

INSTITUTO DE QUÍMICA

GERAÇÃO DE OXIGÊNIO SINGLETE DURANTE
A OXIDAÇÃO DE ÁCIDO FÓLICO
CATALISADA POR PEROXIDASES

LUCIA HELENA INNOCENTINI MEI
TESE DE MESTRADO

Orientador: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero

-DEZEMBRO-

1981

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais, Antonio e
Alayde por permitirem uma
existência cheia de cora-
gem e fé.

Ao meu amigo, esposo e
conselheiro Paulo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Nelson Durán pelo contínuo apoio e dedicação na orientação deste trabalho.

Ao Prof. Giuseppe Cilento, da USP, pela cessão dos equipamentos para medidas de fotoemissão.

À Prof^a Sonia M. de Toledo pela colaboração nos estudos de detecção de peróxido de hidrogênio.

Aos Profs. Hiroshi Aoyama e Neuza M. Barbosa, do Departamento de Bioquímica da UNICAMP, pelas facilidades oferecidas para o uso dos seus equipamentos para medidas de fotoemissão.

Aos meus colegas de equipe, pelo apoio e colaboração recebidos na realização deste trabalho.

Finalmente desejo agradecer o apoio financeiro recebido pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia - CNPq.

Í N D I C E

Pág.

RESUMO

ABSTRACT

ABREVIACÕES UTILIZADAS

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO	1
I.1 - GENERALIDADES	1
I.2 - METABOLISMO DO ÁCIDO FÓLICO	5
I.3 - ANORMALIDADES NO METABOLISMO DO ÁCIDO FÓLICO	6
I.4 - ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO	9
I.4.1 - Estudo da degradação do ácido fólico com HRP (horseradish peroxidase)	9
I.4.2 - Degradação do ácido fólico por enzima ex- traída de eritrócitos humanos (AF)	13
I.5 - RELAÇÃO ENTRE O METABOLISMO DO ÁCIDO FÓLICO E A BAIXA ATIVIDADE DA XANTINA OXIDASE EM PESSOAS CAN- CEROSAS	14
I.6 - OBJETIVOS DA TESE	20

CAPÍTULO II

MATERIAIS E MÉTODOS	22
II.1 - DROGAS UTILIZADAS E SUA PROCEDÊNCIA	22
II.1 - APARELHOS UTILIZADOS	24

	<u>Pág.</u>
II.3 - MÉTODOS	24
II.3.1 - Solução de ácido fólico	24
II.3.2 - Solução de catalase	25
II.3.3 - Solução de glutationala	25
II.3.4 - Solução de HRP-tipo VI	25
II.3.5 - Soluções tampão	25
II.3.6 - Solução de bilirrubina	25
II.3.7 - Aceptores antracênicos	26
II.3.8 - Solução de cisteína	26
II.3.9 - Reagente de Ellman	26
II.3.10- Detecção do grupo SH	26
II.3.11- Geração de peróxido de hidrogênio	26
II.3.12- Detecção de peróxido de hidrogênio	27
II.3.13- Detecção de amina diazotizável (ácido p-aminobenzoilglutâmico)	27
II.3.14- Obtenção da enzima extraída de eritrócitos	27
II.3.15- Teste para avaliar a concentração da enzima	29

CAPÍTULO III

APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	31
III.1 - DETECÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA REAÇÃO Glu/HRP/Mn ⁺⁺ /O ₂	32
III.1.1 - Influência do pH	32
III.1.2 - Consumo de oxigênio	32
III.1.3 - Geração e detecção do peróxido de hidrogênio	35

III.2 - DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO NO SISTEMA AFo/HRP/Glu/ Mn ⁺⁺ /O ₂	37
III.2.1 - Consumo de oxigênio	37
III.2.2 - Reconhecimento dos produtos de degrada- ção enzimática do ácido fólico	37
III.2.3 - Consumo de oxigênio em presença de Gli- cose/Glicose oxidase	40
III.2.4 - Consumo de oxigênio com SOD e benzoato.	40
III.2.5 - Consumo de oxigênio em meio deuterado .	44
III.3 - GERAÇÃO DE ESTADOS EXCITADOS NO SISTEMA AFo/HRP/ COFADORES	44
III.3.1 - Corantes xantênicos ou aceptores emis- sivos xantênicos	44
III.3.2 - Aceptores emissivos antracênicos	47
III.3.3 - Supressores de oxigênio singlete	47
III.3.4 - Supressores de outras espécies	50
III.4 - DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO NO SISTEMA AFo/AF/Glu/ Mn ⁺⁺ /O ₂	53
III.4.1 - Consumo do oxigênio	53
III.4.2 - Reconhecimento dos produtos obtidos ..	53
III.4.3 - Geração de espécies excitadas	56
III.5 - ESTUDO DA INATIVAÇÃO DA XANTINA OXIDASE	60

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	64
--------------------------------	----

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES	83
SUGESTÕES PARA CONTINUAÇÃO DESTE TRABALHO	86
REFERÊNCIAS	87

RESUMO

Uma enzima extraída do sangue humano metaboliza o ácido fólico para produzir o pterin-6-aldeído e o ácido p-aminobenzoil-glutâmico, quando o peróxido de hidrogênio está presente. Horseradish peroxidase também metaboliza o ácido fólico para produzir os mesmos produtos acima, quando a glutathione e íons Mn^{++} estão presentes. Neste caso, porém, o peróxido de hidrogênio mostrou ser prejudicial para a reação metabólica.

O estudo da fotoemissão que acompanha a degradação do ácido fólico por estas enzimas, evidenciou a presença de um produto no estado eletrônico excitado. A possibilidade de se formar algum produto no estado triplete excitado foi eliminada perante a ineficácia dos aceptores de energia antracênicos. Experiências utilizando supressores de oxigênio singlete (por ex.: bilirrubina), amplificadores de emissão para esta espécie (por ex.: 1,4 diazobicyclo(2.2.2)octano ou DABCO) e meio deuterado, para o estudo da reação de oxidação e de fotoemissão, sugerem fortemente que oxigênio singlete (1O_2 , $^1\Delta_g$) é o responsável pela emissão observada.

A bilirrubina impede inicialmente a fotoemissão dos sistemas enzimáticos por reagir com a espécie excitada e formar um presumível intermediário, o 1,2-dioxetano. Este cliva-se posteriormente produzindo fragmentos cetona no estado eletronicamente excitado, cuja emissão pode ser aumentada se o meio for suplementado com DBAS (9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato), um excelente acceptor de energia proveniente de cetonas tripletes.

ABSTRACT

An extracted protein from red blood cells catalyses the transformation of folic acid to produce pterin-6-aldehyde and p-aminobenzoylglutamic acid when hydrogen peroxide is present. Horseradish peroxidase catalyses folic acid as well to produce the same products when glutathione and Mn^{++} are present, but in this case hydrogen peroxide seems to be prejudicial to the reaction.

The photoemission that accompanies the metabolism of folic acid by both enzymes, evidences the formation of an intermediate in excited state. Studies of this metabolism with singlet oxygen quenchers as bilirubin; enhancers of singlet oxygen emission as 1,4-diazo-bicyclo(2.2.2)octane (DABCO); the system behaviour toward D_2O , as well as the unefficiency of the anthracenic acceptors on the photoemission, suggest that singlet oxygen is responsible by that emission. Bilirubin quenches the emission from the enzymatic system initially by reacting with singlet oxygen to produce presumably a 1,2-dioxetane intermediate, which cleaves to ketone fragments in excited states as proved by the enhanced emission with DBAS, an excellent triplet ketone counter.

ABREVIACES UTILIZADAS

<u>Abreviao</u>	<u>Nome</u>
AFo	cido fólico ou pteroilglutmico
AF	cido fólico peroxidase
AFc	cido fólico peroxidase extraída de portador de cncer
ATP	Adenosina trifosfato
AS	Antraceno-2-sulfonato
Bil.	Bilirrubina
Cat.	Catalase
DABCO	1,4-diazobiciclo (2,2,2) octano
DBAS	9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato
D ₂ O	gua deuterada
DPAS	9,10-difenilantraceno-2-sulfonato
EDTA	cido etilenodiaminatetractico
Glu	Glutaciona
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HRP	Horseradish peroxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
Pt-6-CHO	Pterin-6-aldeído
Pt-6-CH ₂ OH	6-hidroximetil pterin
Pt-6-COOH	Pterin-6-carboxílico
SOD	Superóxido dismutase

CAPÍTULO I

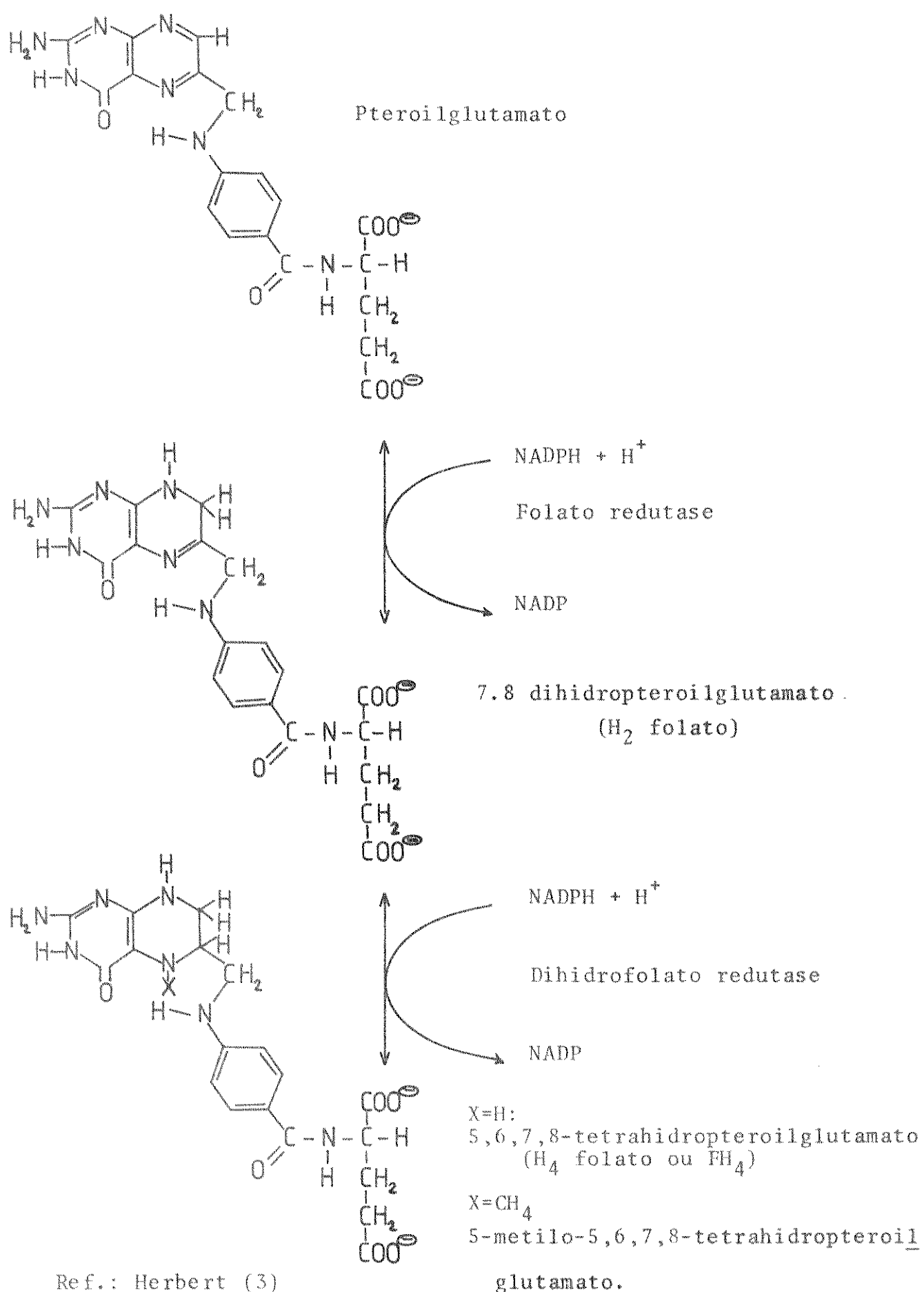
INTRODUÇÃO

Apesar do grande número de pesquisas realizadas sobre o ácido fólico, nenhuma delas foi, até o momento, capaz de elucidar um mecanismo pelo qual a degradação desta vitamina ocorra, principalmente em pessoas portadoras de qualquer tipo de câncer. Pterin-6-aldeído, um metabólito do ácido fólico, atua como um potente inibidor de xantina oxidase, cuja atividade apresenta-se baixa nestes pacientes. Acredita-se que deva haver alguma relação entre o metabolismo do ácido fólico e o comportamento da xantina oxidase, capaz de explicar essas anomalias observadas. Devido ao grande número de variáveis envolvidas neste estudo, torna-se importante introduzir alguns conceitos básicos e analisar algumas pesquisas já realizadas nesta área, a fim de melhor situar o problema.

I.1 - GENERALIDADES

O ácido fólico ou ácido pteroilglutâmico é uma vitamina do complexo B, hidrossolúvel. Os folatos compreendem uma pterina, um ácido p-amino-benzóico e um ácido glutâmico (Fig. I.1, pag.2). Suas porções poliglutâmicas são hidrossolúveis dentro do organismo, nas formas simples de mono e diglutamatos, graças a duas enzimas denominadas conjugases. No organismo os folatos existem na forma de coenzimas e cada uma delas exercem reações enzimáticas específicas [1].

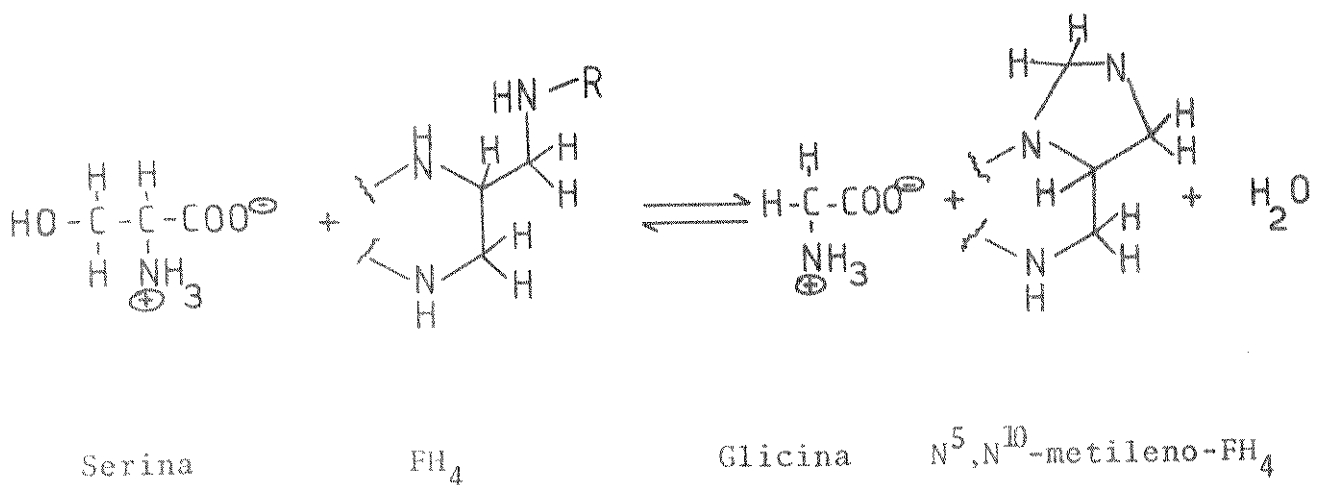
As reações metabólicas de base, dentro das quais os folatos ocupam um papel importante, compreendem: a formação de bases púricas e pirimídicas, a interconversão de serina em glicina



Ref.: Herbert (3)

Fig. I.1 - Fórmulas estruturais do folato e principais derivados.

(reação 1.1), a degradação da histidina em ácido glutâmico e a conversão da homocisteína em metionina. Esta última ocorre devido ao metiltetrahydrofolato, à vitamina B₁₂ e a uma enzima; a homocisteína transferase. A formação da metionina é de grande importância no sistema nervoso central, sendo o principal agente das metilações do organismo, principalmente a da colina e a da adrenalina. Enfim, a principal reação metabólica é a conversão de uracila em timina, um processo que se destaca dentro da formação do DNA [2].



(reação 1.1)

Os folatos são encontrados nos legumes de folhas verdes (espinafre, brócoli, aspargos, etc), em frutas (laranjas, abacates, abacaxis, etc), no fígado e nas leveduras. Existem, entretanto, alguns derivados de ácido fólico encontrados nas plantas, cujas composições químicas são os pteroilglutamatos, os quais não participam de reações enzimáticas dentro das células dos mamíferos e nem atravessam as membranas celulares. A forma monoglutamato é encontrada no soro sanguíneo e na urina. A forma ativa principal da coenzima que é encontrada dentro dos tecidos e no sangue do homem é o 5-metiltetrahydrofolato (Fig. 1.1) o qual é requerido para uma grande variedade de transferências de um carbono [2].

Dentro do papel importante que o ácido fólico ocupa no crescimento e na divisão celular, está a sua participação na sín-

tese do DNA, onde atua na construção das unidades de purina, pirimidina e timina. Não é surpreendente constatar que uma interferência da divisão celular seja um dos primeiros sinais que acompanham a deficiência em ácido fólico. A administração de uma dieta deficiente em folato conduz a uma anemia macrocitária (abaixamento do teor normal de hemoglobina no sangue) e a uma leucopenia (diminuição dos glóbulos brancos no sangue), com aparecimento de megaloblastos.

A absorção dos folatos, sob a forma de pteroilglutamato, ocorre na primeira etapa do intestino grosso, onde se dá o mecanismo de desconjugação. Este processo permite o desligamento de resíduos glutâmicos ligados à parte benzóica da molécula, para dar origem aos compostos do tipo mono, di e triglutamatos, sendo a enzima γ -glutamil-carboxi-peptidase a responsável por esse evento. Os folatos poliglutamatos atravessam a parede intestinal e em seguida são reduzidos e metilados no fígado. Uma parte substancial dos folatos monoglutamatos são reduzidos e metilados no interior das células intestinais e aparecem dentro da circulação sanguínea sob a forma coenzimática ativa; 5-metiltetrahydrofolato.

A quantidade mínima de ácido fólico necessária ao organismo não foi ainda detectada com precisão, no entanto é recomendado uma ingestão diária de 200 μg de folato livre para adultos, 50 μg para bebês, 100 μg para crianças, 400 μg durante a gestação e 300 μg durante a lactação.

Quando um homem normal recebe uma dose de 1 $\mu\text{g}/(\text{kg de peso})$ de ácido fólico marcado com trítio, 60% é retirado da circulação sanguínea em fração de segundos, e em três minutos 95% desaparece, sugerindo que há uma grande afinidade dos tecidos para as quantidades fisiológicas administradas. Menos que 2% de ácido fólico é excretado na urina em 3 horas. No entanto, para doses superiores ao padrão fisiológico, é possível detectar 60% num período de 12 horas, pois neste caso já foi atingida a saturação.

Apesar de muitos estudos realizados nesta linha, não se sabe com certeza se o ácido fólico é degradado enzimaticamente no homem normal, embora se assuma que isto possa ocorrer de algum modo. Uma vez que a desconjugação oxidativa não enzimática de folato reduzido ocorra in vitro, produzindo pterin e ácido p-aminobenzoilglutâmico, a degradação do folato, evidenciada na urina humana normal, pode resultar provavelmente de uma reação in situ. Não há evidências convincentes para a degradação de folato em animais. Da quantidade de folato marcado que aparece na urina após uma hora da ingestão de 1,5 µg/kg do peso do corpo, aproximadamente três quartos é degradada oxidativamente, a maioria remanescente permanece em várias formas reduzidas e apenas 3% continua na forma de ácido fólico [3]. No entanto, trabalhos mais recentes têm demonstrado que a degradação de ácido fólico é possível de ocorrer sob determinadas condições, das quais trataremos a seguir.

I.2 - METABOLISMO DO ÁCIDO FÓLICO

Webb [4], em 1955, já havia realizado uma pesquisa sobre a inibição do crescimento de culturas de Escherichia coli e de Aerobacteria aerogenes, quando análogos do ácido fólico estavam presente. Experiências com bactérias Candida tropicalis demonstraram que essa inibição era reversível, provocando o aparecimento de uma pterina livre no meio de cultura. A purificação posterior deste meio e, a análise dos produtos, demonstraram a formação de ácido p-aminobenzoilglutâmico e uma mistura de pterinas livres, principalmente pterin-6-carboxilato e 6-hidroximetil pterin. A hipótese de que a clivagem dos derivados de folato ocorreria entre C₉-N₁₀, surgiu do fato de que nem ácido p-aminobenzóico, nem ácido L-glutâmico, apareceram entre os produtos da inativação, antes de uma hidrólise ácida.

Em 1957, Futterman e Silverman [5] trabalhando com extrato de fígado de rato, observaram que o ácido fólico era inativa do no meio. Segundo eles, o ácido fólico é convertido enzimaticamente em um derivado tetrahydro reduzido (acredita-se que seja sua forma coenzimática ativa), o qual cliva não enzimaticamente nas posições 9 e 10 quando exposto ao ar. A análise revelou que o ácido p-aminobenzoilglutâmico foi formado em quantidades estequiométricas.

Dinning e col. [6], também em 1957, desenvolveram uma pesquisa na qual o ácido fólico foi convertido em uma amina diazotizável (ácido p-aminobenzoilglutâmico). Seu trabalho foi baseado na incubação do ácido fólico com fatias de fígado de coelho, o qual mostrou maior eficiência nas experiências realizadas. Acompanhando a formação de amina diazotizável, pelo teste de Bratton-Marshall [7], eles puderam acumular mais uma evidência para o metabolismo de folato, o qual não é esperado ocorrer a um nível detectável em tecidos normais do organismo.

Atualmente estas experiências encabeçam uma lista de pesquisas, que vêm sendo desenvolvidas na tentativa de explicar a causa da degradação de folato no homem, principalmente se ele é um portador de doenças malignas.

I.3 - ANORMALIDADES NO METABOLISMO DO ÁCIDO FÓLICO

Seguindo a observação de que células malignas em cultura, exceto células adultas normais ou embrionárias, excretam em seu meio de crescimento um composto azul fluorescente, com Rf característico de 0.35-0.45 na cromatografia de papel, Stea e col. [8] fizeram em 1978 uma investigação para tentar identificar este catabólito fluorescente.

Quando eles adicionaram ácido fólico 2-C¹⁴ em um meio

de crescimento com células malignas, foi notado um pico de radioatividade, o qual emigrou juntamente com a substância azul fluorescente desconhecida. A emissão desta banda azul fluorescente e da radioatividade foi notada quando esta mesma experiência foi desenvolvida em meio de cultura de células normais. Usando espectroscopia UV, fluorescência, eletroforese, cromatografia de papel, cromatografia de camada fina e cromatografia gasosa junto com espectrometria de massa, eles analisaram e identificaram este catabólito desconhecido do folato como 6-hidroximetilpterin (Tab.Ia). Entretanto, quando o pterin-6-carboxaldeído, um intermediário possível na clivagem do folato, foi adicionado ao meio de crescimento de células malignas, ele foi reduzido subsequentemente a 6-hidroximetilpterin. De acordo com Stea e col. [8], estes resultados podem ser indicativos de um possível catabolismo de ácido fólico pelas células malignas. Ácido fólico ou outro derivado do folato é clivado oxidativamente na ligação C₉-N₁₀, para produzir pterin-6-carboxaldeído como um dos produtos. Este derivado é posteriormente reduzido pelas células cancerosas a 6-hidroximetilpterin, o qual é então excretado no meio de crescimento. A atividade de uma enzima capaz de reduzir pterin-6-carboxaldeído a 6-hidroximetilpterin foi medida no sobrenadante de extrato de células, sendo esta enzima dependente da NADPH como cofator. Quando extraída do meio de células malignas, esta enzima apresentou uma atividade 2,5 vezes maior. Embora células normais possuem um nível considerável desta redutase, elas não demonstraram utilizá-la nesta conversão, quando pterin-6-carboxaldeído foi adicionado de fontes exógenas. Deste modo, a redução do pterin-6-carboxaldeído para 6-hidroximetilpterin parece ser uma característica particular de células malignas em cultura. Usando o método da cromatografia líquida de alta pressão, eles analisaram a urina de um paciente portador de carcinoma de ovário. Segundo as observações, pterin-6-carboxaldeído e 6-hidroximetilpterin foram encontrados.

