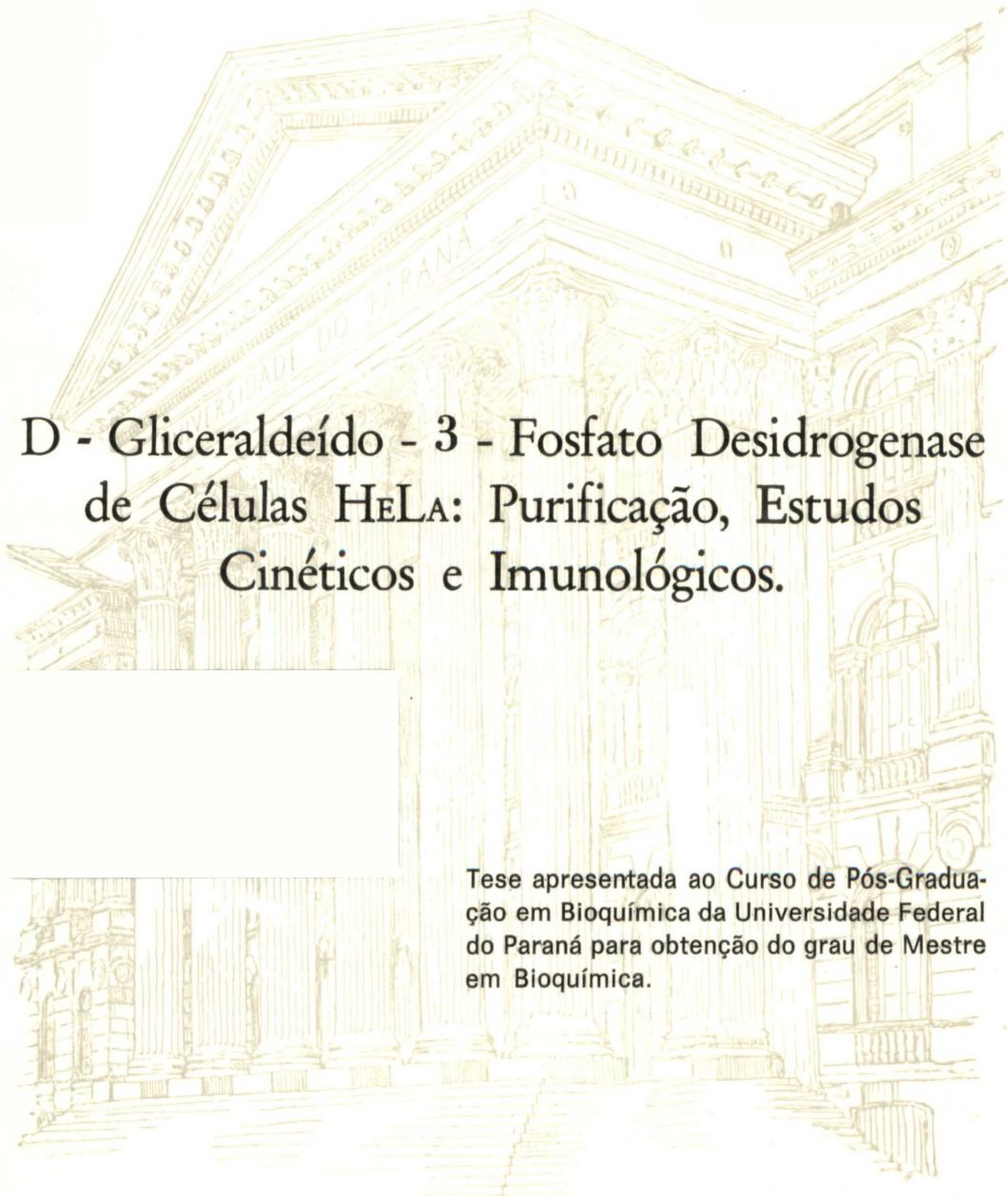


ELISA MAINES GOMES



D - Gliceraldeído - 3 - Fosfato Desidrogenase
de Células HELA: Purificação, Estudos
Cinéticos e Imunológicos.

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

CURITIBA
1990

ELISA MAINES GOMES

D - Gliceraldeído - 3 - Fosfato Desidrogenase
de Células HELA: Purificação, Estudos
Cinéticos e Imunológicos.

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

CURITIBA
1990

TESE ORIENTADA PELA PROFESSORA

DRA. MOMOYO NAKANO

Ao meu pai,
pelas lições aprendidas e
pelo apoio que me tem dado.

AGRADECIMENTOS

Em especial à Dra. MOMOYO NAKANO, orientadora deste trabalho. Não há palavras bastante para expressar minha profunda gratidão pelo privilégio de trabalhar com uma pessoa como ela. A tarefa de concluir este trabalho não teria sido possível sem a sua compreensão.

Ao professor Dr. SHIGEHIRO FUNAYAMA e a à professora Dra. MARIA BENIGNA MARTINELLI DE OLIVEIRA, que participaram e colaboraram com este trabalho desde o início, por suas críticas e encorajamento.

Ao professor Dr. AGUINALDO NASCIMENTO pelo valioso auxílio na obtenção dos gráficos computadorizados e pelo incentivo.

Ao Dr. BENEDITO VALDECIR DE OLIVEIRA e ao Departamento de Cirurgia do Hospital Erasto Gaertner, por terem gentilmente cedido material para a realização de parte deste trabalho.

À Dra. EMA CHANDELIER, pela colaboração na metodologia de cultivo celular e por seu apoio e estímulo.

Ao professor GUIDO FERENCZ pelo auxílio na obtenção das fotografias.

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

À professora Dra. SUNG LIE BRUEL pelos comentários e observações que tão generosamente me foram dados, e pelo seu encorajamento contínuo.

À ROSELI, JULIANA e LILIAN pelo tempo e auxílio que, espontaneamente, partilharam comigo.

À ENEIDA, HIDEVALDO E DALTON, pela amizade e colaboração.

Ao Dr. ROQUE PIRÁGINE, pela ajuda na aquisição de material no exterior, e por sua amizade e estímulo sempre presentes.

À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO, PROFESSORES E AMIGOS DO DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, pelo apoio e incentivo.

AO INSTITUTO DE TECNOLOGIA DO PARANÁ - TECPAR, pela liberação das minhas atividades profissionais até que este trabalho fosse concluído.

AO CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS	x
	LISTA DE FIGURAS	x
	LISTA DE ABREVIATURAS	xii
	RESUMO	xiii
1	INTRODUÇÃO	1
2	MATERIAIS E MÉTODOS	9
	2.1 - REAGENTES	9
	2.2 - FONTES DA ENZIMA	9
	2.2.1 - Células Tumorais	9
	2.2.2 - Células Normais	10
	2.2.3 - Microrganismos	10
	2.3 - CULTIVO CELULAR	10
	2.3.1 - Células HeLa	10
	2.3.1.1 - Repique e Coleta de Células HeLa .	12
	2.3.1.2 - Contagem e Determinação da Viabi-	
	lidade Celular	13
	2.4 - MICRORGANISMOS	14
	2.4.1 - Bactéria (<u>E. coli</u>)	14
	2.4.2 - Levedura (<u>S. cereviseae</u>)	14
	2.5 - PURIFICAÇÃO DA GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO	
	DESIDROGENASE	14
	2.5.1 - Células HeLa	15
	2.5.1.1 - Obtenção do Extrato Bruto	15
	2.5.1.2 - Fracionamento com Sulfato de Amô-	
	nio	15
	2.5.1.3 - Cromatografia em DEAE-Sephadex A-50	16
	2.5.2 - Tecido Tumoral de Mama	16

2.5.2.1 - Obtenção do Extrato Bruto	16
2.5.2.2 - Fracionamento com Sulfato de Amônio .	17
2.5.2.3 - Cromatografia em DEAE-Sephadex A-50.	17
2.5.3 - Bactéria (<u>E. coli</u>)	18
2.5.3.1 - Obtenção do Extrato Bruto	18
2.5.3.2 - Fracionamento com Sulfato de Amônio.	18
2.5.4 - Levedura (<u>S. cerevisiae</u>)	19
2.5.4.1 - Obtenção do Extrato Bruto	19
2.5.4.2 - Fracionamento com Sulfato de Amônio.	19
2.5.5 - Músculo de Coelho	20
2.5.5.1 - Obtenção do Extrato Bruto	20
2.5.5.2 - Fracionamento com Sulfato de Amônio.	20
2.5.5.3 - Cromatografia em DEAE-Sephadex A-50.	21
2.5.6 - Músculo de Jacaré (<u>Caiman sp.</u>) e Pato (<u>Anas sp.</u>).....	21
2.6 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS	22
2.7 - DOSAGEM DE PROTEÍNA	22
2.8 - ATIVIDADE ENZIMÁTICA	22
2.8.1 - Preparo e Determinação da Concentração do Substrato	22
2.8.2 - Determinação da Concentração de NAD ⁺ e NADH	23
2.8.3 - Determinação da Atividade de GPDH	24
2.9 - CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DA GPDH	25
2.9.1 - Obtenção de Anticorpos Anti-GPDH de Células HeLa e de Pato (<u>Anas sp.</u>).....	25
2.9.2 - Purificação dos Anticorpos Anti-GPDH .	25
2.9.3 - Imunodifusão	26
2.9.4 - Imunoeletroforese do Antígeno e do Anticorpo de Células HeLa	27
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29

3.1 - PURIFICAÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa ...	30
3.2 - PURIFICAÇÃO DA GPDH DE TECIDO TUMORAL DE MAMA	30
3.3 - PROPRIEDADES CINÉTICAS DA GPDH DE CÉLULAS HeLa E DE TECIDO TUMORAL DE MAMA ..	34
3.3.1 - Atividade de GPDH de células HeLa em função do pH	34
3.3.2 - Efeito do arseniato sobre a atividade enzimática da GPDH de células HeLa ..	36
3.3.3 - Efeito da concentração de gliceraldeído-3-fosfato sobre a atividade da GPDH de células HeLa e de tecido tumoral de mama. Determinação da constante de Michaelis-Menten	36
3.3.4 - Efeito da concentração de NAD^+ sobre a atividade da GPDH de células HeLa e de tecido tumoral de mama. Determinação da constante de Michaelis-Menten	40
3.3.5 - Efeito inibitório do produto da reação, NADH, e do ATP, sobre a atividade enzimática da GPDH de células HeLa e de tecido tumoral de mama	43
3.4 - ESTABILIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa ..	46
3.5 - CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DA GPDH DE CÉLULAS HeLa	46
3.5.1 - Imunoeletroforese da GPDH de células HeLa	48
3.5.2 - Imunoeletroforese do anticorpo anti-GPDH de células HeLa	48

	3.5.3 - Imunodifusão das GPDHs de diversas fontes. Caracterização do anticorpo anti-GPDH de células HeLa	48
	3.5.4 - Imunodifusão das GPDHs de diversas fontes. Caracterização do anticorpo anti-GPDH de pato (<u>Anas sp.</u>)	52
4	DISCUSSÃO FINAL	57
5	CONCLUSÕES	62
6	BIBLIOGRAFIA	65

LISTA DE TABELAS

1	Processo de Purificação da GPDH de Células HeLa	31
2	Processo de Purificação da GPDH de Tecido Tumoral de Mama	34

LISTA DE FIGURAS

1	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Presença de SDS da Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase de Células HeLa	32
2	Atividade da GPDH de Células HeLa em Função do pH	35
3	Efeito do Arseniato Sobre a Atividade Enzimática de GPDH de Células HeLa	38
4	Efeito da Concentração de Gliceraldeído-3-fosfato Sobre a Atividade da GPDH de Células HeLa. Determinação da Constante de Michaelis-Menten	39
5	Efeito da Concentração de Gliceraldeído-3-fosfato Sobre a Atividade da GPDH de Tecido Tumoral de Mama. Determinação da Constante de Michaelis-Menten	40

6	Efeito da Concentração de NAD^+ Sobre a Atividade da GPDH de Células HeLa. Determinação da Constante de Michaelis-Menten	41
7	Efeito da Concentração de NAD^+ Sobre a Atividade da GPDH de Tecido Tumoral de Mama. Determinação da Constante de Michaelis-Menten	42
8	Efeito Inibitório do Produto da Reação, NADH, Sobre a Atividade Enzimática da GPDH de Células HeLa	44
9	Efeito Inibitório do Produto da Reação, NADH, Sobre a Atividade Enzimática da GPDH de Tecido Tumoral de Mama	45
10	Efeito Inibitório do ATP Sobre a Atividade Enzimática da GPDH de Células HeLa	47
11	Perfil Imunoelctroforético da GPDH Purificada de Células HeLa	49
12	Perfil Imunoelctroforético do Anticorpo Anti-GPDH Purificado de Células HeLa	51
13	Imunodifusão da GPDH de Diversas Fontes com Preparação de Anticorpos Anti-GPDH de Células HeLa	52
14	Imunodifusão da GPDH de Diversas Fontes com Preparação de Anticorpos Anti-GPDH de Células HeLa	53
15	Imunodifusão da GPDH de Diversas Fontes com Preparação de Anticorpos Anti-GPDH de músculo de <u>Anas sp.</u> (pato)	55
16	Imunodifusão da GPDH de Diversas Fontes com Preparação de Anticorpos Anti-GPDH de músculo de <u>Anas sp.</u> (pato)	56

LISTA DE ABREVIATURAS

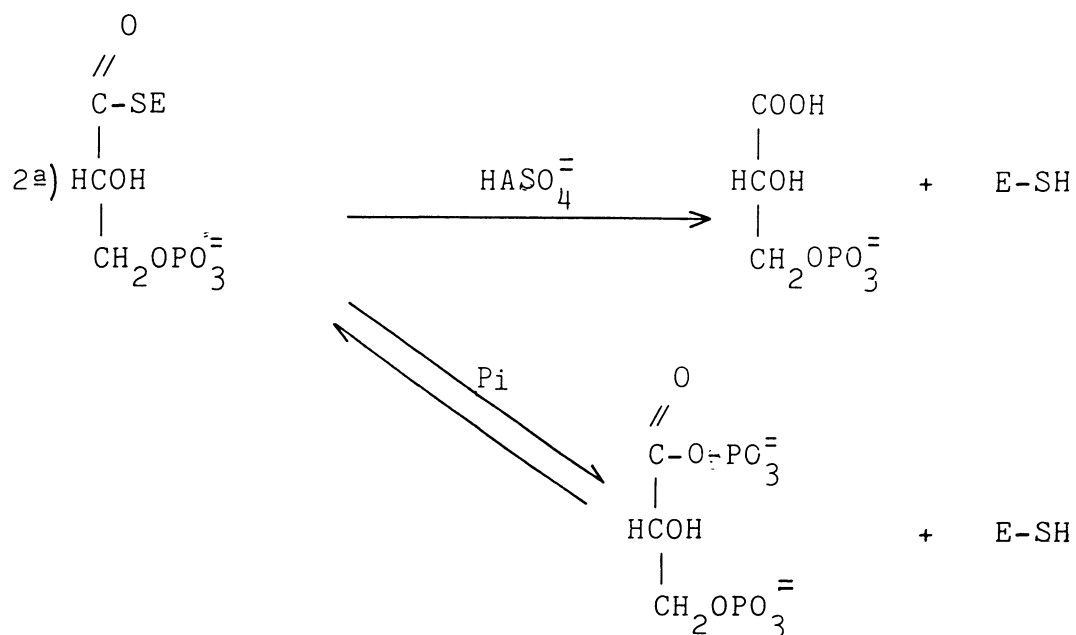
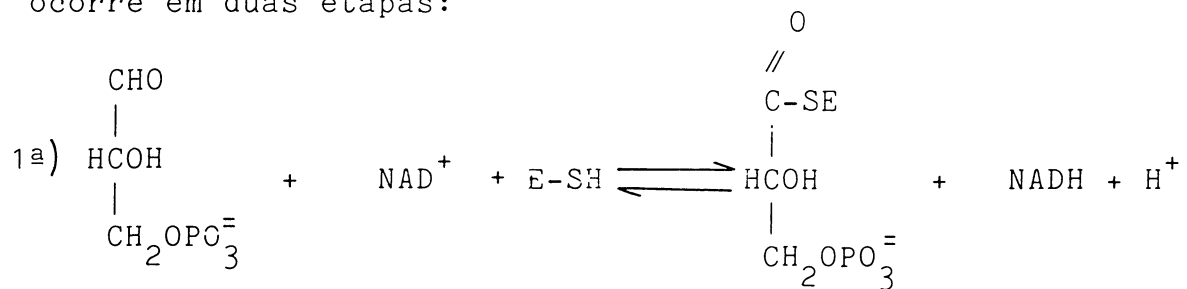
Atm	Atmosfera
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Soro albumina bovina
DEAE	Diethyl amino etil
DNA	Ácido desoxirribonuclêico
D.O.	Densidade ótica
EDTA	Etileno diaminotetracetato - sal dissódico
GPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
G3P	Gliceraldeído-3-fosfato
HASO_4^-	Arseniato
Ki	Constante de inibição
Km	Constante de Michaelis-Menten
LB	Meio de cultivo para bactéria
mA	Miliampères
NAD	β -Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	β -Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
PBS	Solução salina tamponada
SDS	Dodecil sulfato de sódio
STV	Solução tripsina-verseno
Tris	Tris-hidroximetil amino metano
YMM	Meio mineral para levedura

RESUMO

As gliceraldeído-3-fosfato desidrogenases (E.C.1.2.1.12) de fontes tumorais (células HeLa e tecido tumoral de mama) foram isoladas e purificadas, e suas propriedades cinéticas estudadas comparativamente às enzimas de outras fontes normais. As propriedades imunológicas da GPDH de células HeLa foram também estudadas. A pureza da GPDH de células HeLa foi mostrada por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, apresentando uma única banda correspondente à subunidade com PM de 36.000. O pH ótimo encontrado para ambas as enzimas foi de 8,2. Os valores de Km para a GPDH de células HeLa foram determinados para o gliceraldeído-3-fosfato e para o NAD^+ sendo em torno de $1,0 \times 10^{-4} \text{M}$ e $3,07 \times 10^{-5} \text{M}$, respectivamente. Para a GPDH de tecido tumoral de mama, os valores de Km para o gliceraldeído-3-fosfato e o NAD foram de $8,26 \times 10^{-5} \text{M}$ e $1,53 \times 10^{-5} \text{M}$, respectivamente. Foi demonstrado que o NADH é um inibidor competitivo em relação a NAD^+ , sendo o K_i de $3,25 \times 10^{-5} \text{M}$ e $5,35 \times 10^{-5} \text{M}$, respectivamente para as GPDHs de células HeLa e de tecido tumoral de mama. O ATP também foi demonstrado ser um inibidor competitivo em relação ao NAD^+ , sendo o K_i de $2,61 \times 10^{-3} \text{M}$ para a GPDH de células HeLa. A imunoeletroforese do antígeno (GPDH de células HeLa) apresentou uma única banda de precipitina com sua respectiva imunoglobulina, demonstrando a pureza de preparação da GPDH desta fonte. A imunoeletroforese do anticorpo anti-GPDH de células HeLa mostrou 3 bandas de precipitina, com o respectivo antígeno provavelmente correspondentes aos três tipos mais comuns de imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA). Quando testada frente aos anticorpos anti-GPDH de músculo de Anas sp. (pato), a GPDH de células HeLa apresentou determinantes imunologicamente idênticos aos dos antígenos de músculo de Caiman sp. (jacaré) e tumor de mama humano, mas apenas alguns determinantes antigênicos imunologicamente idênticos em relação ao antígeno de músculo de Anas sp.. Quando testada frente aos anticorpos anti-GPDH de células HeLa, a GPDH destas células apresentou os determinantes antigênicos imunologicamente idênticos aos antígenos de Caiman sp. e de tumor de mama humano. Não houve porém, formação de banda de precipitina frente ao antígeno de músculo de Anas sp., indicando que o grupo determinante correspondente provavelmente foi modificado ou perdido. As GPDHs de células HeLa e de tecido tumoral de mama humano não demonstraram diferenças físico-químicas significativas em relação às GPDHs de outras fontes já estudadas.

INTRODUÇÃO

A D-gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (D-gliceraldeído-3-fosfato : NAD oxidoreductase), E.C.1.2.1.12 é uma enzima de via glicolítica que desempenha um papel essencial no metabolismo de carboidratos. Ela catalisa a fosforilação oxidativa do gliceraldeído-3-fosfato (G3P) em 1-3-difosfoglicerato. Segundo FURFINE & VELICK, 1965, a reação ocorre em duas etapas:



Na primeira etapa da reação, o aldeído e o NAD^+ reagem estequiometricamente com a enzima dando como intermediário acil-enzima, que é desacilada na segunda etapa, pelo arseniato ou fosfato, liberando ácido carboxílico ou acil fosfato, respectivamente.

