

A CERULOPLASMINA COMO ENZIMA MARCADORA DE ATIVIDADE NEOPLÁSICA MALIGNA

L. A. ABREU §
R. R. ABREU §§

Centro de Pesquisa Básica, Instituto Nacional de Câncer,
Rio de Janeiro, RJ

RESUMO

Os autores estudaram os níveis de atividade oxidásica da ceruloplasmina sérica em ratos machos da linhagem isogênica U inoculados com um sarcoma singênico. Hiperceruloplasminemia estatisticamente significativa foi observada em todos as fases de crescimento tumoral. Valores normais de ceruloplasmina foram obtidos unicamente após a 1ª dose de ciclofosfamida (100 mg/kg, por via intraperitoneal). A subsequente administração semanal da droga não bloqueou o reaparecimento da hiperceruloplasminemia nos animais portadores de sarcoma. Ratos normais tratados pela ciclofosfamida, de acordo com o mesmo esquema, apresentaram queda na atividade enzimática após a 1ª dose. Os autores concluem que a hiperceruloplasminemia sugere a presença latente de células neoplásicas viáveis e pode servir como um teste bioquímico para monitorizar o processo maligno.

INTRODUÇÃO

Níveis elevados de ceruloplasmina foram encontrados em

soros de pacientes com diferentes tipos de neoplasias malignas.^{6,9,11} Em ratos albinos Wistar portadores de um

fibrossarcoma transplantável, Abreu¹ observou aumento considerável na concentração de ceruloplasmina sérica. Esses dados foram confirmados por Thomas e Constantinescu¹² e Thomas, Olinescu e Constantinescu¹³ trabalhando com ratos inoculados com carcinoma de Jensen e tumor O-Ya, respectivamente. Estudos recentes com o carcinoma VX₂ implantado em coelhos^{14,15} sugeriram que a hiperceruloplasminemia poderia servir como marcadora de atividade neoplásica. O presente trabalho foi executado visando obter dados sobre a atividade oxidásica da ceruloplasmina no soro de ratos durante o crescimento de um sarcoma singênico. Foram igualmente estudados os efeitos da administração de ciclofosfamida (CY) sobre a ceruloplasminemia em ratos normais e em portadores de sarcoma.

§ Médico e §§ Química, Pesquisadores em Ciências da Saúde, Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde. Bolsistas Pesquisadores do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

MATERIAL E MÉTODOS

Ratos machos da linhagem isogênica U, pertencentes à colônia do Instituto Nacional de Câncer, foram usados em todas as experiências. Esses animais foram mantidos com ração balanceada e água "ad libitum" e pesavam 180 a 200 g. O sarcoma II, tumor singênico para o rato U, originalmente induzido pela inoculação de 20-metilcolantreno, é mantido por passagens em séries nos ratos machos U pela implantação subcutânea dorsal de 2 a 3 mm³ de tecido tumoral por meio de trocáter. Os sarcomas utilizados no presente trabalho encontravam-se na 82ª, 83ª e 84ª passagens. O tempo de sobrevivência médio dos ratos portadores de sarcoma II foi de 23,2 ± 7,3 dias (média ± desvio padrão para 15 animais).

Ratos U normais foram usados como controles.

Os ratos portadores de tumor foram sangrados aos 7, 14, 21 e 26 dias após a inoculação com sarcoma II. Um grupo de ratos implantados com sarcoma II foi tratado semanalmente pela administração intraperitoneal de CY (100 mg/kg), e um outro grupo de animais normais recebeu igual terapêutica. Em todos os ratos tratados com CY o sangue foi obtido sempre 24 horas após a injeção da droga.

O sangue de todos os animais foi colhido por punção intracardíaca sob anestesia pelo éter etílico. Os soros foram separados e estocados a -18°C.

Com a finalidade de padronizar a dosagem da ceruloplasmina fizeram-se curvas padrões para determinação do cobre sérico pelo método de Gubler e colaboradores⁵ baseado na reação com dietilditiocarbonato de sódio. As curvas foram feitas nas concentrações de 0 a 8 µg de cobre nos espectrofotômetros

Zeiss mod. PMQ-II e Gilford mod. 240 ambas em 440 nm. Em seguida foram efetuadas diversas determinações de cobre sérico total e livre em um "pooling" de soros de ratos U normais pelo método de Gubler e colaboradores.⁵ Como foi por nós estudado anteriormente¹ 99% do cobre sérico no rato não é livre e encontra-se combinado fazendo parte da molécula de ceruloplasmina.