Tabela Ia - Cromatografia de papel de pterins e material azul fluorescente, isolado do meio de crescimento de células cancerosas tipo KB

Composto	Rf			
	A	B	C	D
Pt-6-CH ₂ -OH	0.42	0.63	0.61	0.47
Material fluorescente de células cancerosas	0.42	0.63	0.61	0.47
Pt-6-CHO	0.28	0.52	0.50	0.52

Ref: Stea e col. |8|

Tabela Ib - Ação inibidora do Ácido Fólico e do Pterin-6-aldeído sobre xantina oxidase

Experiência realizada em tampão fosfato (0.2 M)	nmol de xantina oxidada nos primeiros 10 min, após adição da enzima	Porcentagem de oxidação em relação a amostra não inibida
Xantina(67 nmol/ml)	60,0	100
Xantina + Ácido Fólico (4 nmol/ml)	7,4	13
Xantina + Afo irradiado(2,3 nmol/ml)	3,3	5
Xantina+Pt-6-aldeído obtido por clivagem ácida (0.42 nmol/ml)	1,8	3

Ref: Kalckar e col. |20|

Finalmente, os autores sugeriram que estas duas substâncias poderiam ser os produtos do catabolismo ativo de folato pelas células cancerosas em crescimento in vivo e in vitro, embora existam referências, como a de nº 2 deste trabalho, sugerindo que isto também possa ocorrer em casos normais. Alguns resultados significativos podem ser vistos na Tab. Ib.

Esta pesquisa acima apresenta particular interesse, visto que foi aplicada com êxito em seres humanos. Contudo, seus resultados, acrescidos de outras evidências, não sugerem um modelo para o mecanismo de degradação do ácido fólico. Sabendo-se que o estudo deste mecanismo poderá fornecer informações valiosas, principalmente relativas às pesquisas de Stea e col. [8], tornou-se interessante investigar a degradação do folato a nível molecular e suas implicações em pessoas portadoras de câncer, de qualquer tipo e grau.

I.4 - ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO

Existem duas maneiras pelas quais este estudo pode ser desenvolvido. A primeira, envolve o uso de uma enzima existente in vivo, a qual, obtida sob determinado tratamento do sangue humano, é capaz de degradar o ácido fólico na presença de certos cofatores [18]. A segunda requer a escolha de uma enzima de outras fontes cuja função seja também de degradar o ácido fólico, fornecendo os mesmos derivados. Tendo assim dois procedimentos disponíveis, torna-se indispensável estudá-los paralelamente e observar o comportamento do mecanismo nestes dois processos.

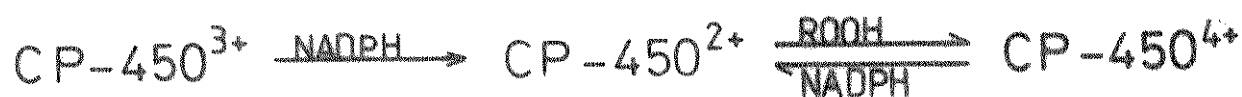
I.4.1 - Estudo da degradação do ácido fólico com HRP (horseradish peroxidase)

Gillette e col. [9] mostraram que os microsossomos he

páticos catalisam a C-oxidação de várias N-alquilaminas por hidroperóxidos orgânicos.

Strobel e col. [10], apresentaram evidências de que tal oxidação era dependente da presença de pirimidina nucleotídeo reduzido e oxigênio molecular. Observaram também que o citocromo P-450 (CP-450), a NADPH citocromo C redutase e possivelmente um componente fosfolipídico estariam envolvidos na catálise.

Hrycay e O'Brien [11] em 1973, trabalhando com CP-450 demonstraram que este poderia funcionar como uma peroxidase microsomal, catalisando a redução do hidroperóxido de ácido linoleico, do hidroperóxido de cumeno e de certos hidroperóxidos esteróides para os álcoois correspondentes, quando um doador de elétrons, o NADPH citocromo C redutase, estivesse presente.



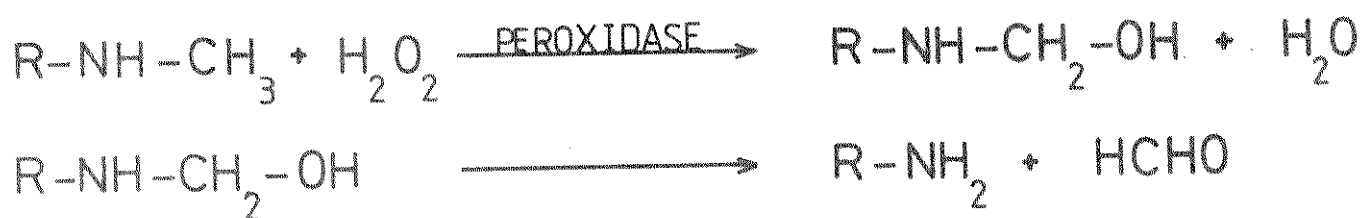
(reação 1.2)

Continuando esta pesquisa, Kadlubar e col. [12] foram os primeiros a demonstrar que a remoção da NADPH citocromo C redutase ou dos fosfolipídeos dos microsossomos não afetava a atividade da peroxidase do CP-450 na catálise da C-oxidação, hidroperóxido-dependente, de vários substratos amins em uma reação que não requer piridina nucleotídeo reduzido ou oxigênio molecular.

O primeiro trabalho desta linha, utilizando enzimas modelo, foi feito por Gillette e col. [13]. Baseando-se no fato de que o principal metabolismo de drogas é a desalquilação oxidativa de N-alquilaminas, para produzir uma amina primária e um aldeído, eles desenvolveram um trabalho com três hemeproteínas (Methemoglobina, Citocromo C e HRP), as quais foram incubadas com monometil-4-amino antipirina, N-metilanilina e seu congênere dimetil. Foi constatado que a desmetilação ocorreu pela medida da quanti-

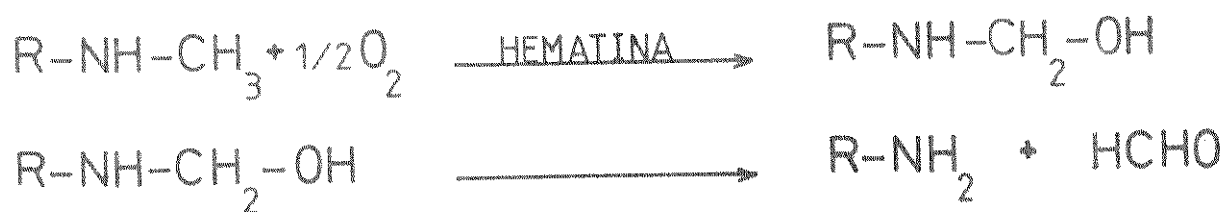
dade de formaldeído nos três sistemas. Como a reação só ocorreu na presença de H_2O_2 , gerado por glicose e glicose oxidase, eles concluíram que as enzimas empregadas funcionaram como peroxidases. Utilizando hematina (parte que engloba o grupo heme protoporfirina), a altas concentrações, eles observaram a desalquilação destas aminas em ambiente aeróbico e na ausência de H_2O_2 . Como nenhuma atividade foi observada anaerobicamente, concluíram que a hematina a altas concentrações atuava como uma oxidase. Assim, para descrever o comportamento dessas proteínas promovendo desalquilação, propuseram dois tipos de reações para sistemas enzimáticos contendo ferro:

(1) Reação tipo peroxidase



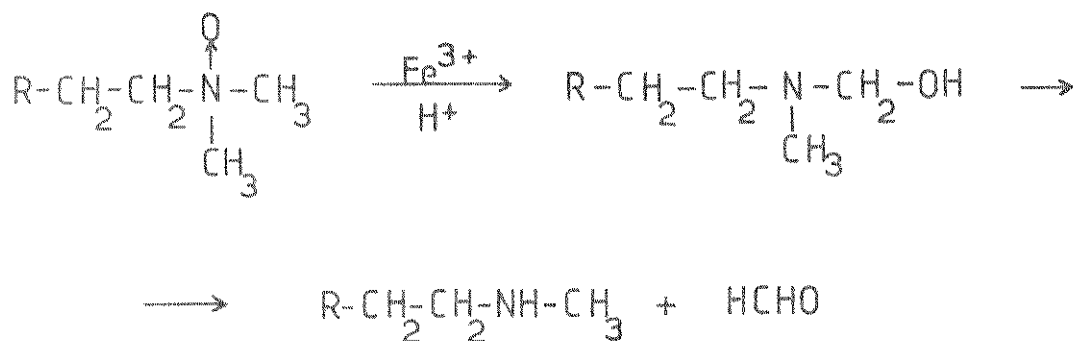
(reação 1.3)

(2) Reação tipo oxidase



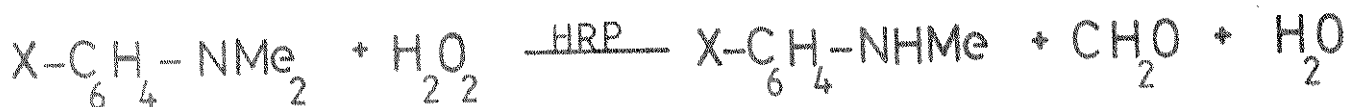
(reação 1.4)

onde os produtos obtidos são os mesmos. Eles propuseram também a existência de um intermediário hidroximetil, que aparece nas desalquilações de N-metilaminas, semelhantes ao encontrado por Fish [14], que estabeleceu a seguinte reação de N-desmetilação:



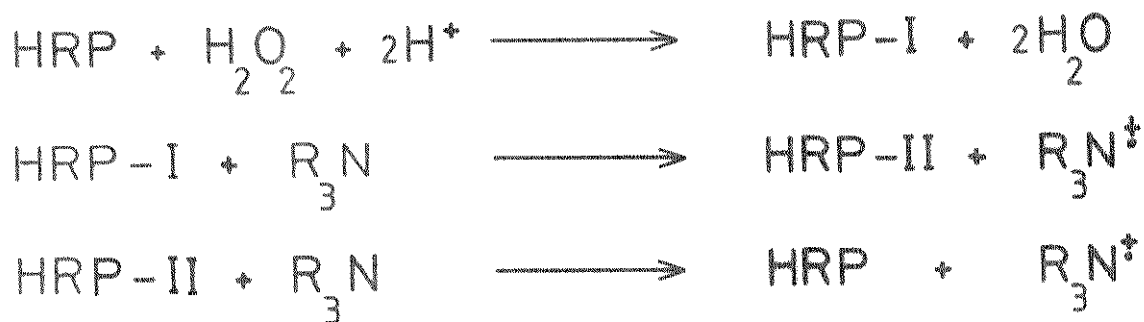
(reação 1.5)

Um outro trabalho nesta linha foi feito por Galliani e Rindone [15]. Eles pesquisaram a intervenção do oxigênio na N-desmetilação de quinze aminas terciárias aromáticas, utilizando peróxido de hidrogênio e HRP como enzima catalisadora. Os resultados obtidos podem ser resumidos na seguinte reação:



(reação 1.6)

a qual forneceu como produtos a amina secundária correspondente e um aldeído. Uma série de observações levaram os autores a sugerir uma reação radical, que seria iniciada pela ativação da enzima pelo peróxido de hidrogênio, de acordo com o esquematizado abaixo:



(reação 1.7)

A reação total mostra a restauração da enzima e a formação de radicais aminium, que podem reagir posteriormente com oxigênio para

formar peróxidos,



(reação 1.8)

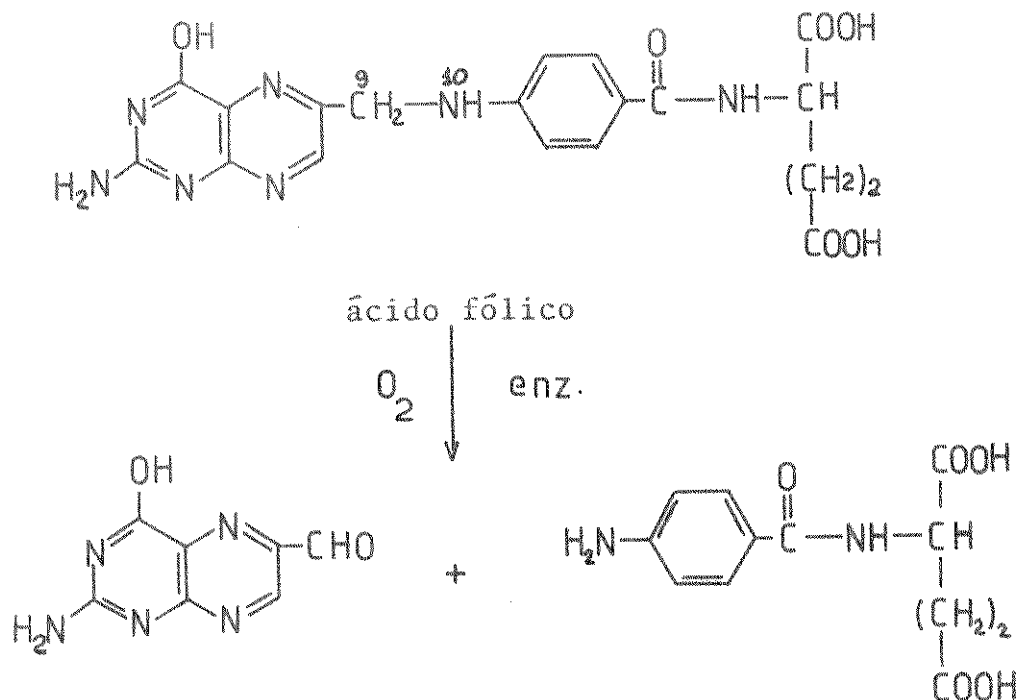
os quais são os substratos específicos para HRP.

A existência de um radical livre, como intermediário em reações de N-desmetilação com HRP e peróxido de hidrogênio, foi reforçada por Griffin [16]. Seu estudo foi baseado na N-desmetilação de aminopirina por HRP e peróxido de hidrogênio, na tentativa de substituir N-desmetilação catalisada por CP-450. A semelhança entre o espectro de EPR obtido para o sistema aminopirina/reagente de Fenton ($Fe^{++}/H_2O_2/0.1\ N\ HCl$), o qual gera um radical livre de aminopirina, e o espectro do radical-cátion, obtido com oxidação anódica de aminopirina (envolvendo a transferência de um elétron, com o mesmo sinal de EPR), levaram Griffin [16] à conclusão de que esta mesma espécie era gerada no sistema modelo. Resultados semelhantes foram obtidos por Durán e Faljoni [17] para o sistema N-nitrosamina/HRP, na ausência de peróxido de hidrogênio, gerando compostos aldeídicos, cetônicos e aminas.

Finalmente com base em todos os resultados apresentados acima, principalmente os de Griffin [16] e os de Durán e Faljoni [17], pensou-se na possibilidade de obter resultados similares com o sistema modelo AFo/HRP, na tentativa de estudar a degradação de ácido fólico e propor um modelo para este mecanismo.

I.4.2. Degradação do ácido fólico por enzima extraída de eritrócitos humanos (AF).

Existe uma enzima extraída de eritrócitos de pessoas normais capaz de promover, sob determinadas condições de pH fisiológico [18], a seguinte reação:



pterin-6-aldeído

ácido p-aminobenzoilglutâmico

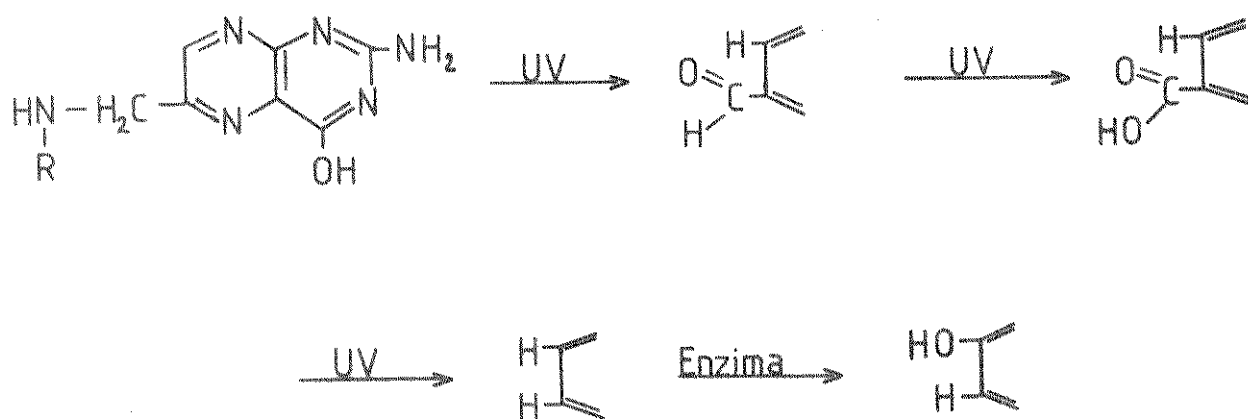
(reação 1.9)

Nesta oxidação são formados o ácido p-aminobenzoilglutâmico (amina diazotizável) e pterin-6-aldeído, os quais podem ser identificados por cromatografia de papel. A experiência evidenciou que esta enzima possui atividade máxima em pH=5,5, na presença de três cofatores; ATP, Mn^{++} , e Glutathiona, os quais são essenciais, segundo Braganca e col. [18]. Apesar de não ter sido possível identificar a natureza das etapas intermediárias envolvidas na degradação do folato, este trabalho permitiu observar que esta enzima também existe nos tecidos humanos, e é ativa para degradar o ácido fólico, mesmo na ausência de HCl, produzindo como derivado o pterin-6-aldeído. Este é um dos mais potentes inibidores da enzima xantina oxidase, de acordo com pesquisas que serão apresentadas a seguir.

I.5 - RELAÇÃO ENTRE O METABOLISMO DO ÁCIDO FÓLICO E A BAIXA ATIVIDADE DA XANTINA OXIDASE EM PESSOAS CANCEROSAS

Um dos primeiros trabalhos nesta área foi realizado em

1949 por Lowry e col. [19]. Ao irradiar o ácido fólico com luz ultra violeta, em meio ligeiramente ácido, Lowry observou que o primeiro produto formado era o pterin-6-aldeído. Irradiação por tempo mais prolongado levou a formação dos derivados; ácido 6-carboxílico e pterin, que é o último produto da ação fotolítica, como se segue:



(reação 1.10)

Numa reação enzimática posterior, o pterin foi então oxidado a isoxantopterin, pela xantina oxidase, presente no meio de reação. Esta última etapa de oxidação, entretanto, mostrou ser fortemente inibida pelo primeiro produto fotolítico, o pterin-6-aldeído.

Kalckar e col. [20], também desenvolveram uma pesquisa sobre a inativação de xantina oxidase em presença deste aldeído, com base nos resultados de Lowry e col. [19] (Tabela Ib). Testando o efeito inibidor do pterin-6-aldeído, obtido na degradação ácida do folato, eles observaram que a atividade desta enzima foi reduzida a 40-50% na reação de conversão de xantina em ácido úrico. Irradiando uma solução diluída de pterin-6-aldeído, seu poder de inibição diminuiu consideravelmente. Do mesmo modo, incubação com zinco metálico, em solução ácida, produziu o mesmo efeito. Segundo eles, isso foi devido à redução do grupo aldeído livre, essencial para a ação inibidora desta substância. A incubação do pterin-6-aldeído com a xantina oxidase pareceu ser reversível com o tempo. Dados de espectroscopia de absorção na região ultra violeta de-

monstraram que isto é acompanhado pelo aparecimento de um grupo ácido. Estes dados podem ser vistos na tabela I c.

Dietrich e col. |21| pesquisaram a atividade de xantina oxidase in vivo e in vitro, na presença do pterin-6-aldeído. Seus experimentos in vitro demonstraram que a quantidade de ácido úrico formado foi inversamente proporcional à quantidade de pterin-6-aldeído presente no meio de reação, resultando em forte inibição quando 1 µg/ml desta substância foi adicionada, (Tab. Id). Testes in vivo com aves que receberam dieta deficiente em ácido fólico demonstraram que a atividade da xantina oxidase do fígado era aumentada.

Feigelson e col. |22| fizeram um trabalho sobre o nível celular da xantina oxidase em camundongos leucêmicos e normais. A capacidade diminuída de oxidação da xantina em linfócitos leucêmicos, em relação aos normais, está de acordo com outros trabalhos, onde tecidos malignos apresentam baixa atividade de xantina oxidase |23,24|.

Lewin e col. |25| também observaram que a atividade desta enzima é baixa durante carcinogênese de mama em camundongos (Fig. I.2). Eles observaram que ocorria uma diminuição gradual na atividade da xantina oxidase durante a mudança de tecidos normais para tecidos pré-cancerosos (e possivelmente cancerosos), que poderia servir como um diagnóstico em suspeitas de carcinogêneses.

Prajda e Weber |26|, analisando o comportamento de xantina oxidase em hepatomas simulados em búfalos e ratos, concluíram que a baixa atividade presente em todos os hepatomas representava uma diminuição na atividade desta enzima em tumores, quando foi analisada a quantidade da xantina metabolizada (ou ácido úrico formado), em condições normais e anormais (Tab. Ie). Segundo eles, a baixa atividade pareceu estar relacionada com as transformações neoplásticas que ocorrem no fígado, uma vez que a atividade

Tabela Ic - Efeito da incubação da xantina oxidase com Pt-6-CHO sobre a fluorescência e a inibição.

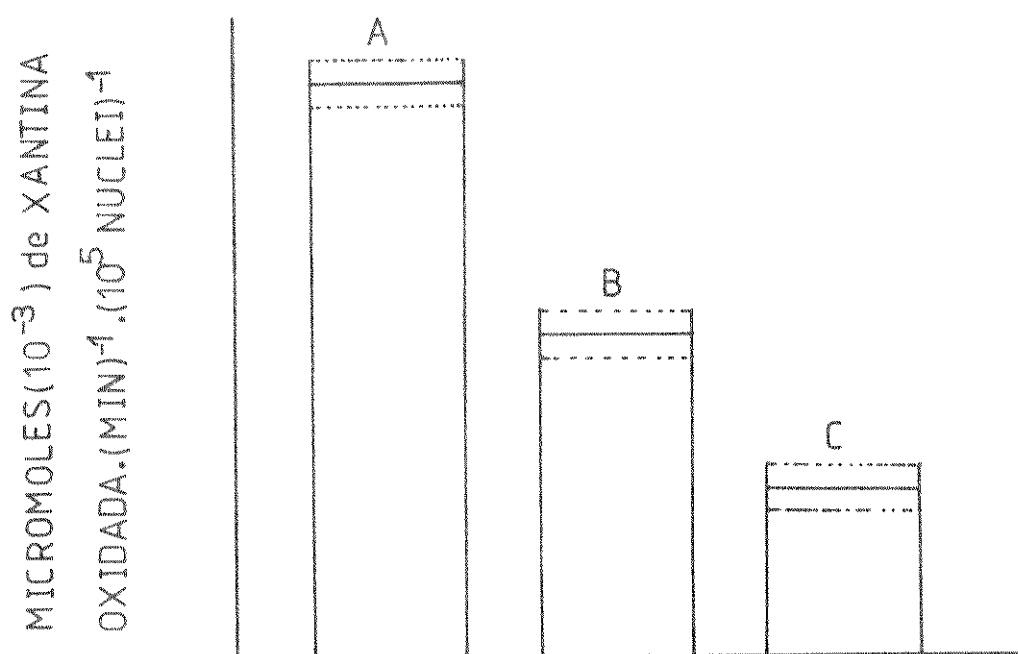
Incubação com enzima (minutos)	Leitura de fluorescência (na escala do galvanômetro)	Aumento na fluorescência (expresso em porcentagem)	Porcentagem de oxidação de xantina em relação à amostra não inibida
0	65	—	13
25	79	44	35
50	89	74	51
100	94	90	93

Ref: Kalckar e col. |20|

Tabela Id - Efeito in vitro do Pt-6-CHO sobre a atividade da xantina oxidase no fígado de galinha.

Quantidade de Pt-6-CHO adicionado em cada frasco	(Ácido úrico formado).h ⁻¹ .(g de fígado fresco) ⁻¹ , a 37°C
µg/ml no frasco	mg
0	1,3
0,4	0,6
1,0	0,04

Ref: Dietrich e col. |21|



Ref: Lewin e col. |25|

Fig. I.2 - Atividade de xantina oxidase durante carcinogênese em mama de camundongo.

A- Camundongos com tumores no início de crescimento.

B- Camundongos com tumores na fase intermediária do crescimento.

C- Camundongos com tumores bem desenvolvidos.

Tabela If - Inibição de xantina oxidase por derivados pterin e por catabólitos de folato, obtidos de células cancerosas.

Composto	Concentração do inibidor(μM)	Concentração do substrato Hipoxantina (μM)	% de inibição
Pt-6-CHO	0.032	14	85
Pt-6-CH ₂ OH	0.35	14	36
Composto isolado de células cancerosas	0.48	16	82

Ref: Stea e col. |8|.

