

Metabólito do Ácido Fólico Inibidor da Xantina Desidrogenase em Células Tumorais

O.R. AFFONSO
V. CAVALLARI
C.V. AYRES DE MOURA
E. MITIDIERI

*Pesquisadores do Centro de Pesquisa Básica do Instituto Nacional de Câncer –
Rio de Janeiro, R.J.*

RESUMO

As células tumorais liberam no líquido ascítico e no meio de cultura um fator com capacidade de inibir atividade da enzima xantina desidrogenase. Tal fator inibidor não foi evidenciado em exsudato peritoneal induzido por antígenos não tumorais e no fluido sobrenadante de cultura de linfócitos. A inibição da enzima é provocada por um fator dialisável que se apresentou com comportamentos químicos e físicos semelhantes aos da 6-hidroxipterina, um catabólito do ácido fólico e de folatos derivados de células malignas.

INTRODUÇÃO

Existem evidências consideráveis de que pacientes com leucemia, doença de Hodgkin, mieloma múltiplo e outras neoplasias no sistema linforreticular apresentam deficiência de ácido fólico². O ácido fólico e a sua forma coenzimática, ácido tetraidrofólico, estão envolvidos em vias críticas da divisão celular. O ácido tetraidrofólico serve como transportador intermediário dos grupos hidroximetílico (-CH₂OH), formílico (-CHO) ou metílico (-CH₃) em um grande número de reações enzimáticas nas quais esses grupamentos são transferidos de um metabólito para outro ou são interconvertidos¹⁰.

Recentemente constatou-se que células em cultura liberam pterinas, como produto do catabolismo do ácido fólico. Células malignas em cultura liberam uma determinada pterina que células epiteliais normais, amnióticas e fibroblastos embrionários não liberam na mesma velocidade. Esta pterina foi inicialmente classificada como 6-carboxialdeído pterina e depois como 6-hidroxi metil pterina. A presença des-

* Trabalho realizado com suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

ta pterina também foi evidenciada na urina de pacientes portadores de tumores malignos na concentração de 300 nmol/ml ou mais e, praticamente, não foi encontrada na urina de indivíduos normais, quer por dosagem pela cromatografia em papel e espectro de absorção no ultravioleta^{3, 9} quer pelo seu poder inibidor da enzima xantina desidrogenase (XD)⁷.

A finalidade deste trabalho foi a de determinar a presença dessa pterina inibidora da XD em culturas de células tumorais e de células normais no líquido ascítico e no exsudato peritoneal, mostrando ainda a identidade química entre este fator inibidor e uma das pterinas do catabolismo do ácido fólico ou de derivados de folatos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi usada hipoxantina da "California Corporation for Biochemical" e ácido fólico e cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazol, da E. Merck Darmstadt; meio basal de Eagle (Base de Hanks) (MEM) da BBL Division of Becton, Dickinson & Co., e meio 199, do Difco Lab. As pterinas usadas, 6-carboxialdeído (6-CHO-pterina), 6-hidroximetil (6-OH-pterina) e 6-carboxilato (6-COOH-pterina), foram preparadas pelo método descrito por Waller e cols.¹² com modificações por nós introduzidas.

Animais. Foram utilizados camundongos machos, das estirpes B 10A e SW, mantidos no Centro de Pesquisa Básica do INCa através de cruzamentos endogâmicos, e ratos R de ambos os sexos, alimentados *ad libitum*.

Tumores. Mec II: Induzido por 20-metilcolantreno na forma ascítica em camundongos B 10A. Tumor de Ehrlich: indiferenciado, de origem espontânea como carcinoma de glândula mamária de camundongo e posteriormente transformado para a forma ascítica.

Purificação da enzima XD. Foi feita seguindo o método descrito por Mitidieri e col.⁶ usando as proteínas solúveis de fígado de ratos R¹¹. No preparo da enzima todas as operações foram conduzidas entre 0-4°C sendo a enzima precipitada numa concentração final de 54% de sulfato de amônio, como descrito em trabalho anterior⁴. Após a diálise por 24 horas a enzima em solução foi tratada por n-butanol (1:1), centrifugada a

1000 x g/15 min e o sobrenadante dividido em pequenos frascos e guardado a 20°C. O conteúdo dos frascos foi somente descongelado no momento do emprego para a dosagem enzimática.

