

## ACÇÃO DE SAIS DE COBRE SOBRE A XANTINA DESIDROGENASE NA CARCINOGENESE HEPÁTICA DE RATAS \*

OTTILIA R. AFFONSO<sup>1</sup>    ARTHUR S.R. SOUZA<sup>1</sup>    JOLIE K. KWEE<sup>1</sup>  
KAREN H. ASCH<sup>1</sup>    EMILIO MITIDIERI<sup>1</sup>

### RESUMO

Os autores estudaram a inibição da atividade de xantina desidrogenase (XD) do soro de ratas pelo acetado de cobre (AcCu). Verificaram também a relação entre a atividade XD e a degeneração hepática e carcinogênese pela D-L-etionina.

Experiências mostraram que a AcCu é um potente inibidor da XD e que esta inibição é não-competitiva quando se mantém constante a concentração do receptor de eletrons, e do tipo competitivo quando esta concentração varia permanecendo constante a concentração de substrato. Comparando-se estes estudos com os resultados da dosagem da atividade de xantina oxidase (oxigênio como receptor de eletrons) os autores sugerem que radicais estariam envolvidos na ação citotóxica do complexo AcCu-etionina com provável necessidade de ocorrência de uma reação de redução.

UNITERMOS sais de cobre, xantina desidrogenase, carcinogênese

### INTRODUÇÃO

O emprego de inibidores químicos que agem em níveis diferentes do metabolismo de substâncias carcinogênicas ou em diferentes degenerações hepáticas produzidas por tais substâncias pode fornecer novos subsídios ao estudo do mecanismo da carcinogênese.

DYER<sup>9</sup> foi quem primeiro estudou a etionina como um antimetabolito da metionina. Após estes estudos, outros pesquisadores mostraram que a etionina apresentava, também, efeitos patológicos e bioquímicos sobre o fígado e outros órgãos de ratos, culminando tais estudos com a descoberta da indução de

carcinoma no fígado de ratas pela etionina<sup>10, 21</sup>. Revisões sobre o assunto podem ser vistas nas referências<sup>11, 12 e 22</sup>.

A semelhança da etionina com a metionina na estrutura química e no metabolismo celular fornece à etionina vantagens sobre os outros agentes carcinogênicos no estudo da carcinogênese. Nesse sentido as conclusões a que chegaram os pesquisadores são: a) o grupo etil da etionina não substituiria o grupo metil da metionina e b) a etionina pode ser ativada a um composto rico em energia, S-adenosil, que pode servir como etil doador<sup>8</sup>. Dessas conclusões, hipóteses foram formuladas

para explicar a formação de hepatomas que estaria ligada à alquilação de macromoléculas.

O uso de alguns inibidores da ação da metionina pôde trazer novos esclarecimentos sobre possíveis mecanismos que ocorreriam na carcinogênese pela etionina. O acetado de cobre (AcCu), por exemplo, aplicado junto com determinadas substâncias carcinogênicas manifesta-se como um autêntico inibidor na formação de carcinomas do fígado<sup>13, 14</sup>. KAMAMOTO *et al.*<sup>15</sup> descreveram o efeito protetor do AcCu na indução de hepatomas pela etionina, pela formação de um complexo entre a etionina e o sal de

<sup>1</sup> Centro de Pesquisa Básica  
Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, R.J.

\* Trabalho realizado com auxílio do CNPq.

Trabalho realizado no Instituto Nacional  
de Câncer, Rio de Janeiro.

Endereço para correspondência: Praça  
Cruz Vermelha, 23 - 20230 - Rio de  
Janeiro, R.J.

cobre, o que foi confirmado, posteriormente, por BRADA *et al.* 7. Por outro lado os estudos referentes a variações da atividade de xantina desidrogenase (XD) de soro de ratos em degenerações hepáticas 1, 2, 3 mostraram que a atividade XD do soro sangüíneo aumenta significativamente após a administração dessas drogas. Isto ocorreria, provavelmente, devido ao escape dessa enzima do citosol do fígado 23 para a corrente sangüínea. Como a etionina produz também um aumento da atividade XD de soro de rato 20, consideramos de interesse um estudo sobre a relação entre a atividade da XD de soro de ratas tratadas pela etionina e/ou pelo AcCu, como fundamento para a avaliação da carcinogênese pela etionina em ratas.