Tabela I.e - Diminuição da atividade da xantina oxidase em hepatomas

Tecidos	Taxa de crescimento (meses)	(Atividade da xantina oxidase em $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot (\text{mg de proteína} \times 10^{-2})^{-1}$)
Fígado normal(Búfalo)		
Controle 9618 A		11.0 \pm 0.4
Controle 20		7.8 \pm 0.5
Controle 9618 B		7.0 \pm 0.3
Controle 16		7.0 \pm 0.2
Controle 47 B		10.8 \pm 0.7
Controle 28 A		8.2 \pm 0.3
Controle 8999		10.8 \pm 0.4
Controle 9633		10.1 \pm 0.6
Controle 7800		9.0 \pm 0.4
Fígado normal(ACI/N)		
Controle 3924 A		10.0 \pm 0.3
Controle 3683		10.9 \pm 0.4
HEPATOMAS		
9618 A	12.4	3.5 \pm 0.2
20	11.6	3.9 \pm 0.1
9618 B	10.8	1.1 \pm 0.1
16	8.3	0.7 \pm 0.1
47 C	7.1	2.3 \pm 0.1
28 A	6.8	3.9 \pm 0.1
8999	6.3	5.4 \pm 0.2
9633	5.2	5.9 \pm 0.2
7800	1.2	5.5 \pm 0.2
3924 A	0.9	1.0 \pm 0.1
3683	0.5	1.0 \pm 0.1

Ref: Prajda e Weber |26|.

de diminuiu independentemente do ritmo de crescimento do tumor ou da sua diferenciação histológica. Este comportamento da xantina oxidase, juntamente com outras cinco enzimas estudadas anteriormente por Weber [27], foi incluído numa lista que pode ser utilizada em diagnósticos bioquímicos de hepatomas, como sinal de transformações neoplásticas e indicativos de câncer de fígado. Os dados da Tab. I f exibem alguns dos resultados obtidos por Stea e col. [8], sobre a inibição da xantina oxidase na presença de pterin e de catabólitos do folato, originários de células cancerosas.

Parece portanto haver uma estreita correlação entre a degradação do ácido fólico in vivo, o qual pode gerar o pterin-6-aldeído e/ou 6-hidroximetilpterin, e a baixa atividade da xantina oxidase em pessoas portadoras de doenças malignas.

I.6 - OBJETIVOS DA TESE

Pelo que se viu anteriormente, a degradação do ácido fólico, para produzir o pterin-6-aldeído (que tem se mostrado um potente inibidor da enzima xantina oxidase), ocorre por um mecanismo ainda desconhecido. O motivo pelo qual este efeito é mais pronunciado em pessoas portadoras de doenças malignas, leva-nos a estudar detalhadamente o mecanismo através do qual esta reação se processa, e procurar explicar as alterações observadas em pessoas cancerosas. Pretende-se usar HRP e AF extraída de pacientes normais e de portadores de qualquer tipo de carcinogênese, para o estudo da cinética de consumo de oxigênio. As condições iniciais para a reação serão baseadas nos resultados de Braganca e col. [18]. Resultados obtidos anteriormente [28] indicaram que um dos papéis principais do HRP é o de catalisar a formação de produtos ou intermediários, no estado eletronicamente exci

tados, essencialmente não emissivos [29-31]. Com base nestes resultados e tendo escolhido a HRP como enzima modelo, torna-se útil também investigar a formação de alguma espécie excitada no nosso sistema, uma vez que a energia liberada no meio de reação poderá ser responsável pela inativação de xantina oxidase. Além disso, se há evidências de emissão de luz no sistema modelo, pode-se suspeitar do mesmo tipo de comportamento com a enzima de eritrócitos, AF.

O método mais comum para desenvolver esta etapa consiste na transferência de energia para aceptores emissivos. Estes, por interação a longa ou curta distância com a espécie excitada, são capazes de emitir a "luz gerada no escuro", que pode ser evidenciada pela emissão do sistema com relação ao tempo. Vários trabalhos foram publicados ilustrando a eficiência deste método e sua enorme utilidade na elucidação dos mecanismos até então desconhecidos [32-36].

Finalmente pretende-se estudar a variação da atividade da xantina oxidase na catálise da conversão da xantina em ácido úrico, utilizando catabólitos de folato obtidos na degradação do ácido fólico com as enzimas já citadas, e observar o comportamento da mesma durante a formação de uma possível espécie excitada. Portanto, analisando a cinética do consumo de oxigênio, a formação dos produtos, e a emissão da espécie excitada, poderemos obter muitas informações valiosas sobre o comportamento da xantina oxidase em cancerosos e o metabolismo anormal do ácido fólico.

O objetivo deste trabalho, visto por uma perspectiva mais ampla, seria o de auxiliar na luta contra o câncer.

CAPÍTULO IIMATERIAIS E MÉTODOS

II.1 - DROGAS UTILIZADAS E SUA PROCEDÊNCIA

<u>Substância</u>	<u>Procedência</u>
Ácido clorídrico	J.T. Baker Chemical Co.
Ácido fólico	Merck
Acetato de sódio	Dyne Produtos Químicos
Ácido tri-cloro acético	Carlo Erba
Antraceno-2-sulfonato de sódio	Ref: [41]
Ácido úrico	Sigma Chemical Co
Adenosina trifosfato	Sigma Chemical Co
Ácido etilenodiaminatetracético	Qeel Ind. Químicas S.A.
Benzoato de sódio	Sigma Chemical Co
Bilirrubina	Sigma Chemical Co
Catalase	Sigma Chemical Co
Cisteína	Merck
Cloreto de sódio	Carlo Erba
5,5-ditio-bis(2-ácido nitrobenzôico)	Calbiochem.
D ₂ O	Merck
Eosina	Merck
Eritrosina B	Fisher Scientific Co
Etanol	Qeel Ind. Químicas S.A.
Fluoresceína	BDH Chemicals Ltd.
Fosfato monobásico de sódio	Qeel Ind. Químicas S.A.
Fosfato bibásico de sódio	Qeel Ind. Químicas S.A.
Glucose	Sigma Chemical Co

<u>Substância</u>	<u>Procedência</u>
Glucose oxidase	Sigma Chemical Co
Glutaciona	Sigma Chemical Co
Guanosina	Sigma Chemical Co
Hidróxido de sódio	Merck
Hidrocloreto de N-naftiletileno diamina	Merck
Histidina	Sigma Chemical Co
Nitrito de sódio	Qeel Ind. Químicos S.A.
9,10-dibromoantraceno-2-sulfonato	Ref: 41
9,10-difenilantraceno-2-sulfonato	Ref: 41
Peroxidase de rabanete (HRP) tipo VI	Sigma Chemical Co
Peróxido de hidrogênio	Merck
Pterin	Sigma Chemical Co
Pterin-6-aldeído	Sigma Chemical Co
Pterin-6-carboxilato	Sigma Chemical Co
Rosa bengala	BDH Chemicals Co
Superóxido dismutase	Sigma Chemical Co
Sulfato de manganês	BDH Chemicals Ltd.
Sulfato de amônio	Ecibra
Sulfamato de amônio	BDH Chemicals Ltd.
6-hidroximetilpterin	Sigma Chemical Co
Triptofano	Sigma Chemical Co
Tris(hdroximetil)aminometano	Merck
1,4-diazobiciclo(2,2,2) octano	Aldrich Chemical Co.
Xantina	Sigma Chemical Co.
Xantina oxidase	Sigma Chemical Co.

II.2 - APARELHOS UTILIZADOS

As pesagens foram feitas em uma balança Mettler (Modelo ME-22).

Para as medidas de consumo e/ou liberação de oxigênio do meio de reação, utilizou-se um monitor da Yellow Spring Inst., Modelo 53, acoplado a um registrador da Phillips, Modelo 8202.

O controle de pH foi feito num potenciômetro Metrhom Herisan, Modelo E-512.

Os espectros de absorção na região do ultra violeta e do visível foram registrados num espectrofotômetro da Zeiss DMR-21.

As medidas de intensidade de cor, para os testes de Bratton-Marshall [7], foram lidas em um colorímetro da Micronal, Modelo B-295 com filtro fixo em 540 nm.

O estudo de fotoemissão e os espectros relacionados foram desenvolvidos num contador de cintilação líquida Beckman, Modelo LS-100c.

Usou-se uma ultra centrifugadora da Sorvall Superspeed, Modelo RC-2B para a obtenção da enzima extraída de eritrócitos, com propriedades do ácido fólico oxidase.

A identificação da mancha azul fluorescente na cromatografia de papel foi feita empregando-se uma lâmpada ultra violeta, Modelo UVSL-25 da Ultra Violet Products Incorporation.

II.3 - MÉTODOS

II.3.1 - Solução de ácido fólico

O ácido fólico foi dissolvido em uma solução aquosa de NaOH a 20% e estocada por 1 semana no escuro, a 0°C, para evitar uma possível fotodecomposição.

II.3.2 - Solução de catalase

A solução de catalase foi preparada em água destilada, sendo renovada a cada experiência.

II.3.3 - Solução de glutatona

Esta solução foi preparada na forma reduzida, em tampão fosfato (0,5 M; pH 5,5), e protegida da luz para evitar fotodecomposição.

II.3.4 - Solução de HRP-tipo VI

A solução de HRP-VI foi preparada em água destilada, dissolvendo-se a alíquota adequada e determinando sua concentração através do espectro de absorção, a 403 nm, onde $E=100.000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ [37].

II.3.5 - Soluções tampão

A preparação dos tampões foi feita seguindo o método de Sorensen [38]. O tampão Tris/HCl foi preparado pelo método de Gomori [39].

A solução de cloreto de sódio isotônico foi feita segundo o método de Parpart e col. [40]

II.3.6 - Solução de bilirrubina

A bilirrubina foi dissolvida em solução aquosa de NaOH a 5% e mantida no escuro para evitar a sua fotooxidação para biliverdina. Devido a esta fotooxidação, esta solução deve ser renovada a cada experiência.

II.3.7 - Aceptores antracênicos

As soluções de AS, DBAS e DPAS foram obtidas por dissolução em água com 2% de etanol. As concentrações foram determinadas através de seus espectros de absorção na região do visível, sabendo-se os valores de seus coeficientes de extinção molar, a seguir:

$$(AS)E_{360}=4558 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}, (DPAS)E_{375}=5040 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1} \text{ e } (DBAS)E_{382}=8940 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1} \quad |41|$$

II.3.8 - Solução de cisteína

Esta solução foi preparada na forma reduzida em tampão fosfato (0,5M; pH 5,5) e estocada no escuro para evitar fotooxidação.

II.3.9 - Reagente de Ellman

Este reagente é preparado pela dissolução de 39,6 mg de 5',5-ditio-bis(2-ácido nitrobenzôico) em 10 ml de tampão fosfato (0,1M; pH 7,0) |42|.

II.3.10 - Detecção do grupo SH

A presença de grupos SH foi detectada empregando-se o método de Stoner e Yang |43|. Este método consiste na adição de 0,5 ml do meio de reação a uma mistura composta de 0,1 ml de tampão fosfato (0,1M; pH 8,0), 1,5 ml de água destilada e 0,165 ml de reagente de Ellman. A seguir observa-se o aumento na absorção a 425 nm.

II.3.11 - Geração de peróxido de hidrogênio

A geração de peróxido de hidrogênio no meio de

reação foi constatada utilizando-se um novo método de De Toledo e col. [44].

II.3.12 - Detecção de peróxido de hidrogênio

A detecção de H_2O_2 foi feita por quimiluminescência, baseada na geração de energia eletrônica, na presença de eosina [45]. Este método consiste na fotoemissão do sistema Peroxidase/ H_2O_2 /eosina. Para se elevar a emissão, empregou-se EDTA, o qual acelera eficientemente tanto o decaimento de HRP I como o desaparecimento de HRP II.

II.3.13 - Detecção de amina diazotizável (ácido p-aminobenzoilglutâmico)

Para se detectar esta substância no meio de reação empregou-se o teste de Bratton-Marshall [7]. Após a completa oxidação do substrato, junta-se à mistura de reação 1 ml de nitrato de sódio 0,1% (peso/vol.) para formação do azo composto. Em seguida, adiciona-se 1 ml de ácido tricloroacético 30% (peso/vol.), o qual garante a acidificação do meio, de modo que o pH não cause efeito na cor do corante. Depois que o meio está homogeneizado, retira-se uma alíquota de 1 ml e adiciona-se a 1 ml de sulfamato de amônio 0,5% (peso/vol.). Isto é para garantir a destruição de excesso de nitrito, que pode dar origem a compostos nitrosos. A seguir coloca-se 1 ml do corante hidrocloreto de N-naftiletilenodiamina 0,1% (peso/vol.), que acoplado a amina diazotizada produz uma cor violeta cuja intensidade pode ser medida num colorímetro convencional.

II.3.14 - Obtenção da enzima extraída de eritrócitos

ETAPA 1 - Retira-se o soro do sangue por centri-

fugação até obter-se 22 ml de eritrócitos. Lava-se os mesmos com NaCl isotônico (0,5M; pH 7,4), para garantir a tamponação do meio e centrifuga-se. O precipitado é então colocado em 20 volumes de tampão Tris/HCl (0,5M; pH 7,4), sob constante agitação, para assegurar a hemólise das células. Após 30 minutos, adiciona-se 27 ml de HCl concentrado, gota a gota, no hemolisado, ainda sob agitação. Centrifuga-se então a mistura assim obtida e o precipitado formado é lavado com HCl 2N. Centrifuga-se novamente. A seguir suspende-se o precipitado obtido em 50 ml de água destilada, e eleva-se o pH para 5,5, por adição de NaOH 1N. Finalmente, para garantir pH 7,0 no fluido, adiciona-se tampão fosfato (0,5M; pH 7,0). O precipitado formado é então removido por centrifugação, e o sobrenadante, contendo o material ativo, é dialisado em água destilada, por 18 horas, com constante agitação.

ETAPA 2 - Após as 18 horas, recolhe-se o dialisado e mede-se o volume. Para cada 100 ml adiciona-se 32,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lentamente, sob agitação. A seguir centrifuga-se por 20 min. a 11.000xg*. O sobrenadante obtido é levado a 70% em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, adicionando-se 9,3 g para cada 100 ml do dialisado, vagarosamente e sob constante agitação. Centrifuga-se novamente a 11.000xg por 20 min. e dissolve-se cuidadosamente o precipitado formado em 50 ml de água destilada. Dialisa-se por 20 horas em água destilada.

Estas duas etapas acima foram realizadas a 0°C e na primeira delas as centrifugações foram de 500 x g por 10 minutos.

* 11.000 xg = "11.000 vezes a aceleração da gravidade terrestre".

II.3.15 - Teste para avaliar a concentração da enzima

Tira-se uma alíquota do dialisado obtido na segunda etapa e dilui-se em tampão fosfato (0,5M; pH 7,0). Mede-se o espectro na região do ultra violeta. Obtendo-se o espectro, aplica-se a seguinte fórmula [18]:

$$\text{Concentração} = 1,45E_{280} - 0,74E_{260} \quad (\text{mg proteína/ml})$$

A existência de uma banda soret, a qual identifica esta enzima como uma homeproteína, foi verificada pelo espectro de absorção a 403 nm como mostra a Fig. II.1

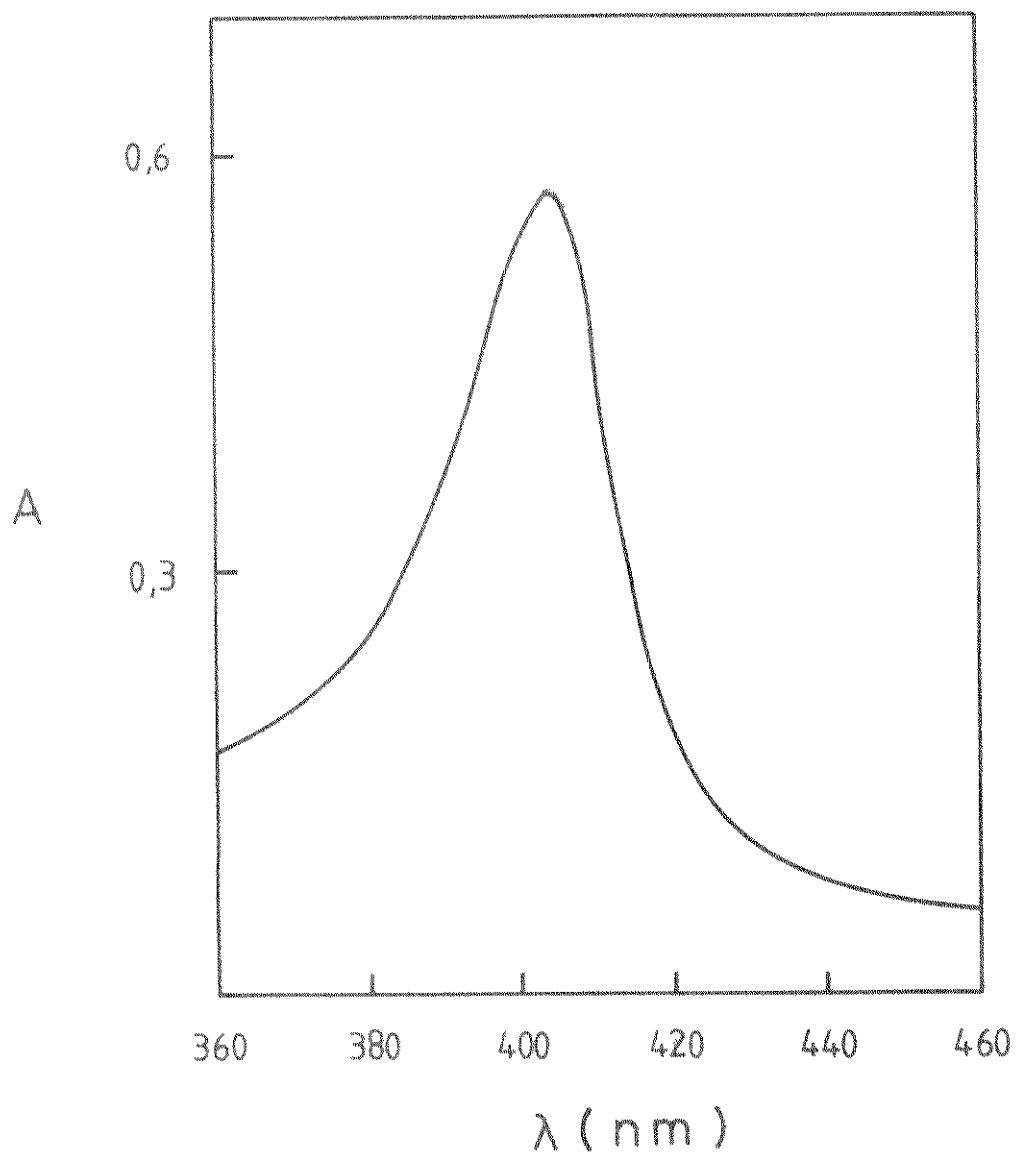


Fig. II.1 - Espectro de absorção da enzima de eritrócitos humanos. A banda a 403nm (Banda Soret) indica que a proteína possui um grupo heme.

CAPÍTULO III

APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Com base nos resultados de Braganca e col. [18], procurou-se obter os primeiros resultados para a oxidação de ácido fólico pela enzima HRP.

Primeiramente tornou-se necessário estabelecermos uma reação padrão, composta de HRP/cofatores, onde o consumo de oxigênio fosse mínimo, para depois compará-la com a oxidação do sistema AFo/HRP/cofatores na presença do substrato e portanto avaliar_umos sua cinética. Entretanto, a elevada porcentagem de oxigênio consumido pelo padrão, deu origem a um estudo cujos resultados também serão discutidos posteriormente.

A partir de então desenvolveu-se o estudo da oxidação do substrato, da formação e reconhecimento dos produtos, bem como da formação de alguma possível espécie gerada no estado eletrônico excitado, cuja presença poderia contribuir para a elucidac_ão do mecanismo de degradação do ácido fólico. A seguir, procurou-se aplicar as mesmas condições para o sistema de degradação, usando a enzima extraída de eritrócitos humanos normais e de alguma pessoa portadora de qualquer tipo de câncer, com a finalidade de se comparar o metabolismo do folato pelos dois processos enzimáticos.

Finalmente, investigou-se a relação entre os derivados pterin, resultantes do metabolismo do ácido fólico, como também a implicac_ão de um produto, no estado eletrônico excitado, sobre a atividade da xantina oxidase, na cinética de oxidação da xantina a ácido úrico.

Portanto os resultados obtidos serão aqui discutidos, obedecendo-se a mesma ordem destes comentários prévios.

III.1 - DETECÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO NA REAÇÃO $\text{Glu/HRP/Mn}^{++}/\text{O}_2$

Tendo observado que os cofatores da reação enzimática do ácido fólico oxidase com ácido fólico produzem um acentuado consumo de oxigênio; e sendo necessário otimizar as condições para que isso não afetasse o catabolismo do substrato, foi possível des^uco^ubrir um excelente sistema peracídico de oxidação de grupos S-H, além de mostrar a importância da geração de H_2O_2 no sistema ácido fólico oxidase. Deste modo, este capítulo inicia-se com a apresentação dos resultados obtidos com a reação $\text{Glu/HRP/Mn}^{++}/\text{O}_2$.

III.1.1 - Influência do pH

A Fig. III.1 (pág. 33) ilustra o sistema acima discutido, onde se pode notar que a atividade da enzima HRP, na catálise da oxidação de glutathiona e/ou cisteína, à temperatura constante de 37°C , é máxima a pH 5,5.

III.1.2 - Consumo de oxigênio

A tabela III.a (pág. 34) mostra que as melhores condições de oxidação são alcançadas quando as concentrações dos dois cofatores essenciais; Mn^{++} e glutathiona, são respectivamente $250 \mu\text{M}$ e $830 \mu\text{M}$. mantendo-se a concentração de HRP ($2 \mu\text{M}$) constante. Nestas condições a concentração de oxigênio consumido foi de $160 \mu\text{M}$ ou 82% |46|.

Verifica-se pela mesma tabela que o consumo de oxigênio é inversamente proporcional à concentração de catalase

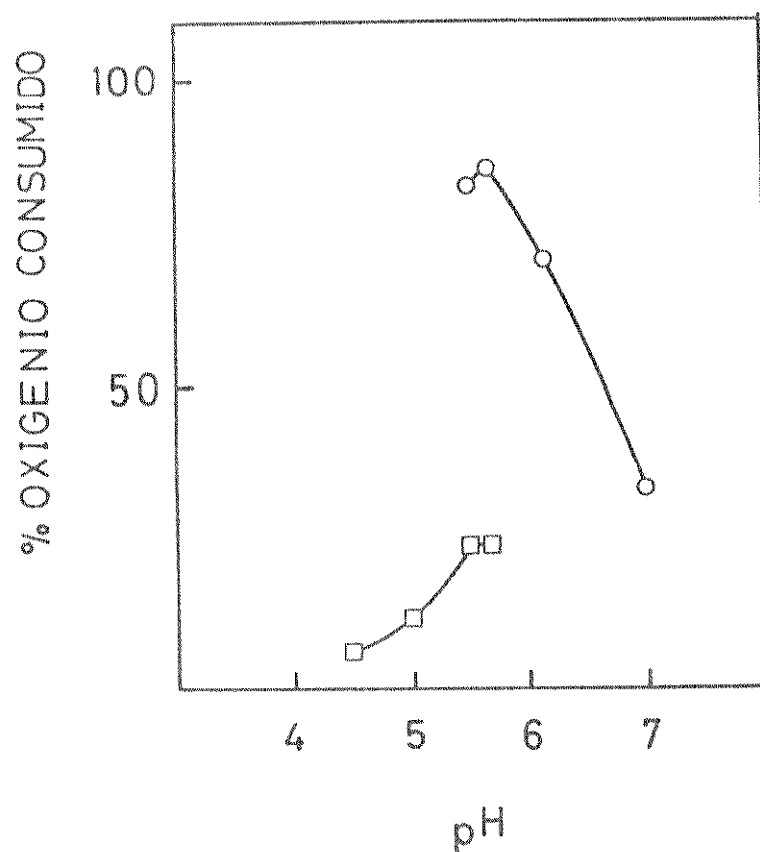


Fig. III.1 - Gráfico de pH do sistema HRP ($2\mu\text{M}$)/ Mn^{++} (83mM)/Glutaciona ($830\mu\text{M}$)/ O_2 , em $0,5\text{M}$ tampão fosfato (-o-) e $0,5\text{M}$ tampão acetato (-□-). A ordenada corresponde a oxigênio consumido em 2 min.

Tabela III.a - Oxigênio consumido pela glutathiona na presença de Mn^{++} e HRP a $37^{\circ}C$, com 8 minutos de reação^(a).

