

PESQUISA

**estudos sôbre
regulação metabólica**
- contrôle de síntese de proteína(*)

H. C. FARIA
F. G. MELLO
M. C. FARIA
P. PRESA
C. A. NEPOMUCENO

ESTUDOS SÓBRE REGULAÇÃO METABÓLICA. CONTRÔLE DE SÍNTESE DE PROTEÍNA

I — Introdução

Admite-se hoje que a célula cancerosa é aquela que perdeu a sensibilidade aos controles que regulam a reprodução de tecido normal. As mitoses se sucedendo umas imediatamente após outras, fazem crescer rapidamente, de modo exponencial, o número de células. Sob o aspecto morfológico é previsível a desorganização do tecido daí resultante. Sob o aspecto bioquímico nada de novo é encontrado; as mesmas enzimas, os mesmos substratos, os mesmos processos metabólicos estão presentes, apenas a velocidade com que se passam está aumentada.

Com os trabalhos de LURIA (1958), VON POTTER (1958-1960-1962-1964), WEBER (1963), MUNBLOCK (1964), PITOT e HEIDELBERG (1963), os conceitos de "Feedback Deletion" e "RNA Template Deletion" parecem dominar o problema da carcinogênese, isto é, esta seria devida à modificação nos sistemas reguladores do metabolismo celular ao nível molecular.

Os problemas de controles de indução enzimática, desrepressão, repressão e inibição de enzimas, atualmente tão pouco conhecidos, embora muito estudados, dominam o aspecto bioquímico da carcinogênese.

Conceituando-se o problema de câncer da maneira exposta impõe-se estudar o controle de síntese de macromoléculas — proteínas e nucleoproteínas, substâncias indispensáveis à reprodução celular.

É, sem dúvida, o estudo do controle de síntese de nucleoproteína a nossa meta. Antes, porém, nos é necessário elucidar processo mais simples, que nos servirão como modelos básicos para futuras comparações.

O entendimento da regulação de síntese de proteínas-enzimas adaptativas em fígado, é, com certeza, o caminho mais fácil para se introduzir no complexo processo de homeostasia dos sistemas metabólicos em animais, cuja desregulação talvez pudesse ter, como uma das consequências, a anárquica reprodução celular característica do câncer.

Estudaremos o controle da proteína enzima alfa ceto glutarato transaminase como nosso primeiro modelo experimental, e apresentaremos nos trabalhos que se seguem a esta introdução, a nossa contribuição original à elucidação do controle de síntese protéica.

Por vezes, as experimentações em fígado de animal "in vivo" são substituídas por fígado "in vitro", em perfusão contínua extracorpórea, para que possamos eliminar o efeito pluri-hormonal do animal vivo e nos situarmos em melhor condição de concluir a relação causa-efeito no sistema em observação.

ESTUDOS SÔBRE REGULAÇÃO METABÓLICA. CONTRÔLE DE SÍNTESE DE PROTEÍNA

II — Indução e repressão da enzima tirosina alfa-ceto-glutarato transaminase em fígado de camundongo.

II — Induction and repression of tyrosine alpha-keto-glutarate transaminase in mouse liver.

H. C. FARIA, F. G. MELLO, M. C. FARIA, P. PRESA

Laboratório de Bioquímica do Serviço de Pesquisa e Experimentação do Instituto Nacional de Câncer — Rio de Janeiro — GB

Numerosos autores já demonstraram a indução de síntese de proteína-enzima dependente de síntese de ácido ribonucléico em fígado de animais tratados pela cortisona (1, 2, 3, 4, 6, 8). Todavia, o mecanismo controlador desta indução não é ainda bem conhecido.

Garren et al. (4), trabalhando na indução por cortisona de Triptofano Pirrolase e Tirosina Transaminase em fígado de rato, sugerem a existência de um "repressor" agindo ao nível da transcrição do mensageiro RNA produtor da enzima. Este "repressor" é bloqueado por Actinomicina D e 5-Fluorouracil permitindo, quando ausente, o reaparecimento das enzimas que, embora sob a ação do estímulo indutor, estavam reprimidas.

Recentemente foi sugerido por Kenney (7) a existência de um polipeptídeo que degrada especificamente a T.T. (Tirosina Transaminase).