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPDH) já foi isolada de diferentes fontes como músculo de coelho (CAPUTTO & DIXON, 1945; CORI et al, 1948), levedura (KREBS et al, 1953), músculo (ELODI & SZORENYI, 1965) e fígado (DAGHER & DEAL, 1977) de porco, músculo humano, de boi, de galinha, de peru, de faisão, de esturjão, de lagosta (ALLISON & KAPLAN, 1964), bactérias (AMELUXEN, 1967; AMELUXEN et al, 1970; SUZUKI & HARRIS, 1971; SUZUKI & IMAHORI, 1973; HOCKING & HARRIS, 1973; D'ALESSIO & JOSSE, 1971; FUJITA et al, 1976; CRABB et al, 1977), algas (HOOD & CARR, 1967; KRUSTEVA et al. 1981), plantas (SCHULMAN & GIBBS, 1968; MELANDRI et al, 1970; YONUSCHOT et al, 1970; DUGGLEBBY & DENNIS, 1974; SPERANZA & GOZZER, 1970), insetos (CARLSON & BROSEMER, 1971), músculo de peixe (GREENE & FEENEY, 1970; KOLB & HARRIS, 1971), protozoários (GRISSON & KAHN, 1975), músculo de rato (NAGRADOVA, et al, 1978), eritrócitos (EBY & KIRTLEY, 1979), músculo de jacaré (VIEIRA et al, 1983) e de pato (BARBOSA & NAKANO, 1987).

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

Os métodos para a sua purificação são geralmente relacionados com sua solubilidade como complexo enzima- NAD^+ em altas concentrações de sulfato de amônio. Assim, a GPDH de músculo de vários animais pode ser obtida, com elevado grau

de pureza, à partir de extratos de músculo, submetendo-os a fracionamentos com sulfato de amônio (ALLISON & KAPLAN, 1964). Entretanto, em outros tecidos, a concentração da enzima é muito mais baixa e sua purificação requer vários passos de fracionamento (KOCHMAN & RUTTER, 1968; LAMBERT & PERHAM, 1974). Procedimentos semelhantes aos utilizados para tecidos normais foram utilizados na purificação da GPDH de tecidos tumorais (OHKUBO et al. 1986).

Em bactérias (D'ALESSIO & JOSSE, 1971; SUZUKI & HARRIS, 1971) foram desenvolvidos métodos de isolamento da enzima pelo uso de cromatografia de troca iônica. HOCKING & HARRIS, em 1973, prepararam a enzima de Thermus aquaticus por cromatografia de afinidade em NAD^+ imobilizado. Um método rápido e conveniente para isolar a GPDH de eritrócitos humanos foi desenvolvido por EBY & KIRTLEY, em 1979. Estes autores basearam-se no fato que a enzima é retida pela membrana celular do eritrócito quando submetida à hemólise hipotônica, podendo ser subsequentemente eluída com altas forças iônicas. SALLEMUDDIN & ZIMMERMANN, (1978), utilizando um método semelhante purificaram as enzimas de músculo, fígado, rim e cérebro de rato que foram eluídas da membrana celular do eritrócito com NADH 2mM. O fato de que esta classe de enzimas apresenta alto grau de homologia (HARRIS & WATERS, 1976), sugere que este procedimento pode ser usado na purificação de enzimas de outras fontes. No caso da GPDH de levedura, a afinidade pela membrana do eritrócito parece ser muito fraca para ser utilizada para a sua purificação (MC DANIEL & KIRTLEY, 1974).

As GPDHs de diversas fontes são relativamente instáveis em solução, tendendo à floculação e desnaturação espontânea em temperatura ambiente, mas podem se conservar por longo período de tempo à baixas temperaturas como suspensão

de cristais em solução de sulfato de amônio. A estabilidade da enzima pode ser afetada por vários fatores como estabilidade dos grupos sulfidrilas, presença ou ausência de metais pesados, presença ou ausência de coenzima ligado e o tipo e concentração do sal (VELICK & FURFINE, 1963).

Vários mecanismos têm sido propostos para a reação catalisada pela GPDH. SEGAL & BOYER, em 1953, postularam para a enzima um mecanismo do tipo ping-pong. Estudos cinéticos realizados por TRENTAM et al, com a enzima de porco (TRENTAM, 1968, 1971; HARRIGAN & TRENTAM, 1971) e por DUGGLEBY & DENNIS, em 1974, com a enzima de Pisum sativum dão apoio a este mecanismo.

Segundo ORSI & CLELAND, (1972), o mecanismo cinético para a GPDH de músculo de coelho é do tipo ordenado, acrescentando-se em ordem o NAD^+ , o aldeído e fosfato ou arseniato e a liberação do ácido precedendo à liberação do NADH. Estudos posteriores, realizados por WANG & ALAUPOVIC, em 1980, reforçaram o mecanismo proposto por ORSI & CLELAND.

A investigação da estrutura das proteínas pode fornecer informações acerca da estabilidade destas macromoléculas e as relações evolucionárias entre elas. A GPDH é um ótimo instrumento para investigações filogenéticas e fisiológicas devido ao fato de conservar sua composição e seqüência de aminoácidos por um longo período evolucionário. As relações filogenéticas entre os seres vivos, interpretados somente à luz de métodos convencionais, tais como a análise morfológica das espécies vivas e fósseis podem estar sujeitas a erros. Como alternativa de estudo destas relações filogenéticas, a análise estrutural de proteínas de evolução lenta ou evolução rápida, forneceu valiosos subsídios para novas interpretações e estabelecimento de novas linhas filogenéticas (GOODMAN, 1976). A GPDH pode ser considerada uma proteína de evolução

lenta, já que apresenta 68% de homologia na seqüência de aminoácidos entre seres tão distantes filogeneticamente como mamífero e levedura (HARRIS & PERHAN, 1968; JONES & HARRIS, 1972), tornando-se excelente instrumento de trabalho para este tipo de análise, já que é relativamente fácil o seu isolamento em forma pura e com grande rendimento.

Embora sejam inúmeras as informações da literatura, referentes à gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de várias fontes, são poucos os dados disponíveis para a enzima de células tumorais.

Com o objetivo de serem esclarecidas as diferenças metabólicas existentes, os perfis enzimáticos de tecidos neoplásicos têm sido exaustivamente estudados (GREENSTEIN, 1956; HERSFELD et al, 1978; SUN et al, 1981; SOHRABY et al, 1983).

Em 1986, OHKUBO et al, isolaram uma proteína de peso molecular 37.000 e ponto isoelétrico 7,6 e observaram que ela existia em quantidades relativamente maiores em tecidos tumorais de pulmão do que no órgão normal. Baseados na análise da seqüência de aminoácidos, mapeamento peptídico e ensaios imunológicos, estes autores concluíram que esta proteína era muito semelhante à GPDH de músculo de coelho, sugerindo um possível envolvimento desta enzima ou de uma outra proteína relacionada à GPDH no desenvolvimento do tumor pulmonar. Estes resultados de OHKUBO et al, estão em concordância com as demais informações da literatura, relacionadas à enzimologia de células tumorais.

Vários pesquisadores (GREENSTEIN, 1956; SHONK et al, 1965; KNOX, 1967; SUN et al, 1982), verificaram que no tecido tumoral, a atividade das enzimas da via glicolítica correspondiam aos maiores valores, e as da respiração celular aos menores valores,

quando comparada ao tecido normal do mesmo tipo histológico e do mesmo animal.

É relevante mencionar os resultados de WEBER, (1977), relacionados à atividade das enzimas da glicólise, em fígado de rato, sujeito a condições normais de proliferação (regeneração) e em hepatomas com diferentes velocidades de crescimento. No primeiro caso, não foram observadas alterações das enzimas chaves da via glicolítica, enquanto que nas condições de neoplasia, ocorre aumento gradativo (segundo a velocidade de crescimento dos tumores) da hexoquinase, fosfofrutoquinase e piruvato quinase, com diminuição dos níveis das enzimas determinantes da gluconeogênese.

Assim, o desequilíbrio no metabolismo das células cancerosas caracteriza-se por alterações qualitativas e quantitativas, manifestadas pelo aparecimento de isoenzimas que favorecem a glicólise (WEBER, 1977).

O aumento da velocidade de utilização da glucose e produção de ácido láctico pelas células neoplásicas foi verificado por vários pesquisadores (WARBURG, 1926; SINGH et al, 1974; BUSTAMANTE & PEDERSEN, 1977; PEDERSEN, 1978; BUSTAMANTE et al, 1981) e constituem um dos marcadores fenotípicos mais consistentes das células tumorais. Estas células tendem a utilizar 5 a 10 vezes mais glucose que os tecidos normais, convertendo-a em grande parte em lactato, mesmo que haja uma respiração normal (REITZER et al, 1979).

Foi sugerido por EIGENBRODT & GLOSSMAN, em 1980, que a predominância da glicólise sobre a gluconeogênese ocorre provavelmente devido ao aumento das necessidades energéticas da célula e para favorecer a produção de ribose-5-fosfato, atendendo à demanda da síntese de DNA. De fato, a alta concentração de metabólitos da via das pentoses-fosfato, de hexoses-fosfato e de trioses-fosfato nestas células sugere

um desvio do fluxo metabólico da via de Embden-Meyerhof, no sentido da síntese de ribose (EIGENBRODT & GLOSSMAN, 1980).

Existem evidências de que a parte oxidativa da via das pentoses-fosfato, onde ocorre a formação de 2 NADPH por mol de glucose, é de menor importância para a produção de ribose (EIGENBRODT & GLOSSMAN, 1980). Neste tipo de células, existe ainda a possibilidade de o ciclo operar pela parte não oxidativa, utilizando as reações de transaldolase e transcetolase, formando grandes quantidades de frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato (REITZER et al, 1979). Dois moles de frutose-6-fosfato e um mol de gliceraldeído-3-fosfato são convertidos em 3 moles de ribose-5-fosfato, sem produção de NADPH. Não há indicações para passos limitantes de velocidade para esta via. Estudos com ^{14}C marcados em várias posições da glucose indicam que 80% do total das pentoses-fosfato acumuladas em células tumorais são formadas por reações não oxidativas das pentoses-fosfato (EIGENBRODT & GLOSSMAN, 1980).

As células HeLa são freqüentemente utilizadas como modelo de célula tumoral. Estas células 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).

É importante mencionar que no metabolismo de células HeLa, apenas 5% da glucose metabolizada durante seu crescimento é oxidada pelo ciclo de Krebs (REITZER et al, 1979). Também há observações de que a glutamina representa o principal combustível para as reações deste ciclo (REITZER et al., 1979), indicando que a função primordial de glicólise, nestas células, é garantir o suprimento de metabólitos para a via das pentoses-fosfato. Altas concentrações de 5-

fosforibose-1-pirofosfato e outros metabólitos desta via são encontrados em células HeLa, indicando a eficiência da conversão de glucose para precursores da biossíntese de ácidos nucleicos.

Muito pouco se sabe sobre as propriedades da GPDH em células HeLa e estudos cinéticos referentes à enzima de células cultivadas não foram encontrados na literatura. Dada a relevância desta enzima no metabolismo de carboidratos, tanto de células normais quanto de células tumorais, planejamos seu estudo em células HeLa.

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

Sabendo-se que a GPDH pode ser utilizada na análise das relações filogenéticas e devido à sua importância no metabolismo de carboidratos de células normais e de células tumorais, os objetivos do presente trabalho são:

1. a obtenção da GPDH de células HeLa em forma homogênea e pura;
2. o estudo de algumas propriedades cinéticas desta enzima;
3. a verificação da identidade imunológica entre a GPDH de células HeLa e as GPDHs de outras fontes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 REAGENTES

Bicarbonato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, fosfato de sódio, tioglicolato de sódio e caldo Casoy foram obtidos da Merck.

Meio essencial mínimo de Eagle foi obtido dos laboratórios Flow.

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

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

Foram obtidos da Sigma Chemical Co. G3P, NAD, NADH, DEAE-Sephadex A-50 e agarose.

Todos os outros produtos utilizados foram de grau analítico.

2.2 FONTES DA ENZIMA

Células das seguintes procedências foram utilizadas como fontes de enzima:

2.2.1 Células Tumorais

- Células de Linhagem HeLa

Estas células são derivadas de carcinoma de cérvix humano e apresentam aparência epitelial. São procedentes da American Type Collection e foram enviadas para este laboratório à passagem nº 30, pela Seção de Cultivo Celular do Instituto Adolfo Lutz, SP.

- Tecido tumoral de mama

O tecido tumoral usado foi do tipo histológico carcinoma infiltrante, com metástases em linfonodos axilares, estadio clínico III-A, colhido e gentilmente cedido pelo Departamento de Cirurgia do Hospital Erasto Gaertner, sendo transportado em gelo e mantido em nitrogênio líquido até a hora do uso.

2.2.2 Células Normais

- Tecido muscular

Neste trabalho foi utilizado tecido muscular proveniente de coelho (Oryctolagus sp.). As enzimas de outras fontes musculares, jacaré (Caiman sp.) e pato (Anas sp.) já se encontravam purificadas no Laboratório de Enzimologia.

2.2.3 Microrganismos

- Bactéria

Neste trabalho foi utilizada a E. coli, cepa PRK 2013.

- Levedura

A levedura utilizada foi a S. cereviseae, cepa 87L.

2.3 CULTIVO CELULAR

2.3.1 Células HeLa

As células HeLa foram cultivadas no laboratório de Cultivo Celular do TECPAR-PR, e no laboratório de Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica da UFPR. Todas as operações de cultivo foram realizadas em fluxo laminar horizontal.

- a) Materiais de vidro e acessórios:

Todo o 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 20 minutos, e depois secas em estufa a 70°C por 20 minutos.

b) Soluções e meio de cultura:

todas as soluções envolvidas no cultivo de células HeLa foram preparadas com água bidestilada.

- Solução de bicarbonato de sódio:

a solução de bicarbonato de sódio foi preparada na concentração de 7,5% (p/v) e distribuída em tubos, num volume de 10ml. Após esterilização em autoclave a 120°C e 1 atm de pressão por 20 minutos, a solução foi mantida à temperatura ambiente.

- Solução salina tamponada (PBS):

a solução salina tamponada pH 7,4 foi preparada rotineiramente na forma de estoque 5 vezes concentrado, sendo constituído de Na₂HPO₄ anidro 40,5 mM, NaCl 680 mM e KH₂PO₄ 7,3mM. Esta solução foi autoclavada a 120°C, 1 atm de pressão por 20 minutos e mantida a 4°C. Na hora do uso, foi feita diluição com água bidestilada estéril.

- Solução de tripsina-verseno (STV):

esta solução, cuja finalidade é descolar as células do frasco de cultura, é constituída de tripsina 0,05%, verseno 0,46 mM, NaCl 136,9 mM, KCl 5,36mM, dextrose 5,55mM, NaHCO₃ 5,95mM e 0,45 mg% de vermelho de fenol a 1%.

A solução de tripsina-verseno pH 7,8 foi esterilizada por filtração, sendo usados filtros marca Millipore e membranas de 0,22µm e guardadas a -20°C.

- Meio de cultura:

o meio de cultura usado foi o meio essencial mínimo de Eagle (PAUL, 1973). Após a reconstituição em água

bidestilada, o meio foi esterilizado por filtração em membranas de acetato de celulose de 142 mm de diâmetro, com poros de 0,22 µm, em aparelho marca Sartorius (Carl Zeiss do Brasil).

Todas as soluções estéreis foram submetidas a testes de esterilidade, colocando-se amostras do meio a ser usado em estufa a 37°C, por um período mínimo de 15 dias, além de testes de esterilidade em meios tioglicolato Brewer, caldo caseína soja tripticase (caldo Casoy) e Sabouraud dextrose. Os testes de esterilidade para micoplasma feitos segundo o método de Dienes (RIZZO et al s.d.), foram realizados gentilmente pela Dra. Ema Chandelier, do TECPAR.

2.3.1.1 Repique e Coleta de Células HeLa

As células HeLa foram cultivadas em meio essencial mínimo de Eagle, contendo glutamina e suplementado com soro fetal bovino (10% v/v) e bicarbonato de sódio em quantidade suficiente para acertar o pH em 7,4. As células HeLa desenvolvem-se em forma de monocamada, sendo utilizadas garrafas de Roux e frascos menores para o seu crescimento.

O repique foi feito por tripsinização, usando-se a solução de STV. Após o descolamento das monocamadas, as células foram ressemeadas a uma concentração aproximada de $2,0 \times 10^6$ células por garrafa de Roux, contendo 100 ml de meio. As culturas foram deixadas crescer à temperatura de 37°C e repicadas semanalmente. As monocamadas foram observadas em microscópio invertido, marca Olympus, modelo CKC, pertencente ao Tecpar.

Estas culturas eram confluentes com 72 a 96 horas de crescimento. Neste trabalho foram utilizadas culturas de 72 horas.

A coleta das células foi feita por tripsinização com STV. Após a tripsinização, as células foram ressuspensas em solução de PBS contendo 25 mg% e BSA (soro albumina bovina). O descolamento das células foi feito com auxílio de pipeta equipada com pera. A suspensão de células descoladas foi recolhida e centrifugada em centrífuga clínica a baixa rotação por aproximadamente 1 minuto. As células foram lavadas por 3 vezes, sendo que após a última centrifugação, foram ressuspensas em pequeno volume de PBS, contendo 1 mM de mercaptoetanol e 1mM de EDTA, sendo mantidas em nitrogênio líquido até o momento do uso.

2.3.1.2 Contagem e Determinação da Viabilidade Celular

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

A viabilidade celular foi determinada usando-se o corante vital azul de tripan (PHILLIPS, 1973). A solução de azul de tripan foi preparada a 0,4% (p/v) em solução salina constituída de KH_2PO_4 5mM, NaCl 140mM e 25 mg% de ácido benzóico como preservativo. O pH foi ajustado para 7,4. Para cada ml de suspensão celular foi usado 0,1 ml da solução corante. A porcentagem de células viáveis foi calculada usando-se a relação:

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

sendo que as preparações apresentaram 95% de viabilidade por este método.

2.4 MICRORGANISMOS

2.4.1 Bactéria (E. coli)

O meio de cultura empregado para o crescimento da bactéria foi o meio LB, preparado conforme MANIATIS et al, (1982). O pré-inóculo foi obtido adicionando-se a 10 ml do meio LB, 10 µl de uma suspensão de E. coli PRK 2013 em glicerol a 50%. Este frasco foi mantido sob agitação em estufa a 28-30°C por aproximadamente 12 horas. Após o aparecimento de turvação, 20 µl deste pré-inóculo foram transferidos para volume adequado (200 ml) de meio LB e mantidos nas mesmas condições anteriores.

2.4.2 Levedura (S. cerevisiae)

O meio de cultura usado para o crescimento de levedura foi o meio YMM, contendo glucose a 1% e preparado conforme GANCEDO et al, (1965). O pré-inóculo foi obtido adicionando-se ao meio YMM contendo glucose 1%, 10 µl de uma suspensão de S. cerevisiae 87 L em glicerol a 50%. Este frasco foi mantido sob agitação em estufa a 28-30°C por aproximadamente 24 horas. Após o aparecimento de turvação 20 µl deste pré-inóculo foram transferidos para volume adequado (200 ml) do meio YMM contendo glucose 1% e mantidos nas mesmas condições anteriores.

2.5 PURIFICAÇÃO DA GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE (E.C.1.2.1.12)

As GPDHs de células HeLa e tumor de mama, foram purificadas até a homogeneidade e as enzimas obtidas dos microrganismos foram parcialmente purificadas.

2.5.1 Células HeLa

2.5.1.1 Obtenção do Extrato Bruto

Para a obtenção do extrato bruto, $2,0 \times 10^8$ células foram descongeladas à temperatura ambiente e ressuspensas em 13,5 ml de solução salina tamponada, pH 7,4, gelada, contendo 2-mercaptoetanol 1mM e então rompidas em homogeneizador Van Potter Elvehjem, em banho de gelo. Esta suspensão de células foi centrifugada a $10\ 000 \times g$ a 4°C por 15 minutos. O extrato bruto (13,0 ml) assim obtido continha 8,5 mg de proteína/ml.

2.5.1.2 Fracionamento com Sulfato de Amônio

A GPDH de células HeLa foi purificada segundo o método de OHKUBO et al, (1986). Todas as operações foram efetuadas entre $0-4^{\circ}\text{C}$. O fracionamento foi feito adicionando-se vagarosamente sulfato de amônio sólido ao extrato bruto (13 ml) anteriormente obtido até que fosse obtida uma saturação de 60%. Após 30 minutos em agitação, o precipitado foi removido por centrifugação e desprezado. A solução sobrenadante (12,5 ml) foi tratada com sulfato de amônio sólido até alcançar uma saturação de 90%. Após 30 minutos em agitação, o material foi centrifugado e o precipitado ressuspenso em pequena quantidade (1,0 ml) de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2 contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM. A solução de enzima foi dialisada 12 horas contra o mesmo tampão. Em todas as etapas foram retiradas alíquotas para testes enzimáticos e dosagem de proteínas.

2.5.1.3 Cromatografia em DEAE-Sephadex A-50

1,25 Ml da fração dialisada de GPDH de células HeLa com uma concentração de proteínas de 6,3 mg/ml foi submetida a uma cromatografia em DEAE-Sephadex A-50 em coluna de vidro medindo 2,3cm x 10,0cm.

