UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

Guilherme Hideki Yoshizane Costa

ESTUDO DA AÇÃO DE POLIÂNIONS SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS COLESTEROL ESTERASE E COLESTEROL OXIDASE, UTILIZANDO LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS COMO SUBSTRATOS

BELO HORIZONTE

2015

Guilherme Hideki Yoshizane Costa

ESTUDO DA AÇÃO DE POLIÂNIONS SOBRE A ATIVIDADE DAS ENZIMAS COLESTEROL ESTERASE E COLESTEROL OXIDASE, UTILIZANDO LIPOPROTEÍNAS PLASMÁTICAS COMO SUBSTRATOS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica e Imunologia

Orientador: Dr. Jader dos Santos Cruz

Belo Horizonte
2015

AGRADECIMENTOS

- A Deus.
- Aos meus pais e irmão, pelo amor e por me proporcionar todos os meios e caminhos para eu alcançar meus sonhos.
- À Rebeca, por todo amor, carinho e compreensão.
- Ao Paulo Alexandre Alves de Almeida Neves, por todo companheirismo, empenho e dedicação ao trabalho.
- À Dra. Lara Carvalho Godoi, por todo apoio e compreensão durante o desenvolvimento do mestrado.
- Ao Jamil e Jaqueline, por todo companheirismo e auxílio na execução dos experimentos.
- Aos Colegas do Laboratório de Enzimologia e Físico-química de Proteínas e do Laboratório de Sinalização Celular e Biotecnologia, pelo auxílio durante o desenvolvimento das atividades técnicas.
- Aos colegas de trabalho do Centro de Desenvolvimento, Inovação, Ciência e Tecnologia, pelo companheirismo.
- Ao Centro de Desenvolvimento, Inovação Ciência e Tecnologia e à Labtest Diagnóstica S.A., pela oportunidade única e financiamento dos meus estudos.
- Ao Dr. Leonides Rezende Junior, por todo apoio, ensinamentos e persistência em nossos planos.
- Ao Professor Dr. Marcelo Matos Santoro *in memoriam*, por ter me aceitado como aluno e ser um grande exemplo de pesquisador.

If you want always to be right, you need always to be prepared to change your mind.

C.G.P. Grey

RESUMO

Sugiuchi *et al.* (1995) desenvolveram um método direto para a determinação de colesterol proveniente da lipoproteína de alta densidade (HDL), sem a necessidade de procedimentos pré-analíticos. O teste consiste na formação de complexos solúveis das apoB100-lipoproteínas com o poliânion α-ciclodextrina sulfato, o que reduz a ação das enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase sobre lipoproteínas de baixa densidade (LDL), muito baixa densidade (VLDL) e quilomicra. A inibição total da catálise enzimática sobre as apoB100-lipoproteínas é alcançado após a ligação covalente de moléculas de polietilenoglicol às superfícies das enzimas. Após essa ligação, somente as partículas de HDL ficam disponíveis para ação da colesterol esterase e colesterol oxidase. O presente trabalho verificou a capacidade de inibição da reação catalisada pelas enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase pelos poliânions: ácido fosfotúngstico, sacarose octassulfato, sulfato de condroitina e α-ciclodextrina sulfato. Foram determinados parâmetros cinéticos para a enzima colesterol esterase nativa e após adição de polietilinoglicol à sua superfície utilizando calorimetria de titulação isotérmica. Os resultados evidenciaram que o ácido fosfotúngstico é capaz de inibir satisfatoriamente a ação das enzimas sobre as apoB100-lipoproteínas. Os valores da constante de Michaelis-Menten (Km) para colesterol esterase nativa utilizando HDL e LDL foram de 4,26 μM de linoleato de colesterila e 13,14 μM de linoleato de colesterila, respectivamente. Após a adição do polietilenoglicol à enzima o K_m da enzima utilizando HDL como substrato foi alterado para 21,6 μM de linoleato de colesterila. Os resultados desse estudo fornecem o embasamento para o desenvolvimento de um reagente para a determinação de colesterol HDL.

Palavras-chave: Colesterol, Lipoproteína, HDL, Poliânion, Peguilação, Calorimetria, Colesterol esterase, Colesterol Oxidase.

ABSTRACT

Sugiuchi et al. (1995) developed a direct method to determine cholesterol from high density lipoprotein, with no need for pre-analytical procedures. The assay consists of the formation apoB100-lipoproteins' soluble complexes with α-cyclodextrin sulfate polyanion, which reduces the action of the enzymes cholesterol esterase and cholesterol oxidase over low density lipoprotein (LDL), very low density lipoprotein (VLDL) and chylomicra. Total inhibition of the enzymatic catalysis over apoB100-lipoproteins is achieved after the covalent bonding of polyethyleneglycol on the enzymes' surfaces. Only the HDL's particles are available for the catalysis of cholesterol esterase and cholesterol oxidase. This study verified the inhibition of the reactions catalyzed by cholesterol esterase and cholesterol oxidase by the polyanions: phosphotungstic acid, sucrose octasulfate, chondroitin sulfate and α- cyclodextrin sulfated. Kinetics parameters for the native enzyme cholesterol esterase and after the bonding with polyethyleneglycol were also determinate. The results showed that phosphotungstic acid is able to inhibit satisfactorily the enzymes' action over apoB100-lipoproteins. The Km's values for native cholesterol esterase with HDL and LDL were 4,26 μM of cholesteryl linoleate and 13,14 μM of cholesteryl linoleate, respectively. After the bound of polyethyleneglycol on the cholesterol esterase surface the enzime's Km for HDL was altered to 21,6 μM of cholesteryl linoleate. The results of this study provide the knowledge to develop a reagent used to determine HDL cholesterol.

Key words: Cholesterol, lipoprotein, HDL, Polyanion, PEGylation,Ccalorimetry; Cholesterol esterase, Cholesterol oxidase.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Principais classes de lipoproteínas. Classificação de acordo com sua densidade hidratada. *Fonte*: JONAS, 2008. 19
FIGURA 2 – Sítios E e F da Apo B100 de ligação à heparina. 23
FIGURA 3 - Mecanismo genérico de hidrólise por lipases. 24
FIGURA 4 – Etapas reacionais catalisadas pela enzima colesterol oxidase e estrutura do substrato colesterol. 25
FIGURA 5 – Sítio ativo ChOx de *Streptomyces* 26
FIGURA 6 – Canal de oxigênio para saída de peróxido de hidrogênio. 26
FIGURA 7 – Estrutura do polietilenoglicol (PEG). 27
FIGURA 8 – Concentração plasmática de PEG-L-asparaginase versus L-asparaginase em camundongo. 28
FIGURA 9 – Estabilidade térmica, 55 ºC – Lipase de *Pseudomonas fluorescens* nativa e peguilada. 29
FIGURA 10 – Ação de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) na reatividade relativa de colesterol em várias frações de lipoproteínas em presença de colesterol esterase peguilada, colesterol oxidase peguilada e α-ciclodextrina sulfatada. 30
FIGURA 11 – Estrutura do monometoxipolietilenoglicol (mPEG). 31
FIGURA 12 – 1ª geração de PEG funcionalizado. 32
FIGURA 13 – PEGs tiol reativos. 33
FIGURA 14 – Peguilação reversível. 33
FIGURA 15 – Métodos enzimáticos para determinação de glicose e colesterol total. 35
FIGURA 16 – Microscopia eletrônica da ação de agregação do poliânion sintético sobre HDL e VLDL. 38
FIGURA 17 – Métodos homogêneos para determinação de cHDL. 39
FIGURA 18 – Esquema básico de um microcalorímetro. 41
FIGURA 19 – Termograma de reações químicas. 41
FIGURA 20 – Termograma de determinação de ΔH_{app}. 44
FIGURA 21 – Determinação de K_m para β-glucosidade. 45
FIGURA 22 – Curva de saturação enzimática. 46
FIGURA 23 - Sulfato de Condroitina A 52
FIGURA 24 - α-ciclodextrina sulfato 53

FIGURA 25 - Sacarose Octassulfato FIGURA 26 - Dextran Sulfato 53
FIGURA 27 – Aspecto da amostra após ultracentrifugação do soro. 64
FIGURA 28 – Cinéticas enzimáticas das classes de lipoproteína. 66
FIGURA 29 – Curva dose efeito para sulfato de condroitina. 67
FIGURA 30 - Curva dose efeito para ácido fosfotúngstico. 68
FIGURA 31 – Curva dose efeito para sacarose octassulfato.....68
FIGURA 33 – Curva dose efeito para α-ciclodextrina sulfato. 70
FIGURA 34 – Curva dose efeito para α-ciclodextrina sulfato associada à dextran sulfato 0,5% p/v. 70
FIGURA 35 – Cinética de reação das enzimas nativas sem poliânions em analisador automático Labmax 240. 73
FIGURA 36 – Cinética de reação das lipoproteínas normalizadas para ABS inicial = 0,000. 74
FIGURA 37 - Cinéticas de reação das enzimas peguiladas com mPEG 5 kDa, sem poliânioins 75
FIGURA 38 - Cinéticas de reação normalizadas das enzimas peguiladas com mPEG 5 kDa, sem poliânions.....75
FIGURA 39 - Cinéticas de reação das enzimas peguiladas com mPEG 10 kDa, sem poliânion 76
FIGURA 40 - Cinéticas de reação normalizadas das enzimas peguiladas com mPEG 10 kDa, sem poliânions.....76
FIGURA 41 – Cinéticas de reação das enzimas peguiladas com mPEG 5 kDa + 0,75 mmol·L^{-1} de ácido fosfotúngstico. 77
FIGURA 42 - Cinéticas de reação normalizadas das enzimas peguiladas com mPEG 5 kDa + 0,75 mmol·L^{-1} de ácido fosfotúngstico.....77
FIGURA 43 – Cinéticas de reação das enzimas peguiladas com mPEG 10 kDa + 0,75 mmol·L^{-1} de ácido fosfotúngstico. 78
FIGURA 44 - Cinéticas de reação normalizadas das lipoproteínas utilizando enzimas peguiladas com mPEG 10 kDa + 0,75 mmol·L^{-1} de ácido fosfotúngstico.....78
FIGURA 45 - Cinéticas de reação das enzimas peguiladas com mPEG 5 kDa + 0,5 mmol·L^{-1} α-ciclodextrina sulfato.....79
FIGURA 46 - Cinéticas de reação normalizadas das enzimas peguiladas com mPEG 5 kDa + 0,5 mmol·L^{-1}α-ciclodextrina sulfato. 79

FIGURA 47 - Cinéticas de reação das enzimas peguiladas com mPEG 10 kDa + 0,5 mmol·L^{-1} α-ciclodextrina sulfato. 80
FIGURA 48 - Cinéticas de reação normalizadas das lipoproteínas utilizando enzimas peguiladas com mPEG 10 kDa + 0,5 mmol·L^{-1} α-ciclodextrina sulfato. 80
FIGURA 49 – Cinéticas de reação reagente enzimático-colorimétrico com 10 vezes a concentração de enzimas mPEG 5 kDa, sem poliânion. 82
FIGURA 50 – Normalização das cinéticas de reação do reagente enzimático-colorimétrico com 10 vezes a concentração de enzimas mPEG 5 kDa, sem poliânion. 83
FIGURA 51 – Cinéticas de reação reagente enzimático-colorimétrico com 10 vezes a concentração de enzimas mPEG 10 kDa, sem poliânion. 83
FIGURA 53 – Cinéticas de reação reagente enzimático-colorimétrico com 10 vezes a concentração de enzimas mPEG 5 kDa, associado a 0,75 mmol·L^{-1} de ácido fosfotúngstico. 85
FIGURA 54 – Normalização das cinéticas de reação reagente enzimático-colorimétrico com 10 vezes a concentração de enzimas mPEG 5 kDa, associado a 0,75 mmol·L^{-1} de ácido fosfotúngtico. 85
FIGURA 55 – Cinéticas de reação reagente enzimático-colorimétrico com 10 vezes a concentração de enzimas mPEG 10 kDa, associado a 0,75 mmol·L^{-1} de ácido fosfotúngstico. 86
FIGURA 56 – Normalização das cinéticas de reação reagente enzimático-colorimétrico com 10 vezes a concentração de enzimas mPEG 10 kDa, associado a 0,75 mmol·L^{-1} de ácido fosfotúngstico. 86
FIGURA 57 - Cinéticas de reação reagente enzimático-colorimétrico com 10 vezes a concentração de enzimas mPEG 5 kDa + 0,5 mmol·L^{-1} α-ciclodextrina sulfato 87
FIGURA 58 – Normalização das cinéticas de reação reagente enzimático-colorimétrico com 10 a concentração de enzimas mPEG 5 kDa + 0,5 mmol·L^{-1} α-ciclodextrina sulfato. 87
FIGURA 59 - Cinéticas de reação reagente enzimático-colorimétrico com 10 vezes a concentração de enzimas mPEG 10 kDa + 0,5 mmol·L^{-1} α-ciclodextrina sulfato 88
FIGURA 60 – Cinéticas de reação normalizadas reagente enzimático-colorimétrico com 10 vezes a concentração de enzimas mPEG 10 kDa + 0,5 mmol·L^{-1} α-ciclodextrina sulfato. 88

FIGURA 61 – Termograma da reação de CE com substrato HDL. 92
FIGURA 62 – Titulação isotérmica da hidrólise de HDL por CE. 93
FIGURA 63 – Cinética enzimática – CE substrato HDL. 93
FIGURA 65 – Termograma da reação de CE com substrato LDL. 95
FIGURA 66 – Titulação isotérmica da hidrólise de LDL por CE. 95
FIGURA 68 – Linearização de Lineweaver-Burk para CE + HDL. 96
FIGURA 69 - Termograma da reação de CE-PEG 10 kDa com substrato HDL. 98
FIGURA 70 – Titulação isotérmica da hidrólise de HDL por CE-PEG – 10 kDa. 98
FIGURA 71 – Cinética enzimática – CE substrato HDL. 99
FIGURA 72 – Linearização de Lineweaver-Burk para CE-PEG 10 kDa + HDL. 99
FIGURA 73 – Termograma da reação de CE-PEG 10 kDa com substrato LDL. 100
FIGURA 74 – Separação de lipoproteínas por gradiente descontínuo de densidade. 101
FIGURA 75 – Esquema da interação entre CE e lipoproteína. 111
FIGURA 76 - Valores de $\Delta G_{app,}$ ΔH_{app} e $-T\Delta S_{app}$ para reações catalisadas por CE. 115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição lipídica das classes de lipoproteínas 20
Tabela 2 – Principais funções das apolipoproteínas 21
Tabela 3 – Principais apolipoproteínas humanas. 21
Tabela 4 – Teste ELISA para titulação de anticorpo de camundongo imunizado com proteína nativa e peguilada 28
Tabela 5 – 1ª geração: Métodos de precipitação de LDL e VLDL por poliânion e cátion bivalente 37
Tabela 6 - Protocolo de ultracentrifugação 49
Tabela 7 – Composição do reagente enzimático colorimétrico. 51
Tabela 8 – Procedimento para realização dos testes espectrofotométricos. 52
Tabela 9 - Poliânions 54
Tabela 10 – Massa de mPEG-NHS 5 kDa e 10 kDa acionado à CE e ChOX. 56
Tabela 11 – Procedimento para determinação do grau de conjugação com mPEG-NHS 58
Tabela 12 - Parâmetros constantes utilizados no microcalorímetro para determinação de ΔH_{app} 59
Tabela 13 - Protocolos e parâmetros variáveis utilizados no microcalorímetro para determinação de ΔH_{app} 60
Tabela 14 - Parâmetros constantes utilizados no microcalorímetro para determinação de K_m 62
Tabela 15 - Protocolos e parâmetros variáveis utilizados no microcalorímetro para determinação de K_m 62
Tabela 16 – Caracterização química e proteica das lipoproteínas 65
Tabela 17 – Atividade residual dos poliânions sobre as atividades residuais das enzimas CE eChOx utilizando as lipoproteínas LDL, HDL e VLDL como substrato 71
Tabela 18 – Teste de ninidrina para determinação do grau de conjugação com mPEG-NHS . 72
Tabela 19 – Teste *t*-Student para comparativo das cinéticas enzimáticas. 89
Tabela 20 – Atividade residual das reações catalisadas pelas enzimas peguiladas 90
Tabela 22 – Parâmetros enzimáticos para colesterol esterase 100
Tabela 23 – Determinação de ΔG_{app} para as reações de hidrólise realizadas por CE 115

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - $\Delta E = Q + W$

Equação 2 - $W = -P\Delta V$

Equação 3 - $\Delta E = Q - P\Delta V$

Equação 4 - $Q = \Delta E - P\Delta V$

Equação 5 - $Q = \Delta H = \Delta E - P\Delta V$

Equação 6 - $\Delta H = Q = \Delta E$

Equação 7 - $$\Delta H_{app} = \frac{1}{[S]total \times V} \int_{t=0}^{t=\infty} \frac{dQ(t)}{dt}\, dt$$

Equação 8 - $$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{V \cdot \Delta H_{\text{app}}} \cdot \frac{dq}{dt}$$

Equação 9 - $$Kcat = \frac{Vmax}{[E_0]}$$

Equação 10 - $$colesterol\ esterificado\ (mM) = colesterol\ total\ (mM) - colesterol\ livre\ (mM)$$

Equação 11 - $$Atividade\ residual\ (\%) = \frac{ABS\ da\ reação\ na\ presença\ do\ poliânion}{ABS\ da\ reação\ sem\ poliânion} \times 100$$

Equação 12 - $$grau\ de\ conjgação\ (\%) = \left[1 - \left(\frac{ABS\ Enzima\ Peguilada - ABS\ Branco\ NHS}{ABS\ Enzima\ Nativa - ABS\ Branco\ água}\right)\right] \times 100$$

Equação 13 - $$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Equação 14 - $$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Equação 15 - $\Delta G = RTLnK_d$

Equação 16 - $$K_d = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

Equação 17 - $$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

Equação 18 - $$K_d = \frac{K_{-1}}{K_1}$$

Equação 19 - $\Delta G_{app} = \Delta H_{app} - T\Delta S_{app}$

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CE	Colesterol esterase
c-HDL	Colesterol HDL
ChOx	Colesterol oxidase
CM	Quilomicra
DAC	Doença arterial coronariana
DP	Potência diferencial (Differencial Power)
EMSE	*N*-etil-*N*-(3-metil fenil)-*N*'-succinil etilenodiamina
FAD	Flavina adenina nucleotídeo
HDL	Lipoproteína de alta densidade (High density lipoprotein)
ITC	Calorimetria de titulação isotérmica (Isothermal titration calorimetry)
KBr	Brometo de potássio
kDa	Quilodalton
LCAT	Lecitina acil transferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (Low density lipoprotein)
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
mPEG	Monometoxipolietilenoglicol
mPEG-NHS	Monometoxipolietilenoglicol succinimidil carbonato
NaCl	Cloreto de sódio
PEG	Polietilenoglicol
SUS	Sistema Único de Saúde
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade (Very low density lipoprotein)
G	Energia livre (energia de Gibbs)
H	Entalpia
S	Entropia
T	Temperatura termodinâmica
R	Constante dos gases ideais = 1,987 $\mathrm{cal \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}}$
ΔG_{app}	Variação da energia livre aparente
ΔH_{app}	Variação da entalpia aparente
ΔS_{app}	Variação da entropia aparente
K_m	Constante de Michaelis-Menten
V_{max}	Velocidade máxima da reação enzimática

k_{cat}	Número de renovação
[E]	Concentração da enzima
[S]	Concentração do substrato
[P]	Concentração do produto
k_1	Constante cinética de formação complexo enzima substrato
k_{-1}	Constante cinética de dissociação do complexo enzima substrato
k_2	Constante catalítica

Sumário

1 Introdução **17**
2 Revisão da literatura **19**
2.1 Lipoproteínas: estrutura, composição, função e interação com glicosaminoglicanos 19
2.1.1 Principais classes de lipoproteínas 19
2.1.2 Conteúdo lipídico 20
2.1.3 Conteúdo proteico 20
2.1.4 Interação de lipoproteínas com glicosaminoglicanos 22
2.2 Enzimas envolvidas na determinação de colesterol HDL 23
2.2.1 Colesterol esterase: mecanismo de reação 23
2.2.2 Colesterol oxidase: mecanismo de reação e sítio ativo 24
2.2.3 Reação catalisada pela colesterol oxidase 24
2.3 Modificação química: conjugação com polietilienoglicol 27
2.3.1 Aplicações biomédicas 27
2.3.2 Aplicações biotecnológicas 29
2.3.3 Química da peguilação. 30
2.4 Determinação de colesterol HDL 34
2.4.1 Determinação de colesterol total 34
2.4.2 Evolução dos métodos para determinação de cHDL 36
2.5 Calorimetria de Titulação Isotérmica 40
2.5.1 Microcalorímetro de titulação isotérmica 40
2.5.2 Termodinâmica básica de calorimetria de titulação isotérmica 42
2.5.3 Determinação de parâmetros cinéticos enzimáticos utilizando ITC 43
3 Objetivos **47**
3.1 Objetivos Gerais 47
3.2 Objetivos Específicos 47
4 Materiais e métodos **48**
4.1 Separação de lipoproteínas por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade 48
4.1.1 Materiais 48
4.1.2 Procedimento experimental 49
4.2 Determinação do conteúdo químico e proteico das lipoproteínas 50
4.2.1 Materiais 50
4.2.2 Procedimento experimental 50
4.3 Estudo enzimático colorimétrico e seleção de poliânion 51

4.3.1 Reagente enzimático-colorimétrico 51
4.3.2 Seleção de poliânions 52
4.4 Materiais 54
4.4.1 Procedimento experimental 54
4.5 Conjugação com monometoxipolietilenoglicol succinimidil carbonato 55
4.5.1 Materiais 55
4.5.2 Procedimento experimental 56
4.6 Determinação de variação de entalpia aparente de reação – ITC 59
4.6.1 Materiais 59
4.6.2 Procedimento experimental 59
4.7 Determinação da constante de Michaelis-Menten 61
4.7.1 Materiais 61
4.7.2 Procedimento experimental 61
5 Resultados 64
5.1 Separação de lipoproteínas por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade 64
5.2 Determinação do conteúdo químico e proteico das lipoproteínas 65
5.3 Estudo enzimático colorimétrico e seleção de poliânion 66
5.3.1 Cinéticas de reação das classes de lipoproteínas 66
5.3.2 Seleção de poliânions 67
5.4 Conjugação com monometoxipolietilenoglicol succinimidil carbonato 72
5.5 Ensaios para determinação da atividade residual das enzimas peguiladas associadas a 0,75 $mmol \cdot L^{-1}$ de ácido fosfotúngstico 73
5.5.1 Reagente enzimático-colorimétrico contendo 10 vezes a concentração de enzimas 82
5.5.2 89
5.6 Determinação da variação de entalpia aparente de reação e constante de Michaelis-Menten. 92
5.6.1 Enzimas nativas – substrato lipoproteínas 92
5.6.2 Colesterol esterase peguilada – substrato lipoproteínas. 97
6 Discussão 101
6.1 Separação de lipoproteínas e determinação de suas características químicas e proteicas. .. 101
6.2 Peguilação das enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase 103
6.3 Estudo enzimático colorimétrico e seleção de poliânions 105
6.3.1 Ensaios de determinação da atividade residual para enzimas peguiladas associadas a 0,75 $mmol \cdot L^{-1}$ de ácido fosfotúngstico. 107
6.4 Determinação de variação da entalpia aparente de reação e constante de Michaelis-Menten. 110

6.4.1 Determinação de ΔH_{app} 110
6.4.2 Determinação de K_m 111
6.5 A reação é entalpica ou entropicamente dirigida? 113
7 Conclusão 117
8 Perspectivas 118
Referências 119
Apêndice 1 125
Apêndice 2 126

1 INTRODUÇÃO

Desde 1977 sabe-se que indivíduos com níveis elevados de colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (colesterol HDL - cHDL) apresentam menor prevalência de doenças arteriais coronarianas (DAC) (CASTELLI *et al*., 1977). Atualmente, a determinação do cHDL é um parâmetro clínico comumente solicitado por médicos para avaliação de risco de doenças correlacionadas ao sistema cardiovascular. No ano de 2013, somente o Sistema Único de Saúde (SUS), realizou 18.671.654 testes para determinação de cHDL, com um gasto de R$ 64.947.809,27. Esse valor corresponde a 8,5% de todo o recurso destinado à realização de exames laboratoriais, dentro do grupo de bioquímica. (BRASIL, 2014).

Para determinação de cHDL é necessário que o sistema analítico seja capaz de detectar somente o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade. Já foram descritos vários métodos para a determinação de cHDL e os artifícios para inibir a participação das lipoproteínas de baixa densidade, muito baixa densidade e quilomicra na reação de determinação do colesterol plasmático são diferentes. Os artifícios contemplam: separação por ultracentrifugação, precipitação de ApoB-lipoproteínas, complexação de ApoB-lipoproteínas por anticorpos anti-ApoB, modificação das enzimas envolvidas na reação para diminuir a interação com as ApoB-lipoproteínas, dentre outros (WARNICK *et al*., 2001).

