

BR8715427

INIS-BR--801

MARIA DAS GRAÇAS CASTELO BRANCO SOARES

ATIVIDADE ESTERIFICANTE DO COLESTEROL EM  
HOMOGENATO DE FIGADO DE CAMUNDONGOS. UMA  
CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA ACIL-CoA:COLES-  
TEROL ACIL TRANSFERASE EM FIGADO DE MAMÍ-  
FEROS.

CHOLESTEROL ESTERIFICATION BY MOUSE  
LIVER HOMOGENATE. CONTRIBUTION TO  
THE STUDY OF ACYL CoA: CHOLESTEROL  
ACYL TRANSFERASE IN MAMMALIAN LIVER.

Tese apresentada ao Departamento  
de Bioquímica e Biofísica do Cent  
tro de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Pernambuco  
co, como requisito final para obten  
ção do grau de mestre em Bioqu  
ímica.

A presente tese foi realizada sob a  
orientação da Professora Sulamitha  
de Souza Borges.

A meus pais, Waldemar e Heloisa,  
e a Valdec.

## AGRADECIMENTOS

Professores e amigos ofereceram orientação e incentivo e Instituições financiadoras forneceram recursos materiais indispensáveis à realização deste trabalho.

Profa. Sulamitha de Souza Borges, orientadora da tese; Prof. Marcionilo de Barros Lins, Chefe do Departamento de Bioquímica e Biofísica da Universidade Federal de Pernambuco; Prof. Dalmo Nunes G. de Oliveira, Coordenador do Mestrado em Bioquímica; Prof. José Camilo da S. Filho, Reitor da Universidade Federal do Piauí; Prof. José Wilson C. Batista, Prof. Antonio Alves de L. Veras, Prof. Francisco de C. Fortes, da Universidade Federal do Piauí; Universidade Federal do Piauí, Universidade Federal de Pernambuco, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico, Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior. A esses professores e entidades citadas e a todos aqueles que prestaram ajuda para a execução desta pesquisa, minha sincera gratidão.

## ABREVIATURAS ESPECIAIS

ACAT	.....	acil coenzima A: colesterol acil transferase
ATP	.....	trifosfato de adenosina
EC	.....	éster de colesterol
CL	.....	colesterol livre
CoA	.....	coenzima A
ECDI	.....	ésteres de colesterol diinsaturados
ECMI	.....	ésteres de colesterol monoinsaturados
ECPI	.....	ésteres de colesterol poliinsaturados
ECS	.....	ésteres de colesterol saturados.
EDTA	.....	tetraacetato de etilenodiamina
LCAT	.....	lecitina colesterol acil transferase
M	.....	molar
mCi	.....	milicurie
mM	.....	milímol
nM	.....	nanamol
NAD	.....	nicotinamida adenina dinucleotídeo
Rf	.....	relação entre as distâncias percorridas pela amostra e pelo sistema de desenvolvimento
TG	.....	triglicérides
$\mu$	.....	micron
$\mu$ Ci	.....	microcurie
$\mu$ l	.....	microlitro

## SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.0 - Histórico	
1.0.1 - Esterificação de colesterol em fígado de várias espécies animais.....	1
1.0.2 - Justificativa e objetivo da pesquisa	3
2 - PARTE EXPERIMENTAL.....	5
2.0 - Materiais.....	5
2.0.1 - Drogas especiais e solventes.....	5
2.0.2 - Soluções.....	5
2.0.3 - Animais.....	6
2.1 - Métodos.....	6
2.1.1 - Preparação dos animais.....	6
2.1.2 - Preparação do homogenato de fígado..	7
2.1.3 - Ensaio para a caracterização da enzima hepática.....	7
2.1.3.1 - Atividade esterificante do homogenato comparada a da LCAT plasmática.....	7
2.1.3.2 - Modo de ação da enzima....	8
2.1.3.3 - Influência de cofatores sobre a atividade enzimática	8
2.1.3.4 - Influência da concentração da enzima sobre a atividade enzimática.....	9
2.1.3.5 - Influência da concentração do substrato exógeno sobre a atividade enzimática....	9
2.1.3.6 - Influência do pH sobre a atividade enzimática.....	9
2.1.4 - Extração e purificação dos lipídios do sistema de incubação.....	9

2.1.5 - Isolamento do CL e CE do extrato lipídico.....	10
2.1.6 - Subfracionamento dos ésteres de colesterol, em diferentes grupos.....	15
2.1.7 - Atividade esterificante do colesterol, em função do tempo.....	15
2.1.8 - Velocidade inicial da esterificação do colesterol.....	17
2.1.9 - Percentuais médios de esterificação do colesterol por hora.....	17
2.1.10 - A esterificação "líquida" do colesterol.....	17
2.1.11 - A distribuição relativa da radioatividade nos diferentes grupos de ésteres de colesterol.....	17
2.1.12 - Medidas da radioatividade.....	17
2.1.13 - Análise estatística dos resultados..	18
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
3.1 - Resultados dos ensaios visando à caracterização da enzima hepática.....	19
3.1.1 - Atividade em fígado de camundongos relativa a da LCAT plasmática.....	19
3.1.2 - O efeito da concentração da enzima sobre a atividade enzimática.....	21
3.1.3 - O efeito da concentração do substrato exógeno sobre a atividade enzimática.....	23
3.1.4 - O efeito do pH sobre a atividade esterificante do colesterol.....	25
3.1.5 - A influência de cofatores sobre a atividade esterificante do colesterol	27
3.2 - A formação de ésteres de colesterol em função do tempo de incubação.....	27
3.3 - Velocidade de esterificação do colesterol- $^{14}C$ .....	31

3.4 - Percentuais de esterificação por hora.....	32
3.5 - Esterificação "líquida" do colesterol em fígado de camundongos.....	35
3.6 - A distribuição relativa da radioatividade nos diferentes grupos de ésteres de colesterol..	35
4 - CONCLUSÕES.....	39
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
6 - ÍNDICES DE FIGURAS E TABELAS.....	45
6.1 - Índice de figuras.....	45
6.2 - Índice de tabelas.....	46



Uma enzima esterificante do colesterol, presente no fígado do *C. undulosa*, foi parcialmente caracterizada. A enzima que apresentou atividade ótima no pH 7,1 e requerimento de ATP e CoA, foi identificada como uma acil CoA: colesterol acil transferase (E.C.2.3.1.26).

A porcentagem de esterificação do colesterol em função do tempo foi linear durante 1 hora, começando a crescer mas não linearmente até 4 horas, tempo a partir do qual nenhuma esterificação líquida adicional foi observada. A concentração relativa de colesterol esterificado no sistema de incubação permaneceu constante entre 4 e 21 horas e em seguida diminuiu até pelo menos 24 horas. A atividade esterificante do colesterol, em termos absolutos e expressa em moles de CL esterificado, por grama de tecido, por min,

foi de  $24,0 \pm 2,9$  nmoles.

As percentagens médias de colesterol livre, esterificado em uma hora e em 24 horas foram de  $14,8 \pm 1,6$  e  $21,9 \pm 4,5$  respectivamente.

O subfracionamento dos ésteres de colesterol após 1 hora de incubação de homogenato de fígado com colesterol-4- $C^{14}$  revelou ésteres de colesterol marcados, na seguinte proporção: monoinsaturado > diinsaturado > saturado >> poliinsaturado.

Deste modo, a enzima do fígado do camundongo apresenta propriedades semelhantes às da acil CoA: colesterol acil transferase do fígado do rato, previamente comunicada.

A cholesterol- esterifying enzyme from mouse liver has been partially characterized. The enzyme which showed optimum activity at pH 7,1 and required ATP and CoA, was identified as an acyl CoA: cholesterol acyl transferase (E.C.2.3.1.26).

As a function of time the percentage of esterified cholesterol increased linearly during the first hour of incubation and continued to increase but not linearly with 4 hours, after which time no further net esterification was observed. The relative concentration of esterified cholesterol remained constant between the 4<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> hours of incubation but afterwards decreased when the incubation continued until 24 hours. The cholesterol - esterifying activity was  $24,0 \pm 2,9$  nmoles

cholesterol esterified per gram tissue wet weight per minute.

The mean percentages of free cholesterol esterified in 1 and 24 hours respectively were  $14,8 \pm 1,6$  e  $21,9 \pm 4,5$ .

The subfractionation of labelled cholesteryl esters after a 1 hour incubation of liver homogenate with  $4\text{-C}^{14}$ -cholesterol showed the order of preference for the formation of the different ester classes to be monounsaturated > diunsaturated  $\geq$  saturated  $\gg$  polyunsaturated.

The properties of the enzyme from mouse liver do not markedly differ from those of the previously recorded ACAT activity of rat liver.

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.0 Histórico

#### 1.0.1 Esterificação de colesterol em fígado de várias espécies animais

SPERRY & BRAND<sup>01</sup>, foram os pioneiros em demonstrar em fígado de rato a existência de um sistema enzimático capaz de catalizar a síntese de ésteres de colesterol. Também NIEFT & DEUEL<sup>02</sup>, provaram a existência em fígado de mamíferos de sistema enzimático que cataliza a conversão de colesterol a éster de colesterol. A localização celular deste sistema bem como o mecanismo da reação de esterificação tornaram-se objeto de estudo de diversos grupos de investigadores.

Entretanto, o material preferido para esses estudos era limitado ao fígado de ratos, até que FREDRICKSON<sup>03</sup> descreveu em fígados de camundongos, um sistema formado de mitocôndria mais uma fração solúvel termo-estável o qual esterificava quantidades consideráveis de colesterol-4-C<sup>14</sup> quando adicionado a um sistema de incubação.

O esclarecimento do mecanismo da reação, todavia, coube a MUKERJEE & Cols.<sup>04</sup>. Estes referiram a existência de um sistema no fígado de rato capaz de sintetizar colesteril palmitato, a partir de colesterol-4-C<sup>14</sup> e ácido palmítico e sugeriram que o sistema envolvia duas etapas de reação: a primeira, consistindo na ativação do ácido palmítico pelo ATP para formar palmitil CoA e a segunda, uma reação de transesterificação entre o acil coenzima A e o colesterol, levando à síntese do éster.