A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2 contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM. A enzima foi eluída com o mesmo tampão e a um fluxo de 30 ml/hora. Frações de 5 ml/tubo foram coletadas em um coletor de frações refrigerado. Cada fração foi analisada quanto à atividade enzimática (DAGHER & DEAL Jr., 1977) e à concentração de proteínas (WARBURG & CHRISTIAN, 1941). A GPDH não é retida nesta coluna e foi eluída imediatamente após o volume morto. As frações de maior atividade foram reunidas e concentradas por ultrafiltração sob pressão de argônio (5 kg/cm²) em células Amicon dotadas de membranas Diaflo PM 10. A GPDH assim obtida mostrou-se eletroforéticamente homogênea e foi usada para experimentos cinéticos e imunológicos.

2.5.2 Tecido Tumoral de Mama

2.5.2.1 Obtenção do Extrato Bruto

O tumor de mama (10 g de massa tumoral) foi descongelado à temperatura ambiente, isento de suas áreas necróticas, finamente picado com tesoura e passado por 15 vezes no homogeneizador de Van Potter Elvehjem, em banho de gelo. Essa preparação foi suspensa em quantidade suficiente de PBS gelada, pH 7,4, contendo 2-mercaptoetanol 1mM. Em seguida foi centrifugada a 10 000 x g por 30 minutos e a 4°C e filtrada através de funil e lã de vidro visando a retirada

de gorduras do sobrenadante. O extrato bruto (25,5 ml) assim obtido continha 3,72 mg de proteínas/ml

2.5.2.2 Fracionamento com Sulfato de Amônio

A GPDH de tecido tumoral de mama foi purificado segundo o método de OHKUBO et al, (1986). Todas as operações foram realizadas entre 0-4°C. O fracionamento foi feito adicionando-se sulfato de amônio sólido ao extrato bruto obtido (25,5 ml) vagarosamente e com agitação constante, até que fosse alcançada uma saturação de 60%. Após 30 minutos em agitação, o precipitado foi removido por centrifugação a 10 000 x g por 30 minutos, a 4°C e desprezado. A solução sobrenadante (30 ml) foi tratada com sulfato de amônio até alcançar uma saturação de 90%. Após 30 minutos em agitação, o material foi centrifugado nas mesmas condições e o precipitado ressuspenso em pequena quantidade (2,0 ml) de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2 contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM e dialisado por 12 horas contra o mesmo tampão. Em todas as etapas foram retiradas alíquotas para testes enzimáticos e dosagem de proteínas.

2.5.2.3 Cromatografia em DEAE-Sephadex A-50

A fração dialisada de tecido tumoral de mama (2,0 ml), com uma concentração de proteínas de 6,1 mg/ml foi submetida a uma cromatografia em DEAE-Sephadex A-50 em coluna de vidro medindo 2,3 cm x 22,0 cm. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,2 contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM. A enzima foi eluída com o mesmo tampão e a um fluxo de 30 ml/hora. Frações de 6 ml/tubo foram coletadas em coletor de frações refrigerado. As frações de maior atividade foram reunidas e concentradas por ultrafiltração sob pressão de

argônio (5 kg/cm²) em células Amicon dotadas de membrana Diaflo PM 10. A GPDH mostrou-se eletroforéticamente homogênea e foi usada para experimentos cinéticos e imunológicos.

2.5.3 Bactéria (E. coli)

2.5.3.1 Obtenção do Extrato Bruto

O meio cultivo de bactéria foi centrifugado a 7 000 x g por 15 minutos a 4°C. Ao precipitado foi adicionado quantidade proporcional de alumina, equivalente a duas vezes o peso do precipitado obtido através da centrifugação e triturado vigorosamente em gral previamente gelado. Essa trituração foi repetida por 3 vezes e ressuspensa em 4,5 ml de tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,2, contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM e centrifugada a 10 000 x g por 15 minutos a 4°C. O extrato bruto (6 ml) assim obtido continha : 8,5 mg de proteínas/ml.

2.5.3.2 Fracionamento com Sulfato de Amônio

Todas as operações do fracionamento com sulfato de amônio foram realizadas entre 0-4°C. Este sal foi adicionado vagarosamente ao extrato bruto anteriormente obtido (6 ml) até que fosse alcançada uma saturação de 60%. Após 30 minutos em agitação constante, o precipitado foi removido por centrifugação e desprezado. A solução sobrenadante (5,9 ml) foi tratada com sulfato de amônio até alcançar uma saturação de 90%. Após 30 minutos em agitação constante, o material foi centrifugado e o precipitado ressuspensa em pequena quantidade (0,5 ml) de tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,2, contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM e dialisado por 12 horas

contra o mesmo tampão. A preparação parcialmente purificada continha 4,5 mg de proteínas/ml e foi utilizada em testes imunológicos.

2.5.4 Levedura (*S. cerevisiae*)

2.5.4.1 Obtenção do Extrato Bruto

O meio de cultivo de levedura foi centrifugado a 7 000 x g por 15 minutos a 4°C. As células assim obtidas foram tratadas com quantidade proporcional de alumina, equivalente a 2 vezes o peso do precipitado obtido através da centrifugação e triturado vigorosamente em gral previamente gelado. Essa trituração foi repetida por 3 vezes e ressuspensa em 3,5 ml de tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,2, contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM e centrifugada a 10 000 x g por 15 minutos, a 4°C. O extrato bruto (4 ml) assim obtido continha 12,0 mg de proteínas/ml.

2.5.4.2 Fracionamento com Sulfato de Amônio

Todas as operações do fracionamento foram realizadas entre 0-4°C. Ao extrato bruto (4 ml) foi adicionado, vagarosamente, sulfato de amônio até que fosse alcançada uma saturação de 60%. Após 30 minutos em agitação constante, o precipitado foi removido por centrifugação e desprezado. A solução sobrenadante (4,0 ml) foi tratada com sulfato de amônio até alcançar uma saturação de 90%. Após 30 minutos sob agitação constante, o material foi centrifugado e o precipitado ressuspensa em pequena quantidade (0,5 ml) de tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,2, contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM e dialisado por 12 horas contra o mesmo

tampão. A preparação parcialmente purificada continha 8,87 mg de proteínas/ml e foi utilizada em testes imunológicos.

2.5.5 Músculo de Coelho

2.5.5.1 Obtenção do Extrato Bruto

Para a obtenção da enzima de músculo de coelho foi utilizado um macho, com 3 meses de idade. O animal, deixado em jejum durante a noite, foi morto após anestesia com clorofórmio. Em seguida, foi retirado seu pêlo, desossado e o músculo, separado de nervos e gorduras, foi mantido em gelo e passado por moedor de carne elétrico. A enzima foi extraída adicionando-se ao músculo moído (720 ml de carne), o dobro do volume de KOH 0,03N, contendo 2-mercaptoetanol (1440 ml). A mistura permaneceu em repouso por 25 minutos e em seguida foi filtrada através de gaze. O volume do extrato bruto assim obtido foi de 1460 ml e continha 12,8 mg de proteínas/ml.

2.5.5.2 Fracionamento com Sulfato de Amônio

A GPDH de músculo de coelho foi purificada segundo o método de Cori modificado (CORI et al, 1948). Todas as operações foram realizadas entre 0-4°C. O fracionamento foi feito adicionando-se vagarosamente sulfato de amônio sólido ao extrato bruto anteriormente obtido (1460 ml), com agitação constante, até que uma saturação de 52% fosse alcançada. Após 30 minutos sob agitação constante, o precipitado foi removido por centrifugação a 7 000 x g por 30 minutos e desprezado. A solução sobrenadante (1500 ml) foi tratada com sulfato de amônio até alcançar a saturação de 72%. Após 30 minutos sob agitação constante, o material foi centrifugado nas mesmas

condições e ao sobrenadante (pH 6,5) foi acrescentado NH_4OH , gota a gota, até atingir pH 8,4 e deixado em repouso por 60 horas em câmara fria, para a precipitação da enzima. Após este tempo, a solução foi centrifugada e o precipitado obtido foi ressuspenso em 40 ml de tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,2, contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM. A solução de enzima foi dialisada por 12 horas contra o mesmo tampão e em todas as etapas foram retiradas alíquotas para testes enzimáticos e dosagem de proteínas.

2.5.5.3 Cromatografia em DEAE-Sephadex A-50

A fração dialisada de GPDH de coelho (85 ml) com uma concentração de proteínas de 13 mg/ml foi submetida a uma cromatografia em DEAE-Sephadex A-50 em coluna de vidro medindo 5,0 cm x 47 cm. A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,2, contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM. A enzima foi eluída com o mesmo tampão a um fluxo de 60 ml/hora. Frações de 9,5 ml/tubo foram coletadas em coletor de frações refrigerado. As frações mais ativas da preparação de músculo de coelho foram reunidas e dialisadas por 72 horas contra uma solução saturada de sulfato de amônio, pH 8,4, contendo 2-mercaptoetanol 1mM. Na hora do uso, alíquotas desta preparação eram retiradas e dialisadas contra tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,2, contendo EDTA 1mM 2-mercaptoetanol 1mM.

2.5.6 Músculo de Jacaré (Caiman sp.) e Pato (Anas sp.)

As enzimas de jacaré (Caiman sp.) e pato (Anas sp.) encontravam-se disponíveis em nosso laboratório em forma homogênea e pura. A cada experimento as enzimas eram

dialisadas por 12 horas contra tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,2, contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM.

2.6 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS

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

2.7 DOSAGEM DE PROTEÍNA

A proteína foi estimada pelo método de WARBURG & CHRISTIAN, (1941), e também pelo método de Lowry (LOWRY et al, 1951), usando-se soro albumina bovina como padrão.

2.8 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

2.8.1 Preparo e Determinação da Concentração do Substrato

A solução de D-L gliceraldeído-3-fosfato foi preparada a partir do sal de bário. Este foi dissolvido com vigorosa agitação em água deionizada contendo uma suspensão de DOWEX 50 W 4 (Sigma), resina catiônica, na proporção de 1,5 mg de

DOWEX para 100 mg do substrato. A solução foi aquecida em banho fervente por 3 minutos, resfriada em banho de gelo e filtrada através de Millipore. Na hora do uso, o pH da solução, que era de aproximadamente 2,0 foi acertado para 7,0 com uma solução de KOH a 15%.

A concentração do D-gliceraldeído-3-fosfato foi determinada enzimaticamente em presença de excesso de NAD^+ , arseniato de sódio e GPDH, de acordo com o método de FURFINE & VELICK, (1963). A mistura de incubação continha tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,2, contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM, arseniato de sódio 50 mM, NAD^+ 1mM, enzima em excesso e 3 a 5 μl da solução de D-L gliceraldeído-3-fosfato a ser testada, num volume final de 1ml. O tubo branco continha todos os componentes acima, exceto o G3P, o qual foi substituído por igual volume de tampão.

Zerado o espectrofotômetro, a reação foi iniciada pela adição de G3P na segunda cubeta. O progresso da reação foi seguido a 340 nm e depois da reação ser completada, calculou-se a variação da D.O. entre as absorbâncias inicial e final. A concentração de G3P foi expressa em função de seu isômero ativo e calculado de acordo com a equação:

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

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

2.8.2 Determinações da Concentração de NAD^+ e NADH

A concentração do NAD^+ foi determinada espectrofotometricamente através da absorbância a 260 nm.

Para o cálculo da concentração foi utilizada a média de duas determinações do componente a ser testado. A concentração do NAD^+ foi calculada usando-se o coeficiente de extinção molar de $17600 \text{ m}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Sigma Chemical Co. s.d.) de acordo com a seguinte equação:

$$\text{NAD mM} = \frac{\text{D.O.}_{260\text{nm}} \times 17,6 \times \text{volume total}}{\text{volume de amostra}}$$

A concentração de NADH foi determinada espectrofotometricamente pela medida da absorbância a 340 nm, do mesmo modo que para o NAD, usando-se um coeficiente de extinção molar de $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (HORECKER & KORNBERG 1948).

2.8.3 Determinação da Atividade da GPDH

A atividade enzimática foi medida espectrofotometricamente a 25°C , segundo método de DAGHER & DEAL (1977), seguindo-se a redução do NAD^+ , a 340 nm, nos primeiros 15 segundos. O espectrofotômetro usado foi o Varian Techtron modelo 635-D, sistema de incubação, em volume final de 1 ml, continha tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,2, contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM, arseniato de sódio 50 mM, NAD^+ 1mM, gliceraldeído-3-fosfato 1mM e quantidades variáveis de proteína. A reação foi iniciada pela adição do substrato, já que o gliceraldeído-3-fosfato é instável em soluções aquosas, decompondo-se com o tempo (DEAL Jr., 1969; DAGHER & DEAL Jr., 1977).

Uma unidade de enzima foi considerada como sendo a quantidade de enzima capaz de reduzir um μmol de NAD^+ por minuto, a 25°C . A atividade específica foi expressa como unidade de enzima por miligrama de proteína.

2.9 CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DA GPDH

2.9.1 Obtenção de Anticorpos Anti-GPDH de Células HeLa e de Pato (Anas sp.)

Os anticorpos anti-GPDH de células HeLa e de músculo de pato foram preparados através de inoculações via subcutânea de emulsões preparadas com as enzimas purificadas e o adjuvante completo de Freund, em dois coelhos albinos machos, da raça New Zealand, com mais ou menos 3 meses de idade. Cada coelho recebeu 1mg do respectivo antígeno purificado, subdivididos em 3 doses com intervalo de 15 dias. Antes de receberem a primeira dose de antígeno, os coelhos foram submetidos à punção cardíaca coletando-se 5 ml de sangue de cada animal. O sangue foi incubado a 37°C por 30 minutos e em seguida a 4°C por 12 horas. O soro foi separado, centrifugado a 5 000 x g e o sobrenadante aliquoteado e congelado a -20°C.

A formação de anticorpos foi acompanhada semanalmente após a segunda dose, pelo método de imunodifusão de Ouchterlony (OUCHTERLONY & NILSSON 1978), empregando-se diluições das enzimas purificadas. Os anticorpos foram retirados através do sangramento da veia marginal da orelha dos coelhos. Após coagulação e retração do coágulo, o soro foi separado e utilizado na imunodifusão, sem nenhum tratamento prévio.

Após 45 dias da primeira dose, os coelhos foram submetidos à punção cardíaca para retirada da maior quantidade possível de sangue (em torno de 150 ml), que foi deixado a 37°C por 30 minutos. Os soros obtidos pela retração dos coágulos foram centrifugados a 5 000 x g por 15 minutos e mantidos a -20°C.

2.9.2 Purificação dos Anticorpos Anti-GPDH

Os sobrenadantes dos soros anteriormente obtidos (38 ml e 27 ml de soro, respectivamente para Anas sp. e células HeLa) foram submetidos ao fracionamento com sulfato de amônio. As proteínas precipitadas entre 0-45% de saturação, em banho de gelo, foram ressuspensas em pequeno volume de água destilada e dialisadas contra a mesma solução, a 4°C, por 24 horas, com agitação. As proteínas precipitadas foram eliminadas por centrifugação a 10 000 x g por 10 minutos e os sobrenadantes foram dialisados contra tampão fosfato 50 mM, pH 6,8 a 4°C, por 48 horas, com agitação. Com os dialisados foram feitos "batchs" com DEAE-celulose equilibrada com tampão fosfato 50 mM pH 6,8, em banho de gelo. Este material foi filtrado à vácuo e o filtrado coletado e concentrado através da adição de sulfato de amônio 45%. Após 20 minutos de agitação, as preparações foram centrifugadas a 10 000 x g por 10 minutos, a 4°C.

Os precipitados foram ressuspensos em pequenos volumes de tampão fosfato 50mM, pH 6,8 e dialisados durante a noite contra o mesmo tampão. Estas soluções contendo as gama-globulinas foram distribuídas em alíquotas de 0,5 ml e congeladas a -20°C. A preparação de anticorpos anti-GPDH de músculo de pato e de células HeLa assim obtidas continham 5,2 mg proteínas/ml (3,8 ml) e 14,9 mg proteínas/ml (3,8 ml), respectivamente.

2.9.3 Imunodifusão

Para a imunodifusão foram utilizadas placas de vidro medindo 5,0 cm x 8,0 cm. Sobre elas, foram vertidos em torno de 15 ml de uma solução de agarose a 1%, fundida em tampão barbital/HCl 25 mM, pH 8,6. Uma vez solidificadas as camadas

de gel, foram feitos os orifícios. A imunodifusão foi realizada de acordo com o método de OUCHTERLONY & NILSSON (1978), colocando-se no orifício central da primeira placa, uma solução de gama-globulina anti-GPDH de músculo de pato (Anas sp.). Nos orifícios periféricos foram aplicadas preparações enzimáticas de diferentes fontes (S. cerevisiae, E. coli, jacaré, pato, tumor da mama, células HeLa e coelho).

A placa de imunodifusão foi colocada em câmara úmida saturada com toluol e mantida à temperatura ambiente por 48 horas. Após este tempo, a placa foi lavada três vezes com solução de NaCl 0,9% por 72 horas, com agitação e em seguida com água destilada, duas vezes, por 48 horas, com agitação. Após estas lavagens, as bandas de precipitina foram coradas mergulhando as placas durante aproximadamente 2 horas em uma solução contendo 475 ml de metanol a 50% (v/v), 46 ml de ácido acético glacial, 1,25g de Comassie Brilliant Blue G. Para a visualização das bandas, as placas foram descoradas através de trocas seguidas do descolorante composto de 5% de metanol, 7,5% ml de ácido acético glacial para 1 litro de água.

2.9.4 Imunoeletroforese do Antígeno e do Anticorpo de Células HeLa

Para a imunoeletroforese foram utilizadas placas de vidro medindo 5,0 cm x 10,0 cm. Sobre elas, foram vertidos volumes de aproximadamente 20 ml de uma solução de agarose a 1%, fundida em tampão barbital/HCl 25 mM, pH 8,6. Uma vez solidificadas as camadas de gel, foram feitos os orifícios.

A imunoeletroforese foi realizada segundo o método de HUDSON & HAY (1976). No orifício A da primeira placa de imunoeletroforese foram adicionados 60 µl de uma solução

purificada de GPDH de células HeLa (5,75 U/ml) e 5 μ l de azul de bromofenol. No orifício A da segunda placa foram adicionados 60 μ l uma solução de gama-globulina purificada anti-GPDH de células HeLa (14,9 mg/ml de proteína) e 5 μ l de azul de bromofenol. Para o desenvolvimento das imunoeletroforeses, utilizou-se tampão barbital/HCl 25 mM, pH 8,6. Cada placa de ágar-gel foi submetida a uma intensidade de corrente elétrica de 15mA por placa, à temperatura ambiente, por 3 horas e meia, tempo suficiente para a migração do azul de bromofenol. Ao fim deste tempo, a eletroforese foi interrompida, e com auxílio de lâmina cortante, preparou-se uma canaleta. À canaleta da primeira placa foi adicionado 0,6 ml da solução de gama-globulina anti-GPDH de células HeLa e à canaleta da segunda placa foi adicionado igual quantidade da preparação enzimática purificada de GPDH de células HeLa e deixadas para difusão por 48 horas, em câmara úmida saturada com toluol, à temperatura ambiente. Após este tempo, as placas foram lavadas, coradas e descoradas conforme procedimento descrito no ítem 2.9.3 de Materiais e Métodos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O isolamento e o estudo da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de fontes tumorais é importante, uma vez que há poucos trabalhos relatados na literatura sobre esta enzima, que participa de uma via metabólica "chave" para células tumorais, a via glicolítica.

A atividade enzimática da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase pode ser ensaiada de várias formas. É necessário a uma enzima de cinética rápida, facilmente reversível e que sofre inibição pelos produtos (DUGGLEBBY & DENNIS, 1974), a adoção de um método que contorne estas propriedades e que facilite a medida da velocidade inicial. O método utilizado neste trabalho para a medida da atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de todas as fontes foi o arsenolítico. O uso do arseniato, em lugar do fosfato (FERDINAND, 1964) resulta na rápida formação do 1-arseno-3-fosfoglicerato, que não é enzimaticamente hidrolisado a 3-fosfoglicerato. Este método evita a reversibilidade da reação e a inibição por 1-3 difosfoglicerato, sendo considerado um método sensível para a análise de estudos cinéticos (DAGHER & DEAL, 1977; BYERS et al, 1979).

Os experimentos cujos resultados são descritos a seguir, foram feitos com a finalidade de purificar e caracterizar a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de células HeLa, e compará-la com as enzimas isoladas de outras fontes, normais e tumorais.

3.1 PURIFICAÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa

A TABELA I apresenta as etapas de purificação da GPDH de células HeLa. A enzima foi purificada por dois fracionamentos sucessivos com sulfato de amônio. A última etapa, que corresponde a uma saturação de 90%, forneceu a enzima. É importante notar que todas as outras GPDHs homogêneas relatadas, têm sido purificadas a partir de precipitados obtidos com uma saturação acima de 50% de sulfato de amônio, algumas, acima de 70%. (VELTRI et al, 1977; VIEIRA et al, 1983; OHKUBO et al, 1986; BARBOSA & NAKANO, 1987). Esta observação sugere similaridades entre as várias GPDHs estudadas.

A GPDH de células HeLa apresentou-se, nos extratos brutos, com atividade específica de 0,4 U/mg de proteína. Após a etapa de cromatografia em DEAE-Sephadex A-50, a atividade específica era de 32 U/mg, ou seja, uma purificação de 80 vezes. O rendimento alcançado foi de 38,5%.