Encontramos no "pooling" de soros 180 µg de cobre ceruloplasmínico por 100 ml. Tendo em vista que a molécula de ceruloplasmina (peso molecular = 151000 daltons) contém 0,34% de cobre a concentração da enzima no "pooling" de soros de ratos foi 52,9 mg por 100 ml. A concentração normal de ceruloplasmina sérica no rato é superior à encontrada no homem: 32,3 ± 4,9 mg/100 ml pelo método de Ravin.¹⁰ Esse fato foi por nós demonstrado.^{1,2}

A mistura de soros de ratos acima estudada foi utilizada para construir curvas-padrão de atividade da ceruloplasmina de acordo com o método enzimático espectrofotométrico de Ravin,¹⁰ baseado na atividade oxidásica em pH 5,4 usando como substrato o dicloridrato de p-fenilenodiamina. As curvas foram obtidas nos espectrofotômetros Zeiss mod. PMQ II e Gilford mod. 240, com cubas de 10 mm de caminho ótico em 530 nm. Fizeram-se 5 pontos com os seguintes volumes de soro padrão: 0,01, 0,02, 0,03, 0,04 e 0,05 ml e calcularam-se as constantes das curvas. Encontramos, como anteriormente, exata proporcionalidade entre as concentrações de ceruloplasmina e a atividade oxidásica. Em função do tempo a oxidação enzimática do substrato segue a cinética de ordem zero (linear). Passamos a fazer, rotineiramente,

determinações de ceruloplasmina com alíquotas de 0,02 ml de soro de rato.

Os níveis de atividade oxidásica da ceruloplasmina foram assim determinados pelo método de Ravin¹⁰ nos soros de todos os ratos sendo os resultados expressos em mg/100 ml de soro. A média e o respectivo desvio padrão da média de cada grupo de animais foram calculados e a significância estatística das diferenças entre os vários grupos de ratos foi avaliada pelo teste t de Student. Valores de P iguais ou menores do que 0,05 foram considerados como significantes no citado teste.

RESULTADOS

O efeito do crescimento do sarcoma II sobre a atividade oxidásica da ceruloplasmina no soro dos ratos portadores é mostrado na Tabela 1. Observa-se hiperceruloplasmínia estatisticamente significativa em todas as fases de evolução tumoral estudadas, desde o 7º até o 26º dia (fase terminal). Não foram encontradas diferenças significativas entre os vários grupos de portadores.

A influência da administração de CY na ceruloplasmínia de ratos normais é apresentada na Tabela 2. Uma depressão estatisticamente significativa nos níveis da enzima foi observada somente após a 1ª dose de CY, sendo que a atividade da oxidase volta a taxas não significativamente diferentes dos controles 24 horas após a 2ª dose da droga (Tabela 2).

Na Tabela 3 podemos observar o efeito da terapia com CY sobre a ceruloplasmina sérica em ratos inoculados com sarcoma II. Foi evidente a influência da droga na 1ª semana de tratamento. Os níveis da oxidase foram mantidos dentro da normalidade tendo em vista que a diferença em relação ao grupo de ra-

tos normais sem tumor não foi estatisticamente significativa (Tabela 3), embora a média dos animais tratados com CY seja mais baixa. Por outro lado, com 14 e 21 dias de evolução tumoral observa-

mos hiperceruloplasminemia altamente significativa. Esse fato é bastante interessante tendo-se em mente que os animais continuaram a terapêutica com altas doses de CY.

COMENTÁRIOS

A ceruloplasminemia nos ratos da linhagem U é mais alta que as concentrações da enzima observadas em homens normais.¹⁰ Esses achados estão de acordo com os resultados de Abreu^{1,2} e de Thomas, Olinescu e Constantinescu¹³ usando diferentes linhagens de ratos. Os dados apresentados no presente e em outros trabalhos^{1,2,12,13} permitem concluir que os neoplasmas malignos induzem hiperceruloplasminemia no rato. Recentemente Ungar-Warion e colaboradores¹⁴ e Voelkel e colaboradores¹⁵ observaram elevadas taxas de ceruloplasmina no plasma de coelhos portadores de carcinoma VX₂. É interessante aqui lembrar que Abreu e Abreu³ observaram queda significativa nos níveis de ceruloplasmina sérica em estágios avançados de desenvolvimento do carcinoma ascítico de Ehrlich em camundongos Swiss. Tendo sido descritas altas concentrações de ceruloplasmina no soro de pacientes cancerosos^{6,9,11} os nossos dados sugerem que o rato parece ser um modelo experimental melhor do que o camundongo para estudos sobre ceruloplasminemia em neoplasias.

