

## VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA O ESTUDO DA LIPASE SENSÍVEL A HORMÔNIO EM VACAS EM LACTAÇÃO<sup>(1)</sup>

DANTE PAZZANESE DUARTE LANNA<sup>(2)</sup> e DALE ELTON BAUMAN<sup>(3)</sup>

**RESUMO:** Este trabalho objetivou: a) desenvolver técnicas para mensuração da HSL (Lipase sensível a hormônio) em tecido adiposo de vacas em lactação; e b) medir a ativação da HSL por "segundos mensageiros" responsáveis pela fosforilação da HSL. Utilizaram-se como substrato emulsões de trioleína radioativa (<sup>3</sup>H-trioleína). A emulsão foi preparada por sonicação em solução 0,1M de fosfato, pH= 7,0. A utilização da mistura de 2,5mg/ml de fosfatidilcolina e 1,5mg/ml de fosfatidiletanolamina como emulsificante proporcionou as maiores atividades. Obteve-se a enzima por homogeneização, centrifugação a 90.000xg, por 50 min e precipitação a pH= 5,2. Demonstrou-se linearidade da atividade em função da quantidade de enzima e tempo de reação. Obteve-se ativação da HSL *in vitro* com dibutiril AMP cíclico (dbcAMP), ATP, proteína quinase-A e MgCl<sub>2</sub>, sendo estes resultados os primeiros publicados na literatura, com bovinos. Para tecido adiposo de bovinos foram necessárias concentrações de 2mM de ATP e 3 μM de dbcAMP para maximizar a ativação da HSL. Estudos da cinética da HSL demonstraram que o K<sub>m</sub> da enzima bovina foi de 0,3 mM de trioleína. A ativação da HSL por dbcAMP, determinada em diversas concentrações de substrato, foi proporcionalmente maior em concentrações próximas ao K<sub>m</sub>, sugerindo que a ativação altera a interface enzima-gota de lipídeo. A metodologia parece adequada para medir a atividade da HSL e a ativação da enzima é função do aumento da afinidade da enzima pelo substrato.

**Termos para indexação:** lipase sensível a hormônio, lipólise, ruminante, lactação

### *Validation of methodologies for the study of hormone-sensitive lipase in lactating cows adipose tissue*

**SUMMARY:** The objectives of this study were: a) to validate techniques to measure HSL in adipose tissue from lactating cows; and b) to measure activation of HSL by second messengers responsible for HSL phosphorylation. Radioactive labelled trioleine (<sup>3</sup>H-trioleína) was used as a substrate. The emulsion was prepared by sonication in a buffer solution containing 0.1M phosphate, pH= 7.0, which minimized interference of lipoprotein lipase in the assay. Utilization of a mixture of 25mg/ml de phosphatidil-choline and 15mg/ml

- (1) Trabalho financiado em parte pela Cornell University Agricultural Experimental Station e USDA Competitive Research Grant Number 89-37265-4478. Parte da tese de PhD apresentada pelo primeiro autor à Cornell University. Parte deste trabalho apresentado na Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia em 1994. Recebido para publicação em março de 1995
- (2) Departamento de Zootecnia, ESALQ/USP, Piracicaba, SP
- (3) Animal Science Department, Cornell University, Ithaca, NY, EUA.



phosphatidil-ethanolamine as emulsifiers produced the higher HSL activities. Enzyme was obtained by homogenization, centrifugation at 90,000xg (50 min) and precipitation at pH= 5.2. Linearity of the assay was demonstrated for changes in amount of enzyme and reaction time. HSL was activated *in vitro* with cyclic dibutiril AMP (dbcAMP), ATP, protein kinase A and MgCl<sub>2</sub>, and these are the first published results in the literature for ruminants. Concentrations of 2mM ATP and 3μ M dbcAMP were necessary to maximize activation of HSL. Kinetic studies of HSL demonstrated that the K<sub>m</sub> for the bovine enzyme was 0.3mM of trioleina. Activation of HSL by dbcAMP, determined in various concentrations of substrate, was proportionally higher in concentrations near K<sub>m</sub>, suggesting that activation alters the interface enzyme-lipid droplet, and not the turnover number. In conclusion, the methodology allows the determination of HSL activity and the activation of the enzyme appears to be the result of increased affinity for the substrate.

