



Fosfofrutocinase-1, Clotrimazol e Aldolase: um
estudo sobre as propriedades cinéticas e regulações
da enzima chave da glicólise.

Mariah Celestino Marcondes

Dissertação submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro visando
obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
2009

Folha de Aprovação

“Fosfofrutocinase-1, Clotrimazol e Aldolase: um estudo sobre as propriedades cinéticas e regulações da enzima chave da glicólise.”

Mariah Celestino Marcondes

Dissertação submetida ao corpo docente da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Membros da Banca Examinadora:

Profa. Ana Acácia Pinheiro Caruso Neves
Professora Adjunta do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

Prof. José Roberto Meyer Fernandes
Professor Associado do Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ

Prof. Luis Mauricio T. R. Lima
Professor Adjunto do Departamento de Medicamentos, FF, UFRJ

Prof. Celso Caruso Neves
Professora Associado do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

Prof. Mauro Sola Penna
Professor Associado do Departamento de Fármacos, FF, UFRJ

Profa. Patricia Zancan
Professora Adjunta do Departamento de Fármacos, FF, UFRJ
Orientadora

Rio de Janeiro, RJ, Brasil
Outubro, 2009

Ficha Catalográfica

MARCONDES, Mariah Celestino.

Fosfofrutocinase-1, Clotrimazol e Aldolase: um estudo sobre as propriedades cinéticas e regulações da enzima chave da glicólise. Rio de Janeiro, UFRJ, Faculdade de Farmácia, CCS, 2005.

XIX, 97 f.

Dissertação – Mestre em Ciências Farmacêuticas

1. Fosfofrutocinase-1. 2. Clotrimazol. 3. Aldolase. 4. Glicólise.

I. Universidade Federal do Rio de Janeiro

II. Fosfofrutocinase-1, Clotrimazol e Aldolase: um estudo sobre as propriedades cinéticas e regulações da enzima chave da glicólise.



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Oncobiologia Molecular – LabOMol, do Departamento de Fármacos, Faculdade de Farmácia, CCS/ UFRJ, sob a orientação da Professora Patricia Zancan. O projeto obteve apoio financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Fundação Ari Frausino/Fundação Educacional Charles Darwin (FAF/FECD).

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus.

Agradeço aos meus pais, Regina e Alexandre, pelo apoio, incentivo e também pela paciência de me aturar nos momentos de stress. Apesar deles nunca entenderem o que eu faço, mas sempre assim acharem um máximo (meu pai perguntou se poderia levar para o trabalho meu pôster de uma jornada para mostrar pros amigos). Fico orgulhosa de vocês sentirem orgulho de mim! Obrigada por tudo.

Ao meu namorado, Henrique, pela compreensão, dos dias inteiros que passei estudando, pelas noites que não saímos, pelas viagens que não pude ir...enfim, aguentou isso tudo, vai aguentar ainda mais 4 anos do Doutorado...rs. Obrigada por tudo.

A minha orientadora, Patrícia Zancan, desde a época do LabECom e agora no LabOMol, já são 4 anos, como passa rápido! Admiro a sua garra e determinação. Durante esse tempo, rimos muito, trabalhamos muitooooo, muita coisa deu errada, mas muito também deu certo (afinal estou aqui agora né!), enfim serão mais 4 anos juntas, se Deus quiser no Doutorado. Obrigado pelo seu incentivo, pelas suas idéias de experimentos e explicações, por todo tempo gasto comigo, por essa correria para finalização da dissertação e pela correria da seleção de Doutorado. Obrigado por tudo. Muito trabalho ainda está por vir...

Sabe aquela pessoa que sabe tudooooo, simplesmente tudooooo, o que você perguntar ele sabe responder, esse é o Professor Mauro Sola Penna. Sempre disposto a ajudar, contribuiu e muito para a finalização dessa dissertação. Sempre com suas explicações e idéias enriquecedoras que me fazem admirá-lo muito não só como professor e cientista, mas também como pessoa! Obrigado por tudo.

Aos meus amigos do LabOMol, Cristiane e Renan, nós já passamos de tudo juntos não é mesmo. Pelos momentos de pagode (Vamos pro show do Belo?), pelos momentos de fofoca, pelos momentos de dança (ah, deixa quieto). Obrigado por fazerem os dias de trabalho mais alegres e divertidos, ah e também pelos momentos de discussão sobre experimentos, artigos, protocolos, enfim, estamos no mesmo barco (ainda vai chegar a vez de vocês hahaha). Obrigado por tudo.

Agradeço a minha banca de acompanhamento, Professor Luis Maurício Trambaioli e Mauro Sola Penna, pelas correções e idéias para conclusão dessa dissertação. Obrigado por tudo.

Aos meus amigos do LabECom, com os quais eu passei um bom tempo junto! Mesmo em laboratórios separados, a amizade continua e as discussões científicas também. Obrigado por tudo.

Aos meus amigos da graduação de Farmácia da UFRJ principalmente aqueles que continuam na UFRJ fazendo Mestrado/Doutorado. Nossas conversas sobre o que fazemos em nossos laboratórios sempre ajudam a entendermos mais sobre alguma técnica ou sobre algum protocolo. Obrigado por tudo.

Agradeço a minha Banca de Defesa por ter aceitado este desafio em cima da hora: Profa. Ana Acácia, Prof. José Roberto, Prof. Luis Maurício Trambaioli e os Profs. Celso Caruso e Mauro Sola Penna. Muito obrigado.

RESUMO

O Clotrimazol (CTZ) é um derivado azólico com atividade antifúngica recentemente reconhecido como antagonista de calmodulina (CaM) apresentando promissores efeitos antitumorais. Esta propriedade tem sido correlacionada com a habilidade deste fármaco em diminuir a viabilidade das células tumorais através da inibição do seu fluxo glicolítico e consequente decréscimo na concentração intracelular de ATP. Recentemente, nós demonstramos que o CTZ inibe diretamente a enzima chave da glicólise, Fosfofrutocinase-1 (PFK-1), através da dimerização desta, reduzindo a população de tetrameros, os quais são mais ativos que os dímeros. Este efeito é independente da propriedade anti-CaM do fármaco, uma vez que ela não é mimetizada pelo clássico antagonista da CaM, o Composto 48/80. Outra forma de regulação da PFK-1 acontece pela sua associação com outras proteínas citosólicas, como a Aldolase. Curiosamente, a forma dimérica da PFK-1, originalmente inativa, quando associada à Aldolase apresenta atividade similar a forma tetramérica. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o papel do CTZ sobre a PFK-1 e sobre o complexo bienzimático PFK-1-Aldolase. Nossos resultados revelaram que a inibição da atividade catalítica da PFK-1 por 50 μ M de CTZ é dependente do tempo de exposição da enzima ao fármaco, durante o qual ocorre a dimerização da enzima. Além disso, o CTZ diminuiu a afinidade da PFK-1 pelos seus substratos, frutose 6-fosfato e ATP. Observamos ainda que a aldolase foi capaz de proteger a PFK-1 do efeito inibitório promovido pelo CTZ. Essa proteção também foi vista em diferentes condições metabólicas, onde variamos as concentrações de frutose 6-fosfato, ATP, proteína e diferentes valores de pH. O CTZ foi capaz de promover um

efeito inibitório sobre a atividade da Aldolase, no entanto, a presença da PFK-1 não foi capaz de proteger a enzima desse efeito, como visto no caso inverso, mesmo a PFK-1 apresentando um efeito ativador sobre a aldolase na ausência do CTZ. Por todo o exposto, nossos resultados suportam uma ação do CTZ como um modulador negativo do fluxo glicolítico através da inibição direta da PFK-1 e da aldolase. Assim, o CTZ apresenta-se como um potencial fármaco com efeitos antineoplásicos.

ABSTRACT

Clotrimazole (CTZ) is an antifungal azole derivative recently recognized as a calmodulin (CaM) antagonist with promising anticancer effects. This property has been correlated to the ability of the drug to decrease the viability of tumor cells by inhibiting their glycolytic flux and consequently decreasing the intracellular ATP concentration. The effects of CTZ on cell glycolysis and ATP production are considered to be due to the detachment of the glycolytic enzymes from the cytoskeleton. Recently, we have shown that CTZ directly inhibits the key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1), since it alone induces the dimerization of PFK reducing the population of tetramers, which are more active than dimers. This effect is not dependent on the anti-CaM property, since it is not mimicked by the classic CaM antagonist, the compound 48/80. Another form of PFK-1 regulation occurs by its association with other cytosolic proteins, such as aldolase. Interestingly, the dimeric form of PFK-1, originally inactive, when associated to aldolase, presents catalytic activity similar to the tetrameric form. The objective of this study was to evaluate the role of CTZ on the PFK-1 and on the complex PFK-1-Aldolase. Our results indicate that the inhibition of the catalytic activity of PFK-1 by 50 μ M of CTZ is dependent on exposure time of the enzyme to the drug, when the dimerization of the enzyme occurs. In addition, CTZ decreases the affinity of PFK-1 to its substrates, fructose 6-phosphate and ATP. We further show that aldolase was able to protect PFK-1 against inhibition promoted by CTZ. This protection is also seen at different metabolic conditions, where various concentrations of fructose 6-phosphate, ATP, protein and different pH values were tested. CTZ was able to promote an inhibitory effect on the

activity of aldolase. However, the presence of PFK-1 is not able to protect the enzyme, as seen in the opposite case, even PFK-1 featuring an activatory effect on aldolase in the absence of CTZ. For all, our results support an action of CTZ as a negative modulator of glycolytic flux through the direct inhibition of PFK-1 and aldolase. Thus, the CTZ is presented as a potential anticancer drug.

LISTA DE ABREVIATURAS

(NH₄)₂SO₄ Sulfato de amônia

[γ ³²P] ATP Adenosina 5'-trifosfato marcado radioativamente no fosfato gama

³²[Pi] Fosfato inorgânico marcado com isótopo radioativo de fósforo

ADP Adenosina 5'difosfato

AIF Fator indutor de apoptose

AMP Adenosina 5'monofosfato

ATP Adenosina 5'trifosfato

Ca²⁺ Íon cálcio

CaM Calmodulina

CM Centro de massa

CTZ Clotrimazol

DL₅₀ Dose letal para metade (50%) de um grupo de animais

DMSO Dimetilsulfóxido

DSS Dissuccinimidil Suberato

EDTA Ácido etileno-diamino tetracético

F-ACTINA Actina filamentosa

F6P Frutose 6-fosfato

F1,6BP Frutose 1,6-bifosfato

F2,6BP Frutose 2,6-bifosfato

FDG Flúor-deoxiglicose

G6P Glicose 6-fosfato

GAPDH Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GdmCl Hidrocloro de guanidina

GLUT Transportadores de glicose por difusão facilitada

GSDVII Síndrome de Tauri ou doença do armazenamento de glicogênio tipo VII

HCl Ácido clorídrico

HK Hexocinase

HPLC Cromatografia líquida de alta eficiência

IC₅₀ Concentração do fármaco que inibe o crescimento de 50% das células

K_a Constante de afinidade

KDa Quilo Dalton

K_i Constante de inibição

K_m Constante Michaelis-Menten

K_{0,5} Constante aparente de afinidade

LDH Lactato desidrogenase

Mg⁺² Íon Magnésio

MgCl₂ Cloreto de Magnésio

MRC Meio de reação comum

n de Hill Índice de cooperatividade para ativação

NaCl Cloreto de Sódio

NAD⁺ Nicotinamida adenosina dinucleotídeo oxidada

NADH Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido

NaF Fluoreto de sódio

NH₄ Amônia

NHS Hidróxi succinimida

PET Tomografia de emissão de pósitrons

PFK-1 Fosfofrutocinase-1

PFK-2 Fosfofrutocinase-2

PFK-1 L Isoforma hepática da PFK-1

PFK-1 M Isoforma muscular da PFK-1

PFK-1 P Isoforma plaquetária da PFK-1

Pi Fosfato inorgânico

PK Piruvato cinase

PKA Proteína cinase A

PKC Proteína cinase C

PM Peso molecular

SDS Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio

T_{0,5} Tempos para atingir 50% de morte celular

TFP Trifluoperazina

TPI Triosefosfato isomerase

TRIS Tris (hidroximetil) aminometano

V_o Volume de exclusão

V_i Velocidade inicial

V_t Velocidade total

V_{max} Velocidade máxima

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1 - Via glicolítica: da glicose ao piruvato 6
- Figura 2 - Reação catalisada pela lactato desidrogenase 10
- Figura 3 - Reação catalisada pela enzima Fosfofrutocinase-1 12
- Figura 4 - Transição do equilíbrio oligomérico da Fosfofrutocinase-1 (esquema ilustrativo) 15
- Figura 5 - Reação catalisada pela Aldolase 16
- Figura 6 - Regulação e interação da fosfofrutocinase-1 com aldolase 18
- Figura 7 - Estrutura química do clotrimazol 22
- Figura 8 - Efeito do clotrimazol sobre a atividade catalítica da PFK-1 mensurada em pH 7.4 37
- Figura 9 - Curva com diferentes concentrações de CTZ sobre a atividade catalítica da PFK-1 em pH 7.4 38
- Figura 10 - Efeito do CTZ sobre a estrutura quaternária da PFK-1 por cromatografia de gel filtração 39
- Figura 11 - Efeito imediato de 50 μ M de CTZ na atividade fosfofrutocinásica 40
- Figura 12 - Curvas de centro de massa do espectro de fluorescência intrínseca da PFK-1 em função do tempo de exposição ao CTZ 42
- Figura 13 - Estrutura química do Dissuccinimidil Suberato 43
- Figura 14 - Avaliação da modulação da conformação oligomérica da PFK-1 pelo CTZ 45
- Figura 15 - Efeito do pH sobre a atividade catalítica da PFK-1 na presença do CTZ 47

- Figura 16 - Efeito do CTZ sobre a atividade da PFK-1 em uma curva de ATP 49
- Tabela 1 - Parâmetros cinéticos para os efeitos do ATP sobre a atividade da PFK na ausência e na presença de CTZ 49
- Figura 17 - Efeito do clotrimazol na curva de frutose 6-fosfato da atividade da PFK-1 51
- Tabela 2 - Parâmetros cinéticos para os efeitos da frutose 6-fosfato sobre a atividade da PFK na ausência e na presença de CTZ 51
- Figura 18 - Curva com concentrações crescentes de PFK-1 na presença do CTZ 53
- Figura 19 - Efeito do CTZ na estrutura oligomérica do complexo bienzimático PFK-1-Aldolase 54
- Figura 20 - Efeito do CTZ na estrutura oligomérica do complexo bienzimático PFK-1-Aldolase com pré-incubação do fármaco 55
- Figura 21 - Curva de atividade fosfofrutocinásica com diferentes concentrações de Aldolase na ausência e presença de 50 μ M de CTZ 57
- Figura 22 - Efeito do CTZ sobre a curva de pH da atividade do complexo PFK-1-Aldolase 58
- Figura 23 - Efeito do CTZ sobre a atividade do complexo PFK-1-Aldolase em diferentes concentrações de ATP 59
- Tabela 3 - Parâmetros cinéticos para os efeitos do ATP sobre a atividade da PFK associada com a Aldolase na ausência e na presença de CTZ 59
- Figura 24 - Efeito do CTZ sobre a atividade do complexo PFK-1-Aldolase em diferentes concentrações de frutose-6-fosfato 60
- Tabela 4 - Parâmetros cinéticos para os efeitos da frutose-6-fosfato sobre a atividade da PFK-1 associada com a Aldolase na ausência e na presença de CTZ 60

- Figura 25 - Curva de diferentes concentrações do complexo PFK-1-Aldolase na ausência e presença de CTZ 61
- Figura 26 - Curva de atividade da Aldolase na ausência e presença de 50 μ M de CTZ 63
- Figura 27 - Atividade catalítica da Aldolase na presença da PFK-1 64
- Figura 28 - Efeito do CTZ sobre a atividade da Aldolase na presença da PFK-1 65
- Figura 29 - Efeito da interação PFK-1-Aldolase na presença e ausência de CTZ sobre a atividade catalítica da PFK-1 e Aldolase 66

SUMÁRIO

1. Introdução

1.1. Câncer 1

1.2. Metabolismo de glicose 4

1.3. Fosfofrutocinase-1 11

1.4. Aldolase 16

1.5. Interações proteína-proteína 19

1.6. Clotrimazol 21

1.6.1. Clotrimazol na clínica 21

1.6.2. Clotrimazol como antagonista de calmodulina 24

1.6.3. Clotrimazol e câncer 25

2. Objetivos 27

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais 28

3.2. Purificação da Fosfofrutocinase-1 de músculo esquelético de coelho 28

3.3. Dosagem de proteína 31

3.4. Síntese de ATP radioativo 31

3.5. Ensaio radiométrico para quantificação da atividade fosfofrutocinásica 32

3.6. Ensaio espectrofotométrico para quantificação da atividade da aldolase

(Sistema Acoplado) 32

- 3.7. Espectroscopia de emissão de fluorescência da PFK-1 33
- 3.8. Cromatografia de gel filtração em Superose 12 34
- 3.9. Eletroforese SDS-PAGE e *Western Blot* com reagente de *cross-linker* 34
- 3.10. Análises estatísticas e Cálculos 35

4. Resultados

- 4.1. Efeito do clotrimazol na atividade e na estrutura quaternária da fosfofrutocinase-1 purificada de músculo esquelético de coelho 36
- 4.2. Avaliação dos parâmetros cinéticos da fosfofrutocinase-1 e das alterações promovidas pelo CTZ 44
- 4.3. Análise estrutural e da atividade do complexo PFK-1-Aldolase na presença do CTZ 52
- 4.4. Estudo dos parâmetros cinéticos do complexo PFK-1-Aldolase na presença de CTZ 56
- 4.5. Efeito do clotrimazol na atividade catalítica da Aldolase 62

5. Discussão 67

6. Conclusões 70

7. Perspectivas 71

8. Referências Bibliográficas 72

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores ou neoplasias malignas. Por outro lado, um tumor benigno significa simplesmente uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida (Organização Mundial da Saúde, 2009).

O Brasil classifica-se entre os países com maior incidência de câncer em todo o mundo. As estimativas para o ano de 2008 e válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.740 novos casos de câncer a cada ano no Brasil, onde somente os tumores de mama feminina atingirão cerca de 50 mil novos casos (Instituto Nacional de Câncer, 2009)

As neoplasias mais agressivas são aquelas que possuem elevada taxa de divisão celular. Portanto, mudanças profundas no metabolismo energético dessas células ocorrem para que elas possam atingir esse estágio anormal de proliferação (El-Bacha *et al.*, 2003). A grande maioria das linhagens tumorais possui um metabolismo energético notavelmente modificado se comparadas com os tecidos de origem, como observado em tumores das glândulas mamárias (MCF-7, MDA-MB-453, MDA-MB-231) (Mazurek *et al.*, 1997).

Em 1920, Otto Warburg, ganhador do prêmio Nobel pela descoberta do citocromo c oxidase e pelo seu importante trabalho sobre respiração mitocondrial e metabolismo celular, foi o primeiro a observar que tecidos tumorais do fígado apresentavam um aumento na atividade glicolítica, mesmo na presença de oxigênio, quando comparados com tecidos normais do mesmo órgão. O fenômeno que essas células tumorais apresentaram em gerar ATP sob condições aeróbicas é conhecido como o ‘efeito Warburg’ (Warburg, 1956). Desde então, as observações experimentais da glicólise aumentada em tumores mesmo na presença de oxigênio têm sido repetidamente verificadas (Semenza, 2002; Gatenby e Gillies, 2004). De fato, o fluxo glicolítico é de 2 a 17 vezes maior em hepatomas de ratos do que em hepatócitos normais (Zu e Guppy, 2004; Marin-Hernández *et al.*, 2006), assim como em outras neoplasias. A diferença entre o metabolismo glicolítico em tumores e em células normais baseia-se no fato de que na maioria das células de mamíferos sadias a glicólise é inibida pela presença de oxigênio, o qual permite que a mitocôndria oxide piruvato em CO₂ e H₂O. Esta inibição é chamada de ‘efeito pasteur’ onde o fluxo de glicose é reduzido pela presença de oxigênio (Racker, 1974).

Algumas características da glicólise aeróbica tumoral são efetivamente utilizadas como marcadores para procedimentos de diagnóstico e tratamentos do câncer. A tomografia de emissão de pósitrons (PET) baseado na utilização de um análogo de glicose, o flúor-deoxiciglicose (FDG), conhecida como *FDG-PET scan*, é amplamente empregada para esses fins (Kherlopian *et al.*, 2008). Esta técnica é baseada no aumento da capacidade das células tumorais em captar glicose (‘efeito Warburg’) e, uma vez que a sonda de FDG não é metabolizada, esta acumula-se nos tecidos, facilitando a identificação dos tumores (Kherlopian *et al.*, 2008).

Além da sua utilização para diagnóstico, a glicólise aeróbica pode também servir como uma importante ferramenta para a terapia antineoplásica. Esta abordagem é conhecida como ‘terapia metabólica’ (Moreno-Sánchez *et al.*, 2007) e baseia-se no fato das células tumorais apresentarem-se mais sensíveis ao tratamento com os inibidores do metabolismo energético do que as células saudáveis, já que a glicólise aeróbica aumentada é somente observada em cânceres (Warburg, 1956; Moreno-Sánchez *et al.*, 2007). Além disso, uma combinação de inibidores do metabolismo energético com outros fármacos antitumorais poderia aumentar a eficácia do tratamento do câncer (Kroemer e Pouyssegur, 2008).

Com base na hipótese de Warburg, diversos grupos têm investigado a possibilidade do desenvolvimento de compostos capazes de inibir a glicólise. Vários compostos foram amplamente avaliados *in vitro* e *in vivo*, como a 2-deoxiglucose, que inibe a primeira enzima da via glicolítica, a hexocinase (HK). Este fármaco, utilizado em concentrações milimolares, provoca a diminuição do ATP intracelular e conseqüentemente a morte celular, especialmente em células cancerígenas com defeitos na respiração mitocondrial ou células em hipóxia (Liu *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002; Maher *et al.*, 2004). Zhao e colaboradores (2009) mostraram que o 3-bromopiruvato é capaz de promover uma modificação covalente na hexocinase do tipo II (HKII), o que diretamente provoca sua dissociação da mitocôndria, levando a liberação específica do fator indutor de apoptose (AIF) da mitocôndria para o citosol e assim promovendo a morte de diferentes tipos celulares.

Dentre essa classe de agentes que agem sobre o metabolismo glicolítico, destaca-se o clotrimazol (CTZ), utilizado na clínica como antifúngico e que foi reconhecido como antagonista de calmodulina (CaM) (Hegemann *et al.*, 1993). De acordo com a literatura, o

CTZ também age como um inibidor do fluxo glicolítico, através da inibição da atividade da enzima chave da glicólise, a fosfofrutocinase-1 (PFK-1), dentre outras ações (Glass-Marmor *et al.*, 1996; Glass-Marmor e Beitner, 1997; Penso e Beitner, 2002a; Penso e Beitner 2002b; Meira *et al.*, 2005) Como consequência desta inibição, o CTZ diminui a viabilidade de linhagens celulares derivadas do câncer de mama, MCF-7 (Meira *et al.*, 2005), de células CT-26 de adenocarcinoma do cólon e células de Lewis de carcinoma do pulmão (Penso e Beitner, 2002a; Penso e Beitner 2002b), e de células B16 de melanoma (Glass-Marmor *et al.*, 1996; Glass-Marmor e Beitner, 1997).

1.2 Metabolismo de glicose

O principal carboidrato presente nos alimentos é o amido, um polissacarídeo. Ao amido seguem-se a sacarose e a lactose, dois dissacarídeos. Enzimas específicas, tais como a sacarase, a lactase, entre outras, presentes nas células da mucosa intestinal, quebram os dissacarídeos em monossacarídeos: glicose, frutose e galactose (Grabitske e Slavin, 2009). Os monossacarídeos formados são absorvidos do intestino para a circulação sanguínea, onde podem ser captados por todas as células do organismo.

A captação de glicose ocorre através de proteínas transportadoras específicas, sendo denominadas de uma forma geral de GLUT (transportadores de glicose – *Glucose transporter*). Várias isoformas de GLUT já foram identificadas e clonadas (Manolescu *et al.*, 2007) que apresentam diferentes afinidades e capacidades de transportar glicose e que são expressas em diferentes tecidos. O GLUT 1 foi o primeiro transportador por difusão facilitada identificado e está presente na placenta, cérebro, rins, eritrócitos e cólon; também está presente em baixa quantidade no tecido adiposo e muscular. O GLUT 2 está presente,

predominantemente, no fígado e nas células β pancreáticas, estando envolvido no mecanismo, regulado por glicose, que leva à secreção de insulina. O GLUT 3 é encontrado em múltiplos tecidos, incluindo cérebro, placenta e rins. O GLUT 5 é encontrado, predominantemente, no intestino delgado (Mueckler, 1994). Os GLUT 1, 3 e 5 são os principais transportadores envolvidos na captação basal de glicose (Bell *et al.*, 1990). O GLUT 4 parece ser o único transportador de glicose regulado por estímulo insulinêmico e por contração muscular, sendo encontrado, exclusivamente, nos músculos esqueléticos, cardíaco e no tecido adiposo (Birnbaum, 1992; Murray *et al.*, 2003). Já as isoformas de GLUT 6-14 ainda não têm um papel bem determinado para o transporte de glicose (Manolescu *et al.*, 2007). Independente do estímulo inicial, quando internalizada, a glicose é rapidamente fosforilada podendo ser direcionada para alguma via metabólica, como por exemplo: via glicolítica, via das pentoses fosfato, síntese de glicogênio, dentre outras.