O presente trabalho mostra que o fígado de camundongo submetido a ação de cortisona, apresenta uma segunda elevação entre 10 e 16 hs (Fig. I), além de conhecida indução de T.T. que é máxima cêrca de 6 hs após a administração do corticóide.

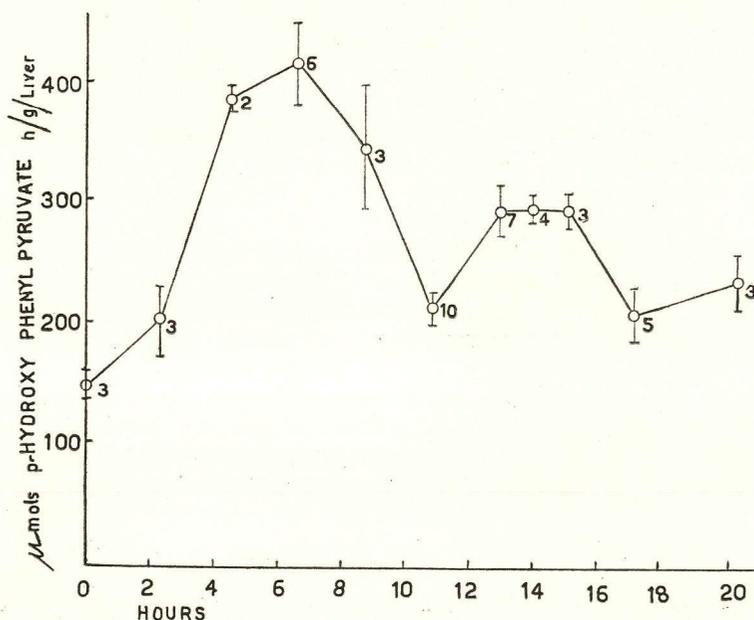


Figura 1 — Indução em fígado de camundongo da tirosina alfa-ceto-glutarato transaminase.

Em camundongos C57 BL machos foi injetado acetato de Cortisona intraperitonealmente (1 mg/20 g de peso corporal) no tempo zero; os animais foram sacrificados em intervalos de 2 horas ou 4 horas num período de 19 horas. Os fígados foram removidos e a tirosina transaminase foi dosada de acordo com Rosen et al. (9). A atividade é expressa em micro M de ácido p-hidroxifenilpiruvico/h/g fígado. Cada ponto representa a atividade da TT \pm erro padrão da média (linha vertical) ou números pertos de cada ponto mostram o n.º de animais que foram utilizados para determiná-los.

Figure 1 — Induction of mouse liver tyrosine alpha-keto-glutarate transaminase in male C57 BL mice by cortisone acetate. Cortisone acetate (1 mg per 20 g mouse weight) was injected intraperitoneally at zero time; mice were sacrificed at intervals of 2 hrs or 4 hrs, for the succeeding 19 hrs. Livers were removed and assayed for tyrosine transaminase as described by Rosen et al. (9). Activity is expressed as micro M p-hydroxyphenyl pyruvate/hr/g liver. Each point represents TT activity \pm standard error of the mean (vertical lines). The numbers seen near each point show how many animals were used to determine the point.

ESTUDOS SÔBRE REGULAÇÃO METABÓLICA. CONTRÔLE DE SÍNTESE DE PROTEÍNA

A Fig. 2 mostra que um bloqueador de síntese de ácido ribonucléico mensageiro (Actinomicina D), embora bloqueie a indução inicial H de atividade enzimática, é ineficaz quando administrado no início da segunda ascensão, sugerindo que, neste momento, o aumento da enzima é independente de síntese de seu m-RNA. Porém, um inibidor de síntese de proteína a nível de ribossoma (etionina) bloqueia completamente esta segunda fase da indução, o que parece indicar que este aumento é devido à síntese "de novo" da T.T., a partir de um mensageiro já existente mas inativo.