A CY possui um potente efeito imunossupressivo^{7,8,16} além de ser uma droga de escolha na quimioterapia oncológica⁴. Em ratos normais a CY acarreta hipoceruloplasminemia após a 1ª dose. Com o esquema de doses usado no presente trabalho a droga mantém a ceruloplasmina em níveis normais somente após a 1ª administração em ratos portadores de sarcoma II. Subseqüentemente, mesmo em tratamento com CY verifica-se a recorrência da hiperceruloplasminemia embora o crescimento tumoral não tenha sido detectado pela palpação. Aparentemente os

Tabela 2
Níveis de ceruloplasmina no soro de ratos U normais tratados com ciclofosfamida (CY)^a.

| Tratamento | Nº de ratos | Ceruloplasmina ^b Média ± DPM ^c | p ^d |
|-----------------------|-------------|---|----------------|
| CY (1ª dose) | 5 | 40.8 ± 4.8 | < 0.05 |
| CY (2ª dose) | 6 | 81.3 ± 7.6 | < 0.2 |
| Controles (sem CY) | 10 | 64.2 ± 9.4 | --- |

- a 100 mg/kg por via intraperitoneal com um intervalo de 7 dias entre a 1ª e a 2ª dose.
b mg/100 ml de soro.
c DPM = desvio padrão da média.
d Significância estatística em relação aos controles.

Tabela 1
Atividade da ceruloplasmina sérica em ratos U portadores de sarcoma II.

| Dias após inoculação | Nº de ratos | Ceruloplasmina ^a Média ± DPM ^b | p ^c |
|-------------------------------|-------------|---|----------------|
| 7 | 5 | 89.1 ± 5.3 | < 0.05 |
| 14 | 5 | 95.4 ± 8.0 | < 0.05 |
| 21 | 5 | 93.1 ± 5.1 | < 0.02 |
| 26 | 5 | 98.2 ± 2.5 | < 0.01 |
| Controles (não inoculados) | 10 | 64.2 ± 9.4 | --- |

- a mg/100 ml de soro.
b DPM = desvio padrão da média.
c Significância estatística em relação aos controles.

Tabela 3
Ceruloplasmina sérica em ratos U portadores de sarcoma II tratados com ciclofosfamida^a.

| Dias após inoculação do sarcoma II | Nº de ratos | Ceruloplasmina ^b Média ± DPM ^c | p ^d |
|------------------------------------|-------------|---|----------------|
| 7 | 5 | 50.8 ± 2.7 | < 0.2 |
| 14 | 5 | 100.3 ± 6.3 | < 0.01 |
| 21 | 3 | 93.8 ± 1.3 | < 0.01 |
| Controles (não inoculados) | 10 | 64.2 ± 9.4 | --- |

- a 100 mg/kg por via intraperitoneal nos dias 6, 13 e 20 após o transplante do sarcoma II.
b mg/100 ml de soro.
c DPM = desvio padrão da média.
d Significância estatística em relação aos controles.

animais parecem livres de tumores com 21 dias de terapia mas a ceruloplasmina permanece em altos níveis. O tratamento com a CY foi interrompido depois da 3ª dose e o sarcoma recidivou matando os ratos hospedeiros num período de 100 a 120 dias após o transplante. Por conseguinte a hiperceruloplasminemia sugere a presença de células latentes de sarcoma e pode servir como um teste bioquímico para monitorizar o processo neoplásico.

A depressão observada na ceruloplasminemia em ratos normais bem como nos animais inoculados com sarcoma II após a 1ª dose de CY é um dado intrigante. Parece-nos prematuro tentar explicar com base na presente investigação o mecanismo do efeito da CY sobre a ceruloplasmina, tendo em vista que os mediadores que controlam a síntese da enzima ainda não são suficientemente conhecidos. Recentemente, Voelkel e colaboradores¹⁵ observaram aumentos paralelos de ceruloplasmina, prostaglandina E₂ (PGE₂) e seu metabólito 13,14-dihidro-15-ceto-PGE₂ (PGE₂-M) no plasma de coelhos inoculados com carcinoma VX₂. O aumento da ceruloplasmina é precoce bem como o de PGE₂-M (que chega a 20 vezes a taxa plasmática normal), sendo que o tumor secreta elevadas concentrações da prostaglandina.