A glicólise, também conhecida como via de Embden-Meyerhof, em mamíferos é a principal via no fornecimento de energia à maioria das células (Figura 1). Devido a sua capacidade de disponibilizar adenosina 5'trifosfato (ATP) rapidamente e não depender do metabolismo oxidativo e, conseqüentemente, da presença de oxigênio, esta via assume fundamental importância para a sobrevivência celular (Stanley e Connett, 1991), sendo, portanto, fortemente regulada por vários mecanismos diferentes (Beitner *et al.*, 1979).

A via glicolítica consiste de 2 fases separadas. A primeira fase é a fase preparatória, que requer energia na forma de ATP para ativar a molécula de glicose, através da sua fosforilação, para as reações oxidativas posteriores. A segunda fase é a fase de pagamento ou produtora de energia. Na primeira, 2 equivalentes de ATP são utilizados para converter a

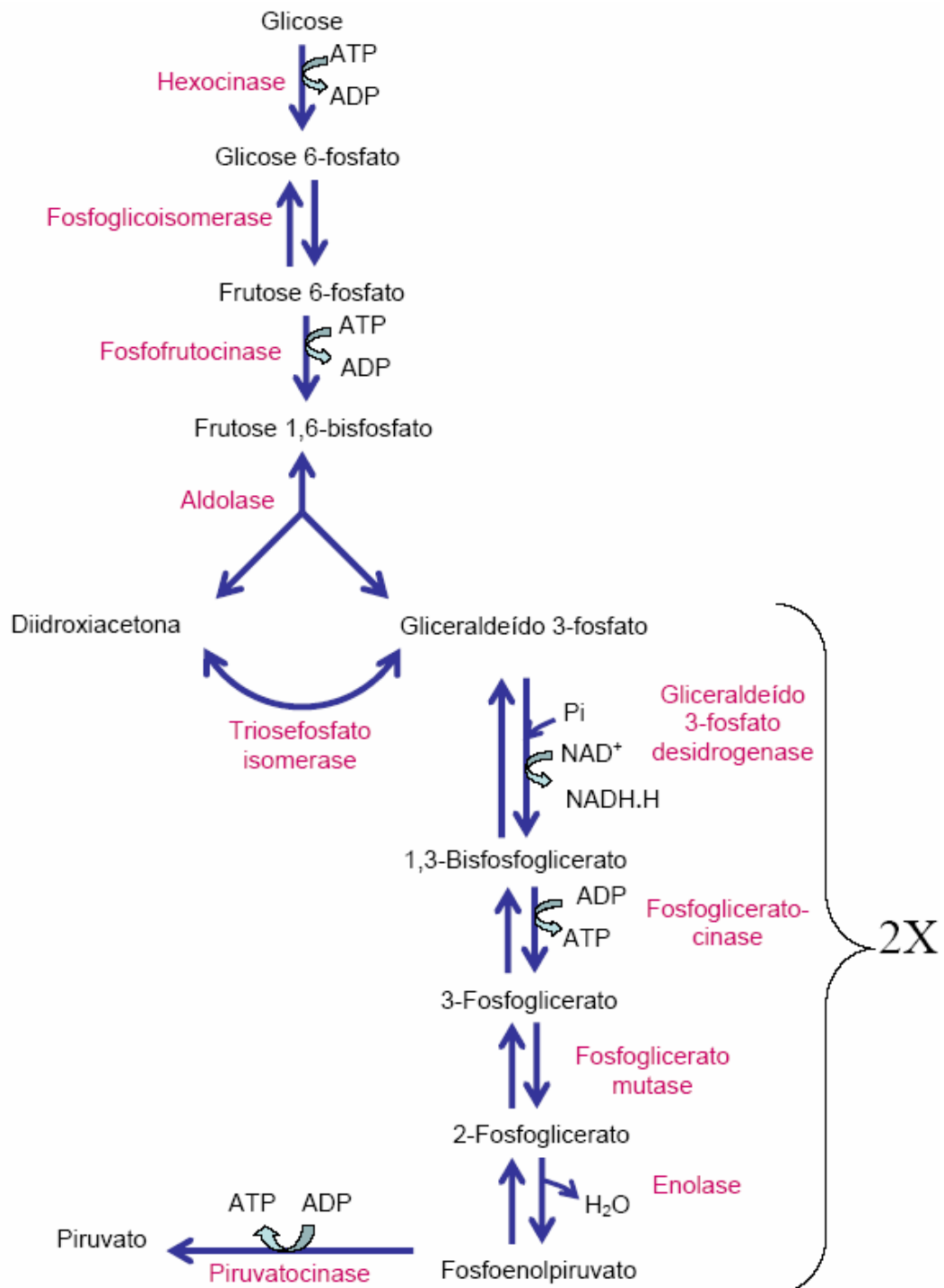
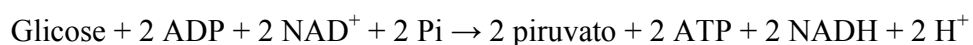


Figura 1. Via Glicolítica: da glicose ao piruvato. Figura obtida no *site* www.icb.ufmg.br.

glicose em 2 moléculas de gliceraldeído 3-fosfato. Na segunda fase, o gliceraldeído 3-fosfato é degradado em piruvato, com a produção de 4 equivalentes de ATP e 2 equivalentes de NADH (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido) (Nelson e Cox, 2000). A oxidação parcial da glicose pela via glicolítica pode ser resumida pela seguinte reação:



O NADH gerado durante a glicólise pode ser utilizado pela mitocôndria na síntese de ATP via fosforilação oxidativa, produzindo 2 ou 3 equivalentes de ATP. O rendimento líquido da oxidação de 1 mol de glicose em 2 moles de piruvato é, portanto, 6 ou 8 moles de ATP. A completa oxidação de 2 moles de piruvato, através do ciclo de Krebs e da cadeia de transporte de elétrons, produz um adicional de 30 moles de ATP; o rendimento total, portanto, é 36 ou 38 moles de ATP obtidos pela oxidação completa de 1 mol de glicose em CO₂ e H₂O (Nelson e Cox, 2000).

A primeira reação da glicólise é catalisada pela hexocinase (HK), uma das três enzimas reguladoras do fluxo através desta via. Essa enzima catalisa a transferência de um grupamento fosfato do ATP para a glicose formando glicose 6-fosfato (G6P), como descrito por Grossbard e Schimke (1966). Esta reação é irreversível em condições fisiológicas, sendo um dos pontos de controle da via. González *et al.*, (1964) descreveram que em células humanas, a HK ocorre em quatro isoformas (I-IV). A isoenzima tipo IV (glicocinase) apresenta uma baixa afinidade pelo substrato G6P, com metade da saturação

em aproximadamente 6 mM de G6P. Em contraste, as isoenzimas tipo I (expressa principalmente no cérebro e rim), tipo II (encontrada principalmente no coração e no músculo esquelético) e tipo III (encontrada virtualmente em todos os tecidos) apresentam alta afinidade pelo substrato, com valores de K_m em faixa submilimolar e apresentam susceptibilidade a inibição por *feed-back* em níveis fisiológicos de G6P, com valores de K_i na faixa de micromolar (Sebastian *et al.*, 1999). A G6P gerada pela HK não é capaz de sair de célula, uma vez que a membrana plasmática, bem como os GLUTs são impermeáveis a G6P (Wilson, 2003).

A segunda reação da glicólise é uma isomerização, na qual a G6P é convertida em frutose 6-fosfato (F6P) pela enzima fosfoglicoisomerase. Esta reação é livremente reversível em condições celulares normais.

A próxima reação da glicólise envolve a utilização de um segundo ATP para converter a frutose 6-fosfato em frutose 1,6-bifosfato (F1,6BP) e é catalisada pela fosfofrutocinase-1 (PFK-1). Esta é a segunda reação irreversível desta via, em condições fisiológicas, sendo descrita como o principal ponto de controle de todo o fluxo glicolítico (Uyeda, 1979; Kemp e Foe, 1983).

A Aldolase catalisa a hidrólise da F1,6BP em dois produtos de 3 carbonos cada: a diidroxiacetona fosfato e o gliceraldeído 3-fosfato. Estes dois produtos da reação da Aldolase equilibram-se, facilmente, na reação catalisada pela triosefosfato isomerase. As reações subsequentes da glicólise utilizam o gliceraldeído 3-fosfato como substrato, assim, os produtos da reação da Aldolase são direcionados no sentido da glicólise pelo princípio de ação das massas (Nelson e Cox, 2000).

A segunda fase do catabolismo da glicose é caracterizada pelas reações que geram energia pela produção de ATP e NADH. Na primeira destas reações, a gliceraldeído 3-

fosfato desidrogenase (GAPDH) catalisa a oxidação, dependente de NAD^+ (Nicotinamida adenosina dinucleotídeo oxidada), do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato e NADH (Eto *et al.*, 1999). O 1,3-bifosfoglicerato é utilizado para formar ATP e 3-fosfoglicerato pela enzima fosfoglicerato cinase. Associada com a via da enzima bifuncional fosfoglicerato cinase/bifosfoglicerato mutase, está uma importante reação em eritrócitos formando 2,3-bifosfoglicerato pela ação da enzima bifosfoglicerato mutase. Esta molécula é um importante modulador da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio (Metivier *et al.*, 2000). Nas reações restantes da glicólise, o 3-fosfoglicerato é convertido em 2-fosfoglicerato pela fosfoglicerato mutase e, em seguida, a conversão deste em fosfoenolpiruvato é catalisada pela enolase.

A reação final da glicólise aeróbica é catalisada pela piruvato cinase (PK), uma enzima altamente regulada, sendo a terceira enzima que catalisa uma reação irreversível, em condições fisiológicas, da via glicolítica (Gupta *et al.*, 1976). Nesta reação altamente exergônica, o ADP, juntamente com o fosfato de alta energia do fosfoenolpiruvato, é convertido em ATP. A perda do fosfato pelo fosfoenolpiruvato leva à produção do piruvato numa forma enol instável que é, espontaneamente, tautomerizado para uma forma ceto mais estável do piruvato.

Sob condições aeróbicas, o piruvato, na maioria das células, é metabolizado pela via ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Contudo, sob condições anaeróbicas e, em eritrócitos sob condições aeróbicas, o piruvato é convertido em lactato pela enzima lactato desidrogenase (LDH) (Figura 2). O lactato produzido é transportado para fora da célula, entrando na circulação sanguínea (Brooks, 2000). A conversão de piruvato em lactato fornece à célula um mecanismo para a oxidação do NADH (produzido durante a reação da GAPDH) em NAD^+ , o que é necessária uma vez que NAD^+ é um importante substrato para a GAPDH.



Figura 2. Reação catalisada pela lactato desidrogenase (Nelson e Cox, 2000).

Teoricamente, todas as células do organismo são capazes de sintetizar lactato, mas o músculo esquelético é o principal produtor deste metabólito, principalmente em situações de exercício com intensidade elevada (Robergs, 2004). Normalmente, durante a glicólise aeróbia, os elétrons do NADH citosólico são transferidos para os carreadores mitocondriais da fosforilação oxidativa, gerando um *pool* contínuo de NAD^+ citosólico (Nelson e Cox, 2000). A glicólise em condições aeróbias gera substancialmente mais ATP por mol de glicose oxidada do que em condições anaeróbias; entretanto, neste último caso, a produção de ATP pela glicólise é aproximadamente 100 vezes mais rápida do que pela fosforilação oxidativa.

Além de degradar glicose para gerar ATP, a glicólise também fornece blocos de construção para reações de síntese, como a formação de ácidos graxos de cadeia longa e aminoácidos (Nelson e Cox, 2000). Assim, a velocidade de conversão de glicose a piruvato é regulada para atender a essas necessidades. As reações catalisadas pela hexocinase, pela fosfofrutocinase-1 e pela piruvato cinase, como dito anteriormente, representam passos limitante do fluxo, são irreversíveis em condições fisiológicas, portanto apresentam papéis

reguladores além dos catalíticos (Weber *et al.*, 1965). A modulação da HK, apesar de ser um ponto chave regulatório da glicólise, apresentando fundamental importância, não é a principal etapa de controle, uma vez que grandes quantidades de G6P, são derivadas da quebra do glicogênio (Cornish-Bowden e Cardenas, 1991). Da mesma forma, a regulação da PK é importante para a reversibilidade da glicólise (ativação da gliconeogênese) em situações onde o nível de ATP está alto (Doiron *et al.*, 1996). Dentre as três enzimas regulatórias do fluxo glicolítico, a PFK-1 é considerada a principal e o ponto chave da regulação do metabolismo glicolítico e a etapa que apresenta a maior complexidade de mecanismos regulatórios (Passonneau e Lowry, 1962; Uyeda, 1979; Kemp e Foe, 1983). Assim, esta enzima será abordada com maiores detalhes no próximo tópico.

1.3 Fosfofrutocinase-1

A fosfofrutocinase-1 (PFK-1, ATP: D-frutose 6-fosfato 1-fosfotransferase, EC 2.7.1.11) tem sua atividade correlacionada com a atividade de toda a via glicolítica e é a primeira reação exclusiva da glicólise (Uyeda, 1979; Kemp e Foe, 1983). A PFK-1 catalisa a transferência irreversível, em condições metabólicas normais, do grupo fosfato gama terminal do ATP para frutose 6-fosfato formando frutose 1,6-bisfosfato e ADP na presença do íon cofator Mg^{+2} (Uyeda, 1979), como visto na Figura 3.

Embora a PFK-1 bacteriana e de mamíferos apresentem características básicas de estrutura e função similares, a regulação alostérica da cinase de mamíferos é muito mais complexa. Em mamíferos as subunidades do tetrâmero possuem 80 KDa, cada uma consistindo de dois domínios homólogos altamente relacionados às subunidades bacterianas (Uyeda, 1969). A PFK-1 de *Escherichia coli* (Hellinga e Evans, 1985) ou a PFK-1 de

Bacillus stearotherophilus (Kolb *et al.*, 1980) possuem cerca de 35 KDa. Em leveduras a PFK-1 é um octâmero composto de 4 subunidades α de 100 KDa cada, e quatro subunidades β também de 100 KDa; como em mamíferos, cada subunidade é composta de dois domínios homólogos (Heinisch *et al.*, 1989).

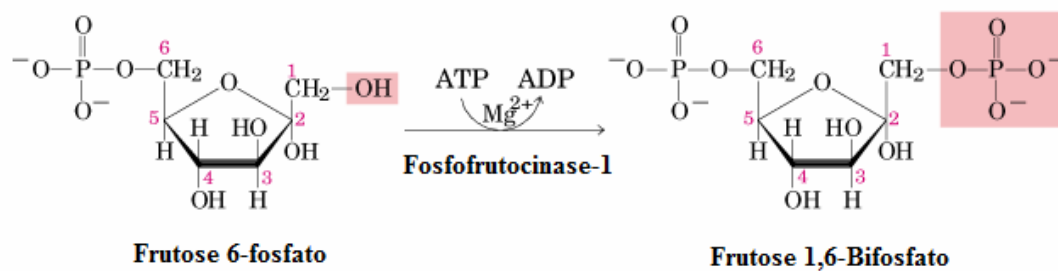


Figura 3. Reação catalisada pela enzima Fosfofrutocinase-1. Adaptado de Nelson e Cox (2000).

Já foi estabelecida a existência de 3 *loci* estruturais para a PFK-1: PFK-1-M, PFK-1-L e PFK-1-P codificando distintas subunidades da PFK-1 no músculo, no fígado e plaquetas, respectivamente (Vora e Francke, 1981). Dependendo do tecido, pode haver a expressão de um, dois ou dos três genes que codificam a PFK-1. Os produtos destes genes podem associar-se de forma aleatória formando heteroligômeros ou homoligômeros. No caso particular do músculo esquelético, a isoforma encontrada da enzima é exclusivamente a PFK-1-M (Vora e Francke, 1981). Mutações nessa isoforma muscular da PFK-1 causam a síndrome de Tarui ou doença do armazenamento de glicogênio tipo VII (GSDVII), que é uma desordem genética rara caracterizada por acúmulo de glicogênio no músculo esquelético. Com isso, a metabolização de frutose 6-fosfato na glicólise é bloqueada, sendo

então substrato para a gliconeogênese, o que promove um aumento da síntese de glicogênio e, conseqüentemente, o seu acúmulo. As manifestações clínicas da doença são heterogêneas, variando desde intolerância ao exercício, hemólise, até morte durante a infância (Tarui *et al.*, 1965).

Por ser considerada a principal enzima da via glicolítica, a PFK-1 está sujeita a uma forte regulação metabólica que pode ocorrer por diversos mecanismos. A PFK-1 pode ser modificada covalentemente em resíduos de serina e treonina pela proteína cinase A (PKA) (Alves e Sola-Penna, 2003) e proteína cinase C (PKC) (Nettelbland *et al.*, 1986). Coelho e colaboradores (2007) mostraram que o hormônio serotonina estimula a atividade da PFK-1 através da promoção da sua fosforilação, o que aumenta também sua associação a actina.

A atividade da PFK-1 pode ser regulada por diversos ligantes alostéricos, incluindo tanto efetores positivos, como frutose 2,6-bifosfato (F2,6BP), íons amônia (NH_4^+), ADP e adenosina 5' monofosfato (AMP), glicose 1,6-bifosfato; como efetores negativos, como citrato, ATP e íons de hidrogênio (H^+) (Uyeda, 1979; Kemp e Foe, 1983). ADP e AMP agem alostericamente, contrapondo-se a inibição da PFK-1 pelo ATP. Além disso, o citrato, um intermediário da oxidação aeróbica do piruvato, é capaz de modular a atividade da PFK-1: altos níveis de citrato potencializam a inibição promovida pelo ATP sobre a PFK-1 (Passonneau e Lowry, 1962; Tornheim e Lowenstein, 1976). A F2,6BP não é somente um poderoso regulador alostérico positivo da PFK-1, mas também um inibidor da frutose 1,6-bifosfatase. Por causa dessa ação antagônica, a F2,6BP foi caracterizada com uma molécula sinalizadora que controla o equilíbrio entre glicólise e gliconeogênese (Van Schaftingen e Hers, 1980; Pilkis *et al.*, 1995; Okar *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2006). A síntese de frutose 2,6-bifosfato é catalisada pela enzima bifuncional fosfofrutocinase-2 (PFK-2)/frutose 2,6-bifosfatase (Okar *et al.*, 2001 e Wu *et al.*, 2006). Este metabólito atua de maneira sinérgica

com AMP, sendo capaz de contrapor a inibição da enzima causada por altas concentrações de ATP, aumentando sua afinidade pelo substrato, frutose 6-fosfato, porém sem alterar a velocidade máxima da enzima (Philips *et al.*, 1981; Van Schaftingen e Hers, 1981; Uyeda *et al.*, 1981). A F2,6BP também protege a PFK-1 da inativação térmica (50°C) e contra efeitos desnaturantes do hidrocloreto de guanidina (GdmCl) (Zancan *et al.*, 2007b).

Adicionalmente aos moduladores acima descritos, o estado oligomérico da PFK-1 representa um importante mecanismo de regulação da sua atividade. PFK-1 é caracterizada por transitar entre diferentes conformações oligoméricas, onde os monômeros da PFK-1 (M1) são capazes de associar-se reversivelmente formando dímeros (M2). Os dímeros podem associar-se formando tetrâmeros (M4) que, por sua vez, são capazes de associar-se formando hexadecâmeros (M16) (Figura 4). Embora, em altas concentrações, a enzima possa agregar-se em conformações mais complexas, estas apresentam a mesma atividade dos tetrâmeros (Uyeda, 1979).

A importância fisiológica desse equilíbrio decorre da influência direta que a estrutura quaternária da PFK-1 exerce sobre a sua atividade enzimática (Parmeggiani *et al.*, 1966; Paetkau e Lardy, 1967). Diversos fatores regulatórios alteram o equilíbrio entre essas diferentes formas oligoméricas, como pH, temperatura e força iônica, onde o meio ácido, alta força iônica e alta temperatura favorecem a formação de dímeros, enquanto o meio alcalino, baixa força iônica e baixa temperatura favorecem a formação de estruturas mais complexas da enzima (Bock e Frieden, 1974; Luther *et al.*, 1986). Alguns moduladores alostéricos e fármacos também são capazes de interferir nesse equilíbrio, como o lactato (Leite *et al.*, 2007), o ácido acetil salicílico (Spitz *et al.*, 2009) e o CTZ (Zancan *et al.*, 2007a) que favorecem a formação de dímeros, e esses dímeros são inativos. A CaM por sua vez promove a formação de dímeros ativos da PFK-1 (Marinho-Carvalho

et al., 2006), já a PKA, a F2,6BF e a F6P favorecem a formação de tetrâmeros, que são as estruturas que apresentam atividade máxima (Zancan *et al.*, 2008).

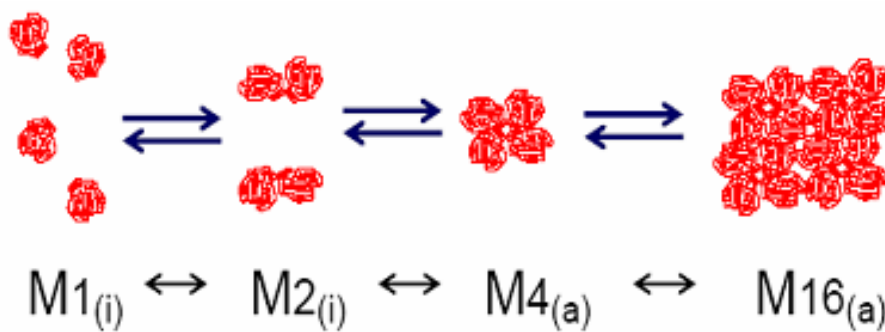


Figura 4: Transição do equilíbrio oligomérico da Fosfofrutocinase-1 (esquema ilustrativo). As letras (a) e (i) indicam a atividade catalítica da forma oligomérica, sendo (a) ativo e (i) inativo.

1.4 Aldolase

A Aldolase (Frutose-bifosfatase aldolase; EC 4.1.2.13) catalisa uma reação de condensação Aldólica reversível, que consiste na clivagem da frutose 1,6-bifosfato em duas moléculas isômeras de três carbonos: gliceraldeído 3-fosfato (aldose) e di-hidroxiacetona fosfato (cetose). O gliceraldeído 3-fosfato segue na via glicolítica diretamente, já a di-hidroxiacetona fosfato não, mas são facilmente intercambiáveis por isomerização através da reação catalisada pela enzima triosefosfato isomerase (TPI) (Nelson e Cox, 2000). Em vertebrados, três isoenzimas da Aldolase são encontradas: A, B e C, as quais apresentam diferentes propriedades catalíticas (Penhoet *et al.*, 1969), distribuição tecidual (Lebherz e Rutter, 1969) e nível de expressão (Weber, 1965). A isoenzima A é expressa,

predominantemente, no músculo; a isoenzima B encontra-se principalmente no fígado; e a isoenzima C está presente principalmente no cérebro (Lebherz e Rutter, 1969; Penhoet *et al.*, 1969).

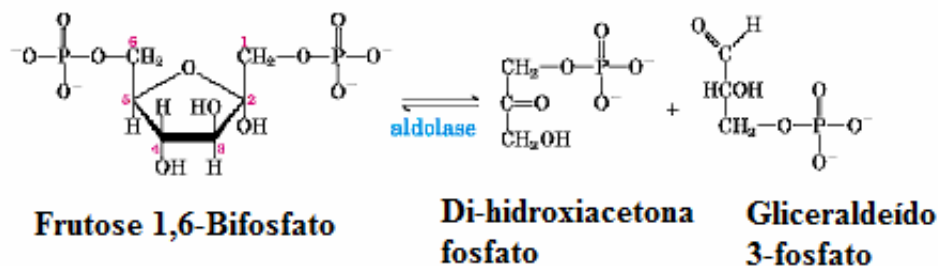


Figura 5. Reação catalisada pela Aldolase. Adaptado de Nelson e Cox (2000).

