

Fosfolipídios retardam
e colesterol e seus derivados aceleram
a formação de tumores
induzidos por hidrocarbonetos cancerígenos *

REINOUT F. A. ALTMAN,
OLGA PUGACHIOV,
ITÁLIA BALLINI-KERR,
DELCÁCIO J. DA SILVA,
LEONOR L. S. PINTO-LEON
CARLOS R. N. LOPES e
IVAN B. FREIRE **

* Realizado com o auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas, foi apresentado ao "Congresso de Cancerologia Comemorativo do XXX Aniversário de Instituto Nacional de Câncer", Rio de Janeiro de 22 a 28 de setembro de 1968.

** Do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, GB — Brasil.

SUMÁRIO

Ficou experimentalmente comprovado que os fosfolipídeos retardam e o colesterol e seus derivados aceleram a formação de tumores induzidos por hidrocarbonetos cancerígenos. Acentua-se a suma importância deste fenômeno, pois trata-se de dois grupos de lipídeos comuns, aliás componentes naturais de qualquer célula animal, capazes de influenciar, positivamente, o mecanismo da carcinogênese. O fato de que os fosfolipídeos e o colesterol, ao lado das proteínas, constituem quantitativamente os componentes principais da **membrana** celular, conduziu ao raciocínio lógico que as membranas devem representar uma posição chave na etiologia do câncer.

SUMMARY

It could be experimentally proved that phospholipids retard and cholesterol and its derivatives promote the formation of tumors induced by carcinogenic hydrocarbons. No sufficient stress can be laid upon the important phenomenon that two very common groups of lipids, i. e. natural components of whatever animal cell, positively influence the mechanism of carcinogenesis. The fact that phospholipids and cholesterol, besides proteins, constitute quantitatively speaking the most important components of cell **membranes**, led to the logic reasoning that cell surfaces actually do represent a key position in cancer etiology. A series of thusfar ununderstood phenomena can thus be explained satisfactorily.

**FOSFOLIPÍDEOS (FL) RETARDAM E COLESTEROL (Col) E SEUS DERIVADOS
ACELERAM A FORMAÇÃO DE TUMORES INDUZIDOS POR
HIDROCARBONETOS CANCERÍGENOS**

Dickens e Weil-Malherbe (9, 10, 32, 33) descobriram, há mais de 20 anos, que os fosfolipídeos retardam e o colesterol acelera a formação de tumores quando aplicados subcutânea e simultaneamente com o hidrocarboneto cancerígeno, o benzopireno. Este trabalho nunca foi comentado na literatura: parece que ninguém percebeu a suma importância deste fato experimental que dois grupos de lipídeos comuns, representando componentes naturais de qualquer célula animal, influem positivamente no mecanismo da carcinogênese.

Entretanto, esta observação notável dos pesquisadores ingleses apresenta um dos principais fundamentos nos quais baseamos a nossa teoria sobre a origem do câncer (1, 2). Era portanto, para nós, de uma significação extraordinária se pudéssemos provar a validade geral da tese de Dickens e Weil-Malherbe. Temos agora a maior satisfação em comunicar que acabamos de confirmar a tese desses autores em relação aos tumores induzidos por um outro hidrocarboneto com uma forte ação cancerígena: o metilcolantreno.

MATERIAL E MÉTODO

Foram realizadas duas experiências envolvendo um total de 280 camundongos "Swiss". Os animais foram divididos, em ambas experiências, em quatro grupos. Os do Grupo I, representando os testemunhas, são indicados no Gráfico (Fig. 1) pelas curvas marcadas "MeC", pois esses animais receberam a dose única de 0,5 mg metilcolantreno dissolvido em 0,2 ml do solvente neutro trioctanoína (Eastman). Os camundongos do Grupo II da 1.^a Experiência receberam além de 0,5 mg MeC, mais 20 mg de fosfatidilcolina e os animais do Grupo II da 2.^a Experiência: 0,5 mg MeC + 50 mg Asolectin (composto de partes iguais de fosfatidilcolina-etanolamina e inositol). Esses Grupos II são marcados "PL" no Gráfico. Os camundongos dos Grupos III das duas Experiências receberam 0,5 mg MeC + 20 mg de colesterol, apresentados no Gráfico pelas

curvas marcadas "Col". Finalmente, os representantes dos Grupos IV (no Gráfico marcados por "PL + Chol") receberam u'a mistura de fosfolipídeos e colesterol além do metilcolantreno.