Atividade da enzima XD. A atividade da enzima foi medida por método previamente descrito^{4, 5}. As determinações foram conduzidas em tubos de Thunber usando hipoxantina como substrato e cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazol que reduzido a formazana foi determinado em 480 nm. Os resultados foram expressos em microgramas de formazana produzidos por ml de solução de enzima durante 30 min a 37°C.

Cultura de tecidos. Os meios usados MEM e meio 199 foram preparados com água tridistilada e esterilizados por filtração a vácuo por membranas GS (Millipore) de 0,22 micra. O meio 199 foi complementado com soro fetal bovino inativado a 56°C/30 min e mais 0,01% de penicilina, 0,06% de estreptomina, de asparagina 2 mM e glutamina 2 mM.

As células tumorais foram coletadas de líquido ascítico de camundongos portadores de tumores de Ehrlich ou Mec II. As células foram adicionadas a 10 ml do MEM e centrifugadas a 800 x g/10 min. O sedimento resultante constituído basicamente de células tumorais foi ressuspenso em 10 ml de meio 199. A cultura foi feita em frascos plásticos da Falcon Division Becton, Dickinson & Co., contendo meio 199, complementado como descrito acima, a 37°C por 24-48 horas.

Os linfócitos para as culturas foram preparados a partir de baço de camundongos em MEM. Ao sedimento, obtido após centrifugação a 250 x g/10 min, foram adicionados 5 ml de NaCl 0,3% e, 1 min após, 3 ml de uma solução de NaCl 1,9%. Após nova centrifugação a 250 x g/5 min o sedimento foi levado duas vezes com MEM e o processo seguiu como descrito anteriormente.

Extração do inibidor. Após crescimento por 24 a 48 horas, células tumorais e normais foram centrifugadas a 800 x g/15 min, obtendo-se um fluido sobrenadante límpido e acelular ao qual se adicionou álcool isopropílico (concentração final de 70%) com agitação, em banho de gelo, por três horas. Após centrifugação a 3000 x g/20 min, o álcool isopropílico foi eliminado do sobrenadante por três extrações com

quatro, cinco e seis volumes de tolueno e, então, a preparação foi guardada na geladeira sob proteção da luz.

RESULTADOS

A enzima purificada apresentou-se com uma única proteína com atividade XD quando se fez a separação por eletroforese em gel de poliacrilamida e sua atividade foi revelada por técnica por nós descrita anteriormente¹.

Durante várias etapas do processo de purificação da XD foram realizadas medidas da atividade enzimática específica e do coeficiente E_{280}/E_{450} (relação proteína/flavina) que nos permitiu visualizar o grau de purificação atingido, comprovando assim a eficiência do processo utilizado.

O líquido ascítico sem tratamento prévio não apresentou capacidade de inibir a atividade da enzima XD, porém, quando submetido a tratamento com álcool isopropílico mostrou-se capaz de atuar sobre a atividade enzimática, inibindo-a (Tabela 1).

Fez-se necessário verificar se a inibição seria realmente devida a produtos do metabolismo tumoral ou devida a fatores plasmáticos, metabólitos de células do hospedeiro e até mesmo à interação tumor hospedeiro. Usou-se, para isto, como controle, exsudatos peritoneais obtidos pela inoculação intraperitoneal de antígenos não tumorais como óleo mineral e soro de cavalo. Estes antígenos provocaram a formação de exsudatos ricos em macrófagos, linfócitos e substâncias provenientes do extravasamento plasmático que foram, então, submetidos a tratamento com álcool isopropílico mostrando-se, porém, sem capacidade de inibir a XD: em seis determinações encontrou-se inibição de 0,7% enquanto uma inibição de 59,8% foi determinada quando se usou o líquido ascítico.

O estudo comparativo com líquido ascítico obtido nove dias e 14 dias após a inoculação do tumor demonstrou que com líquido ascítico de tumores de 14 dias ocorre maior inibição da XD (Tabela 2).