A isoenzima A de músculo existe como homotetrâmero com uma massa molecular de 40 KDa (Penhoet *et al.*, 1967) e sua forma tetramérica em vertebrados é altamente estável (Lebherz, 1975). Subunidades livres são indetectáveis em alta diluição ou na presença de condições desnaturantes (Lebherz, 1975). A Aldolase de músculo de coelho é um homotetrâmero (157 KDa), em que cada subunidade tem 363 resíduos (Sygusch *et al.*, 1990; Gamblin *et al.*, 1990).

Como dito anteriormente, a Aldolase é capaz de se ligar a forma dimérica da PFK-1 e, curiosamente, esse complexo apresenta atividade similar aos tetrâmeros (Rais *et al.*, 2000), como representado na Figura 6.

Diversos estudos envolvendo esse complexo (PFK-1-Aldolase) foram realizados, afim de compreender melhor essa associação. Orósz e colaboradores (1988) mostraram que a inativação da PFK-1 induzida pela associação com CaM é suspensa pela adição de uma

quantidade equimolar de Aldolase. Assim, a Aldolase impede a inativação da PFK-1 induzida pela dissociação das subunidades da enzima, esse efeito foi atribuído a uma competição entre a CaM e a Aldolase pela forma dimérica da PFK-1. Rais e colaboradores (2000) mostraram que a Aldolase é capaz de reverter o efeito inibitório promovido pela diluição da PFK-1 no meio, ou seja, quando a transição para a forma dimérica da PFK-1 é favorecida. Esse grupo também investigou a especificidade desse efeito protetor da aldolase e verificou que as proteínas GAPDH, PK, glicose 6-fosfato desidrogenase e albumina não foram capazes de promover o mesmo efeito. Assim, esses resultados indicam, uma alta especificidade no reconhecimento da PFK-1 pela Aldolase.

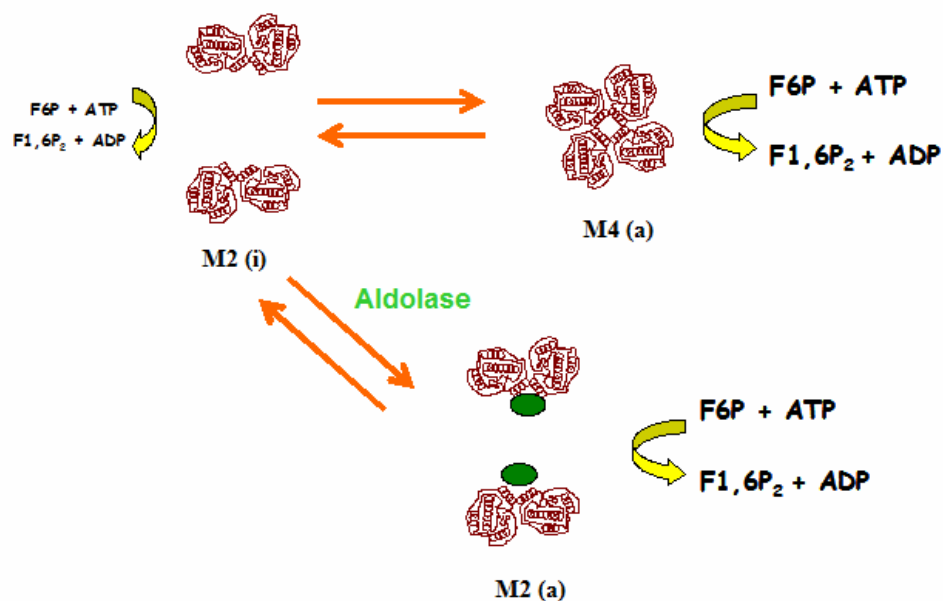


Figura 6. Regulação e interação da fosfofrutocinase-1 com Aldolase. Modelo esquemático que apresenta os diferentes estados oligoméricos da PFK-1 sendo regulado pela Aldolase. As letras (a) e (i) indicam a atividade catalítica da forma dimérica da PFK-1, sendo (a) ativo e (i) inativo.

Além da PFK-1, a Aldolase participa de reações com outras enzimas da via glicolítica. A enzima LDH é inibida por concentrações de ácido ascórbico encontrado normalmente nos tecidos. A Aldolase e a actina são capazes de proteger e reverter a inibição por ascorbato. Já a inibição da LDH por piruvato foi parcialmente aliviada pela presença da Aldolase, reduzindo seu K_m sem afetar a V_{max} da reação (Russell *et al.*, 2004).

A Aldolase também foi identificada como uma das primeiras proteínas ligadoras de actina (Pette e Brandau, 1962). Essa ligação é inibida pela presença do seu substrato frutose 1,6BF (Pagliaro e Taylor, 1988; Arnold e Pette, 1970), o que altera os parâmetros cinéticos da enzima (Robinson e Pang, 1992).

1.5 Interações proteína-proteína

A PFK-1 pode associar-se, formando complexos protéicos, com algumas enzimas citosólicas, como a Aldolase, conforme descrito acima, e a GAPDH (Rais *et al.*, 2000; Campanella *et al.*, 2005); com elementos do citoesqueleto, como a actina filamentosa (F-actina) e microtúbulos (Liou e Anderson, 1980; Andrés *et al.*, 1996; Alves e Sola-Penna, 2003; El-Bacha *et al.*, 2003); e também com proteínas de membrana plasmática, como o canal aniônico banda 3 presente na membrana plasmática de eritrócitos (Kaul e Kohler, 1983; Campanella *et al.*, 2005; Zancan e Sola-Penna, 2005b). Essas associações e dissociações da PFK-1 têm sido objeto de diversas investigações, uma vez que esse fenômeno ocorre de forma muito dinâmica e é capaz de alterar a atividade catalítica enzimática, como observado na oligomerização da enzima (Liou e Anderson, 1980; Andrés *et al.*, 1996).

Este mecanismo de regulação da atividade enzimática é extremamente importante para a regulação do metabolismo celular. Como exemplo disso, a glicólise pode ser controlada através do fenômeno de ligação reversível das enzimas glicolíticas ao citoesqueleto. Esse ponto tem chamado muita atenção por ter sido identificado como um importante mecanismo de geração de ATP na vizinhança do citoesqueleto, o qual é considerado uma estrutura moduladora do metabolismo energético das células (Beitner, 1993).

O citoesqueleto é composto por três tipos principais de proteínas: microfilamentos ou filamentos finos (compostos por F-actina), filamentos intermediários e microtúbulos (compostos de polímeros de tubulina) (Nelson e Cox, 2000). A ligação das formas diméricas e monoméricas da PFK-1 à tubulina e aos microtúbulos desloca o equilíbrio entre oligômeros resultando em uma diminuição significativa da atividade enzimática (Lehotzky *et al.*, 1993; Vértessy *et al.*, 1997). De forma recíproca, a associação com a F-actina estabiliza os tetrâmeros, ativando a enzima, sendo, então, um potente ativador do fluxo glicolítico (Liu e Anderson, 1980; Clarke *et al.*, 1983; Alves e Sola-Penna, 2003; Silva *et al.*, 2004). Segundo estudos de Luther e Lee (1986) e Kuo e colaboradores (1986), a forma fosforilada da enzima tem maior afinidade pela F-actina do que a forma defosforilada. Essa associação também pode ser favorecida por estímulo hormonal, uma vez que agonistas adrenérgicos podem favorecer a fosforilação de diversas proteínas, incluindo a PFK-1 (Alves e Sola-Penna, 2003). A sinalização por insulina também é capaz de favorecer essa associação pelo mesmo mecanismo (Chen-Zion *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 2004).

El-Bacha e colaboradores (2003) mostraram que em situações de alta demanda energética, como em fragmentos de tecidos de câncer de mama, a associação da PFK-1 com o citoesqueleto foi mais pronunciada do que em tecidos normais correspondentes. Esse

achado se tornou um importante alvo para tentar diminuir a oferta de energia à célula e com isso diminuir a sua viabilidade, o que é extremamente relevante para neoplasias. Um fármaco capaz disso é o CTZ que desloca a PFK-1 da F-actina para fração solúvel, com consequente inibição do fluxo glicolítico, o que acarreta menor viabilidade de células de carcinoma mamário (Meira *et al.*, 2005).

Curiosamente, a forma dimérica da PFK-1, originalmente inativa, quando associada a Aldolase apresenta atividade similar à forma tetramérica. Medidas de fluorescência anisotrópica mostraram que Aldolase liga-se a forma dimérica da PFK-1, mas não a forma tetramérica (Orósz *et al.*, 1987) e que esse complexo heterólogo permanece ativo (Vértessy *et al.*, 1997). Essas duas enzimas glicolíticas sequenciais se ligam separadamente aos microtúbulos ocupando distintos sítios de ligação, o que provoca uma diminuição de suas atividades. Por outro lado, o complexo bienzimático (PFK-1-Aldolase) não se liga aos microtúbulos (Ovádi e Orósz, 1996). Assim, a Aldolase é capaz de reverter a inibição da PFK-1 promovida pela associação com microtúbulos (Orósz *et al.*, 1987; Vértessy *et al.*, 1997). Desta forma, o estudo da oligomerização da PFK-1 e da sua associação com proteínas celulares, como a aldolase, tem aberto novas perspectivas no entendimento da regulação do metabolismo glicolítico.

1.6 Clotrimazol

1.6.1 Clotrimazol na clínica

Fungos são microorganismos largamente encontrados na natureza. Seus esporos produzidos em grande número estão amplamente disseminados e são muito resistentes,

tendo grande capacidade de germinar e subexistir em muitos substratos orgânicos (O'Day e Burd, 1994). Existem três grupos de fármacos antifúngicos utilizados na clínica: os polienos, os azóis e os derivados pirimidínicos. São considerados azóis os derivados imidazólicos e triazólicos. Os imidazólicos incluem o clotrimazol, o miconazol, o cetoconazol, entre outros. Os triazólicos incluem o fluconazol, o itraconazol, entre outros (Abad e Foster, 1996).

Clotrimazol é um derivado azólico, primeiramente sintetizado por Buchel e colaboradores (1972) com ação fungistática, terapêuticamente importante, clinicamente seguro e tolerado por humanos (Burgess e Bodey, 1972; Brugnara *et al.*, 1995). Este fármaco é útil no tratamento de infecções por dermatófitos, infecções fúngicas superficiais, e várias infecções por *Candida albicans*, incluindo candidíase oral e candidíase vaginal. Seu amplo espectro e potente atividade foram confirmados em vários estudos (Plempel e Bartmann, 1972; Shadomy *et al.*, 1982).

Essa substância possui peso molecular de 344,85 e é uma base fraca, levemente solúvel em água, benzeno, tolueno e solúvel em acetona, clorofórmio e DMSO. A DL_{50} oral em ratos é 923,708 mg/Kg (Hoogerheide *et al.*, 1982). Possui um anel imidazolínico ligado a uma molécula de bisfenil-(o-clorofenil)-carbinol com fórmula molecular: $C_{22}H_{17}ClN_2$ (Figura 7). O CTZ possui diversas denominações comerciais, tais como Canesten® (Bayer), Gino-canesten® (Bayer), Micotrizol® (Eurofarma), Tricosten® (Farmion Lab), entre outras. Os derivados azólicos, como o CTZ, são antifúngicos totalmente sintéticos e exercem seus efeitos através da inibição da biossíntese de ergosterol. O ergosterol é o principal esterol componente da membrana celular de fungos e tem um papel importante na fluidez e integridade da membrana, bem como na regulação do crescimento e proliferação celular. Qualquer desajuste na síntese dos esteróis de membrana levará a uma diminuição

no crescimento do fungo (Georgiev, 2000). Seu modo de ação consiste na inibição da enzima esterol-14- α -demetilase, prejudicando a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática, o que leva ao acúmulo de 14- α -metilesteróis. Esses metilesteróis não possuem a mesma forma e propriedades físicas que o ergosterol e levam a formação da membrana com propriedades alteradas que não desempenha as funções básicas necessárias ao desenvolvimento do fungo (Bergold e Georgiadis, 2004).

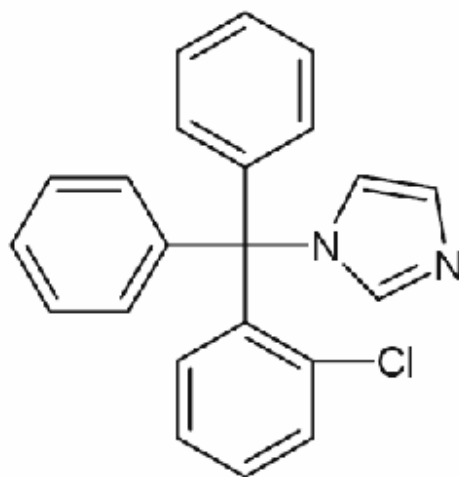


Figura 7: Estrutura química do clotrimazol.

O CTZ foi também associado à inibição da proliferação de células vasculares endoteliais, agindo como um inibidor do fator de crescimento vascular endotelial *in vitro* e *in vivo* (Takagashi, 1998; Takei *et al.*, 2003). Além disso, foi demonstrado que o CTZ possui atividade anti-malarial, através da inibição da degradação do grupo heme, componente das hemácias, resultando em um aumento da hemólise induzida pelo mesmo (Tien Huy, 2004).

1.6.2 Clotrimazol como antagonista de calmodulina

Embora tenha sido provada a segurança clínica e a tolerância em humanos do CTZ (Burgess *et al.*, 1972; Brugnara *et al.*, 1995), estudos têm mostrado que este fármaco apresenta uma multiplicidade de efeitos em uma variedade de alvos celulares. Em células sanguíneas e outros tipos celulares a transdução de sinais externos, via receptores de superfície, levam a produção de inositol (1,4,5)-trifosfato e a resultante liberação de cálcio do retículo endoplasmático. Normalmente, essa liberação induz a abertura dos canais de cálcio da membrana plasmática e ativa os canais intermediários de condução de cálcio ativados por potássio (Canais IK), permitindo o fluxo de cálcio para o espaço extracelular (Berridge, 1993). O CTZ desestabiliza a homeostase do cálcio por liberá-lo de seus estoques intracelulares, através da inibição do influxo do mesmo e também por bloquear os canais IK (Brugnara *et al.*, 1997).

A calmodulina é uma proteína multifuncional ligadora de Ca^{2+} correlacionada com a regulação de numerosos eventos celulares, incluindo proliferação celular normal e anormal (Veigl *et al.*, 1984; Halt e Lazo, 1986; Rasmussen e Means, 1987; Reddy, 1994). Os antagonistas de CaM são fármacos capazes de impedir a ligação de CaM em sua proteína mediadora de efeito, deste modo prevenindo os efeitos mediados pela CaM. Os antagonistas mais comumente utilizados *in vitro* são a trifluoperazina (TFP) (Schatzmann, 1969; Levin e Weiss, 1978), W7 (Dhillon *et al.*, 2003; Rasouli *et al.*, 2004), W5, W13 (Takagi e Lizuka, 1995), W17 e o composto 48/80 (Gietzen *et al.*, 1983).

Devido às evidências de que a CaM está envolvida em infecções fúngicas, bem como em doenças inflamatórias da pele, Hegemann e colaboradores (1993) investigaram os efeitos de vários fármacos antifúngicos sobre a atividade da CaM, usando como indicador a

fosfodiesterase dependente de CaM. Todos os derivados azólicos foram testados, inclusive o CTZ, e o resultado obtido foi que esses fármacos foram capazes de inibir a atividade da CaM. Em contrapartida, antifúngicos pertencentes a outras classes químicas não apresentaram atividade inibitória. A partir desses estudos, os antifúngicos azólicos foram considerados antagonistas de CaM. Em casos de queimaduras ou lesões da pele em geral, ocorre uma rápida liberação de cálcio mobilizado por hormônios, como serotonina, bradicinina e histamina (Rocha e Silva e Rosenthal, 1961; Starr e West, 1967; Marceau *et al.*, 1983). Esse aumento de Ca^{2+} intracelular é responsável por promover danos nocivos ao metabolismo energético e na estrutura celular, o que levou o grupo da pesquisadora Rivka Beitner a testar antagonistas de CaM, em especial os imidazóis, no tratamento dessas injúrias da pele, os quais se mostram efetivos e atenuaram injúrias na pele causadas por radiação ultravioleta (Beitner *et al.*, 1989; Beitner, 1990; Beitner *et al.*, 1991).

1.6.3 Clotrimazol e câncer

Antagonistas de CaM bloqueiam os efeitos estimulatórios de hormônios como insulina e fatores de crescimento (Livnat *et al.*, 1993; Livnat *et al.*, 1994). Esses achados estimularam o estudo desses efeitos sobre o metabolismo energético de células cancerígenas. Como descrito anteriormente, as células cancerígenas são caracterizadas por uma alta taxa de glicólise (sua fonte primária de energia), mesmo em condições aeróbicas (Beckner *et al.*, 1990; Greiner *et al.*, 1994).

Estudos demonstraram que o CTZ é capaz de causar um decréscimo dos níveis de glicose 1,6-bisfosfato e frutose 1,6-bisfosfato em células B16 de melanoma. A queda na concentração da glicose 1,6-bisfosfato, um potente ativador da PFK-1, leva a uma

diminuição da atividade fosfofrutocinásica, que é refletida pela queda drástica dos níveis de frutose 1,6-bisfosfato (produto da reação da PFK-1 e também um ativador alostérico desta enzima). Essa redução está fortemente relacionada ao decréscimo do conteúdo de ATP celular e, conseqüentemente, da proliferação celular do câncer devido a uma diminuição da viabilidade nessas células B16 de melanoma (Glass-Marmor *et al.*, 1996; Glass-Marmor e Beitner, 1997). Esses resultados sugerem que o CTZ exerce algum efeito sobre essas duas moléculas sinalizadoras da glicólise, através da inibição da atividade do complexo Ca^{2+} / CaM, uma vez que a potência relativa do CTZ em reduzir os níveis de glicose 1,6-bisfosfato e frutose 1,6-bisfosfato está próximo ao IC_{50} reportado para a inibição da CaM (Glass-Marmor *et al.*, 1996). Também foi visto a capacidade do CTZ em desligar a PFK-1 e a aldolase do citoesqueleto de células de Lewis de carcinoma de pulmão e de células CT-26 de adenocarcinoma do cólon. Esse desligamento promoveu uma diminuição de ATP local e, conseqüentemente, promoveu a diminuição da viabilidade celular (Penso e Beitner, 2002a).

A hexocinase, como relatado anteriormente é, até então, a única enzima da via glicolítica capaz de se ligar a mitocôndria (Brdiczka, 1991). A HK ligada a mitocôndria utiliza preferencialmente o ATP gerado mitocondrialmente, favorecendo a atividade da enzima (Viitanen *et al.*, 1984). Penso e Beitner (1997) mostraram que o CTZ, de maneira dependente da dose, promove o desligamento da HK da mitocôndria de células B16 de melanoma, diminuindo também a viabilidade dessas células. Em 2005, Meira e colaboradores mostraram que o CTZ induz alterações morfológicas e funcionais em uma linhagem celular derivada de câncer de mama, a MCF-7, de maneira dependente do tempo e da dose, exibindo um IC_{50} de 88.6 μM e $t_{0.5}$ de 89.7 minutos. Essas mudanças ocorreram

paralelamente ao desligamento da PFK-1 e da aldolase do citoesqueleto, que por fim, promoveram uma diminuição da viabilidade celular.

Em 2007, em um artigo publicado pelo nosso grupo de pesquisa, no qual sou co-autora, nós investigamos os efeitos diretos do CTZ sobre a PFK-1 utilizando uma enzima purificada de músculo esquelético de coelho (Zancan *et al.*, 2007a). Observamos que o CTZ, em pH 8.2, que é o pH ótimo da enzima (Luther *et al.*, 1986; El-Bacha *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2007), foi capaz de inibir a PFK-1 purificada em torno de 50% (Zancan *et al.*, 2007a). Observamos que esse efeito inibitório foi devido a capacidade do fármaco em favorecer a formação de dímeros de PFK-1. Com o objetivo de verificar se esses efeitos inibitórios promovidos pelo CTZ seriam devido ao fato deste ser um antagonista de CaM, foi utilizado como parâmetro de comparação o composto 48/80, um clássico antagonista de CaM (Gietzen *et al.*, 1983). O composto 48/80 não promoveu nenhuma alteração na atividade da enzima, assim como no grau de oligomerização da PFK-1. Esses resultados sugerem que o efeito inibitório promovido pelo CTZ sobre a PFK-1 purificada é independente da propriedade anti-calmodulina do mesmo, uma vez que não é mimetizado pelo clássico antagonista de CaM, o composto 48/80.

Conforme demonstrado pelos dados relatados nesta Introdução, verifica-se uma estreita relação entre a taxa do fluxo glicolítico e a atividade da enzima PFK-1. Embora alguns estudos apresentem dados sobre possíveis agentes moduladores desta enzima, ainda não há um inibidor para a PFK-1 descrito e caracterizado. O CTZ apresenta-se, assim, como um potencial agente inibidor da glicólise por apresentar ações diretas sobre a PFK-1. Contudo, o mecanismo de ação deste fármaco foi somente descrito em condições ótimas de ensaio. Resta, então, elucidar a ação do CTZ em condições mais próximas das fisiológicas.

2. Objetivos

Em vias metabólicas, as enzimas que catalisam reações essencialmente irreversíveis, em condições fisiológicas, são potenciais alvos para a modulação por xenobióticos. Considerando-se o papel crítico da PFK-1 sobre a via glicolítica e a importância da interação PFK-1-Aldolase sobre a estrutura quaternária da enzima evidenciada anteriormente, esta Dissertação apresenta como objetivo geral:

- Avaliar o efeito do clotrimazol sobre a PFK-1, a Aldolase e o complexo PFK-1-Aldolase

Neste sentido, buscamos atingir o objetivo principal desta Dissertação através dos seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o efeito do CTZ sobre a atividade catalítica e estrutura da PFK-1;
- Investigar o efeito do CTZ sobre a atividade catalítica da Aldolase;
- Avaliar a modulação induzida pelo CTZ da atividade catalítica do complexo bienzimático e as alterações estruturais da PFK-1 associada a Aldolase na presença do fármaco;
- Contribuir para a elucidação do mecanismo de ação CTZ sobre a glicólise subsidiando sua utilização como agente antineoplásico.

3. Material e Métodos

3.1 Material

ATP, frutose 6-fosfato, frutose 1,6-bisfosfato, aldolase de músculo de coelho, triosefosfato isomerase, α -glicerofosfato desidrogenase, NADH e CTZ foram obtidos da Sigma Chemical Co. MA, EUA. ^{32}P i foi obtido do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (São Paulo, SP). Dissuccinimidil Suberato (DSS) da Sigma Chemical Co. MA, EUA, foi gentilmente cedido pelo Prof. Luis Maurício T.R. Lima da Fac. De Farmácia, UFRJ. Todos os outros reagentes são de alto grau de pureza.

3.2 Purificação da Fosfofrutocinase-1 de músculo esquelético de coelho

A PFK-1 de músculo esquelético de coelho foi purificada segundo o protocolo proposto por Kemp (1975), adaptado de Parmeggiani e colaboradores (1966).

Extração: O coelho foi sacrificado por deslocamento cervical, seguido de sangramento por corte dos vasos do pescoço, sendo os músculos da região dorsal e das patas traseiras removidos, limpos e mantidos em gelo. A massa muscular foi então processada em um moedor, pesada e triturada em liquidificador com 3 volumes do tampão 1 (30 mM NaF, 4 mM EDTA e 15 mM β -mercaptoetanol, pH 7,5) por 30 segundos para homogeneização. A mistura foi então centrifugada a 14,000 g, por 10 minutos, em centrífuga refrigerada, a 4°C. O sobrenadante foi filtrado através de gaze para a remoção dos resíduos lipídicos e o pH é ajustado para 6,8 com adição de 1,5 M Tris.

Precipitação com Isopropanol: A mistura foi mantida em constante agitação em gelo com sal grosso e a temperatura mantida entre -5°C e 0°C. O álcool isopropílico gelado (1/5 do volume total do extrato) foi adicionado gota a gota em constante agitação e foi mantida por mais 20 minutos. O precipitado foi coletado por centrifugação a 14.000 g por 30 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C e dissolvido em 1/15 da fração inicial em tampão 2 (0,1 M Tris-fosfato, 0,2 mM EDTA, 0,2 mM frutose 1,6-bifosfato, 1 mM β -mercaptoetanol, 5 mM pirofosfato de sódio, pH 8,0). Esta suspensão foi dialisada por 20 horas contra o mesmo tampão para a remoção do isopropanol remanescente.

Tratamento Quente: A suspensão dialisada foi transferida para um becker e colocada em banho maria a 70°C. Sob agitação, a temperatura foi mantida entre 57 e 59°C por 3 minutos quando, então, foi retirada e condicionada em banho de gelo, também sob agitação, até atingir a temperatura de 5°C. Depois a suspensão foi centrifugada por 10 minutos em centrífuga a 4°C. O sobrenadante foi reservado e o pellet foi resuspenso em tampão 2 e centrifugado novamente. O segundo sobrenadante foi adicionado ao primeiro.