RESULTADOS

Os resultados obtidos são apresentados pelo Gráfico (Fig. 1). Tomamos como base o momento no qual 50% dos animais foram positivamente atingidos pelo câncer. Observa-se que a incidência de tumores em ambas experiências é consideravelmente retardada pelos fosfolipídeos, pois comparando as curvas "MeC" (testemunhas) com as marcadas "PL" obtivemos um retardamento de mais de 4 semanas, tempo considerável na curta vida do camundongo.

Quanto à influência do colesterol, aplicado junto ao MeC, observamos somente na 2.^a experiência uma importante aceleração

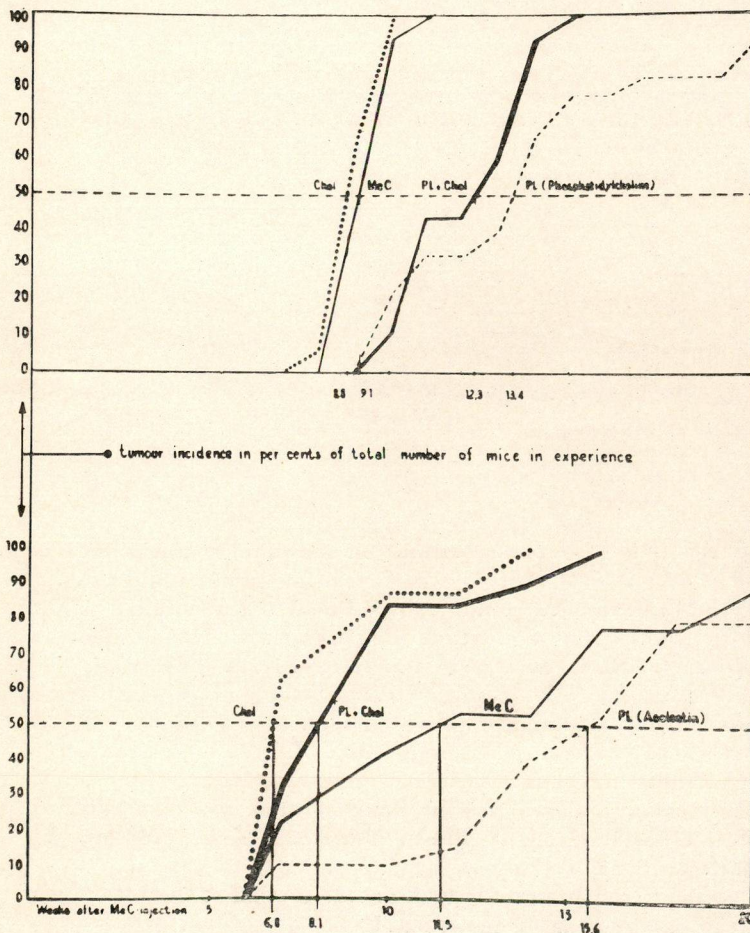


Figura 1

de quase 5 semanas do aparecimento dos tumores. A mistura PL + Chol resultou na 1.^a experiência num efeito predominante dos FL e na 2.^a experiência num efeito maior do Col.

De acôrdo com êsses resultados ficou plenamente confirmado que os fosfolipídeos retardam e o colesterol promove a formação de tumores induzidos por dois hidrocarbonetos fortemente cancerígenos, a saber: benzopireno e metilcolantreno. Uma nova série de experiências está neste momento em andamento com a finalidade de provar a tese para tumores induzidos por dibenzantraceno, outro hidrocarboneto destacadamente cancerígeno.

DISCUSSÃO

Não há explicação para o fenômeno que acabamos de descrever, pois não é possível recorrer aos diversos agentes até agora considerados como prováveis causas do câncer,

a saber: vírus, irritações, mutações da célula, regiões K na molécula do cancerígeno, modificações na constituição dos ácidos nucleicos, variação da atividade de enzimas, etc.

Como, então, esclarecer esta influência notável dêsses dois grupos de lipídeos sobre o mecanismo da carcinogênese? A resposta está, parece-nos, numa outra pergunta: Qual o papel verdadeiro dos fosfolipídeos e do colesterol na própria célula?

Sabe-se com certeza absoluta que êsses grupos de lipídeos constituem, além das proteínas, **os principais componentes da membrana celular**. Citamos, como exemplo, os resultados analíticos obtidos por Emmelot e seus colaboradores (11) da membrana da célula de fígado do rato (Fig. 2).