Linfócitos, células de tumor ascítico Mec II e tumor de Ehrlich foram mantidos em cultura por período de 24-48 horas. O fluido sobrenadante da cultura de células de tumor Mec II apresentou um poder de inibição de 18,3%, não devido ao

TABELA 1

Ação do líquido ascítico (L.A.) tratado e não tratado pelo álcool isopropílico

CONDIÇÕES	ATIVIDADE XD	INIBIÇÃO (%)
Enzima	462,2	—
Enzima mais L.A. não tratado	487,0 (3)	0
Enzima mais L.A. tratado	185,7 (7)	59,8

A atividade XD foi dada em micrograma de formazana/ml de enzima. Os números entre parêntesis representam número de experiências realizadas.

TABELA 2

Varição da inibição da XD pelo líquido ascítico de diferentes fases do desenvolvimento do tumor

LÍQUIDO ASCÍTICO	INIBIÇÃO (%)
9 dias	59,8 ± 11,9
14 dias	77,0 ± 9,5

acaso, com $P < 0,01$ para 14 determinações. O material obtido da cultura de células de tumor de Ehrlich apresentou comportamento semelhante, pois inibiu em cerca de 18,2% a atividade XD.

Com culturas de linfócitos (24-48 horas) o material extraído com álcool isopropílico inibiu apenas 2,8% da atividade enzimática.

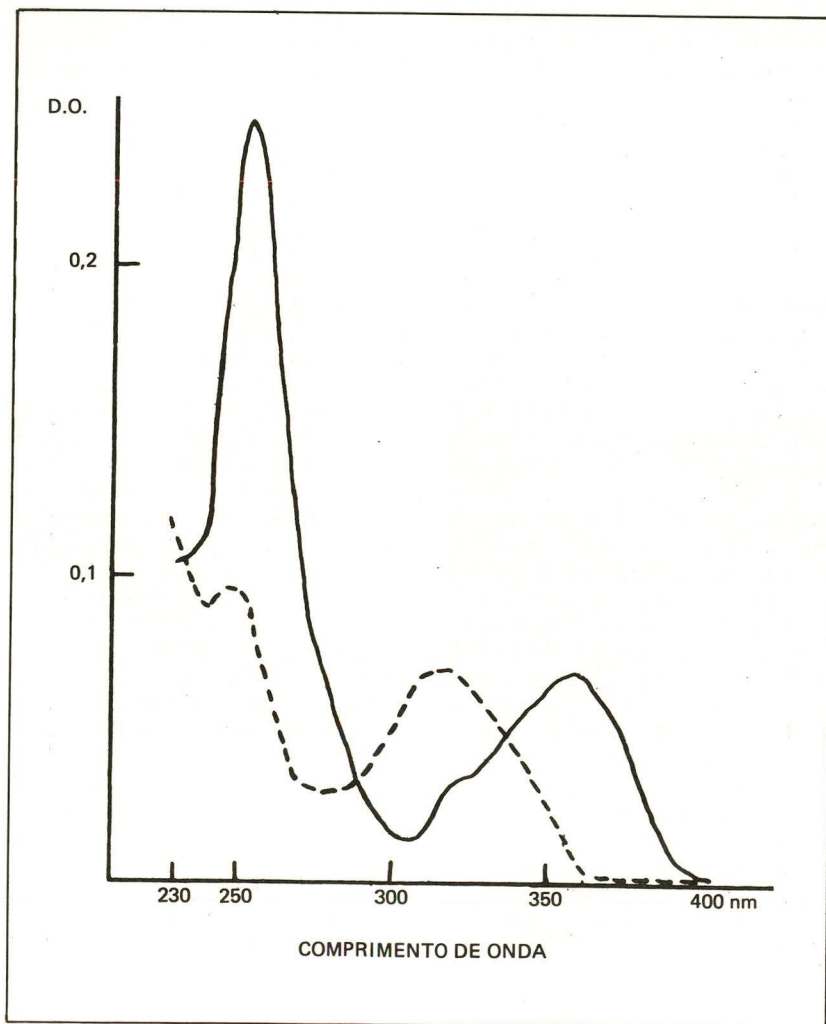


Figura 1 — Espectro de absorção da 6-hidroximetilpterina em pH 13 (————) e em pH 1 (-----)

