

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA O ESTUDO DA LIPASE SENSÍVEL A HORMÔNIO EM VACAS EM LACTAÇÃO⁽¹⁾

DANTE PAZZANESE DUARTE LANNA⁽²⁾ e DALE ELTON BAUMAN⁽³⁾

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 (³H-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 MgCl₂, 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_m 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_m, 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 (³H-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 homogeneization, 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 MgCl₂, 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_m 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_m, 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°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°C). Essa mistura foi homogeneizada em tubos de ensaio, por 20 segundos, com um politron e imediatamente ultracentrifugada a 90.000xg, por 50 minutos, a 4°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 15.000xg, 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 ^3H (New England Nuclear, Boston, MA) em volume total de 4 ml. O pH desta emulsão foi ajustado

para 6,95. A incubação de 90 μl 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°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°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 90.000xg foi filtrado em lâ de fibra de vidro e incubado por 10 minutos em pH 7,4 a 37°C . Cofatores para ativação foram adicionados para obter concentração final de 5mM MgCl_2 , 2mM 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 μl 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

comercial (BioRad, Inc., Richmond, CA) e a albumina sérica bovina como padrão.

Análise estatística

As análises estatísticas para atividade e ativação da HSL utilizaram-se do módulo de t-teste para observações pareadas do MINITAB (1991). Foi feita regressão da atividade da HSL nos explantes em função da taxa de lipólise. Utilizando-se do mesmo pacote estatístico, quando os efeitos foram significativos, os componentes lineares e quadráticos foram separados e analisados.

RESULTADOS

Metodologia para mensuração e ativação da HSL

O ensaio para determinação da HSL foi validado para linearidade em função do tempo e quantidade de enzima. Validou-se também o congelamento dos explantes em nitrogênio líquido e armazenamento por até 4 semanas a -80°C sem ser observada alteração na atividade da enzima (Quadro 1; $P > 0,10$).

Quadro 1. Alterações na atividade da lipase sensível a hormônio (HSL) após armazenamento

Amostra (1)	Atividade da HSL (2) $\text{nmol.h}^{-1}.\text{mg}^{-1}$
Tecido não congelado	32,21 ^a
Após congelamento	31,80 ^a
Após 14 dias	30,92 ^a
Após 28 dias	31,30 ^a

(1) Médias para tecido obtido por biópsia de 3 animais, congelamento a -80°C

(2) Atividade em nmoles de ácidos graxos liberados por mg de proteína do citoplasma

Não houve diferença entre os tratamentos ($P > 0,10$)

Rotineiramente, adiciona-se ácido ascórbico aos meios de cultura de Krebs-Ringer com objetivo de evitar a degradação de β -adrenérgicos. Experimentos preliminares demonstraram que a inclusão do ácido ascórbico no meio de cultura inibiu a atividade da HSL determinada em homogenatos obtidos dos explantes. Portanto, nos experimentos subsequentes, o ácido ascórbico foi omitido do meio de Krebs-Ringer utilizados para determinação das taxas de lipólise.

A ativação da HSL nos homogenatos só foi observada quando os explantes de tecido adiposo eram

previamente incubados, por 90 minutos, em meio de cultura contendo albumina (sem adição de adenosina deaminase) antes da homogeneização. Isto sugere que durante a biópsia a HSL é ativada, provavelmente, pelo estresse do animal e/ou manipulação do tecido. A ativação da enzima, obtida após pré-incubação, foi aproximadamente 1,5 vezes maior que a atividade basal, sendo estes resultados similares a dados publicados para animais de laboratório (RIZACK, 1964; WISE e JUNGAS, 1978; FREDRICKSON et al., 1981) e ovinos (VERNON et al., 1993). VERNON et al. (1993) desativaram a enzima através de pré-incubação, utilizando-se da fenilisopropiladenosina (PIA), um potente agente antilipolítico, adicionado ao meio de cultura. O meio de cultura utilizado nas pré-incubações deste trabalho não continha PIA.