Sugiuchi *et al*. (1995) desenvolveram um reagente para a determinação de colesterol HDL que utiliza a α-ciclodextrina sulfatada e a modificação química das enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase, por meio de adição de moléculas de polietilenoglicol; visando reduzir suas afinidades pelas ApoB-lipoproteínas. A vantagem do seu método é a capacidade de ser utilizado por analisadores automáticos, sem a necessidade de realizar qualquer pré-tratamento da amostra geralmente laborioso, que incluem pipetagem manual ou centrifugação.

Sugiuchi *et. al*. (1995) demonstram que α-ciclodextrina sulfatada auxilia na redução da interação das enzimas com ApoB-lipoproteinas e que as constantes de Michaelis-Menten, (K_m), das enzimasmodificadas quimicamente não diferem dos K_m das enzimas nativas, quando utilizado o linoleato de colesterol e colesterol livre como substratos. Embora o autor não tenha evidenciado alteração dos K_m das enzimas modificadas, os substratos utilizados não correspondem à complexidade de uma lipoproteína.

INTRODUÇÃO

Se for considerado que a modificação química é realizada para diminuir a interação das enzimas com ApoB-lipoproteínas, seria possível imaginar que houvesse alteração nos K_m das enzimas modificadas, quando consideradas as lipoproteínas como substrato. Seria interessante então, avaliar outros poliânions que exercem a mesma função, já que α-ciclodextrina sulfatada tem um custo elevado.

O presente trabalho teve como intuito o estudo de outros poliânions como agentes redutores da interação ApoB-lipoproteínas/enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase e determinação dos $K_{m's}$ para as enzimas nativas e alteradas quimicamente utilizando lipoproteínas humanas como substrato.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Lipoproteínas: estrutura, composição, função e interação com glicosaminoglicanos

Lipoproteínas são complexos solúveis de proteínas (apolipoproteínas) e lipídeos que têm como função o transporte de lípides pela circulação sanguínea (JONAS, 2008).

2.1.1 Principais classes de lipoproteínas

Apesar de apresentarem diferenças estruturais (composição de apolipoproteínas), de interagirem com diferentes receptores e participarem de diferentes vias metabólicas, a classificação mais usual das lipoproteínas é com base na sua densidade hidratada. Sendo denominadas, em ordem crescente de densidade hidratada (**FIGURA 1**): Quilomicra (em inglês: *Chylomicra*, CM); Lipoproteína de muito baixa densidade (em inglês: *Very Low Density Lipoprotein*, VLDL); Lipoproteína de baixa densidade (em inglês: *Low Density Lipoprotein*, LDL) e Lipoproteína de alta densidade (em inglês: *High Density Lipoprotein*, HDL) (JONAS, 2008).

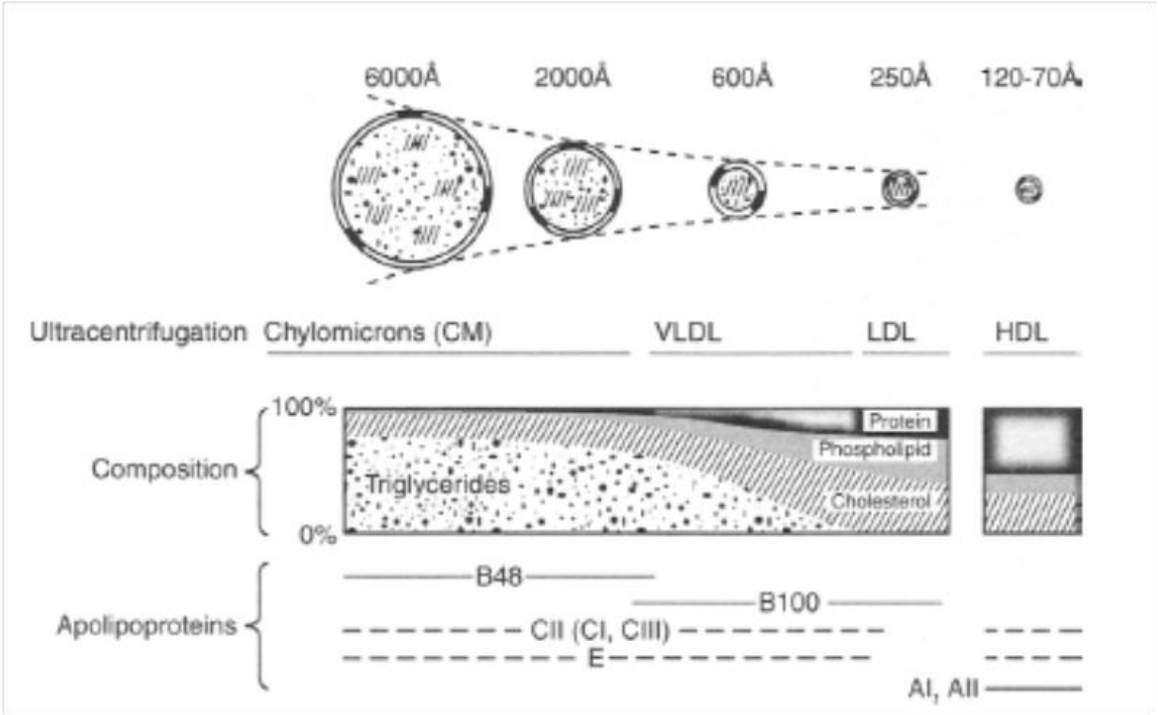


FIGURA 1 - Principais classes de lipoproteínas. Classificação de acordo com sua densidade hidratada. *Fonte*: JONAS, 2008.

As funções principais das lipoproteínas são determinadas pelas apolipoproteínas e o conteúdo de lipídeos. Os quilomicra são sintetizados no intestino para transporte de triglicerídeos, provenientes da dieta, para vários tecidos. O VLDL é sintetizado no fígado para exportar triglicerídeos endógenos, enquanto, o LDL é originado pela transformação metabólica do VLDL na circulação. O LDL tem como função o transporte de éster de colesterol para tecidos periféricos e fígado. O HDL é sintetizado no fígado, intestino ou é originado de transformações metabólicas de outras lipoproteínas na circulação, assim como, lipídeos de origem celular nas membranas celulares. A função principal do HDL é remover o excesso de colesterol das células e transportá-lo para o fígado e tecidos esteroidogênicos. (JONAS, 2008).

2.1.2 Conteúdo lipídico

O revestimento externo de todas as lipoproteínas é composto por uma monocamada de fosfolípides, apolipoproteínas e colesterol livre. O seu conteúdo interno é constituído de triglicerídeos, colesterol esterificado e colesterol livre. A quantidade total de lípides na constituição da lipoproteína é inversamente proporcional à sua densidade (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Composição lipídica das classes de lipoproteínas

	CM	VLDL	LDL	HDL
Densidade (g/mL)	< 0,94	0,94-1,006	1,006-1,063	1,063-1,210
Lípides totais (% *m*/*m*)	98-99	90-92	75-80	40-48
Ésteres de ácido graxo (% *m*/*m*)	81-89	50-58	7-11	6-7
Éster de Colesterol (% *m*/*m*)	2-4	15-23	47-51	24-45
Colesterol livre (% *m*/*m*)	1-3	4-9	10-12	6-8
Fosfolipides (% *m*/*m*)	7-9	19-21	28-30	42-51

A maioria dos ésteres de ácido graxo são triacilgliceróis (96%), somente uma pequena quantidade é composta por diacil e monoacilgliceróis. *Fonte*: Adaptado de SKIPSKI, 1967.

2.1.3 Conteúdo proteico

As apolipoproteínas apresentam diferentes funções nas lipoproteínas: auxiliam na manutenção da estrutura micelar, solubilização de lipídeos na circulação, reconhecimento por receptores de lipoproteínas e modulação enzimática (**Tabela 2**) (BOLANOS-GARCIA e MIGUEL, 2003). As apolipoproteínas podem ser divididas em dois grandes grupos: o

primeiro é composto por apolipoproteínas circulantes, pequenas proteínas solúveis que podem ser transferidas entre lipoproteínas, designadas apoA1, apoA2, apoA4, apoC1, apoC2, apoC3 e apoE; o segundo grupo é composto pelas apolipoproteínas não circulantes, proteínas que não podem ser transferidas de uma lipoproteína para outra, chamadas apoB48 e apoB100. A sua distribuição nas lipoproteínas não é homogênea, sendo que algumas apolipoproteínas só estão presentes em algumas classes de lipoproteínas (**Tabela 3**).

Tabela 2 – Principais funções das apolipoproteínas

Apolipoproteína	**Principal(is) função(ões)**
Circulantes	
ApoA1	Ativador de Lecitina aciltransferase (LCAT)
ApoA2	Manutenção da estrutura de HDL e controle no transporte reverso de colesterol.
ApoC1, C2, C3	Regulação das enzimas envolvidas no metabolismo de lipoproteínas.
ApoE	*Clearance* de VLDL e quilomicron, captura de lipoproteínas pelo fígado e sítios periféricos.
Não Circulantes	
ApoB100	Manutenção da estrutura de VLDL e LDL; ligante do receptor de LDL.
ApoB48	Manutenção da estrutura de quilomícron.

Fonte: BOLAÑOS-GARCIA e MIGUEL, 2003.

Tabela 3 – Principais apolipoproteínas humanas.

Apolipoproteína	**Peso molecular (Da)**	**Classe de lipoproteína [a]**	**Concentração plasmática (mg/dL)**
ApoA1	28.100	**HDL**, CM	130
ApoA2	17.400	HDL	40
ApoA4	44.500	CM	15
Apo(a)	3-8 x 10^5	Lp (a)	0,1–40
ApoB100	512.000	LDL, VLDL	100
ApoB48 [b]	242.000	CM	
ApoC1	6.600	**VLDL**, **CM**, HDL	3
ApoC2	9.000	**VLDL**, **CM**, HDL	12
ApoC3	9.000	**VLDL**, **CM**, HDL	12
ApoD[c]	22.000	HDL	12
ApoE	34.200	VLDL, CM, HDL	7

[a] Em negrito são destacadas as principais lipoproteínas que contêm a apolipoproteína.
[b]Apo B48 corresponde a 48% da sequência n-terminal da Apo B100. Ambas são glicoproteínas presentes em diferentes quantidades dependendo do estado de alimentação e das concentrações dos quilomicra.
[c] Apo D pertence à família da lipocalina, mas seu papel no metabolismo não é conhecido.
Fonte: Adaptado de JONAS, 2008.

2.1.4 Interação de lipoproteínas com glicosaminoglicanos

As apolipoproteínas ApoB100 e ApoE apresentam características únicas dentre as demais, tendo a capacidade de se ligar ao receptor de LDL e a uma variedade de glicosaminoglicanos.

Lindahl e Hook (1978) definem glicosaminoglicanos como polissacarídeos encontrados em tecidos animais, que usualmente estão covalentemente ligados à proteína. Sua cadeia central de carboidratos é composta por unidades alternadas de ácido urônico (ácido L-idurônico e/ou ácido D-glucurônico) e hexosamina. Esses polissacarídeos são distinguidos pela composição de seus monômeros, pela posição e configuração das ligações glicosídicas e pela localização e quantidade dos grupos sulfatos substituintes. Sete tipos são comumente reconhecidos, dos quais seis são estruturalmente relacionados por serem sulfatados (somente hialuronato não é sulfatado).

Apesar de não ser claro o motivo fisiológico pelo qual as lipoproteínas ligam-se aos glicosaminoglicanos, sugere-se que essa ligação ocorra porque a lipase lipoprotéica liga-se ao tecido endotelial por proteoglicanos (proteínas ligadas a glicosaminoglicanos) e a interação das apolipoproteínas com glicosaminoglicanos favoreça a ancoragem da lipoproteína na parede do vaso sanguíneo facilitando a ação da lipase. A interação das apolipoproteínas ApoB100 e ApoE com glicosaminoglicanos dos vasos sanguíneos pode estar relacionada com a patogênese de doenças cardiovasculares. Modificações químicas nos resíduos de aminoácidos das apolipoproteínas ApoE e ApoB100 demonstraram que resíduos de lisina e arginina estão envolvidos nas interações com o receptor de LDL e glicosaminoglicanos. Existem seis sítios de ligação à heparina sódica na ApoB100, sendo que os sítios com maior afinidade, E e F (**FIGURA 2**) são os que apresentam maior concentração de aminoácidos básicos, o que justifica sua maior afinidade (WEISGRABER e RALL, 1987).

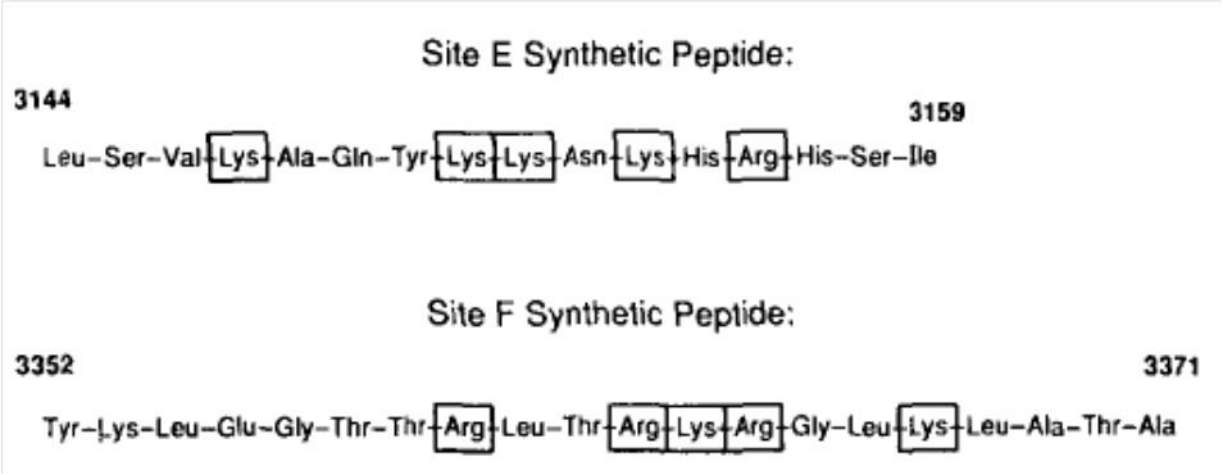


FIGURA 2 – Sítios E e F da Apo B100 de ligação à heparina.
Os sítios de ligação da heparina possuem elevada concentração de resíduos de aminoácidos básicos. *Fonte*: WEISGRABER e RALL, 1987

2.1.4.1 Interação de lipoproteínas com heparina na presença de cátions bivalentes

Uma das principais maneiras para isolar as lipoproteínas LDL e VLDL do soro é a utilização da combinação de glicosaminoglicanos e cátions bivalentes. Essa associação leva à formação de complexos insolúveis que podem ser isolados por centrifugação convencional. O processo de separação apresenta especificidade e rendimento adequados, sem promover alteração na lipoproteína ou necessidade de utilização de ultracentrifugação (BURSTEIN *et al.*, 1970). Srinivasan *et al.* (1975) estudaram a seletividade da interação entre as lipoproteínas HDL, LDL e VLDL na presença de heparina e Ca^{++}, Mg^{++} e Mn^{++}. O estudo demonstrou que os cátions cálcio e magnésio levam à formação de complexos insolúveis com LDL e VLDL, diferentes do cátion manganês que promove a precipitação de HDL, LDL e VLDL na presença de heparina. Esse fenômeno da interação seletiva das moléculas de LDL e VLDL na presença de Mg^{++} e glicosaminoglicanos foi utilizado por Sugiuchi *et al*. (1995) para promover as reações seletivas entre o colesterol HDL e as enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase peguiladas, na presença de α-ciclodextrina sulfatada e Mg^{++}.

2.2 Enzimas envolvidas na determinação de colesterol HDL

2.2.1 Colesterol esterase: mecanismo de reação

Colesterol esterase (CE) é nome antigo dado à enzima carboxil éster lipase. Essa enzima é uma lipase não específica capaz de hidrolisar ésteres de colesterol, tri,-di- e

monoacilglicerol, fosfolípides, lisofosfolípedes e ceramidas (HU e HOWLES, 2002). A CE é utilizada em vários métodos para a determinação de colesterol por meio da hidrólise de ésteres de colesterol (ARRANZ *et al*., 1994).

A atividade hidrolítica da CE (**FIGURA 3**) é conferida pela tríade catalítica constituída pelos resíduos de aminoácidos Ser-His-Asp, semelhante a outras lipases. O resíduo de serina é responsável pelo ataque nucleofílico à carboxila do éster. A histidina auxilia na formação do estado intermediário tetraédrico e promove a remoção do próton da serina, aumentando o seu caráter nucleofílico. O aspartato interage com o resíduo de histidina aumentando o pK_a da base, o que aumenta a força de interação do resíduo de histidina com o próton da serina. Dessa maneira o resíduo de serina se torna mais nucleofílico (HUI; HOWLES, 2002).

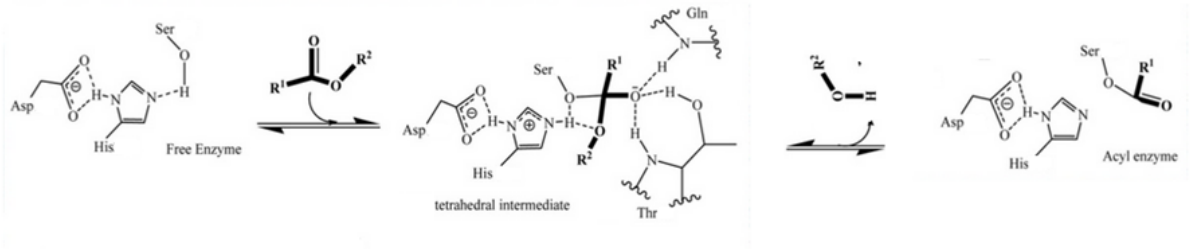


FIGURA 3 - Mecanismo genérico de hidrólise por lipases.
No primeiro momento é mostrado a ação do resíduo de aspartato sobre o resido de histidina, o que acarreta no aumento do pKa da base. Em seguida, ocorre o captura do próton do resíduo de serina, seguido pelo ataque nucleofílico à carbonila do éster, denominado intermediário tetraédrico. Por fim, ocorre liberação do álcool que compunha o éster. *Fonte:* Adaptado de CYGLER e SCHRAG, 2007

2.2.2 Colesterol oxidase: mecanismo de reação e sítio ativo

Colesterol oxidases (ChOx) são flavoproteínas que catalisam o primeiro passo da degradação do colesterol. Essas enzimas contêm uma única molécula de flavina-adenina dinucleótido (FAD) aderido à sua estrutura como coenzima para realização de reações redox. ChOx é uma ferramenta biotecnológica de grande utilidade, utilizada em reagentes para a determinação de concentração de colesterol sérico e potencial uso como larvicida e inseticida (VEIRLINK e GHISLA, 2009).

2.2.3 Reação catalisada pela colesterol oxidase

ChOx catalisa três conversões químicas (**FIGURA 4**). A primeira conversão é a de desidrogenação do álcool na posição 3 do anel esteroide. Os dois prótons, um proveniente do

álcool e outro da ligação C-H, juntamente com um par de elétrons, são transferidos para o cofator FAD promovendo sua redução. No segundo passo catalítico, o FAD reduzido transfere o par de prótons e elétrons recebidos para uma molécula de oxigênio (O_2) produzindo peróxido de hidrogênio. Finalmente, o esteroide oxidado passa por um processo de isomerização da dupla ligação do anel esteroide.

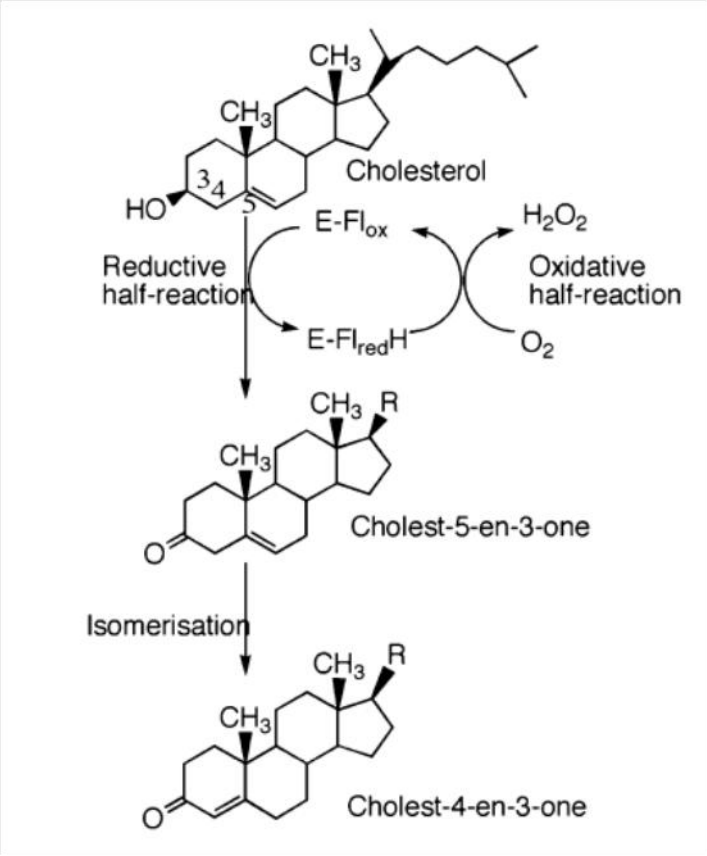


FIGURA 4 – Etapas reacionais catalisadas pela enzima colesterol oxidase e estrutura do substrato colesterol.
1ª etapa: oxidação do colesterol; 2ª etapa: transferência do par de elétrons para molécula de O_2; 3ª etapa: isomerização da dupla ligação. *Fonte:* VEIRLINK e GHISLA, 2009

2.2.3.1 Sítio ativo da colesterol oxidase

O sítio ativo da enzima (**FIGURA 5**) possui um profundo bolsão hidrofóbico capaz de acomodar o anel esteroide. O sítio de ligação é selado do ambiente externo por meio de alças, que devem se reorientar para permitir a entrada do substrato esteroide no bolsão hidrofóbico (YUE *et al*., 1999). A entrada de oxigênio e saída de peróxido de hidrogênio do sitio ativo da enzima ocorre por um canal de oxigênio que se estende do exterior da enzima até o bolsão hidrofóbico (**FIGURA 6**) (CHEN *et al*., 2008).

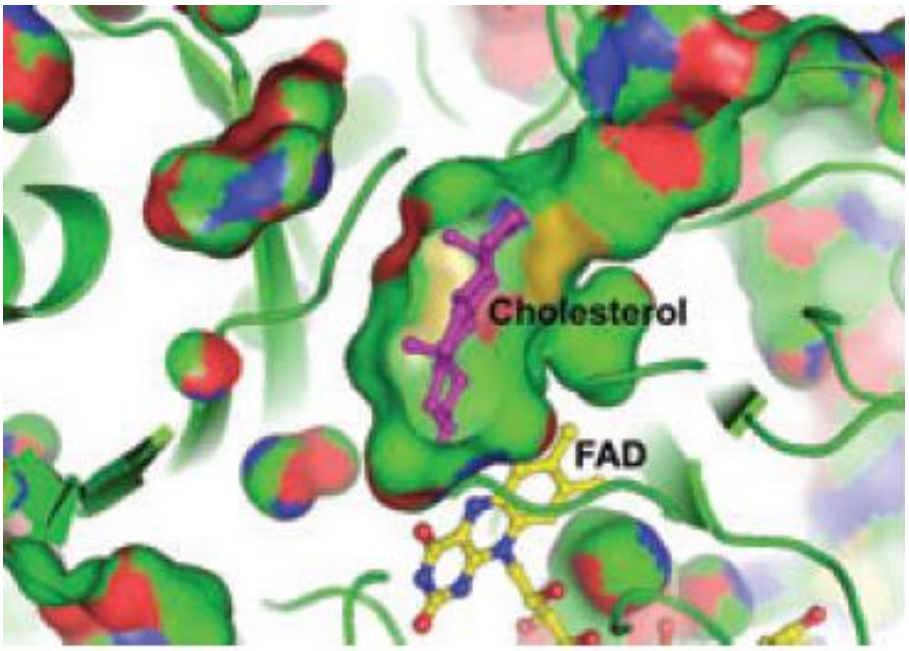


FIGURA 5 – Sítio ativo ChOx de *Streptomyces*
Molécula de colesterol em roxo, localizada dentro do bolsão hidrofóbico. *Fonte*: VEIRLINK e GHISLA, 2009

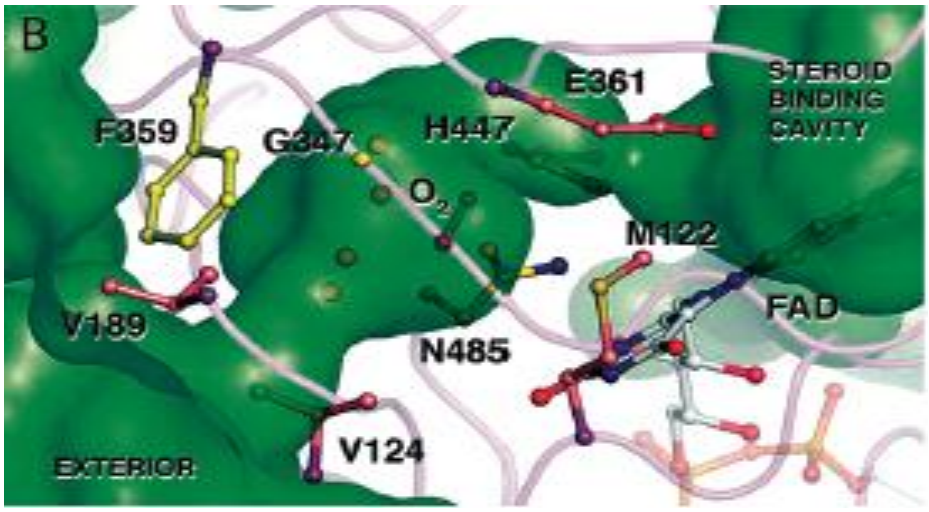


FIGURA 6 – Canal de oxigênio para saída de peróxido de hidrogênio.
Canal de oxigênio estendendo-se do exterior da enzima até o bolsão hidrofóbico, molécula de oxigênio pode ser visualizada no interior do canal. *Fonte*: CHEN *et al*., 2008.