Fracionamento por Sulfato de Amônio: Ao sobrenadante, mantido em banho de gelo, sob agitação, foi adicionado sulfato de amônio sólido até atingir 38% de saturação (21,3 g / 100 mL da solução inicial). Após 30 minutos, o precipitado foi removido por centrifugação a 14,000 g por 15 minutos a 4°C, e ao sobrenadante foi adicionado sulfato de amônio até atingir 55% de saturação (308 g / 100 mL da solução inicial). O sedimento foi coletado por centrifugação a 14.000 g por 20 minutos e dissolvido em tampão 3 (50 mM Tris-fosfato, 0,2 mM EDTA, 1mM β -mercaptoetanol, 5 mM pirofosfato de sódio pH 8,0).

Cristalização: A solução foi dialisada em banho de gelo contra o tampão 3 adicionado de sulfato de amônio até 38% de saturação (21,3 g / 100 mL). Após 24 horas o tampão de diálise foi trocado pelo mesmo volume de tampão 3 adicionado de sulfato de amônio até

40% de saturação (22,6 g / 100 mL). A cristalização se inicia após aproximadamente uma semana. Depois da diálise, a suspensão foi centrifugada a 1,500 g por 10 minutos em centrífuga clínica em 4°C, e o precipitado foi dissolvido em tampão 3 e mantido em isopor com gelo dentro da geladeira.

3.3 Dosagem de proteína

A dosagem de proteína foi feita pelo método de Lowry e colaboradores (1951). O padrão utilizado em todas as dosagens foi a albumina de soro bovino.

3.4 Síntese de ATP radioativo

O [γ - ^{32}P] ATP foi preparado de acordo com Maia e colaboradores (1983). A síntese do [γ - ^{32}P] ATP acontece em um meio contendo 0,115 mM Tris-HCl (pH 9,0), 27,6 μM MgCl_2 , 13,8 μM DTT, 0,276 μM L- α -glicerofosfato, 1,15 μM β -NAD, 0,115 μM ADP e 2,3 μM piruvato pela adição de 1 mL ^{32}P e 40 μL de um coquetel enzimático de marcação. Esse coquetel de enzimas contém glicerol 3-fosfato desidrogenase, triose-fosfato isomerase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, 3-fosfoglicerato quinase e lactato desidrogenase. Durante 90 minutos esse meio de reação foi incubado em temperatura ambiente. Após este período, o [^{32}P] Pi livre foi retirado da mistura através de uma coluna DOWEX 1 x 10 Mesh ativada em 1 M de HCl. Em seguida o [γ - ^{32}P] ATP formado foi aliqotado e avaliado através de contagem em cintilação líquida e depois mantido a -20°C.

3.5 Ensaio radiométrico para quantificação da atividade fosfofrutocinásica

A atividade enzimática foi medida de acordo com o método radiométrico descrito por Sola-Penna e colaboradores (2002) com alterações introduzidas por Zancan e Sola-Penna (2005a e 2005b). Os ensaios, exceto quando indicado, foram realizados a 37°C e foram disparados com PFK-1 purificada em um meio de reação contendo 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 0,1 mM [γ -³²P] ATP (4 μ Ci / μ mol), 1 mM frutose 6-fosfato. Durante a reação catalisada pela enzima, os produtos liberados são ADP e [1-³²P] frutose 1,6-bisfosfato, que é separada do [γ -³²P] ATP não reagido através da adsorção deste último em carvão ativado suspenso em uma solução de 0,1 N HCl e 0,5 M manitol (25 g de carvão por litro de solução). O material foi centrifugado a 2,000g x por 10 min, e 0,4 mL do sobrenadante foi retirado e a radioatividade presente foi avaliada através de contagem por cintilação líquida (Modelo Tri-Carb – Perkin Elmer) para avaliar a quantidade de [1-³²P] frutose 1,6-bisfosfato formado. A atividade fosfofrutocinásica foi calculada por regressão linear da quantidade de [1-³²P] frutose 1,6-bisfosfato formada em função do tempo de reação. Duplicatas foram feitas para todas as amostras e brancos (ausência de frutose 6-fosfato) foram subtraídos de todos os resultados.

3.6 Ensaio espectrofotométrico para quantificação da atividade da aldolase (Sistema Acoplado)

A atividade da aldolase, exceto quando indicado, foi avaliada em um meio reacional contendo 0,5 mM F1.6BF, 0,2 mM NADH, 50 mM Tris HCl pH 7,4, 5 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgCl₂, 2 mU/mL triosefosfato isomerase, 2 mU/mL α -glicerofosfato desidrogenase

num volume final de 200 μ l. A reação foi iniciada pela adição da proteína, e a oxidação de NADH foi acompanhada pela medida do decréscimo na absorbância a 340 nm em um espectrofotômetro (Thermo – Plate – USA), como previamente descrito (Sola-Penna *et al.*, 2002; Meira *et al.*, 2005). Brancos na ausência das enzimas triosefosfato isomerase e α -glicerofosfato desidrogenase foram realizados para descontar a oxidação inespecífica de NADH.

3.7 Espectroscopia de emissão de fluorescência da PFK-1

As medidas de fluorescência intrínseca da da enzima foram realizadas em um espectrofluorímetro JASCO 6300 (INC.MD EUA) com cubetas de quartzo com dimensão de 1,0 X 1,0 cm^2 como descrito por Marinho-Carvalho e colaboradores (2006). As amostras foram excitadas em 280 nm (referente ao comprimento de onda de excitação do triptofano) em um meio de reação contendo 50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5Mm MgCl_2 e as concentrações especificadas em cada ensaio de CTZ, PFK-1 e aldolase. A emissão de fluorescência foi medida entre 300 e 400 nm (referente a faixa de comprimento de onda de emissão do triptofano). O centro de massa (CM) espectral foi calculado pela equação:

$$\text{CM} = \frac{\sum I_{\lambda} \times \lambda}{\sum I_{\lambda}}$$

Onde :

I_{λ} = intensidade de fluorescência em cada comprimento de onda medido

λ = comprimento de onda

3.8 Cromatografia de gel filtração em Superose 12

Amostras de PFK-1 foram incubadas em um meio contendo 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM MgCl₂, 5 mM (NH₄)₂SO₄ na ausência e presença de 50 µM de CTZ a 37 °C por 1 hora. Depois foram aplicadas em uma coluna Superose 12 (HR 10/30) acoplado a um sistema de HPLC (Shimadzu, Tokyo, Japan). Tris-HCl 20 mM foi usado como tampão. A coluna foi eluída com a mesma solução, em uma taxa de fluxo de 0.4 mL/min, e frações de 0.5 mL foram coletadas e mensuradas automaticamente em 280 nm. Dextran blue foi usado para determinar a V₀ (volume de exclusão). A razão dímeros/tetrâmeros foi calculada por divisão da área do pico do dímero (170 KDa) pela área do pico do tetrâmero (340 KDa).

3.9 Eletroforese SDS-PAGE e Western Blot com reagente de *cross-linker*

As amostras de PFK-1 (0.3 µg/mL) foram incubadas por 1 hora com concentrações de CTZ e aldolase, especificadas em cada ensaio, em um meio reacional com 50mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM MgCl₂, 5 mM (NH₄)₂SO₄. Após esse tempo, essas amostras foram novamente incubadas por 1 hora com 0,1 M do reagente de cross-linker (DSS). Posteriormente, as amostras foram acrescidas de tampão de amostra e foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (10%) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), como descrito por Laemmli (1970). Após a eletroforese os géis foram corados por 'Coomassie-blue' e descorados até o aparecimento nítido das bandas de proteínas. Géis obtidos em corridas eletroforéticas paralelas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose durante 1 hora e depois bloqueado overnight com TBS-Tween (pH 7,0) adicionado de leite desnatado (10 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 0,01% Tween 20 e 15% leite desnatado). Após

a incubação overnight, as membranas foram incubadas por 2 horas com o anticorpo primário monoclonal anti-PFK-1 (1:1000). Em seguida foi feita mais 1 incubação por 1 hora como anticorpo secundário IgG, um anti-anticorpo conjugado a fosfatase alcalina (1:2000). A membrana foi adicionado 7 mL de substrato para Fosfatase alcalina, no abrigo da luz. O reagente é incolor e quando escurece (azul-roxo) significa que já está saturado. As bandas, reveladas pelo substrato para fosfatase alcalina, foram scaneadas e quantificadas por densitometria utilizando o software Gel Eral.

3.10 Análises estatísticas e Cálculos

Todos os resultados são expressos como média \pm erro-padrão. A análise dos dados foi realizada usando o *software* SigmaPlot (v. 10.0, Systat Inc. CA, USA) integrado com o *software* SigmaStat (v. 3.2, Systat Inc. CA, USA). Os valores para cada grupo foram comparados por testes *t*-Student pareados ou não pareados, ou por análise de variância (ANOVA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

Os ajustes cinéticos foram realizados por regressão não-linear utilizando o *software* SigmaPlot (v. 10.0, Systat Inc. CA, USA). Para calcular os parâmetros cinéticos para ativação da PFK-1 pelo seu substrato frutose 6-fosfato, foi utilizada a equação:

$$v = \frac{V_{\max} \times S^n}{K_{0.5}^n + S^n}$$

onde: v é a velocidade da reação para uma determinada concentração de frutose 6-fosfato (S), V_{max} é a velocidade máxima da reação atingida com a saturação de frutose 6-fosfato, $K_{0.5}$ é a constante de afinidade e n é o índice de cooperatividade. Para os cálculos dos parâmetros cinéticos para modulação da PFK-1 pelo seu outro substrato, ATP, foi utilizada a equação:

$$v = \frac{\frac{V_{max} \times S^{n(a)}}{K_{0.5}^{n(a)} + S^{n(a)}} \times K_i^{n(i)}}{K_i^{n(i)} + S^{n(i)}}$$

onde: v é a velocidade da reação para uma determinada concentração de ATP (S), V_{max} é a velocidade máxima do componente estimulatório da equação, $K_{0.5}$ é a constante de afinidade para ATP do componente estimulatório, $n(a)$ é o índice de cooperatividade do componente estimulatório, K_i é a constante de afinidade do componente inibitório e $n(i)$ é o índice de cooperatividade do componente inibitório.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito do clotrimazol na atividade e na estrutura quaternária da fosfofrutocinase-1 purificada de músculo esquelético de coelho.

Zancan e colaboradores (2007a) mostraram que 50 μM de CTZ é capaz de inibir a atividade fosfofrutocinásica em 49,2% quando os ensaios são realizados em pH 8,2. Este pH é considerado o pH ótimo da enzima, uma vez que nessas condições a conformação tetramérica da enzima é favorecida e a enzima trabalha em velocidade máxima (Luther *et al.*, 1986; El-Bacha *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2007).

O objetivo deste estudo foi verificar se esse perfil de inibição seria mantido em pH 7,4. Num primeiro ensaio, a enzima foi pré-incubada com os mesmos 50 μM de CTZ durante 1 h a 37°C. Posteriormente, atividade fosfofrutocinásica foi quantificada através do ensaio pelo método radiométrico. Os resultados apresentados na Figura 8 mostram que o CTZ, em pH 7,4, também foi capaz de promover uma inibição da atividade catalítica da PFK-1.

Através de uma curva de concentrações crescentes de CTZ, observamos que o caráter inibitório do CTZ sobre a PFK-1 no pH 7,4 também é dependente da concentração de CTZ no meio reacional (Figura 9). Neste ensaio a enzima também foi pré-incubada com o fármaco por 1 h a 37°C. Assim como observado nos ensaios realizados em pH 8,2, a enzima também apresentou-se inibida em pH 7,4, quando a concentração de CTZ testada foi de 50 μM .

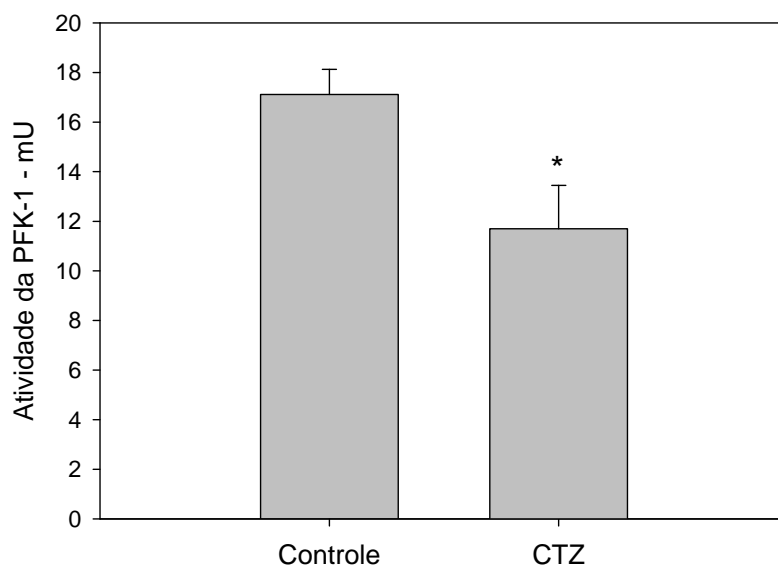


Figura 8. Efeito do clotrimazol sobre a atividade catalítica da PFK-1 mensurada em pH 7,4. A atividade da PFK-1 purificada de músculo esquelético de coelho na ausência e presença de 50 μ M de CTZ foi mensurada pelo método radiométrico como descrito no Material e Métodos. Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$), realizados em duplicata. * $P < 0.05$ comparando com o controle, na ausência de fármaco. O teste t de Student foi usado para avaliar as diferenças estatisticamente significativas entre os valores.

Num artigo publicado em 2006 foi mostrado que a CaM induz a diminuição do espalhamento de luz como também o aumento do centro de massa do espectro de fluorescência intrínseca da PFK-1, o que é diretamente proporcional a formação de dímeros da enzima (Marinho-Carvalho *et al.*, 2006). De maneira similar à CaM, o CTZ mostrou apresentar efeitos sobre a PFK-1 através da indução da formação de dímeros (Zancan *et al.*, 2007a). Com o intuito de avaliar o efeito do CTZ sobre a estrutura quaternária da PFK-1, observamos as alterações estruturais da enzima através da técnica de cromatografia de gel

filtração. O princípio dessa técnica consiste na separação das proteínas com base no seu peso molecular. Nesse ensaio a PFK-1 foi pré-incubada com 50 μM do fármaco por 1 h a 37°C em pH 7,4. Como observado na Figura 10, o CTZ favoreceu a formação de dímeros de maneira significativa, apresentando uma relação dímero/tetrâmero maior do que apresentado no controle. Correlacionando os resultados apresentados até aqui, podemos sugerir fortemente que o CTZ em pH 7,4, favorece a formação de dímeros da PFK-1 (Figura 10) e que esses dímeros têm menor atividade do que os tetrâmeros (Figura 9).

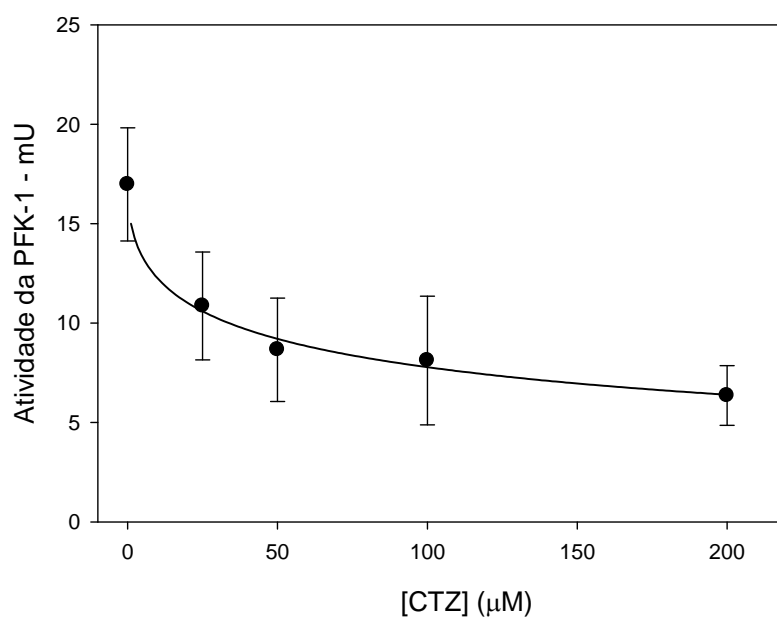


Figura 9. Curva com diferentes concentrações de CTZ sobre a atividade catalítica da PFK-1 em pH 7,4. A atividade da PFK-1 purificada de músculo esquelético de coelho foi mensurada pelo método radiométrico como descrito no Material e Métodos. Concentrações de CTZ testadas: 25, 50, 100 e 200 μM . Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$), realizados em duplicata.

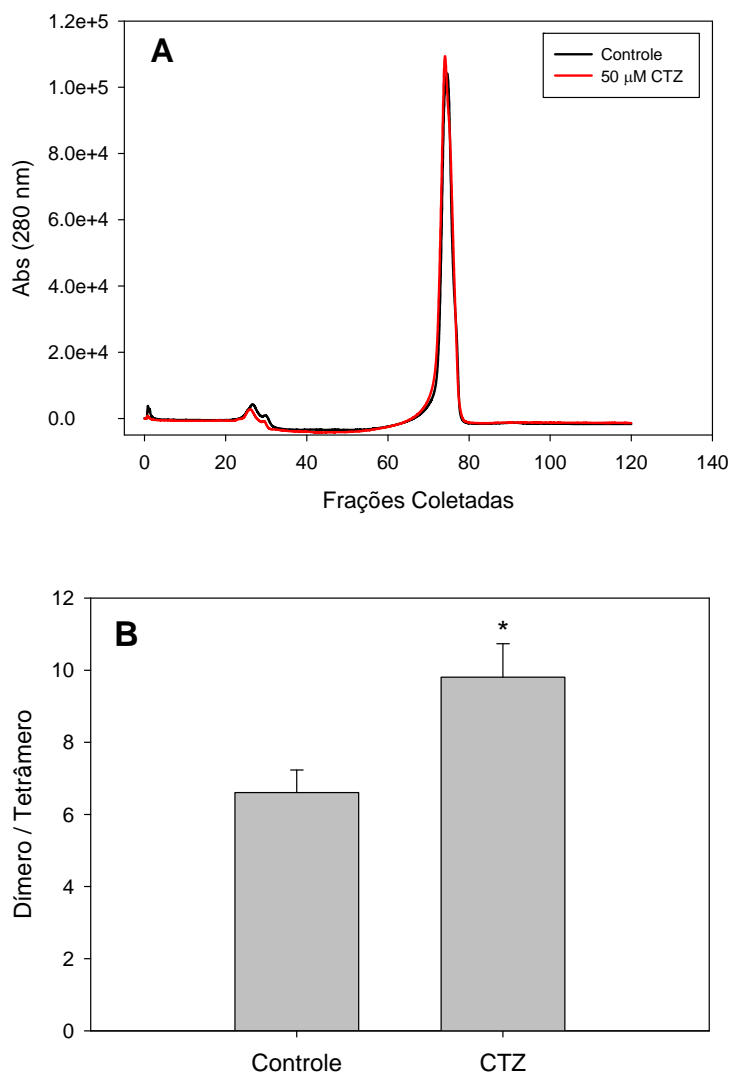


Figura 10. Efeito do CTZ sobre a estrutura quaternária da PFK-1 por cromatografia de gel filtração. O painel A representa o cromatograma da gel filtração na coluna Superose 12 (HR 10/30) acoplado a um sistema de HPLC. O painel B representa a relação dímero/tetrâmero na ausência e presença de 50 μM de CTZ. O ensaio foi realizado conforme indicado no Material e Métodos. Dados representam a média \pm erro-padrão de 2 experimentos independentes ($n = 2$). * $P < 0.05$ comparando com o controle, na ausência de fármaco. O teste t de Student foi usado para avaliar as diferenças estatisticamente significativas entre os valores.

Contudo, em todos os resultados descritos a enzima foi pré-incubada a 37°C durante 1 hora com o fármaco. Com o objetivo de verificar se esse perfil de inibição da atividade enzimática e da modulação da conformação oligomérica promovidos pelo CTZ sobre a PFK-1 é dependente da pré-incubação da enzima com o fármaco, foram realizados ensaios sem essa pré-incubação. Os dados apresentados na Figura 11 demonstram que nessa condição o fármaco não foi capaz de promover nenhum efeito sobre a atividade catalítica da PFK-1.

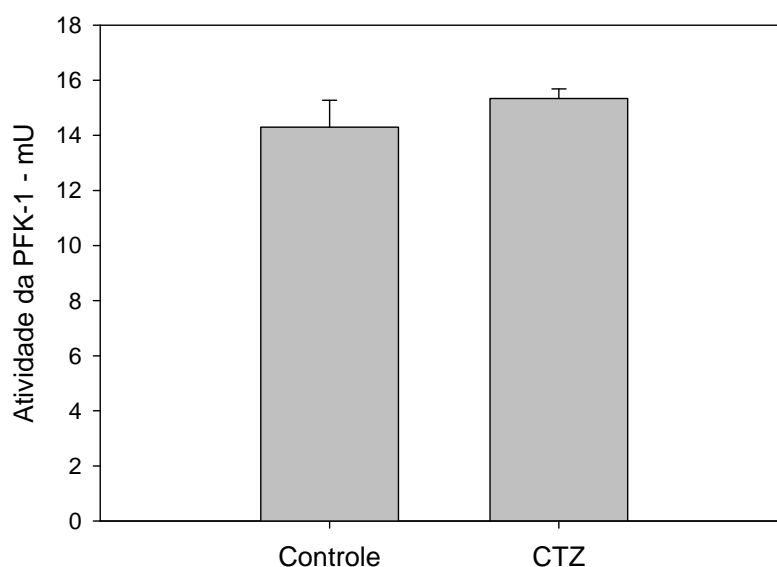


Figura 11. Efeito imediato de 50 μ M de CTZ na atividade fosfofrutocinásica. A atividade da PFK-1 foi mensurada pelo método radiométrico, na ausência e presença de 50 μ M de CTZ sem nenhuma pré-incubação da enzima com o fármaco. Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$), realizados em duplicata.

Uma vez confirmado que o efeito inibitório promovido pelo CTZ é dependente do tempo de incubação, resolvemos investigar as alterações induzidas pelo fármaco sobre a conformação oligomérica da PFK-1 ao longo do tempo. Esse ensaio foi realizado através da

técnica de fluorescência intrínseca, uma metodologia utilizada para avaliar a transição entre as conformações diméricas e tetraméricas da PFK-1 (Hand e Carpenter, 1986; Lan e Steiner, 1991, Marinho-Carvalho *et al.*, 2006). A partir da intensidade de fluorescência da amostra excitada no comprimento de onda de 280 nm, o centro de massa (CM) do espectro de fluorescência intrínseca da PFK-1, medido entre 300 e 400 nm, foi calculado como descrito em Material e Métodos. O CM é utilizado para obter informações sobre a conformação de uma proteína. Uma vez que a PFK-1 dissociada apresenta os triptofanos, que são fluoróforos, mais expostos ao meio aquoso, a fluorescência emitida por esses triptofanos é de menor energia. Por conseguinte, o CM de uma população de tetrâmeros é menor do que o parâmetro medido em relação a uma população de dímeros, porque os triptofanos nessa conformação não estão expostos ao meio aquoso. Esta interpretação dos dados obtidos no fluorímetro é baseada em algumas publicações recentes (Faber-Barata e Sola-Penna, 2005; Marinho-Carvalho *et al.*, 2006; Leite *et al.*, 2007; Zancan *et al.*, 2007a; Zancan *et al.*, 2007b; Zancan *et al.*, 2008).

Como apresentado na Figura 12, a dimerização da PFK-1 foi dependente do tempo de exposição da enzima a 50 μ M de CTZ. A partir de 15 min de incubação, observa-se uma diferença significativa entre as curvas, onde na presença do fármaco vê-se um deslocamento maior e mais rápido do CM. O deslocamento do CM observado na curva controle deve-se ao efeito de diluição da preparação de PFK-1 no meio de ensaio, gerando a dissociação de estruturas complexas promovidas pela alta concentração do estoque de PFK-1. Já na presença de CTZ, o CM é deslocado para regiões de menor energia, sugerindo o favorecimento de estruturas com triptofanos mais expostos ao solvente, ou seja, estruturas menores (dímeros). Assim, pode-se concluir que o CTZ induz a formação de dímeros da PFK-1; entretanto, esta modulação depende do tempo de exposição da enzima ao fármaco.