#### MATERIAIS E MÉTODOS

Ratas R, pesando cerca de 100-50 g foram empregadas nestes estudos. As ratas foram alimentadas *ad libitum* com dieta própria e mantidas em gaiolas separadas, em sala com ar condicionado (24°C) e 50-60% de umidade. A solução de AcCu foi adicionada por via intragástrica considerando-se sempre o volume final da solução de AcCu ajustado com água, e constante, tomando-se como base o peso do animal (12,5 mg de AcCu/100 g de peso). A solução de etionina foi administrada por via intraperitoneal na mesma proporção do AcCu. Após 24 horas da administração de AcCu ou de etionina o sangue foi coletado por punção cardíaca com os animais anestesiados por éter. Uma vez coagulado o sangue, o soro foi separado por centrifugação e imediatamente usado para a determinação da atividade XD. Usando 0,5 ml de soro, 0,1 ml de solução de hipoxantina 50 mM, 0,3 ml de solução de cloreto de trifênil tetrazol (TTC) (0,1%

peso/volume) como receptor de elétrons e 2,5 ml de solução tampão de pirofosfato de sódio 15 mM e pH 8,6, a reação se processou em tubos de Thunberg, anaerobicamente, durante 30 min a 37°C. A formazana vermelha produzida pela redução do TTC empregado foi extraída com 5 ml de éter de petróleo e a densidade óptica medida em

480 nm em um espectrofotômetro Perkin-Elmer 5, 19.

A determinação da atividade de xantina oxidase (XO) usando oxigênio como receptor de elétrons foi levada a efeito pela medida espectrofotométrica, em 292 nm, do ácido úrico formado em um sistema contendo 0,1 ml de soro ou de solução de enzima purificada, 3,0 ml de tampão