2.3 Modificação química: conjugação com polietilienoglicol

Proteínas conjugadas com polietilenoglicol (PEG) (**FIGURA 7**) pertencem a uma diferente classe de biocompostos que não são considerados proteínas ou outros polímeros orgânicos, mas um híbrido dos dois (BAILON e BERTHOLD, 1998). A conjugação de proteínas com polietilenoglicol teve início na década de 70 com o pesquisador Frank F. Davis que estudava mecanismos de redução da imunogenicidade de proteínas por meio de conjugação de carboidratos com sua estrutura. Entretanto, durante seus estudos as características físico-químicas e toxicológicas do PEG se apresentaram mais adequadas para conjugação proteica do que os carboidratos. O PEG apresenta solubilidade em vários solventes orgânicos, mas precipita-se com adição de outro solvente, o que favorece a funcionalização e recuperação do PEG funcionalizado. O polímero é solúvel em soluções aquosas, sua estrutura é flexível, não ramificada e pode apresentar um único grupo terminal hidroxil para funcionalização e ligação às proteínas. O PEG apresenta baixa toxicidade, o que o torna um bom material para uso *in vivo* (DAVIS, 2002).

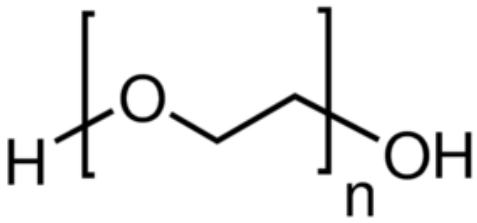


FIGURA 7 – Estrutura do polietilenoglicol (PEG).

2.3.1 Aplicações biomédicas

A conjugação de PEG, chamada de peguilação, a proteínas de interesse médico promove melhorias em suas propriedades farmacocinéticas e toxicológicas. O processo de peguilação promove aumento no tempo de meia-vida da proteína *in vivo*, o que se deve à redução da suscetibilidade à degradação enzimática e diminuição da filtração renal, causado pelo aumento do tamanho aparente da proteína (**FIGURA 8**). A imunogenicidade das proteínas também é reduzida porque eventuais epítopos são peguilados (**Tabela 4**). A toxicidade da proteína peguilada é menor quando comparado com a proteína nativa (FUERTGES e ABUCHOWSKI, 1990).

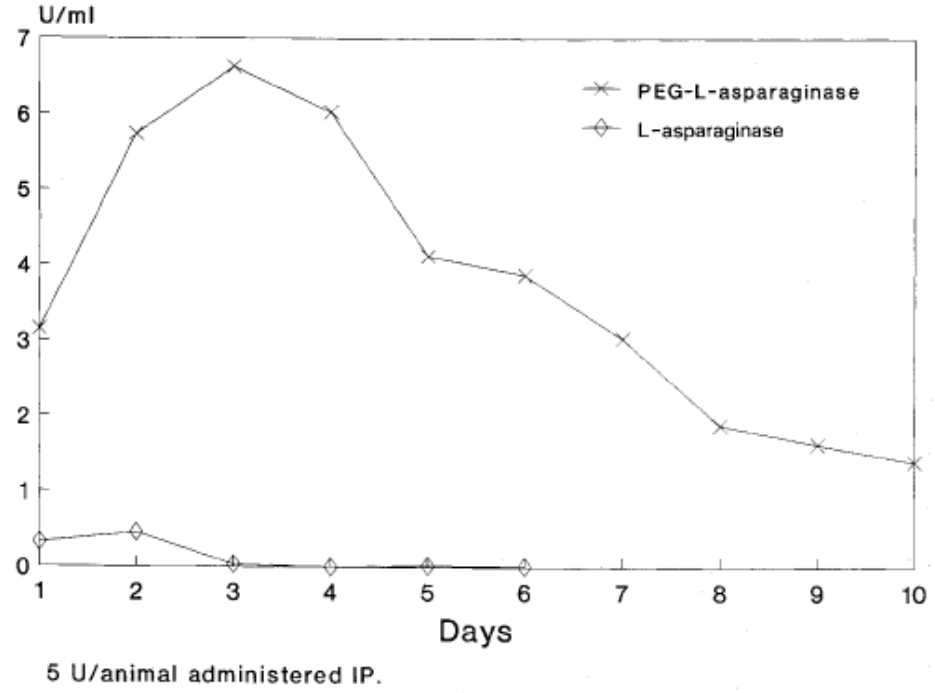


FIGURA 8 – Concentração plasmática de PEG-L-asparaginase versus L-asparaginase em camundongo.

A conjugação da aparaginase com PEG promoveu aumento no tempo de circulação plasmática quando comparado com a enzima na forma nativa. *Fonte:* FUERTGES e ABUCHOWSKI, 1990

Tabela 4 – Teste ELISA para titulação de anticorpo de camundongo imunizado com proteína nativa e peguilada

Antisoro contra	Via de administração	IgG + IgM + IgA	IgG	IgM
superóxido dismutase	Intraperitoneal	1:156.250	1:156.250	1:12.500
PEG - superóxido dismutase	Intraperitoneal	1:320	1:50	1:20
PEG - superóxido dismutase	Intramuscular	1:640	1:100	1:40

A proteína nativa e a PEG superóxido dismutase foram administradas na dose de 0,1 mg/semana , durante 12 semanas.

Fonte: FUERTGES e ABUCHOWSKI, 1990

O principal tratamento para infecções causadas pelo vírus da hepatite C é realizado com interferon-α2b peguilado. Os estudos clínicos demonstraram que a molécula apresenta tempo de meia vida muito superior quando se comparado à forma não peguilada (GLUE *et al.*, 2000).

2.3.2 Aplicações biotecnológicas

O processo de peguilação promove alterações nas características físico-químicas das proteínas. Dentre as alterações, há aumento da solubilidade das proteínas em solventes orgânicos (benzeno, tolueno e haletos de alquila) devido à modificação de sua superfície após a adição do PEG, que é uma molécula anfifílica. Em consequência ao aumento da solubilidade em solventes orgânicos, novas possibilidades de utilização das enzimas são criadas (INADA *et al*., 1995):

- Hidrólise reversa em meio orgânico;
- Aumento de catálise de substratos hidrofóbicos;
- Síntese estereoespecífica em meio hidrofóbico;
- Síntese de compostos instáveis em meios aquosos;
- Aumento de termoestabilidade em meios aquosos e hidrofóbicos.

O aumento da estabilidade térmica é de grande interesse comercial, já que proteínas mais estáveis podem resultar em processos industriais mais robustos e medicamentos com maior estabilidade. Hiroto *et al*. (1992) avaliaram a estabilidade térmica de lipase peguilada e nativa de *Pseudomonas fluorescens*, em meio orgânico e concluíram que a modificação estrutural da esterase promoveu aumento da estabilidade térmica para a enzima (**FIGURA 9**).

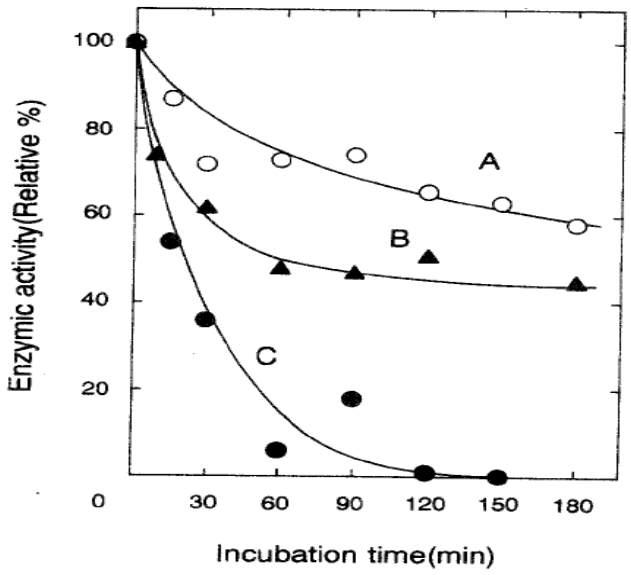


FIGURA 9 – Estabilidade térmica, 55 ºC – Lipase de *Pseudomonas fluorescens* nativa e peguilada.
Curva A – atividade lipase peguilada; Curva B – atividade da síntese de éster em benzeno da lipase peguilada; Curva C – atividade da lipase nativa. *Fonte:* HIROTO *et al*., 1992

Outra aplicação para proteínas peguiladas foi desenvolvida por Sugiuchi *et. al.* (1995) que criou um método para determinação direta de colesterol HDL. As enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase, após serem modificadas pela adição de PEG 6 quilodalton (kDa), interagem com a fração HDL das lipoproteínas e, parcialmente, com LDL, VLDL ou quilomícron. A inibição completa da interação com LDL e VLDL e quilomícron foi alcançada na presença de cátion magnésio e α-ciclodextrina sulfatada (**FIGURA 10**).

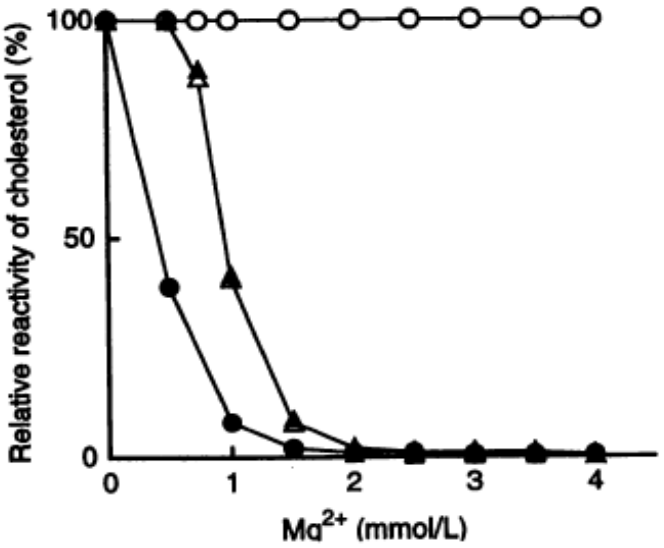


FIGURA 10 – Ação de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) na reatividade relativa de colesterol em várias frações de lipoproteínas em presença de colesterol esterase peguilada, colesterol oxidase peguilada e α-ciclodextrina sulfatada.

O aumento na concentração de cátions magnésio promoveu aumento na inibição da reação catalisada por CE peguilada e ChOx peguilada somente sobre as ApoB-lipoproteínas. A inibição máxima foi alcançada com 2 mM de Mg^{++}. ○, HDL; ●, LDL; Δ, VLDL e ▲quilomicron. FONTE: SUGIUCHI *et al*., 1995

2.3.3 Química da peguilação.

Para realizar o acoplamento de polietilenoglicol a uma molécula (e.g. peptídeos, polissacarídeos, polinucleotídeos e pequenas moléculas orgânicas) é necessário modificar o PEG, adicionando um grupo funcional em uma ou ambas as hidroxilas terminais do polímero. O grupo funcional é escolhido de acordo com o grupo reativo da molécula que será ligada ao polímero. Para as proteínas, os aminoácidos mais usuais para realização do acoplamento são: lisina, cisteína, histidina, arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, treonina e tirosina. Grupos amino-terminal e ácido carboxílico-terminal também podem ser acoplados ao PEG. Entretanto, a rota mais comum de conjugação tem sido por meio dos grupamentos amina presente em resíduos de lisina e N-terminal de proteínas.

Apesar de ambas as hidroxilas do PEG poderem ser funcionalizadas, prefere-se a utilização do monometoxipolietilenoglicol (mPEG) (**FIGURA 11**) para peguilação de proteínas, o que evita a formação de *crosslink* entre as moléculas (ROBERTS *et al*., 2002).

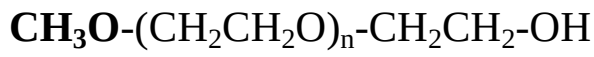


FIGURA 11 – Estrutura do monometoxipolietilenoglicol (mPEG).

2.3.3.1 1ª Geração de PEG funcionalizados

As moléculas de PEG utilizadas para acoplamento em proteínas podem ser divididas em duas gerações. As moléculas da primeira geração são menos seletivas e apresentam baixo grau de pureza. Com a segunda geração de PEGs funcionalizados foi obtido maior seletividade para a conjugação e a criação de acoplamentos reversíveis.

A primeira geração de PEGs funcionalizados liga-se às proteínas por meio de formação de carbamatos. Os grupamentos amina da proteína realizam um ataque nucleofílico à carbonila do PEG funcionalizado, formando um carbamato e liberando o grupo abandonador (**FIGURA 12**). Apesar da reação de acoplamento se proceder principalmente com aminas primárias, provenientes de resíduos lisinas e *N*-terminal, reações colaterais com resíduos de histidina e tirosina também podem ocorrer (ROBERTS *et al*., 2002).

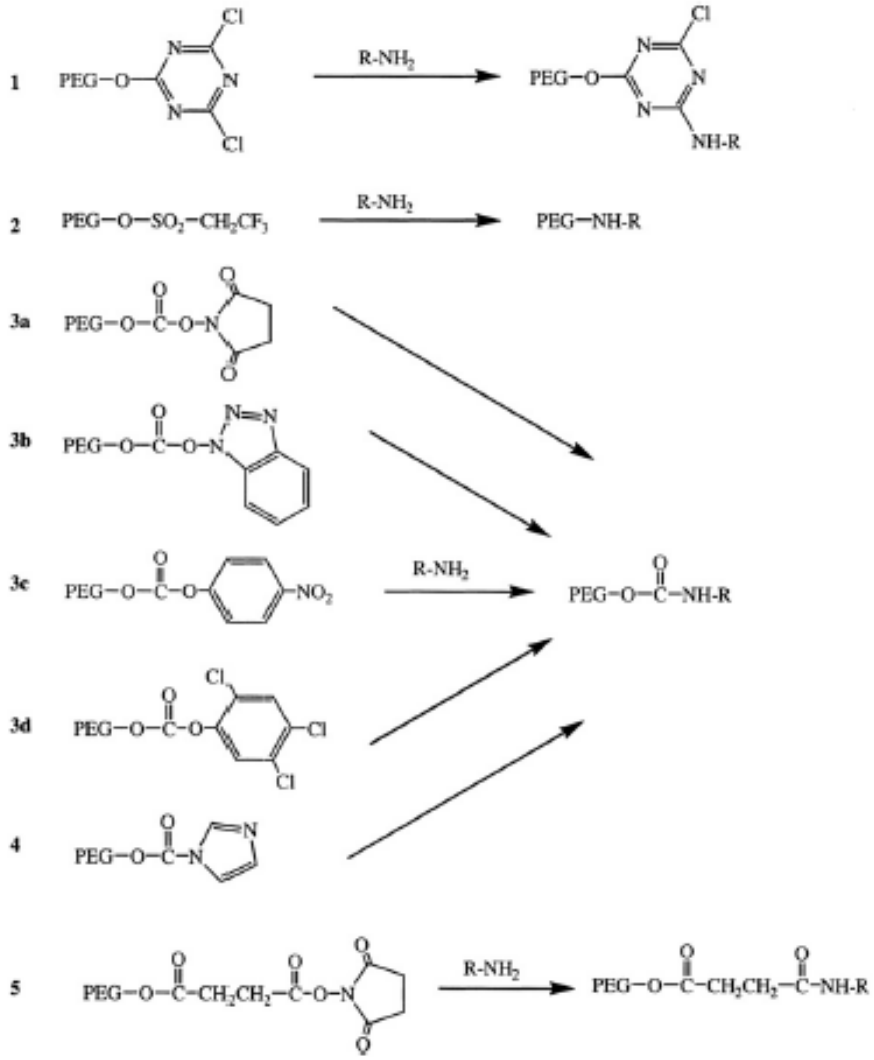


FIGURA 12 – 1ª geração de PEG funcionalizado.
1, PEG diclorotriazina; 2, PEG tresilato; 3a, PEG succinimidil carbonato; 3b, PEG benzotriazol carbonato; 3c, PEG *p*-nitrofenil carbonato; 3d, PEG triclorofenil carbonato; 4, PEG carbonilimidazol e 5, PEG *succinimidil succinato.* FONTE: ROBERTS *et al*., 2002

2.3.3.2 *2ª Geração de PEGs funcionalizados*

A segunda geração de PEGs funcionalizados apresenta modificações em sua estrutura que promoveram melhorias no grau de pureza, redução de reações colaterais, aumento de seletividade e reversão da ligação covalente. Um exemplo são as alterações que permitiram realizar peguilação em resíduos de cisteína (**FIGURA 13**).

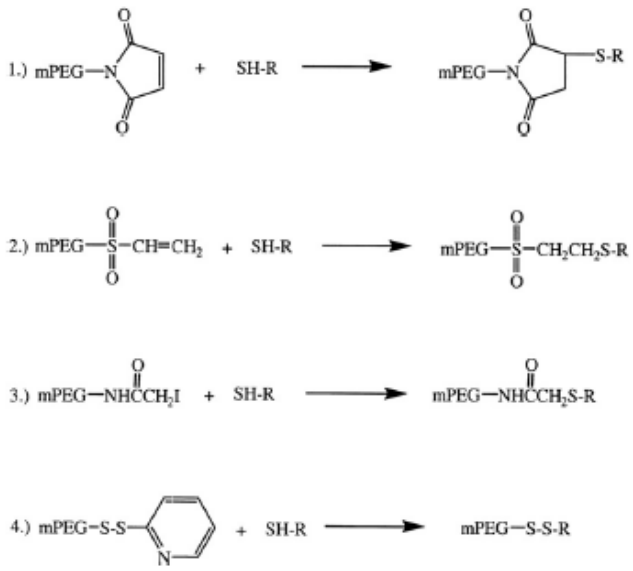


FIGURA 13 – PEGs tiol reativos.
1, PEG maleimida; 2, PEG vinilsulfona; 3, PEG iodoacetamida; 4, PEG ortopiridil dissulfeto. *Fonte:* ROBERTS *et al*., 2002.

O avanço da tecnologia da peguilação permitiu a criação de produtos de conjugação passíveis de hidrólise enzimática, tornando-a reversível (**FIGURA. 14**). O processo de peguilação aumenta o tempo de meia vida das proteínas, entretanto sua atividade é reduzida devido à introdução de PEG em regiões de relevância para atividade da proteína (ROBERTS *et al*., 2002). Esse problema foi solucionado por pesquisadores da empresa ENZON Pharmaceuticals (2002) que utilizaram o processo de peguilação reversível na molécula de interferon, o que permitiu o aumento do tempo de meia vida, acarretado pelo aumento do peso aparente, e manteve a potência do fármaco, já que o PEG adicionado era gradativamente hidrolisado liberando o interferon íntegro (KOZLOWSKI e HARRIS, 2002).

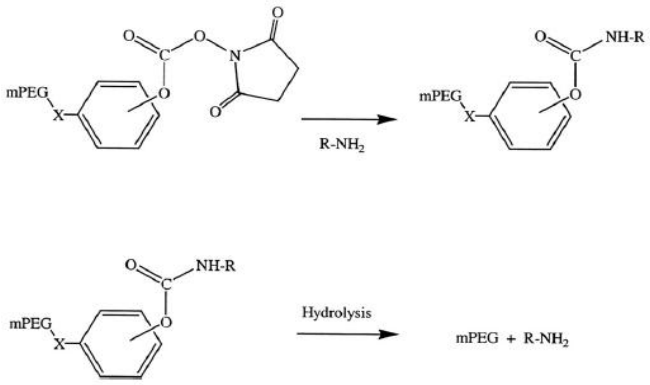


FIGURA 14 – Peguilação reversível.
Após a hidrólise enzimática, a molécula peguilada é liberada sem resquícios da conjugação. *Fonte:*: ROBERTS *et al., 2002.*

2.4 Determinação de colesterol HDL

Atualmente já é bem aceito que níveis elevados de cHDL atuam como fator de proteção para DAC (WARNICK *et al*., 2001). Entretanto, até a década de 1970 não havia grande interesse dos pesquisadores em estudar a potencial relação entre cHDL e DAC. Como o HDL é responsável pelo transporte de uma pequena fração do colesterol circulante, acreditava-se que essa lipoproteína não tivesse grande participação em processos patológicos; o que de certa maneira é curioso, porque Berr *et. al*. (1951) relataram que indivíduos saudáveis apresentam níveis de cHDL mais elevados que pacientes com DAC (CASTELLI *et al*., 1977). A mudança no papel do cHDL em relação a DAC ocorreu quando Castelli *et al.* (1977) apresentaram os resultados do primeiro grande estudo que evidenciou a relação inversa entre os níveis de cHDL e prevalência de DAC.

Com os resultados do estudo de Castelli *et. al*. (1977), aumentou-se o interesse na determinação de cHDL, o que resultou em elevação da demanda pela realização de exames clínicos laboratoriais para a determinação de cHDL e investimentos em novos métodos para quantificar cHDL (WARNICK *et al*., 2001).

Estudos recentes, como o realizado por Huang *et. al*. (2014), evidenciaram a participação da lipoproteína HDL na formação de ateroma e concluíram que a determinação da atividade de transporte de colesterol pela lipoproteína HDL é mais relevante do que seu conteúdo em colesterol. A quantificação de cHDL ainda é importante na avaliação de risco cardíaco, tendo em vista que é um parâmetro que consegue ser mensurado com facilidade em laboratórios de análises clínicas e que os achados realizados por Castelli *et. al*. (1977) ainda se aplicam à maioria das pessoas.

2.4.1 Determinação de colesterol total

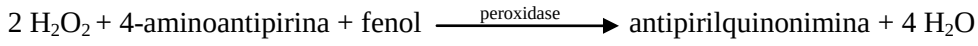
Até a proposição da determinação de colesterol sérico utilizando enzimas, feita por Allain *et al l*(1974); todos os métodos para determinação de colesterol baseavam-se na reação da molécula de colesterol com um ácido forte concentrado, que atua como agente oxidante, levando a formação de colestapilienos, que são compostos corados (ARRANZ *et al*., 1994). Um exemplo é o método desenvolvido por Pearson (1953), no qual se reage colesterol com ácido *p*-toluenosulfônico, na presença de ácido acético e ácido sulfúrico, levando à formação de produto corado cuja intensidade é proporcional à concentração de colesterol. Entretanto, por se tratar de uma reação de oxidação por um ácido forte, ocorrem reações colaterais com

moléculas semelhantes ao colesterol, o que leva à superestimação da colesterolemia (ARRANZ *et al*., 1994).

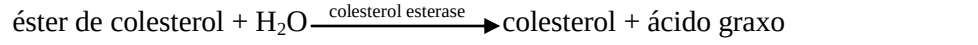
Atualmemte, o método comumente empregado para a determinação de colesterol sérico é o desenvolvido por Allain *et. al.* (1974), que consiste na utilização das enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase, na presença de surfactante não iônico. O sistema utiliza o surfactante não iônico para realizar abertura das lipoproteínas e exposição dos ésteres de colesterol e colesteróis livres. A enzima colesterol esterase catalisa a hidrólise do éster de colesterol e em seguida, a enzima colesterol oxidase promove a oxidação do colesterol livre e colesterol proveniente da hidrólise do éster levando à formação de colesterona e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado reage com fenol e 4-aminoantipirina, sob ação catalisadora da peroxidase, por meio de uma reação de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de colesterol. O sistema de quantificação de colesterol descrito acima é uma modificação do sistema para determinação de glicose desenvolvido por Trinder (1969).

O método criado por Trinder (1969) utiliza a enzima glicose oxidase para conversão da glicose em ácido glucônico e liberação de peróxido de hidrogênio. (**FIGURA 15**). Atualmente, as empresas produtoras de reagentes destinados a análises clínicas denominam os sistemas para determinação de concentração de substratos que utilizam o conjunto de enzimas oxidase/peroxidase como método Trinder - enzimático colorimétrico.

a)



b)



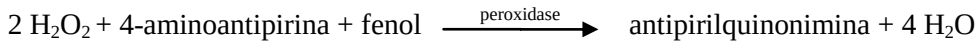


FIGURA 15 – Métodos enzimáticos para determinação de glicose e colesterol total.
a) método desenvolvido por Trinder (1969) para determinação de glicose; b) método desenvolvido por Allain *et. al*. (1974) para determinação de colesterol total.