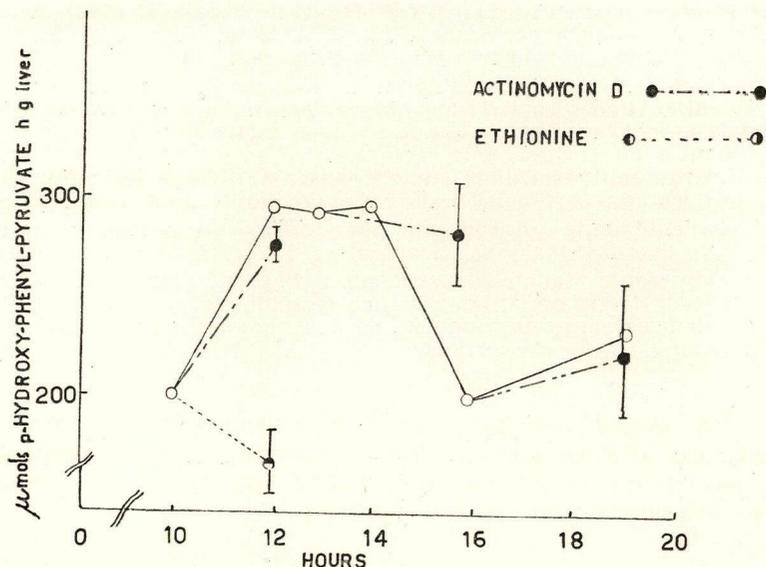


Figura 2 — Efeitos da Actinomicina D e DL etionina sôbre a atividade da Tirosina Transaminase 10 h após a injeção de cortisona. Actinomicina D (110 micro-g por 20 g de pêso corporal) foi administrada 10, 13 e 16 horas após o tratamento por cortisona (1 mg por 20 g pêso corporal) no tempo zero. Os camundongos foram sacrificados 2 e 3 horas mais tarde. O DL-Etionina (20 mg por 20 g de pêso corporal) foi injetada 10 hs após a injeção de cortisona, e os animais foram sacrificados 2 hs após. Cada ponto representa a media da atividade enzimática (micro M de ácido p-hidroxifenilpiruvico/h/g de fígado) de pelo menos 3 camundongos \pm o erro padrão da media.

Os círculos claros (O) representam a atividade enzimática em fígados de camundongos tratados exclusivamente com cortisona (no tempo zero).

Figure 2 — Effect of actinomycin D and DL ethionine administrations on tyrosine transaminase activity after the 10th hour from cortisone injection. Actinomycin D (110 microg per 20 g mouse weight) was administered 10 hrs, 13 hrs and 16 hrs following cortisone injection (1 mg per 20 g mouse weight) (zero time); mice were sacrificed 2 hrs, 3 hrs later. DL Ethyonine (20 mg per 20 g mouse weight) was administered 10 hrs after the cortisone injection, animals being sacrificed two horus later. Each point represents the average of TT activities (micro M p-hydroxyphenyl pyruvate acid/hr/g liver) of, at least, 3 mice \pm standard error of the mean.

White circles (O) represent enzyme activities in livers of mice treated exclusively with cortisone (at zero time).

Essa hipótese concordaria perfeitamente com a sugestão de Garren (4), isto é, com a indução da enzima se formaria um "repressor" de vida média curta atuando na síntese da T.T. ao nível de ribossoma. Com a subsequente queda da atividade enzimática, haveria o desaparecimento do estímulo à produção do "repressor" e a conseqüente reativação do m-RNA preexistente, o qual reiniciaria o processo de síntese da enzima.

ESTUDOS SÔBRE REGULAÇÃO METABÓLICA. CONTRÔLE DE SÍNTESE DE PROTEÍNA

No entanto, a evidência da existência de um polipeptídeo que é especificamente responsável pela degradação da T.T. (7), poderia explicar também os resultados por nós obtidos. O processo de repressão não seria ao nível de ribossoma (segundo Garren), mas sim devido ao aumento da destruição enzimática: mantendo-se a síntese constante e aumentando-se a degradação, o nível da enzima baixaria. Portanto, apenas o local da repressão seria trocado, os mecanismos que destravariam estes fenômenos seriam os mesmos. Tais mecanismos constituem, no momento, um dos pontos de estudo em nosso laboratório, dada a possibilidade de que numerosas enzimas possam apresentar processos de regulação similares.

SUMARIO

Uma segunda subida na atividade da tirosina alfa-ceto-glutarato transaminase foi verificada entre 12 e 14 horas após administração de cortisona, este fato é possivelmente devido a uma reativação de seu m-RNA ou mudança no processo degradativo da enzima.