A FIGURA I, mostra o perfil eletroforético em presença de SDS da preparação após a última etapa de purificação. Foi observada uma única banda correspondente à subunidades com PM de 36.000. Por este critério, pode-se observar que a enzima assim obtida, era homogênea e pura.

3.2 PURIFICAÇÃO DA GPDH DE TECIDO TUMORAL DE MAMA

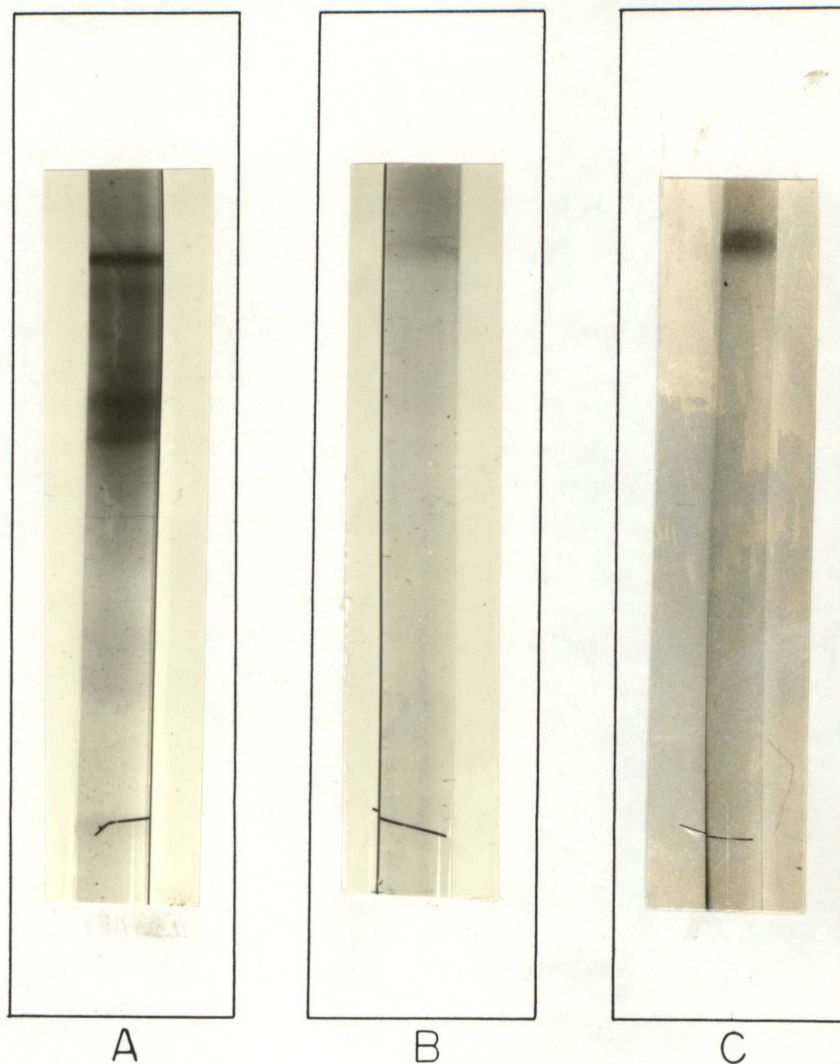
As etapas de purificação da GPDH de células HeLa foram adotadas também para a obtenção da enzima de tecido tumoral de mama. Os resultados estão apresentados na TABELA II.

Pode-se observar que a enzima, nos extratos brutos, apresentou-se com atividade específica de 0,4 U/mg. Após a etapa de cromatografia em DEAE-Sephadex A-50, a atividade específica foi de 24,0 U/mg, sendo purificada em torno de 60,0 vezes com um rendimento final de 34,7%.

TABELA 1 - PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA GPDH DE CÉLULAS HeLa

FRAÇÃO	VOLUME (ml)	ATIVIDADE (U/ml)	UNIDADE TOTAL	PROTEÍNA (mg/ml)	PROTEÍNA TOTAL (mg)	ATIVIDADE ESPECÍFICA (U/mg)	RENDI MENTO (%)	PURIFI CAÇÃO
EXTRATO BRUTO	13,0	3,2	41,6	8,5	110,5	0,4	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ pp.90%	1,25	13,5	16,9	6,3	7,9	2,1	40,6	5,3
CROMATOGRAFIA DEAE-SEPHADEX A-50	5	3,2	16	0,1	0,5	32	38,5	80

FIGURA 1 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA EM PRESENÇA DE SDS DA GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE DE CÉLULAS HeLa.



A eletroforese em gel, na concentração de 10% de poliacrilamida, contendo 0,1% de SDS foi realizada de acordo com o método descrito por WEBER & OSBORN, (1969), sendo aplicada amostra contendo 50 μ g de proteína.

A. Extrato bruto de células HeLa.

B. Fração purificada de células HeLa.

C. GPDH purificada de músculo de pato (Anas sp.) utilizada como padrão.

TABELA 2 - PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA GPDH DE TECIDO TUMORAL DE MAMA

FRAÇÃO	VOLUME (ml)	ATIVIDADE (U/ml)	UNIDADES TOTAIS	PROTEÍNA (mg/ml)	PROTEÍNAS TOTAIS (mg)	ATIVIDADE ESPECÍFICA (U/mg)	RENDI MENTO (%)	PURIFI CAÇÃO
EXTRATO BRUTO	25,5	1,6	40,3	3,7	94,4	0,4	100	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ ppt . 90%	2,0	7,5	15,0	6,1	12,2	1,2	36,8	3,0
CROMATOGRAFIA DEAE-SEPHADEX A-50	6	2,4	14,4	0,1	0,6	24,0	35,3	60,0

Os valores de atividade específica da GPDH para células tumorais (HeLa e mama) são semelhantes àquele relatado por OHKUBO et al, (1986) que obteve 31 U/mg para a enzima purificada de tecido tumoral de pulmão. Entretanto, estes valores são relativamente baixos quando comparados com preparações enzimáticas obtidas de músculo e fígado normais. A atividade específica obtida neste trabalho, para a enzima de músculo de coelho, purificada segundo o método de Cori (CORI et al, 1948) foi de 80 U/mg (resultado não mostrado).

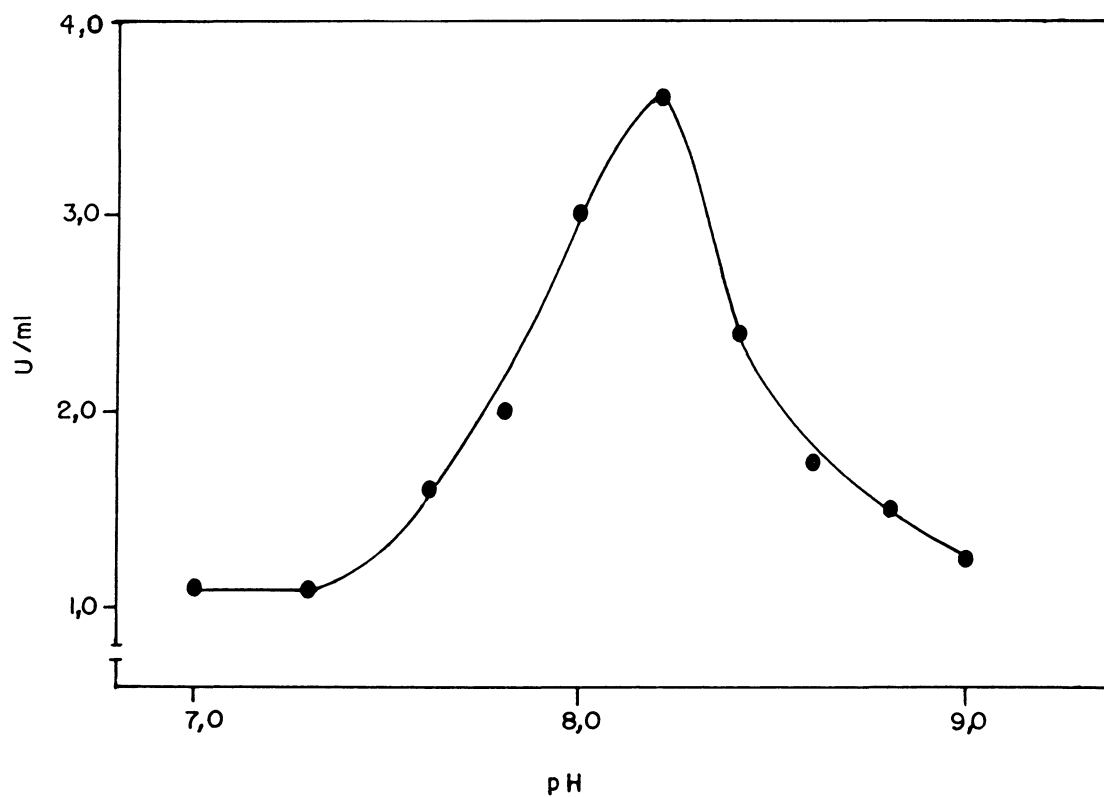
Outros exemplos da literatura podem ser citados: a enzima isolada de músculo de jacaré, apresentou atividade específica de 80 U/mg (VIEIRA et al, 1983); de músculo de pato, 203 U/mg (BARBOSA & NAKANO, 1987); de fígado de porco, 150 U/mg (DAGHER & DEAL Jr., 1977); de músculo de porco, 130 U/mg (HALÁSZ & POLGAR, 1982); de levedura, 150 U/mg (JAENICKE et al, 1980), todas ensaiadas pelo método arsenolítico, o mesmo utilizado neste trabalho. Estes valores podem ser um reflexo da atividade metabólica dos diferentes tecidos.

3.3 PROPRIEDADES CINÉTICAS DA GPDH DE CÉLULAS HeLa E DE TECIDO TUMORAL DE MAMA

3.3.1 Atividade de GPDH de Células HeLa em Função do pH

A atividade da GPDH de células HeLa em função do pH é mostrada na FIGURA 2. O pH ótimo foi estimado em torno de 8,2, sendo que em pH 7,8 e 8,5 apresentou aproximadamente metade da atividade. Este valor de pH ótimo se encontra na faixa geral de valores de pH ótimo relatados para a maioria das GPDHs (VELICK & FURFINE, 1963; DAGHER & DEAL Jr., 1977; VIEIRA et al, 1983; BARBOSA & NAKANO, 1967). Deve-se notar também, que o perfil do gráfico no decréscimo da atividade enzimática em valores de pH mais altos não é tão agudo como aquele descrito

FIGURA 2 - ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa EM FUNÇÃO DO pH.



A mistura de incubação continha, em um volume de 1 ml: 7 μ g de enzima, arseniato de sódio 50 mM, NAD 1 mM e G3P 1 mM. Para o ensaio do pH óti no foi utilizado o sistema com tampão Tris-HCl (pH 7,0 - 9,0). O pH ó-timo foi estimado em torno de 8,2.

por BONDI, (1969) para a GPDH de músculo de coelho.

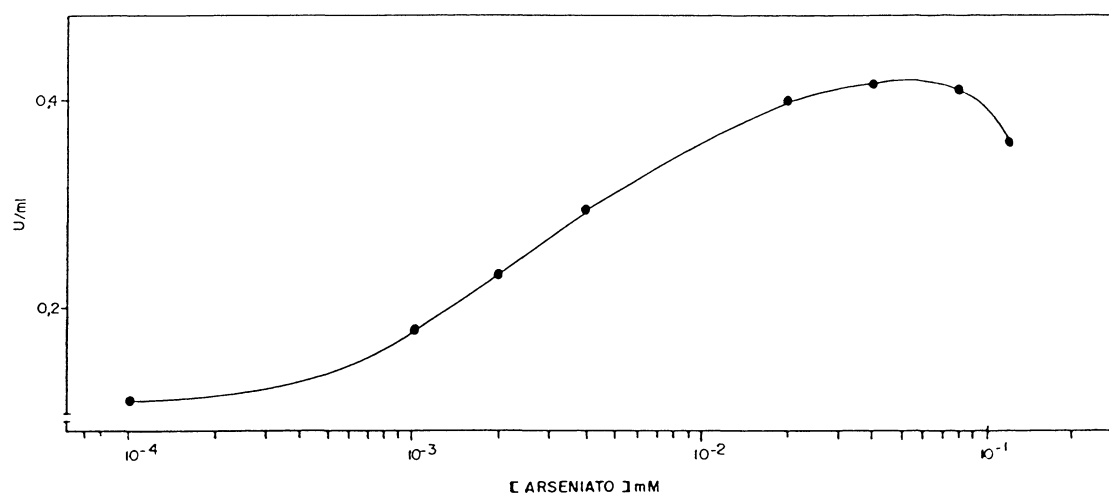
3.3.2 Efeito do Arseniato sobre a Atividade Enzimática da GPDH de Células HeLa

A FIGURA 3 mostra a atividade da enzima frente a diferentes concentrações de arseniato. Observa-se que a concentração ótima de arseniato foi de 50mM, sendo que concentrações superiores foram inibitórias. Valores ótimos de 50mM de arseniato foram descritos também para a GPDH de músculo de jacaré (VIEIRA et al, 1983) e de coelho (FERDINAND, 1964). Valores inferiores (30mM), foram descritos para a enzima de levedura (FOUCAULT et al, 1978) e de músculo de pato (BARBOSA & NAKANO, 1987). O valor de 10mM foi encontrado para a enzima do músculo de porco (DAGHER & DEAL Jr., 1977).

3.3.3 Efeito da Concentração de Gliceraldeído-3-fosfato Sobre a Atividade da GPDH de Células HeLa e de Tecido Tumoral de Mama. Determinação da Constante de Michaelis-Menten

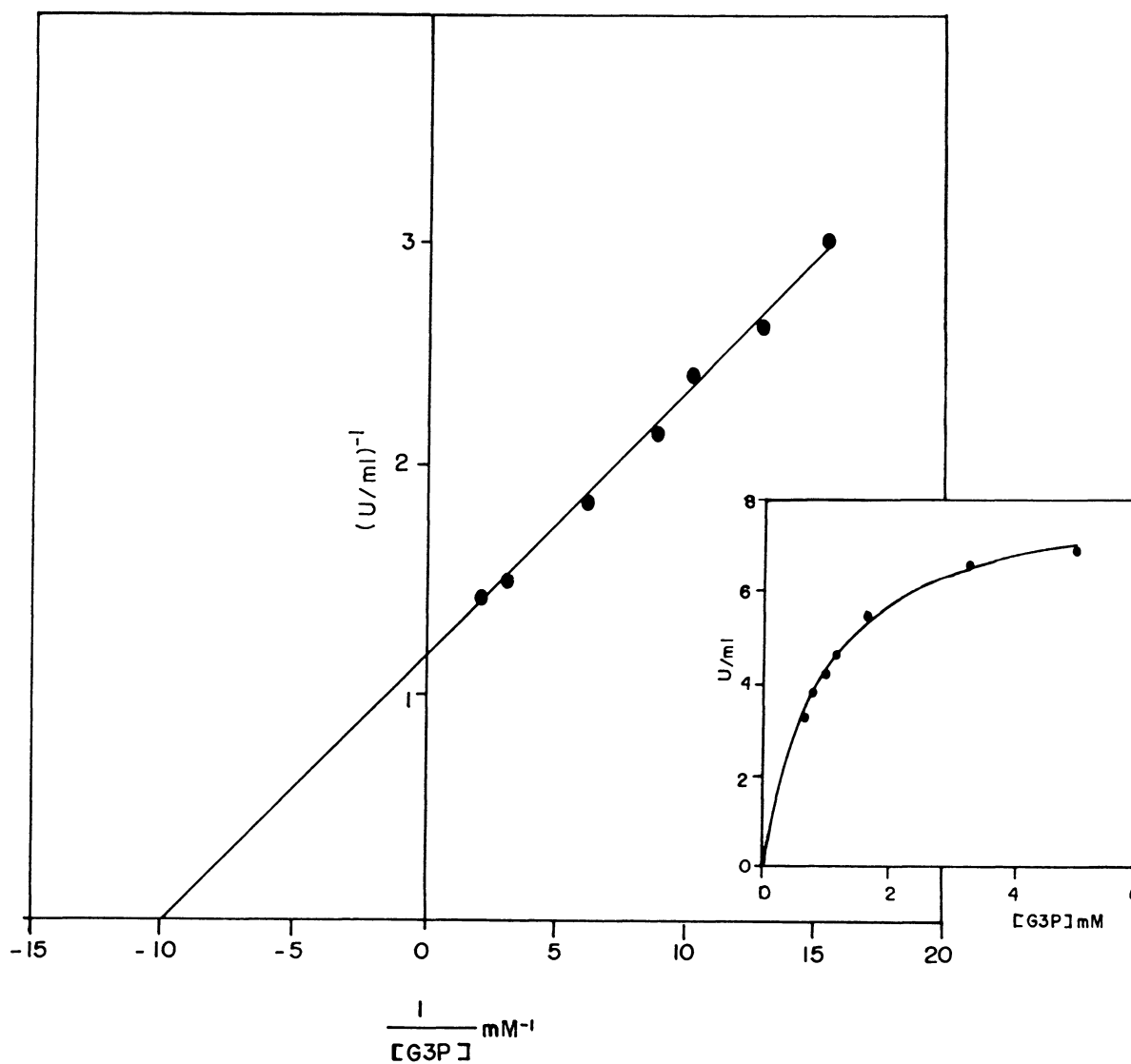
As FIGURAS 4 e 5 apresentam o efeito da concentração de G3P sobre a GPDH de células HeLa e de tumor de mama, respectivamente. O valor da constante de Michaelis-Menten, K_m , calculado segundo o método de Lineweaver-Burk (LINEWEAVER & BURK, 1934) foi de $1,0 \times 10^{-4}$ M para a enzima isolada de células HeLa e de $8,26 \times 10^{-5}$ M para a enzima obtida a partir de tecido tumoral de mama. Deve-se observar que as enzimas de ambas as fontes foram ensaiadas nas mesmas condições, isto é, em pH 8,2 e a 25°C. Os resultados obtidos neste trabalho para as células tumorais são comparáveis aos relatados para esta enzima isolada de uma variedade de fontes normais (FUJITA et al, 1976; FOUCAULT et al, 1978; DEPARADE & GLÖGGLER, 1981; VIEIRA et al, 1983; BARBOSA & NAKANO, 1987).

FIGURA 3 - EFEITO DO ARSENIATO SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE GPDH DE CÉLULAS HeLa.



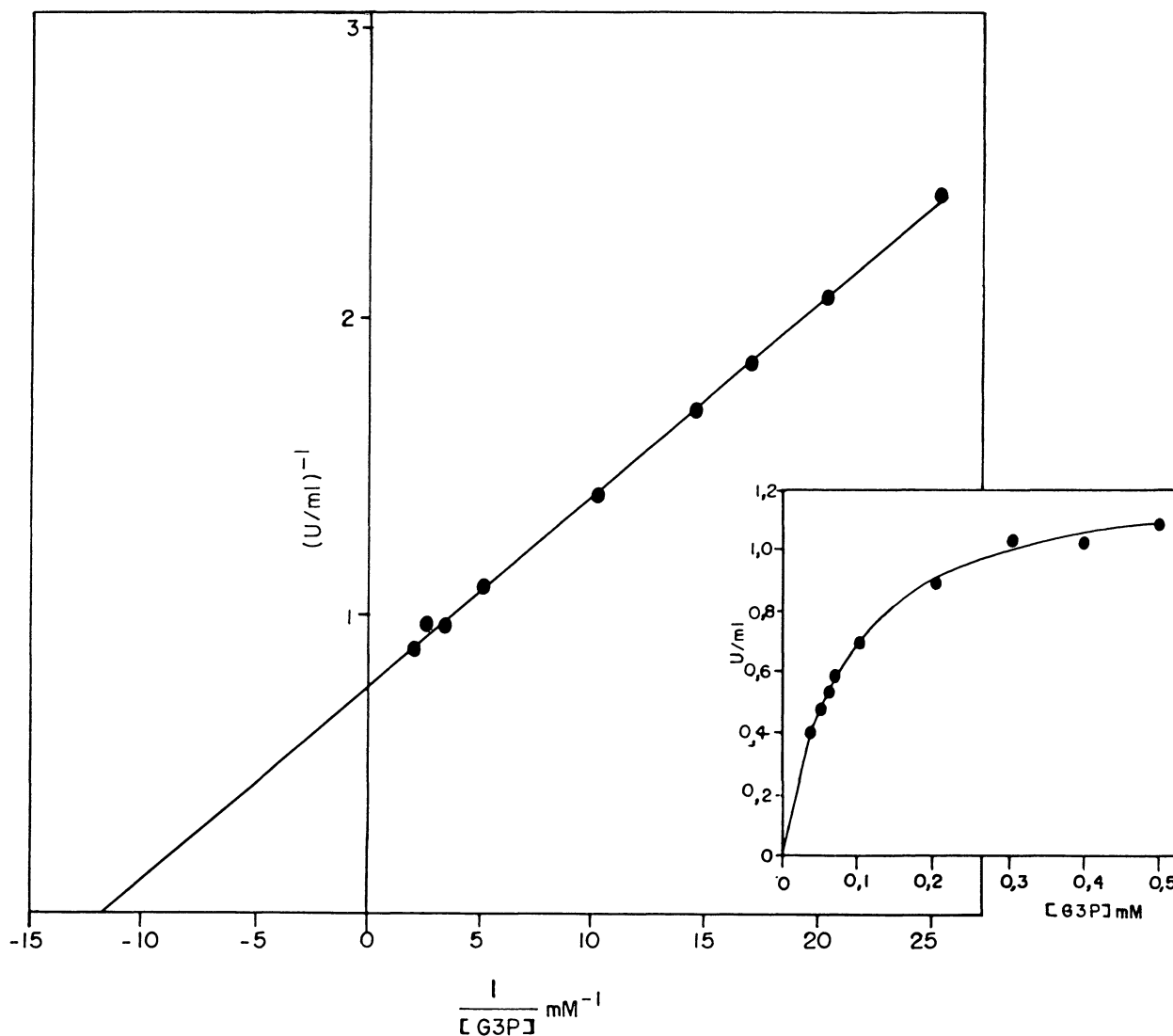
A mistura de incubação continha, em um volume final de 1 ml: 7 μ g de enzima, tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,2 contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM, G3P 1mM e quantidades variáveis de arseniato de sódio.