Por outro lado, SWELL & TREADWELL<sup>05</sup>, demonstraram em fígado de rato a existência de sistemas enzimáticos esterificantes de colesterol-4-C<sup>14</sup> em homogenato total, mitocôndria + fração solúvel, microsome + fração solúvel e somente fração solúvel. Nenhuma atividade foi obtida em pre-

sença de fração solúvel aquecida. Os autores sugeriram que partes diferentes das células do fígado possuem capacidade de formar ésteres de colesterol. Também constataram no referido tecido, um efeito estimulante do NAD sobre a formação de ésteres de colesterol.

DEYKIN & GOODMAN<sup>06</sup>, e GOODMAN & Cols.<sup>07</sup>, em estudos com frações intracelulares de fígado de rato constataram que a enzima estava localizada exclusivamente em algumas dessas partículas, com mitocôndrias e microsomas desempenhando atividades idênticas. Eles comprovaram que para a esterificação do colesterol por essas partículas havia uma dependência absoluta de ATP e CoA. Esses cofatores entretanto, podiam ser substituídos por derivados acil coenzima A.

Uma contribuição considerável ao estudo do mecanismo da enzima hepática, foi fornecida por GLOMSET & KAPLAN<sup>08</sup>, estudando a atividade LCAT, em diferentes tecidos de rato. Incubações de plasma do mesmo animal, usado como referência, foram realizadas em presença de cada um dos tecidos estudados. Para o tecido hepático foi, desse modo, constatada uma atividade relativa de 0,18.

BENNET<sup>09</sup>, incubando preparações de fígado de rato com ácido linoleico-C<sup>14</sup> e lecitina contendo ácido linoleico-C<sup>14</sup> na posição  $\beta$ , na ausência de ATP e CoA, verificou que não havia formação de ésteres de colesterol radioativo.

GOODMAN<sup>10</sup>, GOODMAN & Cols.<sup>07</sup>, SUGANO & PORTMAN<sup>11</sup> e SMELL & Cols.<sup>12</sup>, verificaram que a enzima responsável pela síntese de ésteres do colesterol no fígado de rato, apresenta uma especificidade relativa muito acentuada para a formação de ésteres oleato.

STOKKE & NORUM<sup>13</sup>, estudando a distribuição subcelular da ACAT em fígado de rato, com colesterol-H<sup>3</sup> endogena - mente marcado e colesterol-4-C<sup>14</sup> exógeno, verificaram que a maior parte da atividade dessa enzima é encontrada na fração microsomal e, se existe alguma na mitocôndria, é em quantidade muito pequena.

STOKKE<sup>14</sup>, investigando a atividade ACAT em fígado

do de diferentes espécies animais, observou que esta difere consideravelmente de espécie a espécie. Assim, no fígado humano não foi demonstrada nenhuma atividade. Os níveis mais elevados foram encontrados no rato, enquanto que no cobaia foram detectados os mais baixos.

### 1.0.2 Justificativa e objetivo da pesquisa

A importância do tecido hepático, como fonte de ésteres de colesterol e de lipoproteínas plasmáticas, tem sido referida por diferentes grupos de investigadores, dentre os quais SWELL & LAW<sup>15</sup>, ROHFIM & COLS.<sup>16</sup>, GINEZ & COLS.<sup>17</sup> e ROSE<sup>18</sup>.

OLIVEIRA & BORGES<sup>19</sup>, encontraram uma diminuição da atividade LCAT de plasma de camundongos esquistossomóticos em relação à de camundongos normais. Esta investigação fez parte de uma das linhas de pesquisa do Departamento de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas, que envolve o estudo das alterações do metabolismo lipídico, na esquistossomose mansônica, instalada experimentalmente.

A literatura sobre a atividade esterificante do colesterol em camundongos, além dos trabalhos de FREDRICKSON<sup>20</sup> e OLIVEIRA & BORGES<sup>19</sup>, em mitocôndrias de fígado e em plasma, respectivamente, ambos já citados, é por nós desconhecida.

Visando ao estudo da atividade esterificante do colesterol no fígado de camundongos infectados por *Schistosoma mansoni*, em trabalho a se realizar posteriormente, como parte da linha de pesquisa já referida, a presente investigação teve como objetivos principais:

1) Caracterizar a enzima envolvida no processo de esterificação, visando estabelecer a sua identidade com as enzimas estudadas em fígados de outros mamíferos:

2) Estudar a velocidade inicial da atividade enzimática, tornando possível determinações da atividade em termos absolutos de CL esterificado por grama de tecido,

por minuto, bem como avaliações de percentuais médios de esterificação por hora.

3) Estudar a extensão do processo de esterificação.

4) Estudar a distribuição da radioatividade nos diferentes grupos de ésteres, formados durante uma hora de incubação a partir de colesterol-4-C<sup>14</sup> e separados por cromatografia em camada fina, segundo o grau de insaturação.



## 2 - PARTE EXPERIMENTAL

## 2.0 Materiais

## 2.0.1 Drogas especiais e solventes

Colesterol-4-C<sup>14</sup>, com atividade específica de 61  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ , foi adquirido de New England Nuclear Corporation, Boston, Mass., U.S.A., em solução benzênica, contendo  $1\mu\text{Ci}/\text{ml}$ . ATP, CoA, oleato de sódio e albumina bovina tipo F (livre de ácidos graxos), foram obtidos da Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., U.S.A.; 2,5-difenil oxazol (PPO), 1,4-Bis 2 (5-feniloxazolil)-benzeno(POPOP) procedentes de Beckman Instruments Inc., Palo Alto, California, U.S.A.; colesterol, e EDTA (disódico bihidratado), ambos p.a., hexano para síntese e sílica gel G nach Stahl de 10-40 $\mu$ , procedentes do E. Merck AG, Darmstadt, W. Germany; Rhodamine 6 G foi adquirida de Allied Chemical, New York, U.S.A.; Trioleína, colesteril palmitato, colesteril estearato, colesteril oleato, colesteril linolenato, colesteril linoleato e colesteril -araquidonato foram obtidos da Applied Science Laboratories, Inc., Pennsylvania, U.S.A.; Benzeno p.a. da E. Merck AG, Darmstadt, W. Germany, recém destilado; Clorofórmio do Carlo Erba do Brasil S.A., São Paulo-SP, Brasil, destilado e preservado pela adição de etanol na proporção de 0,7% (v/v). Metanol e éter etílico do tipo comercial foram obtidos de E.M. Vasconcelos, Recife, Pernambuco, Brasil; o metanol foi desidratado por tratamento com óxido de cálcio e em seguida destilado; o éter etílico foi destilado, desidratado duas vezes com ácido sulfúrico concentrado, redestilado e mantido no congelador.

## 2.0.2 Soluções

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água deionizada.

Tampão fosfato de sódio 0,5M, na faixa de 5,9 a 7,7 unidades de pH com intervalos de 0,3.

O colesterol-4-C<sup>14</sup> usado, foi preparado segundo STOKKE & NORUM<sup>20</sup>, em albumina bovina a 5% (em tampão fosfato), de modo a conter uma atividade de 0,01µCi por 0,1ml. O complexo albumina-colesterol foi cuidadosamente preparado a partir da solução benzênica estoque, já mencionada. Para isto, a solução radioativa foi submetida a evaporação sob CO<sub>2</sub>, em banho-maria a 37°C. Em seguida o resíduo foi dissolvido com acetona e transferido gota a gota para a solução de albumina, sob constante agitação no *SUPER-MIXER* (Cole-Parmer, Chicago, ILL. U.S.A.). A acetona foi evaporada sob CO<sub>2</sub> durante 5 minutos e a mistura guardada no congelador, no intervalo máximo de oito dias.

Solução cintiladora constituída de 5g de PPO e 0,1g de POPOP por litro de tolueno.

Soluções de ATP e CoA a pH 7,0 preparadas segundo STOKKE<sup>14</sup>, nas concentrações de 7,5µmoles e 0,3µmoles por 0,1ml respectivamente.

Solução de oleato de sódio contendo 50nmoles/0,05ml foi preparada conforme GOODMAN & COLS.<sup>07</sup>

### 2.0.3 Animais

Camundongos albinos machos fornecidos pelo Centro de Pesquisas Zoopatológicas (Recife-PE).

## 2.1 Métodos

### 2.1.1 Preparação dos animais

Os animais foram alimentados com ração biotério e sacrificados por decapitação, ou conforme indicado, aos cinco meses de idade. No dia anterior ao experimento, os animais ao invés de serem alimentados *ad libitum* como antes, foram alimentados duas vezes durante duas horas, isto é, de 7 às 9 e de 18 às 20 horas. Após doze horas da última alimentação foram sacrificados. O controle da alimentação empregada teve o propósito de garantir a todos os animais um período igual de jejum (OLIVEIRA & BORGES<sup>19</sup>).

### 2.1.2 Preparação do homogenato de fígado

Os fígados dos camundongos sacrificados por decapitação ou conforme indicado, foram removidos para placas de Petri mantidas em gelo, e as vesículas foram retiradas. Os lóbulos hepáticos foram separados e retirado todo o tecido conjuntivo. Em seguida, para livrar o tecido de sangue residual, os lóbulos foram lavados com soro fisiológico gelado e depois com solução de sacarose + EDTA (0,3M + 0,002M) também conservada em gelo. Retirado o excesso da solução com papel de filtro, os fígados foram pesados e homogenizados em solução de sacarose + EDTA (0,3M + 0,002M) na proporção de 1:10 ou 1:5. Para isso foram usados homogenizadores (Arthur H. Thomas Co., Phila., U.S.A.) mantidos em gelo picado e conectados a um motor *Fractional Horsepower* (Bodine Electric Company, Chicago, ILL., U.S.A.).

As experiências foram realizadas com homogenatos preparados a partir de *pools* de três fígados, exceto quando se destinavam às determinações de percentagens de esterificação, que foram conduzidas com homogenato obtido de um fígado, e para a avaliação da atividade absoluta da enzima.

