLIPS, H.J. Dye exclusion tests for cell viability. In: KRUSE, JR.P.F. and PATTERSON, JR.M.K. ed. Tissue culture, methods and applications. New York, A.P., 1973. 868p. p.406-408.
- PINKERTON, C.R.; WELSHMAN, S.G.; BRIDGES, J.M. Serum profiles of methotrexate after administration in children with acute lymphoblastic leukaemia: Br. J. Cancer, 45:300-303, 1982.
- PINKERTON, C.R.; WELSHMAN, S.G.; KELLY, J.G., SHANKS, R.G., BRIDGES, J.M. Pharmacokinetics of low-dose methotrexate in children receiving maintenance therapy for acute lymphoblastic leukemia. Cancer Chemother. Pharmacol. 10: 36-9, 1983.
- POSER, R.G.; SIROTNAK, F.M.; CHELLO, P.L. Extracellular recovery of methotrexate-polyglutamates following efflux from L1210 leukemia cells. Biochem. Pharmacol. 29:2701-2704, 1980.
- POSER, R.G.; SIROTNAK, F.M.; CHELLO, P.L. Differential synthesis of methotrexate polyglutamates in normal proliferative and neoplastic mouse tissues in vivo. Cancer Res. 41: 4441-4446, 1981.

- RACKER, E. Metabolism of intact cells in Mechanisms in Bioenergetics. pp. 226-240, AP, New York, 1965, 259 p.
- RADER, J.I.; NIETHAMMER, D. and HUENNEKENS, F.M. Effects of sulphydril inhibitors upon transport of folate compounds into L1210 cells. Biochem. Pharmacol. 23:2057-2059, 1974.
- REITZER, L.J.; WICE, B.M. and KENNEL, D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. J. Biol. Chem. 254: 2669-2676, 1979.
- RIZZO, E.; TUCHIYA, H.N.; MARTINEZ, C.H. Técnicas Básicas de Cultura Celular. Instituto Butantan, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, s.d.
- ROSE, I.A. & WARMS, J.V.B. Mitochondrial hexokinase: release, rebinding and location. J. Biol. Chem. 242:1635-1645, 1967.
- ROWE, P.B. Inherited disorders of folate metabolism. In: STANBURY, J.B.; WINGAARDEN, J.B.; FREDRICKSON, D.S. eds. The metabolic basis of inherited disease. 4.ed. New York, McGraw Hill Book, 1978. 1862p. p.430-457.
- SCHAFTINGEN, van E.; HUE, L. and HERS, H.G. Fructose-2,6-bisphosphate the probable structure of the glucose and glucagon-sensitive stimulator of phosphofructokinase. Biochem. J. 192: 897-901, 1980.
- SEUBERT, W.; SHONER, W. The Regulation of Pyruvate Kinase. Cur. Top. Cel. Reg. 3:237-267, 1971.
- SINGH, M.; SINGH, N.V.; AUGUST, J.T. and HORECKER, B.L. Alterations in glucose metabolism in chick embryo cells transformed by Rous sarcoma virus. Transformation specific changes in the activities of key enzymes of the glycolytic and hexose monophosphate shunt pathways. Arch. Biochem. Biophys. 165: 240-246, 1974.