FIGURA 4 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa. DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN.



A mistura de incubação continha, em um volume final de 1 ml: 7 μg de proteína, tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,2, contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM, arseniato de sódio 50mM, NAD 1mM e quantidades variáveis de G3P. O valor da constante de Michaelis-Menten (K_m) para o G3P, calculado segundo o método de LINEWEAVER-BURK, foi de $1,0 \times 10^{-4}$ M, em pH 8,2 e a 25°C .

FIGURA 5 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE TECIDO TUMORAL DE MAMA. DETERMINAÇÃO NA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN.



A mistura de incubação continha, em um volume final de 1 ml: 10 μ g de proteína, tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,2 contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM, arseniato de sódio 50mM, NAD 1mM e quantidades variáveis de G3P. O valor da constante de Michaelis-Menten (K_m) para o G3P, calculado segundo o método de LINEWEAVER-BURK, foi de $8,26 \times 10^{-5} \text{ M}$, em pH 8,2 e a 25 $^{\circ}$ C.

3.3.4 Efeito da Concentração de NAD^+ Sobre a Atividade da GPDH de Células HeLa e de Tecido Tumoral de Mama. Determinação da Constante de Michaelis-Menten

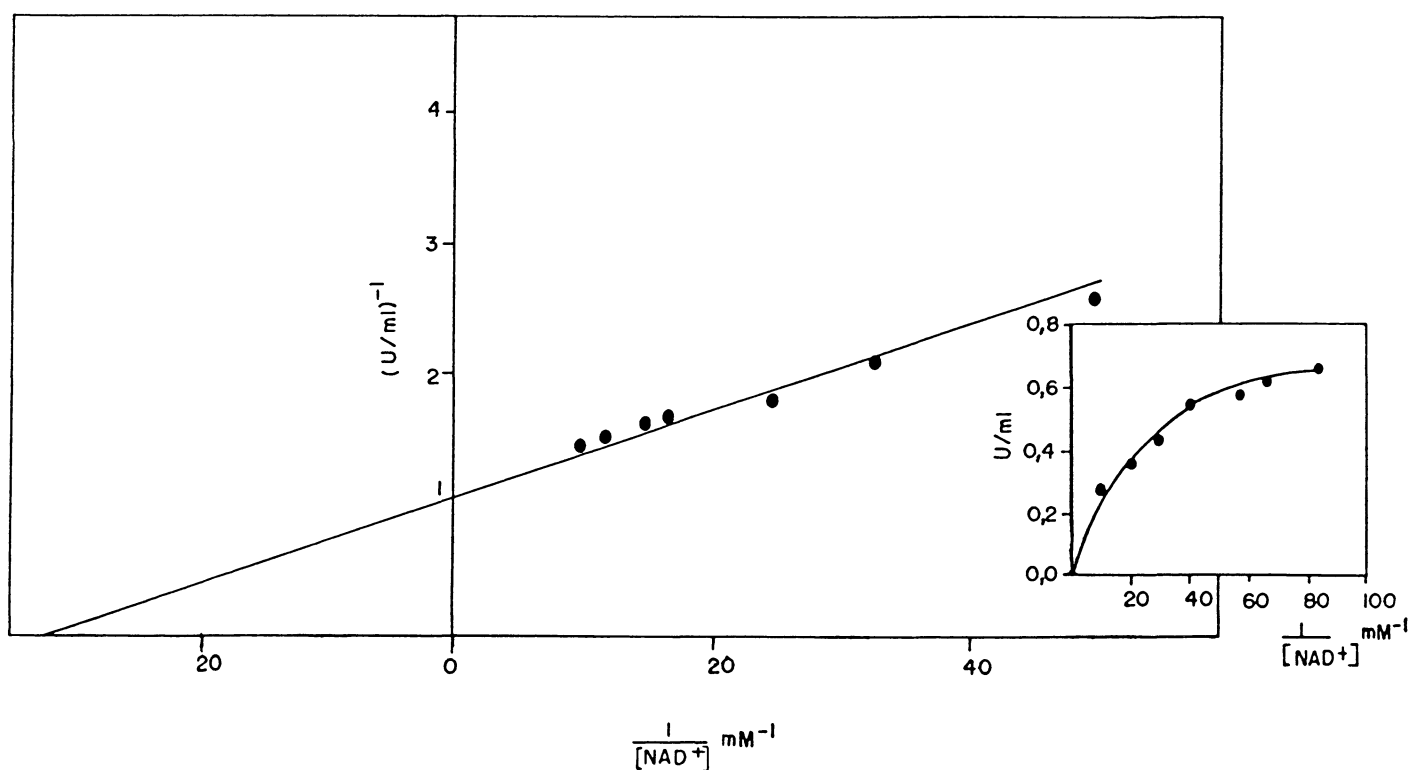
O efeito da concentração do NAD^+ sobre a velocidade da reação é mostrado nas FIGURAS 6 e 7, respectivamente para as enzimas obtidas de células HeLa e de tumor de mama. O valor da constante de Michaelis-Menten para o NAD^+ , calculado segundo o método de Lineweaver-Burk foi de $3,07 \times 10^{-5}\text{M}$ para a enzima de células HeLa e $1,53 \times 10^{-5}\text{M}$ para a enzima do tecido tumoral de mama. Neste aspecto o comportamento das enzimas de células tumorais foi também semelhante ao de outras, obtidas de células normais, de outras espécies animais (FUJITA et al, 1976; FOUCAULT et al, 1978; DEPARADE & GLÖGGLER, 1981; VIEIRA et al, 1983; BARBOSA & NAKANO, 1987).

Quanto ao conteúdo de NAD^+ na proteína isolada, as GPDHs podem ser diferenciadas em dois grupos gerais: o primeiro grupo contém quantidades substanciais de NAD^+ ligado, encontrando-se neste grupo a maioria das enzimas estudadas (SCHEEK & SLATER, 1978; HARRIS et al, 1980; VIEIRA et al, 1983; BARBOSA & NAKANO, 1987). O segundo grupo possui pouco ou nenhum coenzima ligado, como é o caso das enzimas de levedura (KIRSCHNER, 1971), esturjão, peru, faisão (ALLISON & KAPLAN, 1964) e E. coli (D'ALESSIO & JOSSE, 1971).

Como a maioria das GPDHs estudadas, a GPDH de células HeLa apresentam NAD^+ fortemente ligado. A relação $A_{280}:A_{260}$ foi de 1,14, indicando, conforme SEYDOUX, (1973), que a enzima possui 3,6 moles de NAD^+ por mol de enzima. Observações semelhantes são válidas para a enzima isolada de tecido tumoral de mama.

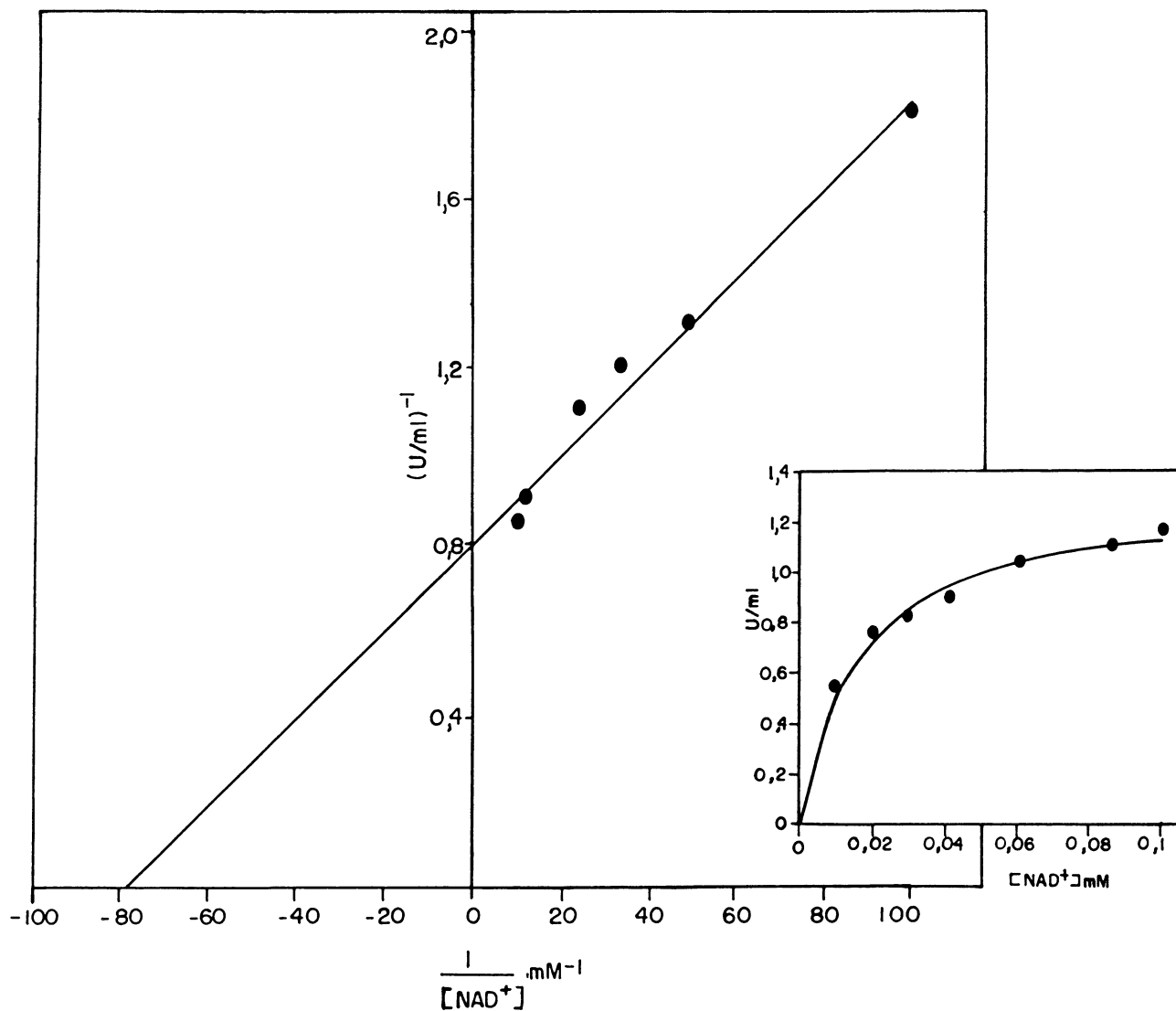
Deve-se ainda salientar que tanto a GPDH de células HeLa como a de tumor de mama, são específicas para o NAD^+ , não

FIGURA 6 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NAD^+ SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa. DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN.



A mistura de incubação continha, em um volume final de 1 ml: $8\mu\text{g}$ de proteína, tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,2 contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM, arseniato de sódio 50mM, G3P 1mM e quantidades variáveis da NAD^+ . O valor da constante de Michaelis-Menten para o NAD^+ , calculado segundo o método de LINEWEAVER & BURK, $3,07 \times 10^{-5} \text{M}$, em pH 8,2 e a 25°C .

FIGURA 7 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO NAD^+ SOBRE A ATIVIDADE DA GPDH DE TECIDO TUMORAL DE MAMA. DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN.



A mistura de incubação continha, em um volume final de 1ml: 10 μg de proteína, tampão Tris-HCl 50mM, contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM, arseniato de sódio 50mM, G3P 1mM e quantidades variáveis de NAD^+ . O valor da constante de Michaelis-Menten para o NAD^+ , calculado segundo o método de LINEWEAVER-BURK foi de $1,53 \times 10^{-5} \text{M}$, em pH 8,2 e a 25°C .

apresentando nenhuma atividade quando este coenzima foi substituído pelo NADP.

3.3.5 Efeito Inibitório do Produto da Reação, NADH, e do ATP, Sobre a Atividade Enzimática da GPDH de Células HeLa e de Tecido Tumoral de Mama.

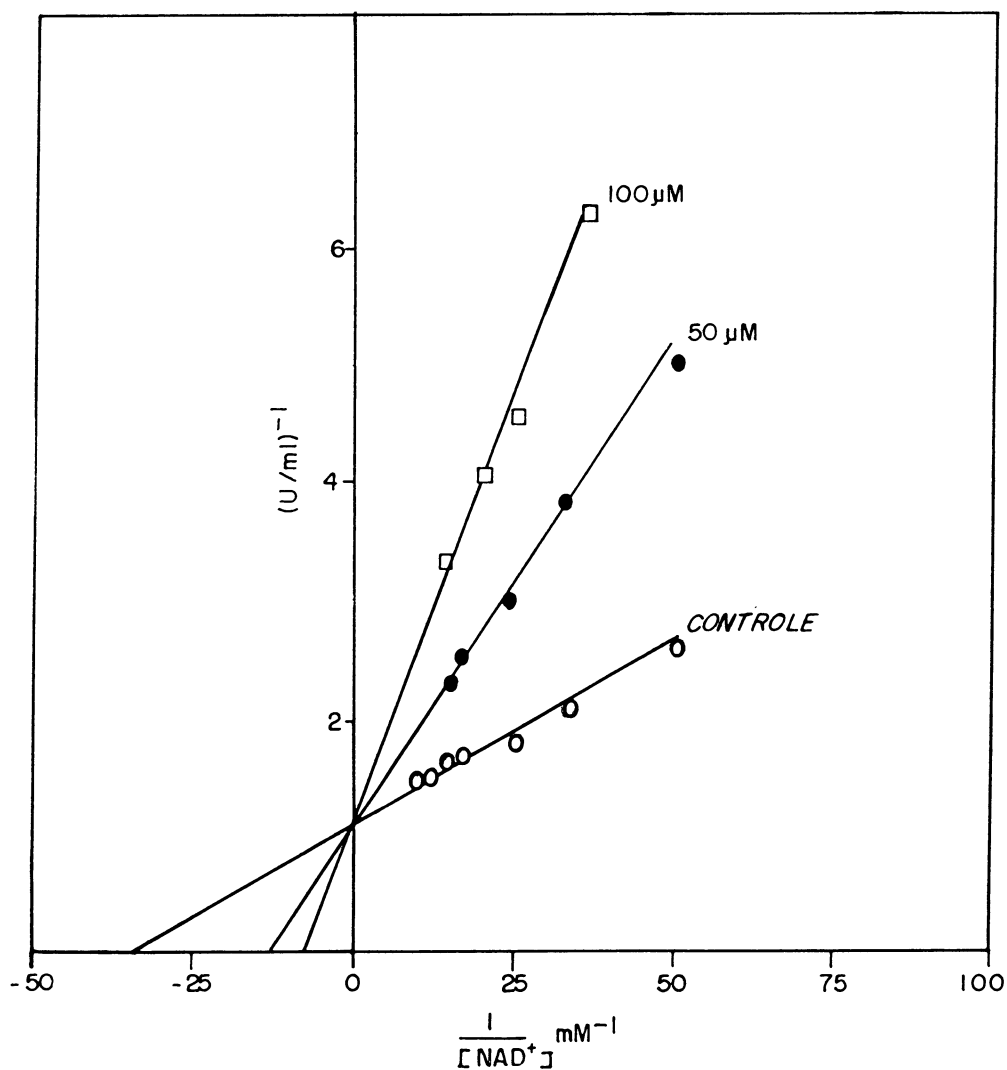
A ação inibitória do NADH e do ATP sobre a GPDH de diferentes fontes foi descrita por vários autores (OGUCHI et al, 1973); VIEIRA et al, 1983; BARBOSA & NAKANO, 1987). Estes parâmetros foram avaliados neste trabalho, para a enzima obtida de células HeLa. Foi também estudada a inibição da GPDH de tecido tumoral de mama pelo NADH.

O efeito inibitório do NADH sobre a GPDH está apresentado na FIGURA 8 (células HeLa) e na FIGURA 9 (tumor de mama). Deve-se salientar que estes experimentos foram feitos em presença de concentração saturante de G3P, em pH 8,2 e à temperatura de 25°C. Em ambos os casos, foi observada uma inibição do tipo competitivo em relação ao NAD⁺. O valor de K_i , calculado da intersecção com o eixo das abcissas foi de $3,25 \times 10^{-5} \text{M}$ para a GPDH de células HeLa e de $5,35 \times 10^{-5} \text{M}$ para a enzima de tumor de mama.

TUCKER & GRISOLIA, em 1962, mostraram que o NADH em concentrações compatíveis com as usadas neste trabalho, promovem a inativação da GPDH. Nossos experimentos foram realizados em condição experimental diferente dos usados pelos autores, que trabalharam em uma situação de pré-incubação com o coenzima reduzido, não podendo, portanto, serem comparados. Embora não possa ser descartada a possibilidade de que o NADH inative a GPDH de células HeLa e de tumor de mama, os resultados aqui apresentados refletem a inibição da enzima e não a sua inativação.

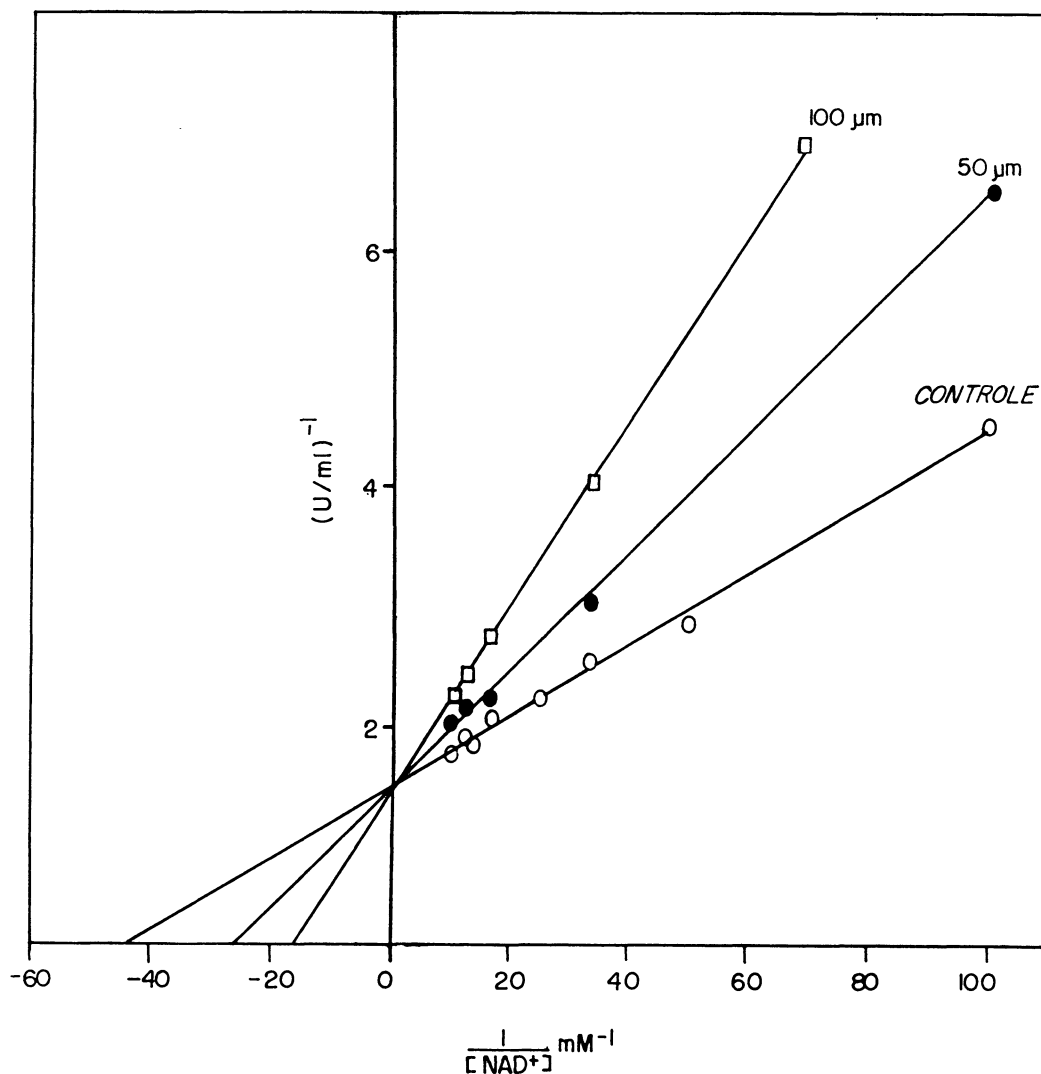
O efeito do ATP sobre a atividade da GPDH de células

FIGURA 8 - EFEITO INIBITÓRIO DO PRODUTO DA REAÇÃO, NADH, SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GPDH DE CÉLULAS HeLa.