2.4.2 Evolução dos métodos para determinação de cHDL

A determinação de cHDL teve sua grande expansão após a constatação da prevalência de DAC em pacientes com níveis reduzidos de cHDL, realizada por Castelli *et al* (1977). Os primeiros métodos para a determinação de cHDL eram demorados, com várias etapas e demandavam a utilização de ultracentrífugas. Novos métodos foram introduzidos, ao ponto que hoje, podemos dividi-los em três gerações: 1ª geração: métodos de precipitação; 2ª geração: métodos de precipitação automatizados; 3ª geração: ensaios homogêneos. Todas essas três gerações citadas têm em comum o fato de utilizarem, em algum momento do processo, o método para determinação de colesterol desenvolvido por Allain *et. al*. (1974) (WARNICK *et al*., 2001).

2.4.2.1 Determinação de cHDL por ultracentrifugação

A separação de lipoproteínas por ultracentrifugação é o método de referência para a determinação de cHDL. Como a ultracentrifugação permite a separação da lipoproteína do soro, é possível determinar o conteúdo de colesterol correspondente a cada classe de lipoproteína. O método baseia-se na diferença da densidade hidratada entre as lipoproteínas. Apesar das lipoproteínas apresentarem densidades hidratadas distintas, esses valores são muito próximos (quilomícron 0,94 g/mL; VLDL 0,94-1,006 mg/mL; LDL 1,006-1,063 g/mL e HDL 1,063-1,210 mg/mL) o que impede a utilização de centrífugas comuns para realizar a separação. O método utiliza brometo de potássio ou brometo de sódio para ajustar a densidade do soro para 1,063 mg/mL e em seguida é realizada a ultracentrifugação. As partículas de HDL formam uma faixa na porção inferior do tubo de centrífuga. A fração de HDL é recolhida, seguido por um processo de diálise para a remoção de sal e determinação da concentração de cHDL pelo método de Allain *et al*(1977) (WARNICK *et al*., 2001).

Esse método não é utilizado com frequência para a determinação de cHDL porque consome muito tempo, é laborioso e requer utilização de ultracentrífuga. Além disso, a elevada concentração de sal utilizada para correção de densidade do soro pode promover alteração na estrutura das lipoproteínas. Esse método é mais utilizado para a separação de lipoproteínas do plasma do que a determinação de concentração de colesterol nas lipoproteínas.

2.4.2.2 Determinação de cHDL – métodos de 1ª geração

Os métodos de 1ª geração (**Tabela 5**) baseiam-se na capacidade das lipoproteínas VLDL e LDL de se ligarem a poliânions (glicosaminoglicanos, polímeros sulfatados, heteropoliácidos) os quais na presença de cátions bivalentes formam complexos insolúveis, que podem ser removidos por simples centrifugação, deixando somente a lipoproteína HDL solúvel no sobrenadante. A determinação da concentração de colesterol no sobrenadante é realizada pelo método de Allain *et. al.* (1974).

Tabela 5 – 1ª geração: Métodos de precipitação de LDL e VLDL por poliânion e cátion bivalente

Poliânion/cátion	Desenvolvido por
Heparina – Mn^{++}	HAINLINE *et al*., 1952 e WARNICK; ALBERS, 1978.
Dextran sulfato – Mg^{++}	FINLEY *et al*., 1978 e WARNICK, BENDERSON, ALBERS, 1982.
Ácido fosfotúngstico – Mg^{++}	LOPES-VIRELLA, 1977.

Fonte: Adaptado WARNICK; NAUCK; RIFAI, 2001.

Os métodos de precipitação são simples e requerem poucos equipamentos, o que permitiu aos laboratórios de análises clínicas determinar a concentração de cHDL. Entretanto, o teste nesse formato ainda necessita passar por um processo de centrifugação, o que impede a total automação do processo e limita a quantidade de testes que podem ser realizados pelos laboratórios. Outro problema comum a esse método está relacionado à pacientes com valores elevados de trigliceridemia. Como os triglicérides são transportados principalmente por VLDL, essas lipoproteínas tornam-se mais abundantes no plasma e menos densas devidos à maior participação de lípides em sua constituição. Essa elevação na quantidade de VLDL, juntamente com a diminuição de sua densidade, dificulta a sua precipitação, levando à superestimação dos valores de cHDL (WARNICK, ALBERS, 1978).

2.4.2.3 Determinação de cHDL – métodos de 2ª geração

A 2ª geração de métodos para a determinação de cHDL foi desenvolvida para agilizar o tempo gasto na centrifugação da amostra. O método desenvolvido pela empresa Cortlandt Manor, NY, avaliado pelos pesquisadores Harris, Galpchian e Rifai (1996), utiliza dextran sulfato ligado a partículas magnéticas para facilitar a remoção das apoB-lipoproteínas

do meio reacional. Vários outros métodos foram criados, desde sistemas que utilizam frascos que continham a quantidade calculada de agentes precipitante e podem ser inseridos nos analisadores automáticos, até fitas reativas impregnadas com reagente. A grande dificuldade da aceitação desses métodos deve-se à necessidade de aquisição de equipamentos específicos para a realização dos ensaios (WARNICK *et al*., 2001).

2.4.2.4 Determinação de cHDL – métodos de 3ª geração

Os reagentes da 3ª geração são denominados homogêneos e têm como principal característica a capacidade de serem completamente automatizáveis. O termo homogêneo é baseado na convenção prévia utilizada na química clínica que descreve um imunoensaio que requer somente uma etapa. Os métodos homogêneos para a determinação de cHDL não requerem pré-tratamento ou separação, eliminando processos como pipetagem manual e centrifugação (WARNICK *et al*., 2001)

Os reagentes homogêneos utilizam diferentes técnicas para a segregação das apoB-lipoproteínas. Kakuyama, Kimura e Hashiguchi (1994) utilizaram anticorpos anti-ApoB para formar complexos com quilomícron, VLDL, LDL e bloquear a ação das enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase. Outro método desenvolvido pela empresa Daiichi, Inc. utiliza um poliânion sintético que agrega as apoB-lipoproteínas. Em seguida, um surfactante atua somente sobre as partículas de HDL, expondo seu conteúdo para ação das enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase. A ação de agregação do poliânion sintético foi avaliado em microscopia eletrônica de transmissão, que comprovou a sua ação somente sobre as apoB-lipoproteínas (**FIGURA 16**) (KONDO *et al*., 1999).

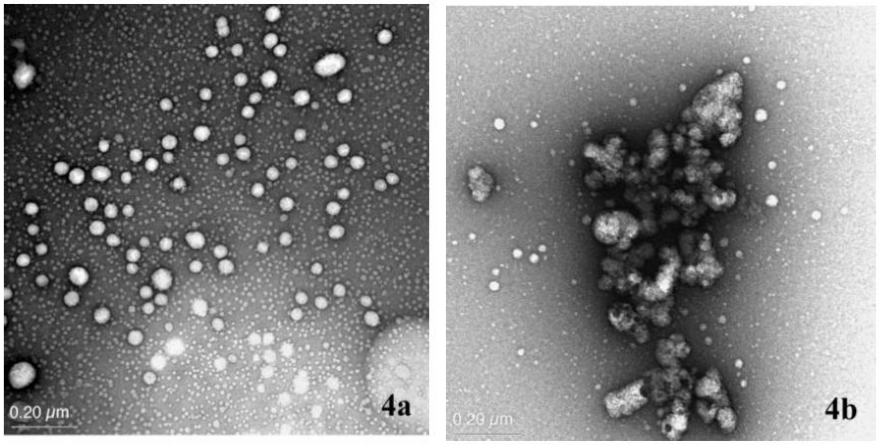


FIGURA 16 – Microscopia eletrônica da ação de agregação do poliânion sintético sobre HDL e VLDL.
Em 4a, o poliânion não consegue agregar partículas de HDL; 4b, o poliânion agrega partículas de VLDL. *Fonte*: KONDO *et al*., 1999.

Sugiuchi *et al*., (1995) demonstraram que α-ciclodextrina sulfatada associada a cátions magnésio era capaz de proteger as lipoproteínas LDL, VLDL e quilimícrons da ação das enzimas envolvidas no teste. Maior seletividade foi alcançada com a ligação covalente de PEG nas enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase. Outros métodos foram desenvolvidos na década de 90 e comercializados por diferentes empresas (**FIGURA 17**).

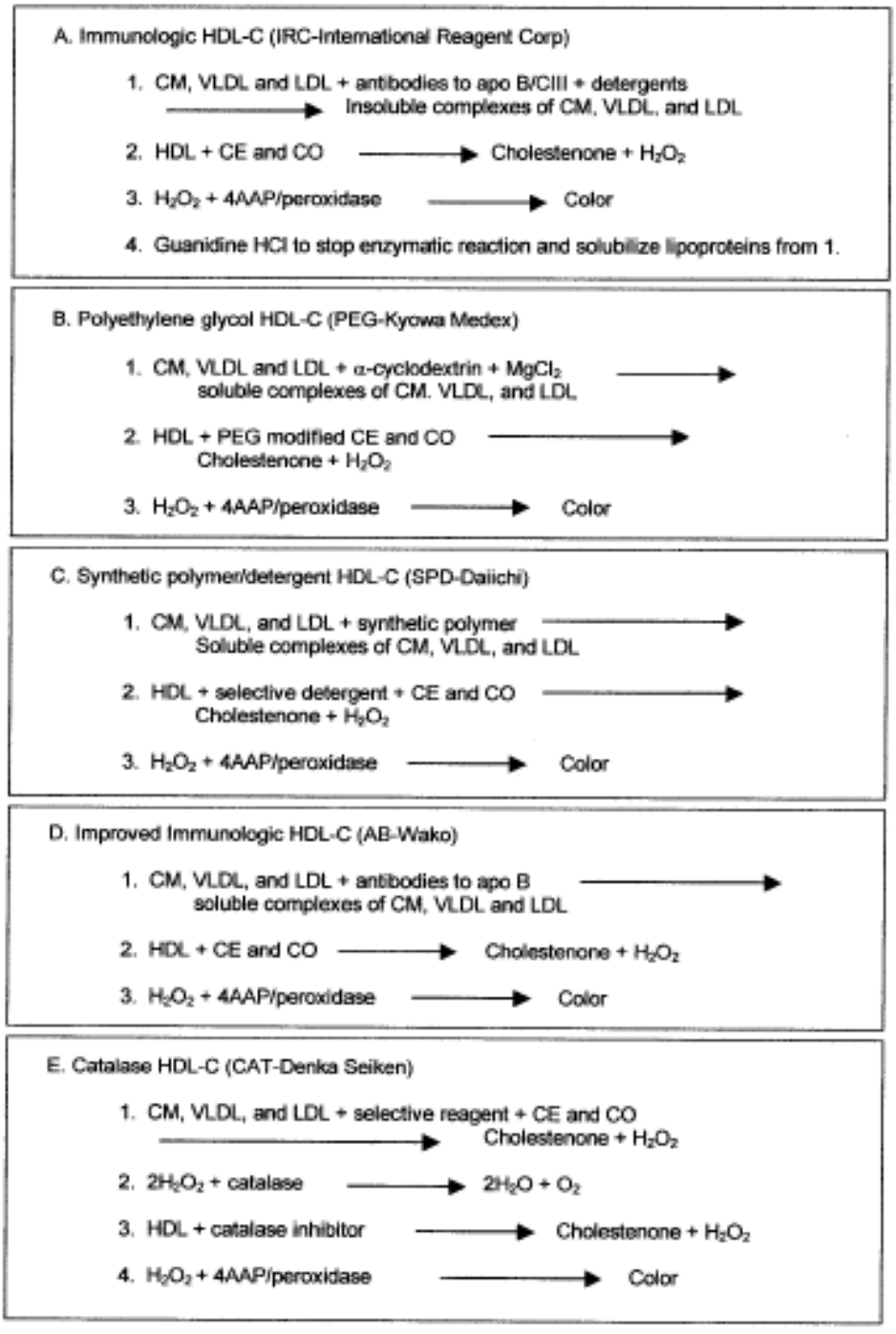


FIGURA 17 – Métodos homogêneos para determinação de cHDL.
Fonte: WARNICK *et al*., 2001

2.5 Calorimetria de Titulação Isotérmica

Técnica que mensura diretamente a mudança de entalpia em interações biomoleculares à temperatura constante; essa é a definição simplificada de Calorimetria de Titulação Isotérmica (em inglês: *Isothermal Titration Calorimetry* – ITC) (LADBURY e DOYLE, 2004).

Interações ligante-receptor, enzima-substrato, proteína-proteína, fármaco-receptor, inibidor-enzima, são algumas dentre as inúmeras possibilidades de interações que podem ser avaliadas pela ITC. (FREIRE *et al*., 1990).

2.5.1 Microcalorímetro de titulação isotérmica

O microcalorímetro de titulação isotérmica (**FIGURA 18**) é o instrumento que torna possível a mensuração da diferença de calor resultante das interações químicas. O equipamento é composto por um sistema diferencial de células dentro de uma manta termostatizada. As células são divididas em referência e de reação. A célula de referência é preenchida com água ou tampão, enquanto a célula de reação recebe a macromolécula ou ligante de interesse. O injetor realiza a adição da amostra na célula de reação o que leva às trocas de calor. Essas trocas originam-se da diluição do ligante, diluição da macromolécula além dos calores envolvidos na reação. O microcalorímetro faz a mensuração da diferença de potência elétrica necessária para que a temperatura da célula de reação seja igual à temperatura da célula referência. Essa medida é denominada potência diferencial (*Differential Power*-DP). Todo esse sistema é envolvido por um escudo adiabático, mantido em temperatura constante, que tem como função isolar o sistema do ambiente (LADBURY e DOYLE, 2004).

O DP é convertido em µcal/s. Todo esse processo é acompanhado por um termograma - µcal/s versus tempo. Quando ocorrem reações endotérmicas o microcalorímetro fornece calor à célula de reação para que as condições isotérmicas sejam mantidas, essa ação é demonstrada no termograma como uma deflexão positiva. Por outro lado, em reações exotérmicas o equipamento fornece menos calor à célula de reação, o que é representado no termograma como deflexão negativa. (**FIGURA 19**) (TODD e GOMEZ, 2011).

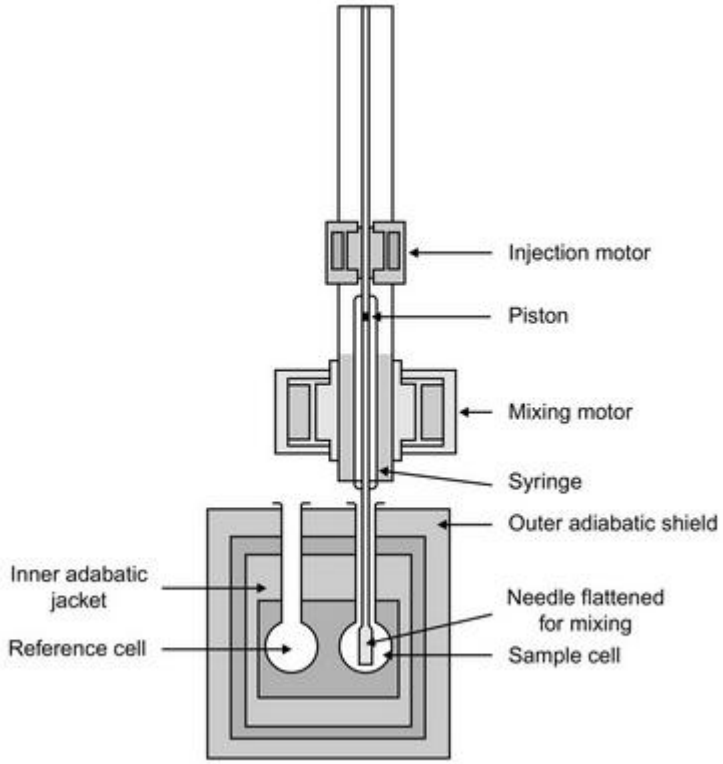


FIGURA 18 – Esquema básico de um microcalorímetro.
Fonte: MARTINEZ *et al*., 2013

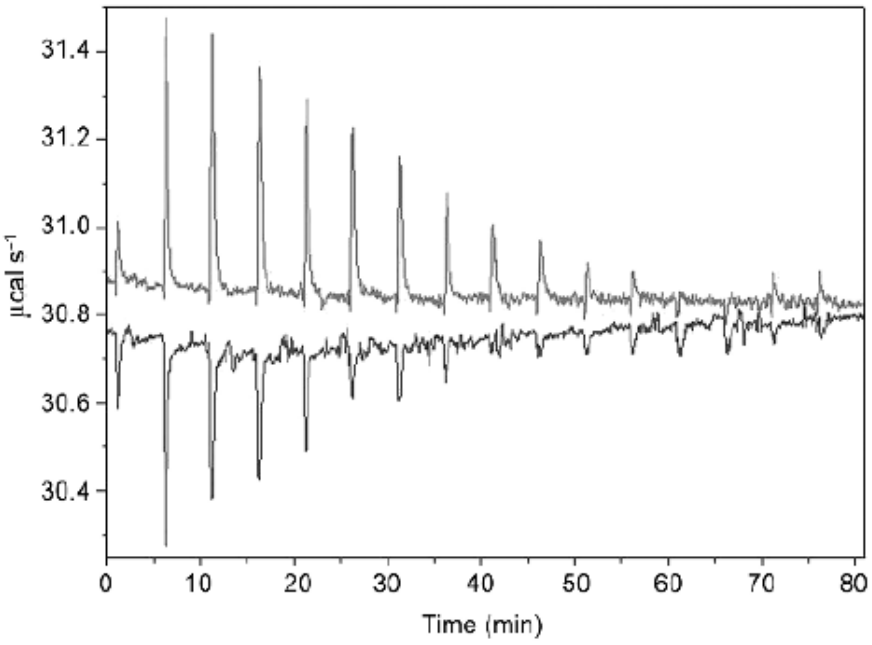


FIGURA 19 – Termograma de reações químicas.
Deflexões negativas correspondem a reações exotérmicas e deflexões positivas correspondem a reações endotérmicas. *Fonte*: LADBURY e DOYLE, 2004, p.44

2.5.2 Termodinâmica básica de calorimetria de titulação isotérmica

Basicamente, a calorimetria de titulação isotérmica utiliza-se da lei de conservação de energia para embasar a metodologia.

> *Energia não pode ser criada ou destruída, ela modifica-se e surge em forma de energia mecânica, energia térmica, energia eletroestática e outras*. (PRIVALOV, 2012)

Energia não pode ser medida diretamente, mas podemos quantifica-la pelas mudanças na sua forma de sua manifestação como calor (Q) e trabalho (W) (**Equação 1**)

$$\Delta E = Q + W \quad (1)$$

Em reações químicas, principalmente as que envolvem proteínas e modificações de estrutura proteica, o trabalho mecânico realizado está associado com as modificações de volume a pressão constante (**Equação 2**):

$$W = -P\Delta V \quad (2)$$

Fazendo a substituição da equação 2 na equação 1 temos (**Equação 3**):

$$\Delta E = Q - P\Delta V \quad (3)$$

Rearranjando a equação 3, temos (**Equação 4**):

$$Q = \Delta E - P\Delta V \quad (4)$$

A variação da entalpia pode ser definida como a variação do conteúdo de calor de um sistema e é representada pelo símbolo ΔH (**Equação 5**):

$$Q = \Delta H = \Delta E - P\Delta V \quad (5)$$

Como todas as reações que ocorrem no microcalorímetro não promovem variações consideráveis no volume e são realizadas a pressão constante, praticamente não há realização de trabalho e toda troca de energia resultante deve-se ao fluxo de calor. Sendo assim podemos assumir (**Equação 6**):

$$\Delta H = Q = \Delta E \quad (6)$$

2.5.3 Determinação de parâmetros cinéticos enzimáticos utilizando ITC

Williams e Toone (1993), Ladbury e Doyle (2004) e Todd e Gomez (2011) citam como principal vantagem da utilização da ITC para determinação de parâmetros cinéticos enzimáticos, a possibilidade de uso do substrato enzimático sem a necessidade de qualquer alteração em sua estrutura química. Métodos espectrofotométricos necessitam que os substratos consumidos ou produtos formados durante a reação enzimática absorvam luz dentro do espectro do ultravioleta e região do visível. Frequentemente isso não é possível, sendo necessária a utilização de substratos quimicamente modificados ou reações acopladas o que pode interferir na determinação dos parâmetros cinéticos enzimáticos. A necessidade de modificação química se estende a outras técnicas como fluorimetria, marcação radioativa e outros (LADBURY e DOYLE, 2004, p.19).

2.5.3.1 Determinação da entalpia aparente de reações catalisadas por enzimas

A determinação da entalpia aparente (ΔH_{app}) (**Equação 7**) é realizada a partir de uma única injeção do substrato enzimático, permitindo que o substrato seja completamente consumido. O calor total liberado pela reação é proporcional à concentração molar do substrato. O calor total da reação é determinado pela integração da área do calor envolvido na reação (**FIGURA 20**) (TODD; GOMEZ, 2011)

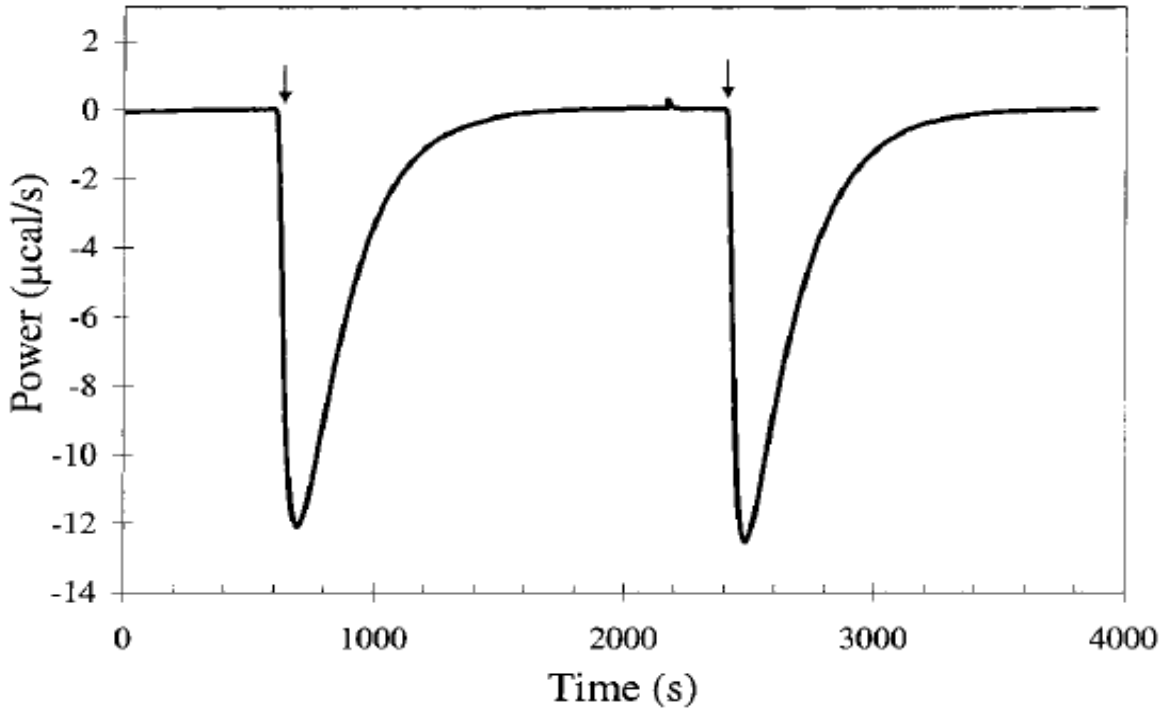


FIGURA 20 – Termograma de determinação de ΔH_{app}.
Termograma da reação de hidrólise de 700 nmol de ureia por urease. Após a injeção do substrato permite-se que ele seja todo consumido. Após a integração da área do pico determinou-se a ΔH_{app} da reação = -10,4 kcal/mol. As setas indicam o momento da adição do substrato. *Fonte*: Adaptado – TODD e GOMEZ, 2011

$$\Delta H_{app} = \frac{1}{[S]total \times V} \int_{t=0}^{t=\infty} \frac{dQ(t)}{dt}\, dt \qquad (7)$$

Determinação de ΔH_{app} . [S], concentração do substrato; V volume de solução na célula de reação; Q, calor; t, tempo. O calor total produzido pela catálise do substrato, $\int_{t=0}^{t=\infty} \frac{dQ(t)}{dt}\, dt$, dividido pela quantidade do substrato na célula de reação no microcalorímetro, $\frac{1}{[S]total \times V}$ resulta no ΔH_{app} da reação avaliada.

2.5.3.2 Determinação de constante de Michaelis-Menten, velocidade máxima e constante catalítica

Em um ensaio com injeções contínuas, sem permitir que o substrato seja todo consumido, é possível determinar a taxa reacional (mol/L·s) de formação de produto por concentração de substrato no meio. A partir desses dados é possível determinar constante de Michaelis-Menten (K_m), velocidade máxima (V_{max}) e constante catalítica (k_{cat}) (TODD e GOMEZ, 2011).