Indexterms: hormone-sensitive lipase, lipolysis, ruminant, lactation

## INTRODUÇÃO

A mobilização das reservas de gordura permite que altas produções de leite sejam obtidas nos estágios iniciais da lactação, quando a ingestão de alimentos é insuficiente para atender às elevadas demandas da glândula mamária. Vacas superiores para produção de leite são capazes de atingir um maior balanço negativo de energia no início da lactação (BAUMAN e ELLIOT, 1983) assim como o tratamento de vacas em lactação com somatotropina (ST) aumenta a mobilização das reservas corporais de gordura (SECHEN et al., 1989).

Os mecanismos envolvidos no aumento da lipólise foram largamente estudados (ver BAUMAN e VERNON, 1993) sendo aceito, pela maioria dos autores, que a enzima limitante no controle da lipólise é a lipase sensível a hormônio (HSL) (VAUGHAN et al., 1964; STRALFROS e BELFRAGE, 1985). A atividade da HSL é modulada de diversas formas na célula. BUTCHER e BAIRD (1968) demonstraram que a incubação com epinefrina ou dibutiril AMP cíclico resulta em aumento na atividade da enzima em tecido adiposo. A purificação da enzima permitiu demonstrar que a ativação da HSL é função da fosforilação reversível em dois resíduos de aminoácidos na cadeia protéica da enzima (BELFRAGE, 1984). A atividade da HSL é também modulada por mecanismo onde estímulos hormonais facilitam a interação da HSL com a gota de lipídeo na célula, aparentemente em função da fosforilação de proteínas que recobrem a gota de lipídeo no adipócito (OKUDA et al., 1966; HIRSCH e ROSEN, 1984; EGAN et al., 1992).

O objetivo deste trabalho foi validar metodologias para determinação da atividade da HSL do tecido

adiposo de vacas em lactação, bem como identificar as condições ideais para ativação da enzima.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais e dietas

Cinco vacas holandesas múltiparas (601± 57 Kg peso vivo, média desvio padrão) na metade da lactação (167 ± 29 dias pós-parto, média ± desvio padrão) foram utilizadas. As vacas foram alojadas em ambiente controlado, a 23°C com ciclo de luz de 16 horas/dia; sendo alimentadas e ordenhadas duas vezes ao dia às 8horas e 18h30. A dieta completa foi formulada para prover 120% dos requerimentos de energia e proteína estimados a partir de consumo *ad libitum* mais 1kg/d de feno.

### Incubações de tecido adiposo

O tecido adiposo subcutâneo foi obtido por biópsia, no oitavo dia de tratamento, às 9h30, da região da anca, como descrito por McNAMARA e HILLERS (1986). O tecido foi retirado aspticamente e colocado em uma solução salina com 25mM de HEPES, a 37°C e pH 7,4 sendo transferido para o laboratório dentro de 5 minutos após a biópsia.

As taxas de lipólise foram medidas usando explantes de tecido adiposo (INGLE et al., 1972). Os explantes (aproximadamente 100mg) foram preparados com micrótomo e pré-incubados, por 15 minutos, em solução tampão de Krebs-Ringer com bicarbonato e 25mM de HEPES (KRB). Posteriormente, os explantes foram transferidos para frascos contendo o meio de KRB: a) sem adição de hormônios (lipólise basal); ou b)



com adição de  $10^{-5}$ M isoproterenol mais 0,75U/ml de adenosina deaminase (lipólise estimulada). Ensaio preliminares deste estudo demonstraram que este último tratamento, nas referidas concentrações, maximizava as taxas de lipólise. A adenosina deaminase é uma enzima que metaboliza a adenosina endógena, presente em incubações de tecido adiposo, transformando-a em inosina. A inosina é um composto que não apresenta efeito sobre a lipólise. Ao final das incubações os pedaços de tecido adiposo eram retirados, secos, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a  $80^{\circ}\text{C}$  negativos até serem utilizados para determinação da atividade da HSL.

As taxas de lipólise foram determinadas a partir da liberação de glicerol e ácidos graxos não esterificados (AGNE) durante a incubação. A concentração de glicerol no meio de cultura foi determinada pelo método descrito por SECHEN et al. (1990). As concentrações de AGNE foram determinadas utilizando-se de um kit comercial (NEFA-C; Wako Chemicals USA Inc., Dallas, TX).