Mn^{++} (μM)	Glutathiona (μM)	Oxigênio consumido (μM)	% Oxigênio consumido
250	830	200	100
170	830	190	97
83	830	160	82 ^(b)
83	416	62	31
83	208	44	22
83	830	80	40 ^(c)
83	830	164	82
0	830	0	0

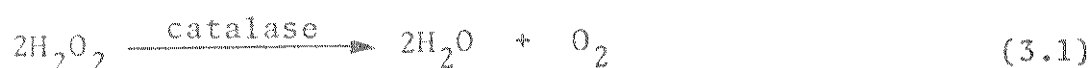
Ref: Innocentini e col. |46|

a) O método de Stonier e Yang |43| mostrou 90% de desaparecimento de GSH à 4 min. de reação.

b) Na presença de 1500 unidades de catalase (Sigma).

c) Na presença de 1500 unidades de catalase desnaturada pelo calor.

no meio. O maior efeito de inibição foi observado quando a concentração desta enzima foi de 83 $\mu\text{g}/1,2$ ml de reação. Empregando-se catalase desnaturada observou-se um aumento no consumo de oxigênio, mas não o suficiente para reproduzir a reação, quando na ausência desta enzima. Tendo em vista esse comportamento de catalase e sabendo-se que esta enzima é específica para promover a seguinte reação:



tornou-se importante investigar a presença de peróxido de hidrogênio gerado no meio de reação.

III.1.3 - Geração e detecção do peróxido de hidrogênio

A geração do peróxido de hidrogênio na reação foi confirmada pelo método de De Toledo e col. [44]. Este foi baseado, por sua vez, no método de quimiluminescência de O'Brien e col. [45]. Foi possível observar fotoemissão no sistema Glu/HRP/ Mn^{++} /eosina, a qual foi proporcional às concentrações de H_2O_2 e HRP. A Fig. III.2 (pág. 36) mostra o efeito da eosina na fotoemissão e o aumento desta quando EDTA é adicionado na reação. Pode-se ainda observar o efeito inibidor da catalase no sistema, mais uma vez confirmando a presença do peróxido de hidrogênio no mesmo. Ainda usando este método bioenergizado, foi possível determinar a concentração de H_2O_2 nos primeiros 30 seg. da reação, a qual foi de 10 μM .

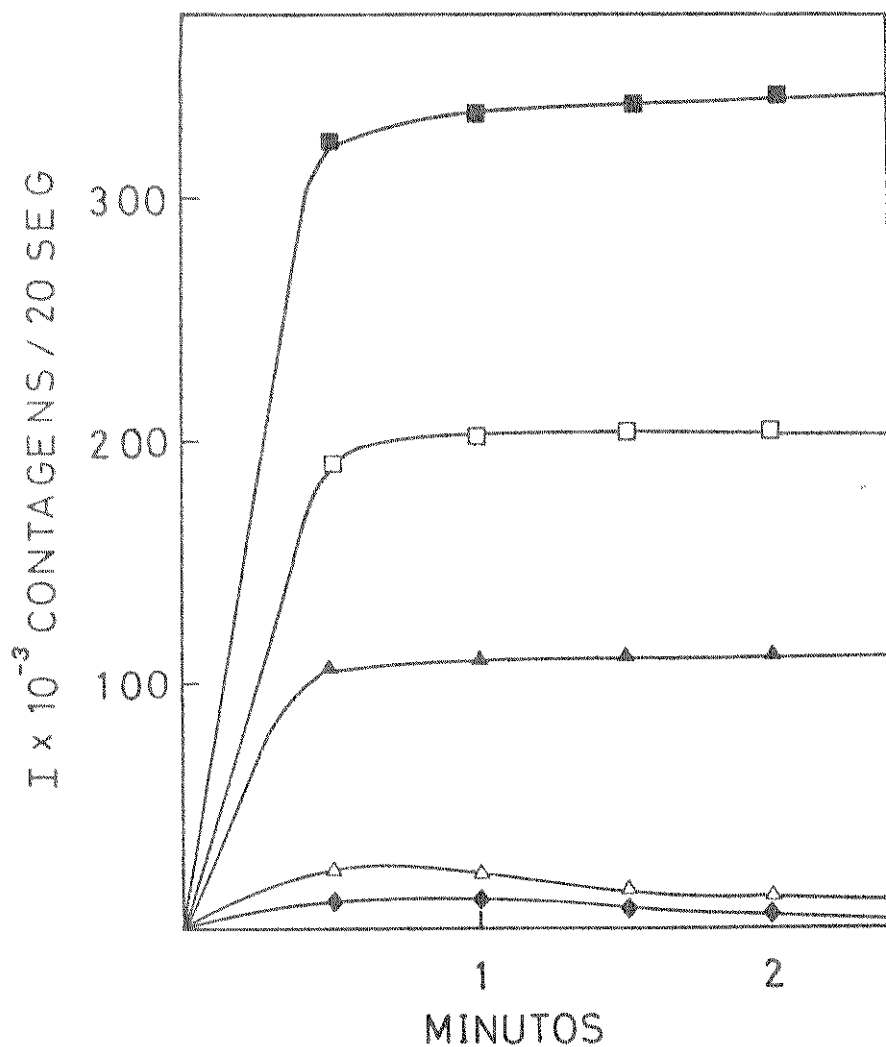


Fig. III.2 - Efeito de EDTA (0,5mM), eosina (2,5 μM) e catalase (150 unidades) sobre a velocidade de fotoemissão do sistema HRP (2,2 μM)/ Mn^{++} (10 mM)/Glutathiona (1mM)/ O_2 em 0,5M tampão fosfato pH 5,5 (- Δ -): (a) em presença de eosina (- \square -); (b) eosina e catalase (- \diamond -); (c) eosina e catalase parcialmente desnaturada(- \blacktriangle -); (d) eosina e EDTA (- \blacksquare -).

III.2 - DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO NO SISTEMA AFo/HRP/Glu/Mn⁺⁺/O₂

III.2.1 - Consumo de oxigênio

As melhores condições para a degradação oxidativa do ácido fólico em presença de HRP são obtidas quando glutatona reduzida, catalase e Mn⁺⁺ estão presentes. A omissão destas três substâncias, principalmente de glutatona e Mn⁺⁺, impede que a reação ocorra a nível satisfatório, como visto na Fig. III.3 (pag. 38). A presença da catalase é importante, uma vez que o peróxido de hidrogênio gerado no meio, como visto anteriormente, mostrou ser prejudicial ao sistema. A partir dos estudos realizados foi possível estabelecermos a seguinte reação padrão, obedecendo-se a ordem de adição: Tampão fosfato (0,5 M) pH 5,5; Ácido fólico (1,2 mM), HRP (2,2 µM), Glutatona (388 µM), Catalase (150 unidades) e Mn⁺⁺ (77,5 µM). Mantendo-se a temperatura na faixa de 37-38°C, e o pH 5,5, a atividade da enzima foi máxima, e a reação foi consumada em aproximadamente 15 minutos.

III.2.2 - Reconhecimento dos produtos de degradação enzimática do ácido fólico

Usando-se a técnica da cromatografia preparativa de papel e NH₄OH 1% como eluente, pode-se observar uma mancha azul fluorescente, cujo valor de R_f é consistente com o valor padrão obtido de uma amostra de pterin-6-aldeído e com os valores teóricos [8]. Outra evidência para a formação deste produto é a fornecida pelo espectro de absorção da mancha azul fluorescente, a qual foi recortada e dissolvida em NaOH 0,1 N. Os máximos observados a 365 nm e 254 nm foram coincidentes com os valores obtidos por Thijssen [47], e com os mesmos valores para o espectro de uma

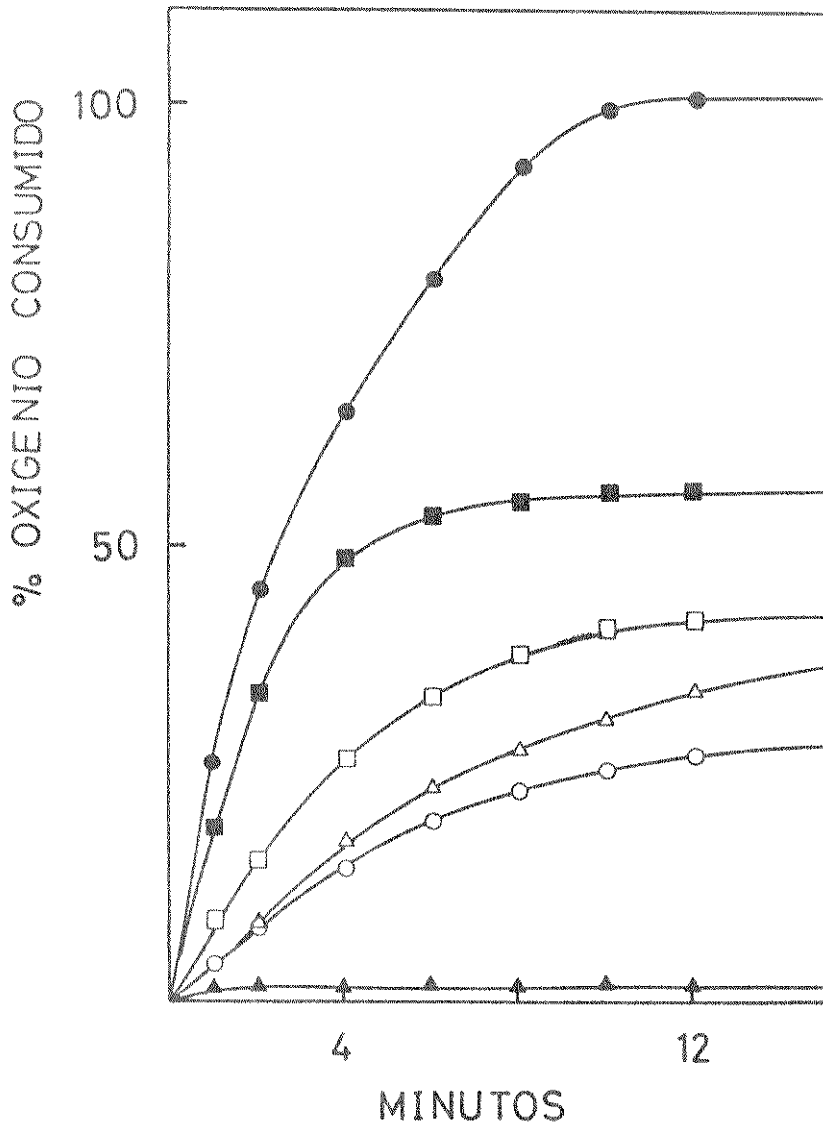


Fig. III.3 - Porcentagem de oxigênio consumido pelo sistema Afo (1,2mM)/HRP (2,2 μ M)/Glutationa (388 μ M)/Catalase (150 unidades/ Mn^{++} (77,5 μ M)/ O_2 em 0,5M tampão fosfato pH 5,5 (-●-); (a) na ausência da catalase (-■-); (b) na ausência de Afo e catalase (-□-); (c) na ausência de glutaciona e catalase (-△-); (d) na ausência de Afo (-○-); (e) na ausência de HRP, glutaciona e catalase (-▲-).

Tabela III.b - Valores de Rf e de absorção na região do UV para os sistemas AFo/HRP, AFo/AF e AFo/AFc.

Reação ou substrato	Rf	Valores de UV (nm) obtidos em NaOH 0,1N
1. AFo+HRP+Glu+Cat+Mn ⁺⁺	0,69	365,277(*),254
2. AFo+AF+Glu+Cat+Mn ⁺⁺	0,80	350,273
3. AFo+AF+Glu+H ₂ O ₂ +Mn ⁺⁺	0,67	360,277(*),254
4. AFo+AF+Glu+Mn ⁺⁺	0,80	350,273
5. Pt-6-CO ₂ H	0,81	350,258
6. Pt-6-CHO	0,68	365,277(*),254
7. Pt-6-CH ₂ OH	0,75	366,252
8. AFo	0,00	360,280,254
9. AFo+AFc+Glu+Mn ⁺⁺	0,64	360,277,254
10. AFo+HRP+Glu+Cat+Mn ⁺⁺ (após 5 dias de reação)	0,79	350,258

* ombro

|AFo| = 1,2 mM

|HRP| = 2,2 μM

|Glu| = 388 μM

|Cat| = 150 unidades

|Mn⁺⁺| = 77,5 μM

|AF| = |AFc| = 0,12 mg/ml

|H₂O₂| = 100 μM

|Pt-6-CO₂H| = 2,5 μM

|Pt-6-CHO| = 2,5 μM

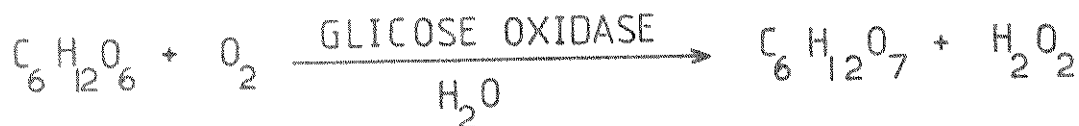
|Pt-6-CH₂OH| = 2,5 μM

alíquota de pterin-6-aldeído tirado nas mesmas condições, como mostra a tabela III.b (pág. 39).

O reconhecimento do ácido p-aminobenzoilglutâmico (amina diazotizável do ácido fólico) como o outro produto proveniente da sua degradação enzimática foi feito segundo o teste de Bratton-Marshall [7]. A intensidade da cor bem como os valores de absorbância e/ou transmitância a 540 m μ estão apresentados na tabela III.c (pág. 41).

III.2.3 - Consumo de oxigênio em presença de Glicose/Glicose oxidase.

Para se confirmar a toxicidade de H₂O₂, gerado na reação, sobre o sistema enzimático, fez-se o estudo da degradação do folato em presença de glicose e glicose oxidase, como mostra a Fig. III.4 (pag. 42). Pode-se observar que o peróxido de hidrogênio gerado in situ pela reação:



(3.2)

inibiu consideravelmente a reação do ácido fólico, nas mesmas condições de pH e temperatura.

Outra experiência feita, introduzindo-se peróxido de hidrogênio na reação apresentou resultado semelhante, como é mostrado na Fig. III.5 (pág. 43).

III.2.4 - Consumo de oxigênio com SOD e benzoato

Tanto a presença de SOD como de benzoato não alteraram significativamente a cinética do consumo de oxigênio da reação, eliminando-se a hipótese da formação do superóxido ânion

Tabela III.c - Resultados do teste de Bratton-Marshall [7] para a identificação da amina diazotizável, proveniente de degradação de AFo.

Reações	Cor	$A_{540 \text{ nm}}$	% de $T_{540 \text{ nm}}$
1. AFo+HRP+Glu+Catal+Mn ⁺⁺	violeta escuro	1,40	4,20
2. HRP+Glu+Catal+Mn ⁺⁺	incolor	0,21	61,80
3. AFo+Tampão	violeta muito claro	0,49	32,00
4. AFo+AF+Glu+Mn ⁺⁺	violeta escuro	1,60	5,00
5. AF+Glu+Mn ⁺⁺	incolor	0,32	48,00
6. AFo+AFc+Glu+Mn ⁺⁺	violeta escuro	1,80	6,00
7. AFc+Glu+Mn ⁺⁺	incolor	0,27	52,00

|AFo| = 1,2 mM

|HRP| = 2,2 μ M

|Glu| = 388 μ M

|Catal| = 150 unidades

|Mn⁺⁺| = 77,5 μ M

|AF| = |AFc| = 0,12 mg/ml

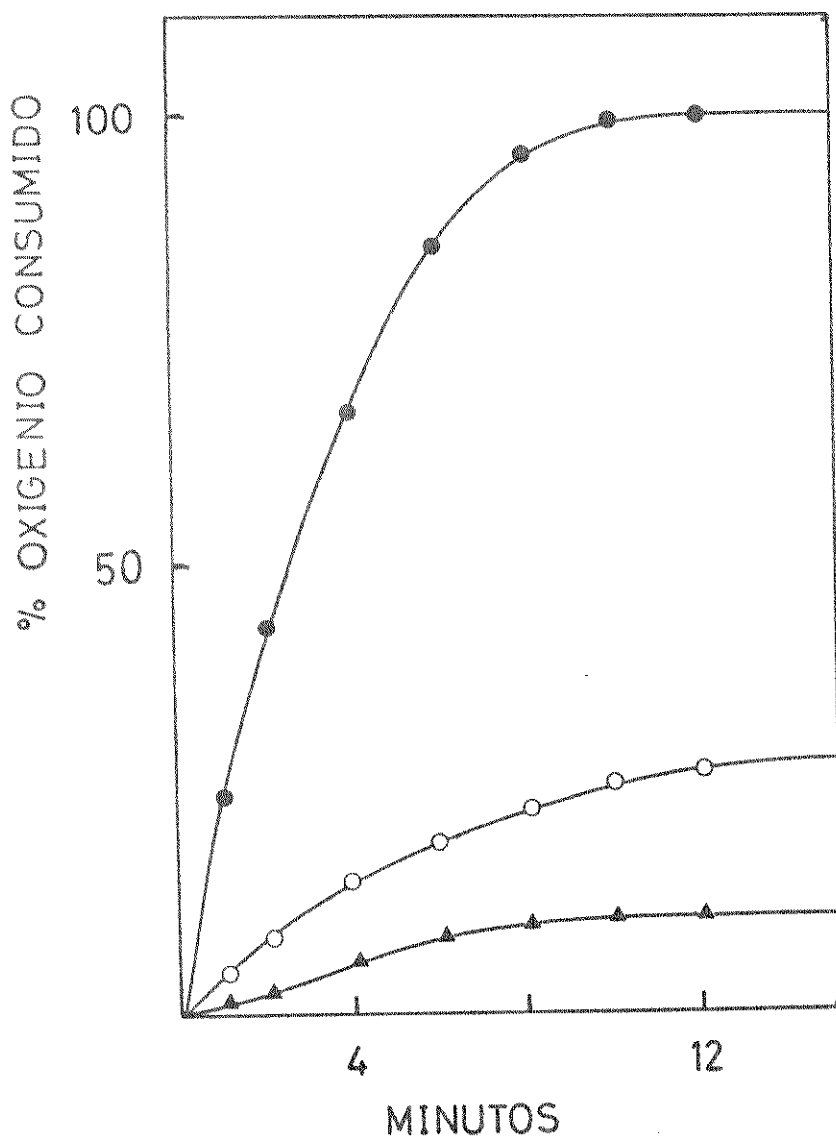


Fig. III.4 - Porcentagem de oxigênio consumido pelo sistema Afo (1,2mM)/HRP (2,2 μ M)/Glutathiona (388 μ M)/Catalase (150 unidades)/Mn⁺⁺ (77,5 μ M)/O₂ em 0,5M tampão fosfato pH 5,5 (-●-): (a) na ausência de Afo (-○-); (b) na ausência dos cofatores (glutathiona, catalase e Mn⁺⁺) e na presença de glicose (770 mM) e glicose oxidase (21 unidades) (-▲-).

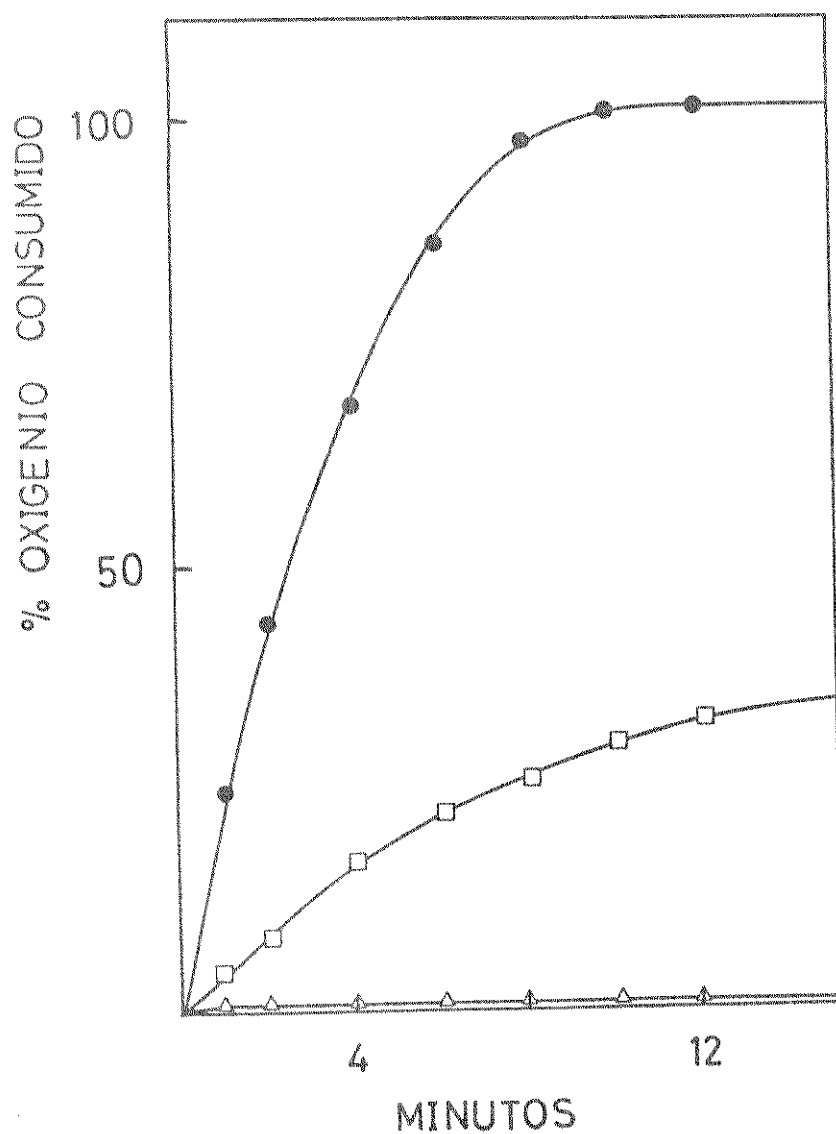


Fig. III.5 - Porcentagem de oxigênio consumido pelo sistema AFO (1,2 mM)/HRP (2,2 μ M)/Glutathiona (388 μ M)/Catalase (150 unidades)/Mn⁺⁺ (77,5 μ M)/O₂ em 0,5M tampão fosfato pH 5,5 (-●-): (a) na ausência dos cofatores (glutathiona, catalase e Mn⁺⁺) na presença de H₂O₂ (1 μ M) (-□-); (b) na ausência dos cofatores (-Δ-).

($O_2^{\cdot-}$) ou radical hidroxila (OH^{\cdot}). A desnaturação de SOD e sua utilização posterior na reação, apresentou o mesmo resultado, confirmando que o pequeno efeito observado era devido somente à presença de outra proteína no meio, [48-49a].

III.2.5 - Consumo de oxigênio em meio deuterado

A eficiência da degradação do ácido fólico foi duplicada quando a reação ocorreu em meio deuterado como mostra a Fig. III.6 (pág. 45). Pode-se notar pela mesma figura que a cinética foi semelhante a do sistema desenvolvido em água comum. Isto pode ser entendido como um efeito estabilizante da água deuterada sobre a proteína, conferindo-lhe possivelmente uma estrutura conformacional mais prontamente favorável ao seu efeito catalítico.

III.3 - GERAÇÃO DE ESTADOS EXCITADOS NO SISTEMA AFo/HRP/COFADORES

Uma análise prévia da reação AFo/HRP/Glu/Catalase/ Mn^{++}/O_2 no contador de cintilação líquida mostrou que uma espécie no estado eletronicamente excitado era a responsável pela fotoemissão observada, como mostra a Fig. III.7 (pág. 46). A identificação de tal espécie como sendo oxigênio no estado excitado singlete (1O_2 $^1\Delta_g$), exigiu uma pesquisa minuciosa, baseada na transferência de energia para aceptores emissivos e supressores. Todos eles foram empregados, tomando-se o cuidado de observar as concentrações que não afetavam o passo oxidativo da degradação do substrato.

III.3.1 - Corantes xantênicos ou aceptores emissivos xantênicos.