### 2.1.3 Ensaio para a caracterização da enzima hepática

#### 2.1.3.1 Atividade esterificante do homogenato comparada a da LCAT plasmática.

Nesse sentido foram conduzidas experiências conforme GLOMSET & KAPLAN<sup>08</sup>, que consistiram de incubações de homogenato e colesterol-4-C<sup>14</sup>. Foram simultaneamente conduzidas experiências controles, que envolveram:

- a) Incubações de plasma ativo e colesterol-4-C<sup>14</sup> na ausência de homogenato.
- b) Incubações de plasma ativo e colesterol-4C<sup>14</sup> e homogenato.
- c) Incubações de plasma aquecido (56-60<sup>o</sup>, 30 min) e colesterol-4C<sup>14</sup> e homogenato.

d) Incubações de plasma ativo, diluído (de:1com salina), colesterol- $4C^{14}$  e homogenato.

As experiências com plasma ativo tiveram a finalidade de verificar a recuperação da atividade enzimática, em presença de homogenato de fígado. A atividade LCAT plasmática serviu de base para o cálculo da atividade relativa do homogenato. As incubações foram feitas a  $37^{\circ}C$  durante 10 min.

### 2.1.3.2 Modo de ação da enzima

Para estudar o mecanismo de ação da enzima esterificante do colesterol de fígado de camundongos, foram realizados ensaios conforme GOODMAN & COLS.<sup>07</sup> com modificações introduzidas por STOKKE & NORUM<sup>13</sup>. O sistema de incubação, além do homogenato, continha: 0,3 $\mu$ moles de CoA, 7,5 $\mu$ moles de ATP, 150 $\mu$ moles de fosfato de sódio (tampão) e 50nmoles de oleato de sódio, em um volume final de 0,85ml. Para tanto foram utilizados tubos de 10 ml com tampas de teflon e um incubador Dubnoff (G.C.A. Corporation Chicago, ILL., U.S.A.). Os tubos foram submetidos a uma incubação prévia, a  $37^{\circ}C$ , durante 30min. Em seguida foi adicionado colesterol- $4C^{14}$  com atividade específica de  $10^{-2}\mu Ci/164nmoles$  e as misturas novamente incubadas por mais 60 minutos, ou conforme indicado, com agitação constante, tendo o ar como fase gasosa.

### 2.1.3.3 Influência de cofatores sobre a atividade enzimática

Em experiências conduzidas paralelamente ATP, coenzima A e oleato de sódio foram omitidos do sistema, ao mesmo tempo ou isoladamente. Tal conduta teve por finalidade verificar a influência desses componentes na atividade enzimática.

#### 2.1.3.4 Influência da concentração da enzima sobre a atividade enzimática

Foi estudada realizando incubações de volumes variáveis de homogenato de fígado, preparado nas proporções de 1:5 e 1:10 em solução de sacarose 0,25 M contendo EDTA 0,001 M e pH 7,4. As concentrações testadas compreenderam a faixa de 10 a 60 mg de tecido hepático.

#### 2.1.3.5 Influência da concentração do substrato exógeno sobre a atividade enzimática

Foi estudada a influência da concentração do substrato exógeno, sobre a atividade enzimática, conduzindo incubações com as concentrações de 164, 328 e 492 nmoles de colesterol exógeno.

#### 2.1.3.6 Influência do pH sobre a atividade enzimática

Foi investigada através de incubações em que o pH do sistema, ajustado com tampão fosfato, variou na faixa de 5,9 a 7,7 unidades com intervalos de 0,3.

#### 2.1.4 Extração e purificação dos lipídios do sistema de incubação

Foram realizadas de acordo com FOLCH & CoIs.<sup>21</sup>, com clorofórmio/metanol 2:1 (v/v) na proporção de 19 volumes da mistura por volume de material a ser extraído. Para facilitar a extração, foi adicionado primeiro o metanol e depois o clorofórmio, sendo a mistura agitada após adição dos referidos solventes. Para garantir completa extração do material lipídico os tubos foram colocados em um agitador automático *Eberbach* (Eberbach Corporation, ANN ARBOR, Michigan, U.S.A.) e agitados durante 30 minutos.

O extrato foi filtrado e purificado de contaminantes não lipídicos, por tratamento com solução de clo-

reto de cálcio 0,05%, com volume correspondente a 1/5 do volume filtrado, e deixado em repouso no congelador, até completa separação das fases. Recolhida a fase inferior (clorofôrmica), o extrato foi evaporado à secura, por meio de evaporador rotatório a vácuo, em banho-maria a 37°C. O resíduo foi dissolvido em volume adequado de hexano e transferido quantitativamente para tubo de fundo cônico de 15ml, com tampa de teflon. Após evaporação do hexano em banho-maria a 37°C sob CO<sub>2</sub>, o resíduo foi redissolvido em 300µl de clorofôrmio/metanol 2:1 (v/v).

### 2.1.5 Isolamento do CL e EC do extrato lipídico

Para obtenção do CL e EC os lipídios do extrato purificado foram fracionados em diferentes classes, por cromatografia em camada fina, em placas de vidro de 20x20 cm, revestidas de sílica gel G de 0,25 mm de espessura e ativadas a 110°C durante 30 minutos. Padrões de lipídios (TG, CL e EC) foram desenvolvidos simultaneamente, para facilitar a identificação dos componentes do extrato. Este fracionamento foi realizado com dois objetivos:

1) Avaliar a percentagem de esterificação do colesterol por hora. Para isto, 50µl do extrato foram aplicados em traço de 1 cm e o cromatograma desenvolvido com hexano/éter etílico/ácido acético nas proporções de 26/24/0,5 (OLIVEIRA & COLs.)<sup>22</sup> As frações foram visualizadas por breve exposição da placa a vapores de iodo metálico e suas posições marcadas. Em seguida, o cromatograma foi exposto ao ar, até completo desaparecimento do iodo.

Uma separação cromatográfica dos lipídios, em diferentes classes, para a obtenção do colesterol livre e esterificado está representada pela figura 1, a qual também mostra o desenvolvimento cromatográfico de padrões representativos das referidas classes.

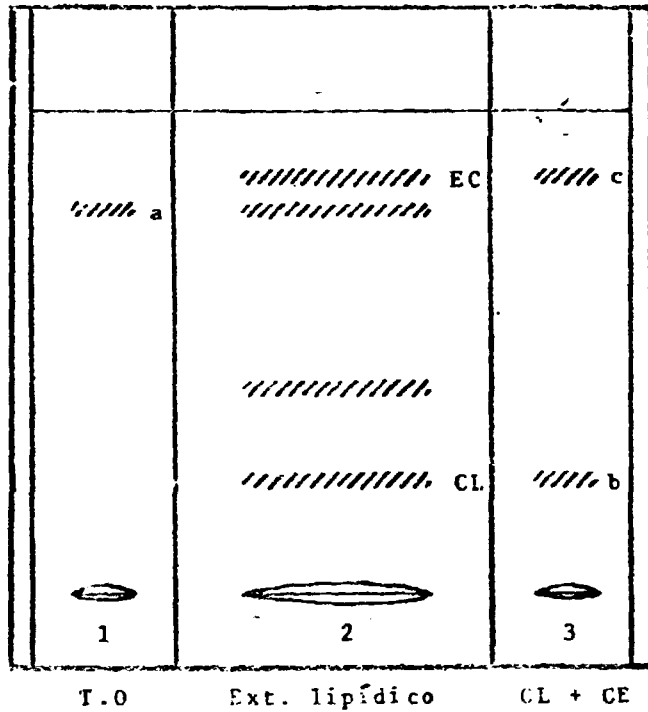


Fig.1- Representação do cromatograma resultante da separação dos lipídios em diferentes classes obtidos após incubação do homogenato de fígado de camundongo durante 1 hora.

Sistema de desenvolvimento: Hexano/Éter etílico/Ácido acético nas proporções de 26/24/0,5.

Revelação: vapores de iodo metálico.

1-Solução padrão de trioleína(a)

2-Extrato lipídico do sistema;

3-Solução padrão de colesterol(b) e solução padrão de ésteres de colesterol (c).

A figura 2 representa um cromatograma desenvolvido nas mesmas condições e revelado por borrifação com ácido sulfúrico concentrado seguida a borrifação de aquecimento a 130°C. As zonas referentes ao EC e CL apresentaram coloração púrpura, comprovando assim a natureza esterólica das aludidas frações.

As zonas correspondentes ao CL e EC foram raspadas, e transferidas diretamente para recipientes apropriados do cintilador *Beckman* (modelo LS-250, Beckman Instruments, Inc., Califórnia, U.S.A.) para medida da radioatividade associada às referidas frações.

2) Isolar o EC para posterior subfracionamento em diferentes grupos de ésteres, de acordo com o grau de insaturação. Neste caso os 250µl restantes do extrato foram quantitativamente aplicados em traço de 4 cm e o cromatograma desenvolvido com a mistura hexano/éter etílico/ácido acético nas proporções de 46/4/0,5 (OLIVEIRA & BORGES<sup>19</sup>). A placa foi borrifada com solução de rhodamine-6G a 0,01% em metanol e exposta à luz ultravioleta para visualização das manchas correspondentes às diversas classes lipídicas.

Uma separação dos lipídios em diferentes classes, visando o isolamento dos EC para posterior subfracionamento está representada pela figura 3.

A área de sílica contendo o EC foi raspada, transferida para coluna apropriada e eluída inicialmente com 40 ml de clorofórmio, seguidos de 40 ml de éter etílico/benzeno 1:1 a 70°C, sob leve pressão de CO<sub>2</sub>.

O eluado foi recolhido em balão de fundo redondo de capacidade adequada e evaporado à secura em banho-maria a 37°C, em evaporador rotatório a vácuo. O resíduo foi dissolvido em volume conveniente de hexano e transferido quantitativamente para tubo cônico de 15 ml com tampa de teflon. Após evaporação do hexano, sob CO<sub>2</sub> em banho-maria a 37°C, o resíduo foi redissolvido em 0,2 ml de clorofórmio/metanol 2:1 (v/v), para subfracionamento.