Henzler *et. al.* (2008) determinaram os parâmetros cinéticos para β-glucosidase imobilizada. Para a determinação de K_m foi realizado ensaio com múltiplas injeções do substrato (**FIGURA 21**). A velocidade máxima da reação foi alcançada quando se formou um platô no termograma e a adição de mais substrato não promoveu aumento do DP.

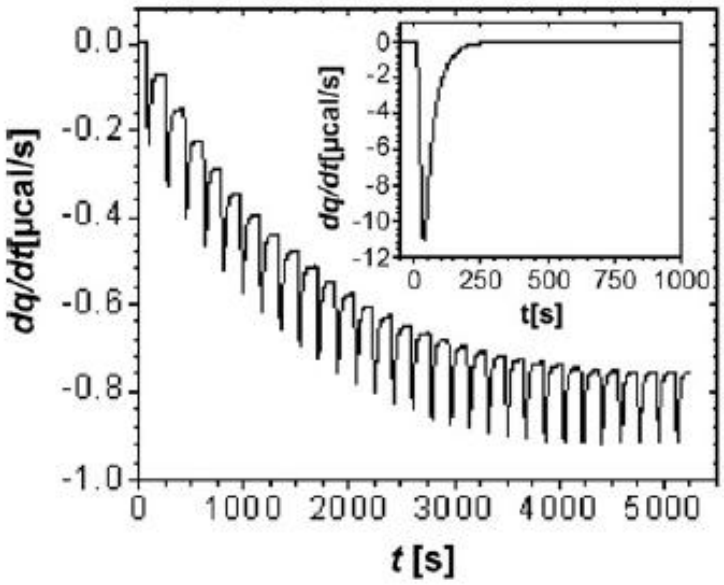


FIGURA 21 – Determinação de K_m para β-glucosidade.
Múltiplas injeções de substrato à célula de reação contendo a enzima. No canto superior direito, termograma da determinação de $\Delta H_{app.}$ *Fonte*: HENZLER *et al*., 2008

De posse do ΔH_{app} da reação é possível determinar a taxa reacional de formação de produto para cada injeção de substrato. Em que v é a taxa de formação do produto em mol/L·s^{-1} (**Equação. 8**).

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{V \cdot \Delta H_{app}} \cdot \frac{dq}{dt} \quad (8)$$

De posse desses dados é possível plotar uma curva de saturação enzimática, contendo a taxa de formação de produto versus concentração de substrato. Como o intervalo das injeções do substrato são curtas o suficiente para não permitir o consumo completo do substrato, ocorre acúmulo do substrato o que permite a enzima alcançar velocidade máxima (**FIGURA 22**) (TODD e GOMEZ, 2011).

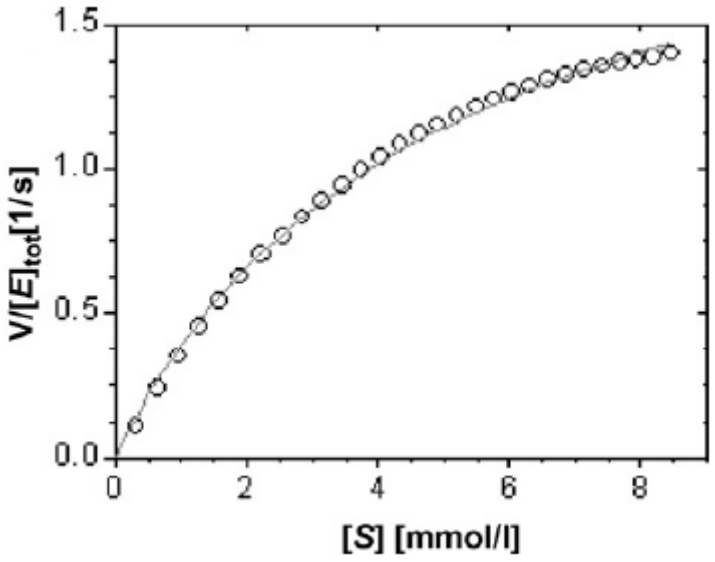


FIGURA 22 – Curva de saturação enzimática.
Velocidade inicial da reação dividido pela concentração de enzima versus concentração do substrato. FONTE: HENZLER *et al*., 2008

K_m e V_{max} podem ser obtidos por linearização dos dados obtidos no gráfico de saturação enzimática ou por utilização de regressão não linear (WILLIAMS e TOONE, 1993). k_{cat} é determinado pela equação, em que $[E_0]$, é a concentração total de enzima no experimento (**Equação. 9**):

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_0]} \quad (9)$$

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

- Definir o poliânion com maior capacidade de reduzir a interação das enzimas colesterol esterase peguilada e colesterol oxidase peguilada com as ApoB-lipoproteínas.
- Determinar K_m para enzimas colesterol esterase, colesterol oxidase, colesterol esterase peguilada e colesterol oxidase peguilada utilizando HDL, LDL e VLDL como substrato, pelo método de microcalorimetria de titulação isotérmica.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os poliânions: α-ciclodextrina sulfatada, ácido fosfotúngstico, dextran sulfato, sulfato de condroitina e sacarose octasulfato e definir qual destes promove a maior inibição relativa da atividade enzimática de CE e ChOx sobre as lipoproteínas LDL e VLDL, utilizando o reagente proposto por Sugiuchi *et al.* (1955).

- Determinar por espectrofotometria, a inibição relativa da atividade enzimática de CE e ChOx conjugadas com PEG e associadas com o poliânion que promoveu maior inibição da atividade para LDL e VLDL.
- Determinar por ITC a entalpia aparente de reação para a reação catalisada por CE e ChOx, nativas e peguilada, utilizando HDL, LDL e VLDL como substrato.
- Determinar por ITC o K_m para CE e ChOx, nativas e peguilada, utilizando HDL, LDL e VLDL como substratos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Separação de lipoproteínas por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade

O método de separação de lipoproteínas por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade desenvolvido por Chung *et al.* (1980) permite a separação de HDL, LDL e VLDL do soro em um único ensaio. O método consiste em criar um gradiente descontínuo de densidade com intervalo entre 1,006 e 1,3 $g \cdot dL^{-1}$ utilizando cloreto de sódio e cloreto de bário. O soro tem a sua densidade ajustada para 1,3 $g \cdot dL^{-1}$ por meio da adição de cloreto de bário. Uma segunda solução de cloreto de sódio 0,9% p/v com densidade de 1,006 $g \cdot dL^{-1}$ é adicionada sobre o soro com densidade ajustada formando um sistema bifásico. Durante a ultracentrifugação, o gradiente de densidade descontínuo é formado. As lipoproteínas são separadas em três faixas, sendo HDL, com densidade hidratada de 1,063-1,21 $g \cdot dL^{-1}$, (faixa situada mais próxima ao fundo do tubo); LDL densidade hidratada 1,019 - 1,063 $g \cdot dL^{-1}$, (faixa situada no meio do tubo) e VLDL densidade hidratada de 0,095 - 1,006 $g \cdot dL^{-1}$ (banda é situada na porção superior do tubo) (CHUNG *et al*., 1980).

4.1.1 Materiais

a) Ultracentrífuga Sorval® - Ultra Pro 80
b) Rotor de ângulo fixo, capacidade 10 tubos 10,0 mL - Sorval ®
c) Tubo de ultracentrífuga de policarbonato, capacidade 7 mL
d) Cloreto de Bário Padrão Analítico (KBr) – Synth ®
e) Cloreto de Sódio Padrão Analítico (NaCl) – Synth ®
f) Seringa 1,0 mL
g) Soro Humano
h) Membrana para diálise 12-14 kDa – Sigma Aldrich Co. LLC
i) Tampão Fosfato 10 mM pH 7,0+ NaCl 0,9% p/v
j) Microtubo 0,5 mL

4.1.2 Procedimento experimental

4.1.2.1 Ajuste de densidade do soro humano

1. Preparar *pool* de soro humano a partir da junção de soros coletados de dez doadores saudáveis em jejum de 12 horas.
2. Adicionar 0,3 g de brometo de potássio (KBr) para cada mililitro de *pool* de soro para ajustar a densidade do soro para 1,3 g•dL^{-1}.
3. Transferir 3,0 mL de *pool* de soro com densidade ajustada para um tubo de ultracentrifugação com capacidade para 10 mL.
4. Adicionar, vagarosamente, 7,0 mL de solução NaCl 0,9% p/v sobre o *pool* de soro humano.

4.1.2.2 Ultracentrifugação em rotor de ângulo fixo

Transferir os tubos cuidadosamente para o rotor evitando que o *pool* de soro misture-se com a solução de NaCl 0,9%.

Tabela 6 - Protocolo de ultracentrifugação

Velocidade	65.000 rpm
Duração	2,0 horas
Tempo de parada	0,5 hora
Temperatura	10 ºC

Após a finalização da ultracentrifugação, coletar as três bandas de lipoproteínas separadamente, com auxílio de seringa.

Observação: Utilizar uma seringa por faixa de lipoproteína.

4.1.2.3 Diálise e armazenamento

1. Transferir as lipoproteínas para membranas de diálise 12-14 kDa.
2. Realizar a diálise por 24 horas entre 2-8 ºC em 4,0 L tampão fosfato 10 mmol·L^{-1} pH 7,0 + 0,9 p/v NaCl. Trocar o tampão a cada 8 horas.
3. Aliquotar as lipoproteínas em criotubos devidamente identificados e armazenar a -80ºC.

4.2 Determinação do conteúdo químico e proteico das lipoproteínas

As classes das lipoproteínas foram avaliadas quanto ao seu conteúdo de colesterol total, colesterol livre, colesterol esterificado, Apolipoproteína A1 e Apolipoproteína B100.

Para determinação de colesterol e triglicérides foram utilizados reagentes enzimático-colorimétricos descritos no item 4.2.1. Para determinação do colesterol livre o reagente utilizado para determinação total de colesterol foi produzido sem a enzima colesterol esterase, assim, somente o colesterol livre participa na reação de Trinder (CARR, 1993). O colesterol esterificado (quantificado como linoleato de colesterila) é determinado pela diferença entre colesterol total e colesterol livre. Para a quantificação das Apolipoproteínas A1 e B100 foram utilizados testes imunoturbidimétricos, referenciados no item 4.2.1.

4.2.1 Materiais

a) Triglicérides Liquiform, Ref. 84 – Labtest Diagnóstica SA
b) Colesterol Liquiform, Ref.139 – Labtest Diagnóstica SA
c) Reagente para determinação de colesterol livre
d) Apo A1Turbiquest, Ref. 381 – Labtest Diagnóstica SA
e) Apo B Turbquest, Ref. 382– Labtest Diagnóstica SA
f) Analisador automático – Labmax 240 – Labtest Diagnóstica SA

4.2.2 Procedimento experimental

1. Utilizar os reagentes conforme indicação do fabricante e em conjunto com as amostras controles.
2. Realizar testes em triplicata utilizando o analisador automático Labmax 240 – Labtest Diagnóstica.
3. Determinar concentração de colesterol esterificado calculando a diferença entre a concentração de colesterol total e a concentração de colesterol livre (**Equação 10**).

$$colesterol\ esterificado\ (mM) = colesterol\ total\ (mM) - colesterol\ livre\ (mM) \quad (10)$$

4.3 Estudo enzimático colorimétrico e seleção de poliânion

4.3.1 Reagente enzimático-colorimétrico

O estudo de atividade enzimática para CE e ChOx foi realizado com uma modificação do reagente desenvolvido por Sugiuchi *et al.* (1995). As diferenças encontram-se na ausência de poliânion e a troca do agente cromógeno *N*-etil-*N*-(3-metil fenil)-*N*'-succinil etilenodiamina (EMSE) por fenol (Tabela 7). O poliânion α-ciclodextrina sulfatada e dextran sulfato foram removidos para possibilitar a adição de outros poliânions.

O reagente é constituído por duas soluções, denominadas PARTE 1 e PARTE 2 (Tabela 7). Na PARTE 1 foi adicionado o poliânion e na PARTE 2 foram adicionadas as enzimas. Essa divisão permite que a amostra interaja primeiro com os poliânions e em seguida, somente após a adição da PARTE 2, ocorra a interação com as enzimas.

4.3.1.1 Materiais

a) Reagente enzimático-colorimétrico.

Tabela 7 – Composição do reagente enzimático colorimétrico.

PARTE 1	PARTE 2
• Tampão ácido 3-(*N*-morfolino) propanosulfônico pH 7,0 - 30 mmol·L^{-1} *(Research Organics Inc.)*	• Tampão ácido 3-(*N*-morfolino) propanosulfônico pH 7,0 - 30 m mol·L^{-1} *(Research Organics Inc.)*
• Fenol - 22 mmol·L^{-1} (*Synth ®)*	• 4-Aminoantipirina - 2,4 m mol·L^{-1} *(Sorachim Co)*
• Cloreto de Magnésio - 2,0 mmol·L^{-1} *(Sigma-Aldrich Co.LLC)*	• Colesterol Oxidase - 5 kU/L *(Roche Ltd)*[2]
• Poliânion[1]	• Colesterol Esterase - 1 kU/L (*Roche Ltd)*[2]
	• Peroxidase - 30 kU/L (*Roche Ltd*)

[1] Os poliânions e suas respectivas concentrações utilizadas estão descritos no item 3.3.3.
[2] As especificações do fornecedor para colesterol esterase e colesterol oxidase estão nos Apêndices 1 e 2.

b) Espectrofotômetro: Biochrom ® Libra S22 UV/VIS.

c) Banho termostatizado

4.3.1.2 Procedimento experimental

Tabela 8 – Procedimento para realização dos testes espectrofotométricos.

Procedimento:	
1º passo-	Pipetar 1,0 mL de reagente - PARTE 1 + 0,02 mL de amostra e homogeneizar.
2º passo-	Aquecer a mistura por 5 minutos a 37 ºC em banho-maria.
3º passo-	Adicionar 0,25 mL de reagente PARTE 2 à mistura, homogeneizar e transferir para espectrofotômetro.
4º passo-	Mensurar o incremento da absorbância em 505 nm. Acompanhar cinética de reação por 10 minutos.

4.3.2 Seleção de poliânions

Sulfato de condroitina (**FIGURA 23**) consiste de uma mistura de polímeros, sulfato de condroitina A, que possui um grupo sulfato ligado ao carbono 4 da *N*-acetilgalactosamina , e sulfato de condroitina C, que possui um grupo sulfato ligado ao carbono 6 da *N*-acetilgalactosamina (LINDAHL e HOOK, 1978).

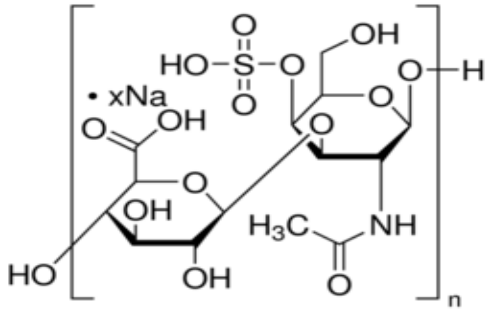


FIGURA 23 - Sulfato de Condroitina A

Ácido fosfotúngstico é um composto inorgânico da classe dos heteropoliácidos com formula molecular $H_3PW_{12}O_{40}$.

Heteropoliácidos constituem uma classe especial dos polioxometalatos. Normalmente um ânion central (fosfato, silicato, ou borato) encontra-se no centro de um poliedro, cujas arestas são compostas por óxidos de metais de transição (JOSÉ e PRADO, 2005).

α-ciclodextrina sulfato (**FIGURA 24**) é um oligossacarídeo cíclico composto por seis unidades de D-glucopiranose, na qual parte de seus grupos hidroxila está substituída por grupos sulfato (SUGIUCHI *et al*, 1995).

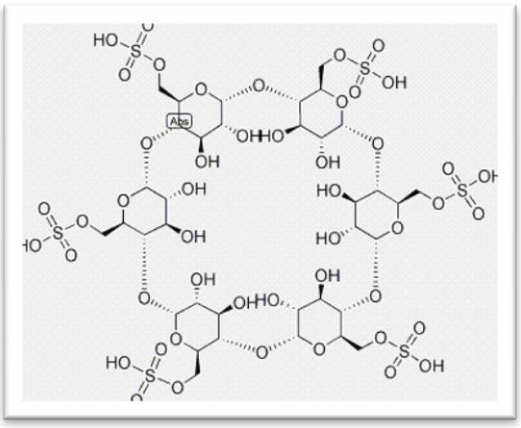


Figura 24 - α-ciclodextrina sulfato

Sacarose octassulfato (fórmula molecular: $C_{12}H_{14}Na_8O_{35}S_8$) é um dissacarídeo formado pela ligação glicosídica entre uma glicose e uma frutose, que possui todos os grupos hidroxilas substituídos por grupos sulfato (**FIGURA 25**). A molécula apresenta 8 grupos sulfato cada um com uma carga negativa. Dextran sulfato (**FIGURA 26**) é um polímero composto por unidades de glicose ligadas entre si por ligações glicosídicas. As hidroxilas são substituídas por grupos sulfato. Ambas as substancias apresentam várias cargas negativas em sua estrutura, o que caracterizam essas moléculas como poliânions com capacidade de interação com resíduos de lisina e arginina de LDL e VLDL (MAHLEY, 1984).

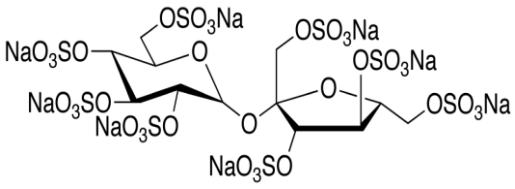


FIGURA 25 - Sacarose Octassulfato

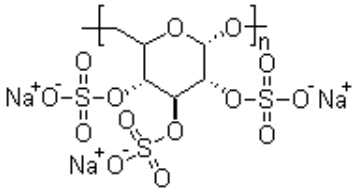


FIGURA 26 - Dextran Sulfato

4.4 Materiais

a) Poliânions

Tabela 9 - Poliânions

Poliânion - Fornecedor	Massa Molar/Unidade de massa
• Sulfato de Condroitina – *Carbosynth Ltd*	• Não aplicável
• Ácido Fosfotúngstico P.A.- *Synth*	• 2880,2 g/mol
• α-Ciclodextrina Sulfato - sal sódico hidratado – *Sigma Aldrich Co. LLC*	• 10373 g/mol
• Sacarose Octassulfato de sódio – *Carbosynth Ltd*	• 1158,7 g/mol
• Dextran Sulfato – *Sigma Aldrich Co. LLC*	• 500 kDa

b) Reagente enzimático-colorimétrico – item 4.3.1.

c) Espectrofotômetro: Biochrom ® Libra S22 UV/VIS

d) Analisador automático Labmax 240 – Labtest Diagnóstica SA.

e) Banho-maria termostatizado

4.4.1 Procedimento experimental

1. Adicionar à PARTE 1 do reagente enzimático-colorimétrico diferentes quantidades do poliânion que será avaliado.
   a) Sulfato de condroitina: 0,00%; 0,05%; 0,10%; 0,25% e 0,50% p/v
   b) Ácido fosfotúgstico: 0,00; 0,75; 1,50; 2,25 e 7,50 $mmol \cdot L^{-1}$
   c) Sacarose octassulfato: 0; 1; 2; 4 e 6 $mmol \cdot L^{-1}$
   d) Sacarose octassulfato + dextran sulfato 500 kDa [0,05% p/v]: 0; 1 e 6 $mmol \cdot L^{-1}$
   e) α-ciclodextrina sulfato: 0,0; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 $mmol \cdot L^{-1}$
   f) α-ciclodextrina sulfato + dextran sulfato 500 kDa [0,05% p/v]: 0,00; 0,75; 1,50; 2,25 e 7,50 $mmol \cdot L^{-1}$
2. Medir o pH do reagente 1, corrigir para pH 7,0 a 25 ºC com solução de hidróxido de sódio 10 $mol \cdot L^{-1}$, se necessário.
3. Ensaiar as lipoproteínas separadas do pool de soro utilizando o protocolo de utilização do Reagente enzimático colorimétrico.
4. Determinar a atividade residual causada pela inibição da reação devido à presença do poliânion em relação à reação sem poliânions, de acordo com procedimento 4.3.1.2.

$$Atividade\ residual\ (\%) = \frac{ABS\ da\ reação\ na\ presença\ do\ poliânion}{ABS\ da\ reação\ sem\ poliânion} \times 100 \quad (11)$$

5. Definir qual poliânion e em qual concentração ocorreu a maior inibição da reação das enzimas CE e ChOx com as frações contendo LDL e VLDL.
6. Após realizar a peguilação das enzimas CE e ChOx (item 4.5), repetir ensaio com enzimas CE e ChOx peguiladas com o poliânion definido no item 5 e determinar a atividade residual. Utilizar analisador automático.
   a. Protocolo analisador automático: Labmax 240
      1. Comprimento de onda: 505 nm
      2. Volume de reagente 1: 200 μL
      3. Volume de reagente 2: 50 μL
      4. Volume de amostra: 4 μL
      5. Ciclos de leitura: *Main* 53-54 / *Sub*: 33-34
      6. Tipo de calibração: Fator
      7. Fator: 10000

4.5 Conjugação com monometoxipolietilenoglicol succinimidil carbonato

A conjugação com polietilenoglicol deve ser realizada em meio aquoso alcalino tamponado (pH 8,5) para aumentar o número de resíduos de lisina e arginina desprotonados. O agente tamponante não deve possuir aminas primárias ou secundárias que possam competir com os resíduos de aminoácidos na reação de conjugação com monometoxipolietilenoglicol succinimidil carbonato (mPEG-NHS). O mPEG-NHS, em meio aquoso, apresenta um tempo de meia vida curto o que impede o seu armazenamento em solução aquosa. A adição do mPEG funcionalizado deve ser realizada diretamente sobre a solução alcalina contendo as proteínas de interesse (dados do fornecedor NANOCS®)

4.5.1 Materiais

a) mPEG-NHS 5 kDa – *NANOCS Inc*
b) mPEG-NHS 10 kDa – *NANOCS Inc*
c) Tampão HEPES 100 mM – pH 8,5, pH corrigido com solução hidróxido de sódio 10M.
d) Colesterol esterase - 134,9 U/mg de pó liofilizado - *Roche Ltd*

e) Colesterol Oxidase - 16.1 U/mg de pó liofilizado - *Roche Ltd*
f) Microtubo de poliestireno com tampa – *Sarstedt AG & Co*

4.5.2 Procedimento experimental

1. Adicionar 4050U da enzima colesterol esterase em 3,0 mL tampão HEPES 100 mmol·L^{-1} - pH 8,5 e homogeneizar até completa solubilização. Aliquotar a solução em três microtubos, contendo volumes iguais da solução e identificar. Denominar tubos 1, 2 e 3.
2. Solubilizar 1200 U da enzima colesterol oxidase em 3,0 mL tampão HEPES 100 mmol·L^{-1} – pH 8,5. Aliquotar a solução em três microtubos, contendo volumes iguais da solução e identificar. Denominar tubos 1, 2 e 3.
3. Adicionar, sob agitação constante, mPEG NHS 5 kDa e 10 kDa às soluções de enzimas CE e ChOx conforme indicado na **Tabela 10**.

Tabela 10 – Massa de mPEG-NHS 5 kDa e 10 kDa acionado à CE e ChOX.

Microtubo com solução de enzimas	**PEG succinimidil carbonato**	
	mPEG-NHS 5 kDa	*mPEG-NHS 10 kDa*
Microtubo 1 – Sol. CE	83,3 mg (16,7 µmol)	-
Microtubo 2 – Sol CE	-	166,6 mg (16,7 µmol)
Microtubo 1 – Sol. ChOx	8,3 mg (1,7 µmol)	-
Microtubo 2 – Sol. ChOx	-	16,6 mg (1,7 µmol)

4. Após a adição do PEG-NHS, manter os microtubos sob agitação constante durante 30 minutos.

4.5.2.1 Determinação do grau de conjugação com mPEG-NHS

A ninidrina reage com aminas primárias formando um composto corado que absorve luz em 570 nm. Como o mPEG-NHS liga-se principalmente aos resíduos de lisina, arginina e grupos n-terminais, as aminas primárias que reagem com o mPEG-NHS não ficam disponíveis para reagir com a ninidrina. A determinação da quantidade de aminas primárias disponíveis antes e após a conjugação permite quantificar o grau de conjugação com mPEG-NHS.

Para o branco da reação foi elaborado uma solução de *N*-hidroxisuccinimida, para simular a *N*-hidroxisuccinimida liberada no meio após a conjugação com mPEG-NHS.

4.5.2.2 Materiais

a) Ninhydrin Reagent Cod. N7285 - *Sigma-Aldrich Co. LLC*
b) Solução de *N*-hidroxisuccinimida 16,7 mM – *Sigma-Aldrich Co. LLC*
c) Etanol P.A. – *Synth* ®
d) Espectrofotômetro: Biochrom ® Libra S22 UV/VIS
e) Solução de enzimas TUBO 3 - CE e TUBO 3 - ChOx elaboradas no item 4.3.2.
f) Solução de enzimas peguiladas 4.5.2
    a. CE-PEG 5 kDa
    b. ChOx-PEG 5 KDa
    c. CE-PEG 10 kDa
    d. ChOx-PEG 10 KDa

4.5.2.3 Procedimento experimental

O protocolo para determinação do grau de conjugação das enzimas encontra-se detalhado na Tabela 11.