Vemos (e desejamos salientar a importância dêste fato) que ocorre apenas uma molécula de Col sobre cada duas e meia moléculas de FL. Existe, portanto, um excesso de FL na membrana em relação ao Col.

Figura 2

A membrana da célula do fígado do rato contem sobre cada 100 moléculas de Fosfolipídeos:

50 mol. de colina
 40 mol. de colesterol
 17 mol. de hexose
 16 mol. de hexosemina
 9 mol. de ácido siálico
 3000 mol. de amino ácidos
 (calculados como
 mono amino ácidos
 para proteína total)

P. Emmelot c. s. : Biochim. Biophys. Acta 90, 126 (1964)

É, naturalmente, de interesse fundamental saber o arranjo e a orientação de todos os componentes mencionados dentro da membrana. Em outras palavras: como é o aspecto da verdadeira estrutura da membrana celular?

O assunto é relativamente novo, pois embora em princípio esclarecido há muito tempo (5, 7, 8), o problema foi estudado profundamente somente nos dez últimos anos. Chamamos a especial atenção aos números especiais das Revistas "Circulation", "Journal of the American Oil Chemists' Society" (17) e "British Medical Bulletin" (28) e às monografias de Chapman (6) e Stein (25).

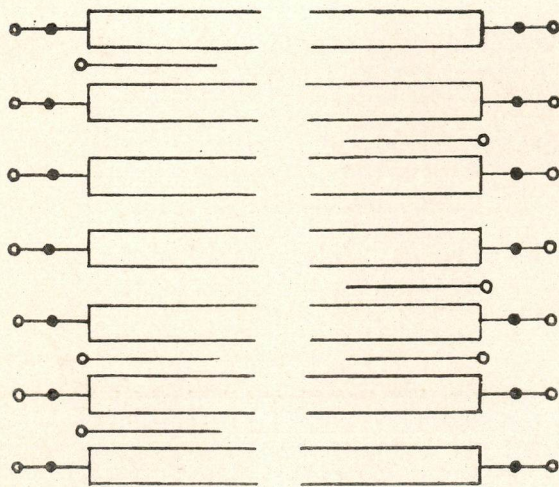
Seja como for, a membrana celular **na sua forma mais simples** se compõe de uma película dupla de FL e Col como é demonstrada na Fig. 3 (cf. Willmer (34), apresentando um possível arranjo e orientação das duas espécies de moléculas, **deixando lugares vagos** entre as moléculas de FL para moléculas de Col ou seus derivados que, além disso, poderiam ser "solubilizadas" na parte lipofílica do sistema. Já na Fig. 4 (cf. Stoeckenius (26, 27) vemos o arranjo e a orientação de moléculas de FL em relação às proteínas que se acham estendidas com

os grupos básicos NH_2 dos amino ácidos ligados aos grupos ácidos P-OH dos fosfolípidos.

Segundo as concepções de Finean (13), as moléculas de FL e Col formam facilmente "associações como é demonstrado pela Fig. 5. Existem neste sistema, além das forças de London-Van der Waals, que ligam as partes lipofílicas dos FL e do Col, também ligações químicas entre o grupo positivo da base orgânica dos FL e o grupo OH do Col com carga negativa, formando assim um conjunto homogêneo de uma firmeza extraordinária.

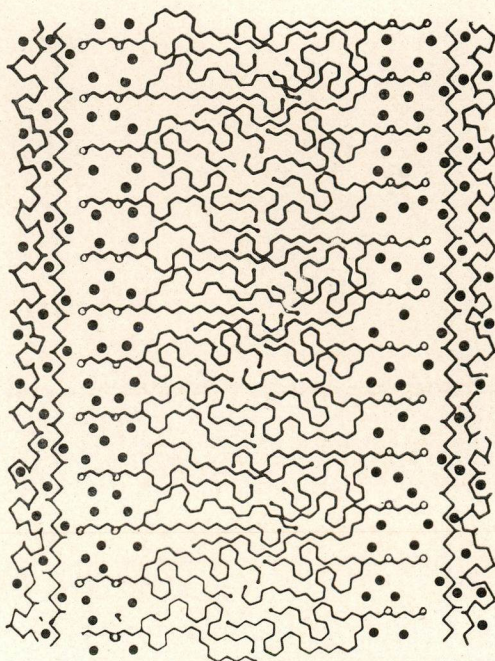
É fácil de compreender, então, que um excesso de colesterol (ou um dos seus derivados) pode perfeitamente ser absorvido pela membrana, que contém uma molécula de Col sobre cada duas e meia moléculas de FL no caso da célula de fígado do rato. O colesterol será fixado na membrana que muda assim de composição química e, conseqüentemente, de permeabilidade. Esta modificação da permeabilidade muda, por sua vez, lenta porém profundamente a composição do conteúdo da célula, isto é, o plasma e o núcleo. Esta nova célula com uma composição diferente da célula original, possui evidentemente propriedades diferentes e po-

