

Atividade de Xantina-oxidase na Carcinogênese Induzida pela 1.2-dimetil-hidrazina

OTTILIA R. AFFONSO¹, ARTHUR STEENHAGEN R. SOUZA, KAREN H. ASCH, EMÍLIO MITIDIÉRI

Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ

Resumo

A 1,2-dimetil-hidrazina (DMH) induz a formação de tumores no intestino de ratos após aplicações semanais durante 20 semanas. As atividades de xantina-oxidase (XO) e xantina-desidrogenase (XD) variam de acordo com a distância ao longo do intestino. Nos animais injetados com DMH verificou-se uma diminuição da atividade enzimática exatamente na porção onde ocorre maior incidência tumoral. Anotou-se, também, um aumento da atividade XD em soro sanguíneo de ratos tratados com DMH.

Unitermos: xantina-oxidase; dimetil-hidrazina; carcinogênese

Introdução

A aplicação repetida de dimetil-hidrazina (DMH) em ratos induz a uma alta incidência de tumores no intestino. Essa neoplasia ocorre mais frequentemente na região colo-retal e no ceco adjacente ao fêo¹. Em ratos, a DMH ocasionou um aumento nos níveis de superóxido-dismutase contendo cobre e zinco (Cu-Zn SD) mas não alterou a atividade de superóxido-dismutase contendo manganês (Mn-SD)².

O sistema xantina/xantina-oxidase é gerador de radicais livres derivados do oxigênio, altamente reativos, contra os quais a superóxido-dismutase funciona como agente protetor. Desde que sabemos ocorrerem alterações na atividade de superóxido-dismutase intestinal na carcinogênese pela DMH, foi de nosso interesse verificar os efeitos dessa droga na atividade de xantina-oxidase intestinal.

Material e métodos

Tumores foram induzidos em ratos R machos (150-200g) por injeção subcutânea semanal de DMH (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis) numa dose de 20mg/kg de peso, durante 20 semanas. A DMH para injeção foi preparada dissolvendo-se a droga em salina isotônica e ajustando o pH da solução em 6,5 com NaOH 1M.

Os animais foram mortos no máximo duas semanas após o final das injeções. Antes, o sangue foi coletado por punção cardíaca direta e o soro separado para posterior determinação da atividade de xantina-desidrogenase (XD). O intestino foi retirado imediatamente e lavado em salina gelada retirando-se,

então, toda a gordura e tecido conjuntivo. O intestino limpo foi dividido em porções, de 5cm ou de 10cm, que foram pesadas e homogeneizadas com água (1:5). O homogeneizado foi centrifugado a 8.500 x g por 15 min e o sobrenadante foi, em seguida, dialisado (4-8°C) contra água destilada por 22 horas. Após diálise, nova centrifugação foi realizada (8.500 x g por 10 min) e o sobrenadante usado para determinação da atividade enzimática.

A xantina-oxidase (XO) foi determinada espectrofotometricamente medindo-se a formação de ácido úrico em 292 nm. O sobrenadante foi usado como solução de enzima e o sistema para determinação de XO continha: 0,1 ml da solução de enzima, 3,0 ml de tampão pirofosfato 0,015 M de pH 8,6 e 0,1 ml de uma solução de hipoxantina (2×10^{-3} M). Esse sistema foi incubado a 37° C por 15 min e o ácido úrico produzido medido em 292 nm. A atividade XO foi expressa em nmoles de ácido úrico produzido por mg de proteína em 15 min, tomando-se para coeficiente de extinção molar em 292 nm, para o ácido úrico, o valor de $12,0 \times 10^{33}$.

A atividade desidrogenase (XD) foi determinada medindo-se a formazana produzida por redução de um sal de tetrazólio, usado como descrito em outras publicações^{4,5}. O meio de incubação que continha 0,5 ml de homogeneizado de intestino (ou de soro sanguíneo), 0,1 ml de uma solução de hipoxantina 0,05 M e 0,3 ml de solução a 0,1 % de cloreto de trifeniltetrazólio foi ajustado para um volume de 3,4 ml com tampão pirofosfato 0,015 M de pH 8,6. Rotineiramente a reação processou-se durante 30 min e foi interrompida pela adição de 5 ml de ácido acético glacial. A formazana produzida foi extraída com 5 ml de

éter de petróleo e medida em 480nm em um espectrofotômetro Perkin-Elmer, Coleman 55. A atividade específica da enzima foi expressa em microgramas de formazana por ml de soro por 30 min a 37° C ou em microgramas de formazana por mg de proteína por 30min a 37° C⁶.

A proteína foi determinada com o reagente Folin-Ciocalteu seguindo-se a técnica de **Lowry** et al.⁷. A diferença entre as médias dos diversos grupos foi analisada estatisticamente pelo teste *t* (Student).