SUMMARY

Hyperceruloplasminemia was detected in U strain isogenic male rats bearing a syngeneic sarcoma in all phases of neoplasm evolution. Normal levels of ceruloplasmin oxidase activity were only observed after the first dose of intraperitoneally administered cyclophosphamide (100 mg/kg). However subsequent weekly therapy with the drug did not prevent the return of high levels of serum ceruloplasmin in the tumor hosts. Healthy rats treated similarly with cyclophosphamide presented a fall in the enzyme activity after the first dose. The constant hyperceruloplasminemia observed suggests the presence of viable latent sarcoma cells and can serve as a biochemical test to monitorize the malignant process.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABREU, L. A., *Contribuição ao estudo da ceruloplasmina*. Tese, 1961.
2. ABREU, L. A., *Determination of serum ceruloplasmin oxidative activity*. Rev. Brasil. Biol. 21:97:103, 1961.
3. ABREU, L. A. & ABREU, R. R., *Serum ceruloplasmin in mice with Ehrlich ascites carcinoma*. Experimentia 27:85, 1971.
4. CALABRESI, P. & PARKS JR., E. R., *Alkylating agents, antimetabolites, hormones, and other antiproliferative agents* in GOODMAN, L. S. & GILMAM, A., *The pharmacological basis of therapeutics*, 5th edition, New York, Macmillan, Chapter 62, 1254-1307, 1971.
5. GUBLER, C. J., LAHEY, M. E., ASCHENBRUCKER, H., CARTWRIGHT, G. E. & WINTROBE, M. M., *Studies on copper metabolism. I. A method for the determination of copper in whole blood, cells, and plasma*. J. Biol. Chem. 196:209-220, 1952.
6. HUGHES, N. R., *Serum transferrin and ceruloplasmin concentrations in patients with carcinoma,*

melanoma, sarcoma and cancers of haematopoietic tissues. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 50:97-107, 1972.

7. MARUSIC, M., ALLEGRETTI, N. & CULO, F., *The timing of cyclophosphamide therapy in tumor-bearing rats affects the resistance to tumor challenge in survivors*. Experimentia 34:1355-1356, 1978.
8. PATERSON, P. Y., DROBISCH, D. C. & BIDDICK, A. S., *Cyclophosphamide inhibition of experimental allergic thyroiditis and thyroid antibody production*. J. Immunol. 106:570-572, 1971.
9. PINEDA, E. P., RAVIN, H. A. & RUTENBURG, A. M., *Serum ceruloplasmin: observations in patients with cancer, obstructive jaundice, and other diseases*. Gastroenterology 43:266-270, 1962.
10. RAVIN, H. A., *An improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin*. J. Lab. Clin. Med. 58:161-168, 1961.
11. SULLIVAN, J. F. & HART, K. T., *Serum benzidine oxidase*. J. Lab. Clin. Med. 55:260-267, 1960.
12. THOMAS, E. & CONSTANTINESCU, R., *Coeruloplasmin modifications by HNa₂PO₄ administration to rats bearing Jensen carcinoma*. Clin. Chim. Acta 13:708-710, 1966.
13. THOMAS, E., OLINESCU, R. & CONSTANTINESCU, R., *Coeruloplasmin modifications by HNa₂PO₄ administration to O-Ya ascitogen tumor-bearing rats*. Clin. Chim. Acta. 13:711-712, 1966.
14. UNGAR-WARON, H., GLUCKMAN, A., SPIRA, E., WARON, M. & TRAININ, Z., *Ceruloplasmin as a marker of neoplastic activity in rabbits bearing the VX-2 carcinoma*. Cancer Res. 38:1296-1299, 1978.
15. VOELKEL, E. F., LEVINE, L., ALPER, C. A. & TASHJAN JR., A. H., *Acute phase reactants ceruloplasmin and haptoglobin and their relationship to plasma prostaglandins in rabbits bearing the VX₂ carcinoma*. J. Exp. Med. 147:1078-1088, 1978.
16. WORTHINGTON, M., RABSON, A. S. & BARON, S., *Mechanism of recovery from systemic vaccinia virus infection. 1. The effects of cyclophosphamide*. J. Exp. Med. 136:277-290, 1972.