

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE PARAOXONASE-1 (PON1) LIGADA À FRAÇÃO DAS LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDADE (HDL)

LÍGIA ANTUNES PRIETSCH¹; DRIELE NESKE GARCIA¹; FELIPE TERRES²
DE CAMPOS²; SANDRA COSTA VALLE³; AUGUSTO SCHNEIDER³

¹Faculdade de Nutrição – ligiaprietsch@hotmail.com

Faculdade de Nutrição – drika_neske@yahoo.com.br

²Programa de Pós-Graduação em Veterinária – felipe.t.campos@hotmail.com

³Faculdade de Nutrição – sandracostavalle@gmail.com

Faculdade de Nutrição – augustoschneider@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O HDL contém várias proteínas constituintes com propriedades anti-oxidantes e anti-inflamatórias relevantes (ATGER, et al., 1990). Entre estas proteínas associadas, a enzima anti-oxidante, paraoxonase-1 (PON-1), tem efeito protetor contra o desenvolvimento de aterosclerose em seres humanos e em modelos animais (SCHMITZ, et al., 1982). A PON-1 forma parte da família de genes da enzima Paraoxonase, é sintetizada no fígado e transportada pelo sangue (FERRE, et al., 2002). Sua atividade foi encontrada diminuída em alguns estudos quando em condições associadas com níveis baixos de colesterol HDL, principalmente em casos de diabetes mellitus. Neste contexto, a HDL é necessária para a função da PON-1, enquanto que, por outro lado, a modificação oxidativa do HDL compromete a atividade enzimática da PON-1. (GARNER, et al., 1998).

Uma variedade de técnicas têm sido adaptadas para subfracionar o HDL, incluindo precipitação, eletroforese, cromatografia por afinidade, e ultracentrifugação. O último destes métodos, ultracentrifugação, é o mais usado rotineiramente para subfracionar o HDL, com inúmeros protocolos já publicados. No entanto, muitos destes métodos dependem de longos períodos de ultracentrifugação para maximizar a recuperação de HDL e dos seus componentes (HAVEEL, et al., 1955).

Baseado nisso o presente estudo teve com objetivo a adaptação da técnica de subfracionamento do HDL para dosar os níveis de PON1 no soro total e nas frações HDL e LDL.

2. METODOLOGIA

Foram utilizadas amostras de camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, sendo 12 fêmeas jovens com aproximadamente 4 meses de idade e 12 fêmeas velhas com 13-14 meses de idade alojados em estantes ventiladas, sob temperatura (22 ± 2 °C) e umidade (40 – 60%) controladas.

Primeiramente iniciou-se o protocolo de separação de HDL. As amostras foram diluídas em 100µl de reagente separador do HDL (Labtest, São Paulo, Brasil), sendo na sequência centrifugadas por 15 minutos a 3500rpm. O

sobrenadante, contendo a fração HDL, foi removido após a centrifugação para outro *ependorf*. O *pellet* restante, contendo a fração LDL e VLDL, foi diluído em 200µl de PBS.

As amostras (HDL, LDL/VLDL e soro total) foram diluídas 1 para 3 em tampão 20mM Tris/HCL. Logo após o adicionou-se 3,3µl de amostra para 500µl de solução de trabalho, composto por fenilacetato e tampão 20mM Tris/HCL. A absorbância foi medida a 270 nm durante 60 segundos em espectrofotômetro. A atividade da PON1 foi expressa em U/mL. Os valores obtidos na fração HDL e VLDL/LDL foram multiplicados por 2 devido a diluição inicial para separação do HDL.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade média de PON1 no soro total foi de $94,8 \pm 30,8$ U/mL, sendo que na fração HDL foi de $66,8 \pm 16,6$ U/mL. Estes resultados indicam que aproximadamente 70% da atividade da PON1 encontra-se ligado à fração HDL. A correlação entre a PON1 total e no HDL não foi significativa ($P=0.22$) com o valor de “r” de 0.26 (Figura 1).

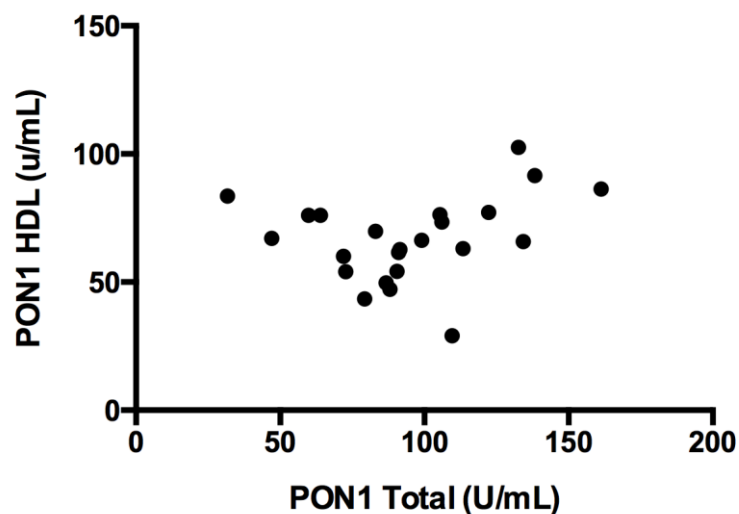


Figura 1 – Correlação entre a atividade total e na fração HDL de PON1.

O método proposto pelo presente trabalho mostrou resultados satisfatórios, a técnica utilizada parece ser eficiente para medir o nível de PON1 no HDL, porém o total das frações é desigual ao total do soro puro, nesse contexto mais testes e estudo precisam ser realizados para adequar o método proposto.

4. CONCLUSÕES

Neste estudo, o método utilizado parece ser valido para medir a atividade de PON1 no HDL, porém o total das frações é desigual ao total do soro puro,

nesse contexto mais testes e estudos precisam ser realizados para adequar o mecanismo de pesquisa proposto.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SCHNEIDER, A.; ABSALON-MEDINA, V.A.; ESPOSITO, G., et al. Paraoxonase (PON) 1, 2 and 3 expression in granulosa cells and pon1 activity in follicular fluid of dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, Nova Iorque, v. n/a, p. n/a, 2013.

FERRE, N.; CAMPS, J.; PRATS, E., et al. Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. **Clinical Chemistry**, Nova Iorque, v.48, p.261–268, 2002.

ATGER, V; WIRBLE, D; ROCHE, M; APFELBAUM, M; BURSTEIN, A; and Girard-Globa. Distribution of HDL2 and HDL3 in a random population of healthy French males and females—evaluation by a two-step precipitation procedure. **Clin. Chim. Acta**; v.189, p.111–122, 1990.

SCHMITZ, G; .ASSMANN, G. **Isolation of human serum HDL1 by zonal ultracentrifugation**. *J. Lipid Res*; v.23, p.903–910, 1982.

GARNER, B; WALDECK, A; WITTING, P; RYE, K and STOCKER, R. Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. **J. Biol. Chem**; v.273, p.6088–6095, 1998.

HAVEL, R. J; EDER, H. A and BRAGDON, J. H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. **J. Clin. Invest**; v.34, p.1345–1353, 1955.