

CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DAS ECTONUCLEOTIDASES NAS LINHAGENS DE TUMOR DE BEXIGA HUMANO T24 E RT4.

Liliana Rockenbach¹, Joséli Stella¹, Luci Bavaresco¹, Patrícia F. Farias¹, Fernanda B. Morrone², Carlos Henrique Barrios³, Ana Maria O. Battastini¹.

¹Departamento de Bioquímica-ICBS-UFRGS; ²Faculdade de Farmácia, PUCRS; ³Faculdade de Medicina, PUCRS

O tumor de células transicionais constitui o tipo mais comum de tumor de bexiga. Fatores de risco tais como cigarro, idade e exposição ocupacional estão associados ao aparecimento desses tumores. A linhagem de tumor de bexiga humano T24 é de alta invasividade, proveniente de tumor de grau 3 que invade até o peritônio, enquanto a linhagem RT4 corresponde a tumor de grau 1 que invade somente até a lâmina própria da bexiga. Nucleotídeos púricos e pirimídicos estão envolvidos em vários processos fisiológicos e patológicos e seus níveis extracelulares são controlados pela ação conjunta das ectonucleotidases. Resultados de nosso laboratório e da literatura indicam a participação dos nucleotídeos extracelulares bem como das enzimas envolvidas na sua degradação na diferenciação e proliferação de células tumorais. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar e comparar as atividades ecto-nucleotidásicas nas linhagens de tumor de bexiga humana T24 e RT4. As linhagens, adquiridas da ATCC, foram mantidas a 37°C em incubadora contendo 5 % de CO₂, em meio RPMI (linhagem T24) e DEMEM (linhagem RT4) suplementados com 10 % de soro fetal bovino. Após a confluência, as células foram incubadas com ATP, ADP, AMP ou ésteres de fosfato como substrato. A atividade enzimática de hidrólise dos nucleotídeos foi determinada através do método do Verde de Malaquita; ou foi usado o substrato *p*-nitrofenil 5'-timidina monofosfato éster (5'TMP) cuja hidrólise foi determinada pela coloração amarela do *p*-nitrofenol em meio alcalino. A proteína foi dosada pelo método de Coomassie Blue. As condições ideais de incubação para ATP, ADP e AMP foram determinadas. Para ambas as linhagens o tempo de incubação escolhido foi de 30 minutos para os três substratos; e a concentração de substrato foi de 2,5 mM de ATP e ADP e 2,0 mM de AMP para linhagem T24, e de 2,0 mM dos três nucleotídeos para linhagem RT4. A linhagem T24 apresentou uma maior atividade AMPásica enquanto na linhagem RT4 uma maior atividade ATPásica. Além disso, não foi observada atividade ecto-fosfodiesterásica significativa no pH 7,4 em ambas as linhagens, porém no pH ótimo da enzima (8,9) foi observada atividade significativa somente na linhagem T24. Foi excluída a participação de fosfatases inespecíficas. Logo, conclui-se que assim como representam graus diferentes de malignidade essas linhagens apresentam também diferentes características enzimáticas as quais podem estar relacionadas com a evolução do tumor. Dessa forma, tornam-se necessários mais estudos para melhor compreender o papel do sistema purinérgico no processo de desenvolvimento do tumor de bexiga e a partir da comparação das linhagens tentar definir um alvo terapêutico. **Apoio:** PIBIC/CNPq, CAPES e FAPERGS.

OBTENÇÃO DE ALCALÓIDES DO TIPO HIACINTACINA POR SOFS

Guilherme M. Stedele¹, Mônica O. Duarte¹, Vera L. Eifler Lima¹, Mariane Pazinato², Eduardo R. de Oliveira².

¹LaSOM - Faculdade de Farmácia, UFRGS, ²Instituto de Química, UFRGS.

Alguns alcalóides mimetizam estruturalmente carboidratos e, por isso, são chamados de azaçúcares ou iminoaçúcares. Esta semelhança lhes permite participar dos mesmos processos que metabolizam os carboidratos, através da inibição de enzimas glicosidases. Com ensaios biológicos percebeu-se que estes alcalóides, ao bloquear a ação das glicosidases, afetavam a síntese de oligossacarídeos presentes na parede celular e, conseqüentemente, perturbavam o processo de reconhecimento célula-célula, célula-vírus. Como este princípio é utilizado no combate a doenças como câncer, AIDS e hepatites, estes compostos tornaram-se potenciais quimioterápicos, além de contribuírem para a elucidação e o entendimento da biossíntese de carboidratos e glicoproteínas. **OBJETIVO:** O objetivo deste trabalho é utilizar a L-prolina como bloco de construção para a síntese em fase sólida de alcalóides do tipo hiacintacina. **METODOLOGIA:** A SOFS consiste em ligar de forma covalente o produto de partida a um polímero (ou resina) insolúvel e inerte ao meio reacional. Toda a rota sintética é desenvolvida com o produto acoplado ao polímero. Com a obtenção do produto final faz-se uma clivagem, que é o desprendimento desse produto da resina, deixando-o solúvel no meio reacional. Após, o produto clivado é separado por uma simples filtração. **RESULTADOS E CONCLUSÕES:** Após o acoplamento da Boc-L-prolina na RM procedeu-se à otimização desta reação utilizando a metodologia de coloração com NBP