Certas condições especiais parecem ser necessárias para maximizar a ativação da HSL em homogenatos de bovinos. Foram necessárias concentrações de ATP maiores que 1mM para maximizar a ativação da HSL incubada com Mg^{+2} e dbcAMP (Figura 1; $P < 0,05$). A literatura demonstra que concentrações de ATP entre 0,2 e 3mM têm sido utilizadas com sucesso em diferentes espécies, sendo que a ativação de homogenatos menos purificados requer utilização de concentrações mais altas (RIZACK, 1964; CORBIN et al., 1970; BELFRAGE et al., 1981; GARTON et al., 1989).

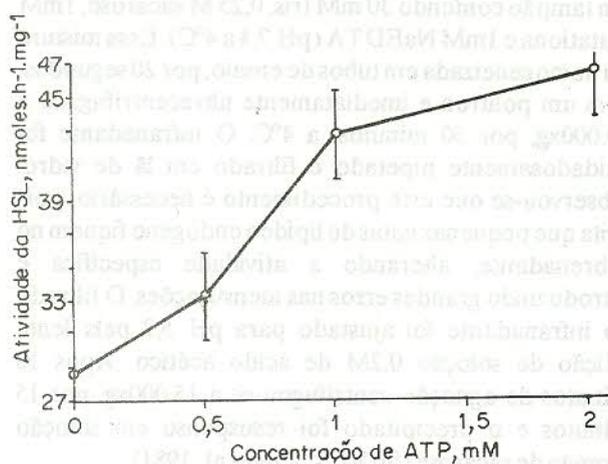


Figura 1. Efeito da concentração de ATP na ativação da lipase sensível a hormônio do tecido adiposo de vacas em lactação. A atividade basal e ativação da HSL foram de $33 \pm 2,6$ e $46,3 \pm 6,3$ nmol ácido graxo. $\text{h}^{-1}.\text{mg}$ proteína⁻¹ (média e erro padrão) para experimentos com tecido adiposo de 4 vacas

Os estudos com dbcAMP demonstraram que, em concentrações de $2\mu\text{M}$, a ativação da HSL tinha sido

maximizada (Figura 2; $P > 0,05$). Esta ativação foi numericamente aumentada até concentrações de $16 \mu\text{M}$ e, portanto, nos ensaios subsequentes esta concentração de dbcAMP foi utilizada.

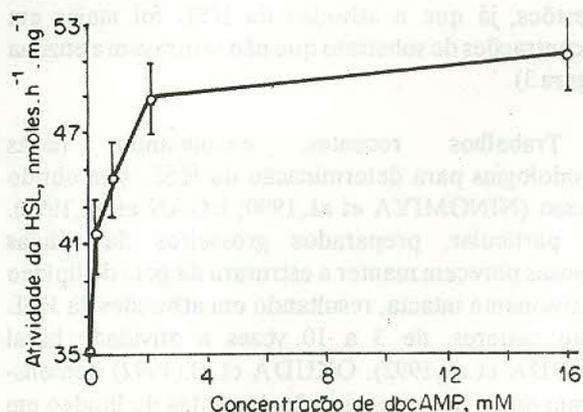


Figura 2. Efeito da concentração do dibutilil AMP cíclico (dbcAMP) na ativação *in vitro* da lipase sensível a hormônio (HSL). A atividade basal e ativação da HSL foram de $35 \pm 4,6$ e $51,4 \pm 6$ nmol ácido graxo.h⁻¹.mg proteína⁻¹ (média e erro-padrão) para experimentos com tecido adiposo de 4 vacas

Efeito da ativação na cinética enzimática

A extensão da ativação da HSL do tecido adiposo de vacas em lactação incubado com cAMP, ATP e Mg^{+2} variou de 1,3 a 1,6 vezes a atividade basal, o que é bastante inferior ao aumento de 4 a 6 vezes observado nas taxas de lipólise em explantes de tecido adiposo (ou células isoladas por colagenase de ruminantes), incubadas com hormônios que estimulam a produção de cAMP (VERNON, 1980).