De todos os corantes xantênicos empregados, ape

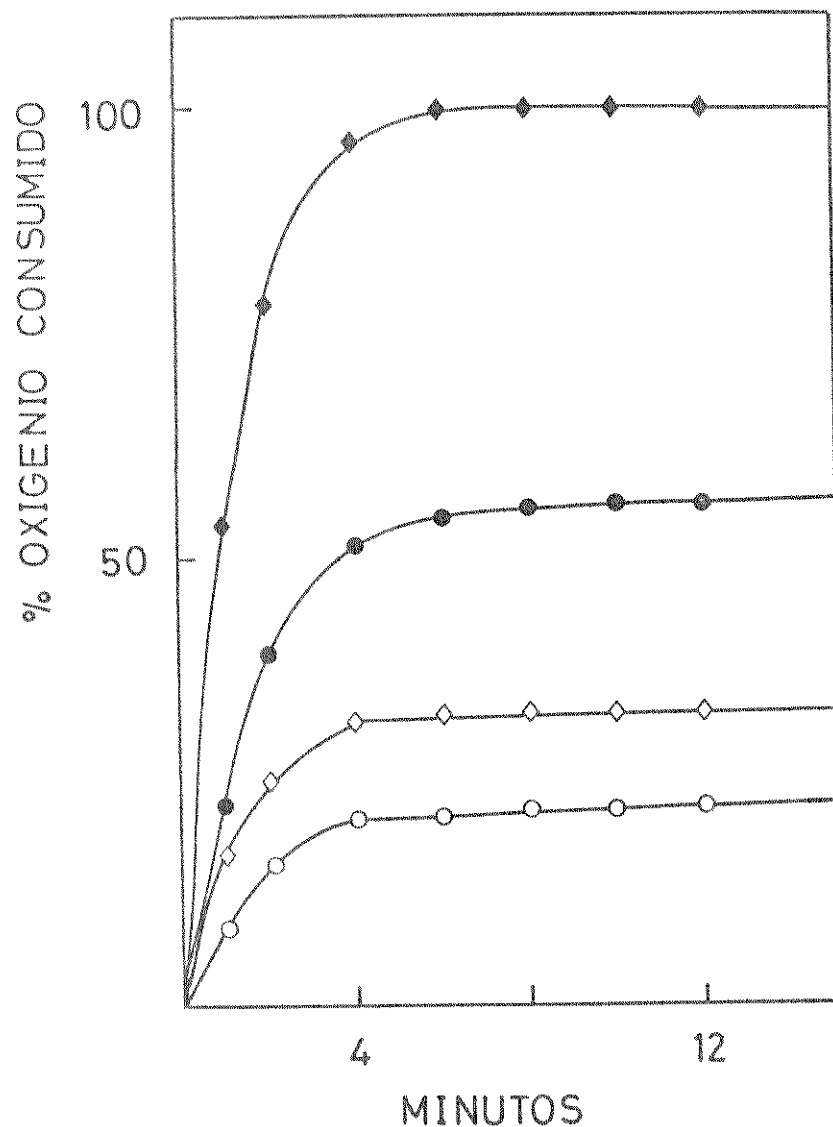


Fig. III.6 - Porcentagem de oxigênio consumido pelo sistema AFo (1,2 mM)/HRP (2,2 μ M)/Glutathiona (388 μ M)/Catalase (150 unidades)/Mn⁺⁺ (77,5 μ M)/O₂ em 0,5M tampão fosfato pH 5,5: (a) em meio aquoso (-●-); (b) em meio aquoso e na ausência de AFo (-○-); (c) em meio deuterado (-◇-); (d) em meio deuterado e na ausência de AFo (-◊-).

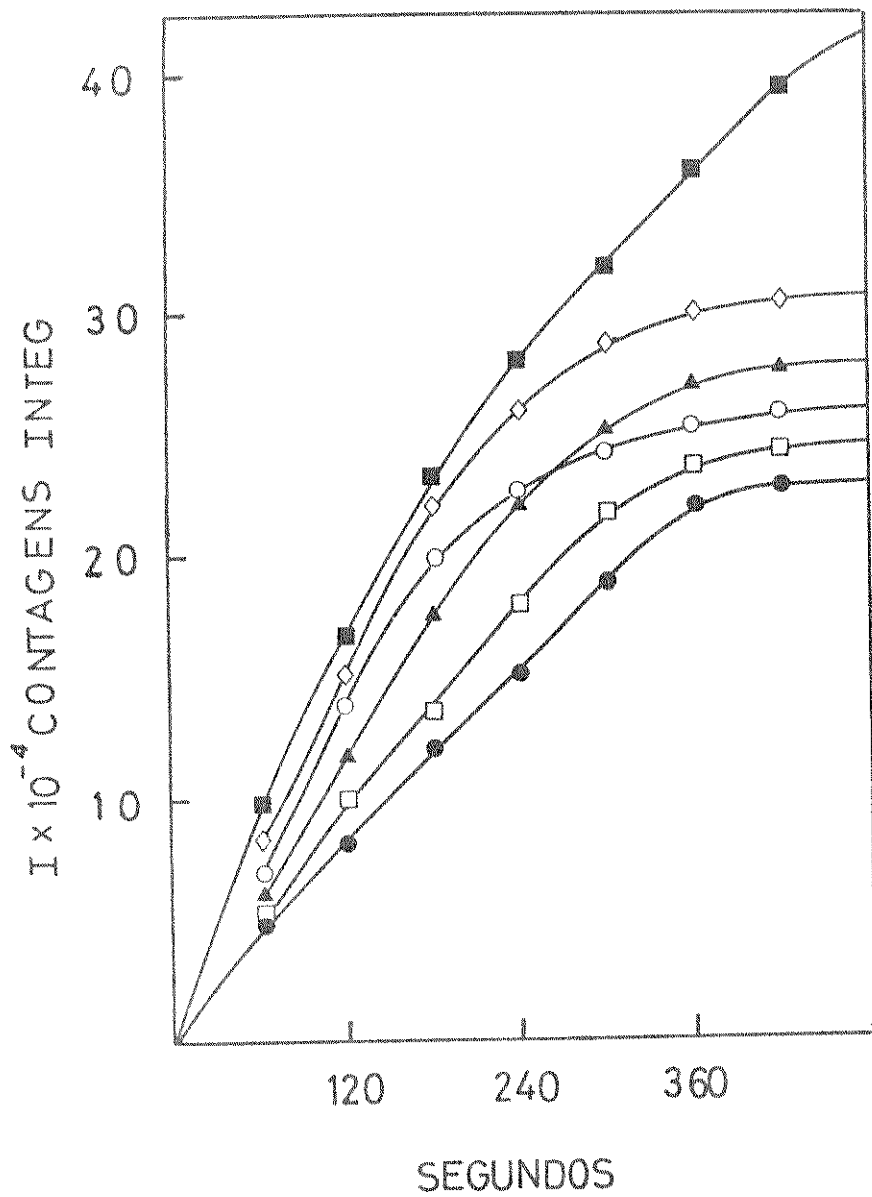


Fig. III.7 - Fotoemissão integrada do sistema AFO (1,2 mM)/HRP (2,2 μ M)/Glutationa (388 μ M)/Catalase (150 unidades)/Mn⁺⁺ (77,5 μ M)/O₂ em 0,5M tampão fosfato pH 5,5 (-●-): (a) em presença de 10 mM DABCO (-■-); (b) fluoresceína 7,7 nM (-◇-); (c) eritrosina B 15,4 nM (-▲-); (d) eosina 127 nM (-○-); (e) rosa bengala 150 nM (-□-).

nas a fluoresceína produziu um aumento na emissão total do sistema. Os demais corantes (eosina, eritrosina B e rosa bengala) que possuem átomos pesados não produziram efeito considerável. Estes resultados estão exemplificados na Fig. III.7 (pág. 46).

III.3.2 - Aceptores emissivos antracênicos

Dos três aceptores utilizados, i.e., AS, DBAS e DPAS, apenas o primeiro apresentou um pequeno efeito. Novamente aqui, a presença de um acceptor que possui átomo pesado (DBAS) não alterou a emissão total da reação.

III.3.3 - Supressores de oxigênio singlete

A presença de aminoácidos na reação, os quais possuem a propriedade para suprimir oxigênio singlete (1O_2), [50], pode ser vista na Fig. III.8 (pág. 48). Tanto guanósina como histidina e triptofano não causaram efeito, quando utilizados nas concentrações permitidas para não afetarem a oxidação do substrato. Contudo, a presença de triptofano, numa concentração 10 vezes maior, permitiu observar um aumento na emissão total em aproximadamente cinco minutos da reação.

O efeito de DABCO, um supressor da formação de oxigênio singlete e estimulador de sua emissão, é visto na Fig. III.7. O aumento na emissão total do sistema é atribuído à propriedade deste supressor em aumentar a emissão dimol em meio aquoso, propiciando a formação de microbolhas, que mantêm em contacto as moléculas de oxigênio singlete [51].

A bilirrubina, um pigmento excretado pela bÍlis, também foi utilizada como supressor [52]. Seu efeito sobre a reação é ilustrado na Fig. III.9 (pág. 49), onde se observa uma supressão da fotoemissão por aproximadamente 2 minutos, seguida de

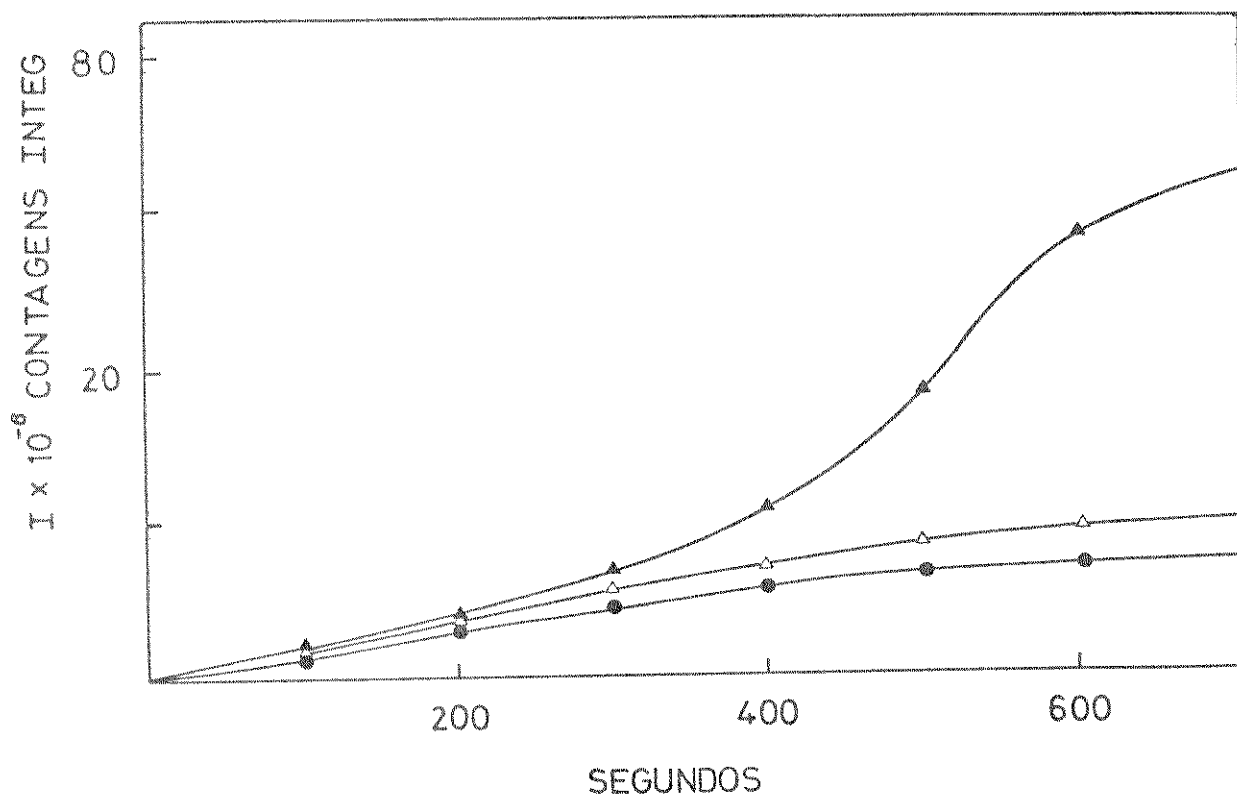


Fig. III.8 - Fotoemissão integrada do sistema Afo (1,2mM)/HRP (2,2 μ M)/Glutathiona (388 μ M)/Catalase (150 unidades)/Mn⁺⁺ (77,5 μ M)/O₂ em 0,5M tampão fosfato pH 5,5 (-●-): (a) na presença de triptofano 775 μ M (-▲-); (b) curva média de fotoemissão integrada do sistema na presença de Histidina 575 μ M ou Guanosina 775 μ M ou triptofano 77,5 μ M (-△-).

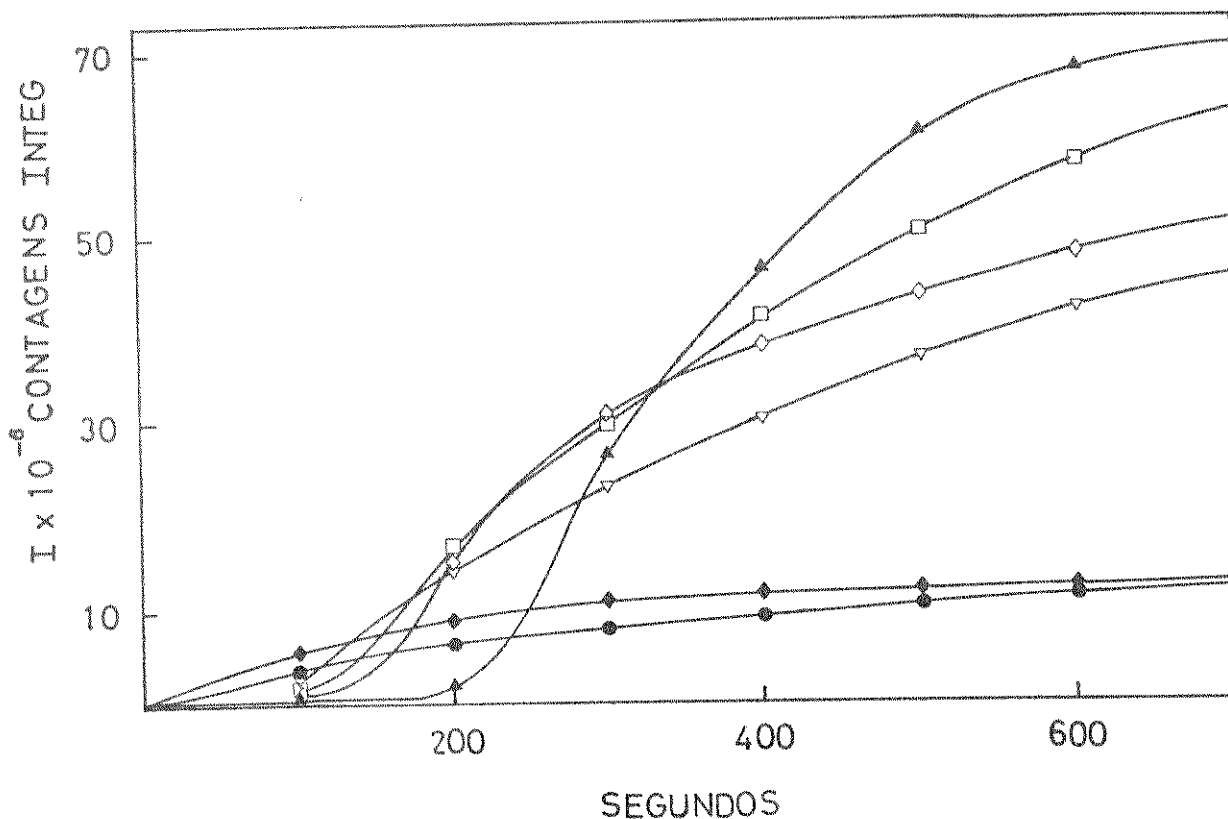


Fig. III.9 - Fotoemissão integrada do sistema AFO (1,2 mM)/HRP (2,2 μM)/Glutationa (388 μM)/Catalase (150 unidades)/Mn⁺⁺ (77,5 μM)/O₂ em 0,5M tampão fosfato pH 5,5 (-●-): (a) na presença de DBAS 4 μM (-◆-); (b) na presença de bilirrubina 20 μM e DBAS 4 μM adicionado a 100 seg. de reação (-▲-); (c) na presença de bilirrubina 20 μM e DBAS 4 μM adicionado a 324 seg. de reação (-□-); (d) na presença de bilirrubina 20 μM e DBAS 4 μM adicionado no início da reação (-◇-); (e) na presença de bilirrubina 20 μM (-▽-).

um pronunciado aumento da emissão total. Este comportamento da bilirrubina, similar ao triptofano, nos leva a crer que algum intermediário formado por esta molécula, em presença de oxigênio singlete, seria o responsável pelo comportamento observado. Mais evidências são fornecidas pela presença simultânea de bilirrubina e DBAS como mostra a Fig. III.9. Também obteve-se resultados interessantes quando a bilirrubina participou da reação, juntamente com DABCO, o qual é visto na Fig. III.10 (pág. 51).

43631 BC /
 Outro estudo da reação desenvolvida em água deuterada, mostrou que a fotoemissão da mesma foi duplicada quando comparada com o resultado obtido em água comum. Este comportamento, mais o efeito de bilirrubina na reação com água deuterada, são mostrados na Fig. III.11 (pág. 52).

III.3.4 - Supressores de outras espécies

Nenhum efeito na fotoemissão foi observado quando do benzoato de sódio [48] ou SOD estiveram presentes [49.a]. Assim a possibilidade de formação de radical hidroxila ou superóxido ânion, os quais poderiam gerar indiretamente oxigênio singlete, foi eliminada. As reações abaixo ilustram este fato [49.b]:



A participação do peróxido de hidrogênio na fotoemissão também foi excluída, uma vez que a catalase foi usada rotineiramente em todas as experiências.

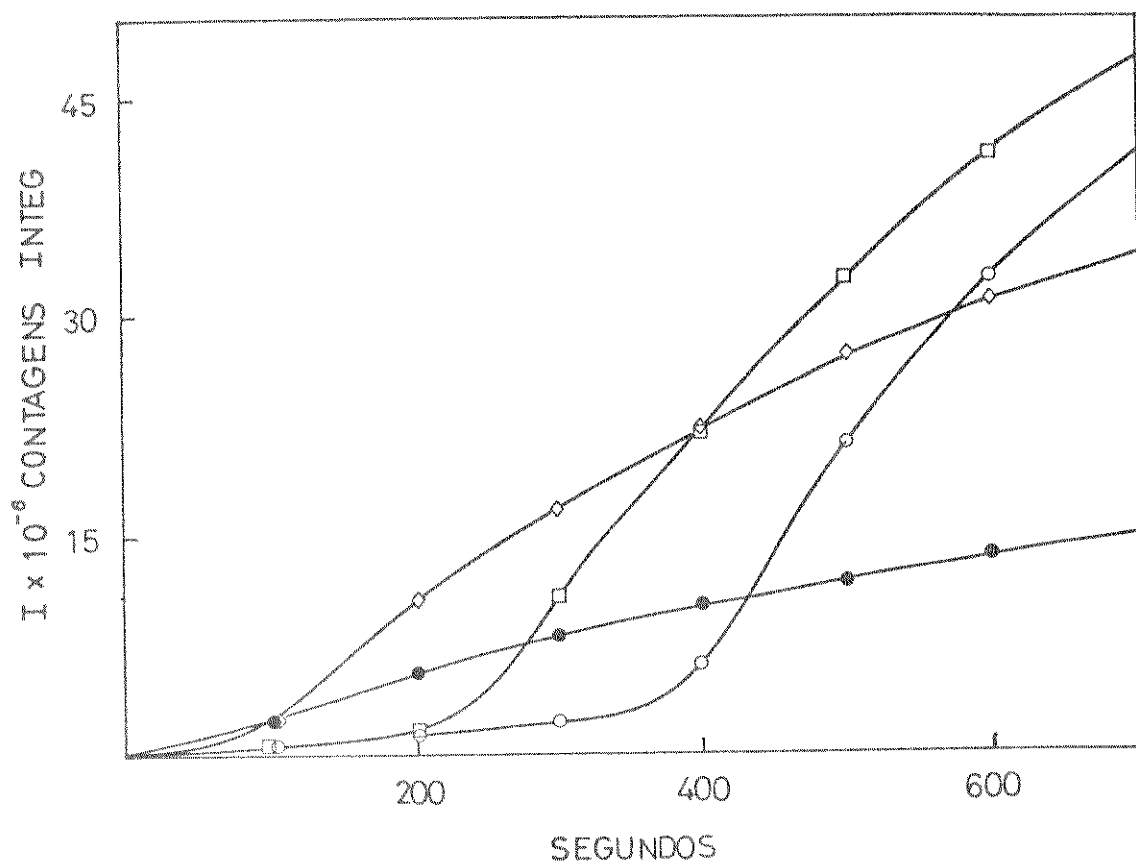


Fig. III.10 - Fotoemissão integrada do sistema AFO (1,2 mM)/HRP (2,2 μ M)/Glutaciona (388 μ M)/Catalase (150 unidades)/Mn⁺⁺ (77,5 μ M)/O₂ em 0,5M tampão fosfato pH 5,5 (-●-): (a) em presença de bilirrubina 7,5 μ M (-◇-); (b) em presença de bilirrubina 20 μ M e DABCO 10 ml (-○-); (c) em presença de bilirrubina 20 μ M (-□-).

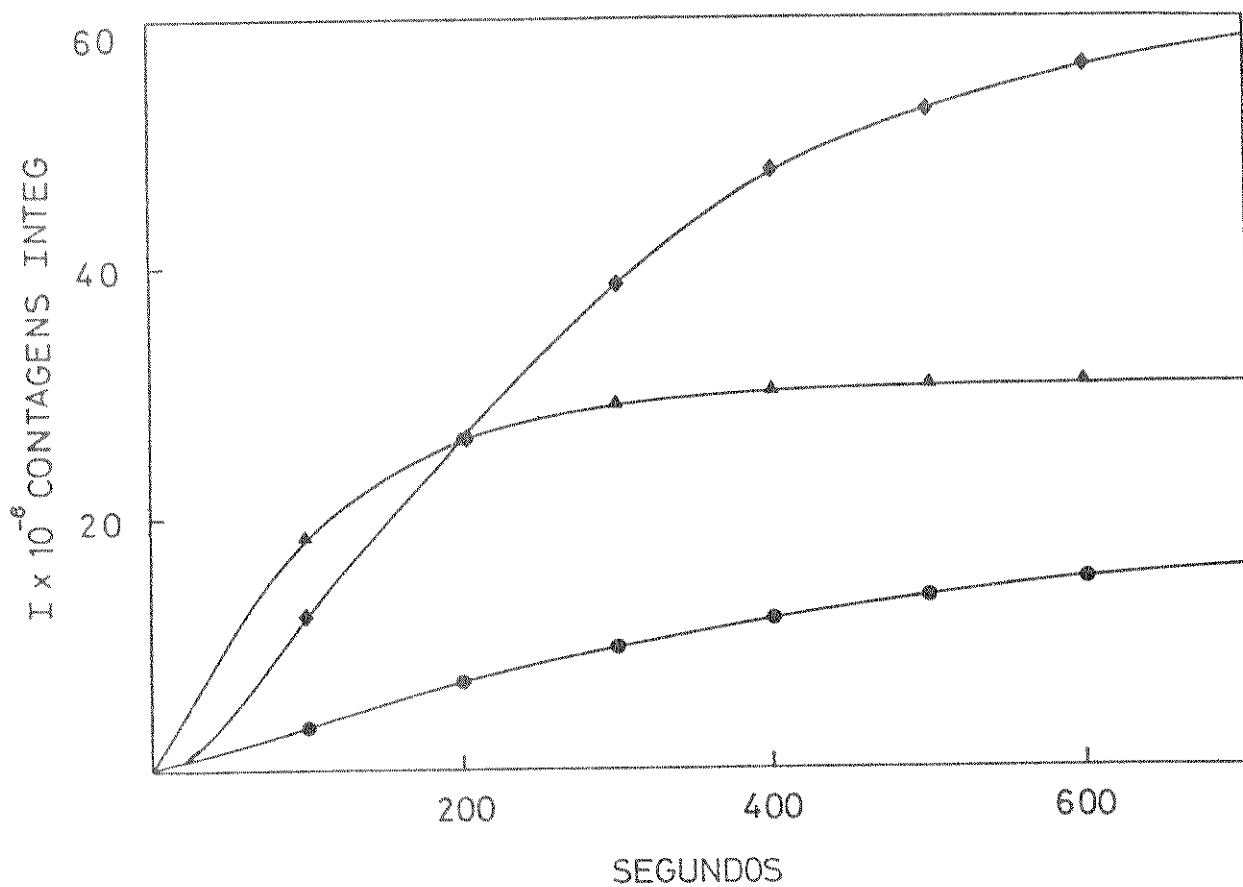


Fig. III.11 - Fotoemissão integrada do sistema Afo (1,2 mM)/HRP (2,2 μ M)/Glutathiona (388 μ M)/Catalase (150 unidades)/Mn⁺⁺ (77,5 μ M)/O₂ em 0,5M tampão fosfato pH 5,5: (a) em meio aquoso (-●-); (b) em meio deuterado (-▲-); (c) em meio deuterado na presença de bilirrubina 20 μ M (-◆-).

III.4 - DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO FÓLICO NO SISTEMA AFo/AF/Glu/Mn⁺⁺/O₂

O estudo da degradação do ácido fólico em presença da enzima extraída de eritrócitos (AF) foi baseado nos dados obtidos anteriormente usando HRP como enzima modelo. A presença de glutathiona e Mn⁺⁺ foi indispensável para a atividade de AF, porém a catalase inibiu a cinética de consumo do oxigênio. Isto tornou evidente que o peróxido de hidrogênio tem um papel importante na degradação do substrato por esta enzima.

Uma pesquisa prévia, utilizando a proteína extraída, em meio não ácido, das membranas das células vermelhas [53], mostrou que esta é inativa para degradar folato.

III.4.1 - Consumo do oxigênio

As melhores condições para a cinética de consumo do oxigênio foram definidas quando se adicionou as substâncias, na seguinte ordem e concentração: Tampão fosfato (0,5 M) pH 5,5, Ácido fólico (1,2 mM), AF (0,12 mg/ml), Glutathiona (388 µM) e Mn⁺⁺ (77,5 µM).