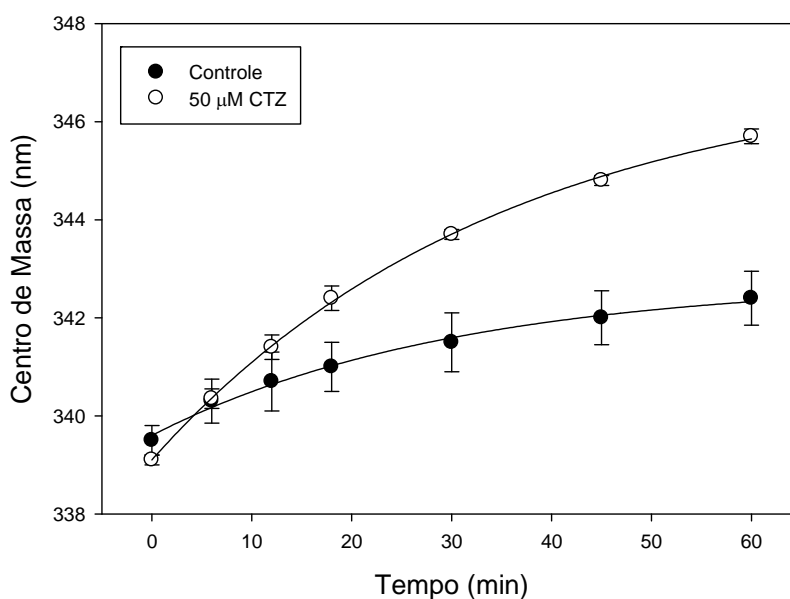


Figura 12. Curvas de centro de massa do espectro de fluorescência intrínseca da PFK-1 em função do tempo de exposição ao CTZ. O espectro de fluorescência intrínseca da PFK-1 na ausência e presença de 50 μ M de CTZ foi calculado como indicado em Material e Métodos. Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$).

Visando confirmar estes resultados, as diferentes formas oligoméricas da PFK-1 na ausência e presença de CTZ também foram avaliadas por eletroforese com reagente de *cross-linker* e, posteriormente, através de *Western Blot* utilizando um anticorpo anti-PFK-1. *Cross-linking* consiste na união de duas ou mais moléculas por meio de uma ligação covalente mediada por um reagente denominado *cross-linker*. *Cross-linkers* são em geral reagentes bifuncionais, ou seja, contém dois grupos reativos frente a cadeias laterais presentes na proteína separados por um conjunto de átomos conhecido como cadeia espaçadora (Wong, 1991; Hermanson, 2008). Dentre os *cross-linkers* disponíveis

atualmente, os de maior destaque são aqueles reativos frente a aminas primárias. Isso se deve principalmente a alta ocorrência de grupos aminos (resíduos de lisina e o N-terminal) na proteína. Como exemplo desse tipo de *cross-linkers*, existe os derivados de N-hidróxi succinimida (NHS), que são os *cross-linkers* mais utilizados atualmente devido aos rendimentos relativamente altos das reações e, principalmente, a facilidade de sua obtenção, bastando para isso reagir um ácido carboxílico com o NHS (Staros, 1982). Neste trabalho foi utilizado um derivado de N-hidróxi succinimida, o Dissuccinimidil Suberato (DSS) (Figura 12).

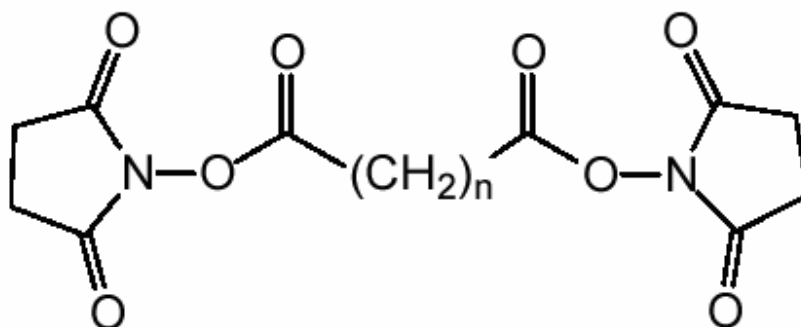


Figura 13. Estrutura química do Dissuccinimidil Suberato. Na estrutura apresentada para o Dissuccinimidil Suberato (DSS) o $n = 6$.

Através da técnica de eletroforese com reagente de *cross-linker* e *Western blot* foi possível observar que a presença de 50 μM de CTZ promoveu um aumento da intensidade das bandas referentes ao peso molecular da forma dimérica da PFK-1, correspondente a um aumento de 54% (Figura 14A). Adicionalmente, observamos que o CTZ promove um

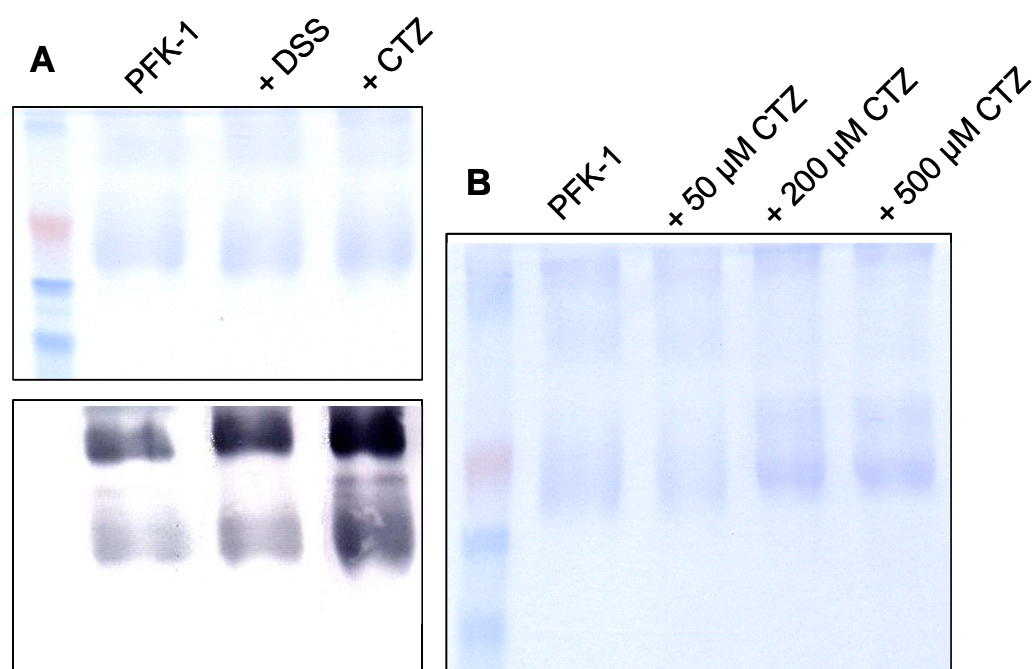
aumento global de formas de menor peso molecular, como dímeros e monômeros, conforme evidenciado pela quantificação das bandas relativas a estas formas oligoméricas (Figura 14A com a quantificação tabulada). Esse aumento da intensidade das bandas diméricas e monoméricas da PFK-1 também é observado com concentrações crescentes de CTZ e, paralelamente, observamos nesse gel uma diminuição da intensidade das bandas referentes a conformações mais complexas (Figura 14B).

Os resultados apresentados até aqui demonstram que o CTZ altera a conformação quaternária da PFK-1, promovendo a dissociação da enzima em formas oligoméricas menos complexas. Adicionalmente, observamos que esta modulação da conformação da PFK-1 ocorre de maneira dependente do tempo, onde em períodos mais longos de incubação, observamos claramente uma dissociação da enzima da forma tetramérica para dimérica. As alterações promovidas pelo CTZ na atividade da PFK-1 refletem a dependência do tempo de incubação da enzima com o fármaco. Tempos posteriores a 1 h de exposição não foram testados.

4.2 Avaliação dos parâmetros cinéticos da fosfofrutocinase-1 e das alterações promovidas pelo CTZ.

O estudo da cinética de uma enzima permite elucidar os pormenores do seu mecanismo catalítico, o seu papel no metabolismo, como é controlada a sua atividade na célula e como sua atividade pode ser modulada por determinadas moléculas. Com o intuito de estudar o comportamento cinético da PFK-1 na presença de 50 μM de CTZ, nós investigamos a influência de vários fatores sobre a atividade fosfofrutocinásica, incluindo diferentes concentrações dos substratos (ATP e F6P), diferentes valores de pH, como

também diferentes concentrações de proteína. Comparando os resultados obtidos para os parâmetros cinéticos da enzima nessas diferentes condições na ausência e presença do CTZ, será possível descrever mais profundamente o efeito direto do fármaco sobre a PFK-1.



	PFK-1	+ DSS	+ 50 μM CTZ
Monômeros	0.1764	0.2185	0.3393
Dímeros	0.3001	0.3409	0.4622

Figura 14. Avaliação da modulação da conformação oligomérica da PFK-1 pelo CTZ. (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) e *Western Blot* do gel “espelho” para PFK-1. (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE) da PFK-1 tratada com o reagente de cross-linker DSS conforme descrito em Material e Métodos. As concentrações de CTZ testadas foram: (A) 50 μM; (B) 50, 100 e 200 μM.

A estrutura e a conformação do sítio ativo da enzima são decorrências da estrutura tridimensional da enzima e podem ser afetadas por quaisquer agentes capazes de provocar mudanças conformacionais na estrutura protéica. Isto torna a atividade enzimática dependente do meio ambiente, principalmente do pH do meio reacional. A atividade da PFK-1 é modulada pelo valor do pH do meio e já é descrito que tetrâmeros de PFK-1 se dissociam em dímeros em pH ácido (Luther *et al.*, 1983; Luther *et al.*, 1986). A consequente diminuição da atividade catalítica da PFK-1 pode ser observada na Figura 15, onde, na faixa de pH 6,5 a 7,0, a enzima apresentou atividade muito reduzida. Com o aumento dos valores de pH a atividade fosfofrutocinásica aumentou de forma crescente com o o aumento do pH. Notavelmente, o CTZ inibe a atividade da PFK-1, mesmo em valores de pH mais alcalinos, onde as formas tetraméricas da enzima são favorecidas (Hesterberg e Lee, 1980).

Outro fator que também afeta a velocidade de uma reação catalisada por uma enzima é a concentração dos seus substratos. O efeito do CTZ nos parâmetros cinéticos da modulação da atividade da PFK-1 por ATP e F6P foram avaliados. O ATP não é apenas um dos substratos para a PFK-1 mas também é o principal produto da glicólise e cada subunidade da enzima apresenta 2 sítios de ligação ao ATP. Quando altos níveis deste nucleotídeo são atingidos, o ATP inibe a atividade fosfofrutocinásica através da sua ligação a um sítio alostérico inibitório. Esta ligação promove uma mudança conformacional na enzima, diminuindo a afinidade da PFK-1 pela F6P (Passonneau e Lowry, 1962), além de promover a dissociação dos tetrâmeros ativos da enzima em dímeros com menor atividade (Zancan *et al.*, 2007b; Zancan *et al.*, 2008).

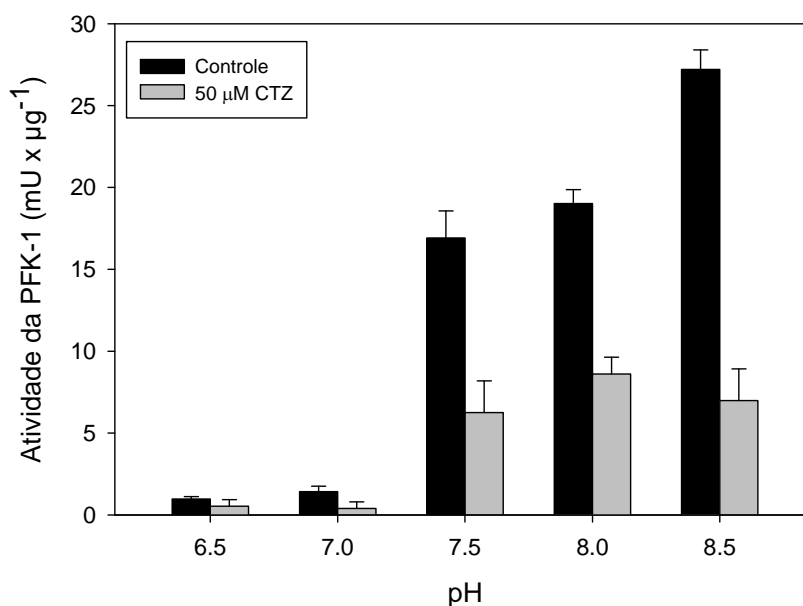


Figura 15. Efeito do pH sobre a atividade catalítica da PFK-1 na presença do CTZ. A atividade da PFK-1 foi avaliada através do método radiométrico na ausência e presença de 50 μM de CTZ, como descrito em Material e Métodos. Valores de pH testados: 6,5, 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5. Dados representam a média ± erro-padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$), realizados em duplicata.

Como observado na Figura 16, o ATP apresenta um efeito duplo sobre a PFK-1, ativando-a em concentrações de até 1 mM e agindo como um inibidor alostérico em concentrações mais elevadas, conforme também descrito por outros autores (Uyeda, 1979; Zancan *et al.*, 2008, Marinho-Carvalho *et al.*, 2009). A presença de 50 μM de CTZ diminuiu atividade catalítica da PFK-1 por toda a faixa de ATP analisada. A Tabela 1 descreve o efeito do CTZ sobre os parâmetros cinéticos da PFK-1 calculados a partir da curva com diferentes concentrações de ATP. Observa-se que o CTZ diminuiu a afinidade da PFK-1 pelo ATP no sítio estimulatório, aumentando o $K_{0,5}$ de 0.36 ± 0.03 mM, obtido

no controle, para $0,77 \pm 0,08$ mM, obtido na presença de $50 \mu\text{M}$ de CTZ ($P < 0.05$). Paralelamente, é observado um aumento do índice de cooperatividade para esse sítio ($n(a)$), sugerindo uma maior interdependência entre os sítios das diferentes subunidades. Esse dado sugere uma maior dificuldade de tetramerização na presença de CTZ, reiterando a conclusão anterior de favorecimento de dímeros da PFK-1 na presença de CTZ. Adicionalmente, a velocidade máxima calculada é 24% menor na presença de CTZ, descartando um possível efeito competitivo entre CTZ e ATP pelo sítio estimulatório para esse substrato. Com relação ao componente inibitório da modulação da atividade da PFK-1 por ATP, observa-se que o CTZ promove um aumento da afinidade do sítio alostérico inibitório para ATP, reduzindo o K_i em quase 50%, sem contudo, afetar o índice de cooperatividade desse sítio ($n(i)$). Levando-se em consideração que os efeitos inibitórios do ATP sobre a PFK-1 devem-se a promoção da dissociação dos tetrâmeros da enzima (Zancan *et al*, 2007b; Zancan *et al.*, 2008), é de se esperar que essa inibição seja favorecida por outros agentes capazes de dissociar os tetrâmeros da enzima, como é o caso do CTZ. A falta de efeito do CTZ sobre o $n(i)$ sugere que o fármaco não afeta a interdependência entre os sítios inibitórios das diferentes subunidades. Uma vez que ambos, CTZ e ATP, inibiriam a enzima através do mesmo mecanismo – a dissociação dos tetrâmeros da enzima – o fato de o CTZ não afetar a interdependência entre os sítios inibitórios para ATP das diferentes subunidades sugere que o CTZ também não se liga ao sítio inibitório para ATP. Concluindo, o CTZ diminui velocidade máxima da PFK-1, diminui a afinidade para ATP do seu sítio catalítico e aumenta a afinidade para ATP do seu sítio inibitório, sem ligar-se a nenhum desses dois sítios.

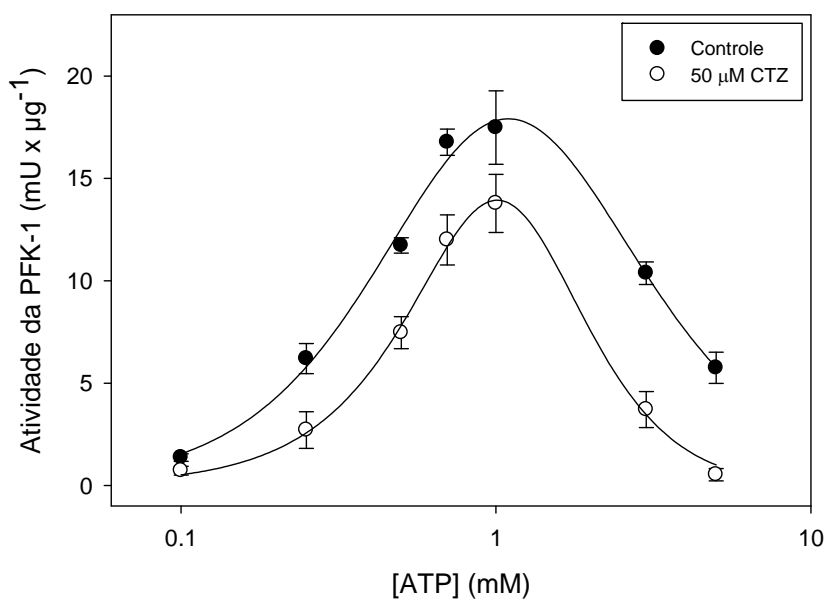


Figura 16. Efeito do CTZ sobre a atividade da PFK-1 em uma curva de ATP. A atividade da PFK-1 foi mensurada pelo método radiométrico na ausência e presença de 50 µM de CTZ, como descrito no Material e Métodos. Concentrações de ATP: 0,1, 0,25, 0,5, 0,7, 1,0, 3,0 e 5,0 mM. Dados representam a média ± erro-padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$), realizados em duplicata.

Tabela 1. Parâmetros cinéticos para os efeitos do ATP sobre a atividade da PFK na ausência e na presença de CTZ.

	Controle	50 µM CTZ
$K_{0.5}$ (mM)	0.36 ± 0.03	$0.77 \pm 0.08^*$
$n(a)$	1.3 ± 0.2	$2.1 \pm 0.3^*$
V_{max} (mU/µg)	19.2 ± 1.7	$14.6 \pm 1.3^*$
K_i (mM)	3.3 ± 0.3	$1.7 \pm 0.2^*$
$n(i)$	1.6 ± 0.2	1.2 ± 0.2

* $p < 0.05$ comparado ao controle (teste t de Student).

Legenda: (a) componente estimulatório; (i) componente inibitório.

A incapacidade do CTZ em se ligar ao sítio catalítico da PFK-1 é corroborada analisando-se os seus efeitos sobre os parâmetros cinéticos para o outro substrato da enzima, a frutose 6-fosfato. Efeitos similares aos observados para o componente estimulatório dos efeitos do ATP sobre a enzima, são observados para os efeitos do CTZ sobre a ativação da PFK-1 por frutose 6-fosfato (Tabela 2). Além da inibição da enzima em todas as concentrações de frutose 6-fosfato testadas (Figura 17), observa-se a diminuição da velocidade máxima e da afinidade da enzima pelo substrato, traduzida no aumento do $K_{0,5}$ (Tabela 2). O aumento no índice de cooperatividade (n), assim como discutido acima para ATP, sugere o favorecimento da formação de dímeros na presença de CTZ. Esses resultados são similares aos recentemente publicados por Marinho-Carvalho e colaboradores (2009), onde a CaM, que induz a dimerização da PFK sem inibi-la, diminui a afinidade da PFK-1 tanto por ATP como por F6P.

A diminuição da afinidade da PFK-1 por seus substratos, observado na presença de 50 μM de CTZ, é provavelmente devido ao mecanismo de ativação desses substratos sobre a PFK-1, que envolve a tetramerização da enzima. Ambos os substratos se ligam ao sítio ativo da enzima estabilizando-a na conformação tetramérica (Zancan *et al.*, 2007b; Zancan *et al.* 2008, Marinho-Carvalho *et al.*, 2009). Uma vez que o CTZ estabiliza a conformação dimérica da PFK-1 (Zancan *et al.*, 2007a), essa modulação interfere no mecanismo acima mencionado, resultando numa diminuição da afinidade da PFK-1 por esses substratos. Essa conclusão é reforçada pelo efeito menos pronunciado do CTZ sobre a afinidade da PFK-1 para frutose 6-fosfato, quando comparado ao efeito sobre a afinidade para ATP, uma vez que a ativação da enzima por este último parece estar mais relacionada com seus efeitos sobre a tetramerização da enzima (Zancan *et al.*, 2008).

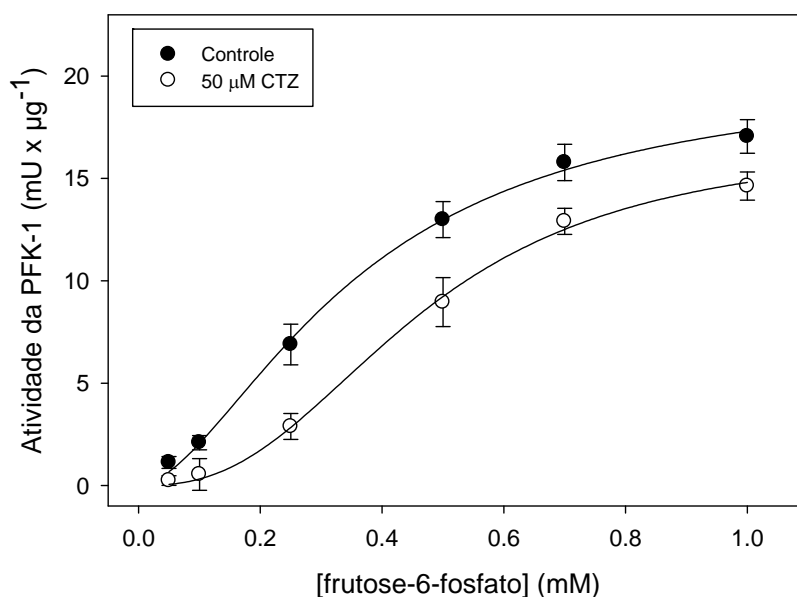


Figura 17. Efeito do clotrimazol na curva de frutose 6-fosfato da atividade da PFK-1.

A atividade da PFK-1 foi mensurada pelo método radiométrico na ausência e presença de 50 µM de CTZ, como indicado em Material e Métodos. Concentrações de frutose 6-fosfato testadas: 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,7 e 1,0 mM. Dados representam a média ± erro-padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$), realizados em duplicata.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos para os efeitos da frutose 6-fosfato sobre a atividade da PFK na ausência e na presença de CTZ.

	Controle	50 µM CTZ
V_{max} (mU/µg)	18.6 ± 1.4	16.2 ± 1.3*
K_{0.5} (mM)	0.32 ± 0.02	0.48 ± 0.03*
n	1.2 ± 0.1	2.1 ± 0.2*

* $p < 0.05$ comparado ao controle (teste t de Student)

Se a inibição da PFK-1 pelo CTZ depende da dimerização da enzima promovida pelo fármaco, seria de se esperar que situações que favoreçam a formação de tetrâmeros diminuíssem os efeitos inibitórios do CTZ. O estado oligomérico da PFK-1 é totalmente dependente da concentração da enzima, onde quanto mais diluída maior é a população de estruturas menores e vice-versa. Assim, avaliamos os efeitos do CTZ sobre diferentes concentrações de PFK-1, onde torna-se claro que o efeito inibitório é maior em concentrações menores da enzima, desaparecendo em concentrações acima de 1,5 µg/mL de PFK-1 (Figura 18). Esse desaparecimento da capacidade inibitória do CTZ sobre a PFK-1 não pode ser atribuída a um excesso molar da enzima, uma vez que, considerando-se a enzima com 85 kDa, uma concentração de 1,5 µg/mL equivale a ~18 nM, o que é mais de 2700 vezes menor que a concentração de CTZ (50 µM). Assim, conclui-se que o favorecimento da formação de tetrâmeros reverte a inibição promovida pelo CTZ sobre a PFK-1.

4.3 Análise estrutural e da atividade do complexo PFK-1-Aldolase na presença do CTZ.

Como descrito anteriormente, a PFK-1 pode associar-se formando complexos protéicos com diversas proteínas. Curiosamente, a forma dimérica da PFK-1, originalmente inativa, quando associada à Aldolase apresenta atividade similar a forma tetramérica (Orósz *et al.*, 1987; Vértessy *et al.*, 1997). O CTZ por sua vez, como mostrado nesse trabalho e por Zancan e colaboradores (2007a), favorece a formação de dímeros inativos. Com o objetivo de analisar o efeito do trinômio PFK-1-Aldolase-CTZ, também no pH 7,4, realizamos uma série de experimentos buscando observar que efeito prevaleceria numa situação onde

Aldolase e CTZ estivessem agindo sobre a PFK-1. A equivalência molar entre a Aldolase e a PFK nesses ensaios é de 1:1.