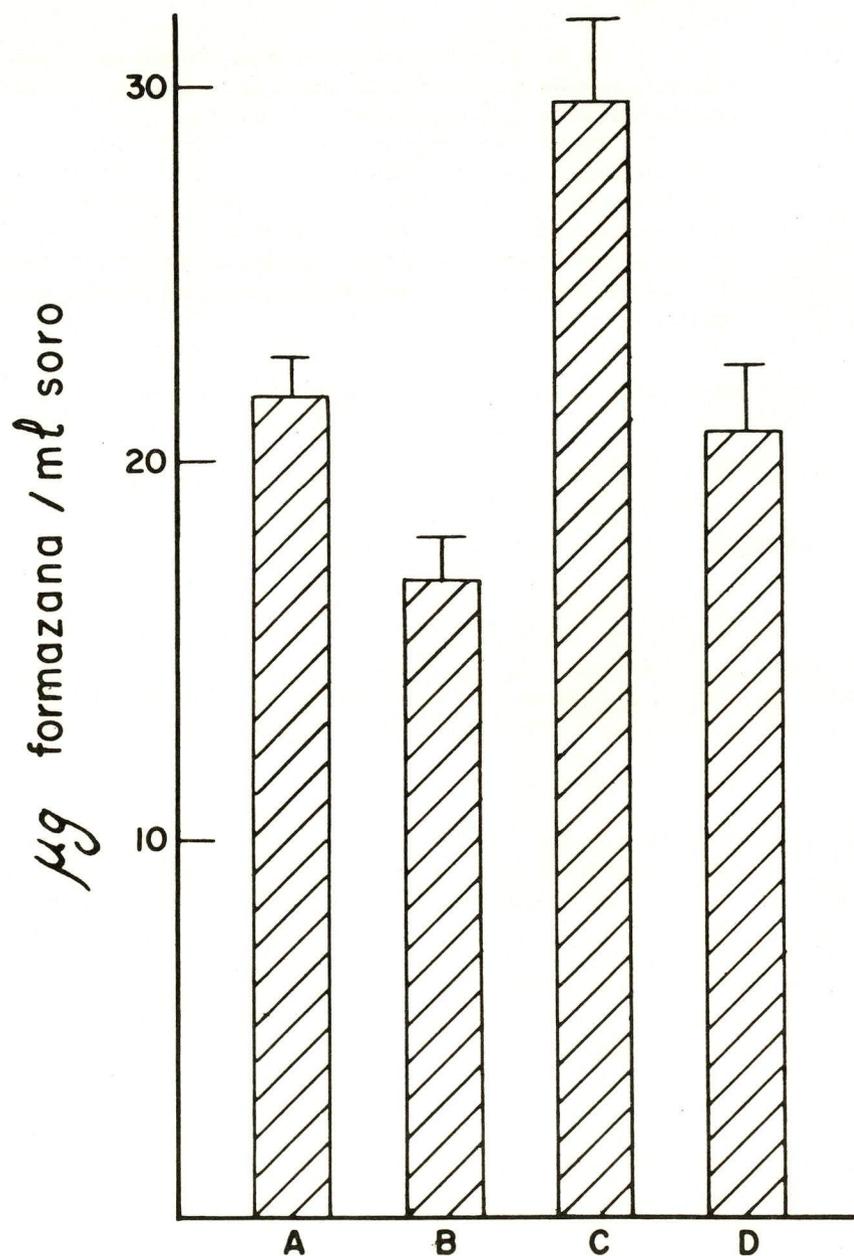


FIGURA 1: Efeito do acetato de cobre e D-L-etionina sobre a atividade de soro de ratas. (A) normais (8 ratas); (B) com acetato de cobre (7 ratas); (C) com etionina (8 ratas); (D) com etionina + AcCu (10 ratas). O desvio padrão de cada grupo está indicado no topo das barras verticais.

pirofosfato de sódio 15 mM pH 8,6 e 0,1 ml de solução de hipoxantina  $2 \times 10^{-3}$  M. Este sistema foi incubado por 30 min. a  $37^{\circ}\text{C}$  4.

A determinação da proteína foi conduzida por método descrito por LOWRY *et al.* 16.

A purificação da enzima foi realizada a partir de fígados de ratos usando o citosol (fração solúvel), por método previamente descrito 18, 6. Todas as operações de purificação foram realizadas entre 0 e  $40^{\circ}\text{C}$ . A purificação constou de uma primeira precipitação por sulfato de amônio 30 a 32% saturado, para em seguida precipitar a enzima em uma concentração final de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  54% saturado. Após diálise por 22 horas contra água destilada a solução de enzima foi tratada com n-butanol (1: 1), centrifugada a  $1000 \times g$  por 15 minutos e o sobrenadante coletado em pequenos frascos que foram estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de serem usados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão representados na Fig. 1 e mostram que o tratamento com etionina causou um aumento significativo da atividade XD ( $P < 0,001$ ) quando comparado com o grupo controle. A diminuição da atividade XD em ratos tratadas com AcCu foi também estatisticamente significativa ( $P < 0,001$ ), quando comparada com a atividade de animais normais. A administração de etionina mais AcCu não teve, no entanto, efeito significativo sobre a atividade XD quando comparados os resultados com os de ratos normais.

Pelos dados da Fig. 1 pode-se concluir que AcCu é um potente inibidor "in vivo" da atividade XD de soro. Usando a enzima purificada estudou-se a cinética dessa inibição em diferentes condições experimentais de concentração de substrato e/ou de receptor

de eletrons. Os resultados mostraram que a inibição "in vitro" pelo AcCu, em função da concentração de substrato é do tipo não competitiva com  $K_i = 3,42 \times 10^{-6}$  M.

Outras experiências mostraram que permanecendo constante a concentração de subs-

trato (1,47 mM) e variando a concentração do receptor de eletrons, no caso o TTC, a inibição "in vitro" pelo AcCu foi do tipo competitiva.

