



Desenvolvimento de uma Emulsão Sintética Rica em 7-Cetocolesterol Semelhante a Quilomicrons

Giovani M. FAVERO^{1,2}, Raul C. MARANHÃO³ & Sérgio P. BYDLOWSKI^{*1}

¹ Laboratório de Genética e Hematologia Molecular (LIM-31), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 1º andar, sala 43. CEP 05403-000, São Paulo SP, Brasil

² Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Ponta Grossa; Campus de Uvaranas, 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brazil

³ Laboratório de Metabolismo de Lípidos, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da USP, Av. Dr. Eneas C. Aguiar, 44, 1º Subsolo, Bloco II, Sala 21, 05403-000 São Paulo, SP, Brasil

RESUMO. Emulsões lipídicas que mimetizam lipoproteínas naturais demonstram ser importantes para o entendimento do metabolismo e da organização constitucional dos componentes lipídicos circulantes. Quilomicrons produzidos pelos enterócitos geralmente contém oxisteróis, como o 7-cetocolesterol. No presente trabalho desenvolvemos uma emulsão rica em 7-cetocolesterol e triglicerídeos como um modelo de quilomicrons ricos em oxisterol. Utilizamos quantidades diferentes de 7-cetocolesterol e avaliamos o diâmetro efetivo das emulsões formadas, alterações baseadas em radiomarcagem das emulsões. A produção de uma emulsão sintética semelhante a quilomicrons rica em 7-cetocolesterol mostrou ser possível e de fácil reprodução, sendo um modelo para estudos futuros do metabolismo deste oxisterol *in vivo*.

SUMMARY. "Development of a Synthetic 7-ketocholesterol- Rich Emulsion Resembling Chylomicrons". Lipid emulsions that mimic natural lipoproteins help to understand the metabolism and the constitutional organization of circulating lipids. Chylomicrons synthesised by enterocyte cells usually contain oxysterols such as 7-ketocholesterol (7-KC). Here we describe the development of a 7-KC-containing emulsion as a model for oxisterol-rich chylomicron. Different amounts of 7-KC were used. Emulsion characteristics as effective diameter, lipid saturation with radiolabeled lipids was evaluated. In conclusion, the production of a synthetic 7-KC-rich emulsion resembling hylomicrons was feasible, being a model for *in vivo* metabolism studies.

INTRODUÇÃO

7-cetocolesterol (7-KC) é o principal colesterol oxidado (oxisterol) presente nos alimentos e no organismo humano¹⁻³. Os oxisteróis representam uma classe de moléculas regulatórias potentes com ações biológicas importantes, como na interferência no metabolismo de esteróis, na inibição da proliferação e diferenciação celulares, na citotoxicidade, na aterogenicidade, na mutagenicidade e na carcinogenicidade⁴. São reguladores da expressão gênica, substratos para a síntese de ácidos biliares e mediadores do transporte de esteróis. Como moléculas regulatórias, inibem a produção de fatores de transcrição requeridos para a expressão de vários genes das vias de suprimento de colesterol⁵ e são ligantes que ativam receptores nucleares⁶. Também podem ser substratos para a síntese de hormônios esteroidais⁷. Os oxisteróis, de uma

maneira geral, são inativados pela conversão em ácidos biliares e, em algumas instâncias, a necessidade de ácidos biliares pode somente ser suprida através do metabolismo de oxisteróis⁸.

O 7-cetocolesterol é o principal oxisterol presente em alimentos processados ricos em colesterol^{9,10}, além de poder ser produzido endogenamente por autooxidação do colesterol. Os oxisteróis de origem dietética são absorvidos e incorporados em quilomicrons. O 7-cetocolesterol, após ingestão, é absorvido pelas células entéricas e incorporado a quilomicrons^{10,11}, sendo que cerca de 12% do conteúdo de 7-KC chega à circulação¹⁰.

Os quilomicrons podem ser considerados como a fase interna de uma emulsão, considerando que emulsões são misturas altamente interdispersas de dois líquidos, aquosos ou oleosos, que não formam soluções. A fronteira entre os

PALAVRAS CHAVE: 7-cetocolesterol, Emulsão, Quilomicrons.

KEY WORDS: Chylomicron, Emulsion, 7-ketocholesterol.

* Autor a quem correspondência deve ser enviada: E-mail: spbydlow@usp.br

domínios aquoso e oleoso é estabilizada por surfactante. Assim, há uma fase dispersa chamada de fase interna, e uma fase contínua, chamada de fase externa. Os quilomicrons apresentam um núcleo rico em triglicerídeos (85-90% da massa) e colesterol esterificado (3-4%) envolvidos por uma monocamada de colesterol não esterificado (3-4%) e fosfolípidos (7-10%) que atuam como agente surfactante, sendo a fase externa o sangue em contato com a partícula.