- SHONK, C.E.; ARISON, R.N.; KOVEN, B.J.; MAJIMA, H.; BOXER, G.C. Enzymic patterns in human tissues. III. Glycolytic enzymes in normal and malignant tissues of colon and rectum. Cancer Res. 25: 206-209, 1965.
- SIROTNAK, F.M. and DONSBACH, R.C. The intracellular concentrations dependence of antifolate inhibition of DNA synthesis in L1210 leukemia cells. Cancer Res. 34:3332-3340, 1974.
- SIROTNAK, F.M. Correlates of folate analog transport pharmacokinetic and selective antitumor action. Pharm. Ther. 8:71-103, 1980.
- SIROTNAK, F.M.; MOCCIO, D.M.; KELLEHER, L.E.; GOUTAS, L.J. Relative frequency and kinetic properties of transport defective phenotypes among methotrexate-resistant L1210 clonal cell lines derived in vivo. Cancer Res. 41:4447-52. 1981.
- SIROTNAK, F.M. Obligate genetic expression in tumor cells of a fetal membrane property mediating "Folate" transport: biological significance and implications for improved therapy of human cancer. Cancer Res. 45: 3992-4000, 1985.
- SMITH, E.L.; HILL, R.L.; LEHMAN, R.I.; LEFROWITZ, R.J.; HANDLEER, P.; WHITE, A. Bioquímica Aspectos Gerais. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1985, 785p.
- SOHRABY, S.S.; MAGRATH, I.T. and BALABAN, R.S. Comparison of energy metabolism in human normal and neoplastic lymphoid cells (Burkitt's lymphoma). Cancer Res. 43: 4662-4664, 1983.
- STEINBERG, S.E.; CAMPBELL, C.L.; BLEYER, W.A. and HILLMAN, R.S. Enterohepatic circulation of methotrexate in rats in vivo. Cancer Res. 42: 1279-1282, 1982.
- STONE, S.R. and MORRISON, J.F. Mechanism of inhibition of dihydrofolate reductases from bacterial and vertebrate sources by various classes of folate analogues. Biochim. Biophys. Acta, 869: 275-285, 1986.

- STRUM, W.B. and LIEM, H.H. Hepatic uptake, intracellular protein binding and biliary excretion of amethopterin. Biochem. Pharmacol. 26:1235-1240, 1977.
- STRUM, W.B.; LIEM, H.H. and EBERHARD, U.M. Characteristics of the hepatic transport of analog folate amethopterin. Clin. Res. 26:113A, 1978a.
- STRUM, W.B.; LIEM, H.H. and EBERHARD, U.M. Effect of chemotherapeutic agents on the uptake and excretion of amethopterin by the isolated perfused rat liver. Cancer Res. 38: 4734-36, 1978(b).
- STRYER, L. Pentose phosphate pathway and gluconeogenesis in FREEMAN, W.H. & Co., ed. Biochemistry. San Francisco. pp.356-375, 1976, 877 p.
- SUN, I. and CRANE, F.L. Transplasmalemma NADH dehydrogenase is inhibited by actinomycin D. Biochem. Biophys. Res. Comm. 101: 68-75, 1981.
- SUN, A.S.; SEPKOWITZ, K.; GELLER, A.A. Study of some mitochondrial and peroxisomal enzymes in human colonic adenocarcinoma Lab. Invest. 44: 13-17, 1981.
- SUN, I.L. and CRANE, F.L. Antitumor drug inhibition of transplasma membrane redox function. Fed. Proc. 41: 737, 1982.
- SUN, I.L. and CRANE, F.L. Transplasma membrane redox stimulates HeLa cell growth. Biochem. Biophys. Res. Comm. 125:649-654, 1984.
- SUN, I.L. and CRANE, F.L. Bleomycin control of transplasma membrane redox activity and proton movement in HeLa cells. Biochem. Pharmacol. 34: 617-622, 1985.
- TAKAHASHI, I.; OHNUMA, T.; KAVY, S.; BHARDWAJ, S. and HOLLAND, J. F. Interaction of human serum albumin with anticancer agents in vitro. Br. J. Cancer, 41: 602-608, 1980.

- TASHIMA, Y. and YOSHIMURA, N. Control of rabbit liver fructose 1,6-diphosphatase activity by magnesium ions. J. Biochem. 78: 1161-1169, 1975.
- 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.
- VOGEL, W.H.; SNYDER, R. and SCHULMAN, M.P. The inhibition of dehydrogenases by folic acid and several of its analogs. Biochem. Biophys. Res. Comm. 10: 97-101, 1963.
- VORA, S.; HALPER, J.P. and KNOWLES, D.M. Alterations in the activity and isozyme profile of human phosphofructokinase during malignant transformation in vivo and in vitro: Transformation and progression-linked discriminants of malignancy. Cancer Res. 45: 2993-3001, 1985.
- WAN, S.H.; HUFFMAN, D.H.; AZARNOFF, D.L.; STEPHENS, R.; HOOGSTRA⁴TEN, B. Effect of route of administration and effusions on methotrexate pharmacokinetics. Cancer Res. 34:3487-3491, 1974.
- WANG, C.S. and ALAUPOVIC, P. Isolation and partial characterization of human erythrocyte membrane NADH: Acceptor oxidoreductase. J. Supramol. Struct. 9:1-14, 1978.
- WARBURG, O. Über den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin, Springer-Verlag, 1926.
- WARREN, R.D.; NICHOLS, A.P.; BENDER, R.A. Membrane transport of methotrexate in human lymphoblastoid cells. Cancer Res. 38: 668-671, 1978.
- WEBER, G.; MORRIS, H.P.; LOVE, W.C. Comparative biochemistry of hepatomas. II. Isotopes studies of carbohydrate metabolism in Morris hepatoma S 123. Cancer Res., 21: 1406-1411. 1961.