Tabela 11 – Procedimento para determinação do grau de conjugação com mPEG-NHS

	Amostras								
	Água Branco	**Branco (NHS 16,7 mmol·L^{-1})**	**Branco (NHS 1,7 mmol·L^{-1})**	**CE-PEG 5 kDa (TUBO 1)**	**ChOx-PEG 5 kDa (TUBO 1)**	**CE-PEG 10 kDa (TUBO 2)**	**ChOx-PEG 10 kDa (TUBO 2)**	**CE (TUBO 3 – Enzima nativa)**	**ChOx (TUBO 3 Enzima nativa)**
Amostra	100 µL	100 µL	10 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Reagente Ninidrina 2%	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
Água	300 µL	300 µL	390 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL
	Aquecer a 100 ºC por 10 minutos.								
Etanol	900 µL	900 µL	900 µL	900 µL	900 µL	900 µL	900 µL	900 µL	900 µL
	Realizar medição de absorbância no espectrofotômetro, 570 nm.								

Cálculo de grau de conjugação

$$grau\ de\ conjgação\ (\%) = \left[1 - \left(\frac{ABS\ Enzima\ Peguilada - ABS\ Branco\ NHS}{ABS\ Enzima\ Nativa - ABS\ Branco\ água}\right)\right] \times 100 \quad (12)$$

4.6 Determinação de variação de entalpia aparente de reação – ITC

4.6.1 Materiais

a) Microcalorímetro MicroCal™ VP-ITC
b) Desgaseificador a vácuo – MicroCal™ TermoVac
c) Lipoproteínas HDL, LDL e VLDL separadas do pool de soro
d) Tampão Fosfato Monobásico Sódio 10 mmol·L^{-1} , ajustado para pH 7,0 com solução de Hidróxido de Sódio 10 M + NaCl 0,9% p/v (tampão fosfato salina)
e) Solução de CE - 20 kU/L em tampão fosfato 10 mmol·L^{-1} pH 7,0+ NaCl 0,9% p/v
f) Solução de ChOx - 20 kU/L (nominal) em tampão fosfato 10 mmol·L^{-1} pH 7,0 + NaCl 0,9% p/v
g) Solução de CE-PEG – 10 kDa - 20 kU/L em tampão fosfato 10 mmol·L^{-1} pH 7,0 + NaCl 0,9% p/v
h) Solução de ChOx-PEG 10 kDa (nominal) - 20 kU/L em tampão fosfato 10 mM pH 7,0 + NaCl 0,9% p/v
i) Softwear OriginPro© 8.0 - OriginLab

4.6.2 Procedimento experimental

1. Desgaseificar as amostras e soluções de enzimas durante 5 minutos a 25 ºC utilizando o MicroCal™ TermoVac.
2. Executar o esquema para a realização dos experimentos descritos nas **Tabelas 12** e **13**.

Tabela 12 - Parâmetros constantes utilizados no microcalorímetro para determinação de ΔH_{app}

Parâmetros constantes para determinação de ΔH_{app}	
Parâmetros experimentais	
# totais injeções	2
Temperatura da célula	37 ºC
Reference Power (µcal/s)	30
Intervalo inicial (seg.)	120
Velocidade de agitação	310
Parâmetros de injeção	
1# Injeção/Intervalo	1 µL/150s

Tabela 13 - Protocolos e parâmetros variáveis utilizados no microcalorímetro para determinação de ΔH_{app}

Protocolos e parâmetros variáveis utilizados no microcalorímetro para determinação de ΔH_{app}				
	Colesterol Esterase	**Colesterol Esterase - PEG**	**Colesterol Oxidase**	**Colesterol Oxidase - PEG**
Injetor	*Ensaio:* Lipoproteína de interesse *Branco de reação:* Lipoproteína de interesse	*Ensaio:* Lipoproteína de interesse *Branco de reação:* Lipoproteína de interesse	*Ensaio:* Lipoproteína de interesse *Branco de reação:* Lipoproteína de interesse	*Ensaio:* Lipoproteína de interesse *Branco de reação:* Lipoproteína de interesse
Célula de amostra	*Ensaio:* Solução de CE 20kU/L *Branco de reação:* Tampão fosfato salina	*Ensaio:* Solução de CE-PEG 20kU/L *Branco de reação:* Tampão fosfato salina	*Ensaio:* Solução de ChOx 20kU/L *Branco de reação:* Tampão fosfato salina	*Ensaio:* Solução de ChOx-PEG 20kU/L *Branco de reação:* Tampão fosfato salina
Volume 2# injeção	HDL: 10 µL LDL: 40 µL VLDL: 40 µL	HDL: 10 µL LDL: 40 µL VLDL: 40 µL	HDL: 10 µL LDL: 40 µL VLDL: 40 µL	HDL: 10 µL LDL: 40 µL VLDL: 40 µL
Duração da reação	1200 s	1200 s	1200 s	1200 s

3. Integrar as deflexões do termograma ocasionadas pela catálise das reações de hidrólise de lipídeos, oxidação do colesterol livre e brancos de reação. Utilizar OriginPro 8.0.
4. Deduzir a quantidade de calor referente ao branco de reação das reações catalisadas pelas enzimas.
5. Normalizar os resultados para kcal/mol de linoleato de colesterila, utilizando **Equação. 7**.
6. Realizar os experimentos em duplicata.

4.7 Determinação da constante de Michaelis-Menten

Durante a execução dos testes para determinação de entalpia aparente, não foi possível determinar a entalpia de reação para a enzima ChOx e interações de VLDL com CE. Como consequência a determinações de K_m foram realizadas somente para CE utilizando HDL e LDL provenientes do pool de soro como substratos.

4.7.1 Materiais

a) Microcalorímetro MicroCal™ VP-ITC
b) Desgaseificador a vácuo – MicroCal™ TermoVac
c) Lipoproteínas HDL, LDL provenientes do pool de soro
d) Tampão Fosfato 10 mmol·L^{-1} pH 7,0 + NaCl 0,9% p/v (tampão fosfato salina)
j) Solução de CE - 20 kU/L em tampão fosfato 10 mmol·L^{-1} pH 7,0 + NaCl 0,9% p/v
k) Solução de CE-PEG - 10 kDa - 20 kU/L (nominal) em tampão fosfato 10 mmol·L^{-1} pH 7,0 + NaCl 0,9% p/v
l) Softwear OriginPro© 8.0 - OriginLab
e) Softwear GraphPad© Prism 5.03 – GraphPad software, Inc.

4.7.2 Procedimento experimental

1. Desgaseificar as amostras e soluções de enzimas durante 5 minutos a 25 ºC utilizando o MicroCal™ TermoVac.
2. Executar o esquema para a realização dos experimentos descritos nas **Tabelas 14** e **15**.

Tabela 14 - Parâmetros constantes utilizados no microcalorímetro para determinação de K_m

Parâmetros constantes para determinação de K_m	
Parâmetros experimentais	
# totais injeções	21
Temperatura da célula	37 ºC
Reference Power (µcal/s)	30
Intervalo inicial (seg.)	120
Velocidade de agitação	310
Parâmetros de injeção	
1# Injeção/Intervalo	1 µL/150 s

Tabela 15 - Protocolos e parâmetros variáveis utilizados no microcalorímetro para determinação de K_m

	Colesterol Esterase	**Colesterol Esterase - PEG**
Injetor	*Ensaio:* Lipoproteína de interesse	*Ensaio:* Lipoproteína de interesse
	Branco de reação: Lipoproteína de interesse	*Branco de reação:* Lipoproteína de interesse
Célula de amostra	*Ensaio:* Solução de CE 20 kU/L	*Ensaio:* Solução de CE-PEG 20 kU/L
	Branco de reação: Tampão fosfato salina	*Branco de reação:* Tampão fosfato salina
Volume das demais injeções	HDL: 5 µL LDL: 5 µL	HDL: 5 µL LDL: 5 µL
Intervalo entre cada injeção	60 s	60 s

3. Integrar as deflexões do termograma ocasionadas pela catálise das reações de hidrólise de lipídeos, oxidação do colesterol livre e brancos de reação. Utilizar OriginPro© 8.0.
4. Deduzir a quantidade de calor referente ao branco de reação das reações catalisadas pelas enzimas.
5. Determinar a velocidade de reação em µmol/L·min, normalizando os resultados pela concentração de linoleato de colesterila na célula de amostra.

6. Construir gráfico de cinética enzimática para as reações de CE e CE-PEG, utilizando a **Equação 8** para cálculo de taxa de catálise do substrato

.

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{V \cdot \Delta H_{\text{app}}} \cdot \frac{dq}{dt} \quad (8)$$

7. Determinar K_m por meio de linearização (**Equação 13**) dos dados do gráfico de cinética enzimática, utilizando a equação de Lineweaver- Burk. Utilizar GraphPad© Prism para aplicar fator de pesos estáticos $1/x^2$ para as curvas de regressão.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (13)$$

5 RESULTADOS

5.1 Separação de lipoproteínas por ultracentrifugação em gradiente descontínuo de densidade

Após a finalização da ultracentrifugação observou-se a formação de três faixas distintas (**FIGURA 27**). Apesar de pouco visível, a faixa de VLDL foi separada satisfatoriamente, como foi comprovado posteriormente pelos testes químicos e proteicos.

As lipoproteínas apresentaram o seguinte aspecto visual após a diálise:

a) HDL: Solução límpida e de coloração amarela.
b) LDL: Solução límpida e de coloração laranja.
c) VLDL: Suspensão levemente opaca e coloração branca.

O aspecto turvo da solução de VLDL não impede sua utilização. Amostras de soro de pacientes que apresentam dislipidemia ocasionada por elevação da concentração de VLDL apresentam o mesmo aspecto (TIETZ, 2008).

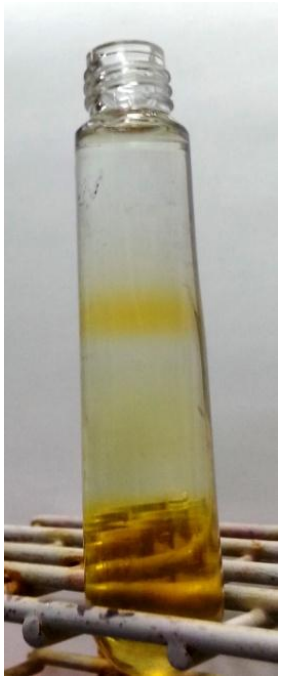


FIGURA 27 – Aspecto da amostra após ultracentrifugação do soro.
As faixas formadas por HDL (parte inferior do tubo) e LDL (parte mediana do tubo) são mais visíveis. A faixa composta por VLDL, apesar de pouco visível, está localiza na porção superior do tubo, próximo à rosca do frasco. As classes de lipoproteínas foram separadas por ultracentrifugação em gradiente descontinuo de densidade. Densidade do soro foi ajustada para 1,3g/mL com adição de KBr. Para criação do gradiente de densidade foi utilizado um sistema bifásico entre o soro com densidade ajustada e solução de cloreto de sódio 0,9% p/v.

5.2 Determinação do conteúdo químico e proteico das lipoproteínas

A **Tabela 16** apresenta os resultados obtidos para a determinação do conteúdo químico e proteico das lipoproteínas. A concentração de colesterol nas classes de lipoproteínas é expressa como: colesterol total, colesterol livre (colesterol não esterificado com ácido graxo) e éster de colesterol (quantificado como linoleato de colesterila).

Tabela 16 – Caracterização química e proteica das lipoproteínas

Parâmetro	Faixa Inferior (HDL)	Faixa mediana (LDL)	Faixa Superior (VLDL)
Colesterol Total	79 mg/dL (2,05 mM)	183 mg/dL (4,76 mM)	32 mg/dL (0,83 mM)
Colesterol livre	*14 mg/dL (0,36* mM*)*	*46 mg/dL (1,20* mM*)*	*15 mg/dL (0,39* mM*)*
*Éster de colesterol**	*110 mg/dL (1,69* mM*)*	*231 mg/dL (3,56* mM*)*	*29 mg/dL (0,44* mM*)*
Triglicérides	17 mg/dL (0,19 mM)	21 mg/dL (0,24 mM)	124 mg/dL (1,40 mM)
ApoA1	183 mg/dL (65,1 µM)	3,3 mg/dL (1,2 µM)	0,0 mg/dL (0,0 µM)
ApoB100	1,6 mg/dL (0,03 µM)	113 mg/dL (2,2 µM)	12 mg/dL (0,22 µM)

A Separação das lipoproteínas foi realizada utilizando ultracentrifugação de gradiente descontínuo de densidade. Densidade do plasma ajustado com KBr.

Concentração de colesterol esterificado foi determinada pela diferença entre colesterol livre e colesterol total.

*Éster de colesterol foi calculado como linoleato de colesterila, MM= 649,08 g/mol

5.3 Estudo enzimático colorimétrico e seleção de poliânion

5.3.1 Cinéticas de reação das classes de lipoproteínas

As cinéticas enzimáticas da **FIGURA 28** foram determinadas utilizando o reagente enzimático colorimétrico sem poliânions em sua composição. O gráfico corresponde à reação catalisada pelas enzimas CE e ChOx nativas após a adição da PARTE 2 do reagente, o que corresponde à solução com as enzimas.

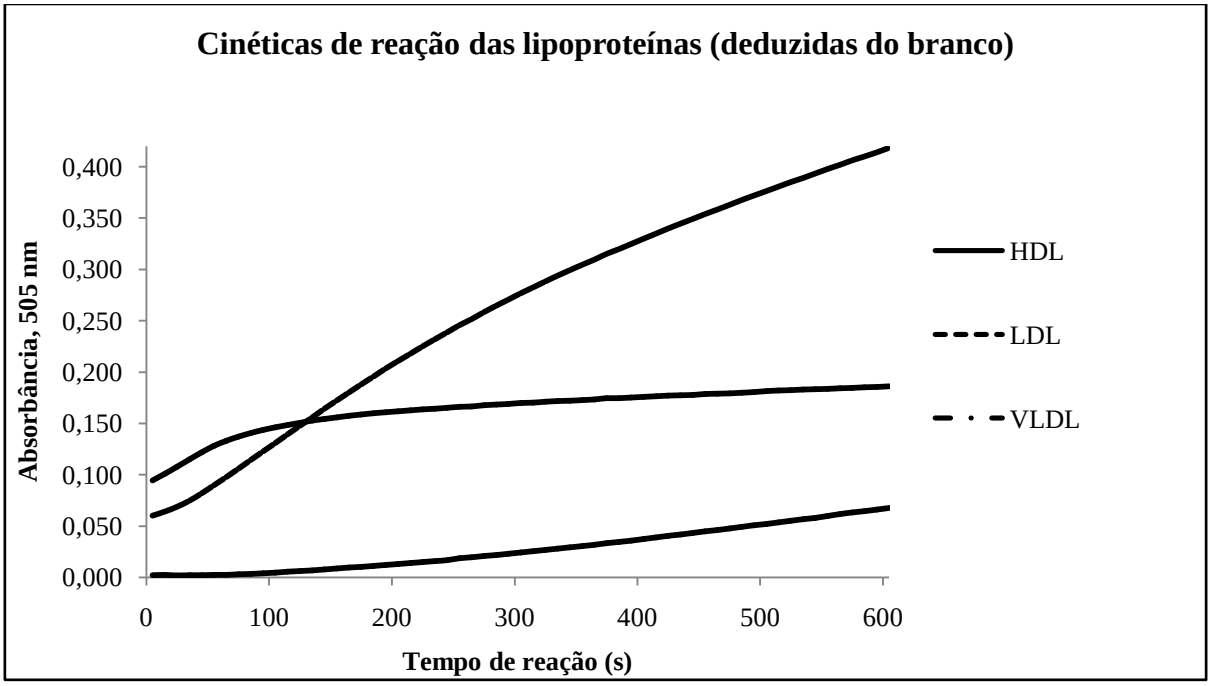


FIGURA 28 – Cinéticas enzimáticas das classes de lipoproteína.
, Teste realizado utilizando o espectrofotômetro Biochrom – Libra S22. Ensaios realizados a 37 ºC, λ= 505 nm**.**

Além das concentrações distintas de colesterol total entre as classes de lipoproteínas, as cinéticas de reação também são distintas. HDL apresenta uma cinética de reação com um incremento de absorbância mais linear. A cinética de reação do LDL possui uma *lag phase*, seguido por um crescimento constante da reação. A reação do VLDL praticamente alcança ponto final com 150 segundos de reação.

5.3.2 Seleção de poliânions

a) Curva dose efeito para sulfato de condroitina

A **FIGURA 29** demonstra diferentes concentrações de sulfato de condroitina que foram adicionadas ao reagente enzimático colorimétrico e estas foram posteriormente avaliadas quanto à atividade residual em relação ao reagente sem poliânions,

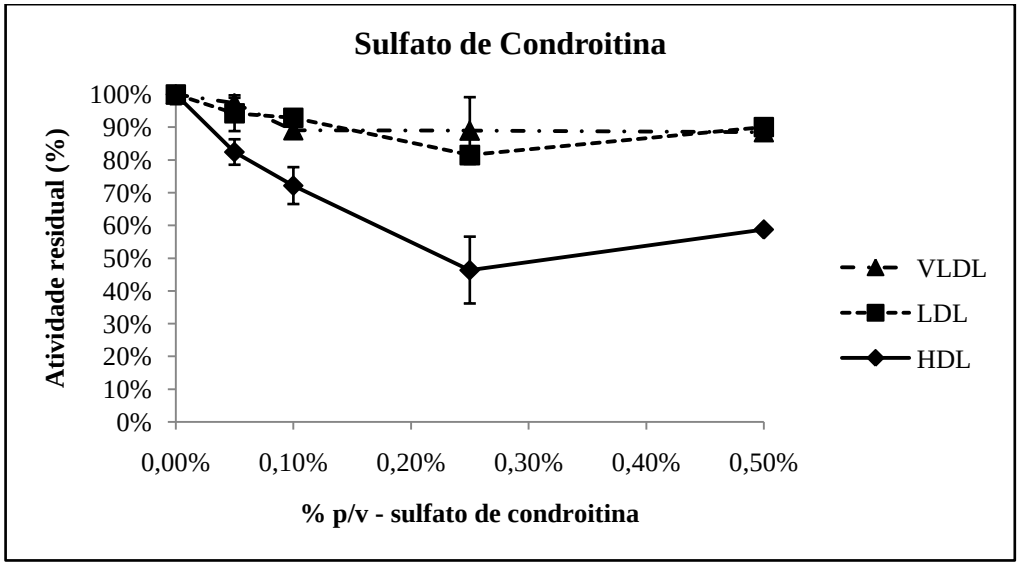


FIGURA 29 – Curva dose efeito para sulfato de condroitina.
100% da atividade corresponde ao $\Delta ABS_{(600segundos\ -\ 0\ segundos)}$ do ensaio realizado com as enzimas CE e ChOx nativas sem a presença de poliânions. As amostras de lipoproteínas foram adicionadas à PARTE 1 do reagente enzimático-colorimétrico, aquecido a 37 ºC, e foram incubados por 5 minutos a 37 ºC. Adicionou-se a PARTE 2 do reagente à mistura. O incremento da absorbância foi acompanhado a 505 nm, durante 10 minutos utilizando o espectrofotômetro Libra S22-Biochrom.

b) Curva dose efeito para ácido fosfotúngstico

A **FIGURA 30** apresenta a atividade residual das lipoproteínas LDL, VLDL e HDL, quando submetidas à ação da ChOx e CE, na presença de diferentes concentrações de ácido fosfotúngstico

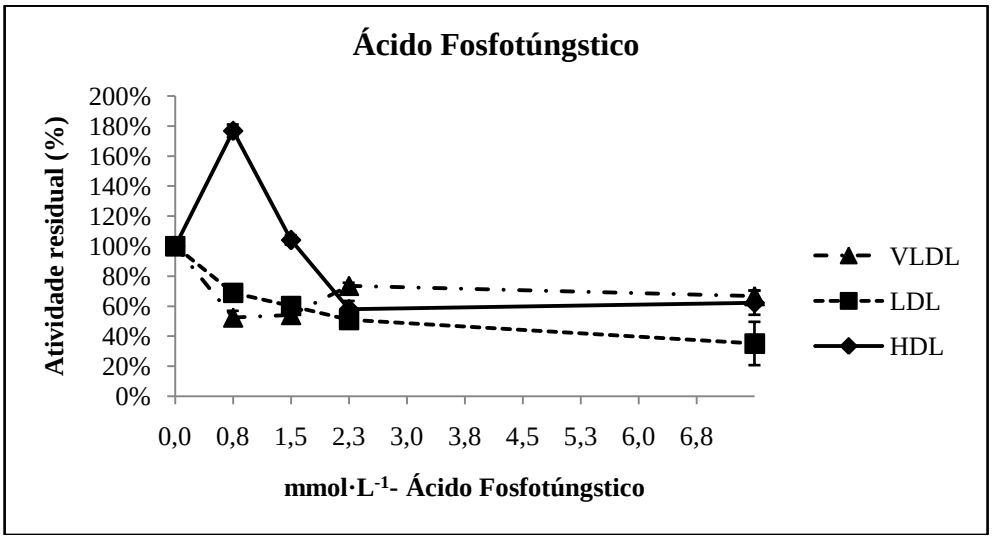


FIGURA 30 - Curva dose efeito para ácido fosfotúngstico.
Concentrações avaliadas de ácido fosfotúngstico presentes na PARTE 1 do reagente enzimático-colorimétrico. Procedimento aplicado ao experimento foi o mesmo realizado no experimento representado pela **FIGURA 29**.

c) Curva dose efeito para Sacarose Octassulfato

‘ A **FIGURA 31** apresenta o efeito das diferentes concentrações de sacarose octassulfato sobre a ação das enzimas CE e ChOx sobre as diferentes classes de lipoproteínas.

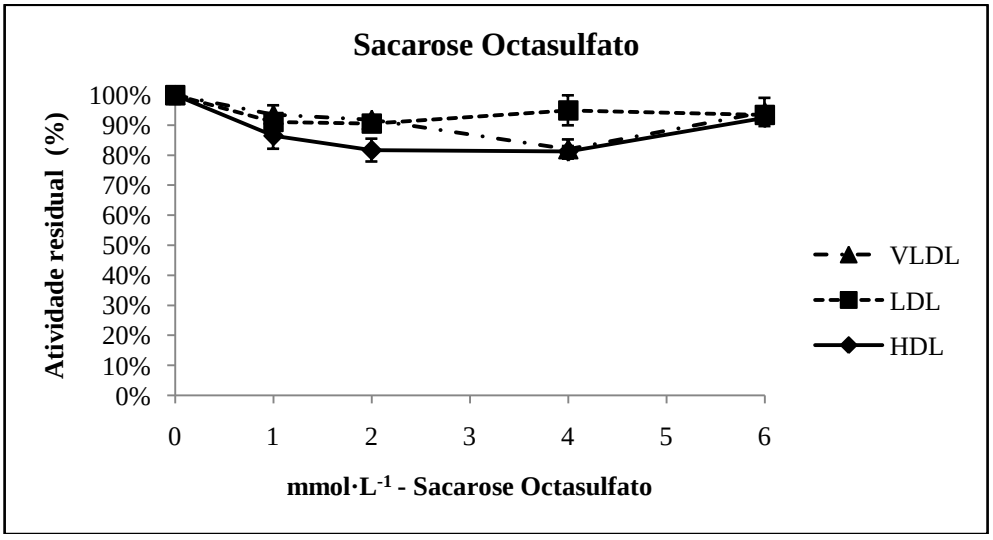


FIGURA 31 – Curva dose efeito para sacarose octassulfato.
Concentrações avaliadas de sacarose octasulfato presentes na PARTE 1 do reagente enzimático-colorimétrico. Procedimento aplicado ao experimento foi o mesmo realizado no experimento representado pela **FIGURA 29.**.

d) Curva dose efeito para Sacarose Octassulfato + Dextran Sulfato 0,5 % p/v

A **FIGURA 32** demonstra ação da associação de diferente concentrações de sacarose octassulfato mais dextran sulfato, com concentração constante de 0,5% p/v, sobre a atividade das enzimas CE e ChOx utilizando HDL, LDL e VLDL como substrato.