Estudos com o oxigênio como receptor de eletrons, dosando-se a formação de ácido úrico aerobicamente, in-

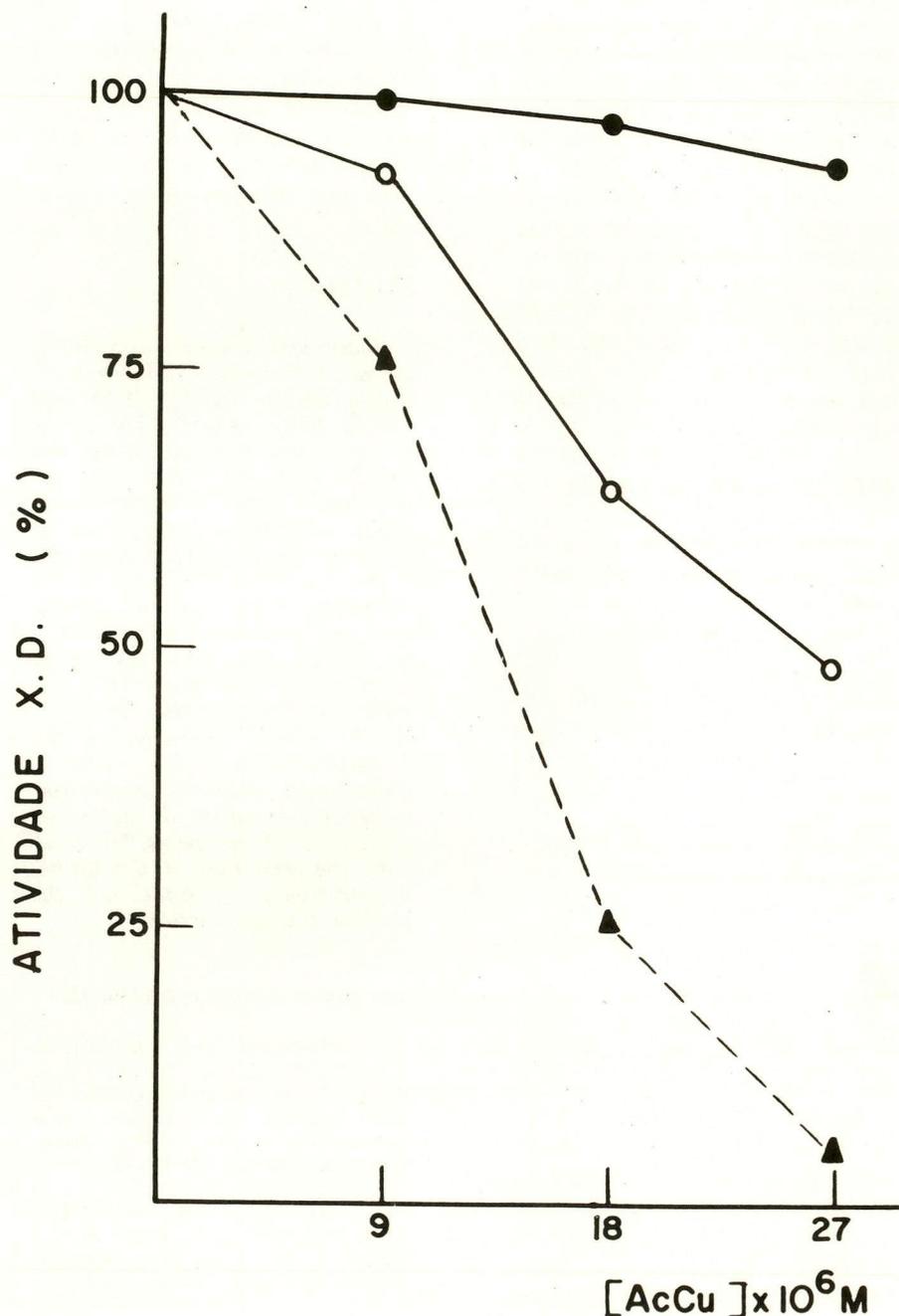


FIGURA 2: Inibição "in vitro" da atividade XD pelo AcCu (----). As linhas cheias representam a adição de etionina: (○)  $6,2 \times 10^{-8}$  M e (●)  $1,2 \times 10^{-7}$  M, na mistura reagente.

dicaram uma não inibição da atividade de xantina oxidase (XO), "in vitro", pelo AcCu. Tal resultado, em que se empregou um receptor de elétrons com potencial de oxidação mais elevado do que o TTC, mostrou que os íons  $\text{Cu}^{++}$  agem "in vitro" como um receptor de elétrons em substituição ao TTC. Esse fenômeno, com diferentes tipos de inibição variando-se o receptor de elétrons, foi também verificado usando-se aloxana que age como receptor em substituição ao TTC<sup>17</sup>.