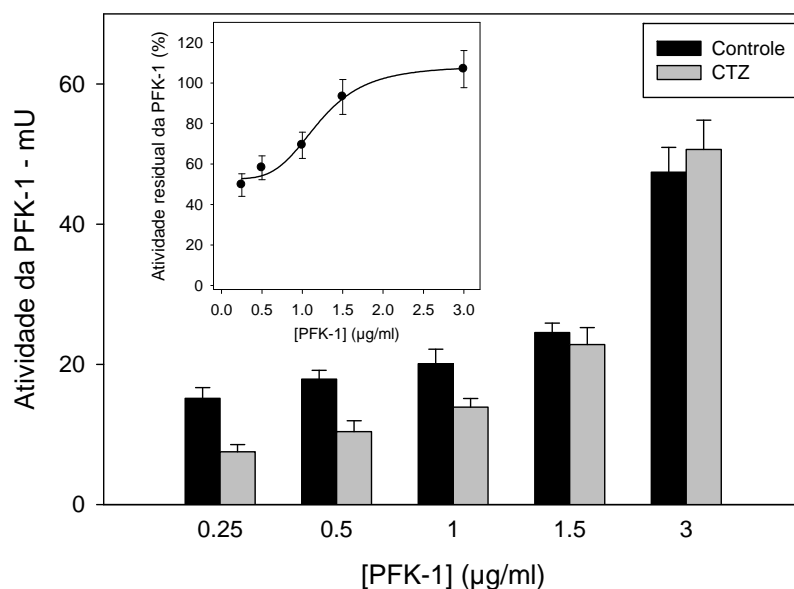


Figura 18. Curva com concentrações crescentes de PFK-1 na presença do CTZ. A atividade do complexo PFK-1 foi mensurada pelo método radiométrico na ausência e presença de 50 µM de CTZ, como descrito no Material e Métodos. Concentrações de proteína: 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 3,0, 5,0 µg/mL. Dados representam a média ± erro-padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$), realizados em duplicata.

Inicialmente, testamos o efeito do CTZ na conformação oligomérica do complexo protéico PFK-1-Aldolase através da técnica de fluorescência intrínseca. Na Figura 19 observa-se que a presença da Aldolase promoveu um deslocamento do centro de massa do espectro de fluorescência intrínseca da PFK-1, correspondente a conformação dimérica. A presença do CTZ não alterou esse resultado, assim como também não alterou a conformação da PFK-1, já que nesse ensaio o CTZ não foi pré-incubado com a enzima.

Esse efeito imediato sobre a estrutura da PFK-1 observado na presença da Aldolase em favorecer a formação de dímeros da PFK-1 sem a necessidade de uma pré-incubação é compatível com os resultados mostrados por Rais e colaboradores (2000).

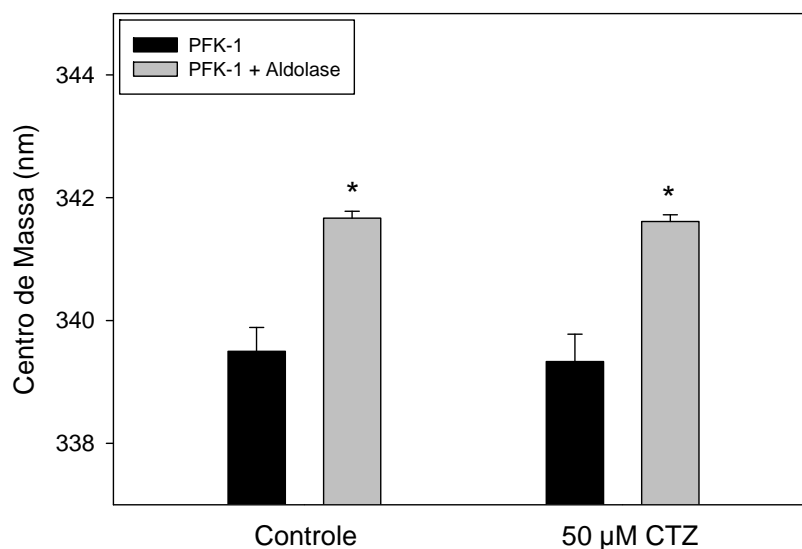


Figura 19. Efeito do CTZ na estrutura oligomérica do complexo bienzimático PFK-1-Aldolase. O espectro de fluorescência intrínseca da PFK-1 (barras pretas) e PFK-1-Aldolase (barras cinzas) foi realizado na ausência e presença de 50 µM de CTZ (sem pré-incubação) como indicado em Material e Métodos. Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$). * $P < 0.05$ comparando com o controle, na ausência de fármaco. O teste t de Student foi usado para avaliar as diferenças estatisticamente significativas entre os valores.

Como descrito na Figura 12, a alteração da conformação oligomérica da PFK-1 promovida pelo CTZ é dependente do tempo de incubação. Com base nessas informações, decidimos pré-incubar esse complexo durante 1 h a 37°C na presença e ausência do fármaco para investigar se nessas condições a conformação do complexo seria alterado.

Apesar de nesse ensaio promover a dimerização da PFK-1 sozinha, o CTZ não foi capaz de promover nenhuma alteração na conformação oligomérica da PFK-1-Aldolase, o qual se manteve dimérico (Figura 20).

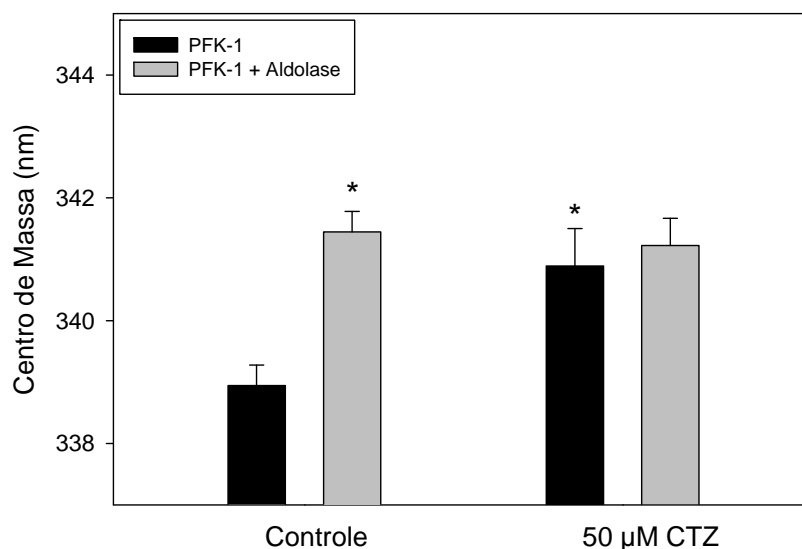


Figura 20. Efeito do CTZ na estrutura oligomérica do complexo bienzimático PFK-1-Aldolase com pré-incubação do fármaco. PFK-1 purificada e o complexo PFK-1-Aldolase foram incubadas por 1 h na ausência e presença de 50 μM de CTZ. O espectro de fluorescência intrínseca da PFK-1 (barras pretas) e PFK-1-Aldolase (barras cinzas) foi obtido como indicado em Material e Métodos. Dados representam a média ± erro-padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$). * $P < 0.05$ comparando com o controle, na ausência de fármaco. O teste t de Student foi usado para avaliar as diferenças estatisticamente significativas entre os valores.

Os resultados das análises estruturais da PFK-1 na presença de Aldolase e CTZ não são capazes de fornecer qualquer indicação de seus efeitos sobre a atividade fosfofrutocinásica nestas condições. Para elucidar os efeitos do CTZ sobre o complexo

PFK-1-Aldolase fizemos uma curva de concentrações crescentes de Aldolase até atingir uma equivalência equimolar de 1:1 com a PFK-1 e investigamos o efeito do CTZ nessas condições. As amostras foram pré-incubadas a 37°C durante 1 h antes da quantificação da atividade fosfofrutocinásica. O efeito inibitório do CTZ é reduzido conforme a concentração de Aldolase aumenta (Figura 21). Este resultado, sugere que a Aldolase é capaz de proteger a PFK-1 do efeito inibitório promovido pelo CTZ. Entretanto, baseados nos resultados das duas figuras anteriores, essa reversão de efeito não se dá por impedir os efeitos do fármaco sobre o estado oligomérico da PFK-1, mas provavelmente por promover a formação de uma estrutura dimérica com atividade catalítica similar os tetrâmeros da enzima.

4.4 Estudo dos parâmetros cinéticos do complexo PFK-1-Aldolase na presença de CTZ.

Após verificarmos a capacidade do CTZ em alterar o comportamento cinético da PFK-1 frente a diferentes moduladores alostéricos, nós avaliamos esses mesmos parâmetros frente a cinética do complexo PFK-1-Aldolase em pH 7,4, com equivalência de 1:1 entre as enzimas. Esse conjunto de experimentos tem como finalidade estudar a influência da Aldolase sobre os parâmetros cinéticos da PFK-1 na presença de 50 μM de CTZ. Novamente, investigamos esses efeitos em diferentes valores de pH, diferentes concentrações dos substratos e sobre diferentes concentrações de proteína.

Na Figura 22 pode-se observar que, como para a PFK-1, o complexo PFK-1-Aldolase teve a sua atividade catalítica aumentada conforme o pH do meio reacional tornava-se mais alcalino. Apesar da Aldolase não proteger a PFK-1 contra inibição

promovida em pHs ácidos, esta foi capaz de proteger a enzima do efeito inibitório do CTZ por toda a faixa de pH analisada.

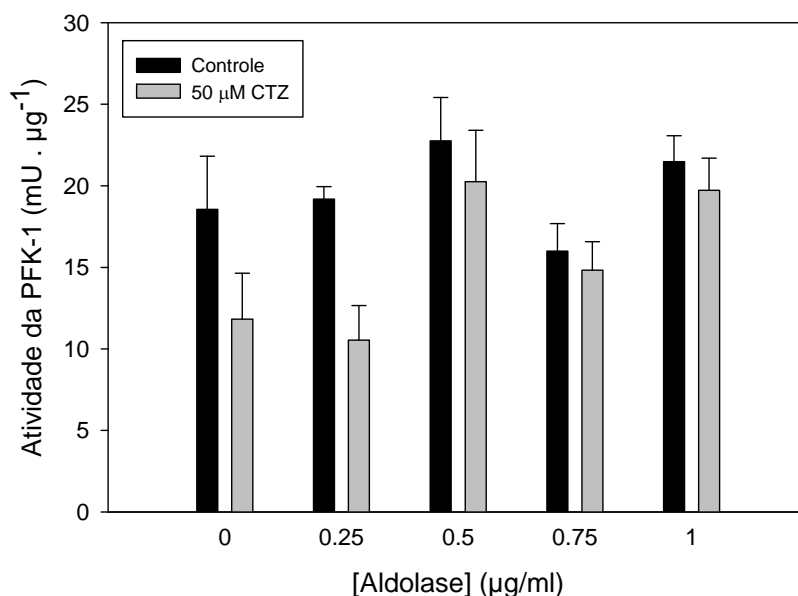


Figura 21. Curva de atividade fosfofrutocinásica com diferentes concentrações de Aldolase na ausência e presença de 50 μM de CTZ. As amostras foram pré-incubadas por 1 h a 37°C com concentrações crescentes de Aldolase: 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 μM/mL. A atividade da PFK-1 foi mensurada pelo método radiométrico, na ausência e presença de 50 μM de CTZ, como indicado em Material e Métodos. Dados representam a média ± erro-padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$). * $P < 0.05$ comparando com o controle, na ausência de fármaco. O teste t de Student foi usado para avaliar as diferenças estatisticamente significativas entre os valores.

Os efeitos do CTZ sobre os parâmetros cinéticos para a modulação da atividade da PFK-1 complexada a Aldolase pelos substratos ATP e frutose 6-fosfato foram avaliados. O complexo PFK-1/Aldolase mantém o mesmo padrão de modulação pelos substratos que a PFK-1 isolada, apresentando os dois componentes, estimulatório e inibitório, para ATP (Figura 23) e um perfil cinético monofásico para frutose 6-fosfato (Figura 24). As

diferenças nas afinidades pelos substratos encontradas são compatíveis com os resultados descritos por Rais e colaboradores (2000). Contudo, os parâmetros cinéticos tanto para modulação por ATP (Tabela 3) quanto para ativação por frutose 6-fosfato (Tabela 4) não foram afetados pela presença de CTZ quando a PFK-1 apresenta-se complexada à Aldolase.

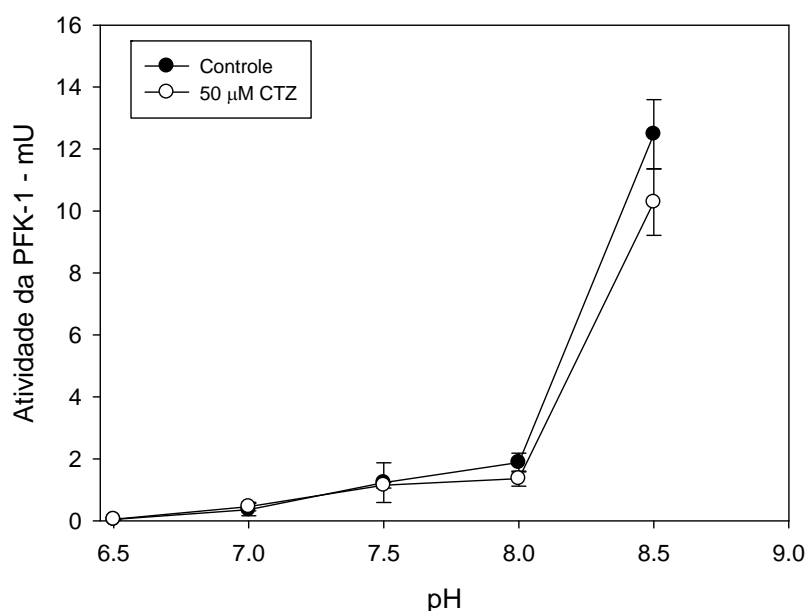


Figura 22. Efeito do CTZ sobre a curva de pH da atividade do complexo PFK-1-Aldolase. A atividade da PFK-1 foi mensurada pelo método radiométrico, na ausência e presença de 50 µM de CTZ, como em Material e Métodos. Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$), realizados em duplicata. * $P < 0.05$ comparando com o controle, na ausência de fármaco. O teste t de Student foi usado para avaliar as diferenças estatisticamente significativas entre os valores.

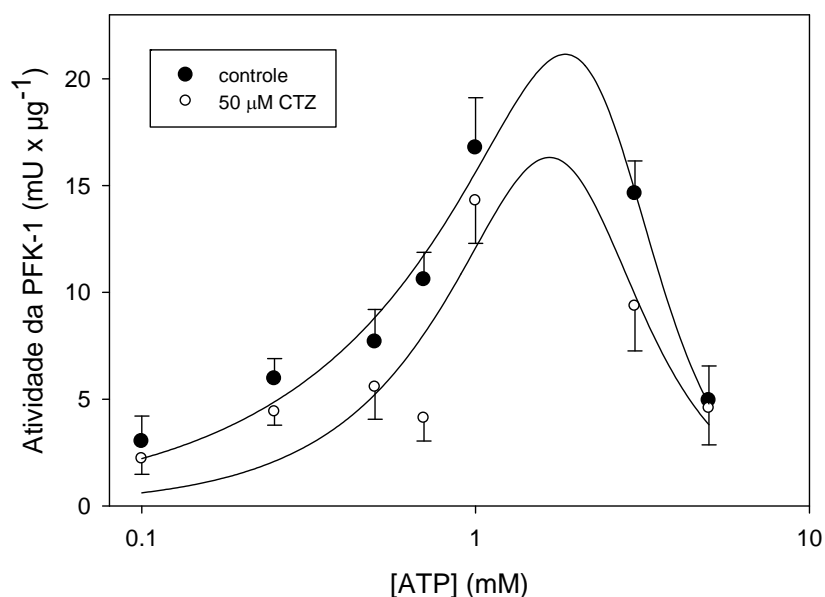


Figura 23. Efeito do CTZ sobre a atividade do complexo PFK-1-Aldolase em diferentes concentrações de ATP. A atividade do complexo PFK-1-Aldolase foi mensurada pelo método radiométrico, na ausência e presença de 50 µM de CTZ, como descrito no Material e Métodos. Concentrações de ATP: 0,1, 0,25, 0,5, 0,7, 1,0, 3,0 e 5,0 mM. Dados representam a média ± erro-padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$), realizados em duplicata .

Tabela 3. Parâmetros cinéticos para os efeitos do ATP sobre a atividade da PFK associada com a Aldolase na ausência e na presença de CTZ

	Controle	50 µM CTZ
K_{0.5} (mM)	0.41 ± 0.04	0.44 ± 0.05
n(a)	1.8 ± 0.2	1.6 ± 0.2
V_{max} (mU/µg)	21.2 ± 3.7	17.9 ± 3.3
K_i (mM)	4.4 ± 0.5	5.2 ± 0.6
n(i)	6.0 ± 2.8	2.3 ± 0.9

Legenda: (a) componente estimulatório; (i) componente inibitório

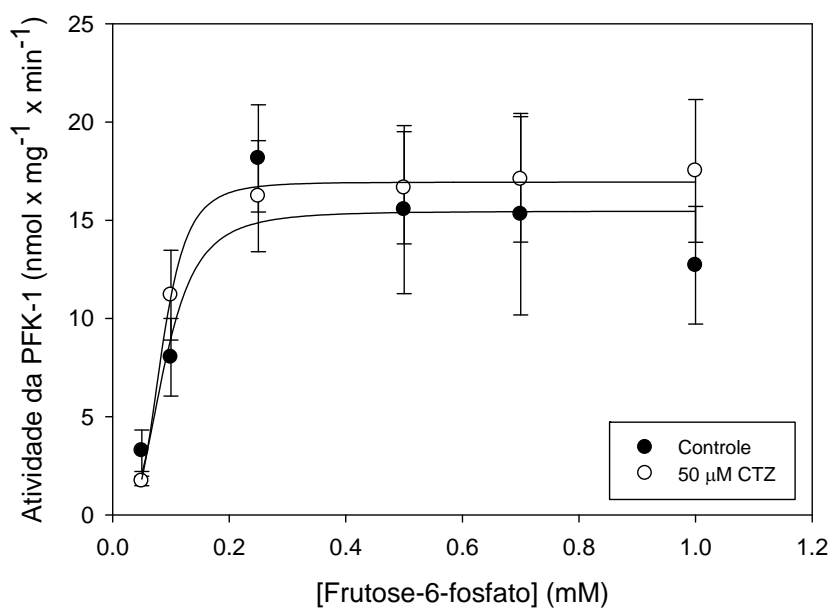


Figura 24. Efeito do CTZ sobre a atividade do complexo PFK-1-Aldolase em diferentes concentrações de frutose-6-fosfato. A atividade do complexo PFK-1-Aldolase foi mensurada pelo método radiométrico, na ausência e presença de 50 μM de CTZ, como descrito no Material e Métodos. Concentrações de frutose 6-fosfato: 0.,05, 0,1, 0,25, 0,5, 0,7 e 1,0 mM. Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$), realizados em duplicata .

Tabela 4. Parâmetros cinéticos para os efeitos da frutose 6-fosfato sobre a atividade da PFK-1 associada com a Aldolase na ausência e na presença de CTZ.

	Controle	50 μM CTZ
V_{max} (mU/μg)	15.8 \pm 2.1	17.2 \pm 2.3
K_{0.5} (mM)	0.14 \pm 0.03	0.15 \pm 0.03
n	2.8 \pm 0.6	3.1 \pm 0.9

De forma análoga ao que foi observado para a PFK-1 isolada, o aumento da concentração do complexo PFK-1/Aldolase é capaz de reverter os efeitos do CTZ sobre a atividade fosfofrutocinásica (Figura 25). Nesse caso, como a concentração das duas enzimas aumentam simultaneamente, a reversão dos efeitos do CTZ provavelmente é devida a um complexo fenômeno de homo- e heteroassociação da PFK-1 como descrito por Rais e colaboradores (2000), formando homotetrâmeros de PFK-1 (que não são inibidos por CTZ) e heterocomplexos de dímeros de PFK-1 associados a aldolase (que também não são inibidos por CTZ).

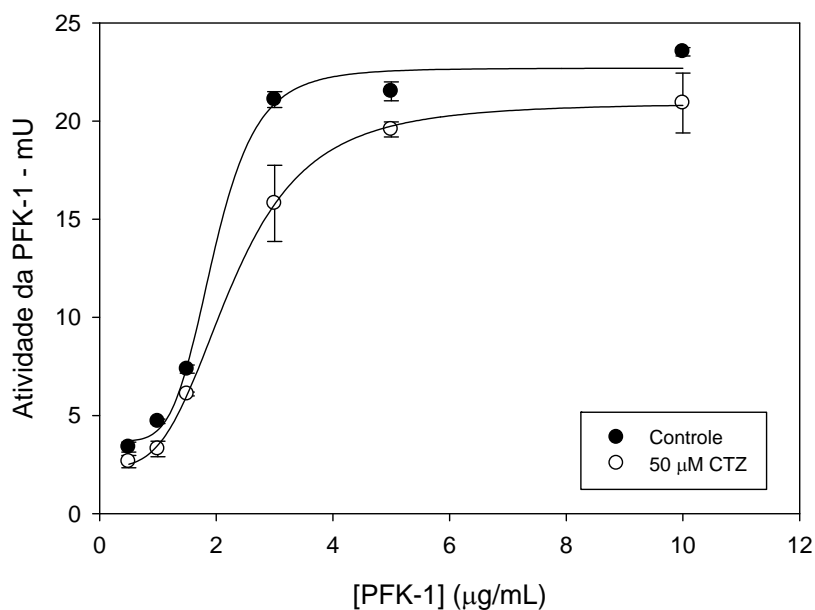


Figura 25. Curva de diferentes concentrações do complexo PFK-1-Aldolase na ausência e presença de CTZ. A atividade do complexo PFK-1-Aldolase foi mensurada pelo método radiométrico, na ausência e presença de 50 µM de CTZ, como descrito no Material e Métodos. Concentrações de proteína: 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 3,0, 5,0 e 10,0 µg/mL. Dados representam a média ± erro-padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$), realizados em duplicata .

4.5 Efeito do clotrimazol na atividade catalítica da Aldolase

Uma vez que o CTZ foi capaz de inibir a atividade fosfofrutocinásica, mas não foi capaz de fazê-lo no complexo bienzimático PFK-1-Aldolase, nosso objetivo foi, então, verificar se o CTZ promoveria algum efeito sobre a atividade da outra enzima do complexo, a Aldolase. Relatos disponíveis atualmente a respeito da ação do CTZ sobre Aldolase descrevem somente que o fármaco é capaz de promover o desligamento dessa enzima do citoesqueleto de uma linhagem celular derivada de câncer de mama, a MCF-7 (Meira *et al.*, 2005), de células CT-26 de adenocarcinoma do cólon, de células de Lewis de carcinoma do pulmão (Penso e Beitner, 2002b), e de células de melanoma de camundongo B16 F10 (Glass-Marmor e Beitner, 1997). Esta dissociação está diretamente relacionada com uma diminuição da viabilidade dessas linhagens. Contudo, seria este o único efeito do CTZ sobre a Aldolase?

Na Figura 26, observamos o efeito direto do CTZ sobre a Aldolase, onde o fármaco foi capaz de promover um efeito inibitório direto significativo sobre a atividade da mesma. Esse efeito não é revertido ou sequer atenuado com o aumento da concentração da enzima, sugerindo ser uma inibição mais potente que a observada para a PFK-1. A Aldolase é fortemente ativada pela presença de PFK-1, como demonstrado na Figura 27. Decidimos assim verificar se a presença de PFK-1 seria capaz de atenuar a inibição promovida pelo CTZ sobre a Aldolase. Como demonstrado pelos resultados apresentados na Figura 28, a presença de PFK-1 não foi capaz de reverter ou atenuar a inibição promovida pelo CTZ sobre a Aldolase. Estes últimos resultados são sumarizados na Figura 29 onde torna-se claro

que, diferente do que ocorre para a atividade da PFK-1, o CTZ promove a inibição da aldolase independente desta enzima encontra-se associada com a PFK-1.

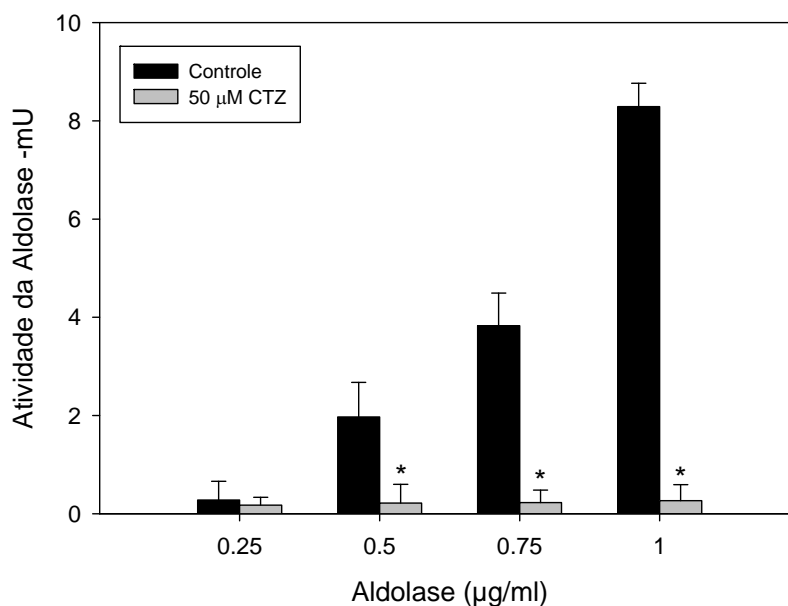


Figura 26. Curva de atividade da Aldolase na ausência e presença de 50 µM de CTZ.