A mistura de incubação continha, em um volume final de 1 ml: $8\mu\text{g}$ de proteína, tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,2 contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM, G3P 1mM, arseniato de sódio 50mM, quantidades variáveis de NAD^+ e zero (○), $50\mu\text{M}$ (●) e $100\mu\text{M}$ (□) de NADH. O valor da constante de inibição (K_i), calculado da interseção com o eixo das abcissas foi de $3,25 \times 10^{-5} \text{ M}$, em pH 8,2 e a 25°C .

FIGURA 9 - EFEITO INIBITÓRIO DO PRODUTO DA REAÇÃO, NADH, SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GPDH DE TECIDO TUMORAL DE MAMA.



A mistura de incubação continha, em um volume final de 1 ml: 10 μ g de proteína, tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,2 contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM, G3P 1mM, arseniato de sódio 50mM, quantidades variáveis de NAD⁺ e zero (o), 50 μ M (●) e 100 μ M (□) de NADH. O valor da constante de inibição (K_i), calculado da interseção com o eixo das abcissas foi de $5,35 \times 10^{-5}$ M em pH 8,2 e a 25°C.

HeLa está apresentado na FIGURA 10. Os experimentos foram realizados em concentração saturante de G3P, pH 8,2 e a 25°C. Foi demonstrada uma inibição do tipo competitivo em relação ao NAD⁺, e o valor da constante de inibição, K_i, calculado da intersecção com o eixo das abcissas foi de 2,61 x 10⁻³M.

A análise dos parâmetros cinéticos, bem como os estudos de inibição, mostram que as GPDHs de células tumorais purificadas apresentam propriedades similares às das enzimas de tecidos normais isoladas de outras fontes.

3.4 ESTABILIDADE DA GPDH DE CÉLULAS HeLa

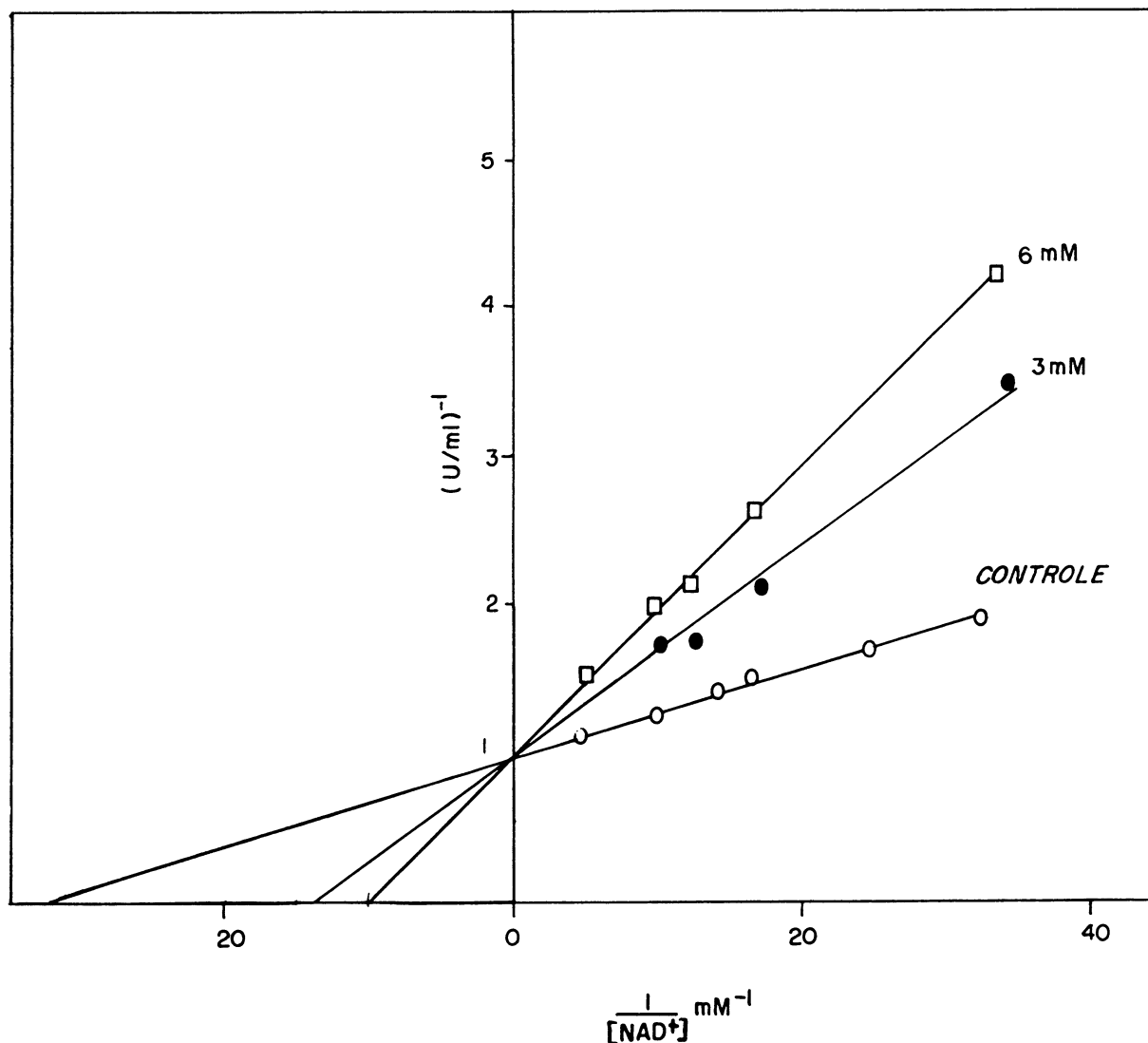
A GPDH de células HeLa, purificada até a etapa de sulfato de amônio e dialisada em tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,2, contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM, foi mantida em geladeira, a aproximadamente 4°C. Nestas condições foi observado que a enzima, diferentemente das GPDHs de outras fontes, não apresenta grande estabilidade. Após uma semana, a GPDH perdeu em torno de 40% de sua atividade inicial.

3.5 CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DA GPDH DE CÉLULAS HeLa

Embora na literatura especializada existam estudos imunológicos sofisticados, realizados com preparações homogêneas de anticorpos que permitiriam caracterizar e/ou identificar grupos determinantes de antigenicidade de um antígeno (ROITT, 1983), o presente trabalho se limitou à análise comparativa das propriedades antigênicas das GPDHs de células HeLa e de Anas sp (pato).

Assim, os experimentos cujos resultados são descritos a seguir, foram feitos com a finalidade de se caracterizar os anticorpos obtidos contra GPDH purificada de células HeLa e de Anas sp.

FIGURA 10 - EFEITO INIBITÓRIO DO ATP SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GPDH DE CÉLULAS HeLa.



A mistura de incubação continha, em um volume final de 1 ml: $8\mu\text{g}$ de proteína, tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,2 contendo EDTA 1mM e 2-mercaptoetanol 1mM, G3P 1mM, arseniato de sódio 50mM, quantidades variáveis de NAD^+ e zero (o), 3mM (●) e 6mM (□) de ATP. O valor da constante de inibição (K_i), calculado da interseção com o eixo das abcissas foi de $2,61 \times 10^{-3} \text{ M}$ em pH 8,2 e a 25°C .

3.5.1 Imunoeletroforese da GPDH de Células HeLa

A FIGURA 11 mostra o perfil imunoeletroforético da preparação utilizada para a obtenção dos anticorpos anti-GPDH de células HeLa. Pode-se observar a presença de uma única banda de precipitina, demonstrando por mais este critério, a pureza da preparação de GPDH empregada para a obtenção do anticorpo.

3.5.2 Imunoeletroforese do Anticorpo Anti-GPDH de Células HeLa

A imunoeletroforese da preparação purificada de anticorpos anti-GPDH de células HeLa está apresentada na FIGURA 12. Esta imunoeletroforese mostra três bandas de precipitina, correspondendo a três frações eletroforéticas das gama-globulinas (IgM, IgG, IgA).

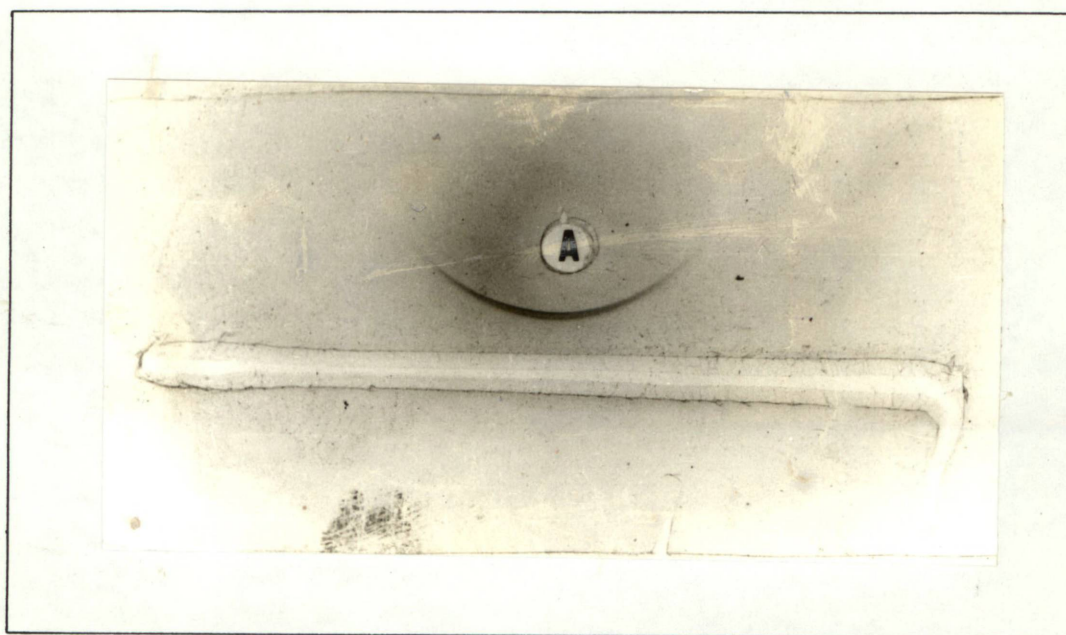
3.5.3 Imunodifusão das GPDHs das Diversas Fontes.

Caracterização do Anticorpo Anti-GPDH de Células HeLa

Com a finalidade de se caracterizar a especificidade dos anticorpos obtidos contra a GPDH de células HeLa foram realizados experimentos de imunodifusão, cujos resultados estão apresentados nas FIGURAS 13 e 14. Em ambos os casos, o orifício central continha o anticorpo anti-GPDH de células HeLa. Na FIGURA 13, as GPDH usadas eram das seguintes fontes: células HeLa (orifícios 1 e 2), S. cerevisiae (Orifício 3), E. coli. (orifício 4), Anas sp. (orifícios 5 e 6). Na FIGURA 14, as GPDHs usadas eram das seguintes fontes: Oryctolagus sp. (orifícios 1 e 2), Caiman sp. (Orifício 3), Anas sp. (orifício 4) e tecido tumoral de mama (orifícios 5 e 6).

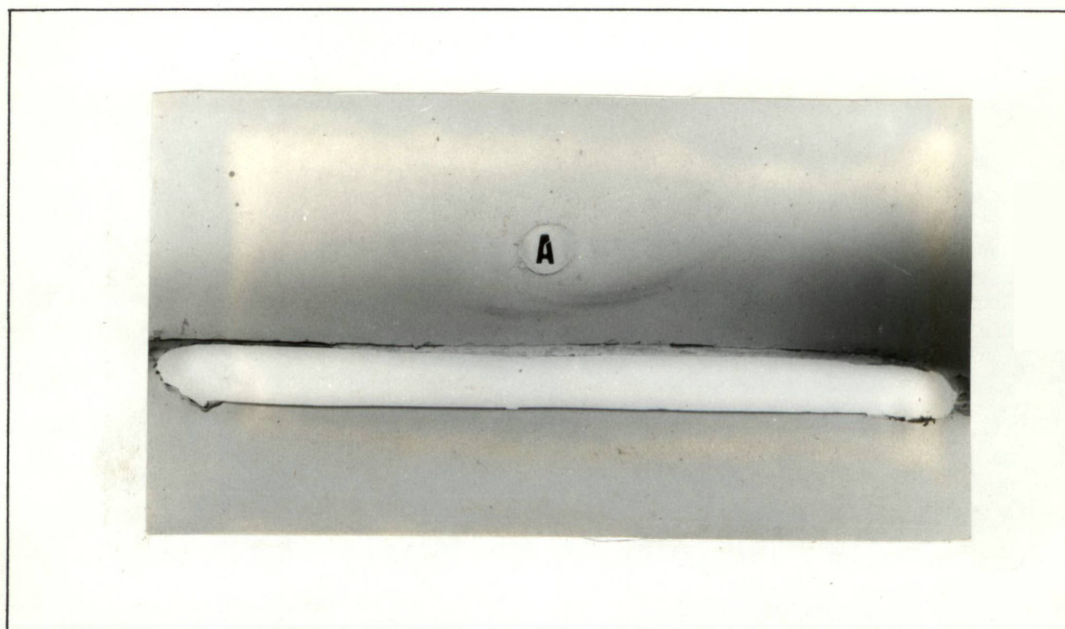
Na FIGURA 13, os anticorpos anti-GPDH de células HeLa reagiram com a enzima de células HeLa (orifícios 1 e 2). Não

FIGURA 11 - PERFIL IMUNOELETROFORÉTICO DA GPDH PURIFICADA DE CÉLULAS HeLa (ANTÍGENO).



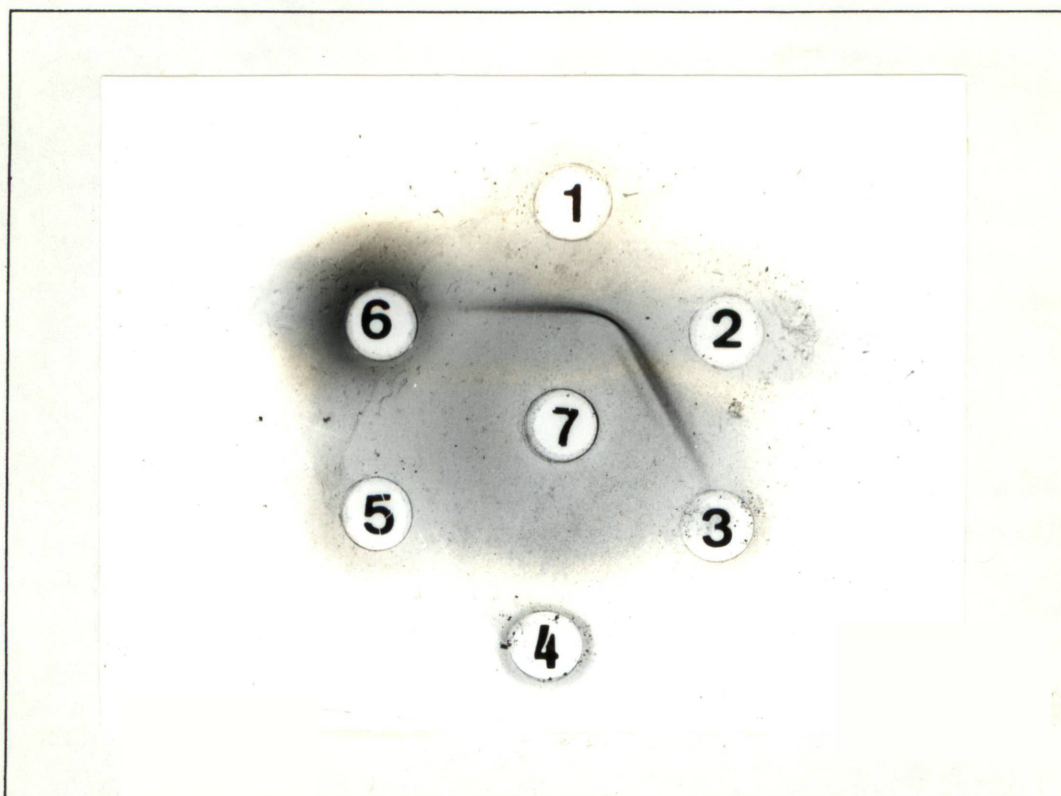
O orifício (A) continha 60 μ l de uma preparação purificada de GPDH de células HeLa (5,75 U/ml). Na fenda foi colocado 0,6 ml de preparação de anticorpos anti-GPDH de células HeLa (14,9 mg/ml de proteínas). A banda de precipitina foi corada com Comassie Brilliant Blue G.

FIGURA 12 - PERFIL IMUNOELETRÓFORÉTICO DO ANTICORPO ANTI-GPDH
PURIFICADO DE CÉLULAS HeLa.



O orifício (A) continha 60 μ l da preparação de anticorpos anti-GPDH de células HeLa (14,9 mg/ml de proteínas). Na fenda foi colocado 0,6 ml da preparação purificada de GPDH de células HeLa (5,75 U/ml). As bandas de precipitina, provavelmente correspondentes a IgM, IgG e IgA, foram coradas com Comassie Brilliant Blue.

FIGURA 13 - IMUNODIFUSÃO DA GPDH DE DIVERSAS FONTES COM PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-GPDH de CÉLULAS HeLa.



A FIGURA 13 continha, no orifício central (7), 60 μ l da preparação de anticorpos anti-GPDH de células HeLa (14,9 mg/ml de proteínas). Os demais orifícios continham:

1 e 2 - 60 μ l de GPDH purificada de células HeLa (5,75 U/ml);

3 - 45 μ l de GPDH de levedura (7,1 U/ml);

4 - 60 μ l de GPDH de bactéria (5,8 U/ml);

5 - 50 μ l de GPDH purificada de pato (6,39 U/ml);

6 - 60 μ l de GPDH purificada de pato (6,39 U/ml).

houve formação de bandas de precipitina quando as GPDHs de levedura (orifício 3), bactéria (orifício 4) e músculo de pato (orifícios 5 e 6) foram colocadas frente à preparação de gama-globulinas purificadas de células HeLa.

Na FIGURA 14, os anticorpos anti-GPDH de células HeLa reagiram com as enzimas de músculo de jacaré (orifício 3) e de tumor de mama (orifícios 5 e 6), enquanto que as GPDHs de músculo de pato (orifício 4) e de músculo de coelho (orifícios 1 e 2) não reagiram com a gama-globulina purificada de células HeLa.

3.5.4 Imunodifusão das GPDHs das Diversas Fontes.

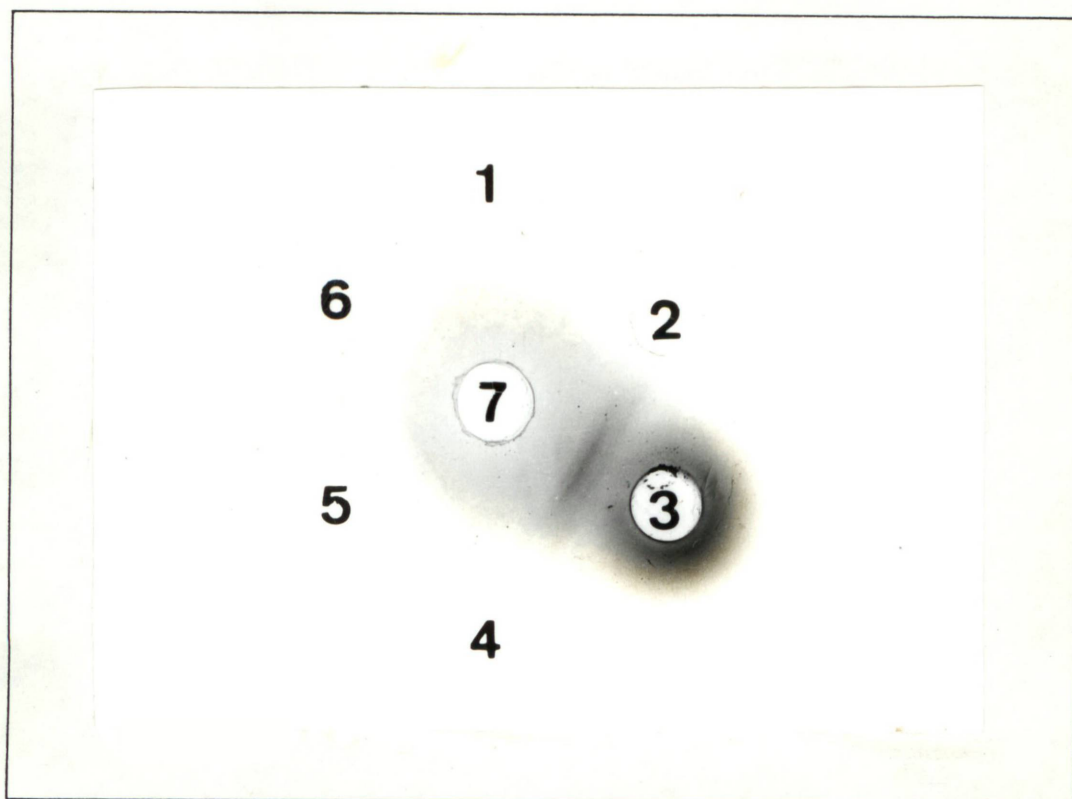
Caracterização do Anticorpo Anti-GPDH de Pato (Anas sp)

Os resultados da imunodifusão, feitos com a finalidade de caracterizar a especificidade dos anticorpos obtidos contra a GPDH de músculo de pato, estão apresentados nas FIGURAS 15 e 16. Em ambos os casos, o orifício central continha o anticorpo anti-GPDH de músculo de pato. Na FIGURA 15, as GPDHs usadas eram das seguintes fontes: células HeLa (orifícios 1 e 4), Anas sp. (orifício 2), Caiman sp. (orifício 3), S. cereviseae (orifício 5) e E. coli (orifício 6). Na FIGURA 16, as GPDHs das seguintes fontes: Oryctolagus sp. (orifícios 1 e 2), Caiman sp. (orifício 3) Anas sp. (orifício 4), e tumor de mama (orifícios 5 e 6).