Estudos realizados com a finalidade de identificação do inibidor mostraram não ser este uma molécula proteica. Ao contrário, é uma molécula pequena dialisável, com comportamento semelhante a 6-OH-pterina, um catabólito do ácido fólico, como ficou constatado após experiências com pterinas obtidas no laboratório por síntese a partir do ácido fólico. Foram sintetizadas a 6-OH-pterina, a 6-CHO-pterina e a 6-COOH-pterina que foram caracterizadas pelo espectro de absorção (Figura 1) e coeficiente de extinção molecular. Comparando-se o fracionamento em gel filtração do fator inibidor de células tumorais com o das pterinas sintetizadas no laboratório foi possível observar-se que o inibidor em estudo apresentou-se com comportamento semelhante ao da 6-OH-pterina (Figura 2). Experiências também foram realizadas quanto ao poder inibidor da XD pelos três principais compostos produzidos por células normais ou malignas no catabolismo do ácido fólico, ou de outros derivados folatos. Os resultados destas experiências mostraram que 6-OH-pterina é também um poderoso inibidor da enzima XD e essa inibição ocorre por competição com o substrato (Figura 3).

DISCUSSÃO

A deficiência de folato em diferentes formas de câncer pode ser devida a um aumento de catabolismo do ácido fólico^{2, 13}. Tal catabolismo, nas células tumorais, ocorre pela quebra oxidativa da molécula do ácido fólico, ou de outro derivado folato, na ligação C₉-N₁₀, com a produção de pterinas que podem ser determinadas pela fluorescência azul na cromatografia em papel⁹ ou por inibição da enzima XD⁸.

As células normais parecem não liberar a mesma pterina inibidora da atividade XD que é liberada por células tumorais, ou se a liberam, não o fazem com a mesma velocidade. Tal pterina que foi primeiramente identificada como 6-CHO-pterina está também presente nas células normais onde é oxidada a 6-COOH-pterina. Tal conversão não ocorre nas células malignas que acumulam a 6-CHO-pterina ou então a converte em 6-OH-pterina, ambas inibidoras da atividade XD. A inibição que se observa com células nor-

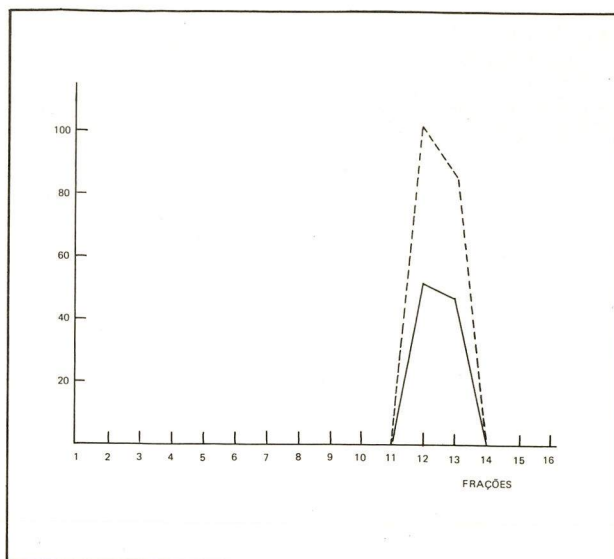


Figura 2 — Fracionamento em Sephadex G-25 da 6-hidroxiimetilpterina (— — —) e do fator inibidor contido no sobrenadante da cultura de células tumorais (— — —).

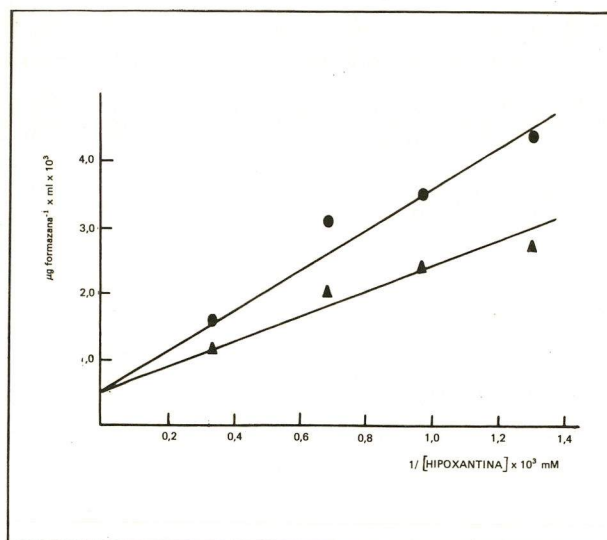


Figura 3 — Gráfico segundo Lineweaver-Burk ($1/v$ versus $1/IS$) da inibição da atividade de xantina desidrogenase por 6-hidrometilpterina 4×10^{-6} M (●) e da atividade enzimática sem inibidor (▲).

mais resulta da presença constante do intermediário 6-CHO-pterina que também é um potente inibidor da XD. A presença do 6-CHO-pterina em células normais decorre de um processo catabólico menos ativo do ácido fólico ou de outros derivados folatos, por estas células. Por outro lado a pterina carboxilada (6-COOH-pterina) que é o principal produto do catabolismo do ácido fólico em células normais, não é um inibidor da enzima.