A adição "in vitro" de etionina e AcCu mostrou também resultados interessantes. A adição de AcCu em concentrações de  $9 \times 10^{-6}\text{M}$  a  $27 \times 10^{-6}\text{M}$  inibe de 25 a 100% a atividade XD do soro. Por outro lado, a adição de etionina nas concentrações de  $6,2 \times 10^{-8}\text{M}$  a  $1,25 \times 10^{-7}\text{M}$  em uma solução contendo XD inibida pelo AcCu induziu um aumento nos níveis de atividade da enzima do soro (Fig. 2).

Considerando os resultados apresentados podemos concluir que o aumento da atividade XD do soro ocorre devido a degeneração hepática produzida pela etionina com o conseqüente escape dessa enzima solúvel, das células hepáticas para a corrente sanguínea, desde que o efeito biológico da etionina, nesse sistema, foi semelhante à de outras drogas anteriormente por nós testadas sobre a atividade XD de soro sanguíneo de ratos<sup>1, 2</sup>.

Como o cobre inibe a indução da degeneração hepática pela etionina, parece que o efeito protetor do AcCu sobre o aumento da XD do soro pela etionina seria devido a uma reação química entre o sal de cobre e a etionina, com a formação de um complexo com comportamento diferente do da etionina livre. Realmente, a produção desse complexo insolúvel em pH maior do que 4 e solúvel em pH menor do

que 4 foi, também, por nós verificado.

Deduzimos das experiências realizadas que o complexo AcCu-etionina poderia ligar-se ao oxigênio, causando no complexo uma transferência de elétrons da etionina (anion) para o cobre (cation) gerando oxigênio parcialmente reduzido ( $\text{OH}^{\ominus}$ ) e exibindo citotoxicidade. Como parece que radicais livres estão envolvidos na ação citotóxica de diferentes complexos com o cobre, é provável a necessidade da ocorrência de uma reação de redução para que haja a citotoxicidade.