As amostra foram pré incubadas por 1 h a 37°C com concentrações crescentes de Aldolase: 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 µg/mL. A atividade da Aldolase foi mensurada pelo método espectrofotométrico como descrito em Material e Métodos. Dados representam a média ± erro-padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$), realizados em duplicata . * $P < 0.05$ comparando com o controle, na ausência de fármaco. O teste t de Student foi usado para avaliar as diferenças estatisticamente significativas entre os valores.

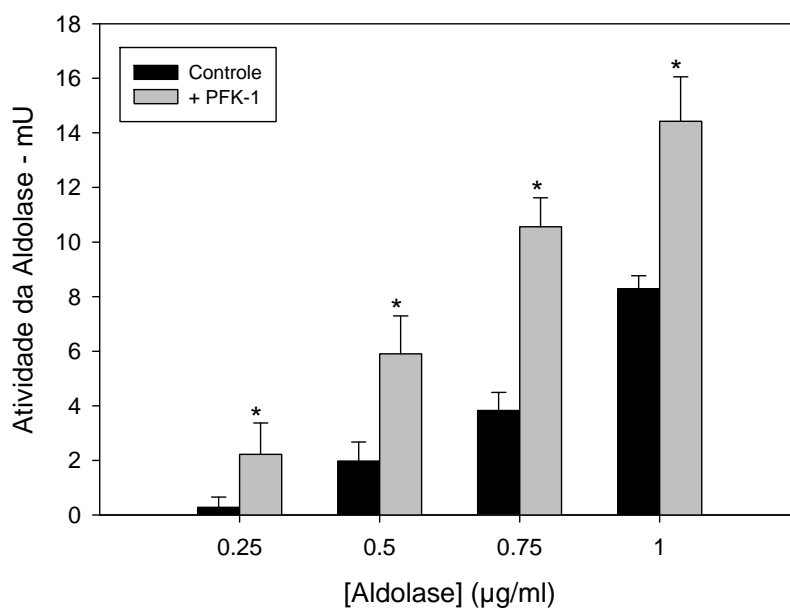


Figura 27. Atividade catalítica da Aldolase na presença da PFK-1. As amostras foram pré-incubadas por 1 h a 37°C com concentrações crescentes de Aldolase: 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 µg/mL. A atividade da Aldolase foi mensurada pelo método espectrofotométrico como descrito em Material e Métodos. Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$), realizados em duplicata.

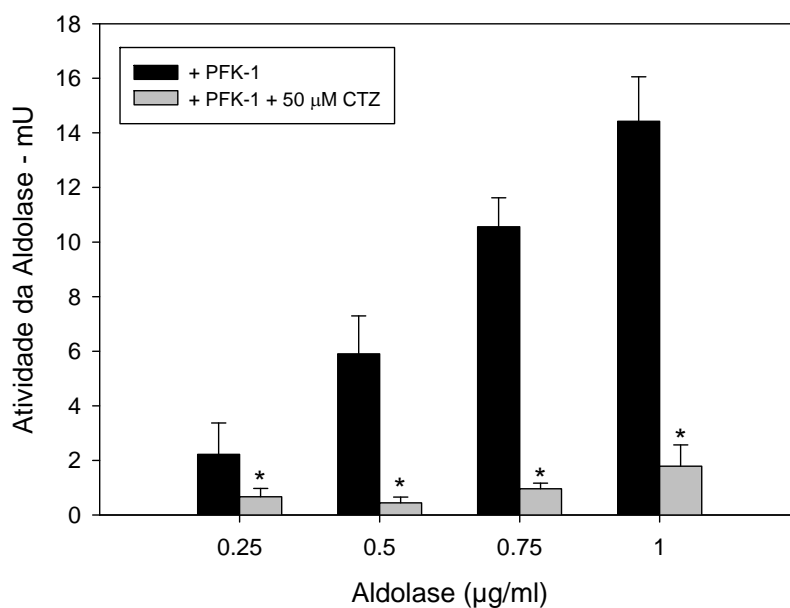


Figura 28. Efeito do CTZ sobre a atividade da Aldolase na presença da PFK-1. As amostras foram pré incubadas por 1 h a 37°C com concentrações crescentes de Aldolase: 0,25, 0,5, 0,75 e 1,0 µg/mL. A atividade da Aldolase foi mensurada pelo método espectrofotométrico como descrito em Material e Métodos. Dados representam a média ± erro-padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$), realizados em duplicata. * $P < 0.05$ comparando com o controle, na ausência de fármaco. O teste t de Student foi usado para avaliar as diferenças estatisticamente significativas entre os valores.

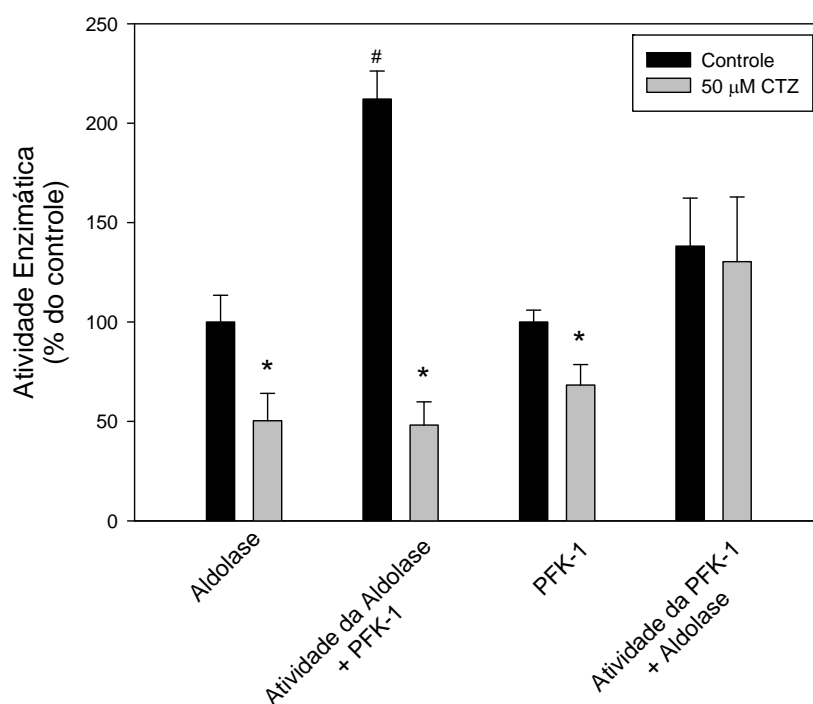


Figura 29. Efeito da interação PFK-1-Aldolase na presença e ausência de CTZ sobre a atividade catalítica da PFK-1 e Aldolase. A atividade da Aldolase foi mensurada pelo método espectrofotométrico e da PFK-1 pelo método radiométrico como descrito em Material e Métodos. Dados representam a média \pm erro-padrão de no mínimo 3 experimentos ($n \geq 3$), realizados em duplicata. * $P < 0.05$ comparando com o controle, na ausência de fármaco. # $P < 0.05$ comparando com o controle, na ausência do fármaco e da PFK-1. O teste t de Student foi usado para avaliar as diferenças estatisticamente significativas entre os valores.

5. DISCUSSÕES

A glicólise é uma importante via bioenergética para diversos sistemas celulares, sendo considerada um excelente alvo para o desenvolvimento de fármacos antineoplásicos que têm como objetivo diminuir a fonte energética com a qual o câncer se nutriria e conseqüentemente se expandiria. Essa terapia ficou conhecida como ‘Terapia Metabólica’ e vem sendo aprimorada tanto para o tratamento do câncer, quanto para o seu diagnóstico. Neste contexto, o CTZ já foi proposto como um fármaco promissor no tratamento do câncer (Penso e Beitner, 2002a; Pendo e Beitner, 2002b; Meira *et al.*, 2005). Isto se deve a sua capacidade de diminuir a viabilidade de diversas linhagens celulares como, células MCF-7 derivadas de câncer de mama (Meira *et al.*, 2005), células CT-26 de adenocarcinoma do cólon e células de Lewis de carcinoma de pulmão (Penso e Beitner, 2002a; Penso e Beitner 2002b). Esses resultados obtidos foram devido a sua habilidade em desligar enzimas da via glicolítica, como PFK-1 e Aldolase, do citoesqueleto diminuindo a atividade dessas enzimas, o fluxo glicolítico e, conseqüentemente, o nível de ATP para a célula, o que acarreta uma diminuição da viabilidade celular. Baseado nessas informações, este trabalho buscou entender os pormenores dessa regulação metabólica através de ensaios *in vitro*. O estudo envolveu o principal ponto de controle da via glicolítica, a reação catalisada pela PFK-1, e englobou também a reação subseqüente a essa, a reação catalisada pela Aldolase. Além disso, estudamos a importância da ligação entre PFK-1 e Aldolase para o metabolismo celular e as alterações que essa associação promove na capacidade inibitória do CTZ sobre ambas enzimas.

Os resultados obtidos neste estudo confirmam dados anteriores relatados por Zancan e colaboradores (2007a) que mostraram um outro efeito do CTZ sobre a enzima chave da glicose, a PFK-1, além do já mostrado sobre o seu desligamento do citoesqueleto. Mostramos que esse fármaco tem a capacidade de favorecer a conformação dimérica da PFK-1, que é a forma inativa da enzima. Esses resultados foram obtidos e confirmados por diferentes técnicas, como cromatografia de gel filtração, eletroforese com reagente de *cross-linker*, *Western Blot* e fluorescência intrínseca, o que valida ainda mais a veracidade desses resultados. Vimos também que essa dimerização da PFK-1, reduziu a afinidade do sítio catalítico da PFK-1 com os seus substratos, ATP e F6P, em 50% e 30%, respectivamente. Ou seja, o CTZ alterou o comportamento cinético da enzima frente aos seus substratos, o que acarreta inevitavelmente na diminuição da sua atividade catalítica.

Associações heterólogas entre a PFK-1 e outras enzimas e com elementos celulares, como filamentos de actina e microtúbulos, têm sido reportadas (Liou e Anderson, 1980; Clarke *et al.*, 1983; Lehotzky *et al.*, 1993). Desde que associações heterólogas alteram a estrutura quaternária da PFK-1, a sua atividade e propriedades regulatórias também são modificadas, ou seja, são altamente dependentes de interações macromoleculares. Rais e colaboradores (2000) mostraram que a Aldolase se liga à forma dimérica da PFK-1 e que essa associação mantém a atividade máxima observada em conformações mais complexas. Nossos resultados confirmam as observações deste grupo de pesquisa, onde, através de ensaios de fluorescência intrínseca e de ensaios cinéticos comprovamos a interação PFK-1-Aldolase. Notamos que essa associação alterou o comportamento cinético da PFK-1 frente ao efeito inibitório promovido pelo CTZ, demonstrando uma capacidade protetora da Aldolase frente a inibição promovida pelo CTZ.

Como relatado anteriormente, o CTZ é reconhecido como um inibidor do fluxo glicolítico. Observamos com os nossos ensaios *in vitro* que o fármaco perde a sua capacidade inibitória sobre a PFK-1 quando esta se encontra ligada a Aldolase. Sabendo que esse tipo de interação heteróloga também ocorre na célula, como explicar a inibição observada sobre a PFK-1 pelo CTZ e consequentemente sobre o fluxo glicolítico relatado por diversos grupos de pesquisa? (Penso e Beitner, 2002a; Penso e Beitner 2002b; Meira *et al.*, 2005). Um outro achado nos nossos estudos, que explica esse ponto, foi a capacidade do fármaco em inibir a outra enzima do complexo, a Aldolase. Além dessa inibição, observamos que a PFK-1 mostrou um caráter ativador da Aldolase quando essas estão associadas. Ao contrário do que foi observado para PFK-1, a presença desta não foi capaz de proteger a Aldolase do efeito inibitório promovido pelo CTZ.

A regulação do metabolismo celular é um evento que envolve uma infinidade de mecanismos direcionados para garantir o fornecimento constante de energia e metabólitos para o organismo. Quanto mais complexo é o organismo, mais complexa é também a regulação do seu metabolismo, como no caso de mamíferos. Assim, apesar de conhecermos diversos mecanismos diferentes de regulação metabólica, ainda estamos muito distantes da compreensão total do metabolismo celular. Isso se torna claro quando tentamos explicar a regulação do fluxo glicolítico.

Baseado na discussão acima, os efeitos do CTZ observados *in vitro* têm como finalidade transportar os conhecimentos adquiridos nesse microambiente, para um macroambiente que é a célula. Isso não somente enriquecerá o entendimento de como ocorre os diferentes tipos de regulação metabólica, que a via glicolítica possui, como possibilitará e possibilitou entender como o CTZ atua como um agente inibidor do fluxo glicolítico.

6. CONCLUSÕES

Concluimos com este trabalho que o clotrimazol atua como um agente inibidor da atividade da PFK-1 e que este efeito é dependente do tempo de exposição da enzima com o fármaco. O CTZ, além de favorecer a conformação dimérica da enzima, que é a forma inativa da enzima, também alterou o comportamento cinético da PFK-1, diminuindo a afinidade do seu sítio catalítico pelos seus dois substratos, ATP e frutose 6-fosfato. Este trabalho também revela a importância das associações proteína-proteína, como a associação entre PFK-1 e Aldolase. Observamos que a Aldolase é capaz de proteger a PFK-1 dos efeitos inibitórios promovidos pelo CTZ sobre a sua atividade, assim como os seus efeitos sobre a estrutura quaternária da enzima. Porém, verificamos também que a PFK-1, ao contrário da Aldolase, não foi capaz de prevenir o efeito inibitório do derivado imidazolínico sobre a Aldolase, mesmo a PFK-1 apresentando-se como um ativador da enzima.

7. PERSPECTIVAS

Dando continuidade ao tema desenvolvido durante o Mestrado, as perspectivas para o Doutorado são:

Desenvolver um sistema protótipo para carregamento e liberação controlada de CTZ para tratamento de câncer a partir de nanopartículas poliméricas contendo nanopartículas magnéticas e compará-los com os resultados obtidos utilizando somente o CTZ.

Adicionalmente e em consequência deste objetivo pretendemos:

- Investigar o papel do CTZ sobre a atividade e estrutura da HK;
- Investigar o papel do CTZ sobre a glicólise aeróbica através da modulação da atividade da HK e PFK-1 em células neoplásicas;
- Avaliar os efeitos desses compostos sobre a ligação da PFK-1 nos filamentos de actina formadores do citoesqueleto das células neoplásicas;
- Avaliar os efeitos destes compostos sobre a localização celular e a atividade da HK mitocondrial;
- Medir o consumo de glicose e a produção da lactato nas condições acima descritas;
- Avaliação da toxicidade das nanopartículas em cultura de células tumorais mamárias pela inibição da glicólise anaeróbica pelo CTZ.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, J.C., FOSTER, C.S. (1996) **Fungal keratitis**. *Int. Ophthalmol. Clin.* 36: 1-15.

ALVES, G.G., SOLA-PENNA, M. (2003) **Epinephrine modulates cellular distribution of muscle phosphofructokinase**. *Mol. Genet. Metab.* 78: 302-306.

ALVES, G.G., MARINHO-CARVALHO, M.M., ATELLA, G.C., SILVA-NETO, M.A., SOLA-PENNA, M (2007) **Allosteric regulation of 6-phosphofructo-1-kinase activity of fat body and flight muscle from the bloodsucking bug *Rhodnius prolixus***. *An. Acad. Bras. Cienc.* 79(1): 53-62.

ANDRÉS, V., CARRERAS, J., CUSSÓ, R. (1996) **Myofibril-bound muscle phosphofructokinase is less sensitive to inhibition by ATP than the free enzyme, but retains its sensitivity to stimulation by bisphosphorylated hexoses**. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 28: 1179-1184.

ARNOLD, H., PETTE, D. (1970) **Binding of aldolase and triosephosphate dehydrogenase to F-actin and modification of catalytic properties of aldolase**. *Eur. J. Biochem.* (2): 360-366.

BECKNER, M.E., STRACKE, M.L., LIOTTA, L.A., SCHIFFMANN, E. (1990) **Glycolysis as primary energy source in tumor cell chemotaxis.** *J. of Natl. Cancer Inst.* 82: 1836–1840.

BEITNER, R. (1990) **Method and composition for the therapeutic and prophylactic treatment of trauma to the skin.** U.S. Patent No. 4,654,323 (1987); No. 4,777,171 (1988) and No. 4,910,197.

BEITNER, R. (1993) **Control of glycolytic enzymes through binding to cell structures and by glucose-1,6-bisphosphate under different conditions. The role of calcium and calmodulin.** *Int. J. Biochem.* 25: 297-305.

BEITNER, R., CHEN-ZION, M., SOFER-BASSUKEVITZ, Y. (1991) **Effect of the calmodulin antagonist CGS 9343B on skin burns.** *Gen. Pharmacol.* 22: 67–72.

BEITNER, R. CHEN-ZION, M., SOFER-BASSUKEVITZ, Y., OSTER, Y., BEN-PORAT, H., MORGENSTERN, H. (1989) **Therapeutic and prophylactic treatment of skin burns with several calmodulin antagonists.** *Gen. Pharmacol.* 20: 165–173.

BEITNER, R., NORDENBERG, J., COHEN, T.J. (1979) **Correlation between the levels of glucose 1,6-diphosphate and the activities of phosphofructokinase, phosphoglucomutase and hexokinase, in skeletal and heart muscles from rats of different ages.** *Int. J. Biochem.* 10(7): 603-608.

BELL, G.I., KAYANO, T., BUSE, J.B., BURANT, C.F., TAKEDA, J., LIN, D., FUKUMOTO, H., SEINO, S. (1990) **Molecular biology of mammalian glucose transporters**. *Diabetes Care* 13: 198-208.

BERGOLD, A.M., GEORGIADIS, S. (2004) **New antifungic drugs: a review**. *Visão Acadêmica, Curitiba*, v. 5, n. 2, p. 159-172.

BERRIDGE, M.J. (1993) **Inositol trisphosphate and calcium signaling**. *Nature* 361: 315-325.

BIRNBAUM, M.J. (1992) **The insulin-sensitive glucose transporter**. *Int. Rev. Cytol.* 137: 239-297.

BOCK, P.E., FRIEDEN, C. (1974) **pH-induced cold lability of rabbit skeletal muscle phosphofructokinase**. *Biochemistry* 13: 4191-4196.

BRDICZKA, D. (1991) **Contact sites between mitochondrial envelope membranes. Structure and function in energy and protein-transfer**. *Biochim. Biophys. Acta* 1071: 291–312.

BROOKS, G.A. (2000) **Intra- and extra-celullar lactate shuttles**. *Medicine and Science and Exercise* 32: 790-799.

BRUGNARA, C., ARMSBY, C.C., SAKAMOTO, M., RIFAI, N., ALPER, S.L., PLATT, O. (1995) **Oral-administration of clotrimazole and blockade of human erythrocyte Ca⁺⁺-activated K⁺ channel: the imidazole ring is not required for inhibitory activity.** J. Pharm. Exp. Ther. 273: 266–272.

BRUGNARA, C., FRANCESCHI, L., ALPER, S.L. (1997) **The antifungal imidazole clotrimazole and its major *in vivo* metabolite are potent blockers of calcium-activated potassium channel in murine erythroleukemia cells.** J. Membr. Biol. 157: 177-191.

BÜCHEL, K.H., DRABER, W., REGEL, E., PLEMPEL, M. (1972) **Synthesis and properties of clotrimazole and other antimycotic 1-triphenylmethylimidazoles** Arzneimittelforschung. 22(8): 1260-1272.

BURGESS, M.A., BODEY, G.P. (1972) **Clotrimazole (Bay b 5097): in vitro and clinical pharmacological studies.** Antimicrob. Agents Chemother. 2: 423–426.

CAMPANELLA, M.E., CHU, H., LOW, P.S. (2005) **Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane.** Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 102: 2402-2407.

CHEN-ZION, M., BASSUKEVITZ, Y., BEITNER, R. (1992) **Sequence of insulin effects on cytoskeletal and cytosolic phosphofructokinase, mitochondrial hexokinase,**

glucose 1,6-bisphosphate and fructose 2,6-bisphosphate levels, and the antagonistic action of calmodulin inhibitors, in diaphragm muscle. *Int. J. Biochem.* 24: 1661-1667.

CLARKE, F., STEPHAN, P., MORTON, D.J., WIEDEMANN, J. (1983) **The role of actin and associated structural proteins in the organization of glycolytic enzymes.** J. Barden and C. Dos Remedios (Eds.). *Actin: Structure and Function in Muscle and Non-Muscle Cells*, Academic Press, Sydney, pp. 249-257.

COELHO, W.S., COSTA, K.C., SOLA-PENNA, M. (2007) **Serotonin stimulates mouse skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase through tyrosine-phosphorylation of the enzyme altering its intracellular localization.** *Mol. Genet. Metab.* 92: 364-370.

CORNISH-BOWDEN, A., CARDENAS, M.L. (1991) **Hexokinase and Glucokinase in Liver Metabolism.** *Trends Biochem. Sci.* 16: 281-282.

DHILLON, N.K., SHARMA, S., KHULLER, G.K. (2003) **Biochemical characterization of Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase from *Candida albicans*.** *Mol. Cell Biochem.* 252: 183-191.

DOIRON, B., CUIF, M.H., CHEN, R., KAHN, A. (1996) **Transcriptional glucose signaling through the glucose response element is mediated by the pentose phosphate pathway.** *J. Biol. Chem.* 271: 5321-5324.

EL-BACHA, T., FREITAS, M.S., SOLA-PENNA, M. (2003) **Cellular distribution of phosphofructokinase activity and implications to metabolic regulation in human breast cancer.** *Mol. Genet. Metabol.* 79: 294-299.

ETO, K., SUGA, S., WAKUI, M., TSUBAMOTO, Y., TERAUCHI, Y., TAKA, J., AIZAWA, S., NODA, M., KIMURA, S., KASAI, H., KADOWAKI, T. (1999) **NADH shuttle system regulates K_{ATP} channel dependent pathway and steps distal to cytosolic Ca^{2+} concentration elevation in glucose-induced insulin secretion.** *J. Biol. Chem.* 274: 25386–25392.

FABER-BARATA, J., SOLA-PENNA, M. (2005) **Opposing effects of two osmolytes - trehalose and glycerol - on thermal inactivation of rabbit muscle 6-phosphofructo-1-kinase.** *Mol. Cell Biochem.* 269: 203-207.

GAMBLIN, S.J., COOPER, B., MILLAR, J.R., DAVIES, G.J., LITTLECHILD, J.A., WATSON, H.C. (1990) **The crystal structure of human muscle aldolase at 3.0 Å resolution.** *FEBS Lett.* 262(2): 282-286.

GATENBY, R.A., GILLIES, R.J. (2004) **Why do cancers have high aerobic glycolysis?** *Nat. Rev. Cancer* 4(11): 891-899 Review.

GEORGIEV, V.S. (2000) **Membrane transporters and antifungal resistance** *Current Drug Targeting* 1 (3): 261-284.

GIETZEN, K., ADAMCZYK-ENGELMANN, P., WUTHRICH, A., KONSTANTINOVA, A., BADER, H. (1983) **Compound 48/80 is a selective and powerful inhibitor of calmodulin regulated functions.** *Biochim. Biophys. Acta.* 736: 109-118.

GLASS-MARMOR, L., BEITNER, R. (1997) **Detachment of glycolytic enzymes from cytoskeleton of melanoma cells induced by calmodulin antagonists.** *European Journal of Pharmacology.* 328(2-3): 241-248.

GLASS-MARMOR, L., MORGENSTERN, H., BEITNER, R. (1996) **Calmodulin antagonists decrease glucose 1,6-bisphosphate, fructose 1,6-bisphosphate, ATP and viability of melanoma cell.** *European Journal of Pharmacology* 313(3): 265-271.

GONZÁLEZ, C., URETA, T., SÁNCHEZ, R., NIEMEYER, H. (1964) **Multiple molecular forms of ATP: hexose 6-phosphotranseferase from rat liver.** *Biochemical and Biophysical* 16: 347–352.

GRABITSKE, H.A., SLAVIN, J.L. (2009) **Gastrointestinal effects of low-digestible carbohydrates.** *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 49(4): 327-360. Review.

GREINER, E.F., GUPPY, M., BRAND, K. (1994) **Glucose is essential for proliferation and the glycolytic enzyme induction that provokes a transition to glycolytic energy production.** *J. Biol. Chem.* 269: 31484–31490.

GROSSBARD, L., SCHIMKE, R.T. (1966) **Multiple hexokinases of rat tissues. Purification and comparison of soluble forms.** J. Biol. Chem. 241(15): 3546-3560.