As Figs. III.12 (pág. 54) e III.13 (pág. 55) mostram a cinética do consumo de oxigênio nos sistemas utilizando AF extraída do sangue de uma pessoa normal e de uma pessoa portando adenocarcinoma retal, respectivamente. Em ambos os casos observa-se um pequeno tempo de indução (lag time), o qual pode desaparecer se o peróxido de hidrogênio for adicionado à reação.

III.4.2 - Reconhecimento dos produtos obtidos

Empregando-se os mesmos métodos desenvolvidos para o sistema modelo, foi possível identificar pterin-6-aldeído e ácido p-aminobenzoilglutâmico como os produtos de degradação do

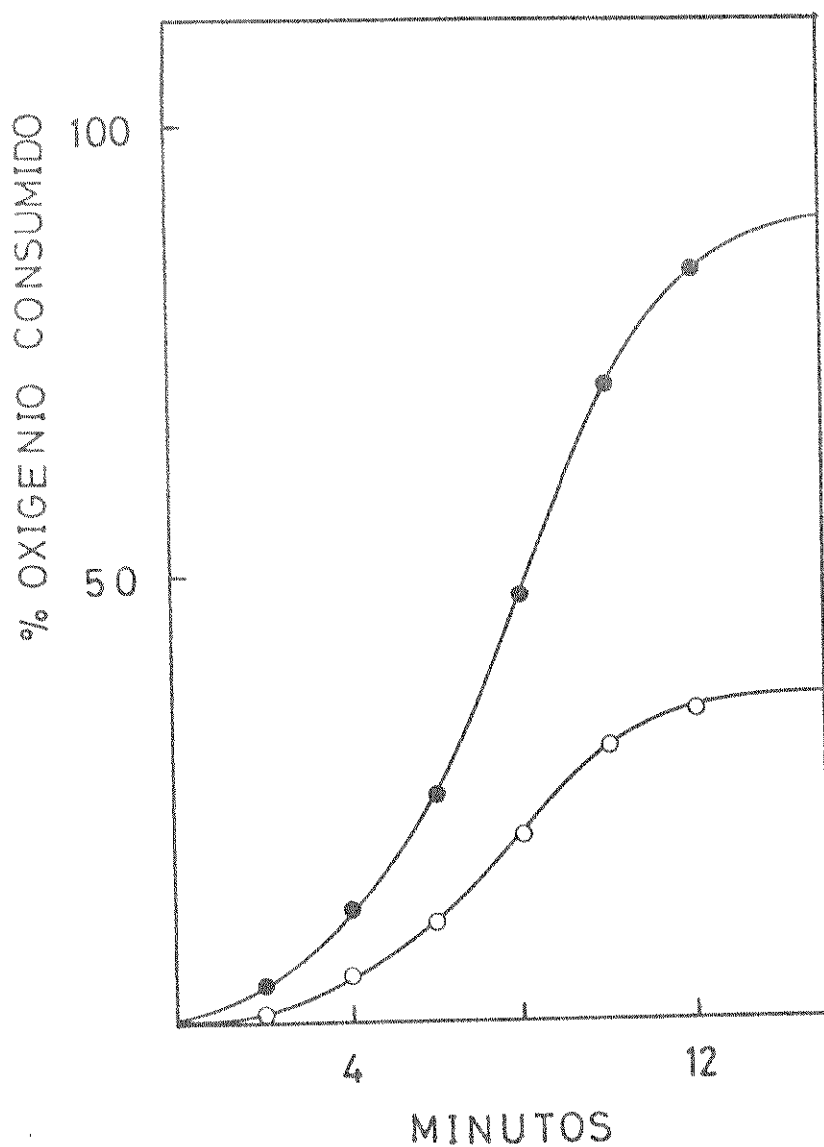


Fig. III.12 - Porcentagem de oxigênio consumido pelo sistema AFO (1,2 mM)/AF (0,12 mg/ml)/Glutathiona (388 μM)/ Mn^{++} (77,5 μM)/ O_2 em 0,5M tampão fosfato pH 5,5 (-●-): (a) na ausência de AFO (-○-).

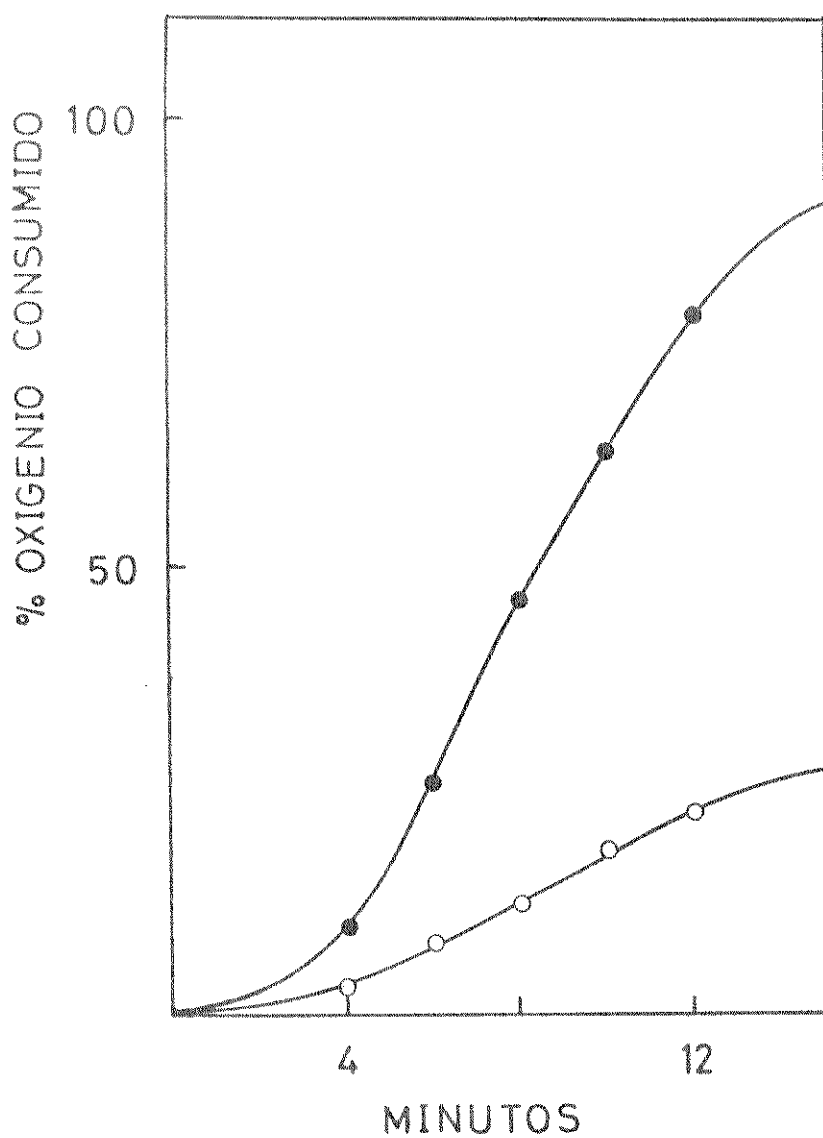


Fig. III.13 - Porcentagem de oxigênio consumido pelo sistema AFo (1,2 mM)/AFc (0,12 mg/ml)/Glutationa (388 μM)/Mn⁺⁺ (77,5 μM)/O₂ em 0,5M tampão fosfato pH 5,5 (-●-): (a) na ausência de AFo (-○-).

ácido fólico, quando peróxido de hidrogênio foi adicionado à reação. Por outro lado, a formação de pterin-6-carboxilato e ácido p-aminobenzoilglutâmico ocorreu quando o peróxido de hidrogênio foi suprimido da reação. Estes resultados são apresentados na tabela III.b (pág. 39) juntamente com os resultados obtidos para a degradação de folato por HRP.

III.4.3 - Geração de espécies excitadas

A Fig. III.14 (pág. 57) ilustra um gráfico da intensidade de emissão versus tempo para a reação onde a AF de um paciente normal foi empregada. Dentre as substâncias empregadas para se detectar a presença de espécies excitadas, apenas o DABCO e a bilirrubina apresentaram considerável efeito sobre a emissão total da reação, principalmente quando a bilirrubina estava presente.

No caso onde a AF de paciente portador de carcinoma (AFc) foi empregada, observou-se os mesmos efeitos, Fig. III.15 (pág. 58). No entanto, uma análise detalhada das duas figuras mostrou que para os primeiros minutos a atividade da AFc era aproximadamente 4 a 5 vezes maior que a da AF, em presença de DABCO e de bilirrubina.

Em ambos os casos nenhum efeito foi observado com SOD e benzoato, eliminando-se assim a hipótese de que O_2^- ou OH^* seriam responsáveis pela emissão observada.

O efeito da variação de temperatura sobre a supressão de bilirrubina também foi estudado e os resultados estão na Fig. III.16 (pág. 59).

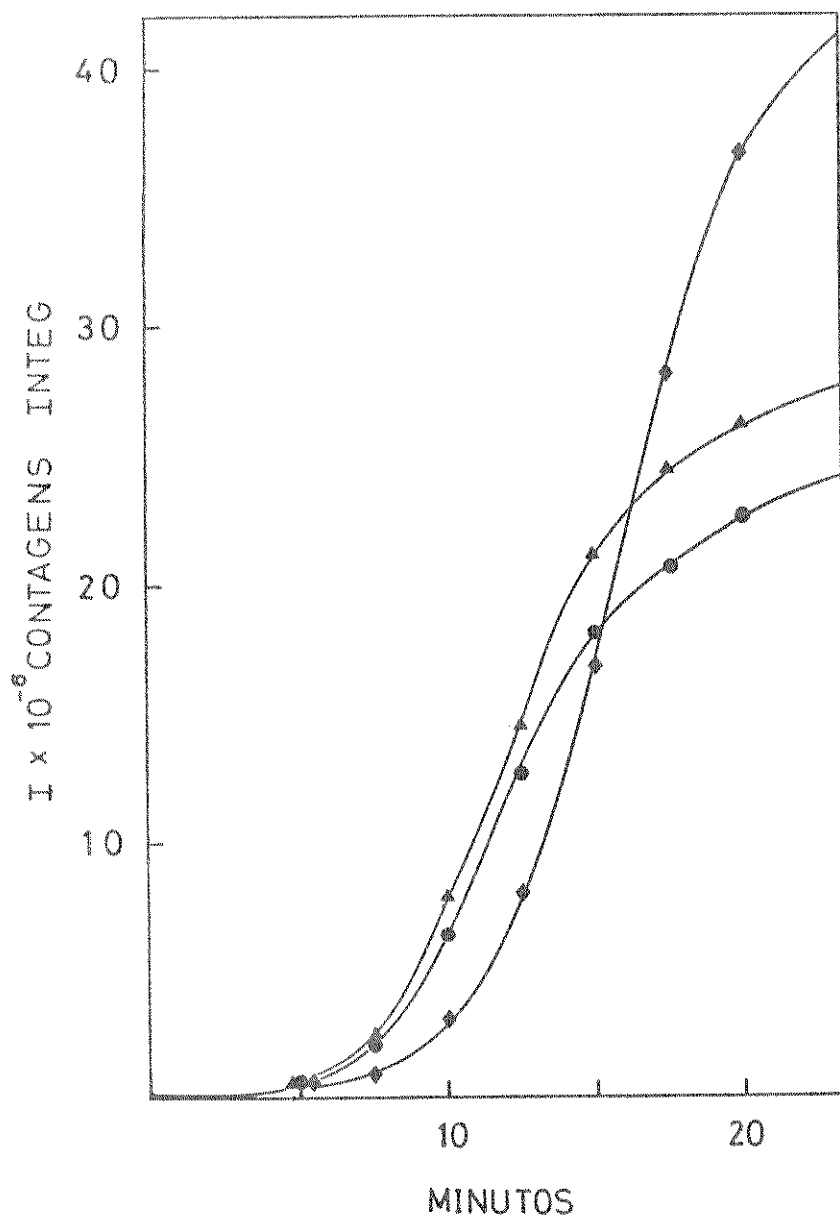


Fig. III.14 - Fotoemissão integrada do sistema AFO (1,2 mM)/AF (0,12 mg/ml)/Glutathiona (388 μ M)/Mn⁺⁺ (77,5 μ M)/O₂ em 0,5M tampão fosfato pH 5,5 (-●-): (a) em presença de DABCO 10 mM (-▲-); (b) em presença de bilirrubina 20 μ M (-◆-).

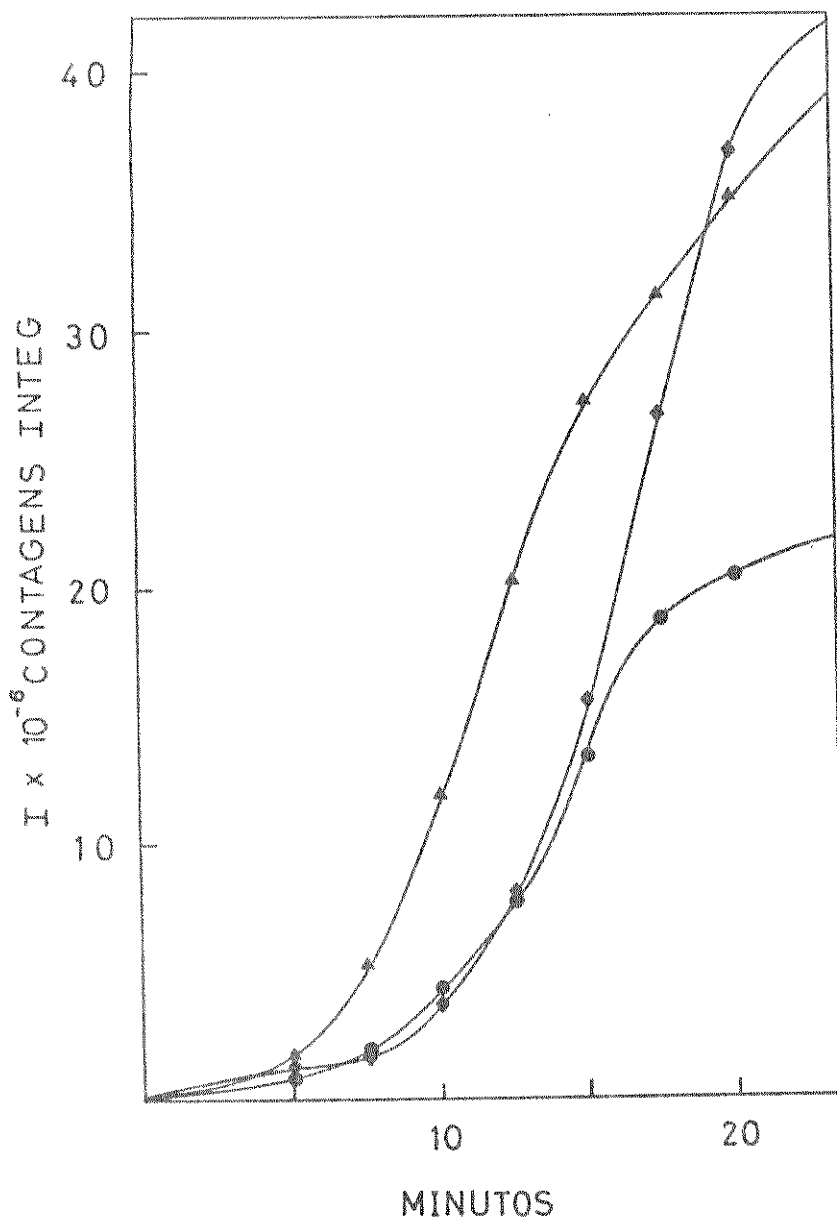


Fig. III.15 - Fotoemissão integrada do sistema Afo (1.2 mM)/AFc (0,12 mg/ml)/Glutaciona (388 μ M)/Mn⁺⁺ (77,5 μ M)/O₂ em 0,5 M tampão fosfato pH 5,5 (-●-): (a) em presença de DABCO 10 mM (-▲-); (b) em presença de bilirrubina 20 μ M (-◆-).

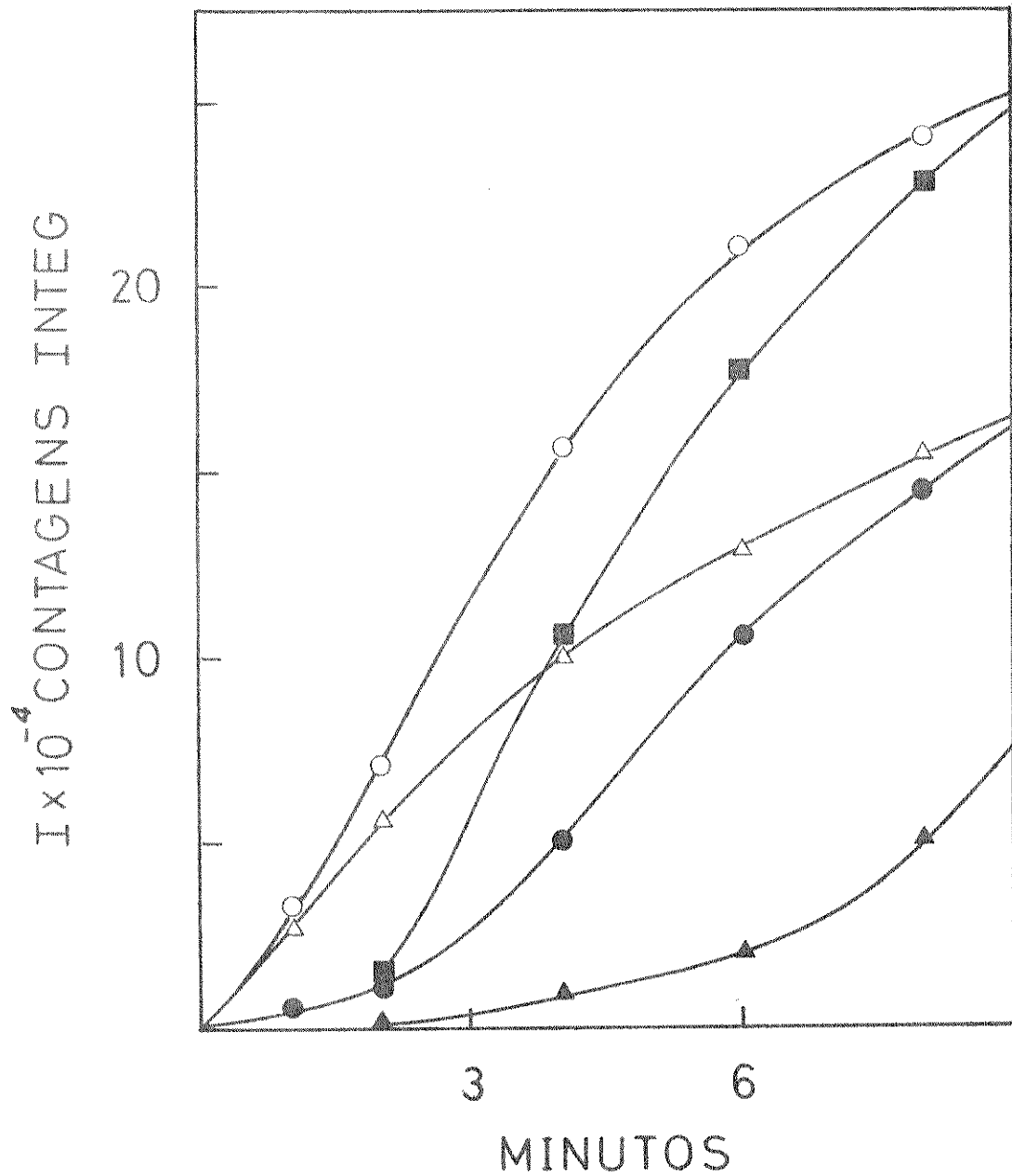


Fig. III.16 - Fotoemissão integrada do sistema AFO (1,2 mM)/HRP (2,2 μM)/Glutathiona (388 μM)/Catalase (150 unidades)/Mn⁺⁺ (77,5 μM)/O₂ em 0,5M tampão fosfato pH 5,5: (a) na faixa de (23-38)^oC a qual é essencialmente a mesma (-Δ-); (b) na presença de bilirubina 20 μM a 23^oC (-▲-); a 28^oC (-o-); a 35^oC (-■-) e a 38^oC (-o-).

III.5 - ESTUDO DA INATIVAÇÃO DA XANTINA OXIDASE

Como já foi comentado, o pterin-6-aldeído tem se destacado como um potente inibidor da xantina oxidase [19-24]. Como este é um dos produtos formados na degradação do ácido fólico quando HRP ou AF estão presentes, tornou-se possível estudar a atividade desta enzima na presença deste inibidor, durante a reação de conversão da xantina em ácido úrico.

Uma vez que a reação de degradação do ácido fólico envolve diversas variáveis, foi necessário primeiramente realizarmos um estudo preliminar sobre a variação da banda de absorção da xantina, na presença dos componentes da reação. Também determinamos as bandas de absorção da xantina, xantina oxidase e ácido úrico de acordo com nossas condições experimentais. As experiências foram desenvolvidas em pH 5,5, visto que é neste valor que o sistema de degradação do ácido fólico é mais ativo. A tabela III.d (pág. 61) resume os resultados obtidos nesta etapa.

Estudou-se também o efeito de cada substância sobre xantina e xantina oxidase para se verificar a ocorrência de uma possível conversão ou inativação da enzima. Os dados obtidos são apresentados na tabela III.e. (pág. 62).

Como era de se esperar, a inibição da xantina oxidase ocorreu na presença do pterin-6-aldeído, proveniente da degradação do ácido fólico pela HRP. Todavia, a dúvida com respeito à reversibilidade desta inibição, associada ao fato de que a formação de uma espécie excitada poderia estar inativando a xantina oxidase, nos levou a uma pesquisa complementar onde se empregou o método da diálise. Em todas essas diálises, cujos resultados são mostrados na tabela III.f (pág. 63), utilizou-se tampão fosfato (0,5 M e pH 5,5) como solvente e o tempo de duração foi padronizado em 22 horas. Manteve-se a temperatura a 0°C para evitar que a enzima perdesse sua atividade.

Tabela III.d - Absorção da xantina e da xantina oxidase na ausência e na presença do sistema AFo/HRP/Glu/Cat/Mn⁺⁺

Compostos ou Reações	Absorção (mn)
1. Xantina	266
2. Xantina oxidase	273
3. Xantina+Xantina oxidase	283
4. Ácido Úrico	288
5. Xantina+AFo	266
6. Xantina+AFo+HRP	266
7. Xantina+AFo+HRP+Glu	266
8. Xantina+AFo+HRP+Glu+Cat	266
9. Xantina+AFo+HRP+Glu+Cat+Mn ⁺⁺	266

|Xantina| = 50 μ M

|Glu| = 388 μ M

|Xantina oxidase| = 0,1 mg/ml

|Cat| = 150 unidades

|Ácido úrico| = 1 μ M

|Mn⁺⁺| = 77,5 μ M

|AFo| = 1,2 mM

|HRP| = 2,2 μ M

OBS: em todas as experiências acima o pH foi 5,5 e o tampão utilizado foi fosfato de sódio (0,5 M).

Tabela III.e - Cinética de consumo de xantina pela xantina oxidase na presença e na ausência do sistema AFo/HRP/Glu/Cat/Mn⁺⁺.

Reações	Absorção (nm)	Concentração de xantina consumida (µM)*	% de Atividade
1. Xantina+Xantina oxidase	283	24,0	100
2. Xantina+AFo+HRP+Glu+Cat+Mn ⁺⁺ +Xantina oxidase	283	5,5	33,0
3. AFo+HRP+Glu+Cat+Mn ⁺⁺ +Xantina oxidase+Xantina	266	0,0	0,0
4. Xantina+Pt-6-CHO+Xantina oxidase	266	0,0	0,0
5. Xantina+AFo+Xantina oxidase	283	19,6	81,7
6. Xantina+HRP+Xantina oxidase	266,283	14,2	59,2
7. Xantina+Glu+Xantina oxidase	266,283	15,3	63,7
8. Xantina+Cat+Xantina oxidase	283	17,4	72,5
9. Xantina+Mn ⁺⁺ +Xantina oxidase	283	20,5	85,0

* após 5 minutos mediu-se a concentração da xantina consumida.

|Xantina| = 50 µM

|Glu| = 388 µM

|Xantina oxidase| = 0,1 mg/ml

|Cat| = 150 unidades

|AFo| = 1,2 mM

|Mn⁺⁺| = 77,5 µM

|HRP| = 2,2 µM

|Pt-6-CHO| = 2,5 µM

Tabela III.f - Diálise e cinética de consumo da xantina pela xantina oxidase na ausência e na presença do sistema AFo/HRP/Glu/Cat/Mn⁺⁺.