Os efeitos da concentração de substrato na atividade da HSL para a enzima ativada e não ativada por dbcAMP foram estudados (Figura 3). Em baixas concentrações de substrato (0,4 mM de trioleína), a ativação da enzima (em relação à atividade basal) foi maior do que em concentrações do substrato que saturavam a enzima ($P < 0,05$). Entretanto, na faixa de 2 a 4 mM de trioleína a relação entre a atividade da HSL ativada e não ativada foi constante e ao redor de 1,5 (Figura 3; $P > 0,10$).

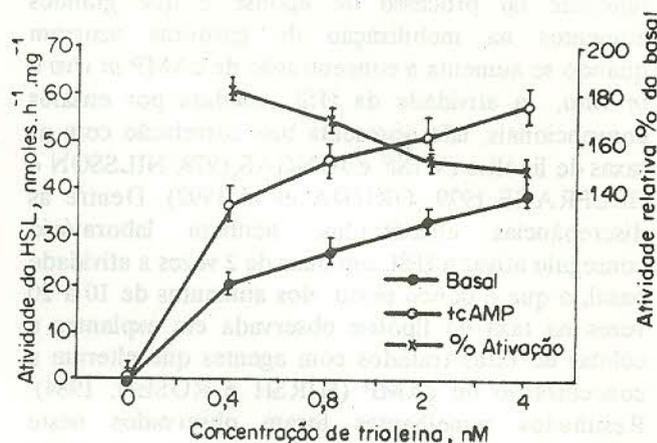


Figura 3. Efeito da concentração de substrato na atividade da lipase sensível a hormônio (HSL) e na proporção da ativação da enzima em tecido adiposo de vacas em lactação. A porcentagem de ativação foi calculada pela relação entre a atividade da HSL em homogenatos incubados exclusivamente com tampão e HSL incubada na presença de dbcAMP, proteína quinase-A e ATP. A atividade máxima foi de $51 \pm 2,4$ e $58 \pm 3,7$ nmol.h⁻¹.mg proteína⁻¹ (média e erro-padrão) para experimentos com tecido adiposo de 3 vacas

Correlação entre Lipólise *in vitro* e atividade da HSL

Quando a taxa de lipólise em explantes de tecido adiposo incubados com isoproterenol e adenosina deaminase foram regredidos em função da atividade da HSL em homogenatos derivados destes mesmo explantes, o coeficiente de correlação encontrado foi bastante baixo ($r^2 = 0,35$). Quando as regressões foram feitas utilizando-se a atividade da HSL estimulada por incubação com dbcAMP os resultados foram modestamente melhorados ($r^2 = 0,41$). Em trabalhos não publicados citados por McNAMARA (1991), também observou-se baixa correlação entre a taxa de lipólise e a atividade da HSL. Isto sugere que a atividade da HSL, medida em emulsões de lipídeos exógenos, pode não ser um bom parâmetro para avaliar a taxa lipolítica. Outra hipótese que pode ser levantada a partir destes resultados é de que a quantidade de HSL pode não ser um componente importante na regulação das taxas de lipólise no tecido adiposo.

DISCUSSÃO

Ativação da HSL

Estudos sobre a ativação da HSL têm tido pouco sucesso em explicar as mudanças observadas *in vivo* na mobilização de gorduras. Ainda que a HSL seja a enzima

limitante no processo de lipólise e que grandes aumentos na mobilização de gorduras ocorram quando se aumenta a concentração de cAMP *in vivo* e *in vitro*, a atividade da HSL, medida por ensaios convencionais, não apresenta boa correlação com as taxas de lipólise (WISE e JUNGAS, 1978; NILSSON e BELFRAGE, 1979; OKUDA et al., 1992). Dentre as discrepâncias encontradas, nenhum laboratório conseguiu ativar a HSL em mais de 2 vezes a atividade basal, o que é pouco perto dos aumentos de 10 a 20 vezes na taxa de lipólise observada em explantes e células de ratos tratados com agentes que alteram a concentração de cAMP (HIRSH e ROSEN, 1984). Resultados semelhantes foram observados neste trabalho e em trabalhos anteriores com ruminantes citados por McNAMARA (1991).