GUPTA, R.K., OESTERLING, R.M., MILDVAN, A.S. (1976) **Magnetic resonance studies of the proximity and spatial arrangement of propionyl coenzyme A and pyruvate on a biotin-metalloenzyme, transcarboxylase.** Biochemistry 15: 2881-2887.

HALT, W.N., LAZO, J.S. (1986) **Calmodulin: a potential target for cancer chemotherapeutic agents.** J. Clin. Oncol. 4(6): 994-1012.

HAND, S.C., CARPENTER, J.F. (1986) **pH-induced hysteretic properties of phosphofructokinase purified from rat myocardium.** Am. J. Physiol. 250(3 Pt 2): R505-R511

HEGEMANN, L., TOSO, S.M., LAHIJANI, K.I., WEBSTER, G.F., UITTO, J. (1993) **Direct interaction of antifungal azole-derivatives with calmodulin: a possible mechanism for their therapeutic activity.** J. Invest. Dermatol. 100(3): 343-346.

HEINISCH, J., RITZEL, R.G., VON BORSTEL, R.C., AGUILERA, A., RODICIO, R., ZIMMERMANN, F.K.(1989). **The phosphofructokinase genes of yeast evolved from two duplication events.** Gene. 78(2): 309-321.

HELLINGA, H.W., EVANS, P.R. (1985) **Nucleotide sequence and high-level expression of the major Escherichia coli phosphofructokinase**. Eur. J. Biochem. 149(2): 363-373.

HERMANSON, G.T. (2008) **Bioconjugate Techniques**. 2nd Edition pp 1041-1132

HESTERBERG, L.K., LEE, J.C. (1980) **Sedimentation study of a catalytically active form of rabbit muscle phosphofructokinase at pH 8.55**. Biochemistry 19: 2030–2039

HOOGERHEIDE, J.G., WYKA, B.E. (1982) Anal. Profiles Drugs Subs. 11: 225-255.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA DE CÂNCER, RIO DE JANEIRO, BRASIL (2009) **Estimativa 2009: Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível no site, <http://www.inca.gov.br/estimativa/2009/versaofinal.pdf>. Acessado em setembro de 2009.

KAUL, R.K., KOHLER, H. (1983) **Interaction of hemoglobin with band 3: a review**. Klin Wochenschr. 61: 831-837.

KEMP, R.G. (1975) **Phosphofructokinase**. Methods Enzymol. 42: 72-77.

KEMP, R.G., FOE, L.G. (1983) **Allosteric regulatory properties of muscle phosphofructokinase.** Mol. Cell. Biochem. 57: 147-154.

KHERLOPIAN, A.R., SONG, T., DUAN, Q., NEIMARK, M.A., PO, M.J., GOHAGAN, J.K., LAINE, A.F. (2008) **A review of imaging techniques for systems biology.** BMC Syst. Biol. 2: 74.

KOLB, E., HUDSON, P.J., HARRIS, J.I. (1980) **Phosphofructokinase: complete amino-acid sequence of the enzyme from Bacillus stearothermophilus.** Eur. J. Biochem. 108(2): 587-597.

KROEMER, G., POUYSSEGUR, J. (2008) **Tumor cell metabolism: cancer's Achilles Heel.** Cancer Cell 13: 472-482.

KUO, H.J., MALENCIK, D.A., LIOU, R.S., ANDERSON, S.R. (1986) **Factors affecting the activation of rabbit muscle phosphofructokinase by actin.** Biochemistry 25: 1278-1286.

LAEMMLI, U.K. (1970) **Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.** Nature 227: 680-685.

LAN, J.Q., STEINER, R.F. (1991) **The interaction of troponin C with phosphofructokinase. Comparison with calmodulina.** Biochem. J. 274 (Pt 2): 445-451.

LEBHERZ, H.G. (1975) **Evidence for the lack of subunit exchange between aldolase tetramers in vivo.** J. Biol. Chem. 250(18): 7388-7391.

LEBHERZ, H.G., RUTTER, W.J. (1969) **Distribution of fructose diphosphate aldolase variants in biological systems.** Biochemistry 8: 109–121.

LEHOTZKY, A., TELEGDI, M., LILIOM, K., OVÁDI, J. (1993) **Interaction of phosphofructokinase with tubulin and microtubules. Quantitative evaluation of the mutual effects.** J. Biol. Chem. 268: 10888-10894.

LEITE, T.C., DA SILVA, D., COELHO, R.G., ZANCAN, P., SOLA-PENNA, M. (2007) **Lactate favors the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis.** Biochem. J. 408: 123-130

LEVIN, R.M., WEISS, B. (1978) **Specificity of the binding of trifluoperazine to the calcium-dependent activator of phosphodiesterase and to a series of other calcium-binding proteins.** Biochim. Biophys. Acta. 540: 197-204.

LIU, R.S., ANDERSON, S. (1980) **Activation of rabbit muscle phosphofructokinase by F-actin and reconstituted thin filaments.** Biochemistry 19: 2684-2688.

LIU, H., HU, Y.P., SAVARAJ, N., PRIEBE, W., LAMPIDIS, T.J. (2001) **Hypersensitization of Tumor Cells to Glycolytic Inhibitors**. *Biochemistry* 40: 5542–5547.

LIU, H., SAVARAJ, N., PRIEBE, W., LAMPIDIS, T.J. (2002) **Hypoxia increases tumor cell sensitivity to glycolytic inhibitors: a strategy for solid tumor therapy (Model C)**. *Biochemical Pharmacology* 64: 1745–1751.

LIVNAT, T., CHEN-ZION, M., BEITNER, R. (1993) **Stimulatory effect of epidermal growth factor on binding of glycolytic enzymes to muscles cytoskeleton and the antagonistic action of calmodulin inhibitors**. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 50(1): 24-34.

LIVNAT, T., CHEN-ZION, M., BEITNER, R. (1994) **Platelet-derived growth factor (PDGF) rapidly stimulates binding of glycolytic enzymes to muscle cytoskeleton, prevented by calmodulin antagonists**. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 53(1): 28-33.

LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, N.L., FARR, A.L., RANDAL, R.J. (1951) **Protein measurement with the Folin phenol reagent**. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

LUTHER, M.A., CAI, G.Z., LEE, J.C. (1986) **Thermodynamics of dimer and tetramer formations in rabbit muscle phosphofructokinase**. *Biochemistry* 25: 7931–7937.

LUTHER, M.A., GILBERT, H.F., LEE, J.C. (1983) **Self-association of rabbit muscle phosphofructokinase: role of subunit interaction in regulation of enzymatic activity.** *Biochemistry* 22: 5494–5500.

LUTHER, M.A., LEE, J.C. (1986) **The role of phosphorylation in the interaction of rabbit muscle phosphofructokinase with F-actin.** *J. Biol. Chem.* 261: 1753-1759.

MAIA, J.C.C., GOMES, S.L., JULIANI, M.H. (1983) **Preparation of [α -³²P] and [γ -³²P] - nucleoside triphosphate, with high specific activity.** C.M. Morel (Ed.) *Genes and Antigens of Parasites, a Laboratory Manual*, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, RJ, Brazil, pp. 146-157.

MAHER, J.C., KRISHAN, A., LAMPIDIS, T.J. (2004) **Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-d-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions.** *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 53: 116–122.

MANOLESCU, A.R., WITKOWSKA, K., KINNAIRD, A., CESSFORD, T., CHEESEMAN, C. (2007) **Facilitated hexose transporters: new perspectives on form and function.** *Physiology (Bethesda)*. 22: 234-240.

MARCEAU, F., LUSSIER, A., REGOLI, D., GIROUD, J.P. (1983) **Pharmacology of kinins: their relevance to tissue injury and inflammation.** *Gen. Pharmacol.* 14: 209–229.

MARÍN-HERNÁNDEZ, A., RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, S., VITAL-GONZÁLEZ, P.A., FLORES-RODRÍGUEZ, F.L., MACÍAS-SILVA, M., SOSA-GARROCHO, M., MORENO-SÁNCHEZ, R. **Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. Flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase.** FEBS J. 273(9): 1975-1988

MARINHO-CARVALHO, M.M., ZANCAN, P., SOLA-PENNA M., (2006) **Modulation of 6-phosphofructo-1-kinase oligomeric equilibrium by calmodulin: Formation of active dimmers.** Molecular Genetics and Metabolism 87: 253–261.

MARINHO-CARVALHO, M.M., COSTA-MATTOS, P.V., SPITZ, G.A., ZANCAN, P., SOLA-PENNA, M. (2009) **Calmodulin upregulates skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase reversing the inhibitory effects of allosteric modulators.** Biochim. Biophys. Acta. (8): 1175-1180.

MAZUREK, S., MICHEL, A., EIGENBRODT, E. (1997) **Effect of extracellular AMP on cell proliferation and metabolism of breast cancer cell lines with high and low glycolytic rates.** J. Biol. Chem. 272(8): 4941-4952.

MEIRA, D.D., MARINHO-CARVALHO, M.M., TEIXEIRA, C.A., VEIGA, V.F., DA POIAN, A.T., HOLANDINO, C., FREITAS, M.S., SOLA-PENNA, M. (2005) **Clotrimazole decreases human breast cancer cells viability through alterations in cytoskeleton-associated glycolytic enzymes.** Mol. Genet. Metab. 84: 354-362.

METIVIER, F., MARCHAIS, S.J., GUERIN, A.P., PANNIER, B., LONDON, G.M. (2000) **Pathophysiology of anaemia: focus on the heart and blood vessels.** Nephrology Dialysis Transplantation 15: 14-18. Review.

MORENO-SÁNCHEZ, R., RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, S., MARÍN-HERNÁNDEZ, A., SAAVEDRA, E. (2007) **Energy metabolism in tumor cells.** FEBS J. 274: 1393-1418.

MUECKLER, M. (1994) **Facilitative glucose transporters -** Review Eur. J. Biochem. 219: 713-725.

MURRAY, R.H., GRANNER, D.K., MAYES, P.A., RODWELL, V.M. (2003) **Harper's Illustrated Biochemistry.** The McGraw-Hill Companies pp.160-266 ed.

NELSON, D.L., COX, M.M. (2000) **Lehninger Principles of Biochemistry.** 3^o ed., Worth Publishers, New York, NY.

NETTELBLAD, F.A., FORSBERG, P.O., HUMBLE, E., ENGSTROM, L. (1986) **Aspects on the phosphorylation of muscle phosphofructokinase by protein kinase C - inhibition by phosphofructokinase stabilizers.** Biochem. Biophys. 136: 445-453

O'DAY, D.M., BURD, E.M. (1994) **Fungal keratitis and conjunctivitis.** Mycology. In: Smolin G, Thoft RA. The Cornea. Boston: Little, Brown; pp. 229-239

OKAR, D.A., MANZANO, A., NAVARRO-SABATÉ, A., RIERA, L.L., BARTRONS, R., LANGE, A.J. (2001) **PFK-1-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose 2,6-bisphosphate.** Trends Biochem. Sci. 26: 30–35.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS) (2009) Disponível em: <http://www.who.int/topics/cancer/en/>. Acessado em setembro de 2009.

ORÓSZ, F., CHRISTOVA, T.Y., OVÁDI, J. (1987) **Aldolase decreases the dissociation induced inactivation of muscle phosphofructokinase.** Biochem. Biophys. 147: 1121-1128.

OROSZ, F., CHRISTOVA, T.Y., OVÁDI, J. (1988) **Functional in vitro test of calmodulin antagonism: effect of drugs on interaction between calmodulin and glycolytic enzymes.** Mol. Pharmacol. 33: 678-682.

OVÁDI, J., OROSY, F. (1996) **New concept for control of glycolysis.** in: L. Agius, H.S.A. Sherratt (Eds), Channeling in Intermediary Metabolism, Portland, London, pp 237-268.

PAETKAU, V., H.A. (1967) **Phosphofructokinase. Correlation of physical and enzymatic properties.** J. Biol. Chem. 242: 2035-2042.

PAGLIARO, L., TAYLOR, D.L. (1988) **Aldolase exists in both the fluid and solid phases of cytoplasm.** J. Cell Biol. (3): 981-291

PARMEGGIANI, A., LUFT, J., LOVE, D.S., KREBS, E.G. (1966) **Crystallization and properties of rabbit skeletal muscle phosphofructokinase.** J. Biol. Chem. 241: 4625-4637.

PASSONNEAU, J.V., LOWRY, O.H. (1962) **Phosphofructokinase and the Pasteur effect.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 7: 10-15.

PENHOET, E.E., KOCHMAN, M., RUTTER, W.J. (1969) **Isolation of fructose diphosphate aldolases A, B, and C.** Biochemistry 8: 4391-4395

PENHOET, E., KOCHMAN, M., VALENTINE, R., RUTTER, W.J. (1967) **The subunit structure of mammalian fructose diphosphate aldolase.** Biochemistry. 6(9): 2940-2949.

PLEMPEL, M., BARTMANN, K. (1972) **Experimental studies on the antimycotic action of clotrimazole (Canesten) in vitro and after local application in vivo.** Drugs Germ. 15: 103-120.

PENSO, J., BEITNER, R. (1997) **Clotrimazole and bifonazole detach from mitochondria of melanoma cells.** European Journal of Pharmacology 342: 113-117.

PENSO, J., BEITNER, R. (2002a) **Detachment of glycolytic enzymes from cytoskeleton of Lewis lung carcinoma and colon adenocarcinoma cells induced by**

clotrimazole and its correlation to cell viability and morphology. *Mol. Genet. Metab.* 76: 181-188.

PENSO, J., BEITNER, R. (2002b) **Clotrimazole decreases glycolysis and the viability of lung carcinoma and colon adenocarcinoma cells.** *Eur. J. Pharmacol.* 451: 227-235.

PETTE, D., BRANDAU, H. (1962) **Intracellular localization of glycolytic enzymes in cross-striated muscles of *Locusta migratoria*.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 9: 367-370.

PILKIS, S.J., CLAUS, T.H., KURLAND, I.J., LANGE, A.J. (1995) **6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme.** *Annu. Rev. Biochem.* 64: 799-835. Review.

PHILIPS, D., BLAKE, C.C.F., WATSON, H.C. (1981) **The enzymes of glycolysis: structure, activity and evolution.** *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 293(1063): 1-214.

RACKER, E. (1974) **History of the Pasteur effect and its pathobiology.** *Mol. Cell. Biochem.* 5: 17-23.

RAIS, B., ORTEGA, F., PUIGJANER, J., COMIN, B., OROSZ, F., OVADI, J., CASCANTE, M. (2000) **Quantitative characterization of homo- and heteroassociations of muscle phosphofructokinase with aldolase.** *Biochim. Biophys. Acta* 1479: 303-314.

RASMUSSEM, C.D., MEANS, A.R. (1987) **Calmodulin is involved in regulation of cell proliferation.** *EMBO J.* 6 (13): 3961-3968.

RASOULI, M., TRISCHUK, T.C., LEHNER, R. (2004) **Calmodulin antagonist W-7 inhibits de novo synthesis of cholesterol and suppresses secretion of de novo synthesized and preformed lipids from cultured hepatocytes.** *Biochim. Biophys. Acta.* 1682: 92-101.

REDDY, G.P.V. (1994) **Cell cycle: regulatory events in G1-->S transition of mammalian cells.** *J. Cell. Biochem.* 54(4): 379-386.

ROBERGS, R.A., GHIASVAND, F., PARKER, D. (2004) **Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis.** *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 287: R502-R516.

ROBINSON, L.J., PANG, S., HARRIS, D.S., HEUSER, J., JAMES, D.E. (1992) **Translocation of the glucose transporter (GLUT4) to the cell surface in permeabilized 3T3-L1 adipocytes: effects of ATP insulin, and GTP gamma S and localization of GLUT4 to clathrin lattices.** *J. Cell Biol.* 117(6): 1181-1196

ROCHA E SILVA, M., ROSENTHAL, S.R. (1961) **Release of pharmacologically active substances from the rat skin *in vivo* following thermal injury.** J. Pharmacol. Exp. Ther. 132: 110–116.

RUSSELL, P.J, WILLIAMS, A., AMADOR, X., VARGAS, R. (2004) **Aldolase and actin protect rabbit muscle lactate dehydrogenase from ascorbate inhibition.** J. Enzyme Inhib Med Chem. 19(1): 91-98.

SCHATZMANN, H.J., VINCENZI, F.F. (1969) **Calcium movements across the membrane of human red cells.** J. Physiol. 201: 369-395.

SEBASTIAN, S., WHITE, J.A., WILSON, J.E. (1999) **Characterization of the rat type III hexokinase gene promoter. A functional octamer 1 motif is critical for basal promoter activity,** J. Biol. Chem. 274: 31700–31706.

SEMENZA, G. (2002) **Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1.** Biochem Pharmacol. 64 (5-6): 993-998. Review.

SILVA, A.P., ALVES, G.G., ARAÚJO, A.H.B., SOLA-PENNA, M. (2004) **Effects of insulin and actin on phosphofructokinase activity and cellular distribution in skeletal muscle.** Annals of the Brazilian Academy of Sciences 76(3): 541-548.

SHADOMY, S., DIXON, D.M., MAY, R. (1982) **A comparison of bifonazole (Bay H 4502) with clotrimazole *in vitro*.** Sabouraudia 20: 313-323.

SOLA-PENNA, M., SANTOS, A.C., SEREJO, F., ALVES, G.G., EL-BACHA, T. FABER-BARATA, J., PEREIRA, M.F., DA POIAN, A.T., SORENSON, M. (2002) **A radioassay for phosphofructokinase-1 activity in cell extracts and purified enzyme.** J. Biochem. Biophys. Meth. 50: 129-140.

SPITZ, G.A., FURTADO, C.M., SOLA-PENNA, M., ZANCAN, P. (2009) **Acetylsalicylic acid and salicylic acid decrease tumor cell viability and glucose metabolism modulating 6-phosphofructo-1-kinase structure and activity.** Biochem. Pharmacol. 77(1): 46-53.

STANLEY, W.C., CONNETT, R.J. (1991) **Regulation of muscle carbohydrate metabolism during exercise.** Faseb J. 5: 2155-2159.

STAROS, J.V. (1982) **N-hydroxysulfosuccinimide active esters: bis(N-hydroxysulfosuccinimide) esters of two dicarboxylic acids are hydrophilic, membrane-impermeant, protein cross-linkers.** Biochemistry 21(17): 3950-395.

STARR, M.S., WEST, G.B. (1967) **Bradykinin and oedema formation in heated paws of rats.** Br. J. Pharmacol. Chemother. 31: 178-187.

SYGUSCH, J., BEAUDRY, D., ALLAIRE, M. (1990) **Inactivation of mammalian fructose diphosphate aldolases by COOH terminus autophosphorylation.** Arch. Biochem. Biophys. 283(2): 227-33.

TAKAGI, A., IIZUKA, H. (1995) **UVB-induced calmodulin increase in pig epidermis: analysis of the effect of the calmodulin antagonist, W-13.** Arch. Dermatol. Res. 287: 326-332.

TAKAHASHI, H., ABE, M., SUGAWARA, T. (1998) **Clotrimazole, an imidazole antimycotic, is a potent inhibitor of angiogenesis.** Jpn. J. Cancer Res. 89: 445-451.

TAKEI, S., ISEDA, T., YOKOYAMA, M. (2003) **Inhibitory effect of clotrimazole on angiogenesis associated with bladder epithelium proliferation in rats.** Int. J. Urol. 10: 78-85.

TARUI, S., OKUNO, G., IKURA, Y., TANAKA, T., SUDA, M., NISHIKAWA, M. (1965) **Phosphofructokinase deficiency in skeletal muscle. A new type of glycogenosis.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 19: 517-523.

TIEN HUY, N., TAKANO, R., HARA, S., KAMEI, K. (2004) **Enhancement of Heme-induced membrane damage by the anti-malarial clotrimazole: The role of colloid osmotic forces.** Biol. Pharm. Bull. 27(3): 361-365.

TORNHEIM, K., LOWENSTEIN, J.M. (1976) **Control of phosphofructokinase from rat skeletal muscle. Effects of fructose diphosphate, AMP, ATP and citrate.** J. Biol. Chem. 251: 7322-7328.

UYEDA, K. (1969) **Reaction of phosphofructokinase with maleic anhydride, succinic anhydride, and pyridoxal 5'-phosphate.** *Biochemistry* 8(6): 2366-2373.

UYEDA, K. (1979) **Phosphofructokinase.** *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, v. 48, pp. 193-244.

UYEDA, K., FURUYA, E., LUBY, L.J. (1981) **The effect of natural and synthetic D fructose 2,6-bisphosphate on the regulatory kinetic properties of liver and muscle phosphofructokinases.** *J. Biol. Chem.* 256: 8394-8399.

VAN SCHAFTINGEN, E., HERS, H.G. (1980) **Synthesis of a stimulator of phosphofructokinase, most likely fructose 2,6-bisphosphate, from phosphoric acid and fructose 6-phosphoric acid.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96: 1524-1531

VAN SCHAFTINGEN, E., JETT, M.F., HUE, L., HERS, H.G. (1981) **Control of liver 6- phosphofructokinase by fructose 2, 6-bisphosphate and other effectors.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 3483-3486.

VEIGL, M.L., VANAMAN, T.C., SEDWICK, W.D. (1984) **Calcium and calmodulin in cell growth and transformation.** *Biochim. Biophys. Acta* 738(1-2): 21-48.

VÉRTESSY, B.G., OROSZ, F., KOVÁCS, J., OVÁDI, J. (1997) **Alternative binding of two sequential glycolytic enzymes to microtubules. Molecular studies in the phosphofructokinase/aldolase/microtubule system.** *J. Biol. Chem.* 279: 25542-25546.

VIITANEN, P.V., GEIGER, P.J., ERICKSON-VIITANEN, S., BESSMAN, S.P., (1984) **Evidence for functional hexokinase compartmentation in rat skeletal muscle mitochondria.** *J. Biol. Chem.* 259: 9679–9684.

VORA, S., FRANCKE, U. (1981) **Assignment of the human gene for liver-type 6- phosphofructokinase isozyme (PFK-1L) to chromosome 21 by using somatic cell hybrids and monoclonal anti-L antibody.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 3738-3742.

ZANCAN, P., MARINHO-CARVALHO, M.M., FABER-BARATA, J., DELLIAS, J.M., SOLA-PENNA, M. (2008) **ATP and fructose-2,6-bisphosphate regulate skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase by altering its quaternary structure.** *IUBMB. Life* 60: 526-533.

ZANCAN, P., ROSAS, A.O., MARCONDES, M.C., MARINHO-CARVALHO, M.M., SOLA-PENNA, M. (2007a) **Clotrimazole inhibits and modulates heterologous association of the key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase.** *Biochem. Pharmacol.* 73: 1520–1527.

ZANCAN, P., ALMEIDA, F.V., FABER-BARATA, J., DELLIAS, J.M., SOLA-PENNA, M., (2007b) **Fructose-2,6-bisphosphate counteracts guanidinium chloride-, thermal-, and ATP-induced dissociation of skeletal muscle key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase: A structural mechanism for PFK-1 allosteric regulation.** *Arch. Biochem. Biophys.* 467: 275-282.

ZANCAN, P., SOLA-PENNA, M. (2005a) **Calcium influx: a possible role for insulin modulation of intracellular distribution and activity of 6-phosphofructo-1-kinase in human erythrocytes.** Mol. Genet. Metab. 86: 392-400.

ZANCAN, P., SOLA-PENNA, M. (2005b) **Regulation of human erythrocyte metabolism by insulin: cellular distribution of 6-phosphofructo-1-kinase and its implication for red blood cell function.** Mol. Genet. Metab. 86: 401-411.

ZHAO CHEN, Z., ZHANG, H., LU, W., HUANG, P. (2009) **Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate.** Biochimica et Biophysica Acta 1787: 553–560.

ZU, X.L., GUPPY, M. (2004) **Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction.** Biochem. Biophys. 313(3): 459-465.

WARBURG, O. (1956) **On respiratory impairment in cancer cells.** Science 124(3215): 269-270.

WEBER, C.S. 1965. **Fructose diphosphate aldolase homologs in embryological developmente** [thesis]. Urbana: University of Illinois.

WEBER, G., SINGHAL, R.L., STAMM, N.B., LEA, M.A., FISHER, E.A. (1966) **Synchronous behaviour pattern of key glycolytic enzymes: glucokinase, phosphofructokinase and pyruvate kinase.** Adv. Enzyme Regul. 4: 59-81.

WILSON, J.E. (2003) **Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function.** J. Exp. Biol. 206: 2049–2057.

WONG, S.S. (1991) **Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking.** CRC Press. USA.

WU, C., KHAN, S.A., PENG, L.J., LANGE, A.J. (2006) **Roles for fructose-2,6-bisphosphate in the control of fuel metabolism: beyond its allosteric effects on glycolytic and gluconeogenic enzymes.** Adv. Enzyme Regul. 46: 72-88.