Resultados

A atividade enzimática foi medida em função da posição ao longo do intestino. Este processo tornou-se obrigatório devido ao fato de os tumores atingirem muitos locais diferentes no intestino. Dessa forma pode-se fazer uma comparação adequada entre a atividade enzimática em determinado local de tecido com tumor e a atividade em local equivalente de tecido normal. Conseqüentemente o intestino foi dividido em porções com 5 e 10cm de

comprimento desde o duodeno até o ânus e as atividades XO e XD foram medidas em cada porção. A Figura 1 mostra que as atividades XO e XD variam de acordo com a distância ao longo do intestino, sendo menor conforme se aproxima do ânus.

Nos animais injetados com DMH verificou-se uma diminuição da atividade enzimática exatamente na porção onde há maior incidência tumoral. Como mostra a Tabela 1 essa diminuição da atividade enzimática é estatisticamente significativa na porção dois e não significativa na porção um, considerando que a porção um compreende um segmento de 10cm de intestino a partir do duodeno e a porção dois outro segmento de 10cm a seguir.

A determinação da atividade XD em soro sanguíneo de ratos mostrou, para oito ratos normais, um valor de $43,6 \pm 1,8 \mu\text{g}$ formazana/ml soro. Para ratos injetados durante 20 semanas com DMH esses valores foram determinados em oito animais encontrando-se $58,3 \pm 2,4 \mu\text{g}$ de formazana/ml de soro (Fig. 2) anotando-se, pois, um aumento da atividade XD em soro de ratos injetados com DMH.

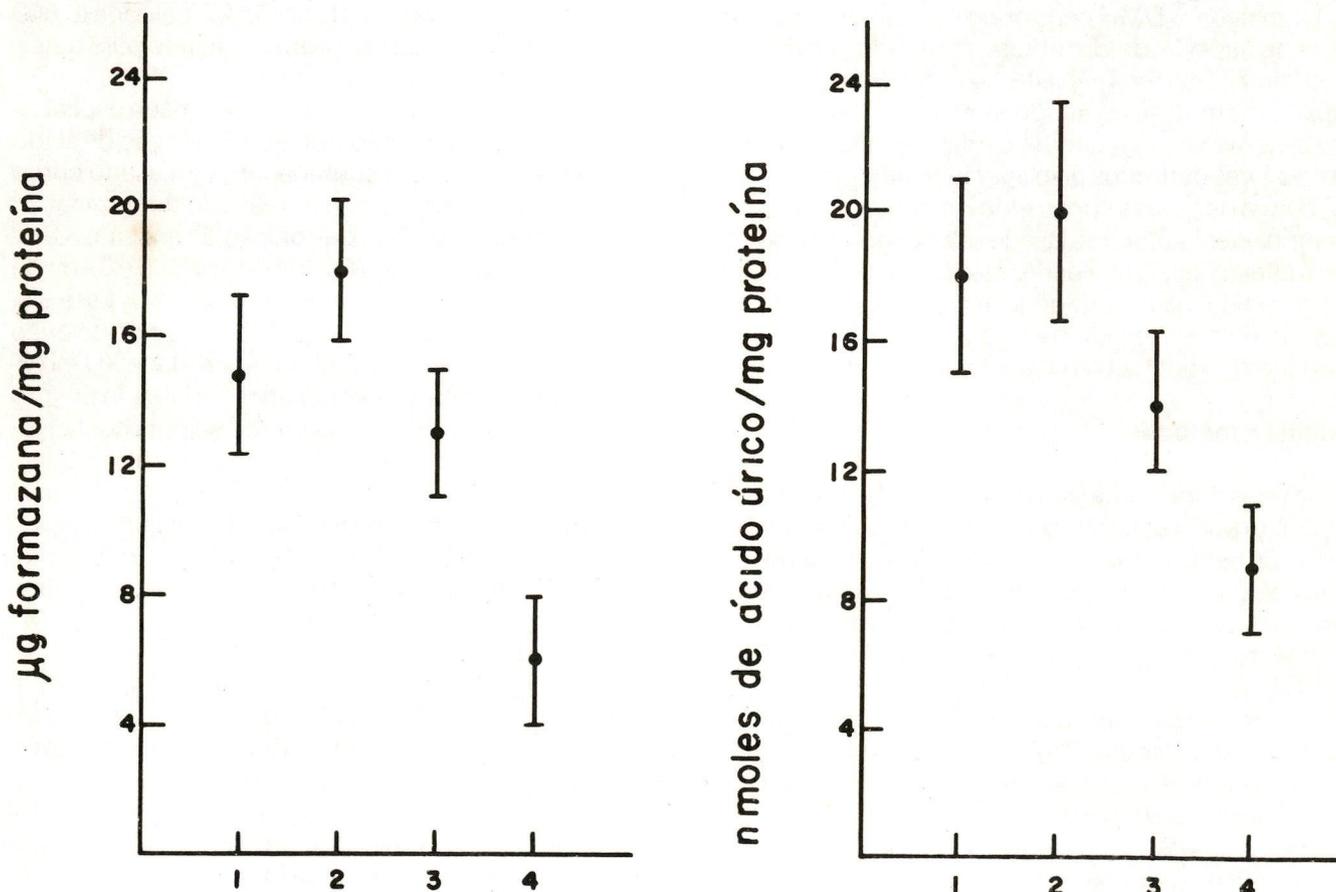


Fig. 1 — Atividade de xantina-desidrogenase e de xantina-oxidase em função da distância ao longo do intestino normal. O intestino foi dividido em porções de 5 cm desde o duodeno até o ânus. As atividades foram determinadas por métodos descritos no texto