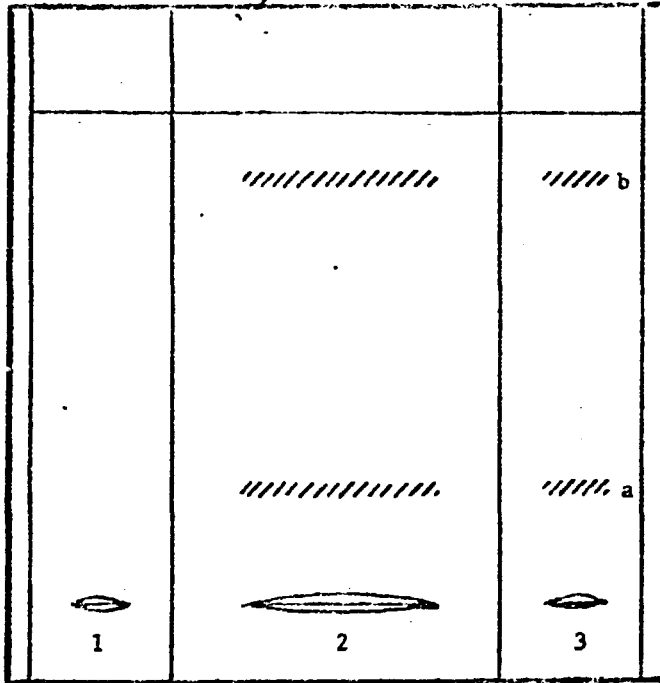


Fig.2- Representação do cromatograma resultante da separação dos lipídios em diferentes classes, para comprovação da natureza esterólica das frações de EC e CL.

Sistema de desenvolvimento: Hexano/Éter etílico/Ácido acético nas proporções de 26/24/0,5.

Revelação: Borrifação com ácido sulfúrico e aquecimento a  $130^{\circ}\text{C}$ .

1- Solução padrão de trioleína

2- Extrato lipídico do sistema

3- Solução padrão de colesterol(a) e solução padrão de ésteres de colesterol(b).

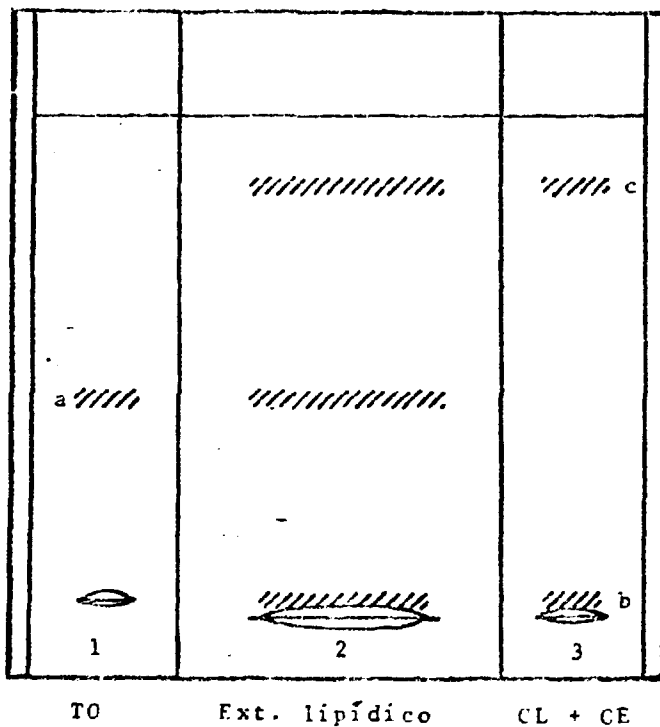


Fig.3- Representação do cromatograma resultante da separação dos lipídios em diferentes classes visando o isolamento dos EC para posterior subfracionamento.

Sistema de desenvolvimento: Hexano/Éter etílico/ácido Acético nas proporções de 46/4/0,5.

Revelação: Borrifação com solução de rhodamine-6G e exposição à luz ultravioleta.

1 - Solução padrão de trioleína (a)

2 - Extrato lipídico do sistema;

3 - Solução padrão de colesterol (b) e solução padrão de ésteres de colesterol (c).

### 2.1.6 Subfracionamento dos EC, em diferentes grupos

Os EC foram isolados por cromatografia em camada fina, em placas de 20x20 cm revestidas com sílica gel G impregnada com nitrato de prata a 5% (p/p) e ativadas a 110°C durante 30 minutos (MORRIS<sup>23</sup>). O sistema de desenvolvimento foi constituído de: Hexano/Benzeno, nas proporções de 2:1 (v/v) (OLIVEIRA & BORGES<sup>19</sup>).

Como a quantidade de ésteres obtidos do material incubado não foi suficiente para visualização das frações no cromatograma, aos 200µl do extrato foram adicionados como carreadores 50µl da solução padrão de ésteres de colesterol e a mistura aplicada em traço de 1cm. O cromatograma foi revelado por borrifação com solução de rhodamine-6 G a 0,01% em metanol. Um subfracionamento cromatográfico dos EC formados durante incubação do homogenato está representado pela figura 4. As zonas correspondentes aos ésteres saturados, mono, di e poliinsaturados foram visualizadas por exposição à luz ultravioleta e retiradas da placa diretamente para tubos apropriados do cintilador *Beckman*, com a finalidade de medir a radioatividade associada a cada fração.

### 2.1.7 Atividade esterificante do colesterol em função do tempo

Incubações individuais de uma única preparação de homogenato foram conduzidas em intervalos de tempo variáveis e medidas as percentagens de esterificação correspondentes. Os homogenatos eram preparados a partir de "pools" de três fígados. Ensaios foram realizados no tempo zero, no qual a inativação da enzima se processou antes da adição do colesterol-4-C<sup>14</sup>. Além disso, foram feitas incubações, com o sistema completo, nos intervalos de tempo seguintes: de cinco em cinco minutos até 20 minutos; de vinte aos sessenta, com intervalos de 10 minutos; de 1 a 4 horas, com intervalos de 1 hora; de quatro a doze, com intervalos de duas horas e ainda com 18 e 24 horas.

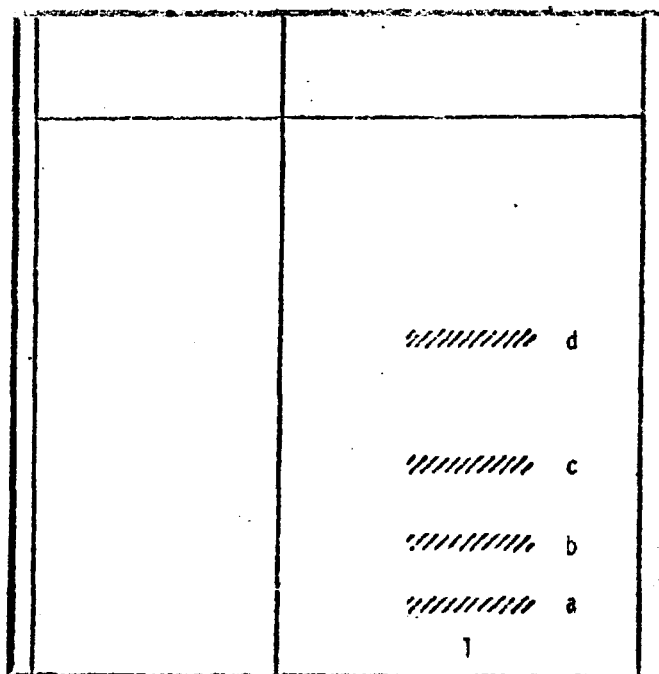


Fig.4- Representação do cromatograma resultante do subfracionamento dos ésteres de colesterol- $4C^{14}$ , obtidos após incubação do homogenato durante 1 hora.

Sistema de desenvolvimento: Hexano/Benzeno nas proporções de 2:1.

Revelação: borrifação com solução de rhodaminc-6G e exposição à luz ultravioleta.

1- Mistura dos ésteres de colesterol isolados de homogenato de fígado, com solução padrão de ésteres de colesterol: poliinsaturados(a), diinsaturados(b), monoinsaturados(c), saturados(d).

### 2.1.8 Velocidade inicial da esterificação do colesterol

Foi determinada das diferenças entre os níveis de colesterol esterificado após a incubação do sistema e os obtidos nos ensaios de tempo zero, respectivos. Foram realizadas avaliações com homogenatos de quinze fígados, na fase inicial da reação de esterificação e os resultados foram expressos em nmoles de EC sintetizado, por grama de tecido, por minuto.

### 2.1.9 Percentuais médios de esterificação do colesterol por hora

Ensaio foram realizados com as preparações de homogenato, durante uma hora de incubação, e os percentuais de esterificação foram calculados da relação entre a radioatividade incorporada aos ésteres de colesterol e o total da radioatividade recuperada nas duas frações (CL + EC). Foram conduzidos vinte ensaios e os resultados foram expressos em percentuais de esterificação por hora.

### 2.1.10 A esterificação "líquida" do colesterol

Foi determinada em quinze camundongos, por processo idêntico ao descrito no item anterior, sendo que as incubações foram levadas a efeito durante 24 horas.

### 2.1.11 : A distribuição relativa da radioatividade nos diferentes grupos de ésteres de colesterol

Foi calculada relacionando a radioatividade incorporada a cada um dos grupos de ésteres e o total da radioatividade recuperada nos diferentes grupos.

### 2.1.12 Medidas da radioatividade

A radioatividade foi medida em c.p.m., por um sistema de cintilação em líquido *Beckman*, com padronização ex-

terna automática. As frações do material foram removidas das cromatoplasas para recipientes apropriados e 10ml da solução cintiladora foram adicionados a cada recipiente. As contagens foram realizadas com um erro de 1% e corrigidas para o máximo de eficiência do anarelho com relação ao  $C^{14}$ .

### 2.1.13 Análise estatística dos resultados

Foram calculadas as médias com os respectivos desvios padrões das percentagens de esterificação do colesterol em uma hora e em vinte e quatro horas. Tratamento semelhante foi aplicado às atividades esterificantes, em termos absolutos, e expressas em nmoles de CL esterificado/g tecido/min.

## 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Resultados dos ensaios visando a caracterização da enzima hepática

## 3.1.1 A atividade LCAT relativa em fígado de camundongos

Como se pode observar da tabela I, o homogenato de fígado mostrou uma percentagem de esterificação de 2,32% por hora, enquanto que no plasma essa foi de 15%. Estes percentuais fornecem uma atividade LCAT relativa para o homogenato de 0,19. Quando homogenato de fígado foi incubado com plasma aquecido e diluído (de 1:1 com salina), este resultado foi praticamente reproduzido, com uma atividade LCAT relativa de 0,18.