#### Atividade da HSL

A atividade da HSL foi determinada adaptando-se o método de FREDRICKSON et al. (1981). O tecido adiposo obtido por biópsia foi transportado para o laboratório em solução de 0,15M NaCl e 25 mM HEPES e aproximadamente 1g de tecido foi adicionada a 3ml de um tampão contendo 30 mM tris, 0,25 M sacarose, 1mM glutationa e 1mM NaEDTA (pH 7,4 a  $4^{\circ}\text{C}$ ). Essa mistura foi homogeneizada em tubos de ensaio, por 20 segundos, com um politron e imediatamente ultracentrifugada a  $90.000\times g$ , por 50 minutos, a  $4^{\circ}\text{C}$ . O infranadante foi cuidadosamente pipetado e filtrado em lâ de vidro. Observou-se que este procedimento é necessário, pois evita que pequenas gotas de lipídeo endógeno fiquem no sobrenadante, alterando a atividade específica e introduzindo grandes erros nas mensurações. O filtrado do infranadante foi ajustado para pH 5,2 pela lenta adição de solução 0,2M de ácido acético. Após 10 minutos de agitação centrifugou-se a  $15.000\times g$ , por 15 minutos e o precipitado foi resuspenso em solução tampão de sacarose (SEVERSON et al., 1981).

Uma emulsão de trioleína foi preparada por sonicação de uma solução tampão de 0,1M de fosfato contendo ainda 8mM de trioleína, 2,5mg/ml de fosfatidilcolina, 1,5mg/ml de fosfatidiletanolamina, 4% de albumina sérica bovina (Sigma Chemical Comp., "Essentially fat-free-BSA") e  $8\mu\text{Ci/ml}$  de trioleína marcada com  $^3\text{H}$  (New England Nuclear, Boston, MA) em volume total de 4 ml. O pH desta emulsão foi ajustado

para 6,95. A incubação de  $90\mu\text{l}$  do infranadante das homogeneizações com um volume igual do tampão de fosfato com os substratos apresentava concentração final de 4mM de trioleína e pH 7,0. Ao final do período de incubação de 1h os ácidos graxos foram extraídos utilizando-se da técnica de separação líquido-líquido descrita por BELFRAGE e VAUGHAN (1969).

A atividade da HSL também foi determinada nos explantes de tecido adiposo usados para determinação das taxas de lipólise. Neste caso, os explantes congelados (três explantes, aproximadamente 100mg cada) foram homogeneizados em 1,8ml do tampão de sacarose utilizado anteriormente.

Ensaio iniciais estudaram o efeito do congelamento de explantes e sua armazenagem a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Amostras de explantes, após incubação em meio de KRB, foram retiradas de três animais. Uma amostra do tecido fresco e outra após imersão em nitrogênio líquido por 2 minutos foram imediatamente analisadas para atividade da HSL, como descrito. As amostras congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram retiradas após 14 e 28 dias de armazenamento e a atividade da HSL determinada.

#### Ativação da HSL

A lipase sensível a hormônio foi ativada como descrito por RIZACK (1964), com algumas modificações. O infranadante da centrifugação a  $90.000\times g$  foi filtrado em lâ de fibra de vidro e incubado por 10 minutos em pH 7,4 a  $37^{\circ}\text{C}$ . Cofatores para ativação foram adicionados para obter concentração final de 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 2mM  $\text{MgATP}$  e  $16\mu\text{M}$  de dibutilil cAMP (dbcAMP), sendo os reagentes dissolvidos no mesmo tampão utilizado para as homogeneizações. Em algumas incubações adicionou-se a proteína quinase dependente de cAMP (proteína quinase-A), proveniente de bovinos (Sigma Chemicals Co.), na concentração final de 1,6mg/ml. Após o final da incubação uma alíquota de  $90\mu\text{l}$  foi utilizada para determinar a atividade da HSL em triplicata.

Com o objetivo de estudar o efeito da ativação da HSL na sua atividade em concentrações de substrato que não saturavam a enzima, mediu-se a atividade da HSL em concentrações do substrato (trioleína) de 0,4 a 4 mM.

A concentração de proteína solúvel nos infranadantes das homogeneizações foi determinada pelo método de Bradford utilizando-se de um kit