- WEBER, G. Enzymology of cancer cells. First of two parts. N. Eng. J. Med. 296: 486-493, 1977a.
- WEBER, G. Enzymology of cancer cells. Second of two parts. N. Eng. J. Med. 296: 541-551, 1977b.
- WEINHOUSE, S. Glycolysis, respiration and anomalous gene expression in experimental hepatomas: G.H.A. CLOWES Memorial Lecture. Cancer Res. 32: 2007-2016, 1972.
- WEINSTEIN, E.D. Methotrexate. Ann. Intern. Med. 86 : 199-204, 1977.
- WENNER, C.E. Pasteur and Crabtree effects - Assay in cells: In: FLEISCHER, S.; PACKER, L. eds. Meth.Enzymol.Bioenergetics-oxidative phosphorylation, New York, A.P., 1979. V. LV. 896 p. p. 289-297.
- WERKHEISER, W.C. Specific binding of 4-amino folic analogues by folic acid reductase. J. Biol. Chem. 236:888-893, 1961.
- WERKHEISER, W.C. The biochemical, cellular and pharmacological action and effects of the folic acid antagonists. Cancer Res. 23: 1277-1285, 1963.
- WHITE, J.C.; LOFTFIELD, S.; GOLDMAN, I.D. The mechanism of action of methotrexate. III. Requirement of free intracellular methotrexate for maximal suppression of $[C^{14}]$ formate incorporation into nucleic acids and protein. Mol. Pharmacol. 11:287-97, 1975.
- WHITE, J.C. Reversal of methotrexate binding to dihydrofolate reductase by dihydrofolate: studies with pure enzyme and computer modeling using network thermodynamics. J. Biol. Chem., 254:10889-95, 1979.

- WILLIAMSON, D.H.; LUND, P. and KREBS, H.A. The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide in the cytoplasm and mitochondria of rat liver. Biochem. J. 103:514-27, 1967.
- WILLKENS, R.F.; WATSON, M.A. Methotrexate: a perspective of its use in the treatment of rheumatic diseases. J. Lab. Clin. Med. 100: 314-21, 1982.
- WOODS, M.; BURK, D.; HUNTER, J. Methotrexate, 5-fluorouracil and prednisolone as inhibitors of tumors glycolysis. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 3:74, 1959.
- WU, R. and RACKER, E. Regulatory mechanism in carbohydrate metabolism. IV. Pasteur effect and Crabtree effect in ascites tumor cells. J. Biol. Chem. 234: 1036-1041, 1959.
- YAMAMOTO, N.S. Estudo bioquímico dos efeitos do metotrexato em mitocôndria. Curitiba, 1985. 63p. Tese, Mestrado, Universidade Federal do Paraná.
- ZAHARKO, D.S.; DEDRICK, R.L.; BISCHOFF, K.B. Methotrexate, first steps of pharmacokinetic modeling in mice. Fed. Proc. 28: 389, 1969.
- ZANCAN, G.T., RECONDO, E.F. and LELOIR, L.F. Enzymic dephosphorylation of adenosine diphosphate phosphoglyceric acid. Biochim. Biophys. Acta. 92:125-131, 1964.
- ZIELKE; H.R.; ZIELKE, C.L. and OZAND, P.T, Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells. Fed. Proc. 43: 121-125, 1984.