SUMMARY

A second rise in tyrosine alpha-keto-glutarate transaminase activity was detected between 12 to 14 hours after cortisone administration, possibly due to the reactivation of its respective m-RNA, or changes in the degradative process of the enzyme.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BARNABEI, O. and SERENEI, F. — *Biochim. Biophys., Acta*, 91, 239 (1934).
- 2 — GREENGARD, O., SMITH, M. A. and A. C. S. G. — *Biochim. Biophys., Acta*, 61, 658 (1962).
- 3 — GREENGARD, O., SMITH, and A. C. S. G. — *J. Biol. Chem.*, 238, 1548 (1963).
- 4 — GARREN, L. D., HOWELL, R. R., TOMKINS, G. M. and GROCCO, R. M. — *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 52, 1121 (1964).
- 5 — JERVELL, K. F. and OSNES, J. B. — *Life Sciences*, 12, 975 (1963).
- 6 — KENNEY, F. T. — *J. Biol. Chem.*, 237, 3495 (1962).
- 7 — KENNEY, F. T. — *Science*, 156, 525 (1967).
- 8 — SEGAL, H. L. and KIM, Y. S. — *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 50, 912 (1963).
- 9 — ROSEN, F., HARDING, H. R., MILHOLLAND, R. J. and NICHOL, C. A. — *J. Biol. Chem.*, 238, 3725 (1963).

ESTUDOS SÓBRE REGULAÇÃO METABÓLICA. CONTRÔLE DE SÍNTESE DE PROTEÍNA

III — Efeito de inibidores de síntese de proteína sôbre a indução da enzima tirosina alfa-ceto-glutarato transaminase em fígado de camundongo.

III — Effect of inhibitors of protein synthesis on the induction and repression of tyrosine alpha-keto-glutarate transaminase.

MAURO C. FARIA, F. G. MELLO, P. PREZA, H. C. FARIA

Laboratório de Bioquímica do Serviço de Pesquisa e Experimentação do Instituto Nacional de Câncer — Rio de Janeiro — GB

Numerosas enzimas adaptativas, quando induzidas, sofrem processo de repressão característico. Assim acontece com a tirosina transaminase (TT) que, induzida no fígado por injeção de cortisona, após atingir nível elevado sofre um fenômeno de "repressão". Este fato seria devido à formação de um repressor específico bloqueador de sua síntese (1), ou então a um aumento de seu processo degradativo (2), o que já foi discutido em em trabalho anterior.

Inibidores de síntese de proteína a nível de ribossoma como a DL Etionina e Actidione (3) bloqueiam o aumento da atividade de tirosina alfa-ceto glutarato transaminase no fígado de camundongo que recebeu cortisona como o indutor da enzima. Os referidos inibidores não bloqueiam a formação do m-RNA específico da enzima.

O presente trabalho tem por finalidade tentar demonstrar que o efeito repressivo sôbre a citada enzima está intimamente ligado ao aumento da sua atividade.

Foi por nosso Laboratório verificado que camundongos recebendo simultaneamente uma única dose de corticóide e etionina apresentam atraso de 6 horas no aparecimento da atividade máxima da enzima (e também da repressão) em relação aos animais contrôles que apenas foram tratados com corticóides. (Fig. 1)

Administrando-se 2 doses do inibidor (à 0 hora e às 3 horas) consegue-se defasar de 12 hs o início do aparecimento da enzima, sendo o ponto máximo da atividade enzimática às 18 hs, verificando-se daí por diante o fenômeno de "repressão". (Fig. 1)

Outros inibidores de síntese de proteína a nível de ribossoma como o Actidione (Ciclohexamida) demonstram ter efeito semelhante a DL Etionina.

A comparação das curvas de indução de TT obtidas em camundongos injetados com cortisona e mais inibidor de síntese de proteína ao nível de ribossoma (etionina) sugerem a hipótese de que, cessado o efeito do inibidor (por injeção de metionina ou por sua metabolização), o m-RNA induzido por cortisona, até então inativo, passa a funcionar traduzindo-se como proteína Tirosina transaminase.

O mecanismo de "repressão" da referida enzima parece ser dependente do aumento da atividade enzimática não tendo relação direta com o indutor (cortisona) ou com o m-RNA formador da enzima.