A FIGURA 15 mostra que não houve formação de bandas de precipitina quando as GPDHs de bactéria (orifício 6) e levedura (orifício 5) foram testadas frente à preparação de gama-globulina purificada de músculo de pato. As GPDHs de músculo de jacaré (orifício 3); de células HeLa (orifícios 1 e 4) e de pato (orifício 2) apresentaram uma única banda de precipitina frente ao mesmo anticorpo.

A FIGURA 16 mostra que os anticorpos anti-GPDH de

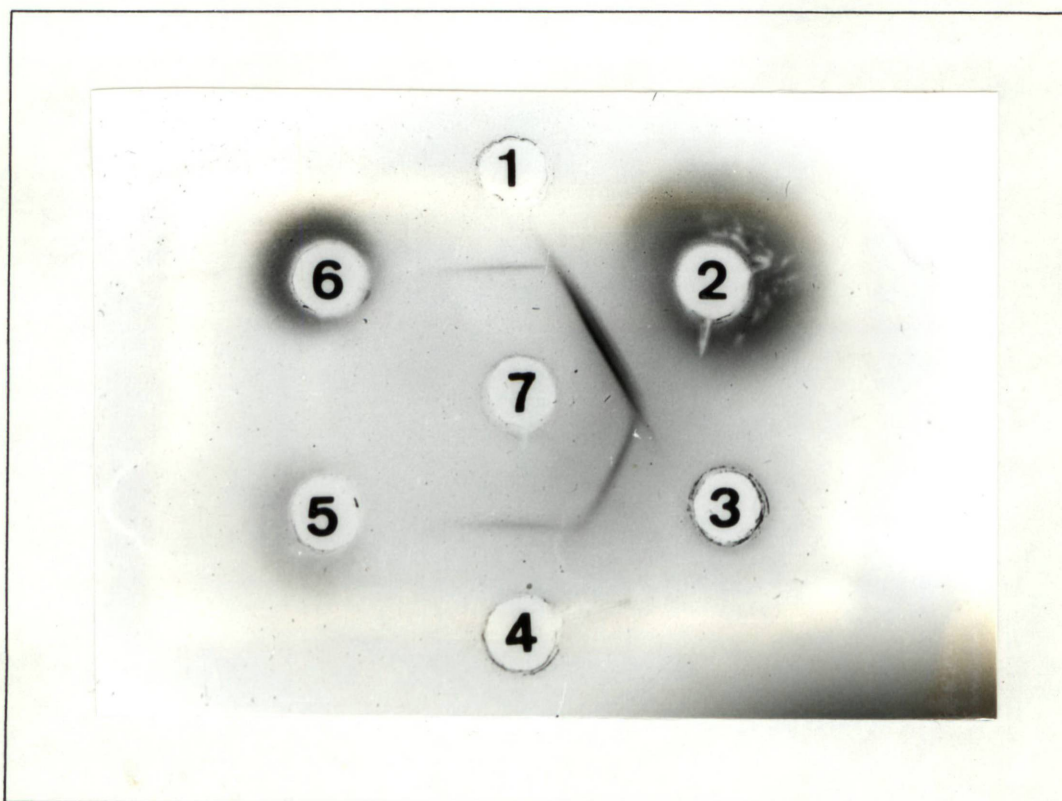
FIGURA 14 - IMUNODIFUSÃO DA GPDH DE DIVERSAS FONTES COM PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-GPDH DE CÉLULAS HeLa.



A FIGURA 14 continha, no orifício central (7), 50 μ l da preparação de anticorpos anti-GPDH de células HeLa (14,9 mg/ml de proteínas). Os demais orifícios continham:

- 1 - 5,0 μ l de GPDH purificada de coelho (147,0 U/ml);
- 2 - 10,0 μ l de GPDH purificada de coelho (147,0 U/ml);
- 3 - 50 μ l de GPDH purificada de jacaré (3,04 U/ml);
- 4 - 25 μ l de GPDH purificada de pato (6,17 U/ml);
- 5 - 40 μ l de GPDH purificada de tecido tumoral de mama (3,84 U/ml);
- 6 - 20 μ l de GPDH purificada de tecido tumoral de mama (3,84 U/ml).

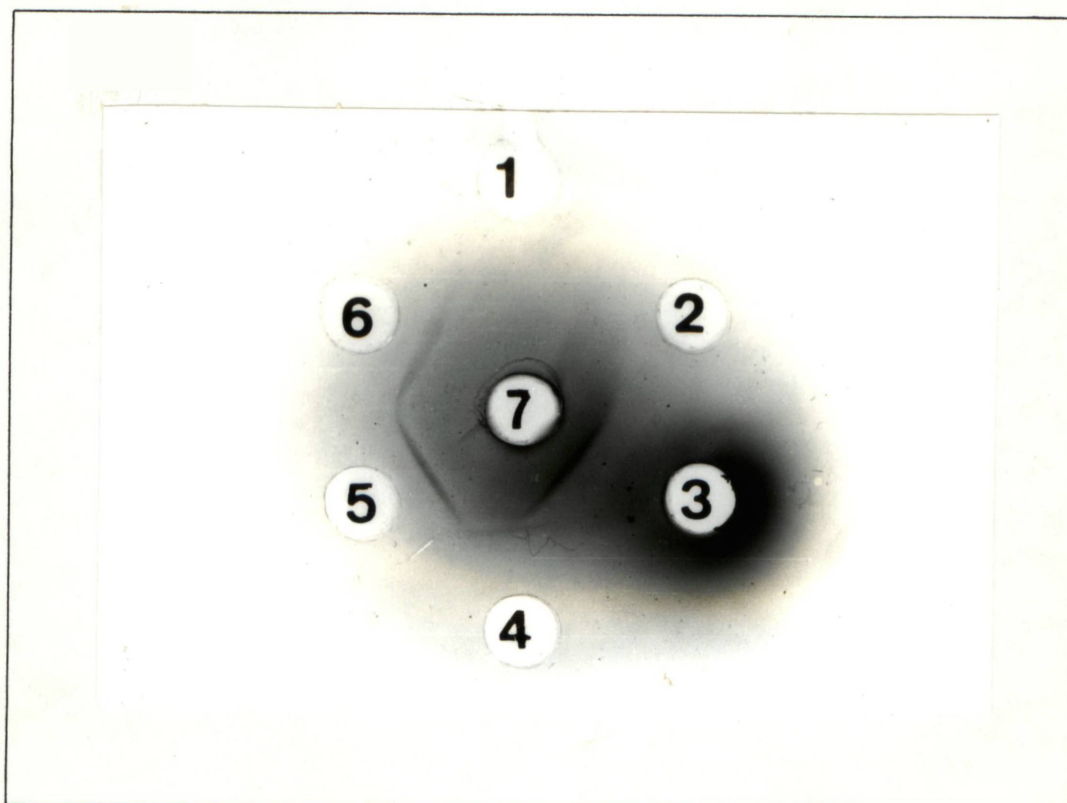
FIGURA 15 - IMUNODIFUSÃO DA GPDH DE DIVERSAS FONTES COM PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-GPDH DE PATO (*Anas sp.*).



A FIGURA 15 continha, no orifício central (7), 70 μ l da preparação anti-GPDH de pato (5,2 mg/ml de proteínas). Os demais orifícios continham:

- 1 - 70 μ l de GPDH purificada de células HeLa (1,8 U/ml);
- 2 - 30 μ l de GPDH purificada de pato (18,8 U/ml);
- 3 - 70 μ l de GPDH purificada de jacaré (7,3 U/ml);
- 4 - idem ao orifício 1;
- 5 - 30 μ l de GPDH de levedura (7,1 U/ml);
- 6 - 70 μ l de GPDH de bactéria (7,0 U/ml).

FIGURA 16 - IMUNODIFUSÃO DA GPDH DE DIVERSAS FONTES COM PREPARAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-GPDH DE PATO (*Anas sp.*).



A FIGURA 16 continha, no orifício central (7), 50 μ l da preparação de anticorpos anti-GPDH de pato (5,2 mg/ml de proteínas). Os demais orifícios continham:

- 1 - 5 μ l de GPDH purificada de coelho (147,0 U/ml);
- 2 - 10 μ l de GPDH purificada de coelho (147,0 U/ml);
- 3 - 50 μ l de GPDH purificada de jacaré (3,04 U/ml);
- 4 - 25 μ l de GPDH purificada de pato (6,17 U/ml);
- 5 - 40 μ l de GPDH purificada de tecido tumoral de mama (3,84 U/ml);
- 6 - 20 μ l de GPDH de tecido tumoral de mama (3,84 U/ml).

músculo de pato reagiram com as enzimas de músculo de jacaré (orifício 3), músculo de pato (orifício 4) e tumor de mama (orifícios 5 e 6), formando uma única banda de precipitina. Não houve formação de bandas de precipitina quando o mesmo anticorpo foi testado frente à enzima de músculo de coelho (orifícios 1 e 2).

Assim, as FIGURAS 15 e 16 mostram que a GPDH de células HeLa apresentam determinantes antigênicos imunologicamente idênticos aos dos antígenos de músculo de réptil e de tumor de mama, mas apresenta apenas alguns determinantes antigênicos imunologicamente idênticos em relação ao antígeno de músculo de pato.

Neste trabalho, a GPDH de células HeLa foi purificada até a homogeneidade e as suas propriedades foram estudadas comparativamente às enzimas isoladas de outras fontes, normais e tumorais. Considerando que a GPDH é uma proteína marcadora da evolução (GOODMAN, 1976), a comparação entre a enzima obtida de células que regrediram para um estado indiferenciado, com outras da escala filogenética, é relevante e foi feita pela primeira vez, por análise imunológica, neste trabalho.

A GPDH é uma proteína muito abundante no citoplasma das células (CORI et al, 1948; KREBS et al, 1953), e o é também em tumores de diferentes tipos histológicos, onde aparece com atividade específica maior que nos tecidos normais de mesma origem (OHKUBO et al, 1986). Entretanto, neste trabalho não nos foi possível efetuar um estudo comparativo da atividade entre células normais e tumorais da mesma origem devido ao alto grau de comprometimento do tumor de mama.

Os resultados das análises cinéticas obtidos neste trabalho mostram que as GPDHs de células HeLa e de tecido tumoral de mama são semelhantes à enzima proveniente de outras fontes. Aspecto semelhante, por exemplo, foi o pH ótimo de atividade, bem como os valores da atividade específica dos extratos brutos, que embora menores que os de tecido muscular, foram compatíveis com os encontrados para outros tecidos tumorais (OHKUBO et al, 1986).

Estes valores, que também são encontrados em tecidos

normais, são explicados pelo fato de que em alguns tecidos, como o muscular, a GPDH constitui até 10% da proteína total solúvel (CORI et al, 1948). O fato da GPDH apresentar uma atividade específica relativamente alta, não justificaria sua existência em tão altas concentrações. Entretanto, foi demonstrado por CORI et al, em 1948, que em pHs baixos encontrados nas células musculares, a atividade catalítica da GPDH parece ser somente uma fração da sua atividade máxima em pHs altos. Isto poderia explicar a abundância desta enzima no músculo (YANG & DEAL, 1969). Considerando as informações da literatura, no que se refere a outros tecidos, pode-se supor também que a atividade da GPDH esteja regulada pelo pH. Foi relatado por vários autores que o início dos eventos mitóticos é acompanhado por uma alcalinização do citoplasma (GERSON et al., 1982; BRAVO & MAC DONALD-BRAVO, 1986) seguido por um estímulo da via glicolítica (ROSENGURT, 1980). Essas alterações transitórias de pH intracelular poderiam estar associadas a alterações na atividade desta enzima, cujo pH ótimo é bastante alcalino.

Outro parâmetro a ser citado é a inibição pelo NADH para a GPDH de células HeLa e de tumor de mama, que foi da mesma ordem de grandeza (10^{-5} M), quando comparada com as demais. Entretanto, deve-se considerar que a dinâmica do metabolismo da célula tumoral, particularmente no que se refere ao fluxo glicolítico, difere da célula normal (EIGENDROT & GLOSSMAN, 1980). Em células HeLa, como em outras células tumorais, predomina um alto fluxo glicolítico com a acentuada produção de lactato, em condições aeróbicas (REITZER et al., 1979). Nestas células, o NADH citossólico é removido pela lactato desidrogenase, presente com alta atividade (OLIVEIRA, 1986), pela lançadeira de equivalentes redutores do citossol para a mitocôndria, malato-aspartato

(BASTOS et al, 1990) e pelo sistema redox transmembrana plasmática (NAVAS et al, 1986; OLIVEIRA et al, 1989). Tais atividades juntas, poderiam contribuir para aumentar a razão NAD/NADH do citossol, tornando sem significado "in vivo" a inibição pelo NADH observada "in vitro", na GPDH.

Neste trabalho, foi mostrado que a GPDH de células HeLa foi sensível à inibição pelo ATP, a exemplo da enzima obtida de outras fontes (VIEIRA et al, 1983; BARBOSA & NAKANO, 1987). O significado fisiológico desta inibição nas células normais é tema controverso, porém, segundo STANCEL & DEAL, (1969), este efeito poderia ser significativo "in vivo". Enquanto permanece em aberto esta questão, devemos citar ainda que a inibição da GPDH de células HeLa ocorreu em concentrações de ATP compatíveis com o nível deste metabólito, determinado em células HeLa por BASTOS (1990).

As análises imunoquímicas realizadas neste trabalho revelaram alguns aspectos interessantes da GPDH de células HeLa. As GPDHs de diferentes espécies de organismos são proteínas homólogas e, como tal, possuem homologia seqüencial, isto é, em certas posições estratégicas da cadeia polipeptídica dessas enzimas, está presente um mesmo aminoácido, independente da espécie da qual foi isolada. Em outras posições dessas proteínas homólogas podem ocorrer diferentes aminoácidos (DICKERSON et al, 1971; SALEMME et al, 1973; LYDDIATT et al, 1978; FERGUSON, 1980; THOMAS et al, 1980).

O estudo diferencial das estruturas das GPDHs de diferentes fontes têm sido realizado através da análise da seqüência de aminoácidos da cadeia polipeptídica (DAVIDSON et al, 1967; HARRIS & PERHAN, 1968; JONES & HARRIS, 1972; BIESECKER et al, 1977; WALKER et al, 1980), permitindo assim avaliar o grau de homologia seqüencial e

conseqüentemente, as prováveis diferenças filogenéticas existentes entre elas.

Desde que a alta especificidade da resposta imunológica está diretamente relacionada com o grupo determinante de antigenicidade e, portanto, com a seqüência de aminoácidos nas proteínas, não é difícil estimar a importância desta técnica nestes tipos de estudos, que pode detectar pequenas diferenças filogenéticas como as que provavelmente existem entre as GPDHs de Anas sp e de células HeLa, ou de grandes como as existentes entre as de E. coli, S. cerevisiae, fígado de rato e músculo de coelho com as de Anas sp ou de células HeLa.

Vale a pena ressaltar que nestes experimentos as GPDHs obtidas de fígado de rato e músculo de coelho, tomadas como parâmetros de comparação para os mamíferos não reagiram com as enzimas de células HeLa e de mama humana, ambas tumorais. Permanece a ser esclarecido se o alto grau de indiferenciação das células tumorais utilizadas neste trabalho é o responsável pela falta de reatividade das GPDHs usadas como padrão para mamíferos.

A GPDH de Anas sp. provavelmente possui grupos determinantes de antigenicidade idênticos aos da GPDH de células HeLa, uma vez que seus respectivos anticorpos são capazes de formar complexos antígeno-anticorpo com seus respectivos antígenos e com GPDH de Caiman sp, de tumor de mama humano e de células HeLa. Entretanto, apesar das similaridades antigênicas existentes entre as GPDHs de Anas sp. e de células HeLa, elas não são totalmente idênticas, já que a imunoglobulina anti-GPDH de células HeLa não é capaz de formar complexo com a GPDH de Anas sp. mas a imunoglobulina anti-GPDH de Anas sp. forma complexo com a GPDH de células HeLa. Esta aparente discrepância sugere três hipóteses:

1 - A GPDH de Anas sp. tem pelo menos um grupo determinante de antigenicidade comum às GPDHs de Anas sp., Caiman sp., tumor de mama humano e de células HeLa ou quatro grupos determinantes de antigenicidade, cada um deles com capacidade antigênica similar aos grupos determinantes peculiares de cada GPDH.

2 - A GPDH de células HeLa pode possuir apenas um grupo determinante de antigenicidade. Neste caso, ele provavelmente sofreu alguma modificação, uma vez que as imunoglobulinas induzidas por este antígeno formam complexos com as GPDHs de células HeLa, Caiman sp., tumor de mama humano, mas não com o de Anas sp.

3 - A GPDH de células HeLa, por algum distúrbio na sua biossíntese, teve sua estrutura parcialmente alterada, conservando três dos quatro grupos determinantes homólogos à GPDH de Anas sp. perdendo justamente o correspondente a este antígeno.

Nenhuma destas hipóteses pode ser descartada sem estudos mais aprofundados que provavelmente envolveriam a utilização de anticorpos monoclonais, de técnicas radioimunológicas e digestão parcial das GPDHs com o intuito de identificar a sequência ou os tipos de aminoácidos que participam na formação de determinantes antigênicos ou mesmo verificar o tipo de modificação sofrido pelo antígeno.

5 CONCLUSÕES

- 5.1 A GPDH de células HeLa foi purificada 80 vezes com um rendimento de 38,5%.
- 5.2 Após uma semana de armazenamento a 4°C, a GPDH purificada até a etapa de sulfato de amônio, perde em torno de 40% de sua atividade inicial.
- 5.3 O pH ótimo da enzima foi de 8,2 em tampão Tris-HCl.
- 5.4 A GPDH de células HeLa é ativada por arseniato, sendo 50mM a concentração ótima para a ativação.
- 5.5 Os valores de K_m para GPDH de células HeLa foram de $1,0 \times 10^{-4}$ M para o G3P e $3,07 \times 10^{-5}$ M para o NAD, em pH 8,2 e a 25°C.
- 5.6 O NADH e o ATP são inibidores competitivos em relação ao NAD, sendo o $K_{i_{\text{NADH}}}$ $3,25 \times 10^{-5}$ M e o $K_{i_{\text{ATP}}}$ $2,61 \times 10^{-3}$ M para a GPDH de células HeLa.
- 5.7 A imunoeletroforese do antígeno (GPDH de células HeLa) apresentou uma única banda de precipitina com sua respectiva imunoglobulina, demonstrando a pureza da preparação de GPDH de células HeLa.

- 5.8 A imunoeletroforese do anticorpo anti-GPDH de células HeLa purificado mostrou três bandas de precipitina com o respectivo antígeno, que provavelmente correspondem aos três tipos mais comuns de imunoglobulina (IgG, IgM, IgA).
- 5.9 Quando testada frente aos anticorpos anti-GPDH de pato (Anas sp.), a GPDH de células HeLa apresentou determinantes antigênicos imunologicamente idênticos aos dos antígenos de jacaré (Caiman sp.) e de tumor de mama humana, mas apenas alguns determinantes antigênicos imunologicamente idênticos em relação aos antígenos de músculo de pato (Anas sp.).
- 5.10 Quando testada frente aos anticorpos anti-GPDH de células HeLa, a GPDH destas células apresentou os determinantes antigênicos imunologicamente idênticos aos dos antígenos de músculo de jacaré (Caiman sp.) e de tumor de mama humano. Não houve, porém, formação de banda de precipitina frente ao antígeno de músculo de pato (Anas sp.), indicando que o grupo determinante correspondente provavelmente foi modificado ou perdido.
- 5.11 A GPDH de tecido tumoral de mama humano foi purificado 50 vezes com um rendimento de cerca de 35,3%.
- 5.12 Os valores de K_m para GPDH de tecido tumoral de mama humano foram de $8,26 \times 10^{-5} M$ para o G3P e de $1,53 \times 10^{-5} M$ para o NAD a pH 8,2 e a $25^\circ C$.