Outra limitação dos ensaios tradicionais utilizados para medir a atividade da HSL é a impossibilidade de se detectarem mudanças nas propriedades cinéticas da HSL. Isto é importante pois estudos detalhados, usando a enzima purificada do tecido adiposo de ratos, indicaram que a ativação da enzima pela proteína quinase-A ocorre principalmente através de um decréscimo no valor do k_m para o substrato (BELFRAGE, 1984). Em contraste, SEVERSON et al. (1981) observaram que a ativação da enzima por cAMP resultava em aumento da $V_{máx}$ da reação, sem nenhuma alteração no k_m . Uma provável explicação para estas discrepâncias estaria nas características dos substratos exógenos utilizados nos diferentes trabalhos (KHOO e STEINBERG, 1975; FREDRICKSON et al., 1981). Substratos exógenos, geralmente compostos por emulsões de trioleína, como utilizado neste experimento, são bastante diferentes da enorme gota de lipídeo presente dentro da célula do tecido adiposo. Emulsões de lipídeo preparadas por sonicação são compostas de um grande número de pequenas vesículas ao invés de uma grande gota de lipídeo e estas vesículas são cobertas por fosfolipídeos e albumina bovina (adicionada para complexar os ácidos graxos liberados durante a incubação, impedindo que estes inibam a atividade da HSL). O maior problema do uso destes substratos é que alterações no k_m da enzima são difíceis de serem determinadas dada a natureza completamente diferente da interação da HSL com o substrato. Agentes emulsificantes também alteram a natureza da interação da HSL com o substrato. NINOMIYA et al. (1990) propuseram que a fosfatidilcolina pode funcionar como um inibidor da HSL, enquanto a fosfatidiletanolamina parece aumentar a atividade da HSL. Diferentes concentrações da fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e outros substitutos tem sido utilizados por diferentes laboratórios na preparação dos substratos (FREDRICKSON et al., 1981). Ensaios preliminares, conduzidos com enzima bovina, demonstraram que a

proporção de agentes emulsificantes influencia a atividade da enzima.

A maior parte das evidências indicam que a ativação da HSL altera a habilidade da enzima de interagir com o substrato (EGAN et al., 1992). Mesmo considerando as limitações da metodologia, os resultados deste trabalho parecem confirmar estas sugestões, já que a ativação da HSL foi maior em concentrações de substrato que não saturavam a enzima (Figura 3).

Trabalhos recentes, examinando novas metodologias para determinação da HSL, têm obtido sucesso (NINOMIYA et al., 1990; EGAN et al., 1992). Em particular, preparados grosseiros de células adiposas parecem manter a estrutura da gota de lipídeo relativamente intacta, resultando em ativações da HSL muito maiores, de 3 a 10 vezes a atividade basal (OKUDA et al., 1992). OKUDA et al. (1992) demonstraram que a homogeneização das gotas de lipídeo em um sistema "cell-free" aumentava a taxa de lipólise para taxas semelhantes às obtidas com máxima estimulação com forskolina (aumento na concentração de cAMP). O fato da homogeneização, per se, resultar em altas taxas de lipólise, sem um concomitante aumento da concentração de cAMP, indica que a homogeneização aumenta a lipólise através de efeitos independentes da HSL, provavelmente facilitando a interação da enzima com o substrato endógeno (OKUDA et al., 1992). Esses resultados e outros trabalhos recentes (NINOMIYA et al., 1990; EGAN et al., 1992) confirmam sugestões anteriores (OKUDA et al., 1966; WISE e JUNGAS, 1978) de que as catecolaminas ativam a lipólise também através de um mecanismo de "ativação do substrato" presente na gota de lipídeo.