Fig. 3



Possible arrangement and orientation of PL and Chol. in bimolecular leaflets of cell surfaces

Fig. 4



de se apresentar, por acaso, como uma célula cancerosa.

A semelhança entre as estruturas químicas do colesterol de um lado, e de vários compostos cancerígenos de outro lado, é flagrante como demonstra a Fig. 6. Temos aqui como autênticos derivados do colesterol: 3.4-benzopireno, o 3-metilcolantreno como representantes dos mais ativos cancerígenos, além de 2 hormônios igualmente com uma ação cancerígena. Devemos salientar que o próprio colesterol é, sob determinadas circunstâncias, também cancerígeno como foi indiscutivelmente provado por Hieger (15, 16), Bischoff (3, 4), e Szepsenwol (30, 31). Aliás o perigo de um excesso de colesterol em relação ao câncer já foi acrescentado pelo grande e saudoso Prof. Angel Roffo (18, 24).

Fica, desta maneira, perfeitamente esclarecida a ação cancerígena do colesterol e seus derivados como consequência duma ação molecular direta sobre a membrana celular. Resta-nos ainda explicar a ação benéfica dos FL.

Voltemos à Fig. 5. Vemos que os FL são capazes de evitar que os derivados cancerígenos do colesterol entrem na membrana,

pois as associações entre eles e os FL são demasiado grandes para poderem entrar na película dupla de FL e Col ou bem de penetram e se fixar ou solubilizar na zona lipofílica. Esta ação protetora dos FL é evidentemente anulada por Col livre que, devido ao seu grupo — OH com carga negativa, é capaz de deslocar (libertar) o cancerígeno da sua associação com os FL da seguinte maneira:

$FL-MeC + Col \rightarrow FL-Col + MeC$,
possibilitando uma nova ação do MeC libertado.

Chegamos assim à conclusão importantíssima de que os fosfolípidos, quando administrados juntamente ao cancerígeno, são capazes de **retardar consideravelmente o aparecimento de tumores malignos**. Se é possível retardar, isto é, **evitar temporariamente** a formação de tumores, deve também existir a possibilidade de evitar o fenômeno **permanentemente**. Conseguir esta real profilaxia do câncer experimental é, no momento, a nossa maior preocupação. Trata-se, evidentemente, de estabelecer a proporção correta entre FL e Col e seus derivados no organismo, quer no sangue, quer nos outros tecidos.

Agradecemos ao Sr. José de Carvalho Filho pelos excelentes diapositivos e ao Sr. Vivaldo C. do Amaral pela incomparável assistência técnica.