Reações	Concentração de xantina consumida (µM)	% de Atividade
1. Xantina oxidase+Xantina	24,0	100
2. AFo+HRP+Glu+Catal+Mn ⁺⁺ +Xantina oxidase+Xantina	2,0	8,3
3. AFo+HRP+Glu+Catal+DABCO+Xantina oxidase+Mn ⁺⁺ +Xantina	2,0	8,3
4. AFo+HRP+Glu+Catal+Bil+Xantina oxidase+Mn ⁺⁺ +Xantina	0,0	0,0
5. Pt-6-CHO+Xantina oxidase+Xantina	20,0	83,3

|Xantina| = 50 µM

|Mn⁺⁺| = 77,5 µM

|Xantina oxidase| = 0,1 mg/ml

|DABCO| = 10 mM

|AFo| = 1,2 mM

|Bil| = 20 µM

|HRP| = 2,2 µM

|Pt-6-CHO| = 2,5 µM

|Glu| = 388 µM

|Cat| = 150 unidades

OBS: Cinética após 22 horas de diálise a 0°C em tampão fosfato (0,5 M) pH 5,5.

CAPÍTULO IV

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A Fig. III.3 (pág. 38) mostra o consumo de oxigênio em função do tempo para alguns sistemas aleatórios, onde se pode observar claramente que não existe uma adição linear de efeitos (por exemplo -▲- e -□-), indicando que deva haver uma interação conjunta entre os reagentes.

As alternativas mostram que a degradação do substrato é máxima quando o Mn^{++} e a Glutathiona estão presentes na reação juntamente com a catalase, cuja ausência (-■-) produz uma queda de 50% na eficiência de oxidação do substrato. Como a catalase é uma enzima específica para a reação:



isso nos sugeriu que H_2O_2 deveria ser formado durante a oxidação do ácido fólico, via um passo competitivo para a reação principal. Isto foi notado quando se fez o estudo do sistema padrão (HRP/Glu/ Mn^{++}), cuja atividade da enzima é máxima a pH 5,5 como mostra a Fig. III.1 (pág. 33). Durante este estudo observou-se o desaparecimento do grupo SH através do consumo de oxigênio pela glutathiona (com diferentes concentrações) na ausência e na presença da catalase, (tab. III.a, pág. 34), usando-se Mn^{++} como cofator, o qual pareceu essencial para a atividade enzimática. Observa-se que a oxidação da glutathiona é sensivelmente reduzida, podendo ser recuperada se a catalase desnaturada é colocada no meio. Esse efeito inibidor da catalase torna evidente que essa reação depende da produção de H_2O_2 , cuja detecção e concentração

nos primeiros 30 seg. de reação foi feita pelo novo método de De Toledo e col. [44], baseado na detecção do peróxido de hidrogênio por quimiluminescência na presença de eosina [45]. A Fig. III.2 (pág.36) mostra o efeito de eosina na fotoemissão e o aumento da mesma quando o EDTA é adicionado, o qual é conhecido por acelerar eficientemente tanto o decaimento do HRP I, quanto o desaparecimento do HRP II [45]. Também pode ser notado o efeito inibidor da catalase, indicando mais uma vez a presença de H_2O_2 .

Desses resultados parece evidente que a glutathiona livre ocupa um papel importante na oxidação do substrato, e que a presença de H_2O_2 parece inibir esse processo. Isso foi evidenciado quando se fez o estudo da oxidação de AFo na presença de peróxido de hidrogênio gerado in situ pela reação de Glicose/Glicose oxidase, (Fig. III.4 pág. 42). Resultado semelhante foi obtido quando H_2O_2 de fonte externa foi adicionado à reação, Fig. III.5 (pág. 43). Parece portanto que existe uma competição da enzima entre as reações:



onde esta última estaria prejudicando a atividade enzimática da reação principal(4.1), por conjugar a glutathiona livre, a qual é requerida na forma reduzida como cofator, e por formar H_2O_2 que é tóxico para a enzima. Entretanto, este problema pode ser eficientemente contornado quando catalase está presente, pois além de favorecer a reação(4.1)(por inibir a formação de peróxido de hidrogênio, via oxidação da glutathiona), ela evita o efeito

nocivo desta substância sobre o HRP.

A presença ou ausência de ATP, por sua vez não alterou a eficiência da reação, contrariando a hipótese de Braganca [18], que diz serem a Glu e o Mn^{++} necessários para a atividade enzimática, como mostra a Fig. III.5 (pág. 43). Ainda de acordo com este autor, para os valores de pH 5,5 (tampão fosfato 0,5 M) e temperatura na faixa de 37-38°C a enzima apresentou atividade máxima, similarmente à enzima extraída de eritrócitos com função AFO oxidase, Fig. III.6 (pág. 45).

A análise dos produtos formados na reação indicou que o pterin-6-aldeído e o ácido p-aminobenzoilglutâmico (amina diazotizável) eram os principais produtos encontrados, com base nos valores de Rf [8], de absorção na região do UV e no teste de Bratton-Marshall [7]. A tabela III.b (pág. 39) mostra que existe uma forte similaridade entre os valores de Rf e absorção para a reação (1) e para o pterin-6-aldeído de fonte externa (6).

Pelo teste de Bratton-Marshall [7], tabela III.c (pág. 41), fica claro que houve formação de amina diazotizável, comparando-se a coloração das reações (1) e (2) e os valores de absorbância a 540 nm. A fraca coloração observada quando somente AFO está presente, parece indicar que este possui uma ligeira contaminação, atribuída à presença do pterin-6-aldeído, segundo as pesquisas de Dietrich e col. [21].

Um estudo comparativo da oxidação do substrato entre H_2O e D_2O mostrou que o meio pode influenciar na atividade enzimática. O resultado na Fig. III.6 (pág. 45) mostra que em meio deuterado a atividade da enzima é aproximadamente o dobro em relação ao meio comum, para as mesmas condições de pH, temperatura e concentração. Este resultado parece estar de acordo com alguns trabalhos realizados sobre o efeito do D_2O nas proteínas. Henderson e col. [54] investigaram o efeito do D_2O sobre o equi-

líbrio associação - dissociação em subunidades de proteínas e observaram que a substituição de pontes de hidrogênio por pontes de deutério confere maior estabilidade a proteína, devido ser maior a força de ligação.

Appel e Yang [55] estudando a mudança conformacional do ácido Poli-L-glutâmico e da Poli-L-lisina nestes dois meios, mostraram que existe uma mudança na estabilidade conformacional destas moléculas, que pode ser atribuída às mudanças nas constantes de dissociação dos grupos ionizáveis, quando o meio é deuterado.

Schachman e Smith [56] também observaram o efeito estabilizador do D_2O sobre a estrutura quaternária do Gliceraldeído fosfato desidrogenase, mesmo à temperatura ambiente, contra a espontânea inativação e precipitação apresentada em meio aquoso.

Merkel e col. [57] analisaram o efeito do meio deuterado sobre o oxigênio singlete, no estado eletronicamente excitado ($^1\Delta_g$). Medindo a eficiência de fotooxidação, de DPBF (1,3-difenilisobenzofurano) numa mistura de D_2O-CD_3-OD , eles mostraram que esta era dez vezes maior quando comparada à mistura H_2O-CH_3-OH . Desde que a constante de velocidade da reação não foi alterada pela troca de solvente, eles atribuíram esse efeito à uma maior vida média dessa espécie excitada (posteriormente calculada em 20 μ seg. para D_2O e 2 μ seg. para H_2O). Os estudos de Merkel e col. [57] não só confirmaram o efeito do deutério na vida média de oxigênio singlete ($^1\Delta_g$), como também forneceram um método totalmente novo para se determinar a sua participação em reações de oxidação.

De acordo com esses dados, parece razoável atribuírmos o efeito observado no nosso sistema, a uma maior estabilização do HRP nesse solvente.

Também, a partir desse ponto tornou-se interessante investigar a participação de alguma espécie excitada, principal

mente o $^1O_2^*$, na degradação do ácido fólico.

Os testes prévios para a oxidação de AFo na presença de SOD e de Benzoato, dois conhecidos protetores de sistemas enzimáticos na formação de superóxido ânion e radical hidroxila, como se segue:



mostraram que eles não alteram o curso da reação de oxidação de AFo, mesmo quando SOD desnaturada foi empregada. Tampouco essas substâncias mostraram qualquer efeito na fotoemissão observada nesta reação, Fig. III.7 (pág. 46). Esses primeiros testes evidenciaram que uma espécie no estado eletronicamente excitado era formada durante a degradação do substrato, e que evidentemente, superóxido ânion e radical hidroxila não estariam participando deste processo.

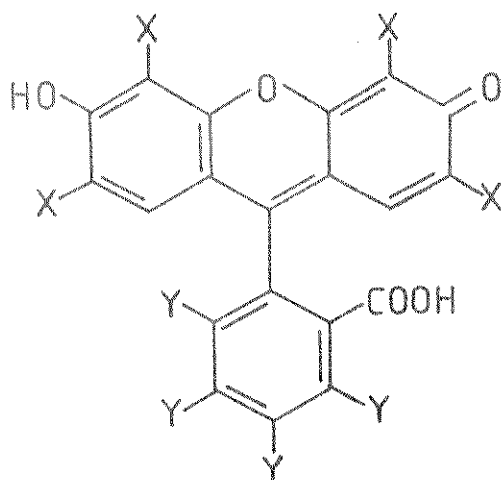
O passo seguinte foi o estudo da fotoemissão do sistema, para se verificar a possível formação de algum produto eletronicamente excitado, na presença dos seguintes agentes fluorescentes xantênicos:

X = Y = H fluoresceína

X = Br Y = H eosina

X=I Y=H eritrosina B

X=I Y=Cl rosa bengala



Tais agentes são eficientes na detecção de tripletes não emissivos eletronicamente excitados, por transferência de energia no processo proibido pela lei de conservação de spin, abaixo exemplificada:



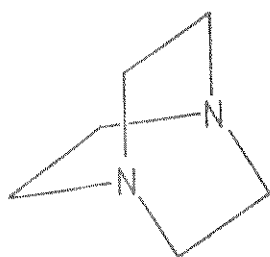
Este processo ocorre pela presença de átomos pesados na molécula (28).

Um fraco efeito desses aceptores sobre a fotoemissão do sistema é visto na Fig. III.7 (pág. 46) em contraste com um considerável aumento produzido quando o DABCO está presente.

Vários trabalhos tem sido publicados sobre o efeito do DABCO, quando o ${}^1O_2^*$ está presente. Ouannes e Wilson [51] observaram o efeito do DABCO nas reações de amins terciárias alifáticas com oxigênio singlete ${}^1\Delta_g$, gerado por descarga de rádio

freqüência. Não foi detectado qualquer produto de reação do bromobenzeno com $^1O_2^*$, durante duas horas, na presença do DABCO. Quando este foi adicionado a uma solução de DPBF, a oxidação ocorreu muito vagarosamente que na sua ausência. Testando outras aminas, eles mostraram que este efeito também poderia ser estendido às aminas alifáticas terciárias com aparentemente nenhuma reatividade para $^1O_2^*$, na presença do DABCO. Segundo os autores, estes resultados sugerem que o DABCO não é oxidado na presença desta espécie, visto que nenhuma reação química foi constatada. Também nenhuma fotoemissão foi observada na desativação do $^1O_2^*$ por DABCO, cuja existência de um estado tripleto (abaixo de 22,5 kcal), para o qual o oxigênio singlete pudesse transferir sua energia, parece improvável. Finalmente, os pares de elétrons isolados de DABCO levaram os autores a concluir que a inibição de $^1O_2^*$ pudesse ocorrer através de um processo de transferência de carga, e que esse efeito poderia ser aproveitado como um teste útil em reações que envolvessem essa espécie.

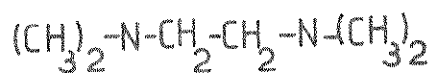
Outra pesquisa suportando essa idéia foi publicada por Krinsky e Deneke [58], sobre a emissão dimol aumentada do $^1O_2^*$. Este seria gerado quimicamente, na presença de DABCO, DABCO II e DABCO III, cujas fórmulas estão representadas:



DABCO
1,4 diazobiciclo
(2,2,2) octano



DABCO II
N,N' dimetil
piperazina



DABCO III
N,N,N', N' tetrametil
etilenodiamina

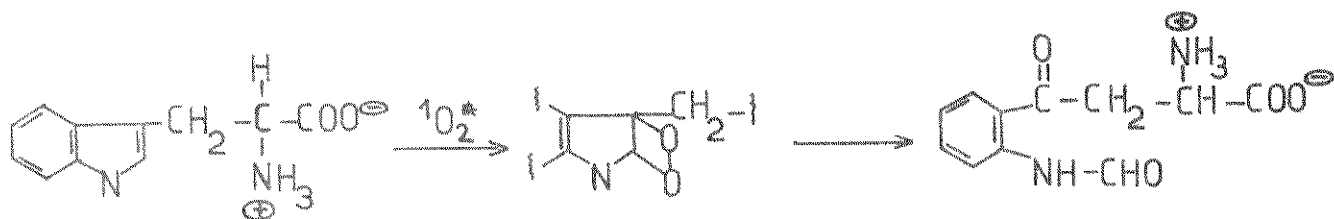
Destas três aminas, somente o DABCO e o DABCO II induzi

ram a emissão estimulada de luz, a qual foi atribuída a $^1\text{O}_2^*$ (com base no valor de λ observado a 634 nm). O análogo acíclico DABCO III não foi efetivo, uma vez que inibiu a emissão dimol, podendo indicar que fatores estéricos devem ser importantes nessa reação. Analisando os resultados dessa experiência, os autores sugeriram que o aumento da emissão dimol do $^1\text{O}_2^*$ poderia ser atribuída à concentração localizada dessa espécie em solução, ou à velocidade e extensão de nucleação das bolhas de oxigênio. A reação de amins terciárias, com oxigênio singlete $^1\Delta_g$, deve ocorrer através de um complexo de transferência de carga, o qual pode aumentar a vida média do $^1\text{O}_2^*$ e, portanto, facilitar a emissão dimol. De qualquer forma, eles admitem que esta espécie não reaja quimicamente com estas amins e, que o DABCO e o DABCO II aumentam a emissão dimol ao mesmo tempo que inibem a reatividade química do $^1\text{O}_2^*$.

Parece portanto razoável admitirmos a formação do $^1\text{O}_2^*$ no nosso sistema, visto que foi observado um aumento na fotoemissão na presença do DABCO, muito embora esse não tenha sido o único critério adotado.

O efeito de aminoácidos sobre o $^1\text{O}_2^*$ também foi testado para a nossa reação, com base nos trabalhos de Nilsson e col. [50]. Estes desenvolveram uma pesquisa sobre a evidência da participação do $^1\text{O}_2^*$ ($^1\Delta_g$) na oxidação fotodinâmica de aminoácidos. Dos resultados obtidos, tanto em H_2O como em D_2O , eles sugeriram que estas reações deveriam ocorrer por um mecanismo envolvendo o $^1\text{O}_2^*$, tendo em vista a inibição da fotooxidação do triptofano, metionina, histidina e guanossina por N_3^- e tetrametiletileno, conhecidos inibidores dessa espécie. O mecanismo pelo qual esses aminoácidos inibem o $^1\text{O}_2^*$ não foi elucidado neste trabalho. Entretanto, foi sugerido recentemente que a formação de um dioxetano intermediário poderia estar envolvida [59], como ilustrado abai-

xo para o triptofano:



triptofano

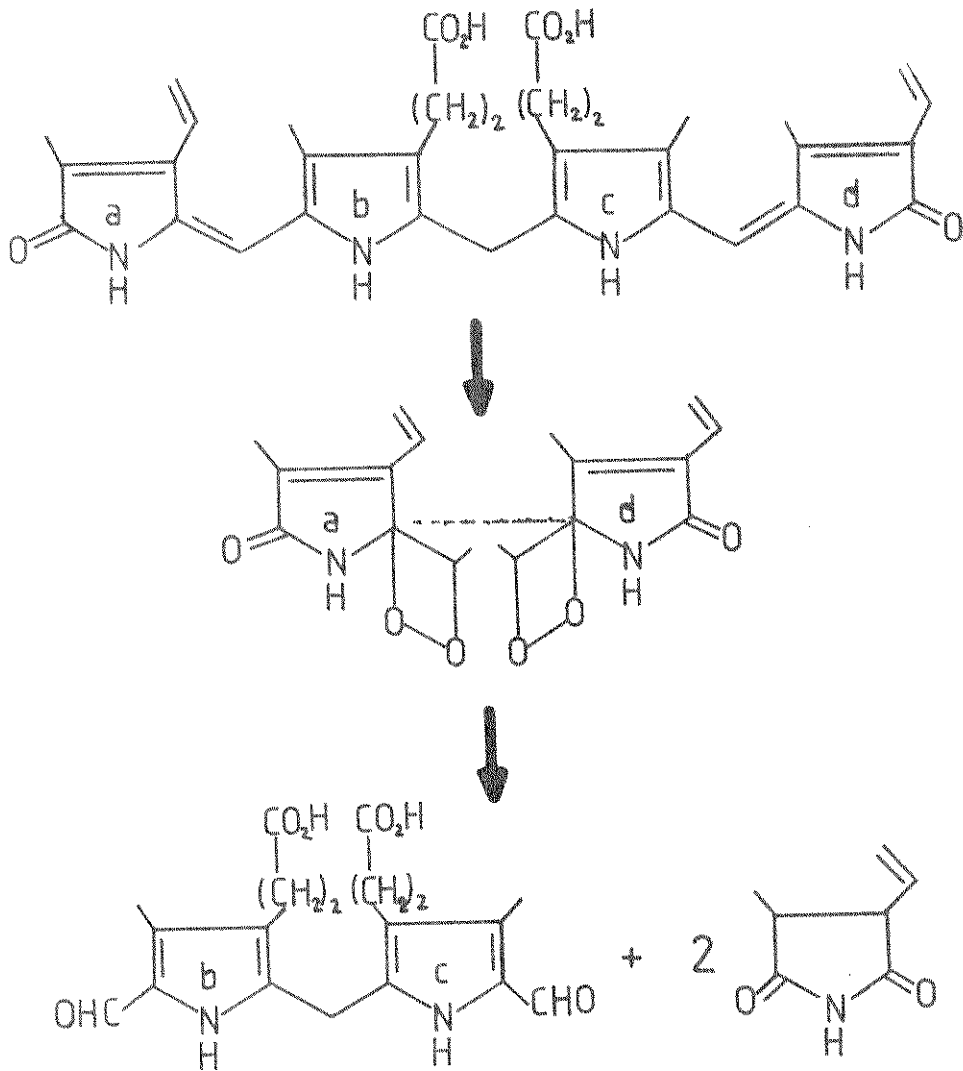
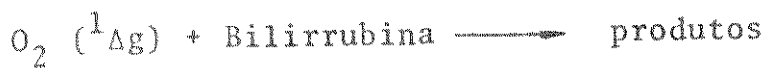
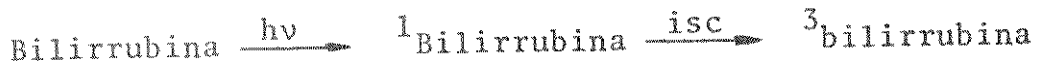
N-formilquinurenina

(4.7)

Todavia, os resultados obtidos com a histidina, guanosina e o triptofano indicam que tais supressores não afetam a reação, como evidencia a Fig. III.8 (pág.48). Isto talvez seja devido a baixa concentração em que foram utilizados, visto que a fotoemissão foi quadruplicada quando o triptofano foi adicionado numa concentração dez vezes maior que a permitida para não causar danos à enzima. Entretanto, o efeito causado nessas condições parece indicar que existe uma supressão nos primeiros minutos da reação, talvez para formar o intermediário dioxetano, cujo produto no estado eletrônico excitado seria o responsável pelo aumento da fotoemissão.

Dados interessantes para a fotoemissão do sistema foram obtidos na presença de bilirrubina (um pigmento que é transportado na corrente sanguínea como um complexo com sero albumina) a qual está presumivelmente em equilíbrio com a bilirrubina livre e outras proteínas complexas. Nos últimos anos, o número de pesquisas sobre o mecanismo de fotodegradação da bilirrubina tem aumentado, pois este é o meio utilizado para eliminar excesso desse pigmento, que pode ser letal para crianças recém-nascidas. Todos os trabalhos publicados nesta área estão de acordo com a participação do $^1O_2^*$ nesse mecanismo [60-63], o qual pode ser exem-

plificado pelo esquema abaixo:



Os resultados obtidos em nossa reação, Fig. III.9 (pág. 49), parecem concordar com este tipo de mecanismo. Como pode ser observado, existe um tempo de indução nos primeiros dois minutos de reação, o qual pode ser atribuído a formação do intermediário dioxetano de bilirrubina, seguida de um forte aumento da emissão proveniente do fotoproduto obtido. Evidência de que o carbonilo acima deve ser o responsável por essa fotoemissão é sugerida pelo efeito produzido quando o DBAS, um acceptor conhecido por detectar tri

pletos eletronicamente excitados, está presente. Quando esse acceptor foi colocado na reação na ausência de bilirrubina, nenhuma alteração foi observada, e portanto este foi um dos critérios utilizados para eliminar a possível formação de algum produto triplete excitado, durante a degradação do substrato. Entretanto, quando adicionado no sistema, em presença da bilirrubina, ocorreu um aumento adicional na fotoemissão total, a qual pareceu dependente do tempo de adição de DBAS, e que sugeriu a ocorrência de uma transferência de energia do produto excitado para este acceptor.

Outro resultado interessante foi obtido quando a bilirrubina e o DABCO foram adicionados simultaneamente na reação. Vê-se pela Fig. III.10 (pág. 51) que a presença do DABCO provocou uma diminuição na fotoemissão total e um tempo de indução maior, embora o efeito de bilirrubina não tenha sido alterado.

Isto parece sugerir que existe uma ligeira competição entre estes dois supressores para inibir o $^1O_2^*$ formado e que DABCO não reaja, de fato, com esta espécie. Entretanto, como já visto anteriormente, o DABCO diminui a concentração disponível para reagir com bilirrubina. Também pode-se verificar pela Fig. III.10 que uma diminuição na concentração da bilirrubina (que estaria disponível para reagir com o $^1O_2^*$), parece provocar uma diminuição na intensidade total da emissão.

O efeito do meio sobre a emissão da reação, bem como da bilirrubina, é mostrado na Fig. III.11 (pág. 52). Para as mesmas condições experimentais, o meio deuterado parece prover uma maior estabilidade tanto para a enzima quanto para o $^1O_2^*$. Esta estabilidade parece favorecer também a formação do intermediário da bilirrubina, por permitir um maior tempo de contacto entre esta e $^1O_2^*$, com um concomitante aumento na eficiência da fotoemissão do sistema.

A estabilidade deste intermediário também não é afetada por temperaturas em torno de 37°C , Fig. III.16 (pág. 59), porém para temperaturas menores, nota-se a crescente instabilidade do intermediário. Na mesma faixa de temperatura estudada, 23 a 38°C , quase nenhum efeito na ausência da bilirrubina foi observado, parecendo indicar que neste caso o intermediário apresenta uma certa estabilidade com temperatura.

Com estes e outros resultados anteriores obtidos para a reação HRP/AFo, tornou-se possível selecionar as melhores condições para o estudo do consumo de oxigênio, do reconhecimento dos produtos e da fotoemissão na presença dos supressores. Tais condições foram então, adaptadas diretamente na investigação da oxidação do AFo na presença da enzima extraída de eritrócitos humanos como já realizado por Braganca [18].

Os resultados do consumo de oxigênio para as reações AF/AFo e AFc/AFo estão representados nas Figs. III.12 e III.13 (págs. 54, 55). Suplementando o meio de reação com os mesmos cofatores, e obedecendo as mesmas condições de temperatura, pH e concentrações, observou-se que para estes sistemas a presença da catalase inibiu consideravelmente a reação. Por outro lado, se H_2O_2 for adicionado, o tempo de incubação observado nos primeiros minutos é eliminado e a reação não é inibida, sugerindo que o peróxido de hidrogênio deva ocupar um papel de destaque nesta degradação in vivo.

Na tabela III.b (pág. 39), observa-se que os produtos obtidos nos sistemas AF/AFo e AF/Cat/AFo apresentam valores de R_f e de absorção no UV similares aos do pterin-6-ácido; enquanto os produtos dos sistemas AF/ H_2O_2 /AFo e AFc/AFo exibem uma similaridade entre os valores de R_f e absorção no UV e o pterin-6-aldeído. A formação da amina diazotizável foi confirmada em todas essas reações pelo teste de Bratton-Marshall [7] tabela III.c

(pág. 41).

A diferença entre os derivados pterin obtidos nestas duas reações parece indicar que existe uma contaminação de xantina oxidase, na preparação das enzimas de eritrócitos normais, que estaria promovendo a oxidação do pterin-6-aldeído, no sistema AF/AFo, para o pterin-6-ácido. A adição de H_2O_2 nesse sistema, o qual é um forte inibidor da xantina oxidase [64] leva somente à produção do pterin-6-aldeído. Por outro lado, como a atividade da xantina oxidase é baixa em casos de câncer [26^{a,b}-27] a adição de H_2O_2 não afetaria a reação do aldeído para ácido, uma vez que nesse caso ela não ocorre a nível detectável. Existe porém a possibilidade de que in vivo ocorra uma alta concentração celular de H_2O_2 em pessoas cancerosas, as quais não teriam um nível de catalase suficiente para proteger o organismo deste peróxido proveniente de algum metabolismo, nem mesmo para proteger a xantina oxidase.