VERNON et al. (1993) usaram lipídeos endógenos para medir a atividade da HSL em tecido adiposo de ratas em lactação, rompendo a gota de lipídeo ao homogeneizar os adipócitos, e obtendo ativação da HSL de apenas 1,4 vezes a atividade basal, resultado similar ao obtido com emulsões de lipídeos no presente trabalho. Portanto, a integridade estrutural da gota de lipídeo é importante para manter a funcionalidade do sistema presente na célula intacta. A metodologia proposta por NINOMIYA et al. (1990) parece atender a estas condições e, provavelmente, será a técnica utilizada em futuros trabalhos com a HSL.

Estudos da morfologia da gota de lipídeo tem demonstrado que a parte externa é composta de uma estrutura filamentosa, de característica proteinácea (EGAN et al., 1992). Esta estrutura contém uma proteína, chamada de perilipina, que é fosforilada em múltiplos lugares pela proteína quinase-A e

provavelmente regula o acesso da HSL à interface da gota de lipídeo (GREENBERG et al., 1991). Até recentemente consideraram-se apenas os mecanismos envolvendo receptores, proteínas coligadas ao trifosfato de guanosina (GTP), adenilato ciclase, e as fosfodiesterases e fosfatases, todos agindo acima ("upstream") da HSL. Se a fosforilação da perilipina pela proteína quinase-A é importante para a regulação da atividade da HSL então a modulação da lipólise poderá ocorrer acima ou abaixo da HSL, o que torna o sistema mais complexo do que anteriormente imaginado.

Quantidade de HSL e o controle da lipólise

Se a redistribuição da HSL em subcompartimentos celulares é importante na regulação da atividade da HSL, então a quantidade da HSL seria importante na regulação das taxas de lipólise. Entretanto, apenas pequenas variações parecem ocorrer (< 30%) na atividade total da HSL durante a lactação (SMITH e McNAMARA, 1990) ainda que as taxas de lipólise variem muito. VERNON et al. (1993) não observaram alterações na atividade total da HSL em homogenatos de tecido adiposo de ratas em lactação, comparadas a não-lactantes, ainda que as taxas de lipólise fossem muito mais elevadas. Da mesma forma que pequenas variações tem sido observadas na atividade da HSL, a taxa máxima de lipólise não é alterada por uma variedade de tratamentos fisiológicos. VERNON e FINLEY (1986) não observaram diferenças nas taxas máximas de lipólise (determinadas em incubações com -adrenérgicos e adenosina deaminase) em tecido adiposo de ratas virgens, grávidas e lactantes. HOFFMAN et al. (1984) não observaram diferenças nas taxas máximas de lipólise em ratos entre 6 e 12 semanas de idade. Trabalhos subsequentes demonstraram que não houve alteração na expressão do RNA mensageiro da HSL em ratos entre 3 semanas e 2 anos de idade, período este que compreende o período em que obesidade e resistência à insulina são observados (KRAEMER et al., 1991). Também a subnutrição de ratos ou seres humanos parece não alterar a taxa máxima de lipólise determinada *in vitro* (ARNER et al., 1981). LANNA et al. (1992 e 1994) não observaram efeito do tratamento com somatotropina na taxa máxima de lipólise em tecido adiposo de vacas em lactação. Estes resultados sugerem que alterações na quantidade de enzima nas células não parecem ser importantes para regulação da mobilização de gorduras.

CONCLUSÕES

Demonstrou-se que a HSL do tecido adiposo de bovinos pode ser ativada em incubações de explantes