Tabela 1 – Atividade XD e XO no intestino

Condição	Segmento (10cm)	Experiências	XD ^(a)	XO ^(b)
Normal	1	7	16,30 ± 1,63	18,8 ± 1,1
DMH	1	8	14,61 ± 1,48	18,9 ± 1,7
Normal	2	7	9,70 ± 1,11	13,8 ± 2,8
DMH	2	8	6,32 ± 0,79	8,1 ± 1,0

P < 0,01

P < 0,01

(a) µg formazana/mg proteína

(b) nmoles de ácido úrico/mg proteína

Summary

Colon tumors were induced in adult male rats by weekly s.c. injections of 1,2-dimethylhydrazine (DMH) at a dose of 20 mg/kg body weight for 20 weeks. The XO and XD activities were measured as a function of position along the length of the intestine. Animals injected with DMH showed enzyme activity reduced when compared to normal controls. An increase in XD activity was shown in blood serum of animals treated with DMH.

Referências Bibliográficas

- Toth B, Malick L, Shimizu H — Production of intestinal and other tumors by 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride in mice. *Am J Pathol*, 1976; 84:69-80.
- Loven DP, Oberley LW, Rousseau FM, Stevens RH — Superoxide dismutase activity in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 1980; 65:377-381.
- Affonso OR, Ayres de Moura CV, Cavallari V, Mitidieri E — Serum and liver xanthine oxidase activity in tumor bearing rats and mice. *An Acad Brasil Ciênc*, 1981; 53:617-620.
- Mitidieri E, Ayres de Moura CV, Cavallari V, Affonso OR — Xanthine dehydrogenase inhibitor as a diagnostic tool in human cancer. *IRCS Medical Sci*, 1981; 9:933.
- Affonso OR, Cavallari V, Ayres de Moura CV, Mitidieri E — Detection of a cancer cell catabolite inhibitor of xanthine dehydrogenase activity. *Arch Geschwulstforsch*, 1982; 52:635-639.
- Affonso OR, Souza ASR, Mitidieri E — Effect of copper on blood serum xanthine dehydrogenase in rats given D-Lethionine. *Arch Geschwulstforsch*, 1985; 55:167-170.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ — Protein measurements with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951; 193:265-275.

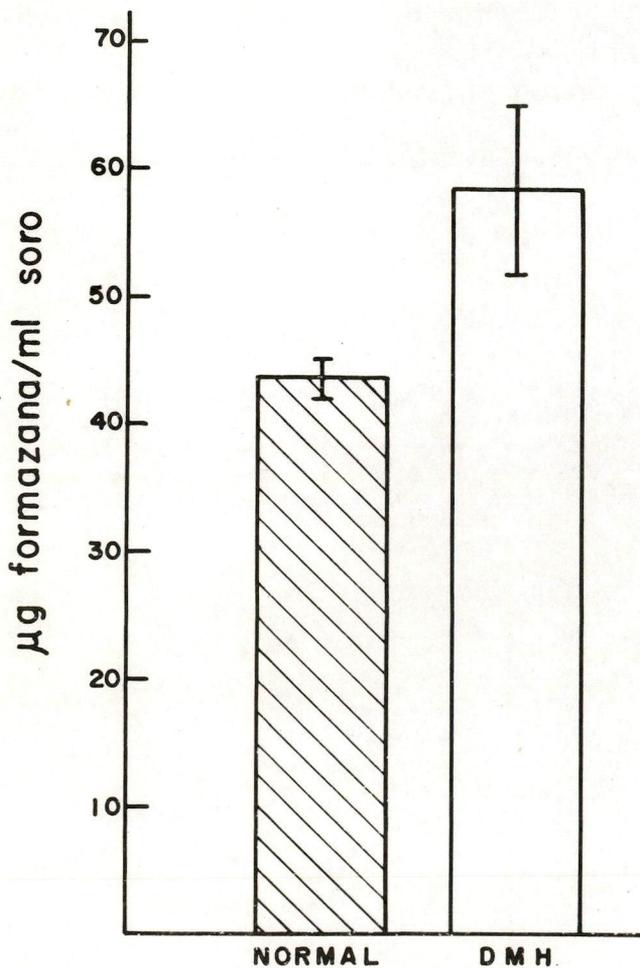


Fig. 2 — Atividade de xantina-desidrogenase em soro sanguíneo de ratos DMH-tratados e ratos normais. A atividade enzimática foi determinada empregando-se hipoxantina como substrato e cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) como receptor de elétrons