SUMMARY

Malignant cells excrete into their growth medium a xanthine dehydrogenase inhibitor. This catabolite was not found in peritoneal exudate induced by non-tumoral antigen and in the supernatant fluid of lymphocytes culture. The XD inhibitor is a dialyzable factor, probably 6-OH-pterin.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AFFONSO, O.R.; LEMOS, M.F.; SIMAS, S.M. & MITIDIERI, E. — Characterization of the Blood Serum Xanthine Dehydrogenase by Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *An. Acad. Bras. Ci.*, 47: 517-520, 1975.
2. BLAKLEY, R.L. — The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines. Ed. Neuberger, A. & Tatum, E.L., North-Holland Pub. Co., Amsterdam, 1969.
3. HALPERN, R.; HALPERN, B.C.; STEA, B.; DURLAP, A.; CONKLIM, K.; CLARK, B.; ASHE, H.; SPERLING, L.; HALPERN, J.A.; HARDY, D. & SMITH, R.A. — Pterin-6-aldehyde, a Cancer Cell Catabolite: Identification and Application in Diagnosis and Treatment of Human Cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 74: 587-591, 1977.
4. MITIDIERI, E. & AFFONSO, O.R. — The Relationship of Phosphate and Lipids to Xanthine Dehydrogenase. *Experientia*, 24: 330-331, 1968.
5. MITIDIERI, E. & AFFONSO, O.R. — Serum Xanthine Dehydrogenase of Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Alloxan-Diabetic Rats. *Acta Biol. Med. Ger.*, 38: 1131-1134, 1979.
6. MITIDIERI, E.; AFFONSO, O.R. & RIBEIRO, L.P. — Studies on the Phosphate Requirement for Xanthine Dehydrogenase Activity. I: Phosphorus Content and Activity of Different Enzyme Preparations. *Rev. Bras. Biol.*, 29: 391-397, 1969.
7. MITIDIERI, E.; AYRES DE MOURA, C.V.; CAVALLARI, V. & AFFONSO, O.R. — Xanthine Dehydrogenase Inhibitor as a Diagnostic Tool in Human Cancer. *IRCS Medical Science* (em impressão).
8. MITIDIERI, E.; CAVALLARI, V.; AYRES DE MOURA, C.V. & AFFONSO, O.R. — Characteristics of a xanthine Oxidase Inhibitor from Tumor Cells. III Pan-American Biochemistry Congress. Aug. 23-29, Mexico City, Mexico, 1981.
9. STEA, B.; BACKLUND, P.S.; BERKEY, P.B.; CHO, A.K.; HALPERN, B.C.; HALPERN, R.M. & SMITH, R.A. — Folate and Pterin Metabolism by Cancer Cells in Culture. *Cancer Research*, 38: 2378-2384, 1978.
10. STOKSTAD, E.L.R. & KOCH, J. — Folic Acid Metabolism. *Physiol. Rev.* 47: 83-116, 1967.
11. VILLELA, G.G.; MITIDIERI, E. & AFFONSO, O.R. — Intracellular Distribution of Xanthine Oxidase in the Rat Liver. *Nature*, 175: 1687, 1955.
12. WALLER, C.W.; GOLDMAN, A.A.; ANGIER, R.B.; BOOTH, J.H.; HUTCHINGS, B.L.; MOWAT, J.H. & SEMB, J. — 2-Amino-4-Hydroxy-6-Pteridine Carboxialdehyde. *J. Am. Chem. Soc.*, 72: 4630-4633, 1950.
13. WEIR, D.G. — The Pathogenesis of Folic Acid Deficiency in Man. *Irish J. Med. Sci.*, 143: 3-20, 1974.