(teste indicativo para presença de Icloro no linker da RM) onde constatou-se que o acoplamento ocorre em apenas 12 horas. O aparecimento de uma banda intensa em torno de 1700 cm^{-1} no espectro de infravermelho referente à CO do éster confirma o sucesso da reação. A etapa seguinte, retirada do grupamento Boc protetor também foi otimizada. Apesar da perda considerável de massa, que indica a provável retirada do grupamento Boc, não estava sendo possível visualizar nos espectros de infravermelho as diferenças ocorridas nesta etapa. Para contornar este problema utilizou-se uma técnica já conhecida de subtração de espectros (espectro da reação subtraído do espectro da Resina Merrifield) e com isso visualizou-se uma banda alargada em torno de 3400 cm^{-1} que pode indicar a presença de amina secundária. Após seguiu-se com a reação de Michael entre o propiolato de etila e o éster acoplado à RM, onde pode ser verificado pela subtração de espectros o desaparecimento da banda em torno de 3400 cm^{-1} . Entretanto, com o inoato não houve o desaparecimento desta banda. Para analisar com maior clareza o sucesso destas reações, procedeu-se à clivagem, onde o produto foi retirado da resina, em que se constatou que a reação de Michael foi bem sucedida. Após a etapa da adição de Michael, procedeu-se à redução do enaminoéster ligado à RM e constatou-se que os dados espectroscópicos modificaram-se. A partir disso, procedeu-se à última etapa por SOFS: a ciclização e conseqüente clivagem. Após algumas horas de reação pode-se constatar por CCD o aparecimento de um produto no meio reacional. O produto obtido foi caracterizado por espectroscopia de RMN e IV e pode-se observar que não era o produto esperado. Acredita-se que na etapa de redução houve clivagem do produto, já que a reação ocorre em meio ácido e esta condição pode ter favorecido a hidrólise do éster. (CAPES, CNPq)

AVALIAÇÃO DA GORDURA ABDOMINAL E LIPÍDIOS SÉRICOS EM RATOS MACHOS ESTRESSADOS E COM UTILIZAÇÃO CRÔNICA DE CAFEÍNA

Toigo, E.v.P¹; Petteuzzo, L.F¹; Noschang, C¹; Vendite, D¹; Dalmaz, C¹.

Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS¹

A cafeína, um alcalóide do grupo das metilxantinas, é um dos compostos mais consumidos no mundo, cerca de 21 milhões de kg/ano somente nos EUA. Esta substância está presente principalmente em cafés, chás e refrigerantes. A cafeína aumenta a oxidação de ácidos graxos, mas em animais, as metilxantinas podem gerar anorexia ou não apresentar efeito, dependendo do estado fisiológico deste animal. Por outro lado, a obesidade e o estresse são dois grandes problemas de saúde pública na nossa atual sociedade. O estresse estimula a liberação de cortisol pelas glândulas supra-renais, esse cortisol pode causar hiperglicemia. A glicose, em alta concentração, estimula a liberação de insulina, que por sua vez, estimula a transformação da glicose em lipídios, que, por sua vez, se acumulam no tecido adiposo. **OBJETIVO:** Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do estresse e do consumo crônico de cafeína sobre a quantidade de gorduras abdominais e sobre os teores de lipídios séricos (colesterol total, HDL e triglicerídeos) em ratos machos. **METODOLOGIA:** Ratos Wistar machos adultos, pesando em média 250 g, foram estressados por contenção por 1 hora/dia, 5 dias/semana durante 40 dias, e/ou receberam solução de cafeína (0,3 ou 1,0 g/L) na água de beber durante 40 dias. Todos os animais receberam ração padrão *ad libitum* durante todo o tratamento. Após, os animais foram submetidos a tarefas comportamentais utilizadas em outro estudo, durante a realização destas tarefas os animais continuaram a serem estressados e/ou recebendo cafeína. Após as tarefas, os animais foram sacrificados por decapitação, as gorduras inguinal e perirrenal retiradas e pesadas, o sangue também foi recolhido, onde posteriormente foram dosados colesterol total, HDL e triglicerídeos. **RESULTADOS E CONCLUSÕES:** o presente estudo verificou que a administração crônica de cafeína diminuiu as concentrações plasmáticas de triglicerídeos (0,3 e 1,0 g/L) e a quantidade de gorduras abdominais, perirrenal (0,3 e 1,0 g/L) e inguinal (1,0 g/L). Por outro lado, não alterou os níveis séricos de colesterol total, de HDL e o peso corporal dos animais. O estresse, por sua vez, aumentou os níveis de HDL, sem alterar as concentrações de colesterol total, de triglicerídeos e a quantidade de gorduras abdominais. Com isso concluímos que a cafeína pode ser útil para auxiliar na terapia de controle de peso, sendo uma ferramenta importante no tratamento deste problema.