GLONSET e KAPLAN<sup>10</sup>, realizando estudos com fígados de rato, nas mesmas condições, encontraram uma atividade relativa à LCAT plasmática de 0,18. Os nossos resultados estão, portanto em perfeita concordância com os desses investigadores. Apesar da atividade esterificante de homogenato de fígado ter-se mostrado cerca de 81% mais baixa que a do plasma de referência, convém salientar que esta representa ainda níveis bem consideráveis. Isto poderia ser justificado da seguinte maneira:

a) Uma atividade LCAT plasmática de camundongos com valores muito abaixo dos encontrados por OLIVEIRA e BORGES<sup>10</sup>, (56%) provavelmente por se tratar de plasma obtido na véspera da experiência, e conservado no congelador até o momento do ensaio.

b) Contaminação do homogenato por plasma residual uma vez que esta preparação foi obtida de fígado de ani-

TABELA I

ATIVIDADE ESTERIFICANTE DO COLESTEROL-4-C<sup>14</sup> EM HOMOGENATO DE FIGADO DE  
CAMUNDONGOS COMPARADA A DA LCAT PLASMÁTICA

O meio de incubação com um volume final de 0,6ml continha: colesterol-4-C<sup>14</sup> com atividade específica de 10<sup>-2</sup>µCi/164 nmoles, 5mg de albumina e 30µmoles de tampão fosfato de sódio pH 7,3. Os referidos percentuais de esterificação foram calculados da distribuição da radioatividade no colesterol livre e esterificado. As incubações foram feitas a 37°C durante 10 min.

Preparação	% de esterificação (por hora)	Atividade relativa à LCAT plasmática
Plasma ativo	15,00	1,00
Homogenato total	2,82	0,19
Homogenato total + PAD <sup>(a)</sup>	2,76	0,18
Homogenato total + PD <sup>(b)</sup>	7,32	0,49
Homogenato total + Plasma ativo	7,14	0,48

(a) PAD - Plasma aquecido e diluído de 1:1 com salina

(b) PD - Plasma diluído de 1:1 com salina



mais submetidos apenas à punção cardíaca, para a remoção do sangue. Uma possível contribuição de plasma residual seria a responsável pela atividade esterificante detectada. As incubações de plasma não aquecido diluído ou não, em presença de homogenato, apresentaram atividades LCAT de 0,9 e 0,48, respectivamente. Considerando que na primeira destas duas incubações o plasma foi diluído com salina na proporção de 1:1, a recuperação da atividade LCAT corrigida foi de 98%. A incubação de plasma não diluído em presença de homogenato, mostrou no entanto uma recuperação de apenas 48% da atividade LCAT plasmática. Isto poderia sugerir a presença, no fígado de camundongo, de algum componente com propriedades de inibir a atividade LCAT plasmática, ou a existência de atividade hidrolizante no referido tecido.

### 3.1.2 O efeito da concentração da enzima sobre a atividade enzimática

Incubações de colesterol-4-C<sup>14</sup> com homogenato de fígado de camundongos, este variando de 10 a 60 mg de tecido, forneceram percentuais de esterificação que estão representados na figura 5. Da análise dessa figura, observa-se que:

1) A atividade esterificante do colesterol aumentou com acréscimos na concentração da enzima, na faixa de 10 a 30 mg de tecido hepático.

2) O aumento da atividade em função da concentração da enzima, até 30 mg de tecido, ocorre pelo menos quando a concentração do substrato é da ordem de 164 a 492 nmoles de colesterol exógeno. Uma análise mais detalhada dos resultados forneceu os dados seguintes:

a) tomando por base a atividade esterificante obtida com 10 mg de tecido, em ensaios conduzidos com 10 mg de tecido, em ensaios conduzidos

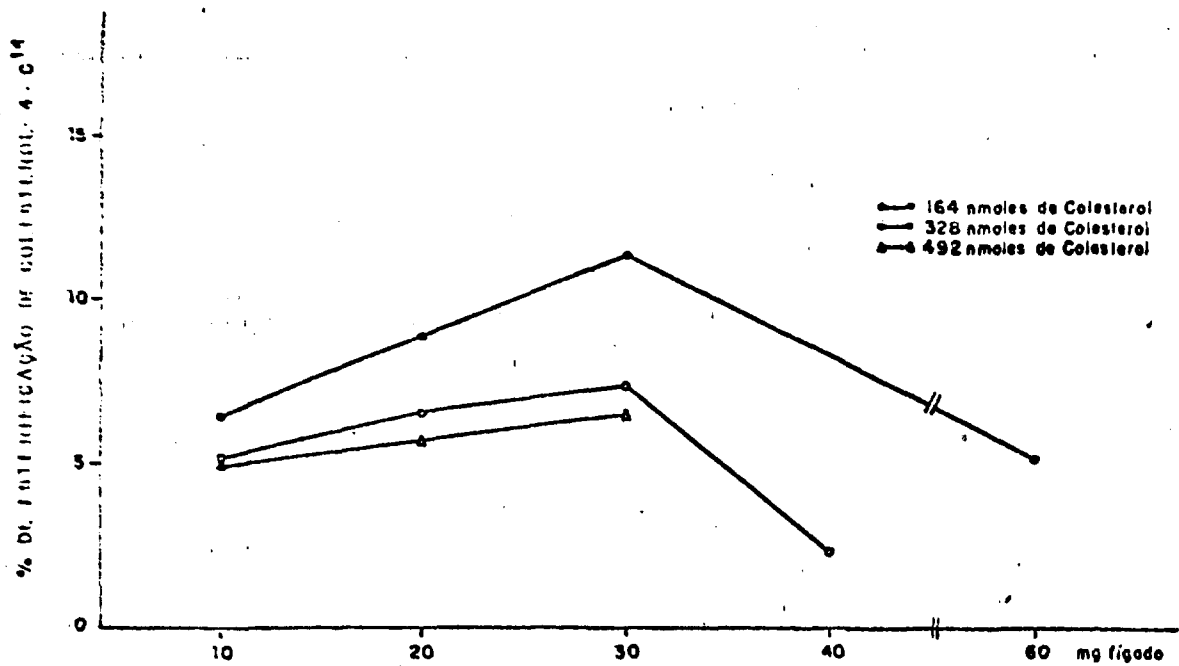


Fig.5- O efeito da concentração da enzima sobre a esterificação do colesterol-4 - C<sup>14</sup> por fígado de camundongos. O sistema de incubação consistiu de: 150 μmoles de Tampão Fosfato pH 7,4, 0,3 μmoles de CoA, 7,5 μmoles de ATP, Colesterol-4 - C<sup>14</sup> em solução de albumina a 5%, com atividade de 1 x 10<sup>-2</sup> a 3 x 10<sup>-2</sup> μCi e homogenato de fígado em concentrações que variam de 10 a 60 mg de tecido fresco, num volume final de 0,8 ml. As incubações foram realizadas durante 60 min. a 37°C.

com 164 nmoles de colesterol exógeno, houve acréscimos de 35,5 e 72,2%, quando as concentrações de tecido foram de 20 e 30 mg respectivamente. Concentrações de 60 mg de tecido, ao contrário, produziram inibições da ordem de 55,7% quando comparadas à atividade obtida com 30 mg do tecido hepático.

- b) acréscimos de 31,2 e 74,3%, foram assinalados para as concentrações de 20 e 30 mg, quando a concentração do substrato foi aumentada para 328 nmoles. Esses aumentos foram discretamente inferiores aos referidos no item anterior. Concentrações de 40 mg produziram inibições de 72,1% na atividade observada com 30 mg de tecido e com 328 nmoles de colesterol exógeno;
- c) ensaios com 20 e 30 mg de tecido mostraram acréscimos da atividade observada com 10 mg, correspondentes a 13,8 e 31,4% respectivamente, quando a concentração do substrato exógeno foi elevada para 492 nmoles. Os níveis de atividade, nesse último caso, foram do mesmo modo aumentados, mas com essa concentração de colesterol os acréscimos foram bem menores. Concentrações superiores a 30 mg de tecido não foram testadas com 492 nmoles de colesterol exógeno.

### 3.1.3 O efeito da concentração do substrato exógeno sobre a atividade enzimática

Os traçados da figura 6 representam percentuais de esterificação que mostram o efeito das concentrações de 164, 328 e 492 nmoles de colesterol exógeno, sobre a atividade enzimática. Observa-se o seguinte:

- a) o aumento da concentração do substrato determinou quase sempre um decréscimo na atividade

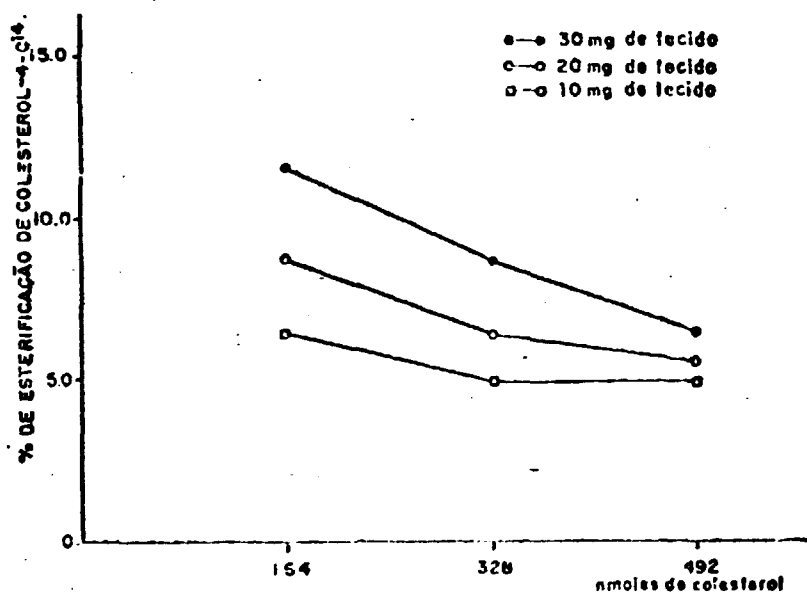


Fig. 6 - Efeito da concentração do substrato sobre a esterificação do colesterol -4-C<sup>14</sup> por fígado de camundongos. O sistema de incubação como descrito na Fig. 5.