Há poucos estudos sobre incorporação de oxisteróis em partículas lipídicas; Lyons & Brown¹² utilizaram 7-KC em LDL acetilada ou quilomicrons naturais. Por outro lado, a utilização de quilomicrons naturais para estudos metabólicos é dificultada pelas características de sua obtenção e manipulação. Modelos de emulsões lipídicas sintéticas com características fisiológicas e metabólicas de quilomicrons facilitam estes estudos¹³.

No presente trabalho demonstramos a possibilidade da produção de quilomicrons sintéticos ricos em 7-cetocolesterol como possível modelo de estudo das atividades metabólicas do principal oxisterol encontrado no corpo humano.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparo das emulsões ricas em 7-cetocolesterol, semelhantes a quilomicrons

As emulsões semelhantes a quilomicrons foram preparadas a partir de uma mistura contendo 23 mg de fosfatidilcolina (Lipid Products-Surrey, UK), 6,0 mg de colesteril oleato (Lipid Products-Surrey, UK), 69 mg de trioleína (Nu-Check-Elysian, MN), 2,0 mg de colesterol livre não esterificado (Nu-Check-Elysian, MN), previamente secos sob fluxo de nitrogênio. 2405 KBq de [¹⁴C] colesteriloleil éter ou colesterol livre (Amersham, England) foi adicionado, correspondendo a 9.000.000 cpm¹³. As emulsões ricas em 7-cetocolesterol (Sigma - St. Louis, USA) foram preparadas pela adição de diferentes quantidades de 7-cetocolesterol (2,0 mg; 2,5 mg; 5,0 mg; 7,5 mg), além de 7-KC [³H], aos demais lipídios constituintes. Os lipídios foram ressuspensos em 6,0 mL de solução salina (NaCl, densidade 1,101 g/mL), e sonicados, utilizando-se um disruptor celular Branson Ultrasonics Corp., modelo B 450 (Danbury, EUA) equipado com ponta de titânio de 1 cm de diâmetro e potência de 125 Watts, por 30 min, sob atmosfera de N₂, com temperatura abaixo de 52 °C. Após a emulsificação, 3 mL da emulsão foi ultracentrifugada em gradiente de soluções de NaCl em diferentes densidades (1,065 g/mL; 1,02 g/mL; 1,006 g/mL). A ultracentrifugação foi realizada a

12.000 rpm por 15 min, a 20 °C em rotor SW41. Após a ultracentrifugação aspirou-se 0,5 mL do sobrenadante e acrescentou-se igual volume de NaCl (d = 1,006g/mL). Após nova ultracentrifugação a 36.000 rpm por 25 min a 20 °C, o sobrenadante, fração que continha a emulsão semelhante a quilomicrons, era isolado

Análise do tamanho das diferentes emulsões contendo 7-KC

O tamanho das diferentes emulsões foi estimado por laser light scattering (Zeta Pals, EUA). O laser de estado sólido de 15 mW, com coeficiente de difusão de 10⁻⁶ a 10⁻⁹ cm²/seg, e ângulo fixo de 90° é capaz de medir a variação de tamanho de 2 nm até 3 µm. Diluiu-se as emulsões com solução salina 0,9%, seguido de filtração em filtro de poro 0,22 µm de diâmetro (Millipore, Bedford, MA), com posterior análise por light scattering¹⁴. Os resultados são apresentados como média com os respectivos desvios padrões.

Contagem radioativa das emulsões ricas em 7-KC semelhantes a quilomicrons

A radioatividade derivada de [¹⁴C] colesteriloleil éter e [³H]-7-cetocolesterol incorporados em cada emulsão rica em 7-KC semelhante a quilomicrons, de cada alíquota, foi contada em contador de cintilação líquida (LKB). Os resultados estão expressos em porcentagem de radioatividade relativa ao total de radioatividade adicionada inicialmente na primeira etapa de síntese de cada emulsão.

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra o diâmetro efetivo final de cada emulsão quilomicron-símile com diferentes conteúdos de 7-KC. O diâmetro da partícula, sem acréscimo de 7-KC, possui um diâmetro menor do que quilomicrons naturais, como descrito anteriormente¹³. A saturação com concentrações altas do oxisterol não altera de maneira significativa o tamanho das emulsões.

Quantidade de 7-KC	Diâmetro Efetivo
0,0	117,7 ± 35,2 nm
2,0 mg	104,6 ± 35,4 nm
2,5 mg	106,5 ± 31,4 nm
5,0 mg	113,9 ± 29,2 nm
7,5 mg	129,8 ± 9,2 nm
Quilomicron natural	180 - 500 nm

Tabela 1. Diâmetro efetivo de cada emulsão rica em 7-cetocolesterol semelhante a quilomicrons. Os valores representam as médias e os desvios padrões (n=3).