A fotoemissão desses sistemas foi estudada empregando-se apenas dois supressores para o $^1O_2^*$; DABCO e Bilirrubina. Isto porque testes preliminares com supressores para outras espécies (por ex. $O_2^{\bar{}}$ e OH^{\cdot}) e com aceptores de energia de espécies tripletes, não mostraram efeito pronunciado nas reações em questão: Nas Figs. III.14 e III.15 (pág. 57, 58) são apresentados os resultados da fotoemissão dessas reações, juntamente com o efeito do DABCO e da Bilirrubina. O tempo de indução maior para a reação AF /AFo em relação à reação AFc/AFo sugere que neste último caso a atividade da enzima é ligeiramente maior, o que está de acordo com os trabalhos de Stea e col. [8]. Estes, ao analisarem a urina de portadores de câncer observaram uma quantidade elevada de pterin-6-aldeído, a qual demonstraram ser dependente do grau de agravamento da doença, ou seja, a degradação de AFo

ocorreria num nível cada vez mais intenso com o avanço da doença, o que sugere ser a atividade da enzima aumentada nesses casos.

A bilirrubina nessas reações demonstrou um comportamento semelhante ao observado para o HRP/AFo, o que torna evidente a formação do mesmo intermediário da bilirrubina fotooxidada, discutido anteriormente. Por outro lado, o aumento na eficiência da emissão do sistema AFc/AFo, em presença de DABCO, parece indicar que existe uma atividade maior da enzima extraída de eritrócitos de pessoas cancerosas para degradar o ácido fólico (ou seja, turn-over de AFc > turn-over de AF). Isto propiciaria um número maior de emissões dimol, devido a uma maior concentração de $^1O_2^*$ no meio.

É interessante notarmos, nesta altura, que nos três sistemas estudados até o momento, a degradação de AFo ocorre via formação do pterin-6-aldeído e de uma amina primária (ácido P-aminobenzoilglutâmico ou amina diazotizável), como o proposto para a desalquilação de N-alquilaminas [13-17]. Os resultados da fotoemissão desses sistemas, bem como a correlação entre o O_2 consumido e a fotoemissão para HRP/AFo, sugerem que o $^1O_2^*$ participa como um dos produtos* na degradação do ácido fólico, similarmente como para o mecanismo proposto de degradação de N-Nitrosamina catalisada por HRP [17]. Assim, tomando-se por base o mecanismo de Benson, propõe-se o seguinte esquema para a degradação enzimática do folato:

* Ver Fig. IV.1 (pág. 79).

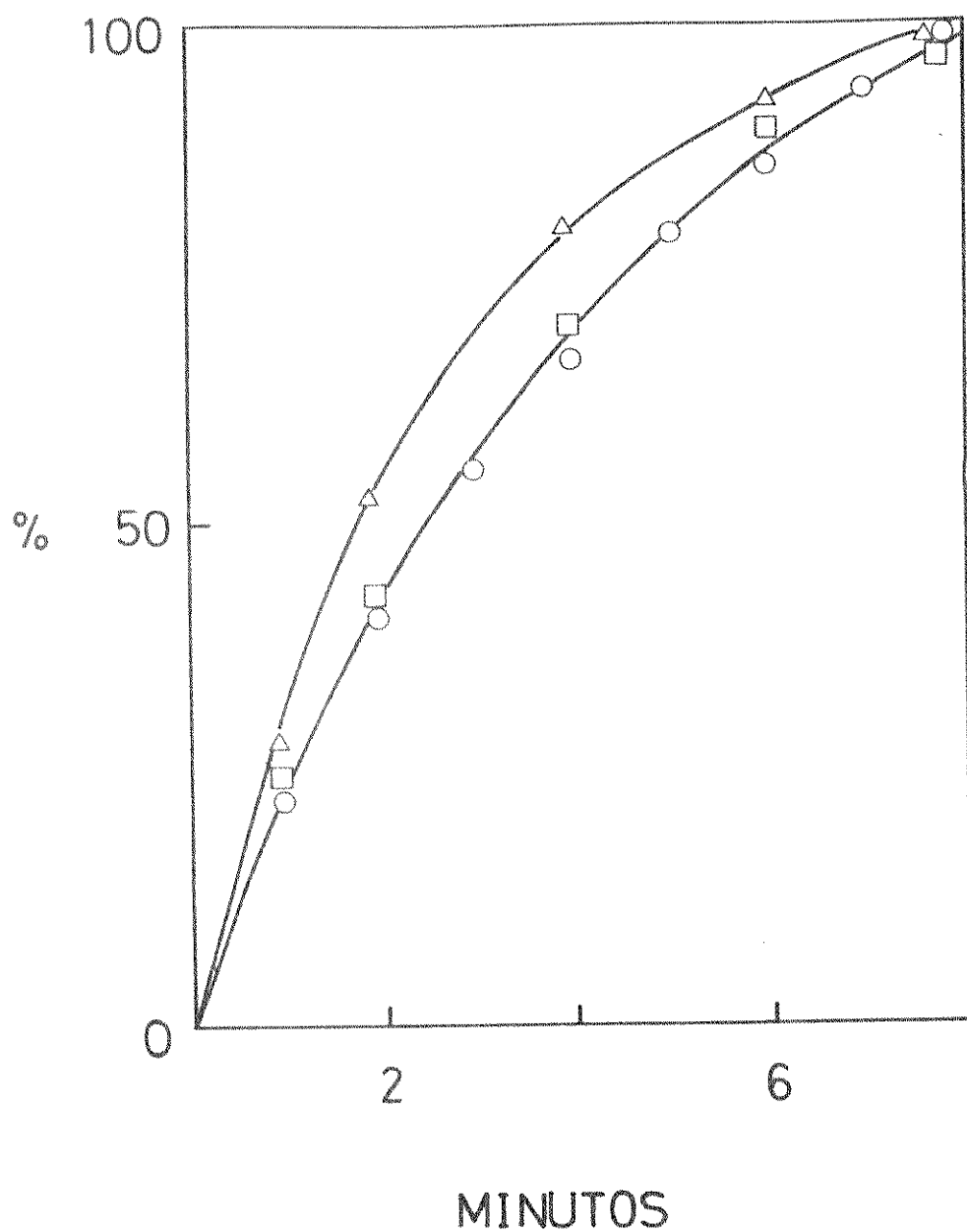


Fig. IV.1 - Correlação entre o oxigênio consumido (-Δ-), e a fotomissão integrada, obtida no contador de cintilação líquida (-□-), e no fotocontador (-O-) para o sistema AFo/HRP/Glu/Catalase/Mn.

do a dois fatores. Primeiro, a grande semelhança de comportamento entre o HRP e a enzima extraída de eritrócitos (cuja existência de um grupo heme foi constatada pelo aparecimento de uma banda sores a 403 nm) em degradar o mesmo substrato, via formação do mesmo produto emitente, o oxigênio singlete ($^1\Delta_g$). Segundo, a enzima de eritrócitos começa a perder sua atividade após 24 horas de sua obtenção, e por isso limitaria os estudos com diálise da reação, nos estudos posteriores. Assim, tendo-se escolhido o sistema HRP/AFo, fez-se o registro de alguns valores de absorção máxima na região do UV para o produto da reação Xantina/Xantina oxidase, bem como para cada componente da mesma. A tabela III.d (pág. 61) mostra esses dados juntamente com os resultados obtidos para absorção da xantina, na presença de cada componente da reação HRP/AFo, a fim de certificar que nenhuma interferência no valor de λ máximo ocorreu durante os estudos de cinética do consumo da xantina.

Partindo destas observações, registrou-se a cinética do consumo de xantina, fixando-se λ em 266 nm e calculando-se a concentração desta após 5 minutos de reação, seguida do espectro de absorção da mesma. Pela tabela III.e (pág. 62) nota-se que a cinética é totalmente inibida na presença da reação HRP/AFo, bem como na presença do pterin-6-aldeído de fonte externa, quando a xantina e a xantina oxidase são adicionadas na etapa final. Essa semelhança de resultado mostra mais uma vez que o pterin-6-aldeído está sendo gerado na degradação do ácido fólico, e que de fato é um potente inibidor da xantina oxidase, de acordo com [20], [64-66]. Porém esse resultado sofre modificação quando a adição da xantina oxidase sobre a xantina é intercalada pela reação HRP/AFo. Neste caso a inibição diminui e a formação do produto ocorre como se pode notar pelos valores de λ e de concentração da xantina consumida. Este resultado está de acordo com Webb [65],

o qual assume que existe uma competição da enzima pelo substrato (é conhecido que a xantina oxidase pode oxidar o pterin-6-aldeído) e que pequenos traços de pterin-6-aldeído inibe a oxidação da xantina, mesmo que a concentração desta seja 100.000 vezes maior que a deste inibidor. Isto parece explicar porque a atividade da xantina oxidase em pessoas cancerosas é baixa, visto que ocorre uma degradação anormal do ácido fólico. Isto pode manter o pterin-6-aldeído no sangue num nível elevado, suficiente para inibir a degradação da xantina pela xantina oxidase.

Estudando-se a cinética na presença de cada componente da reação HRP/AFo, observou-se que eles também interferem na atividade da xantina oxidase, embora o façam em menor grau que pterin-6-aldeído. O AFo também inibiu a reação, porém neste caso pode-se admitir que isto seja causado pela presença de traços de pterin-6-aldeído na amostra [20]. Glutathione, HRP, Catalase e Mn^{++} , separadamente, apresentaram o mesmo efeito, embora nota-se que a porcentagem de inibição do conjunto não corresponde à soma das porcentagens de inibição causada por estas substâncias isoladamente. Isto sugere que a potencialidade destes inibidores, durante a reação da degradação do ácido fólico, é dependente de sua disponibilidade no meio.

Dados interessantes foram obtidos quando se estudou a cinética de consumo da xantina, após 22 horas de diálise das principais reações, em que foi utilizada uma membrana cuja porosidade permitiu a saída do meio de reação, somente das moléculas de baixo peso molecular. Na tabela III.f (pág.63) encontram-se os resultados assim obtidos.

Comparando-se com os resultados anteriores, verifica-se que a reação HRP/AFo continuou inibindo a xantina oxidase, mesmo quando a bilirrubina ou o DABCO estiveram presentes com o pro

pósito de proteger esta enzima de uma possível perda de atividade causada pela formação de $^1O_2^*$ na reação. Por outro lado, a baixa atividade da xantina oxidase foi quase que totalmente recuperada, o que nos leva a crer que não há uma ligação permanente entre a enzima e o inibidor.

Além disso, esta reversibilidade da inibição do pterin-6-aldeído está de acordo com as observações de Webb [65], o qual apresentou evidências de que xantina oxidase pode, de fato, oxidar este substrato muito lentamente e recuperar gradativamente sua atividade.

Estes resultados parecem indicar que a inibição da xantina oxidase não é causada unicamente pela presença de pterin-6-aldeído, podendo mesmo desaparecer, lentamente, se a concentração deste, no meio, não for mantida por adição de fonte externa, in vitro, como também por degradação do folato in vivo. Isto está de acordo com os trabalhos de Stea [8], o qual constatou que a concentração do pterin-6-aldeído, proveniente da degradação de folato in vivo, foi notadamente reduzida e que a atividade da xantina oxidase é recuperada em pacientes submetidos a tratamento anti-tumor.

Também é viável a hipótese de que oxigênio singlete, no estado eletrônico excitado, contribua para a inativação da xantina oxidase, por liberar energia que poderá ser suficiente para provocar danos na estrutura enzimática e, portanto, uma diminuição na sua eficiência catalítica.

CAPÍTULO V

CONCLUSÕES

Trabalhando em paralelo com a enzima de eritrócitos humanos (AF) e com uma enzima modelo (HRP), estudou-se a degradação de ácido fólico, seguindo-se: a) o consumo de oxigênio; b) a formação e identificação dos produtos; c) a formação de alguma espécie no estado eletrônico excitado; d) a relação entre catabólitos pterin do ácido fólico, e a baixa atividade de xantina oxidase.

Dos resultados obtidos, chegou-se às seguintes conclusões:

- ATP é dispensável na degradação do ácido fólico, pois sua presença ou ausência não modifica as reações enzimáticas.
- A reação $\text{HRP/Glu/Mn}^{++}/\text{O}_2$ gera peróxido de hidrogênio, o qual foi detectado por método bioenergizado.
- Glutathione, catalase e íons Mn^{++} são três cofatores, positivos, necessários na reação para aumentar a atividade enzimática do HRP durante a degradação do ácido fólico. Quando a enzima extraída de eritrócitos é empregada, apenas glutathione e íons Mn^{++} são necessários para sua atividade máxima.
- A reação usando HRP, é capaz de oxidar ácido fólico para produzir o pterin-6-aldeído e o ácido p-aminobenzoilglutânico. Estes mesmos produtos também são obtidos na reação usando a enzima de eritrócitos de pessoas portadoras de câncer (AFC).

- Na degradação oxidativa do ácido fólico com a enzima extraída de pessoas normais, são obtidos ácido p-aminobenzoilglutâmico e ácido pterin-6-carboxílico. Este último pode ser derivado de pterin-6-aldeído via oxidação por excesso de xantina oxidase, que deve estar presente na preparação da enzima. Quando H_2O_2 é adicionado na reação, apenas pterin-6-aldeído é formado.
- As três reações enzimáticas, HRP/AFo, AF/AFo e AFc/AFo, são acompanhadas de fotoemissão, a qual atribuiu-se à formação de $^1O_2^*$. A evidência disto vem do estudo da fotoemissão com DABCO e bilirrubina, dois supressores típicos desta espécie.
- A boa correlação entre a oxidação do ácido fólico e a fotoemissão, suporta a existência de uma espécie eletronicamente excitada, formada durante a degradação do ácido fólico.
- A formação de qualquer produto carbonilo, no estado eletrônico excitado, parece improvável pois nenhuma alteração na emissão total foi observada na presença de aceptores de energia de espécies carbonilos tripletos.
- A degradação do ácido fólico ocorre via formação de um aldeído e uma amina primária, similarmente à desalquilação de N-alquilaminas. Além disso, a emissão observada é proveniente da mesma espécie proposta para a degradação de N-nitrosamina, o que leva a crer que o mecanismo de degradação do ácido fólico seja semelhante ao proposto nesta reação, ou seja, o mecanismo de Benson.
- A inibição de xantina oxidase por pterin-6-aldeído (de fonte externa) é praticamente reversível dentro de 22 horas após contacto entre ambos.

- No caso em que a inibição foi estudada na presença de pterin-6-aldeído, proveniente da reação HRP/AFo, não ocorre reversibilidade após 22 horas de diálise da reação. Acredita-se que duas coisas podem acontecer. Primeiro, a inibição assim estudada pode ser causada por um ou mais componentes da reação, sendo irreversível. Segundo, o $^1O_2^*$ obtido pode estar liberando energia suficiente para inativar total ou parcialmente esta enzima.
- DABCO e bilirrubina não protegem xantina oxidase da ação do oxigênio singlete. No caso de bilirrubina, pode-se esperar que um dos produtos resultantes de sua fotooxidação, obtido no estado eletronicamente excitado, também esteja contribuindo para inativar a enzima, por liberar energia no meio, a qual, qualitativamente é maior que a das próprias reações enzimáticas.

SUGESTÕES PARA CONTINUAÇÃO DESTE TRABALHO

- Estudar a possível inativação de xantina oxidase pelo $^1O_2^*$, submetendo a enzima em contato direto com esta espécie, a qual pode ser gerada por uma reação química.
- Investigar o nível de catalase ou de H_2O_2 em pessoas portadoras de doenças malignas, com o propósito de verificar se um alto nível desta enzima poderá evitar, ao menos parcialmente, a degradação anormal de ácido fólico.
- Investigar o nível de xantina oxidase na preparação da enzima de eritrócitos de pessoas normais e também um método de obtê-la de uma forma mais purificada.
- Fazer estudos mais detalhados sobre a reversibilidade da inativação de xantina oxidase pelos componentes da reação HRP/AFo. Tentar descobrir se a inativação desta enzima ocorre no sítio ativo ou no grupo auxiliar.
- Estudar a natureza do intermediário de bilirrubina e a formação de produto carbonilo no estado excitado triplete. Descobrir quais os danos possíveis, que a energia liberada por este produto poderá causar.

REFERÊNCIAS

- [1] Reported by the Bureau of National Sciences, Department of National Health and Welfare, Ottawa, 119 (1975).
- [2] M.I. Botez e Bernard Lambert, Union Medicale du Canada, 108(8), 939 (1975).
- [3] V. Herbert, "The Pharmacological Basis of Therapeutic" (L. S. Goodman e A. Gilman, Eds.) 4^a edição, 1431 (1963).
- [4] M. Webb, Biochim. Biophys. Acta, 17, 212 (1955).
- [5] S. Futterman e M. Silverman, J. Biol. Chem., 224,31 (1957).
- [6] J.S. Dinning, J.T. Sime, P.S. Work, B. Allen e P.L. Day, Arch. Biochem. Biophys., 66, 114 (1957).
- [7] A.C. Bratton e E.K. Marshall, J. Biol. Chem., 128, 537 (1939)
- [8] B. Stea, P.S. Backlund, Jr., P.B. Berkey, A.K. Cho, B. C. Halpern, R.M. Halpern e R.A. Smith, Cancer Res., 38, 2376 (1978).
- [9] J.R. Gillette, D.C. Davis e H.A. Sasame, Ann. Rev. Pharmacol., 12, 57 (1972).
- [10] H.W. Strobel, A.Y.H. Lu, J. Heidema e M.J. Coon, J. Biol. Chem. 245, 4851 (1970).
- [11] E.G. Hrycay e P.J. O'Brien, Arch. Biochem. Biophys., 157, 7 (1973).
- [12] F.F. Kadlubar, K.C. Morton e D.M. Ziegler, Biochem. Biophys. Res. Commun., 54, 1255 (1973).

- [13] J.R. Gillette, J.V. Dingell e B.B. Brodie, *Nature*, 181, 898 (1958).
- [14] M.S. Fish, *Biochim. Biophys. Acta*, 18, 564 (1955)
- [15] G. Galliani e B. Rindone, *J.C. S. Chem. Comm.*, 782 (1976).
- [16] B.W. Griffin, *FEBS Lett.*, 74, 139 (1977).
- [17] N. Durán e A. Faljoni, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83, 287 (1978).
- [18] B.M. Bragança, I. Aravindakshan e D.S. Ghanekar, *Biochim. Biophys. Acta*, 25, 623 (1957).
- [19] O.H. Lowry, O.A. Bessey e E.J. Grawford, *J. Biol. Chem.*, 180, 389 (1949).
- [20] H.M. Kalckar, N.O. Kjedgaard e H. Klenow, *Biochim. Biophys. Acta*, 5, 586 (1950).
- [21] L.S. Dietrich, W. J. Monson, J. N. Williams, Jr., e C. A. Elvehjem, *J. Biol. Chem.*, 197, 37 (1952).
- [22] P. Feigelson, J.E. Ultmann, S. Harris e T. Dashman, *Cancer Res.*, 19, 1230 (1959).
- [23] G. De Lamirande, C. Allard e A. Cantero, *Cancer Res.*, 18, 952 (1958).
- [24] M. Feigelson, P. Feigelson e P.R. Gross, *J. Gen. Physiol.*, 41, 233 (1957).
- [25] I. Lewin, R. Lewin e R.C. Bray, *Nature*, 180, 763 (1957).
- [26] a. N. Prajda e G. Weber, *FEBS Lett.*, 59, 245 (1975).
b. E. Reid e I. Lewin, *Brit. J. Cancer*, 11, 494 (1957).

- [27] G. Weber, "The Molecular Biology of Cancer, Ed. H. Bush, Academic Press, New York, 487 (1974).
- [28] G. Cilento, K. Zinner, E.J.H. Bechara, N. Durán, R.C. De Baptista, Y. Shimizu, O. Augusto, A. Faljoni-Alário, C.C.C. Vidigal, O.M.M. Faria Oliveira e M. Haun, *Ciência e Cultura*, 31 (3), 290 (1979).
- [29] G. Cilento, *Photochem. Photobiol. Rev.*, 5, 199 (1980).
- [30] G. Cilento, *Acc. Chem. Res.*, 13, 225 (1980).
- [31] N. Durán, M. Haun e J. Brunet, *Rev. Latinoamer. Quim.*, 12, 1 (1981).
- [32] N. Durán, O.M.M. Faria Oliveira, M. Haun e G. Cilento, *J.C. S. Chem. Commun.*, 442 (1977).
- [33] O.M.M. Faria Oliveira, M. Haun, N. Durán, P.J.O'Brien, C.R. O'Brein e G. Cilento, *J. Biol. Chem.* 253, 4707 (1978).
- [34] E.J.H. Bechara, O.M.M. Faria Oliveira, N. Durán, R.C. de Baptista e G. Cilento, *Photochem. Photobiol.*, 30, 101 (1979).
- [35] N. Durán, Y. Makita, e L.H. Innocentini, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 88, 642 (1979).
- [36] Y. Makita e N. Durán, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 91, 427 (1979).
- [37] H.B. Dunford e J.S. Stielman, *Coord. Chem. Rev.*, 19, 213 (1976).
- [38] S.P.L. Sorensen, *Biochem. Z.* 21, 131 (1909).
- [39] G. Gomori, *Methods Enzymol*, 1, 144 (1965).

- [40] A.K. Parpart, P.B. Lorenz, E.R. Parpart, J.R. Gregg e A. M. Chase, *J. Clin. Invest.*, 26, 636 (1947).
- [41] O.M.M. Faria Oliveira, Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 1978.
- [42] R.J. Ackerman e J.F. Robyt, *Anal. Biochem.* 50, 656 (1972).
- [43] T. Stonier e H. Yang, *Plant Physiol.*, 51, 391 (1973).
- [44] S.M. De Toledo, M. Haun, N. Durán e E.J.H. Bechara, *Anal. Biochem.*, 105, 36 (1980).
- [45] P.J. O'Brien, E.J.H. Bechara, C.R. O'Brien, N. Durán e G. Cilentó, *Res. Commun.*, 81, 75 (1978).
- [46] L.H. Innocentini, S.M. De Toledo e N. Durán, *An. Acad. Brasil. Cien.*, 52, 691 (1980).
- [47] H.H. W. Thijssen, *Anal. Biochem.* 54, 609 (1973).
- [48] L. Beauchamp e I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, 245, 4641 (1970)
- [49] a. I. Fridovich, *Ann. Rev. Biochem.* 44, 147 (1975)
b. A.M. Michelson em "Superoxide and Superoxide Dismutase" (A.M. Michelson, J.M. McCord e I. Fridovich, Eds.), Academic Press, pag. 245 (1977).
- [50] R. Nilsson, P.B. Merkel e D.R. Kearns, *Photochem. Photobiol.*, 16, 117 (1972).
- [51] C. Ouannes e T. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 6527 (1968).
- [52] I.B.C. Matheson, *Photochem. Photobiol.*, 29, 875 (1979).
- [53] L.M. Snyder, S.C. Liu, J. Palek, P. Bulat, L. Edelstein, S.K. Srivastava e N.L. Fortier; *Biochim. Biophys. Acta*, 470, 290 (1977).

- |54| R.F. Henderson e T.R. Henderson, *J. Biol. Chem.*, 245, 3733 (1970).
- |55| P. Appel e J. T. Yang, *Biochemistry*, 4, 1244 (1965).
- |56| G. D. Smith e H.K. Schachmann, *Biochemistry*, 12, 3789 (1973).
- |57| P.B. Merkel e D.R. Kearns, *J. Am. Chem. Soc.*, 94, 1029 (1972).
- |58| C.F. Deneke e N.I. Krinsky, *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 3041 (1976).
- |59| H.H. Wasserman e B.H. Lipshutz em: "Singlet Oxygen" (H.H. Wasserman e R.W. Murray Eds.) 429, *Acad. Press, N.Y.*, (1979).
- |60| R. Bonnett, *Biochem. Soc. Trans.*, 4, 222 (1976).
- |61| C.S. Foote e Ta-Yen Ching, *J. Am. Chem. Soc.* 97, 6209 (1975).
- |62| A.F. McDonagh, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 44, 1306 (1971).
- |63| E. J. Land, *Photochem. Photobiol.*, 24, 475 (1976).
- |64| E.C. De Renzo, *Advan. Enzymol.*, 17, 293 (1958).
- |65| J.L. Webb, "Enzyme and Metabolic Inhibitors", V. II, 279 (1966).
- |66| R.J. Doisy, D.A. Richert e W.W. Westerfield, *J. Biol. Chem.*, 217, 307 (1955).