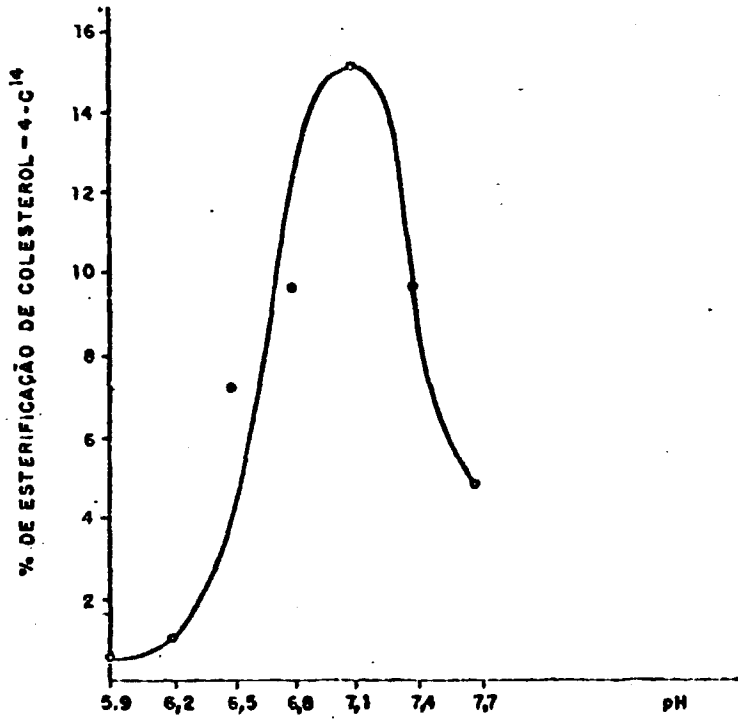
enzimática, quando ensaios com concentrações constantes da enzima;

- b) a diminuição da atividade, com o aumento da concentração do substrato, foi mais evidente quando a concentração da enzima foi equivalente a 30 mg de tecido;
- c) quando a concentração da enzima foi equivalente a 10 mg de tecido as atividades foram praticamente iguais com concentrações de 328 e 492 nmoles de colesterol exógeno.

Do exposto, ficou bem evidente, portanto, de que, nas condições experimentais por nós utilizadas, as concentrações ótimas da enzima e substrato para a atividade esterificante do colesterol por homogenato de fígado de camundongos, correspondem, respectivamente, a 30 mg de tecido e 164 nmoles de substrato exógeno. No que tange a concentração da enzima, em mg de tecido, os nossos valores foram superiores aos sugeridos por GOODMAN & COLS.<sup>07</sup> e STOKKE<sup>14</sup>.

### 3.1.4 O efeito do pH sobre a atividade esterificante do colesterol

Ensaio conduzido com sistemas de incubação, cujo pH variou de 5,9 a 7,7 unidades, com intervalos de 0,3, indicaram 7,1 como o pH ótimo para a atividade esterificante do colesterol-4-C<sup>14</sup>, por homogenato de fígado de camundongos. A figura 7 mostra que em pH (s) adjacentes ao de maior atividade a esterificação foi muito mais baixa. Este resultado é comparável ao obtido por GOODMAN & COLS.<sup>07</sup> STOKKE<sup>14</sup>, entretanto, muito recentemente utilizou o pH 7,3 para estudos da atividade ACAT por fígados de diferentes mamíferos.



**Fig. 7 - Efeito do pH sobre a esterificação do colesterol-4-C<sup>14</sup> por homogenato de fígado de camundongos. O sistema de incubação num volume final de 0,85 ml continha além do descrito na Fig. 5, 50  $\mu$ moles de oleato de sódio. Atividade do colesterol-4-C<sup>14</sup> equivalente a 0,01  $\mu$ Ci e a concentração da enzima contida em 30 mg de tecido fresco. A incubação foi conduzida durante 60 min. a 37°C.**

### 3.1.5 A influência de cofatores sobre a atividade esterificante do colesterol

Ensaio conduzidos com omissões de ATP e coenzima A, do sistema de incubação, simultânea ou isoladamente, mostraram uma dependência quase absoluta de coenzima A, para a esterificação do colesterol-4-C<sup>14</sup> por homogenato de fígado de camundongos. Como se pode observar da tabela II a omissão da coenzima A no sistema de incubação produziu uma esterificação do colesterol-4-C<sup>14</sup> equivalente a 46,5% do ensaio controle (nenhuma omissão). Esse resultado foi comparável ao ensaio em que além dos dois cofatores, oleato de sódio também foi omitido. Quando, porém, ATP foi omitido do sistema a esterificação alcançou níveis de 82,5% da observada no controle, sugerindo que as concentrações de ATP no "pool" endógeno desse componente, são suficientes para conduzir a reação com a velocidade máxima no homogenato de fígado de camundongo. Estes resultados poderiam reforçar a sugestão de que a enzima esterificante do fígado de camundongos, funciona com um mecanismo idêntico a do fígado de rato - a Acil CoA: Colesterol-Acil-Transferase (ACAT).

### 3.2. A formação de ésteres de colesterol em função do tempo de incubação

A figura 8 mostra a curva que representa os percentuais de esterificação do colesterol em função do tempo. Quatro estágios bem distintos podem ser observados:

- estágio A, até 1 hora;
- estágio B, de 1 a 4 horas;
- estágio C, de 4 a 12 horas;
- estágio D, de 12 a 24 horas.

É de suma importância que se estabeleça os limites desses estágios quando se pretende estudar a esterifi-

TABELA II

INFLUÊNCIA DE COFADORES SOBRE A ESTERIFICAÇÃO DO COLESTEROL EM HOMOGENATO DE FÍGADO DE CAMUNDONGOS

As incubações foram realizadas a pH 7,1 durante 1 hora a 37°C. O meio de incubação completo continha: 30mg de tecido fresco, 7,5µmoles de ATP, 0,3µmoles de CoA, 150µmoles de tampão fosfato e 50nmoles de oleato de sódio, 5mg de albumina e colesterol-4-C<sup>14</sup> com atividade específica de 10<sup>-2</sup>µCi/164nmoles.

Omissão	Esterificação %
Nenhuma (sistema completo)	11,6
ATP	9,6
CoA	5,4
Oleato de sódio	11,0
ATP, CoA e oleato de sódio	5,2



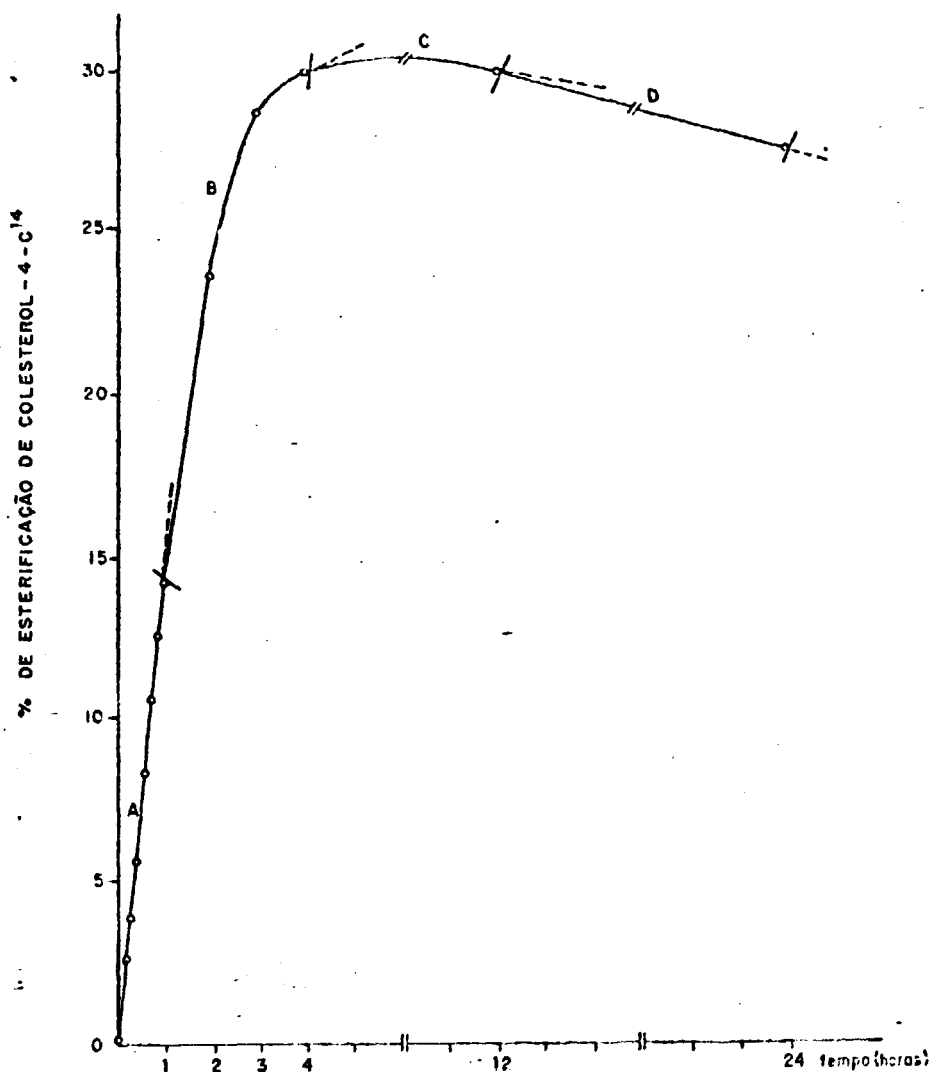


FIG. 8 - Porcentagens de esterificação do colesterol-4-C<sup>14</sup> em homogenato de fígado de camundongos, em função do tempo. O sistema de reação, num volume final de 0,65 ml e a pH 7,1, continha: 30  $\mu$ g de tecido hepático, 50 nmoles de oleato de cálcio, 7,5 nmoles de ATP, 0,3 nmoles de CoA e colesterol com atividade específica de  $1.10^{-2}$   $\mu$ Ci/100 nmoles.

cação do colesterol, uma vez que a exatidão dos resultados, principalmente no que tange à velocidade da reação ou concentração da enzima dependem do intervalo de tempo em que são determinadas.