Também sugerem os nossos dados a possibilidade de ser a vida-média do m-RNA formador de tirosina transaminase, em fígado de camundongo, bastante longa (mais de 18hs), ou ainda, que o m-RNA, não tendo funcionado como modelo na síntese protéica (bloqueada pela etionina), não se destrua, ficando por longo tempo ativo no citoplasma.

ESTUDOS SÔBRE REGULAÇÃO METABÓLICA. CONTRÔLE DE SÍNTESE DE PROTEÍNA

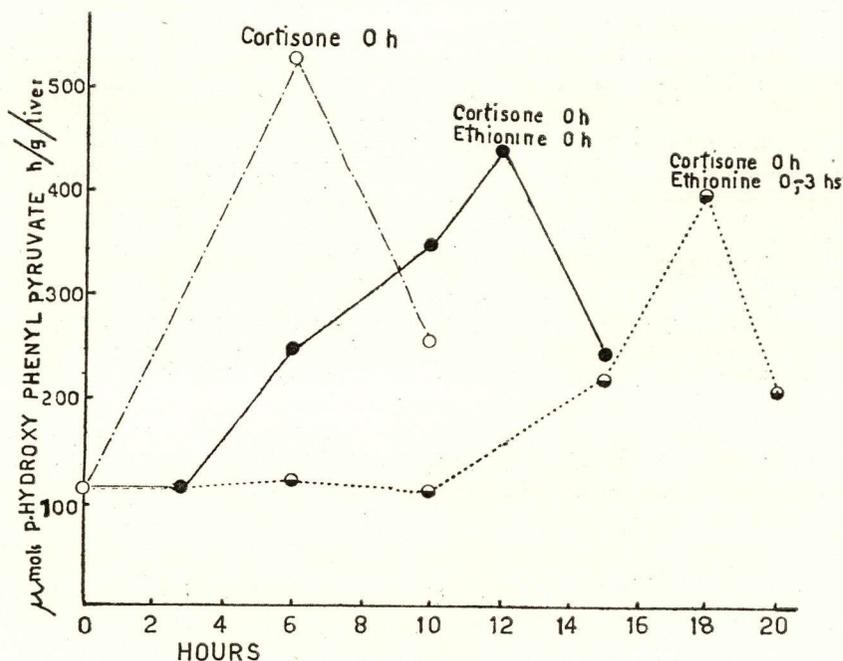


Figura 1 — Efeito de etionina sôbre a indução de tirosina transaminase por cortisona.

Solu-Cortef (1 mg/20 g de pêso) foi injetado intraperitoneal a zero hora em um grupo de camundongos C57 BL com 20 g de pêso. Os animais foram mortos em intervalos de 3 a 4 horas. Alguns receberam etionina (20 mg/20 g de pêso) a zero hora conjuntamente com cortisona (linha cheia); outros receberam 2 doses de etionina a zero hora e 3 horas (linha pontilhada). Os restantes receberam apenas cortisona.

Cada ponto representa a média da atividade de tirosina transaminase (micro mols de ácido para-hidroxi-fenil piruvico por hora e grama de fígado) em fígado de no mínimo 4 camundongos.

Tirosina Transaminase foi dosada pelo método de Rosen et al. (4)

Figure 1 — Effect of ethionine on the induction of tyrosine alpha-keto-glutarate Transaminase by cortisone.

Solu-Cortef (1 mg/20 g of body weight) was injected intraperitoneally at zero hour in a group of C57 BL mice weighting about 20 g. Animals were killed at intervals of 3 or 4 hours. Some received ethionine (20 mg/20 g body weight) together with cortisone at 0 hr (Solid Line); others received two doses of ethionine at 0 hr and 3 hr (dotted line).

The broken-dotted line represents the control cortisone treated animals.

Each point indicates the average of Tyrosine Transaminase activities (micro mols of p-hydroxy phenyl pyruvate/h/g liver) in livers of at least 4 mice.

Tyrosine Transaminase was assayed by the method of Rosen et al. (4).

ESTUDOS SOBRE REGULAÇÃO METABÓLICA. CONTRÔLE DE SÍNTESE DE PROTEÍNA**RESUMO**

É sugerido que bloqueadores de síntese de proteína ao nível de ribossoma (Etionina, Actidione) retardam o aumento da tirosina transaminase no fígado de camundongo quando injetada simultaneamente com cortisona.

Parece existir íntima relação entre o aumento de enzima (ou de sua atividade) e o mecanismo responsável pelo fenômeno de "repressão".