com isoproterenol e adenosina deaminase. Demonstrou-se também que a HSL de homogenatos de tecido adiposo pode ser ativada através de incubações com cAMP, ATP e Mg^{+2} . Em ambos os casos a ativação aumentou a atividade em aproximadamente 1,4 vezes, muito menos que o aumento observado nas taxas de lipólise em culturas de explantes, que foram de 5 vezes a taxa basal. Estes resultados sugerem que a determinação da atividade da HSL, utilizando-se de substratos exógenos emulsificados, talvez não seja apropriada para o estudo dos mecanismos de controle da lipólise. É também provável que outros mecanismos de controle, incluindo a interação da HSL com a gota de lipídeo sejam importantes no controle da mobilização de gorduras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNER, P. et al. In vivo observations on the lipolytic effect of noradrenaline during therapeutic fasting. *J. Clin. End. Met.*, Baltimore, v. 53, n. 6, p. 1207-1212, 1981
- BAUMAN, D.E., VERNON, R.G. Effects of exogenous bovine somatotropin on lactation. *Annu. Rev. Nutr.*, v.13, p. 437, 1993.
- BAUMAN, D. E., ELLIOT, J. M. Control of nutrient partitioning in lactating ruminants. In MEPHAM, T.B., ed. *Biochemistry of Lactation*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV, 1983. p. 437-468.
- BELFRAGE, P. Hormonal control of lipid degradation. In: CRYER, A., R.VAN, R.L., eds. *New Perspectives in Adipose Tissue: Structure, Function and Development*. London: Butterworths. 1984. p. 121-144.
- BELFRAGE, P., VAUGHAN, M. Simple liquid-liquid partition system for isolation of labeled oleic acid from mixtures with glycerides. *J. Lip. Res.*, Bethesda, v. 10, p. 341-343, 1969.
- BELFRAGE, P et al. Regulation of adipose tissue lipolysis by phosphorylation of hormone-sensitive lipase. *Int. J. Obes.*, v. 5, p. 635-641, 1981.
- BUTCHER R.W., BAIRD, C.E. Effects of prostaglandins on adenosine 3',5'-monophosphate levels in fat and other tissues. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v. 243, p. 1713, 1968..
- CORBIN, D. et al. Activation of adipose tissue lipase by skeletal muscle cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-stimulated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v. 245, p. 4849-4851, 1970.
- EGAN, J.J. et al. Mechanism of hormone-stimulated lipolysis in adipocytes: translocation of hormone-sensitive lipase to the lipid storage droplet. *Proc. Nat. Acad. Sci., New Delhi*, v. 89, p. 8537-8541, 1992.
- FREDRIKSON, G. et al. Hormone-sensitive lipase from adipose tissue of rat. *Methods in Enzymol.*, London, v. 71, p. 636-646, 1981.
- GARTON, A. J. et al. Phosphorylation of bovine hormonesensitive lipase by the AMPactivated protein kinase; A possible antilipolytic mechanism. *FEBS Lett.*, Berlin, p. 249-254, 1989. .