Massa de 7-KC	[¹⁴ C] colesteriloleil éter	[³ H]-7-cetocolesterol
2,0 mg	47,6 ± 12,9%	58,8 ± 3,6 %
2,5 mg	46,7 ± 13,1 %	53,9 ± 5,3 %
5,0 mg	50,1 ± 9,6 %	53,1 ± 6,9 %
7,5 mg	51,3 ± 7,2 %	47,7 ± 7,2 %

Tabela 2. Porcentagem de incorporação de [¹⁴C] colesteriloleil éter e [³H]-7-cetocolesterol às emulsões artificiais. Os resultados são apresentados em porcentagem relativa à contagem radioativa inicial (n=3).

Para avaliar o grau de incorporação de 7-KC às emulsões utilizou-se [¹⁴C]-colesteriloleil éter e [³H]-7-cetocolesterol. A Tabela 2 mostra a porcentagem de radioatividade final contida em cada quilomícron sintético. Nota-se que, aumentando a massa de 7-KC a ser utilizada na preparação das emulsões, que acarreta uma maior massa final, há uma diminuição da marcação correspondente ao 7-KC, caracterizando um rendimento menor.

DISCUSSÃO

Os oxisteróis, mais especificamente o 7-cetocolesterol, apresentam importância na homeostasia lipídica e em doenças relacionadas ao metabolismo lipídico. É importante o desenvolvimento de estratégias que propiciem a avaliação do metabolismo destes oxisteróis com base em estruturas lipídicas sintéticas semelhantes às naturais, haja vista as dificuldades de obtenção e manipulação destas últimas.

Neste trabalho desenvolvemos uma emulsão rica em 7-cetocolesterol semelhante a quilomícrons como modelo para estudos deste oxisterol. A emulsificação foi eficiente, como demonstrado pelos estudos do diâmetro efetivo de cada emulsão e da saturação lipídica, através da de lipídios radiomarcados.

Os diâmetros das partículas não mostraram diferença estatística significativa quando comparadas entre si e com a ausência de 7-KC, apesar de exibirem um tamanho menor que o dos quilomícrons naturais. Neste aspecto, é de esperar que estas partículas exibam um comportamento fisiológico semelhante ao da partícula sem 7-KC¹³. Por outro lado, quantidades crescentes de 7-cetocolesterol na preparação levam a um menor rendimento na incorporação. Apesar disto, poderiam ser utilizadas na dependência do experimento a ser realizado.

Em conclusão, foi possível produzir uma emulsão lipídica rica em 7-cetocolesterol, baseada quilomícrons artificiais, que é de fácil reprodutibilidade. Esta partícula é potencialmente útil como modelo para o estudo do metabolismo deste oxisterol e seus efeitos quando incorporado a quilomícrons.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Pie, J.E., K. Spahis & C. Seillan (1991) *J. Agric. Food Chem.* **39**: 250-4.
- Osada, K., T. Kodama, L. Cui, K. Yamada & M. Sugano (1993) *J. Agric. Food Chem.* **41**: 1893-8.
- Guardiola, F., R. Codony, M. Rafecas & J. Boattella (1995) *Grasas Aceites* **46**: 202-12.
- Baranowski, A., C.W. Adams, O.B. High & D.B. Bowyer (1982) *Atherosclerosis* **41**: 255-66.
- Higley, N.A. & S.L. Taylor (1984) *Food Chem. Toxicol.* **22**: 983-92.
- Boissonneault, G.A. & H.J. Heiniger (1985) *J. Cell Physiol.* **125**: 471-5.
- Guyton, J. R., B.L. Black & C.L. Seidel (1990) *Am. J. Pathol.* **137**: 425-34.
- Naseem, S.M. & F.P. Heald (1987) *Biochem. Int.* **14**: 71-84.
- Chang, J.Y., K.D. Phelan & J.A. Chavis (1998) *Brain Res. Bull.* **45**: 615-22.
- Osada, K., S. Hoshina, S. Nakamura & M. Sugano (2000) *J. Agric. Food Chem.* **48**: 3823-9.
- Peng, S.K., C.B. Taylor, J.C. Hill & R.J. Morin (1985) *Atherosclerosis* **54**: 121-33.
- Lyons, M.A. & A.J. Brown (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1530**: 209-18.
- Almeida, K.A., R. Schreiber, R.F. Amancio, S.P. Bydlowski, A. Debes-Bravo, J.S. Issa, C.M. Strunz & R.C. Maranhao (2003) *Clin. Chim. Acta* **335**: 157-63.
- Owens, M.D., G. Baillie & G.W. Halbert (2001) *Int. J. Pharm.* **228**: 109-17.