NORUM<sup>24</sup> definiu e caracterizou muito bem esses estágios: o estágio A, por exemplo, que reflete a composição do meio de incubação pode variar de espécie a espécie, tornando ainda mais críticas as determinações referidas acima, sem o conhecimento prévio dos limites do estágio A. Estudos sobre a atividade LCAT em plasmas de animais por diferentes grupos de investigadores, discutidos mais adiante, fornecem subsídios para tal afirmativa.

Segundo NORUM<sup>24</sup>, o estágio A reflete sobretudo o nível da enzima, muito embora a velocidade da reação também dependa da concentração do substrato; o estágio B representa a "etapa limitante" da velocidade da reação e o estágio C reflete a falta de substrato disponível para levar a termo a reação ou poderia indicar uma inibição do processo pelos produtos da reação. No que se refere ao limite do estágio A, esta ainda restrito à atividade LCAT de algumas espécies animais. Assim, LACKO & COLS.<sup>25</sup> e STOKKE & NORUM<sup>20</sup>, estudando isoladamente a velocidade de esterificação, em plasma humano normal, mostraram que o limite desse estágio situa-se entre 40 a 60 minutos.

DREYON & NORUM<sup>24</sup>, entretanto, encontraram valores bem mais baixos para LCAT de ratos e cobaias. Acerca do comportamento da enzima esterificante do colesterol em camundongos, sob esse aspecto, nenhuma informação foi obtida, quer no plasma, quer no fígado.

Da análise da curva representada pela figura 8, verifica-se que:

1) No estágio A a velocidade de esterificação do colesterol foi constante e proporcional ao tempo de incubação, pois depende da concentração da enzima no meio de incubação. Em consequência, houve um aumento linear no percentual de esterificação em função do tempo. Por essa

razão determinações da atividade esterificante do colesterol, em termos absolutos, foram procedidas nesse estágio e os resultados serão discutidos mais adiante. As atividades esterificantes do colesterol correspondentes aos diferentes pontos da curva, expressas em termos absolutos, ou seja, CL esterificado em nmoles por grama de tecido, por minuto, deixaram de ser incluídas nos nossos resultados por se mostrarem equivalentes às respectivas percentagens de esterificação por hora;

2) No estágio B, as percentagens de esterificação continuaram a aumentar (em função do tempo) mas não linearmente, tanto que houve um declínio nas percentagens de esterificação relativa correspondente a 16,7%, 33,4% e 52,4% aos 120, 180 e 240 minutos de incubação, respectivamente;

3). No estágio C, nenhuma esterificação líquida ocorreu. É a etapa em que a esterificação independe da concentração da enzima e provavelmente há uma diminuição na concentração de colesterol não esterificado disponível para a esterificação ou ainda inibição do processo pelos produtos da reação;

4) No estágio D, houve uma diminuição na concentração relativa do colesterol esterificado no meio de incubação, pelo menos até 24 horas. Este efeito poderia decorrer de um desequilíbrio entre os processos de formação e de hidrólise dos ésteres de colesterol, ou de um aumento da atividade hidrolítica dos ésteres nos períodos prolongados de incubação do homogenato.

### 3.3 Velocidade de esterificação do colesterol-4-C<sup>14</sup>

A velocidade de esterificação do colesterol foi constante até sessenta minutos de incubação.

Em termos absolutos, a atividade esterificante do colesterol por homogenato de fígado de camundongos, em

quinze determinações procedidas no estágio inicial da reação (intervalo A da curva da figura 8), e expressa em nmoles de CL esterificado por grama de tecido, por minuto, foi de  $24,0 \pm 2,9$ , conforme se observa da tabela III. STOKKE & MORUM<sup>13</sup>, referem uma atividade total para a ACAT de fígado de rato, de 3 a 4 nmoles CE/g de tecido/min, com colesterol endógeno, obtido por administração de mevalonato-5-<sup>14</sup>C. O dobro desses valores foi obtido em ensaios com colesterol exógeno. Atribuem que os resultados mais elevados, no último caso, decorram do fato de não ter sido alcançado o equilíbrio isotópico entre as duas formas de colesterol. É, portanto, muito difícil a interpretação dos resultados da esterificação com o colesterol radioativo exógeno, por não ser conhecido o grau das trocas isotópicas entre esta forma e o colesterol endógeno inativo, o que dificulta o cálculo exato da atividade (ROSE<sup>18</sup> e STOKKE & MORUM<sup>13</sup>).

Em fígados de camundongos obtivemos atividades cerca de três a quatro vezes superiores as assinaladas pelos referidos investigadores, em fígado de ratos. Isto poderia sugerir que o equilíbrio isotópico tenha ocorrido em condições muito mais precárias nos ensaios com fígado de camundongos. Uma outra alternativa seria admitir que a velocidade inicial de esterificação do colesterol exógeno por fígado de camundongo seja maior do que a de fígado de rato.

### 3.4 Percentuais de esterificação por hora

Determinações da percentagem de esterificação do colesterol realizadas em homogenatos de fígado de 20 camundongos, na fase inicial da reação (estágio A da curva da figura 8) revelaram um percentual médio de esterificação de  $14,8 \pm 1,6$  por hora, conforme se observa da tabela IV.

TABELA III

ATIVIDADE ACAT EM HOMOGENATO DE FÍGADO DE CAMUNDONGOS EXPRESSA  
EM nMoles DE CL ESTERIFICADO POR GRAMA DE FÍGADO, POR MINUTO

As incubações foram realizadas conforme foi descrito na fig. 7. As diferenças entre os níveis de EC determinados no estágio inicial da reação (fig. 8) e os encontrados no tempo zero serviram de base para cálculo da concentração do CL esterificado.

---

Número de Animais,	Atividade ACAT
15	24,0 ± 2,9 <sup>a</sup>

---

<sup>a</sup> Média ± desvio padrão.

TABELA IV

ATIVIDADE ACAT EM HOMOGENATO DE FÍGADO DE CAMUNDONGOS,  
EXPRESSA EM PERCENTUAL POR HORA

As incubações foram conduzidas a 37°C em pH 7,1. O sistema foi idêntico ao mencionado na fig. 7. Os valores estão representados pela média  $\pm$  desvio padrão.

Número de Animais	Atividade ACAT
20	14,8 $\pm$ 1,6

STOKKE<sup>14</sup> procedendo determinações em extrato citoplasmático de fígado de rato, em condições experimentais muito semelhantes às que utilizamos, encontrou um percentual médio de  $14,6 \pm 2,4$ . Os nossos resultados estão de acordo com os de STOKKE<sup>14</sup>, embora as preparações ensaiadas tenham sido diferentes.

Do mesmo modo, em estruturas intracelulares de fígado de rato, GOODMAN & Cols.<sup>07</sup>, referem percentuais de esterificação semelhantes ou discretamente mais baixos, ou seja, 13,1 e 11,3 em microsomas e mitocôndrias, respectivamente. DEYKIN & GOODMAN<sup>06</sup>, entretanto, encontraram o percentual de 9,5 por hora, em microsomas de fígado do mesmo animal.

### 3.5 Esterificação "líquida" do colesterol em fígado de camundongos

Da análise da tabela V podemos constatar que a esterificação "líquida" do colesterol, em quinze determinações, procedidas com homogenato de fígado de camundongos, apresentou um percentual médio de  $21,9 \pm 4,5$  por 24 horas.

A esterificação "líquida" do colesterol em fígado de rato, referida por outros investigadores tem se mostrado ligeiramente ou muito mais baixa. Assim, LOPEZ-SANTOLINO<sup>26</sup>, encontrou um percentual de  $16,0 \pm 0,0$  por 24 horas, em estudos conduzidos com homogenato de fígado de ratos recém-nascidos. SNELL & Cols.<sup>12</sup>, entretanto, assinalaram um percentual de  $11,0 \pm 4,3$  por 24 horas, quando investigaram o papel do fígado de rato no metabolismo de ésteres de colesterol exógeno.

### 3.6 A distribuição relativa da radioatividade nos diferentes grupos de ésteres de colesterol

TABELA V

ESTERIFICAÇÃO LÍQUIDA DE COLESTEROL-4-C<sup>14</sup> EM HOMOGENATO DE FÍGADO DE  
CAMUNDONGOS EXPRESSA EM PORCENTAGEM DE CL ESTERIFICADO EM 24 HORAS

As incubações foram conduzidas a 37°C em pH 7,1. O sistema foi idêntico ao mencionado na fig. 7. Os valores estão representados pela média ± desvio padrão.

Número de Animais	Atividade ACAT
15	21,9 ± 4,5



Subfracionamentos por cromatografia em camada fina, dos ésteres de colesterol, sintetizados por homogenato de fígado de camundongos, durante 1 hora de incubação, forneceram os percentuais de esterificação de  $23,6 \pm 1,8$ ,  $44,5 \pm 5,1$ ,  $25,6 \pm 4,2$  e  $6,3 \pm 3,3$  para os ésteres de colesterol saturados, mono-insaturados, di-insaturados e poli-insaturados, respectivamente.

Esses valores constam da tabela VI e mostram que há uma diferença bem evidente na velocidade de esterificação do colesterol com alguns dos grupos de ácidos graxos de cadeia longa, presentes no "pool" de ácidos graxos do fígado de camundongos. Essa diferença na distribuição relativa da radioatividade nos correspondentes grupos de ésteres de colesterol determina que  $ECMI > ECPI > ECS \gg ECPI$ .

Convém salientar que esta sequência de formação dos referidos ésteres, é, de certo modo, semelhante à assinalada por GOODMAN & Cols.<sup>07</sup>, sugerindo que a enzima esterificante do colesterol de fígado de camundongos apresenta uma especificidade relativa muito semelhante à encontrada em fígado de ratos por GOODMAN & Cols.<sup>07</sup>. Mais um dado a favor de que se trata de uma Acil-CoA: Colesterol-Acil Transferase nos foi fornecido pelas observações aqui discutidas.

Nós entendemos que os nossos achados, poderão contribuir de maneira bem sugestiva para o estudo da Bioquímica Comparada.