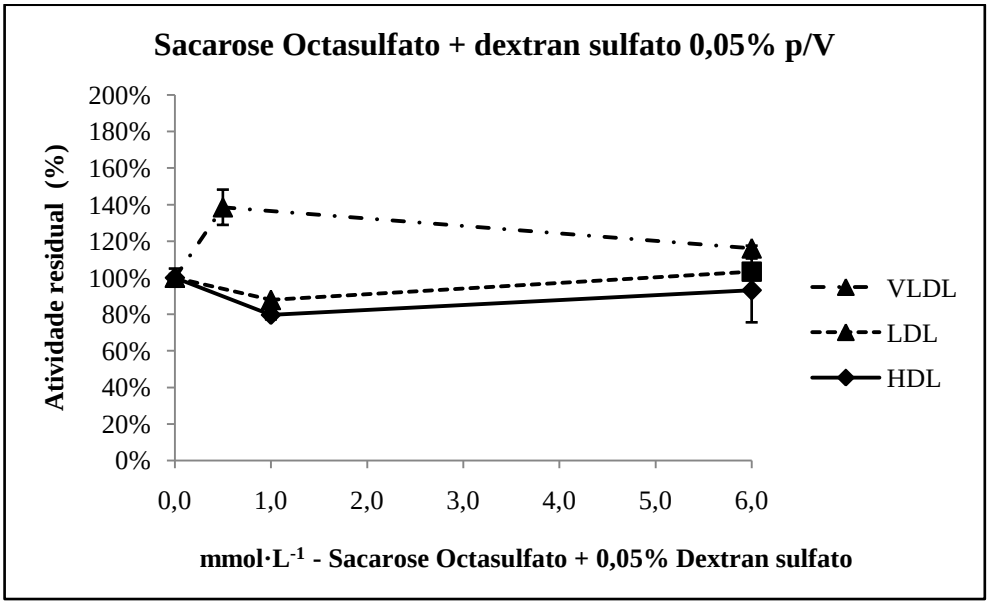


FIGURA 32 – Curva dose efeito para sacarose octassulfato + dextran sulfato 0,05% p/v.
Concentrações avaliadas de sacarose octasulfato, associada a 0,05% de dextran sulfato, presentes na PARTE 1 do reagente enzimático-colorimétrico. Procedimento aplicado ao experimento foi o mesmo realizado no experimento representado pela **figura 29**.

e) Curva dose efeito para α-ciclodextrina sulfato

Também foram avaliadas diferentes concentrações do poliânion α-ciclodextrina sulfato (**FIGURA 33**) como potencial inibidor da catálise das enzimas CE e ChOX sobre as lipoproteínas. Em complemento a esse ensaio, foi avaliado a associação de α-ciclodextrina sulfato com 0,5% p/v de dextran sulfato (**FIGURA 34**).

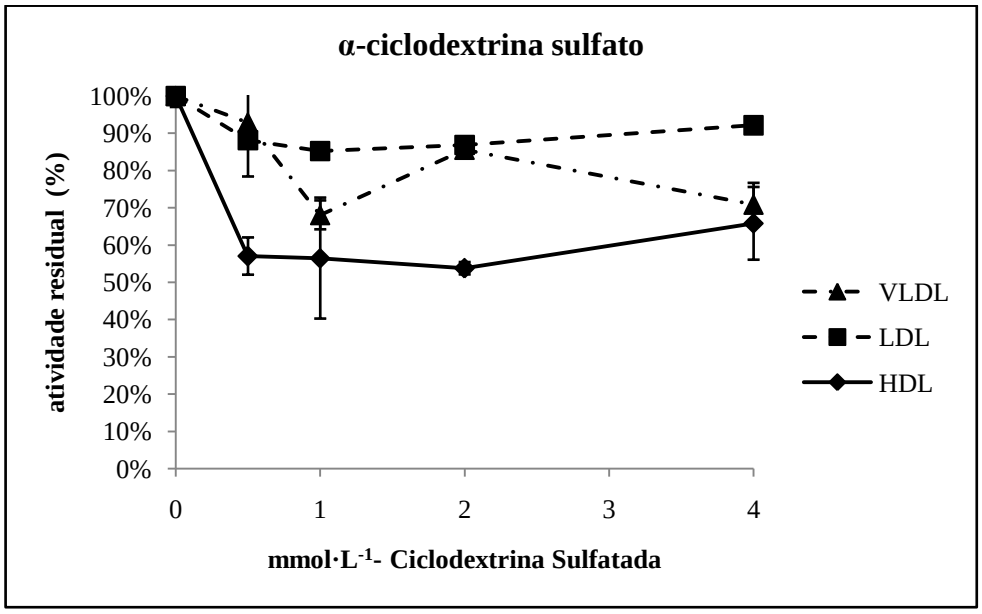


FIGURA 33 – Curva dose efeito para α-ciclodextrina sulfato.
Concentrações avaliadas de α-ciclodextrina sulfato presentes na PARTE 1 do reagente enzimático-colorimétrico. Procedimento aplicado ao experimento foi o mesmo realizado no experimento representado pela **figura 29**.

f) Curva de dose efeitoα-ciclodextrina sulfato + dextran sulfato 0,05% p/v

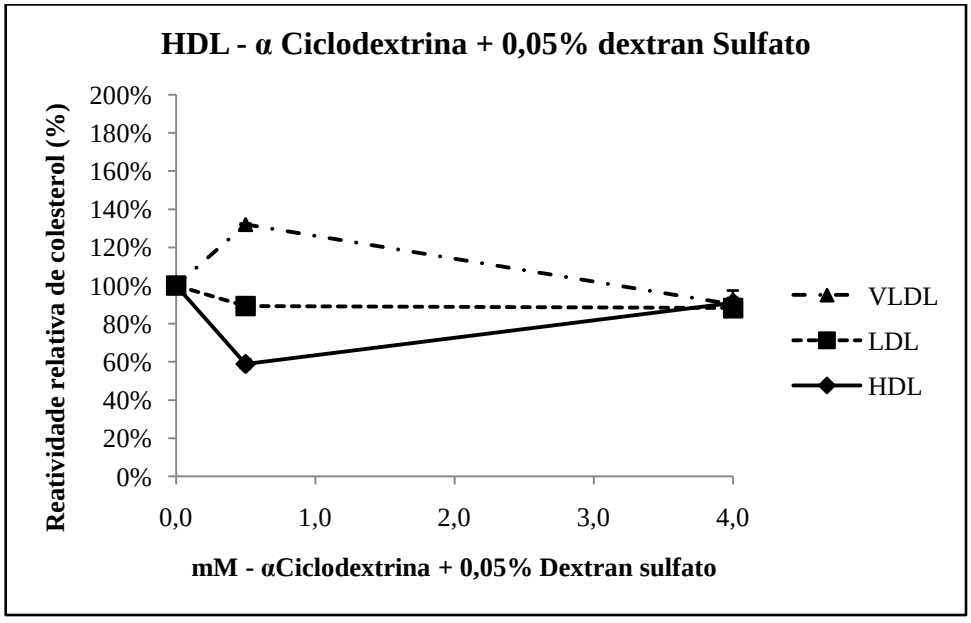


FIGURA 34 – Curva dose efeito para α-ciclodextrina sulfato associada à dextran sulfato 0,5% p/v.
Concentrações avaliadas de α-ciclodextrina sulfato, associada a 0,05% p/v de dextran sulfato, presentes na PARTE 1 do reagente enzimático-colorimétrico. Procedimento aplicado ao experimento foi o mesmo realizado no experimento representado pela **FIGURA 29**.

RESULTADOS

Tendo em vista que a adição do poliânion ao reagente enzimático-colorimétrico tem como objetivo a inibição da ação das enzimas CE e ChOx sobre as lipoproteínas LDL e VLDL. A **Tabela 17** resume de cada gráfico de dose efeito dos diferentes poliânions qual foi a concentração verificada que obteve o menor valor de atividade residual para cada classe de lipoproteína.

Tabela 17 – Atividade residual dos poliânions sobre as atividades residuais das enzimas CE eChOx utilizando as lipoproteínas LDL, HDL e VLDL como substrato

		ApoB100	ApoA1
Poliânion	**LDL**	**VLDL**	**HDL**
Sulfato de condroitina	81% a 0,25% p/v	88% a 0,5% p/v	46% a 0,25% p/v
Ácido fosfotúngstico	35% a 7,5 mM	52% a 0,75 mM	58% a 2,25 mM
Sacarose octassulfato	91% a 2 mM	82% a 4 mM	81% a 4 mM
Sacarose octassulfato + dextran sulfato	88% a 1 mM	100% a 0 mM	80% a 1 mM
α-ciclodextrina sulfato	85% a 1 mM	68% a 1 mM	54% a 2 mM
α-ciclodextrina sulfato + dextran sulfato	82% a 4 mM	90% a 4 mM	59% a 0,5 mM

O ácido fosfotúngstico promoveu a maior inibição da reação catalisada por CE e ChOx em comparação aos demais poliânions avaliados para os substratos LDL e VLDL. Foram alcançadas atividades residuais de 35% e 52% para LDL e VLDL, respectivamente. Mesmo na primeira concentração do ácido avaliado, 0,75 mmol·L^{-1}, a atividade residual do LDL caiu para 69%, valor inferior ao de qualquer outro poliânion avaliado.

O ácido fosfotúngstico permitiu a obtenção de uma atividade residual de 58% para o HDL na concentração de 2,25 mmol·L^{-1}, promoveu um incremento da atividade da reação em 77% a 0,75 mmol·L^{-1} e em nenhum momento incrementou as atividades das reações de LDL e VLDL. Se considerado a concentração de 0,75 mmol·L^{-1}para ácido fosfotúngstico as atividades residuais foram: 69% para LDL, 52% para VLDL e 177% para HDL, o que o define como poliânion com maior capacidade de inibição da reação catalisada por CE e ChOx sobre LDL e VLDL.

5.4 Conjugação com monometoxipolietilenoglicol succinimidil carbonato

Os resultados dos percentuais de conjugação das enzimas colestesol esterase e colesterol oxidase estão demonstrados na **Tabela 18**. Os resultados estão expressos em absorbância em 570 nm para o ensaio colorimétrico com ninidrina.

Tabela 18 – Teste de ninidrina para determinação do grau de conjugação com mPEG-NHS

Absorbâncias das amostras – λ 570 nm				
Colesterol esterase			***Grau de peguilação***	
CE nativa	CE PEG-5 kDa	CE PEG-10 kDa	*CE PEG-5 kDa*	*CE PEG-10 kDa*
0,943	0,526	0,556	*44,2%*	*41,0%*
Colesterol oxidase				
ChOx nativa	ChOx PEG-5 kDa	ChOx PEG-10 kDa	*ChOx PEG-5 kDa*	*ChOx PEG-10 kDa*
0,736	0,660	0,665	*10,3%*	*9,7%*

As absorbâncias das amostras foram deduzidas dos brancos reacionais.
Grau de peguilação pode ser entendido como porcentagem de potenciais grupos amino que foram conjugados com mPEG.

O grau de peguilação alcançado foi semelhante entre os dois polímeros de mPEG-NHS selecionados. O mPEG NHS 10 kDa apresentou menor grau de conjugação.

Durante o aquecimento das enzimas a 100 ºC, para a realização do teste de ninidrina a enzima ChOx nativa precipitou, o que não foi percebido com a enzima peguilada.

5.5 Ensaios para determinação da atividade residual das enzimas peguiladas associadas a 0,75 mmol·L^{-1} de ácido fosfotúngstico

Após a conjugação das enzimas com mPEG-NHS foi elaborado novo reagente enzimático-colorimétrico contendo as enzimas peguiladas e o ácido fosfotúngstico 0,75 mmol/L^{-1}. O desempenho do novo reagente foi verificado utilizando as lipoproteínas como amostra e comparado aos reagentes contendo: a) as enzimas peguiladas sem o poliânion, b) enzimas peguiladas + 0,5 mmol·L^{-1} α-ciclodextrina sulfato associado à dextran sulfato 0,05% p/v e c) enzimas nativas sem poliânion (**FIGURA 35**). Os ensaios foram realizados no analisador automático Labmax 240 – Labtest Diagnóstica SA, o que possibilitou a visualização da interação entre a PARTE 1 dos reagentes com a amostra.

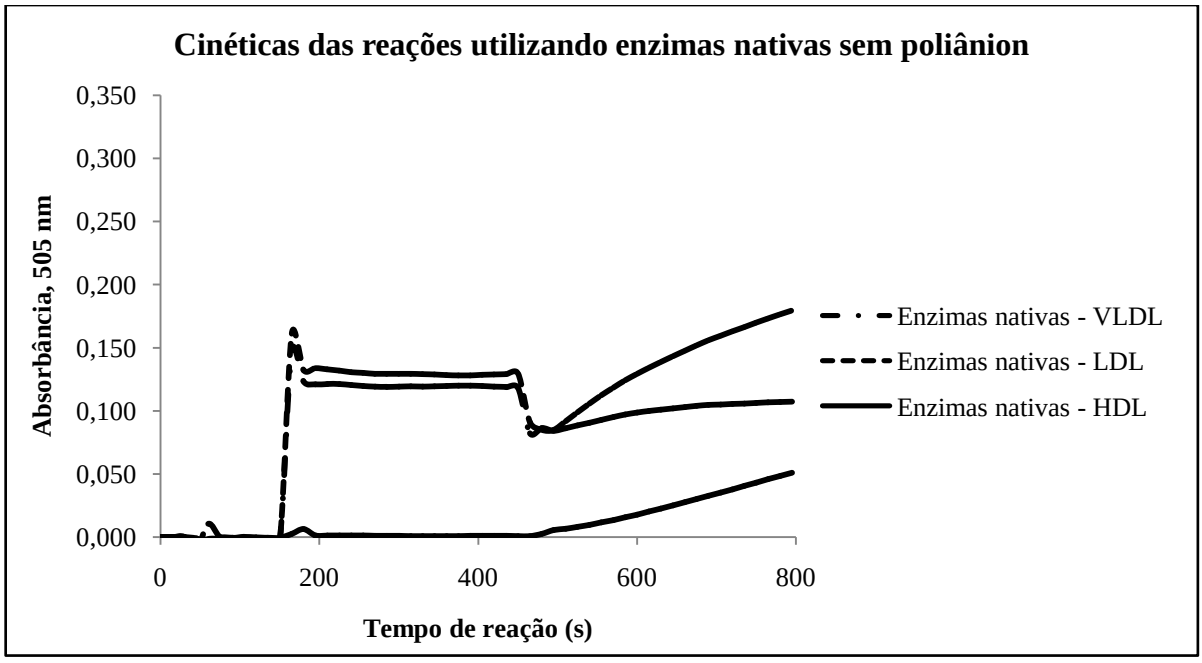


FIGURA 35 – Cinética de reação das enzimas nativas sem poliânions em analisador automático Labmax 240.

A PARTE 1 do reagente enzimático colorimétrico é adicionada à cubeta de reação, aquecida a 37 ºC, aos 75 segundos. Após 90 segundos a amostra é adicionada. A adição da PARTE 2 ocorre aos 300 segundos após adição da amostra. Os tempos de adição dos reagentes, tempo de reação e temperatura são fixos. O equipamento realiza medição da absorbância em 505 nm a cada 15 segundos de reação. As absorbâncias das amostras foram deduzidas do branco de reação, que consiste da absorbância do reagente mais amostra que não contenha o substrato das enzimas (no ensaio em questão foi utilizado água deionizada) em 505 nm,. O mesmo protocolo foi aplicado a todos os demais experimentos realizados utilizando o analisador automático.

RESULTADOS

A normalização das cinéticas (**FIGURA 36**), considerando a absorbância inicial igual a 0,000, permite visualizar com uma maior escala gráfica, em comparação à utilizada na **FIGURA 35,** a reação catalisada pelas enzimas nativas. Os dados apresentados no gráfico foram obtidos após a adição da PARTE 2 do reagente enzimático-colorimétrico.

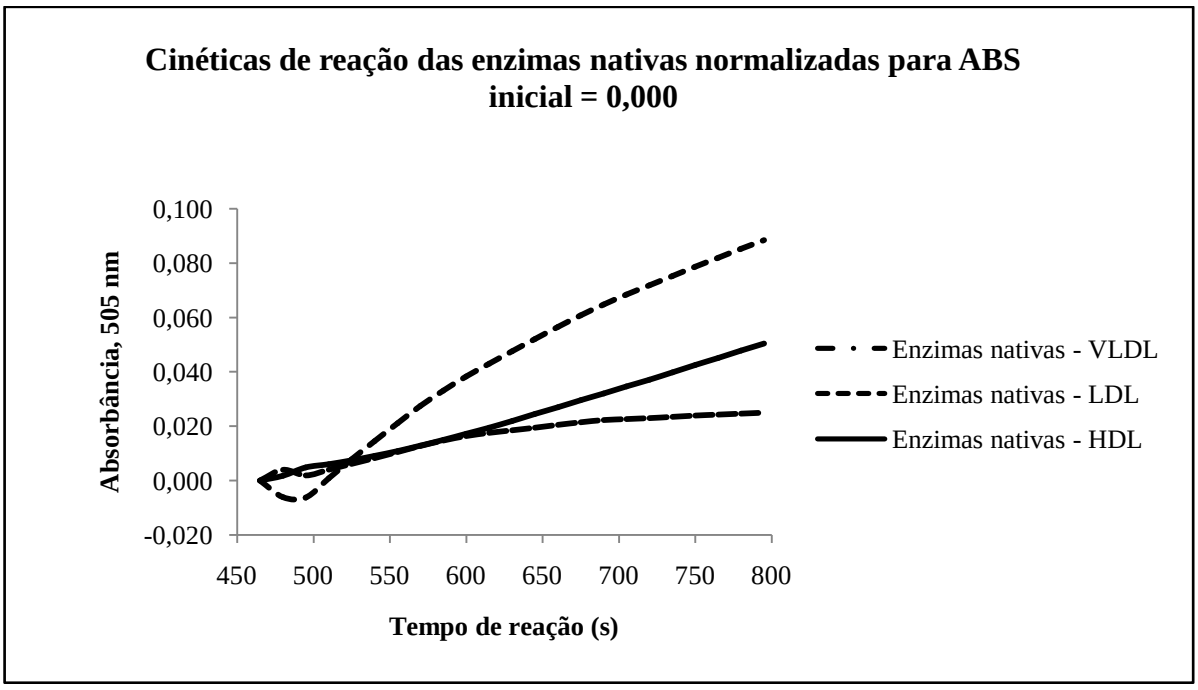


FIGURA 36 – Cinética de reação das lipoproteínas normalizadas para ABS inicial = 0,000.

Cinéticas das enzimas CE e ChOx após normalização para ABS= 0,000, A normalização das cinéticas proporciona melhor vizulaização do perfil cinético de cada reação.

A conjugação das enzimas com mPEG NHS 5 kDa promoveu redução de sua atividade catalítica, independente do substrato analisado, como está indicado na **FIGURA 37** As reações das enzimas peguiladas com as lipoproteínas apresentam cinética de reação distinta das enzimas nativas e uma redução do ΔABS (800 segundos – 465 segundos).

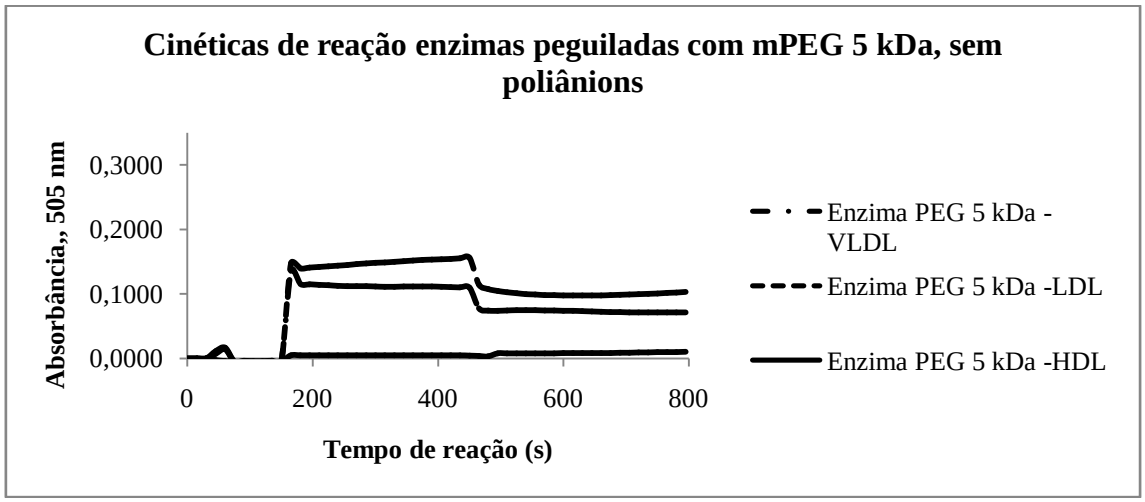
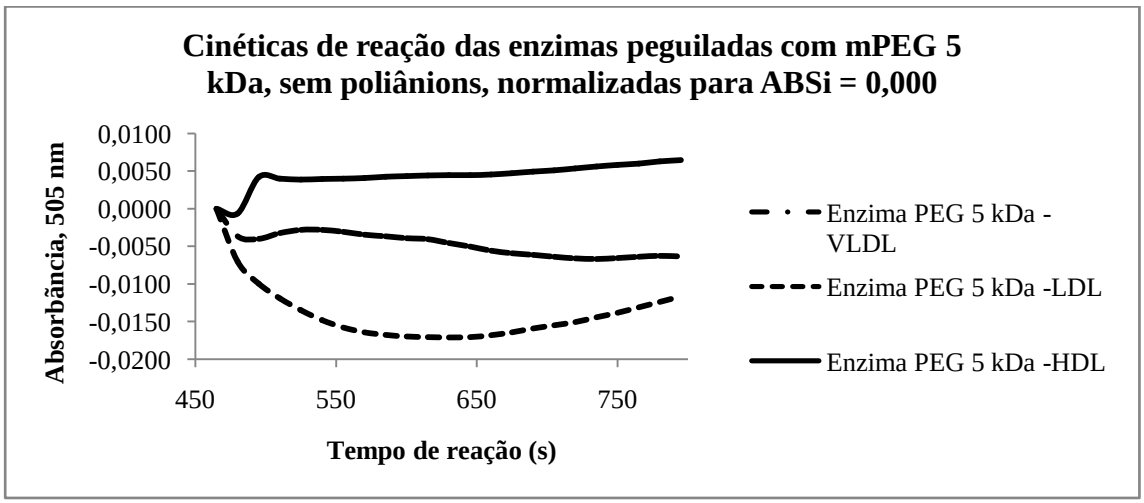


FIGURA 37 - Cinéticas de reação das enzimas peguiladas com mPEG 5 kDa, sem poliânioins

As cinéticas obtidas com o reagente enzimático-colorimétrico que contém enzimas peguiladas com mPEG 5 kDa foram avaliadas utilizando o analisador automático Labmax 240, conforme descrito na FIGURA 35. A peguilação reduziu a atividade catalítica das enzimas CE e ChOx.

As cinéticas de reação da **FIGURA 37** foram normalizadas para ABS 0,000 e apresentadas na **FIGURA 38**. A cinética de reação com HDL ainda apresenta crescimento linear na absorbância, entretanto a taxa de crescimento é inferior quando comparado com as enzimas nativas. Para o LDL ocorre uma deflexão na cinética da reação, seguido por um aumento da absorbância. Praticamente, não há alteração na absorbância para o VLDL. Entretanto, todas essas alterações ocorrem com uma pequena variação no ΔABS (800 segundos – 465 segundos), não superior a 20 miliunidades de absorbância.



.

FIGURA 38 - Cinéticas de reação normalizadas das enzimas peguiladas com mPEG 5 kDa, sem poliânions

Cinéticas de reação normalizadas referentes à **FIGURA 37**.

Os mesmo fenômenos observados com as enzimas peguiladas com mPEG NHS 5 kDa são observados nas enzimas conjugadas com mPEG 10 kDa **(FIGURAS 39 e 40)**.

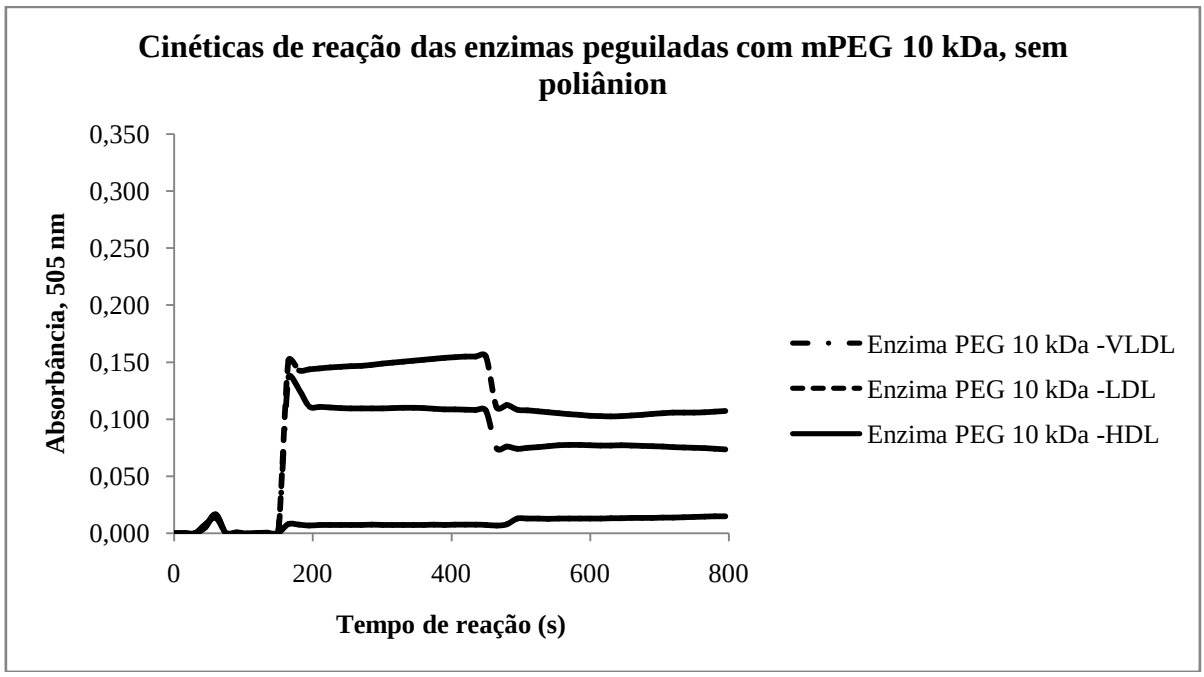


FIGURA 39 - Cinéticas de reação das enzimas peguiladas com mPEG 10 kDa, sem poliânion

As cinéticas de reação com de mPEG 10 kDa não diferem das cinéticas com mPEG 5kDa.