## SUMMARY

*Blood serum xanthine dehydrogenase activity was inhibited by cupric acetate (CuAc) (12,5 mg/100 g body weight). The study of the inhibition by CuAc was related with the hepatic changes produced by D-L-ethionine (12,5 mg/100 g body weight). "In vitro" experiments showed that CuAc is a potent inhibitor of the xanthine dehydrogenase activity and that this inhibition is of a non-competitive type. Ethionine protects against the inhibitory effect of CuAc, both "in vivo" as "in vitro", probably by the formation of a copper complex. Experiments with  $\text{O}_2$  as electron acceptor seemed to indicate that the cupric salt competes "in vitro" with the reduction of the triphenyltetrazolium chloride in the electron transfer reaction.*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFONSO, O.R., MITIDIÉRI, E., RIBEIRO, L.P. & VILLELA, G.G.: *Blood Serum Xanthine Oxidase of Rats Poisoned with Carbon Tetrachloride*. PROC. SOC. EXPTL. BIOL. AND MED., **90**: 527-529 (1955).
- AFFONSO, O.R., MITIDIÉRI, E. & VILLELA, G.G.: *Effect of Colchicine on Rat Blood Serum Xanthine Oxidase*. NATURE, **193**: 64 (1962).
- AFFONSO, O.R., MITIDIÉRI, E. & RIBEIRO, L.P.: *Comparative Effects of Carbon Tetrachloride and Colchicine on Xanthine Dehydrogenase*. EXPERIENTIA, **23**: 291-292 (1967).
- AFFONSO, O.R., AYRES DE MOURA, C.V., CAVALLARI, V. & MITIDIÉRI, E.: *Serum and Liver Xanthine Oxidase in Tumor Bearing Rats and Mice*. AN. ACAD. BRASIL. CI., **53**: 617-620 (1981).
- AFFONSO, O.R., CAVALLARI, V., AYRES DE MOURA, C.V. & MITIDIÉRI, E.: *Detection of a Cancer Cell Catabolite Inhibitor of the Xanthine Dehydrogenase Activity*. ARCHIV. GESCHWULSTFORSCH, **52**: 635-639 (1982).
- AFFONSO, O.R., CAVALLARI, V., AYRES DE MOURA, C.V. & MITIDIÉRI, E.: *Metabolito do Ácido Fólico inibidor da Xantina Desidrogenase em células tumorais*. REV. BRAS. CANCEROLOGIA, **29**: 42-45 (1982).
- BRADA, Z., ALTMAN, N.H. & BULBA, S.: *The Effect of Cupric Acetate on Ethionine Metabolism*. CANCER RES., **35**: 3172-3180 (1975).
- BROOKES, P. & LAWLEY, P. D.: *Carcinogenesis by Alkylating Agents*. BRIT. MED. BULL., **20**: 91-95 (1964).
- DYER, H.M.: *Evidence of the Physiological Specificity of Methionine in Regard to the Methylthiol Group: The Synthesis of S-Ethylhomocysteine (Ethionine) and a Study of its Availability for Growth*. J. BIOL. CHEM., **124**: 519-526 (1938).
- FARBER, E.: *Carcinoma of the Liver in Rats Fed Ethionine*. ARCH. PATHOL., **62**: 445-453 (1956).
- FARBER, E.: *Ethionine Carcinogenesis*. ADVANC. CANCER RES., **7**: 380-479 (1963).
- FARBER, E.: *Studies on the Molecular Mechanisms of Carcinogenesis*, in J. SCHULTZ (ed.) *Metabolic Alterations in Cancer* pp. 314-334, Amsterdam; NORTH HOLLAND PUBLISHING CO., (1970).
- FARE, G. & HOWELL, J.S.: *The Effect of Dietary Copper on Rat Carcinogenesis by 3-Methoxy Dyes. I. Tumors Induced at Various Sites by Feeding 3-Methoxy-4-aminoazobenzene and its N-Methyl Derivative*. CANCER RES., **24**: 1279-1283 (1964).
- HOWELL, J.S.: *The Effect of Copper Acetate on p-Dimethylaminoazobenzene Carcinogenesis in the Rat*. BRIT. J. CANCER, **12**: 594-608 (1958).
- KAMAMOTO, Y., MAKIURA, S., SUGIHARA, S., HIASA, Y., ARAI, M. & ITO, N.: *The Inhibitory Effect of Copper on D-L-Ethionine Carcinogenesis*. CANCER RES., **33**: 1129-1135 (1973).
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J.: *Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent*. J. BIOL. CHEM., **193**: 265-275 (1951).

17. MITIDIERI, E. & AFFONSO, O.R.: *Serum Xanthine Dehydrogenase of Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Alloxan-Diabetic Rats*. ACTA BIOL. MED. GERM., **38**: 1131-1134 (1979).
18. MITIDIERI, E. & AFFONSO, O.R.: *Effect of the Renal Glutaminase on the Regulation of Xanthine Dehydrogenase Activity*. REV. BRASIL, BIOL., **40**: 759-762 (1980).
19. MITIDIERI, E., AYRES DE MOURA, C.V., CAVALLARI, V. & AFFONSO, O.R.: *Xanthine Dehydrogenase Inhibitor as a Diagnostic Tool in Human Cancer*. I.R.C.S. MEDICAL SCIENCE, **9**: 933 (1981).
20. MITIDIERI, E., SOUZA, A.R., ASCH, K.H., KWEE, J.K. & AFFONSO, O.R.: *Effect of Copper upon Xanthine Dehydrogenase in Liver Damage by D-L-Ethionine*. ARQ. BIOL. TECNOL., **27**: 203 (1984).
21. POPPER, H., DE LA HUERGA, J. & YESINICK, C.: *Hepatic Tumors Due to Prolonged Ethionine Feeding*. SCIENCE, **118**: 80-82 (1953).
22. STEKOL, J.A.: *Biochemical Basis for Ethionine Effects on Tissues*. ADVAN. ENZYMOL., **25**: 369-393 (1963).
23. VILLELA, G.G., MITIDIERI, E. & AFFONSO, O.R.: *Intracellular Distribution of Xanthine Oxidase in the Rat Liver*. NATURE, **175**: 1087 (1955).