SUMMARY

Blokers of protein synthesis at ribosomal level (Ethyoinine, Actidione) are reported to delay the increase in tyrosine alphe-keto glutarate transaminase activity in mice livers when injected simultaneously with cortisone.

It is suggested a close relationship between the increase in the amount of the enzyme (or the enhancement of its activity) and the mechanism responsible for the "repression" phenomenon.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — GARREN, L. D., HOWELL, R. R., TOMKIS, G. M. and GROCCO, R. M. — Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 52, 1121 (1964).
- 2 — KENNEY, F. T. — Science, 156, 525 (1967).
- 3 — ENNIS, H. L. and LUBIN, M. — Science, 146, 1474 (1964).
- 4 — ROSEN, F., HARDING, H. R., MILHOLLAND, R. J. and NICHOL, C. A. — J. Biol. Chem., 238, 3725 (1963).

ESTUDOS SOBRE REGULAÇÃO METABÓLICA. CONTRÔLE DE SÍNTESE DE PROTEÍNA

IV — Ação da 5-Fluorouracil sobre a indução e repressão de tirosina alfa-ceto-glutarato transaminase em fígado de rato.

IV — Effect of 5-Fluoruracil on the induction an repression of Tyrosine alpha-keto-glutarate transaminase in rate liver.

MAURO C. FARIA, C. A. NEPOMUCENO, P. PREZA, F. G. MELLO e HUGO C. FARIA

Laboratório de Bioquímica do Serviço de Pesquisa e Experimentação do Instituto Nacional de Câncer — Rio de Janeiro — GB

A ação do 5-Fluorouracil (5-FU) sobre a síntese de ácido desoxirribonucleico tem sido objeto de numerosas publicações (1), (2), (3), (4), etc. A sua atividade sobre a síntese de ácido ribonucleico é pequena, só se fazendo sentir em doses elevadas (1), (3), (4), (5). No sistema de síntese de proteína foi visto que o poli-Fluorouracil não difere sensivelmente do poli-uracil na incorporação de fenil alanina em proteína (6).

Os trabalhos de Horowitz (7) e Willen (8) vieram esclarecer que certos sistemas enzimáticos não eram sensíveis ao 5-FU.

Estudando a indução de T.T. (Tirosina Transaminase) em fígado de rato, Garren et al (9) verificaram o chamado "efeito paradoxal" do 5-FU, isto é, que o referido citostático evitava a queda natural da enzima T.T., previamente induzida por cortizona.

Nosso Laboratório, trabalhando com pequenas doses de 5-FU (4mg/100g de animal), verificou que o 5-FU (Fig. I), administrado a ratos juntamente com cortizona, não impede a indução da enzima T.T. no fígado, e, se repetido a cada 3 hs, evita a queda da enzima depois de induzida pelo corticóide.

Estes achados parecem demonstrar uma possível diferença de sensibilidade de 2 sistemas biológicos, indução e degradação (esta última demonstrada recentemente por Kenney) (10), à ação de um mesmo citostático. O 5-FU não impedindo a síntese da enzima T.T. evitaria contudo a sua degradação normal, isto é, bloquearia a síntese do degradador específico da enzima.

Se o 5-FU tem efeito preferencial sobre a inibição do sistema que degrada a enzima T.T., pode ser previsto teoricamente que o referido citostático, por si só, deveria aumentar a atividade da enzima no fígado, sem ser necessária a ação de cortizona. Sua ação seria aumentar a vida média da enzima, por evitar a produção do degradador específico.

A (fig. 2), confirmando nossas previsões, mostra que ratos adrenalectomizados recebendo 5-FU (4mg/100g de peso) a cada 3 hs, durante 9 horas, apresentam nítido aumento de T.T. 6, 8 e 10 hs após o início da experiência.

Se verdadeira a hipótese acima, fica evidenciado que o nível basal normal da enzima no fígado poderia ser controlado pelo seu "degradador" específico, variando a vida média as moléculas enzimáticas. O 5-FU evitaria a ação do sistema degradador.

O efeito da glicose e produtos que bloqueiam a síntese de glicogênio, assim como verificação imunológica da indução de T.T. juntamente com o efeito da 5-FU, estão sendo objeto de estudo como complemento do presente trabalho.