- 5.13 O NADH é um inibidor competitivo em relação ao NAD^+ , sendo o K_i de $5,35 \times 10^{-5} \text{M}$ para a GPDH de tecido tumoral de mama humano.
- 5.14 As GPDHs de células HeLa e de tecido tumoral de mama humano não demonstraram diferenças físico-químicas significativas em relação às GPDHs de outras fontes já estudadas.

1. ALLISON, W.S. & KAPLAN, N.O. The comparative enzymology of triosephosphate dehydrogenase. J.Biol.Chem., 239:2140-2152, 1964.
2. AMELUNXEN, R.E. Some chemical and physical properties of thermostable glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Bacillus stearothermophilus. Biochim.Biophys.Acta, 139:24-32, 1967.
3. AMELUNXEN, R.E.; NOELKEN, M.; SINGLETON Jr., R. Studies on the subunit structure of thermostable glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Bacillus stearothermophilus. Arch.Biochem.Biophys., 141:447-455, 1970.
4. BARBOSA, V. & NAKANO, M. Muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Anas sp I. Purification and properties of the enzyme. Comp. Biochem. Physiol. 88B n° 2, p.563-568, 1987.
5. BASTOS, M.T.; OLIVEIRA, M.B.M.; CAMPELLO, A.P. and KLUPPEL, M.L.W. Methotrexate studies on cellular metabolism. IV. Effect on the mitochondrial oxidation of cytosolic reducing equivalents in HeLa cells. Cell Biochem. Function. in press, 1990.
6. BIESECKER, G.; HARRIS, J.I.; THIERRY, J.C.; WALKER, J.E. and WONACOTT, A.J. Sequence and structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Bacillus stearothermophilus. Nature, 266: 328-333, 1977.
7. BONDI, E.; WATKING, J.; KIRTLEY, M.E. Comparaison of the activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in rabbit tissues. Biochem. Biophys. Acta. 185: 305-309, 1969.

8. BRAVO, R. & MAC DONALD-BRAVO, H. Effect of pH on the induction of competence and progression to the S-phase in mouse fibroblasts. FEBS Lett., 195: 309-312, 1986.
9. BUSTAMANTE, E. & PEDERSEN, P.L. High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: Role of mitochondrial hexoquinase. Proc. Natl.Acad.Sci.USA, 74: 3735-3739, 1977.
10. BUSTAMANTE, E.; MORRIS, H.P.; PEDERSEN, P.L. Energy metabolism of tumor cells. Requirement for a form of hexoquinase with a propensity for mitochondrial binding. J.Biol.Chem. 256:8699-8704, 1981.
11. BYERS, L.D.; SHE, H.S.; ALAIOFF, A. Interaction of phosphate analogues with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry, 18 (12):2471-2480, 1979.
12. CAPUTTO, R. & DIXON, M. Crystallization and identity of the Triose and Triosephosphate dehydrogenase of muscle. Nature (Lond) 156:630-631, 1945.
13. CARLSON, C.W. & BROSEMER, R.W. Comparative structural properties of insect triosephosphate dehydrogenase. Biochemistry, 10:2113-2119, 1971.
14. CORI, G.T.; SLEIN, M.W.; CORI, C.F. Crystalline D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from rabbit muscle. J.Biol.Chem., 173:605-618, 1948.
15. CRABB, J.W.; MURDOCK, A.L.; AMELUNXEN, R.E. Purification and characterization of thermolabile glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the facultative thermophile. Bacillus coagulans KU. Biochemistry, 16:4840-4847, 1977.
16. DAGHER, S.M. & DEAL Jr., W.C. Pig liver glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Purification, crystallization and characterization. Arch.Biochem.Biophys., 179:643-653, 1977.
17. D'ALESSIO, G. & JOSSE, J. Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate kinase and phosphoglyceromutase of Escherichia coli. J.Biol.Chem., 246:4319-4325, 1971.

18. _____. Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase of E.coli. Structural and catalytic properties. J.Biol.Chem., 246:4326-4333, 1971.
19. DAVIDSON, B.E.; SAJGO, M.; NOLLER, H.F.; and HARRIS, J.I. Aminoacid sequence of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from lobster muscle. Nature, 216: 1181-1185, 1967.
20. DEAL Jr., W.C. Metabolic control and structure of glycolitic enzymes. IV. Nicotinamida-adenine dinucleotide dependent in vitro reversal of dissociation and possible in vivo control of yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase synthesis. Biochemistry, 8:2795-2805, 1969.
21. DEPARADE, M.P. & GLÖGGLER. Isolation and properties of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from a sturgeon from the Caspian Sea and its interaction with spin-labeled NAD⁺ derivatives. Biochim.Biophys. Acta, 659:422-433, 1981.
22. DICKERSON, R.E.; TAKANO, T.; EISENBERG, D.; KALLAI, D.B.; SAMSON, L.; COOPER, A.; MARGOLIASH, E. Ferricytochrome C. I. General features of the horse and bonito proteins at 2,8 Å resolution. J.Biol.Chem., 248:1511-1535, 1971.
23. DUGGLEBY, R.G. & DENNIS, D.T. Nicotinamide adenine dinucleotide - specific glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Pisum sativum. Purification and characterization. J.Biol.Chem., 249:162-166, 1974.
24. EBY, D. & KIRTLEY, M.E. Isolation and characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human erythrocyte membranes. Arch.Biochem.Biophys., 198:608-613, 1979.
25. EIGENBRODT, E. & GLOSSMAN, H. Glycolysis-one of the keys to cancer? Trends Pharmacol. Sci. 9:240-245, 1980.
26. ELODI, O. & SZORENYI, E. Crystallization and comparative studies of D-3-phosphoglyceraldehyde dehydrogenase from muscle of various mammals. Acta.Phisiol.Acad.Sci.Hung., 9:339-350, 1965.

27. FERDINAND, W. The isolation and specific activity of rabbit-muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochem.J., 92:578-585, 1964.
28. FERGUSON, A. Higher-category systematics. In: _____. Biochemical systematics and evolution. Glasgow. Blackie. 1980. p.131-150.
29. FORT, Ph.; MARTY, L.; PIECHACZYK, M.; SABROUTY, S.El.; DANI, Ch.; JEANTEUR, Ph.; BLANCHARD, J.M. Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase multigenic family. Nucl.Acids Res., 13:1431-1442, 1985.
30. FOUCAULT, G.; NAKANO, M.; PUDLES, J. Role of lysine-183 in D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. Eur.J.Biochem. 83():113-123, 1978.
31. FUJITA, S.C.; OSHIMA, T.; IMAHORI, K. Purification and properties of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from an extreme thermophile, Thermus thermophilus, strain HB 8. Eur.J.Biochem., 64:57-68, 1976.
32. FURFINE, C.S. & VELICK, S.F. The acyl-enzyme intermediate and the kinetic mechanism of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase reaction. J.Biol.Chem., 240:844-855, 1965.
33. GANCEDO, C.; GINER, A.; SALAS, M.L.; SOLS, A. Reciprocal effects of carbon sources on the levels of an AMP sensitive fructose-1,6-diphosphatase and phosphofructokinase in yeast. Biochem.Biophys. Res. Comun., 20:15-20, 1965.
34. GERSON, D.F.; KIEFER, H. and EUFE, W. Intracellular pH of mitogen stimulated lymphocytes. Science, 216:1009-1010, 1982.
35. GOODMAN, M. Protein sequence in phylogeny. In.: AYALA, F.J. ed. Molecular evolution. Sinauer associates, Sunderland, Massachusetts, 1976, p.141-159.

36. GREENE, F.C. & FEENEY, R.E. Properties of muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from cold adapted Antarctic fish Dissostichus mawsoni. Biochim.Biophys.Acta, 220:430-442, 1970.
37. GREENSTEIN, J.P. Some biological characteristics of morphologically separable cancer. Cancer Res. 16:641-643, 1956.
38. GRISSON, F.E. & KAHN, J.S. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Euglena gracilis. Arch.Biochem.Biophys. 171:444-458, 1975.
39. HALÁSZ, P.; POLGAR, L. Lack of asymmetry in the active sites of tetrameric D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase during alkylation in the crystalline state. FEBS Lett. 143 (1):93-95, 1982.
40. HARRIGAN, P.J. & TRENTAM, D.R. Reactions of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with chromophoric thiol reagents. Biochem.J., 124:573-580, 1971.
41. HARRIS, J.I.; HOCKING, J.D.; RUNSWICK, M.J.; SUSUKI, K.; WALKER, J.E. D-GPDH. The purification and characterization of the enzyme from thermophiles Bacillus stearothermophilus and Thermus aquaticus. Eur.J.Biochem., 108:535-547, 1980.
42. HARRIS, J.I. & PERHAM, R. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from pig muscle. Nature (Lond) 219:1025-1028, 1968.
43. HARRIS, J.I. & WATERS, M. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase In: BOYER, P.D. ed. Oxidation-Reduction; Part C: Dehydrogenase (II) Oxidases (II) Hydrogen peroxidase cleavage. 3.ed. New York, Academic, 1976. p.1-49. (The enzymes, 13).
44. HERZFELD, A.; LEGG, M.A.; GEENGARD, O. Human colon tumors: enzymic and histological characteristics. Cancer, 42:1280, 1978.
45. HOCKING, J.O. & HARRIS, J.I. Purification by affinity chromatography of thermostable glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Thermus aquaticus. FEBS Lett., 34:280-284, 1973.

46. HOOD, W. & CARR, N.G. A single glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase active with NAD and NADP in Anabaena variabilis. Biochim.Biophys.Acta., 146:309-311, 1967.
47. HORECKER, B.L. & KORNBERG, A. The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. J.Biol.Chem., 175:385-390, 1948.
48. HUDSON, L. & HAY, F.C. Practical immunology. Oxford, Blackwell, 1976. p.116-125.
49. JAENICKE, R.; KREBS, H.; RUDOLPH, R.; WOENCKHAUS, C. Rate enhancement of reconstitution of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by a covalent bound coenzyme analog. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77(4):1966-69, 1980.
50. JONES, G.M.T. & HARRIS, J.I. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: aminoacids sequence of enzyme from baker's yeast. FEBS Lett., 22:185-189, 1972.
51. KABAT, E.A. & MEYER, M.M. Estimation of antigens. In Experimental immunochemistry - Springfield - Charles C. Thomas Publisher, 1971. p.361-383.
52. KIRSCHNER, K. Cooperative binding of nicotinamide adenine dinucleotide to yeast GPDH. J.Mol.Biol., 58:51-68, 1971.
53. KOCHMAN, M. & RUTTER, W.J. The similarity of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isolated from rabbit brain and muscle. Biochemistry, 7:1671-1677, 1968.
54. KOLB, E. & HARRIS, J.I. Purification and properties of glycolytic cycle enzymes from coelacanth (Latimeria chalumnae). Biochem.J., 130:26P, 1972.
55. KREBS, E.G.; RAFTER, G.W.; JUNGE, J.M. Yeast-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. II. Yeast protein. J.Biol.Chem., 200:479-492, 1953.
56. KNOX, W.E. The enzymic pattern of neoplastic tissue. Adv.Cancer Res., 10:117-129, 1967.

57. KRUSTEVA, N.; GEORGIEVA, M.; TOMOVA, N. Purification, molecular weight and subunit structure of NAD (NADP) dependent GPDH from *Chlorella*. Biochim. Biophys. Acta, 46:1740-1747, 1981.
58. LAMBERT, J.M. & PERHAM, R.N. A comparison of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from ox muscle and liver. FEBS Lett., 40: 305-308, 1974.
59. LYDDIATT, A.; PEACOCK, D.; BOULTER, D. Evolutionary change in invertebrate cytochrome c. J.Mol.Biol. 11:35-45, 1978.
60. LINEWEAVER, H. & BURK, D. The determination of the enzyme dissociation constants. J.Am.Chem.Soc., 56:658-666, 1934.
61. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 193:265-275, 1951.
62. MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. Molecular cloning. A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, 545 p.
63. MC. DANIEL, C.F. & KIRTLEY, M.E. The interaction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with human erythrocyte membranes. J.Biol.Chem., 249:6478-6485, 1974.
64. MELANDRI, B.A.; PUPILLO, P.; BACCARINI-MELANDRI, A. D-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in photosynthetic cells. I. The reversible light-induced activation in vivo of NADP dependent enzyme and its relationship to NAD-dependent activities. Biochim.Biophys.Acta., 220:178-189, 1970.
65. NAGRADOVA, N.K.; SAFRONOVA, M.I.; BARATOVA, L.A. Structural studies on glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase from rat skeletal muscle. Biochim.Biophys.Acta, 532:1-5, 1978.
66. 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. Biochim.Biophys.Res.Comm 135: 110-115, 1986.

67. OGUCHI, M.; MERIWETHER, B.P.; PARK, J.H. Interaction between adenosine triphosphate and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. III. Mechanism of action and metabolic control of the enzyme under simulated in vivo conditions. J.Biol.Chem., 248:5562-5570, 1973.
68. OLIVEIRA, M.B.M. Estudo dos efeitos do metrotexato sobre alguns parâmetros metabólicos em células HeLa e em fígado perfundido. Curitiba, 1986. 107 p. Tese, Doutorado, UFPr.
69. OLIVEIRA, M.B.M.; CAMPELLO, A.P.; and KLUPPEL, M.L.W. Methotrexate: Studies on cellular metabolism. II. Effect on transplasma redox activity and on ferricyanide induced proton extrusion by HeLa cell. Cell Biochem.Function, 7:135-137, 1989.
70. OHKUBO, M.; NAKAMURA, Y.; TOMUNAGA, K.; SAKIYAMA, S. Similarity between glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and a 37,000 dalton protein which is abundantly expressed in human lung cancers. Jpn.J.Cancer Res., 77:554-559, 1986.
71. ORSI, B.A. & CLELAND, W.W. Inhibition and kinetic mechanism of rabbit muscle glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry, 11:102-109, 1972.
72. OUCHTERLONY, O. & NILSSON, I.A. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: WEIR, D. (ed.) Handbook of experimental immunology. Oxford, Blackwell, 1978, p.19.1 - 19.44.
73. PAUL, J. Media for culturing cells and tissues in Cell and Tissue Culture, 4^a ed. Churchill Livingstone, London, pp.86-119, 1973, 430p.
74. PEDERSEN, P.L. Tumor mitochondria and bioenergetics of cancer cells. Prog. Exp. Tumor Res., 22:190-274, 1978.
75. PHILLIPS, H.J. Dye exclusion tests for cell viability. In: KRUSE, M.K. ed Tissue Culture, methods and applications. New York, A.P., 1973. 868 p.p.406-408.

76. PIECHACZYK, M. BLANCHARD, J.M.; MARTY, L.; DANI, Ch.; PANABIERES, F.; SABOUTY, S.El.; FORT, Ph.; JEANTEUR, Ph. Post-transcriptional regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in rat tissue. Nucl. Acids Res., 12: 6951-6963, 1984.
77. REITZER, L.J.; WICE, B.M.; KENNEL, D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured HeLa cells. J.Biol. Chem., 254:2669-2676, 1979.
78. RIZZO, E.; TUCHIYA, H.N.; MARTINEZ, C.H. Técnicas básicas de cultura celular. Instituto Butantã, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, s.d.
79. ROITT, I.M. Imunologia Básica. Rio de Janeiro. Edições Atheneu. 1983. 299p.
80. ROSENGURT, E. Stimulation of DNA synthesis in quiescent cultured cells: Exogenous agents, internal signals, and early events in current topics in cellular regulation. In: HORECKER, B.L. & STADTMAN, E.R. eds. vol. 17 p.59-88. Academia Press, 1980.
81. SALEMME, F.R.; KRAUT, J.; KAMEN, M.D. Structural bases for function in cytochrome C. An interpretation of comparative X-ray and biochemical data. J.Biol.Chem., 248:7701-7716, 1973.
82. SALEEMUDDIN, M. & ZIMMERMANN, U. Use of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-depleted human erythrocyte ghosts as specific high affinity adsorbents for the purification of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from various tissues. Biochim.Biophys.Acta, 527:182-192, 1978.
83. SCHEEK, R.M. & SLATER, E.C. Preparation and properties of rabbit muscle GPDH with equal binding parameters for the third and fourth NAD⁺ molecules. Biochim. Biophys.Acta, 256:13-24, 1978.
84. SCHULMAN, M.D. & GIBBS, M. D-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of higher plants. Plant Physiol., 43:1805-1812, 1968.

85. SEGAL, H.L. & BOYER, P.D. The role of the sulfhydryl groups in the activity of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J.Biol.Chem., 204:265-281, 1953.
86. SEYDÔUX, F.; BERNHARD, S.; PFENNINGER, O.; PAYNE, M.; MALHOTRA, O.P. Preparation and active-site specific properties of sturgeon muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry, 12(21):4290-4300, 1973.
87. 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.
88. SINGH, M.; SINGH, N.V.; AUGUST, J.T.; 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.
89. SOHRABY, S.S.; MAGRATH, I.T.; BALABAN, R.S. comparison of energy metabolism in human normal and neoplastic lymphoid cells (Burkitt's lymphoma). Cancer Res., 43:4662-4664, 1983.
90. SPERANZA, M.L. & GOZZER, C. Purification and properties of NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from spinach leaves. Biochim.Biophys. Acta, 552:32-42, 1978.
91. STANCEL, G.M. & DEAL, Jr. W.C. Reversible dissociation of yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by adenosine triphosphate Biochemistry. 8:4005-4011, 1969.
92. SUN, A.S.; SPEKOWITZ, K.; GELLER, A.A. Study of some mitochondrial and peroxisomal enzyme in human colonic adenocarcinoma. Lab.Invest., 44:13-17, 1981.
93. SUN, I.L. & CRANE, F.L. Antitumor drug inhibition of transplasma membrane redox function. Fed.Proc., 41:737, 1982.

94. SUZUKI, K. & HARRIS, J.I. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Bacillus stearothermophilus. FEBS Lett., 13:217-220, 1971.
95. SUZUKI, K. & IMAHORI, K. Isolation and some properties of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from vegetative cells of Bacillus cereus. J.Biochem. 73:97-106, 1973.
96. THOMAS, K.A. & SCHECHTER, A.N. Protein folding. Evolutionary, structural, and chemical aspects. In: GOLDBERG, R.F. ed. Biological regulation and development. New York, Plenum Press, 1980. V.2. p.43-100.
97. TRENTHAM, D.R. Aspects of chemistry of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochem.J., 109:603-612, 1968.
98. _____. Reactions of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase facilitated by oxidized nicotinamide-adenine-dinucleotide. Biochem.J., 122:59-69, 1971.
99. TUCKER, D. & GRISOLIA, S. Inactivation of muscle triosephosphate dehydrogenase by reduced diphosphopyridine nucleotide at physiological concentrations. J.Biol.Chem., 237:1068-1073, 1962.
100. VELICK, S.F. & FURFINE, C. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. In: BOYER, P.D.; LARDY, H.; MYRBÄCK, K. eds. Oxidation and Reduction; Part A: Nicotinamide Nucleotide-linked enzymes. Flavin nucleotide-linked enzymes. 2 ed. New York, Academic, 1963, p.243-273. (The Enzymes, 7).
101. VELTRI, R.W.; MENGOLI, H.F.; MAXIM, P.E.; WESTFALL, S.; GOPO, J.M.; HUANG, C.W. and SPRINKLE, P.M. Isolation and identification of human lung tumor-associated antigens. Cancer Res., 37:1313-1322, 1977.
102. 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., 74B(4):781-90, 1983.

103. YANG, S.T. & DEAL Jr., W.C. Metabolic control and structure of glycolytic enzymes. VI. Competitive inhibition of yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by cyclic adenosine monophosphate, adenosine triphosphate and other adenine-containing, compounds. Biochemistry, 8(7):2806-12, 1969.
104. YONUSCHOT, G.R.; ORTWERTH, B.J.; KOEPPE, O.J. Purification and properties of a nicotinamide adenine dinucleotide phosphate - requiring glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from spinach leaves. J.Biol.Chem., 245:4193-4198, 1970.
105. WALKER, J.E.; CAINE, A.F.; RUNSWICK, M.J.; BRIDGEN, J. and HARRIS, J.I. D-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Complete aminoacid sequence of the enzyme from Bacillus stearothermophilus. Eur.J. Biochem., 108:549-565, 1980.
106. WANG, C.S. & ALAUPOVIC, P. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human erythrocyte membranes. Kinetic mechanism and competitive substrate inhibition by glyceraldehyde-3-phosphate. Arch.Biochem.Biophys., 205:136-145, 1980.
107. WARBURG, O. & CHRISTIAN, H. Isolierung und kristallisation des garungs ferments enolase. Biochem.Z., 310:384-421, 1941.
108. WARBURG, O. Überden stoffwechsel der tumoren. Berlin, Springer Verlag, 1926.
109. WEBER, G. Enzymology of cancer cells. First of two parts. N.Eng.J.Med. 296:486-493, 1977 a.
110. _____. Enzymology of cancer cells. Second of two parts. N.Eng.J.Med. 296:541-551, 1977 b.
111. WEBER, K. & OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecil sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J.Biol.Chem., 244:4406-4412, 1969.