- GREENBERG, A.S. et al. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v. 266, n. 17, p. 11341-11346, 1991.
- HIRSH, A.H., ROSEN, O.N. Lipolytic stimulation modulates the subcellular distribution of hormone sensitive lipase in 3T3-L1 cells. *J. Lip. Res.*, Bethesda, v. 25, p. 665, 1984.
- HOFFMAN, B.B. et al. Age-related decrement in hormone-stimulated lipolysis. *Amer. J. Physiol.*, Bethesda, v. 247, p. E772-E777, 1984.
- INGLE, D. L. et al. Lipogenesis in the ruminant: in vitro study of tissue sites, carbon source and reducing equivalent generation for fatty acid synthesis. *J. Nutr.*, Bethesda, v. 102, p. 609-616, 1972.
- KHOO, C.K., STEINBERG, D. Hormone-sensitive lipase from rat adipose tissue. *Methods in Enzymol.*, New York, v. 35, p. 181-189, 1975.
- KRAEMER, F.B. et al. Developmental regulation of hormone-sensitive lipase mRNA in the rat: changes in steroidogenic tissues. *J. Lipid Res.*, Bethesda, v. 32, p. 1303-1309, 1991.
- LANNA, D. P. D. et al. Effects of Bovine Somatotropin (bST) on Lipolysis, Lipogenesis and Activities of Some Enzymes in Adipose Tissue from Lactating Cows. *J. Anim. Sci.*, Champagn, v. 70, suppl.1, p. 193, 1992.
- LANNA, D.P.D. et al. Effect of somatotropin on lipolysis and response to homeostatic signals in chronic cultures of lactating cow adipose tissue. *J. Dairy Sci.*, Minneapolis, v.77, suppl.1, p.209, 1994.
- McNAMARA, J. P. Regulation of adipose tissue metabolism in support of lactation. *J. Anim. Sci.*, Champagn, v. 74, p. 706-719, 1991.
- McNAMARA, J. P., HILLERS, J.K. Adaptations in lipid metabolism of bovine adipose tissue in lactogenesis and lactation. *J. Lipid Res.*, Bethesda, v. 27, p. 150-157, 1986.
- MINITAB STATISTICAL SOFTWARE. Minitab Reference Manual: PC version., Release 8. Rosemont: Minitab Inc., 1991. p. irreg.
- NILSSON, N.O, BELFRAGE, P. Continuous monitoring of free fatty acid release from adipocytes by pH-stat titration. *J. Lipid. Res.*, Bethesda, v. 20, p. 557-560, 1979.
- NINOMYA, H. et al. Biomodulator-mediated susceptibility of endogenous lipid droplets from rat adipocytes to hormone-sensitive lipase. *Biochem. Med. Metab. Biol.*, v. 43, p. 112-127, 1990.
- OKUDA, H. et al. Relationship between cyclic AMP production in lipolysis induced by forskolin in rat fat cells. *J. Lip. Res.*, Bethesda, v. 33, p. 225-231, 1992.
- OKUDA, H. et al. The mechanism of in vitro stimulation of lipolysis by adrenaline. *J. Biochem.*, Oxford, v. 59, p. 438-442, 1966.
- RIZACK, M.A. Activation of an Epinephrine-sensitive lipolytic activity from adipose tissue by adenosine 3',5'-phosphate. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v. 239, n. 2, p. 392-395, 1964.
- SECHEN, S. J. et al. Effect of somatotropin on kinetics of nonesterified fatty acids and partition of energy, carbon, and nitrogen in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, Champagn, v. 72, 5967, 1989.
- SECHEN, S. J. et al. Somatotropin in lactating cows: effect on response to epinephrine and insulin. *Am. J. Physiol.*, Bethesda, v. 258, p. E582-E588, 1990.
- SEVERSON, D.L. et al. Hydrolysis of triolein, cholesterol oleate, and 4-methylumbelliferyl stearate by acid and neutral ester hydrolases (lipases) from pigeon adipose tissue: effect of cAMP-dependent protein kinase. *Can J. Biochem.*, Ottawa, v. 59, p. 418-429, 1981.
- SMITH, T. R., McNAMARA, J.P. Regulation of bovine adipose tissue metabolism during lactation. 6. Cellularity and hormonesensitive lipase activity as affected by genetic merit and energy intake. *J. Dairy Sci.*, Champagn, v. 73, p. 772-783, 1990.
- STRALFORS P., BELFRAGE, P. Reversible phosphorylation of hormone-sensitive lipase/cholesterol ester hydrolase in the hormonal control of adipose tissue lipolysis and of adrenal steroidogenesis. London, Elsevier Science Publishers, 1985. p.27-62.
- VAUGHAN, M. et al. Hormone-sensitive lipase and monoglyceride lipase actives in adipose tissue. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v. 239, n. 2, p. 401-409, 1964.
- VERNON, R. G., FINLEY, E. Endocrine control of lipogenesis in adipose tissue from lactating sheep. *Biochem. Soc. Trans.*, Colchester, v. 14, p. 635-636, 1986.
- VERNON, R.G. et al. Mechanisms involved in the adaptations of the adipocyte adrenergic signal-transduction system and their modulation by growth hormone during the lactation cycle in the rat. *Biochem. J.*, Colchester, v. 299, p. 243-254, 1993.
- VERNON, R. G. Lipid metabolism in the adipose tissue of ruminant animals. *Prog. Lipid Res.*, v. 19, p. 23-106, 1980.
- WISE, L.S., JUNGAS, R.L. Evidence for a dual mechanism of lipolysis activation by epinephrine in rat adipose tissue. *J. Biol. Chem.*, Bethesda, v. 253, n. 8, p. 2624-2627, 1978.