Fig. 5

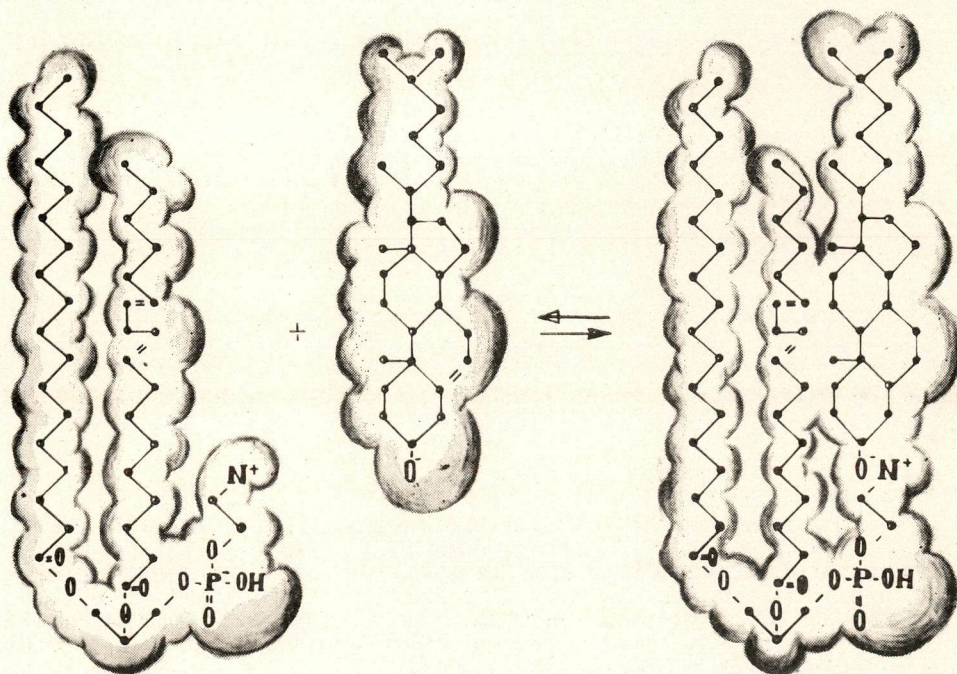
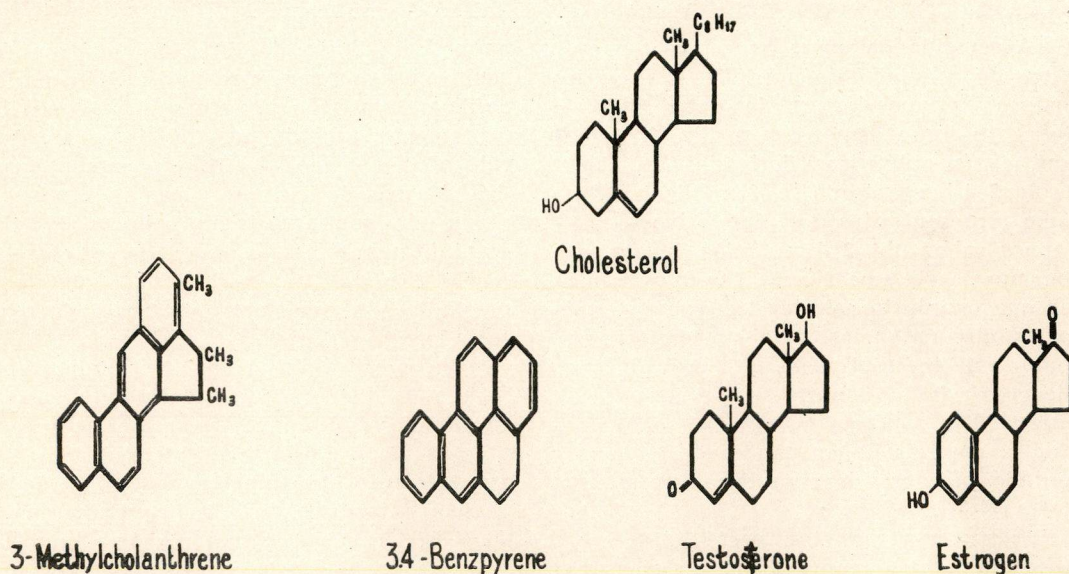