ESTUDOS SÔBRE REGULAÇÃO METABÓLICA. CONTRÔLE DE SÍNTESE DE PROTEÍNA

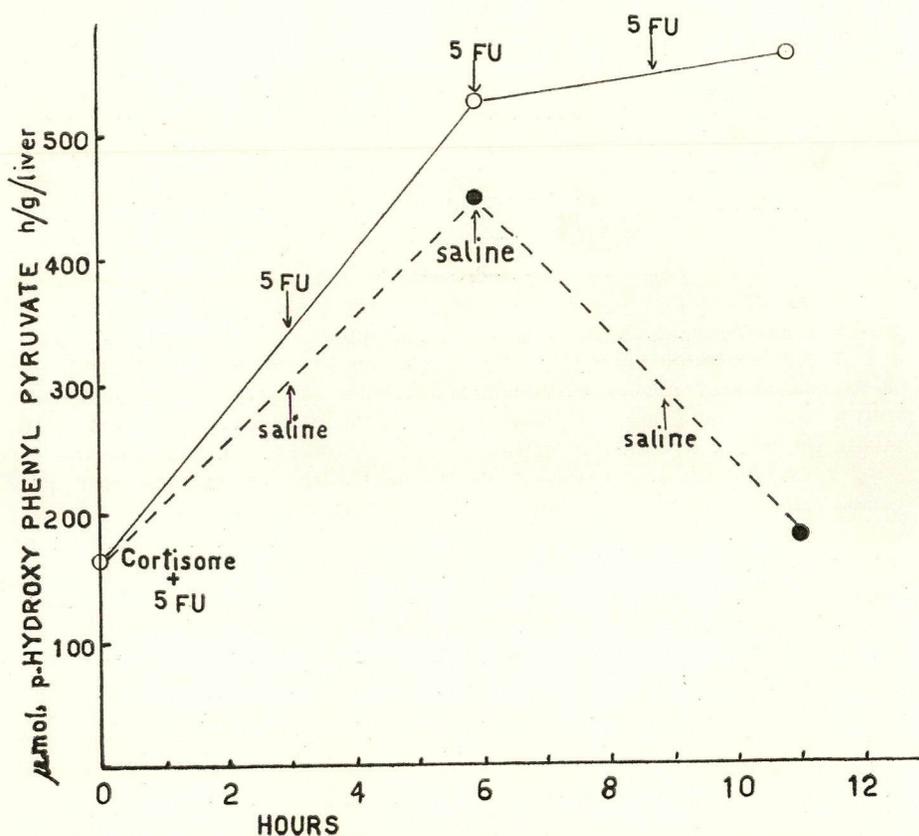


Figura 1 — Efeito do 5-fluorouracil na indução da tirosina alfa-ceto-glutarato transaminase pela cortisona.

Ratos U machcs, adrenalectomizados pesando cerca de 150 g foram em jejum durante 24 horas antes da experiência. No tempo zero injetou-se cortisona intraperitonealmente em todos os animais (solu-cortef 5 mg/100 g). Os animais foram divididos em 2 grupos; o 1.º grupo recebeu injeções de salina a 0, 3, 6 e 9 horas (linha tracejada). O outro grupo recebeu tratamento de 5-fluorouracil (4 mg/100 g) intraperitonealmente a 0, 3, 6 e 9 horas (linha cheia). Cada ponto representa a medida da atividade da tirosina transaminase de pelo menos 4 fígados. Tirosina transaminase foi dosada de acordo com Rosen et al. (11).

Figure 1 — Effect of 5-fluorouracil on the induction of tyrosine alpha-keto-glutarate transaminase by cortisone.

Male adrenalectomized U rats weighting about 150 g were fasted for 24 hours prior to the experiment. At zero time cortisone (solu-cortef — 5 mg/100 g) was administered intraperitoneally to all animals. Animals were, then, divided in two groups. First group received intraperitoneal injection of saline at 0 h, 3 hrs, 6 hrs and 9 hrs (broken line). The other group was treated with 5-fluorouracil (4 mg/100 g — intraperitoneally) at 0 h, 3 hrs, 6 hrs and 9 hrs (solid line). Each point is the average of tyrosine transaminase activities of at least four livers. Tyrosine transaminase was assayed according to the method of Rosen et al. (11).