Investigações em andamento em nosso Laboratório, têm por finalidade não somente complementar os estudos de caracterização da enzima (usando inibidores, etc.), bem como contribuir para o setor da Bioquímica Aplicada, com a esterificação do colesterol por homogenato de fígado de camundongos esquistossomóticos, *in vitro* com colesterol- $14C^{14}$  exógeno e *in vivo* com colesterol- $H^3$  endogenamente marcado, a partir de mevalonato  $H^3$ .

TABELA VI

DISTRIBUIÇÃO RELATIVA DA RADIOATIVIDADE NOS DIFERENTES  
GRUPOS DE ÉSTERES DE COLESTEROL

As incubações foram realizadas durante 1 hora, a 37°C e pH 7,1. O sistema de incubação, com um volume final de 0,85 ml, foi idêntico ao mencionado na figura 7.

Número de Animais	Distribuição da radioatividade nos diferentes grupos de ésteres de colesterol <sup>a</sup>			
	ECS	ECMI	ECDI	ECPI
8	23,6 ± 1,8	44,5 ± 5,1	25,6 ± 4,2	6,3 ± 3,3

<sup>a</sup> Percentuais médios e respectivos desvios padrões

## 4 - CONCLUSÕES

- 1) Uma atividade esterificante do colesterol em homogenato de fígado de camundongos foi mostrada utilizando Colesterol-4- $C^{14}$  como substrato;
- 2) O pH ótimo de ação da referida enzima, na faixa 5,9 a 7,7, foi bem definido, e correspondeu a 7,1;
- 3) A enzima mostrou uma dependência relativa para o ATP e absoluta pela CoA, indicando, portanto, um mecanismo de ação semelhante ao da ACAT de fígado de rato;
- 4) A velocidade de esterificação foi constante até sessenta minutos, levando a aumentos dos percentuais de esterificação em função do tempo;
- 5) A atividade esterificante do colesterol, em termos absolutos, calculada na fase inicial da reação, correspondeu a  $24,0 \pm 2,9$  nmoles de CL esterificado por grama de tecido, por minuto;
- 6) O percentual médio de esterificação, foi de  $14,8 \pm 1,6$  por hora;
- 7) A esterificação "líquida" apresentou um percentual médio de  $21,9 \pm 4,5$  em 24 horas;

- 8) A enzima apresentou uma especificidade relativa para a formação dos ésteres de colesterol segundo a sequência: ECMI > ECPI > ECS >> ECPI.

## 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - SPERRY, W. H. & BRAND, F. C. A study of cholesterol esterase in liver and brain. *J. Biol. Chem.* 137:377-387, 1941
- 02 - NIEFT, M. L. & DFUEL, H. J., Jr. Studies on cholesterol esterases. I. Enzymes systems in rat tissues. *J. Biol. Chem.* 177:143-150, 1949
- 03 - FREDRICKSON, D. S. The conversion of cholesterol-4-C<sup>14</sup> to acids and other products by liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 222:109-120, 1956
- 04 - MUKHERJEE, S., KUNITAKE, G. & ALFIN-SLATER, R. B. The esterification of cholesterol with palmitic acid by rat liver homogenates. *J. Biol. Chem.* 230:91-96, 1958
- 05 - SWELL, L. & TREADWELL, C. R. Sterol ester formation by rat liver cell fractions. *Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med.* 110:55-57, 1962
- 06 - DEYKIN, D. & GOODMAN, DeWITT, S. The esterification of cholesterol by rat liver particles. *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 8:411-415, 1962
- 07 - GOODMAN, DeWITT, S. DEYKIN, D. & SHIRATORI, T. The formation of cholesterol esters with rat liver enzymes. *J. Biol. Chem.* 239:1335-1345, 1964
- 08 - GLOMSET, John A., KAPLAN, David M. The distribution of plasma fatty acid transferase-like activity in rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* 98:41-46, 1965

- 09 - BENNETT, J. R. The esterification of cholesterol by rat liver preparations. *Biochim. Biophys. Acta.* 70: 465-466, 1963
- 10 - GOODMAN, DEWITT, S. The metabolism of chylomicron cholesterol ester in the rat. *J. Clin. Invest.* 41:1886-1896, 1962
- 11 - SUGANO, M. & PORTMAN, O. H. Fatty acid specificities and rates of cholesterol esterification *in vivo* and *in vitro*. *Arch. Biochem. Biophys.* 107:341-351, 1964
- 12 - SWELL, L., LAW, M. D. & TREADWELL, C. R. Role of the liver in the metabolism of exogenous cholesterol esters. *Arch. Biochem. Biophys.* 105:541-553, 1964
- 13 - STOKKE, K. T. & NORUM, K. R. Subcellular distribution of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase in rat liver cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 210:202-204, 1970
- 14 - STOKKE, K. T. Cholesteryl ester metabolism in liver and blood plasma of various animal species. *Atherosclerosis.* 19:393-406, 1974
- 15 - SWELL, L., & LAW, M. D. Labeling of liver and serum cholesterol esters after the injection of cholesterol-4-C<sup>14</sup> esters. *Arch. Biochem. Biophys.* 113:143-149, 1966
- 16 - ROHEIM, P. S., HAFT, D. E., GIDEZ, L. I. WHITE, A. & EDER, H. A. Plasma lipoprotein metabolism in perfused rat livers. II. Transfer of free and esterified cholesterol into plasma. *J. Clin. Invest.* 42:1277-1285, 1963

- 17 - GIDEZ, L. I., ROHEIM, P. S. & EDER, H. A.J. Lipid Res. 6:377-382, 1965. in: ROSE, H. G. Origin of cholesterol esters in the blood of cholesterol-fed rabbits: relative contributions of serum lecithin-cholesterol acyl-transferase and hepatic ester synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 90:194-196, 1964
- 18 - ROSE, H. G. Origin of cholesterol esters in the blood of cholesterol-fed rabbits: relative contributions of serum lecithin-cholesterol acyltransferase and hepatic ester synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 260:312-326, 1972
- 19 - OLIVEIRA, D. N. G. & BORGES, S. Esterification of cholesterol by plasma from normal and *Schistosoma mansoni* infected mice. *Memórias do Instituto de Biociências da U. F. PE.* 1(1):359-376, 1974
- 20 - STOKKE, K. T. & NORUM, K. R. Determination of lecithin: cholesterol acyltransferase in human blood plasma. *The Scand J. Clin. Lab. Invest.* 27:21-27, 1971
- 21 - FOLCH, J., LEES, T. & G. H. SLOANE, STANLEY, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-509, 1957
- 22 - OLIVEIRA, Dalmo. N. G. de, COSTA, José Carlos de M. & CARVALHO, Adriana B. de. Concentrações de colesterol e de ésteres de colesterol no fígado de camundongos infectados pelo *Shistosoma mansoni*. *Rev. Bras. de Pesquisas Méd. e Biol.* 7:525-528, 1974

- 23 - MORRIS, L. J. Fractionation of cholesterol esters by thin-layer chromatography. *J. Lipid. Res.* 4:357-359, 1963
- 24 - HORUM, K. R. The enzymology of cholesterol esterification. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 137:7-13, 1974
- 25 - LACKO, A. G. RUTENBERG, H. L. & SOLOFF, L. A. On the rate of cholesterol esterification in cord blood serum. *Lipids.* 7:426-429, 1972
- 26 - LOPEZ-SANTOLINO, A., Studies of cholesterol ester metabolism in newborn and adult rats. A *DISSERTATION* submitted to the Department of Biochemistry of Tulane University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy, Tulane, 1963. -



## 6 - ÍNDICES DE FIGURAS E TABELAS

## 6.1 Índice de figuras

- Fig. 1 - Representação do cromatograma resultante da separação dos lipídios em diferentes classes obtidos após incubação do homogenato de fígado de camundongos durante 1 hora..... 11
- Fig. 2 - Representação do cromatograma resultante da separação dos lipídios em diferentes classes, para comprovação da natureza esterólica das frações de EC e CL..... 13
- Fig. 3 - Representação do cromatograma resultante da separação dos lipídios em diferentes classes visando o isolamento dos EC para posterior subfracionamento..... 14
- Fig. 4 - Representação do cromatograma resultante do subfracionamento dos ésteres de colesterol- $4C^{14}$ , obtidos após incubação do homogenato durante 1 hora..... 16
- Fig. 5 - O efeito da concentração da enzima sobre a esterificação do colesterol- $4C^{14}$  por fígado de camundongos..... 22
- Fig. 6 - O efeito da concentração do substrato sobre a esterificação do colesterol- $4C^{14}$  por fígado de camundongos..... 24

	46
Fig. 7 - Efeito do NH sobre a esterificação do colesterol-4C <sup>14</sup> por homogenato de fígado de camundongos.....	26
Fig. 8 - Percentagens de esterificação do colesterol-4C <sup>14</sup> em homogenato de fígado de camundongos em função do tempo.....	29

## 6.2 Índice de tabelas

Tabela I -Atividade esterificante do colesterol-4C <sup>14</sup> em homogenato de fígado de camundongos comparada à da LCAT plasmática.....	20
Tabela II- Influência de cofatores sobre a esterificação do colesterol em homogenato de fígado de camundongos.....	28
Tabela III- Atividade ACAT em homogenato de fígado de camundongos expressa em n <sup>o</sup> les de CL esterificado por grama de fígado, por minuto...	33
Tabela IV - Atividade ACAT em homogenato de fígado de camundongos, expressa em percentual por hora.....	34
Tabela V - Esterificação líquida de colesterol-4C <sup>14</sup> em homogenato de fígado de camundongos expressa em percentagem de CL esterificado em 24 horas.....	36
Tabela VI - Distribuição relativa da radioatividade nos diferentes grupos de ésteres de colesterol.	38

SOARES, Maria das Graças Castelo Branco  
Atividade esterificante do colesterol  
em homogenato de fígado de camundongos.  
Uma contribuição ao estudo da acil-CoA:  
colesterol acil transferase em fígado  
de mamíferos. Recife, 1976. 46p.

Tese. Univ. Fed. Pernambuco. Centro  
de Ciências Biológicas. Dep. Bioquímica  
e Biofísica. (Mestrado).

591. 192 47 CDD