Fig. 6



BIBLIOGRAFIA

- 1 — ALTMAN, R. F. A.: The origin of the first cancer cell. Arch. Geschwulstforsch., 19: 1 e 97, 1962.
- 2 — ALTMAN, R. F. A.: A possible definition of the cancer problem. O Hospital, 73: 1525, 1968.
- 3 — BISCHOFF, F.: Carcinogenesis through cholesterol and derivatives. Progr. Exp. Tumor Res., 3: 412, 1963.
- 4 — BISCHOFF, F.: Solid state carcinogenesis (cholesterol-induced). 47th. Ann. Meeting of the Federation of Am. Soc. for Exp. Biology. 1963.
- 5 — BUNGENBERG DE JONG, H. G. & BONNER, J.: Phosphatide auto-complex coacervates as ionic systems and their relation to the protoplasmic membrane. Protoplasma, 24: 198, 1935.
- 6 — CHAPMAN, D.: Biological membranes Academic Press. London & New York, 1966.
- 7 — DANIELLI, J. F.: Some properties of lipid films in relation to the structure of the plasma membrane. J. Cell. Comp. Physiol., 7: 393, 1936.
- 8 — DAVSON, H. & DANIELLI, J. F.: The permeability of natural membranes. Cambridge Univ. Press. Cambridge, 1943.
- 9 — DICKENS, F. & WEIL-MALHERBE, H.: Factors affecting carcinogenesis, I. The effect of lipid solvents on tumor production by 3,4-benzpyrene, Cancer Res., 2: 560, 1942.
- 10 — DICKENS, F. & WEIL-MALHERBE, H.: Factors affecting carcinogenesis. III. The effect of hydrogenation of lipid solvents on carcinogenesis by 3,4-benzpyrene. Cancer Res., 6: 161, 1946.
- 11 — EMMELLOT, P.; BOSS, C. J.; BENEDETTI, E. L. & RÜMKE, P.: Studies on plasma membranes I. Chemical composition and enzyme content of plasma membranes isolated from rat liver. Biochim. Biophys. Acta, 90: 126, 1964.
- 12 — FINEAN, J. B.: Phospholipid-cholesterol complexes in the structure of myelin. Experimentia, 9: 17, 1953.
- 13 — FINEAN, J. B.: The nature and stability of the plasma membrane. Circulation, 26: 1151, 1962.
- 14 — HISGER, I: Carcinogenesis by cholesterol. Brit. J. Cancer, 13: 439, 1959.
- 15 — HIEGER, I: Cholesterol as carcinogen I. Sarcoma induction by cholesterol in asensitive strain of mince. Brit. J. Cancer, 16: 716, 1962.
- 16 — HIEGER, I. & ORR, S. F. D.: On the carcinogenic activity of purified cholesterol. Brit. J. Cancer, 8: 274, 1964.
- 17 — Proceedings of the Symposium on "Behavior of lipids at interfaces and in biological membranes". The American Oil Chemists' Society at its 39th. Fall Meeting. Cincinnati, Ohio, 1965.

- 18 — ROFFO, A. H.: Lesiones precancerosas definidas y su relación con la colessterina. Bol. Inst. Med. Exp. del Cancer (Buenos Aires), 3:11, 1926
- 19 — ROFFO, A. H.: La colessterina segun la edad y su relación con el desarrollo del cancer. Ibid., 3: 195, 1926.
- 20 — ROFFO, A. H.: Propriedades colesterogeneticas de los tejidos normales y neoplasticos. Ibid., 3: 584, 1926.
- 21 — ROFFO, A. H.: Relación de la colessterina con el crecimiento de tecidos normales y neoplasticos in vitro. Ibid., 4: 55, 1927.
- 22 — ROFFO, A. H.: Absorción de la colessterina por el tumor. La colessterina en su passaje por el tejido neoplasico. Ibid. 5: 101, 1928.
- 23 — ROFFO, A. H.:Influencia de la colessterina sobre el desarrollo del cancer de alquitrán. Ibid. 6: 144, 1929.
- 24 — ROFFO, A. H.: La nutrición y el desarrollo de los tumores: Importancia de los lipoides. Ibid. 6: 170, 1929.
- 25 — STEIN, W. D.: The movement of molecules across cell membranes. Academic Press. London, 1967.
- 26 — STOECKENIUS, W.: The molecular structure of lipid-water systems and cell membrane models studied with the electron microscope. Symp. Intern. Soc. Cell Biology, I: 349, 1961.
- 27 — STOECKENIUS, W.: Structure of the plasma membrane. An electronmicroscope study. Circulation, 26: 1066, 1962.
- 28 — Structure and Function of Membranes. British Medical Bulletin, Vo. 24, N.º 2, May, 1968.
- 29 — Symposium on the Plasma Membrane. Circulation, Vol. 26, N.º 5, Part. 2. November, 1962.
- 30 — SZPSENWOL, J.: Carcinogenic effect of egg white, egg yolk and lipids in mice. Proc. Soc. Exp. Biol., 112: 1073, 1963.
- 31 — SZPSENWOL, J.: The carcinogenic effect of alcohol extract of egg yolk in mice. 47th. Ann. Meeting of the Federation of Am. Soc. Exp. Biol., 1963; (c. Biol. Abtst. 43 (4), Entry nº 14.726, 1963).
- 32 — WEIL-MALHERBE, H. & DICKENS, F.: Factors affecting carcinogenesis II. Incorporation of 3.4-benzopyrene in media containing purified licithin or cephalin. Cancer Res., 4: 425, 1944.
- 33 — WEIL-MALHERBE, H. & DICKENS, F.: Factors affecting carcinogenesis IV. The effect of tricapyrin solutions of cholesterol and phospholipins. Cancer Res., 6: 171, 1946.
- 34 — WILMER, E. N.:Steroids and cell surfaces. Biol. Rev., 36: 1961.