ESTUDOS SOBRE REGULAÇÃO METABÓLICA. CONTRÔLE DE SÍNTESE DE PROTEÍNA

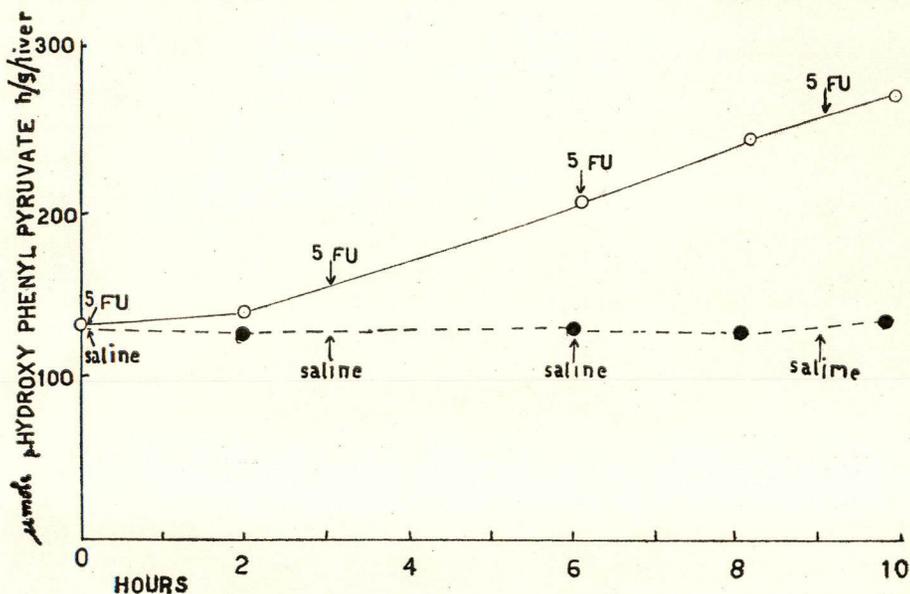


Figura 2 — "Indução" de tirosina transaminase por 5-fluorouracil.

As condições foram essencialmente as mesmas da fig. 1, exceto que os ratos não foram tratados com cortisona.

Figure 2 — "Induction" of tyrosine transaminase by 5-fluorouracil.

Conditions are essentially the same as in fig. 1, except that rats were not treated with cortisone.

RESUMO

Os autores sugerem que 5-fluoruracil não bloqueia a indução de tirosina transaminase por cortisona. Todavia é apresentada evidência de que este derivado de piridina age eletivamente no mecanismo de degradação, bloqueando-o.

SUMMARY

The authors suggest the possibility that 5-fluorouracil does not block the induction of the enzyme tyrosine alpha-keto glutarate transaminase by cortisone. However, they present some evidence that the enzyme's specific degradation mechanism is electively blocked by this fluorinated pyrimidine.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — BOSH, L., HARBERS, E. and HEIDELBERG, C. — *Cancer Res.*, 18, 335 (1958).
- 2 — COHEN, S. S., FLAKS, J. G., BARNER, H. D., LOEB, M. R. and LICHTENSTEIN, J. — *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 44, 1004 (1958).
- 3 — DANNEBERG, P. B., MONTAG, B. J. and HEIDELBERG, C. — *Cancer Res.*, 18, 329 (1958).
- 4 — HARBERS, E., CHAUDHURI, N. K. and HEIDELBERG, C. — *J. Biol. Chem.*, 234, 1255 (1959).
- 5 — ACKERMANN, W. W. — *Bacteriol. Rev.*, 22, 71 (1958).
- 6 — LENGYEL, P., SPEGER, J. F. and OCHOA, S. — *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 47, 1936 (1961).
- 7 — HOROWITZ, J. and KOHLMEIER, V. — *Bioch. Biophys. Acta*, 142, 208 (1967).
- 8 — WILLEN, R. and STENRAM, U. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 119, 501 (1967).
- 9 — GARREN, L. D., HOWELL, R. R., TOMKINS, G. M. and GROCCO, R. M. — *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 52, 1121 (1964).
- 10 — KENNEY, F. T. — *Science*, 156, 525 (1967).
- 11 — ROSEN, F., HARDING, H. R., MILHOLLAND, R. J. and NICHOL, C. A. — *J. Biol. Chem.*, 238, 3725 (1963).