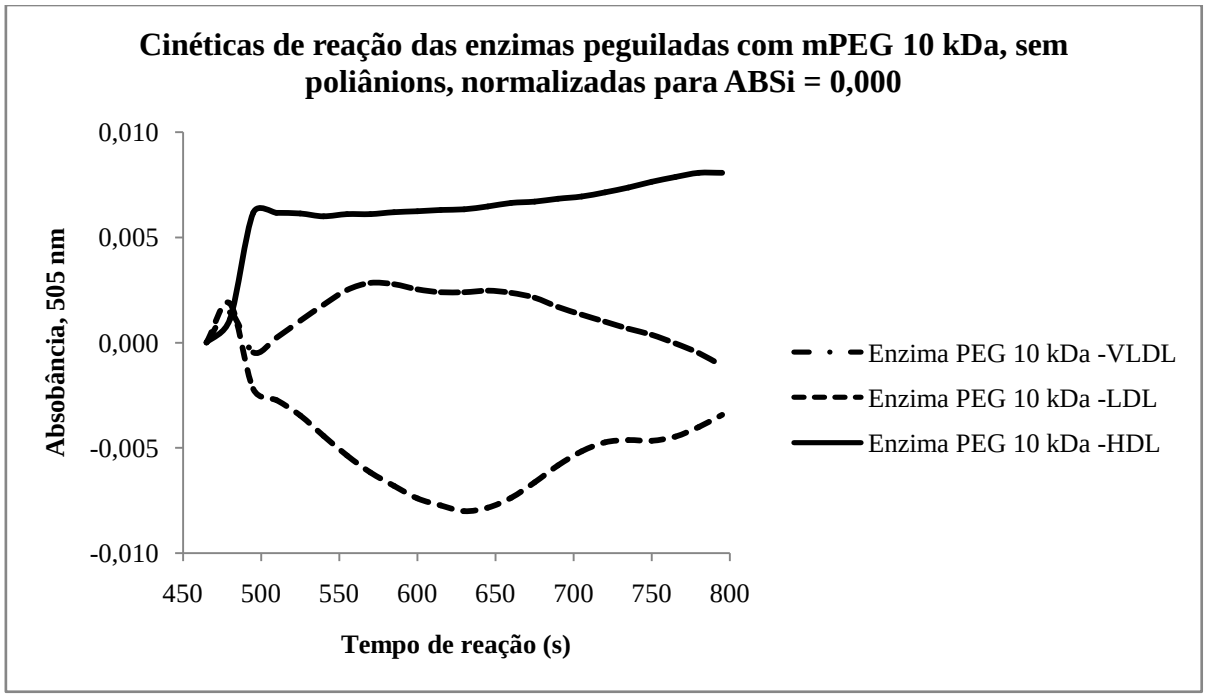


FIGURA 40 - Cinéticas de reação normalizadas das enzimas peguiladas com mPEG 10 kDa, sem poliânions

As cinéticas de reação da **FIGURA 39** foram normalizadas para ABS 0,000.

RESULTADOS

A mesma avaliação das cinéticas enzimáticas foi aplicada ao reagente enzimático-colorimétrico com 0,75 mmol·L^{-1} (**FIGURAS 41 e 42).** A adição de 0,75 mmol·L^{-1} de ácido fosfotúngstico à PARTE 1 do reagente enzimático-colorimétrico inibiu a formação da deflexão negativa na reação com LDL, porém não provocou alterações nas cinéticas de reação para HDL e VLDL.

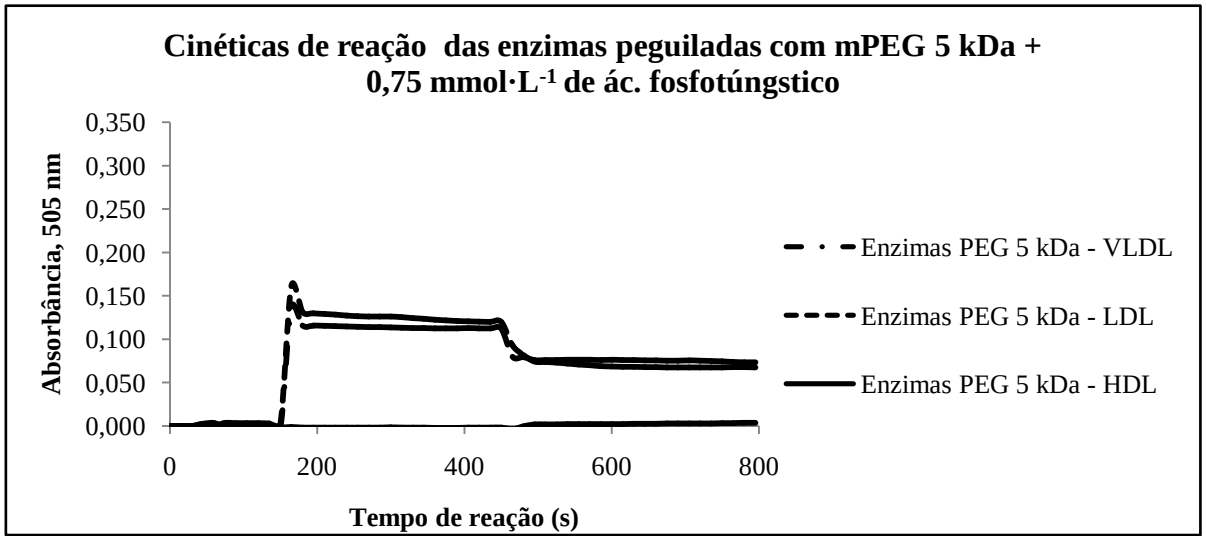


FIGURA 41 – Cinéticas de reação das enzimas peguiladas com mPEG 5 kDa + 0,75 mmol·L^{-1} de ácido fosfotúngstico.

As cinéticas enzimáticas obtidas com o reagente enzimático-colorimétrico que contém enzimas peguiladas com mPEG 5 kDa + 0,75 mmol·L^{-1} de ácido fosfotúngstico foram avaliadas utilizando o analisador automático Labmax 240.

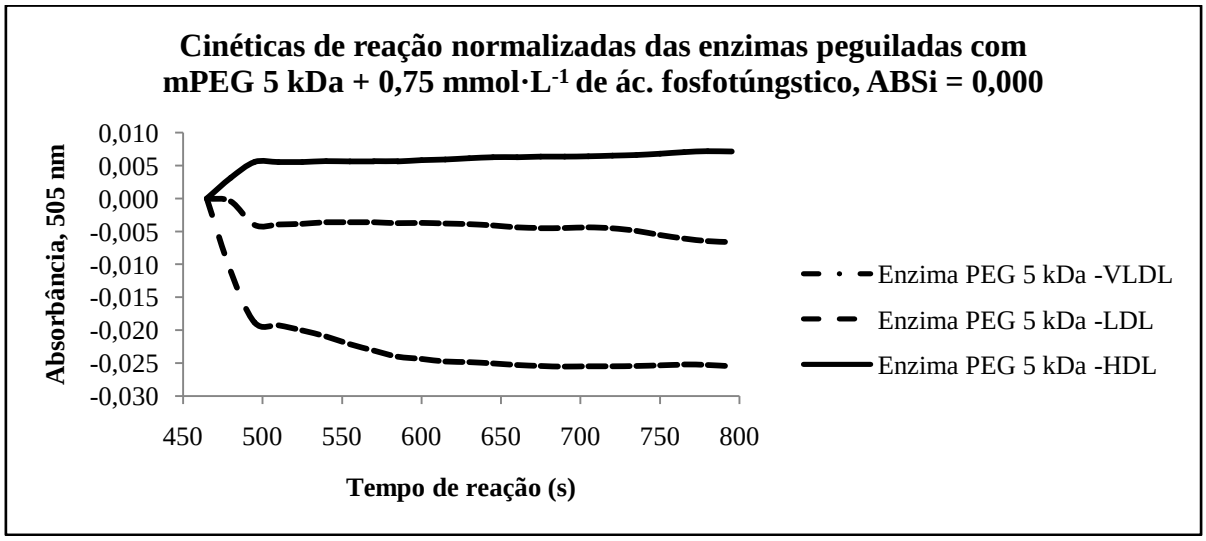


FIGURA 42 - Cinéticas de reação normalizadas das enzimas peguiladas com mPEG 5 kDa + 0,75 mmol·L^{-1} de ácido fosfotúngstico.

As cinéticas de reação da **FIGURA 41** foram normalizadas para ABS 0,000..

As mesma alterações presentes nas cinéticas de reação das enzimas peguiladas com mPEG-NHS 5 kDa na presença de 0,75 mM de ácido fosfotúngstico aplicam-se as enzimas modificadas com mPEG NHS 10 kDa na presença do poliânion (**FIGURAS 43 e 44)**.

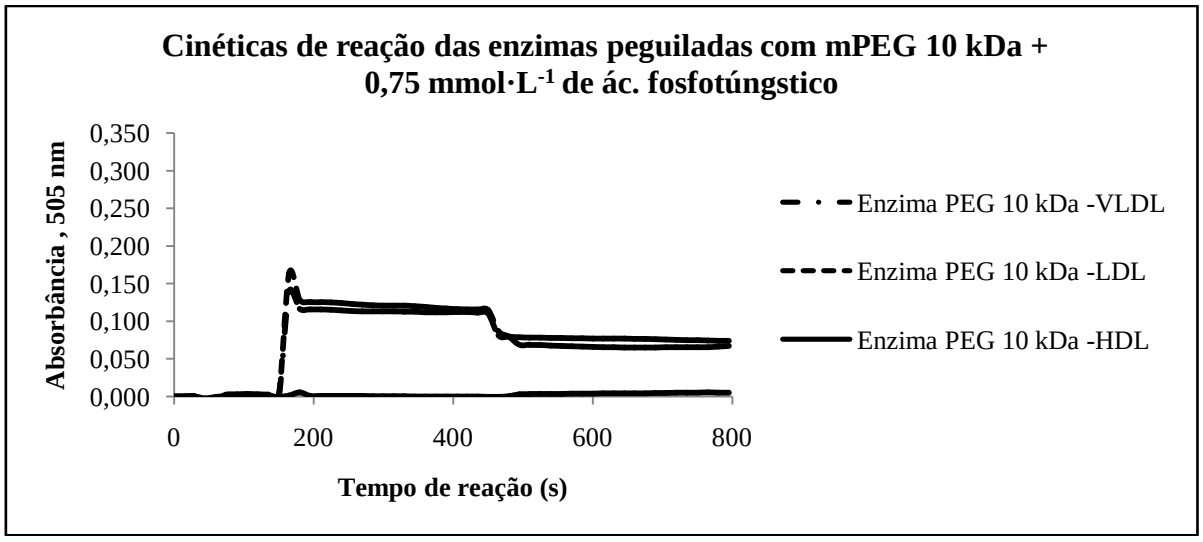


FIGURA 43 – Cinéticas de reação das enzimas peguiladas com mPEG 10 kDa + 0,75 mmol·L^{-1} de ácido fosfotúngstico.

As cinéticas enzimáticas do reagente enzimático-colorimetro elaborado com enzimas peguiladas com mPEG 10 kDa e 0,75 mmol·L^{-1} de ácido fosfotúngstico foram avaliadas utilizando o analisador automático Labmax 240

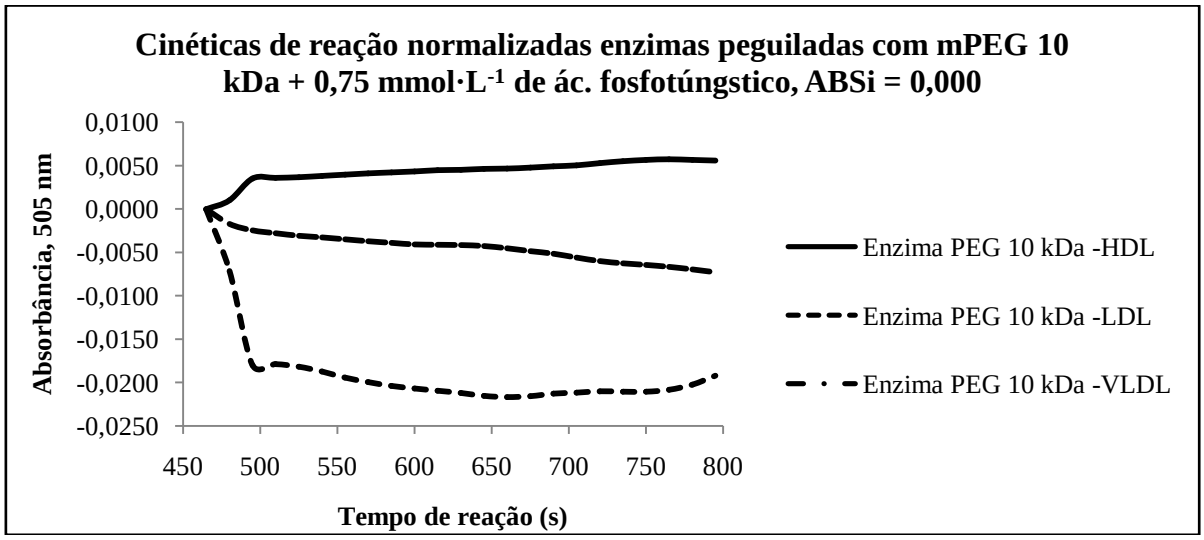


FIGURA 44 - Cinéticas de reação normalizadas das lipoproteínas utilizando enzimas peguiladas com mPEG 10 kDa + 0,75 mmol·L^{-1} de ácido fosfotúngstico.

As cinéticas de reação da **FIGURA 43** foram normalizadas para ABS 0,000.

RESULTADOS

A adição de 0,5 mmol·L^{-1} de α-ciclodextria sulfato ao reagente enzimático-colorimétrico com enzimas peguiladas não afetou significativamente as cinéticas de reação enzimáticas, idependente do peso molecular de mPEG utilizado na peguilação (**FIGURAS 45, 46, 47 e 48),** quando comparado às cinéticas de reação das enzimas peguiladas na ausência de poliânion.

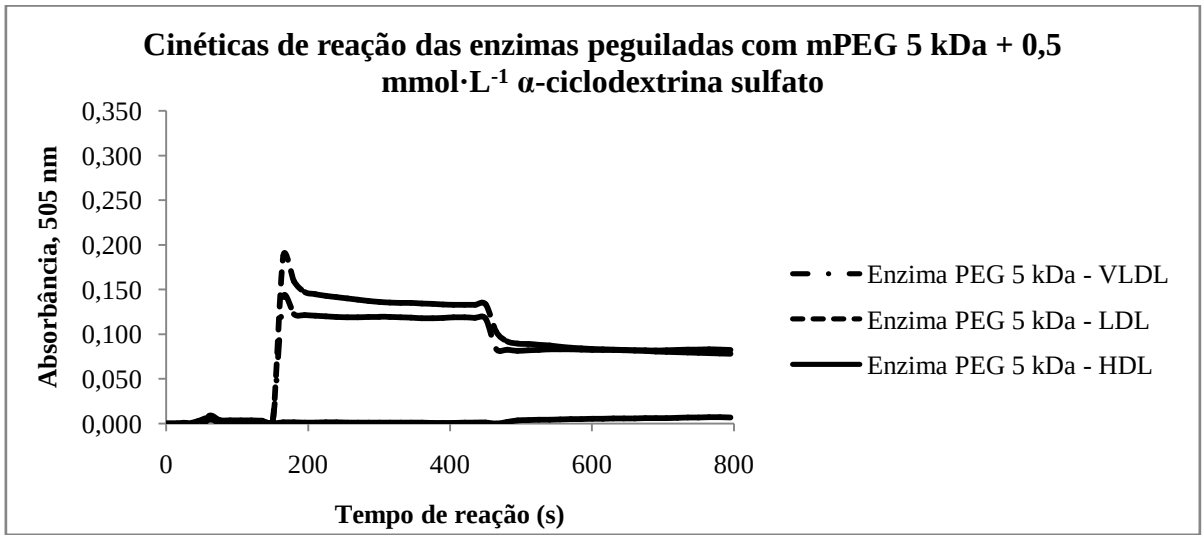


FIGURA 45 - Cinéticas de reação das enzimas peguiladas com mPEG 5 kDa + 0,5 mmol·L^{-1} α-ciclodextrina sulfato

As cinéticas enzimáticas do reagente enzimático-colorimetro elaborado com enzimas peguiladas com mPEG 5 kDa e 0,5 mmol·L^{-1} de α-ciclodextrina sulfato foram avaliadas utilizando o analisador automático Labmax 240.

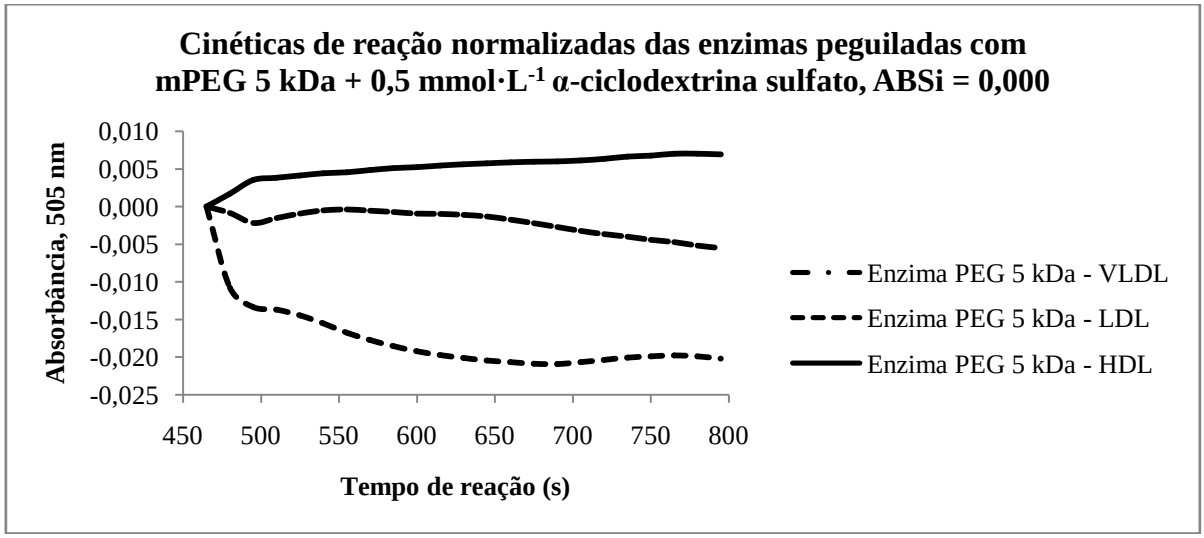


FIGURA 46 - Cinéticas de reação normalizadas das enzimas peguiladas com mPEG 5 kDa + 0,5 mmol·L^{-1}α-ciclodextrina sulfato.

A utilização de α-ciclodextrina sulfato não acarretou em diferenças no perfil da cinética da reação das lipoproteínas em comparação às cinéticas enzimas peguiladas na ausência de poliânions.

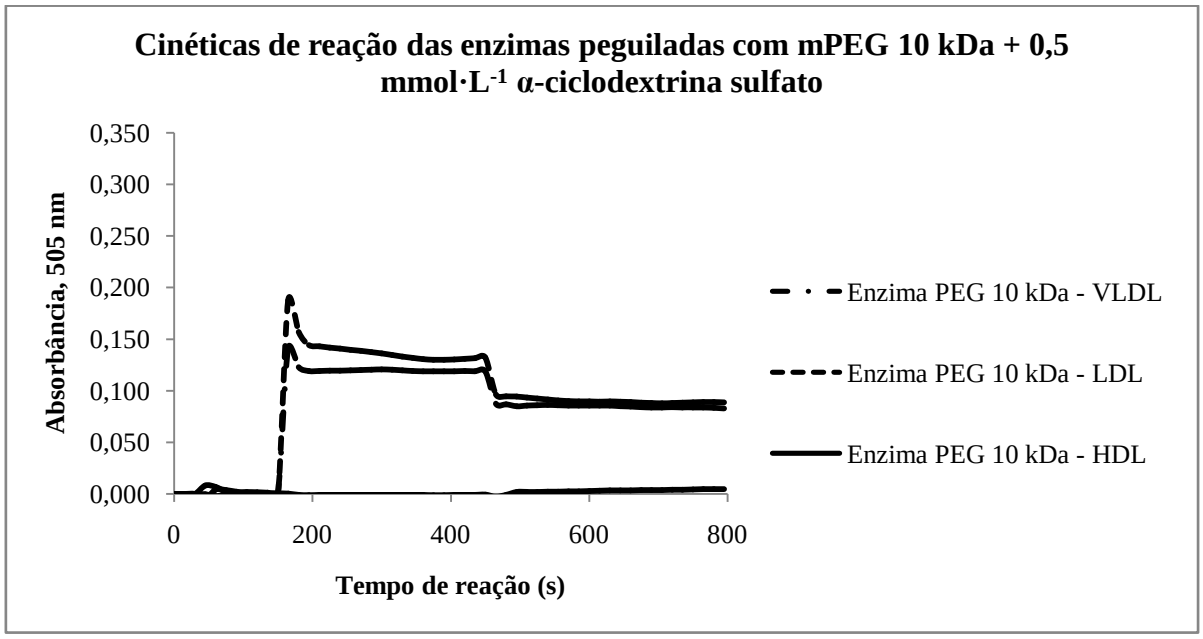


FIGURA 47 - Cinéticas de reação das enzimas peguiladas com mPEG 10 kDa + 0,5 mmol·L^{-1} α-ciclodextrina sulfato.

A associação de 0,5 mmol·L^{-1} de α-ciclodextrina sulfato com enzimas peguiladas com mPEG-NHS 10 kDa não promoveu alterações significativas nas cinéticas de reação das lipoproteínas em comparação

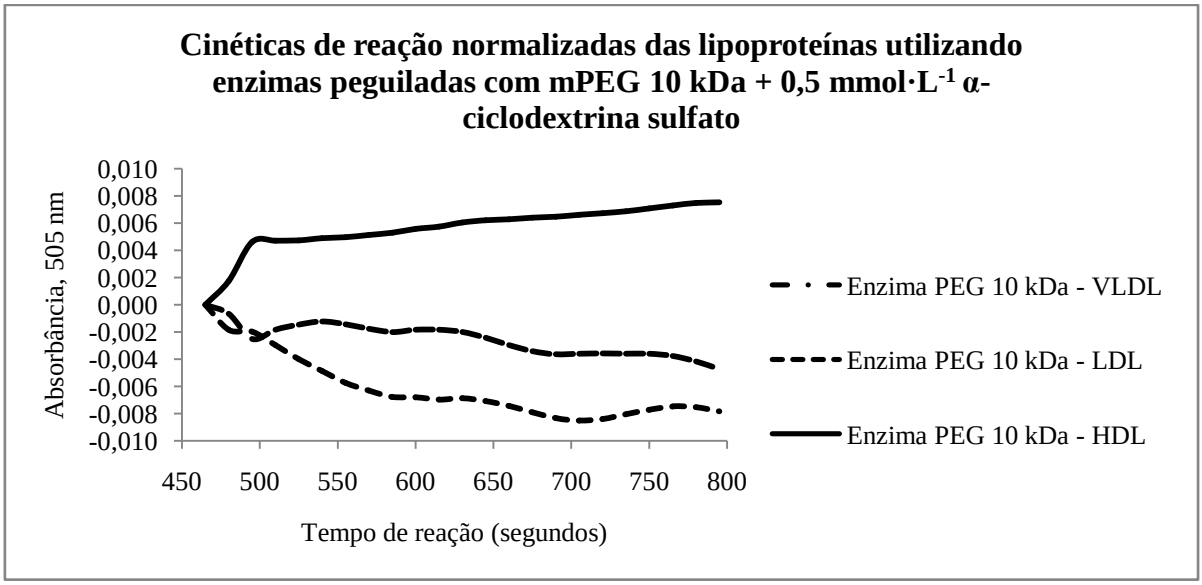


Figura 48 - Cinéticas de reação normalizadas das lipoproteínas utilizando enzimas peguiladas com mPEG 10 kDa + 0,5 mmol·L^{-1} α-ciclodextrina sulfato.

Cinéticas de reação da **FIGURA 47** são apresentadas normalizadas para ABS = 0,000.

RESULTADOS

A peguilação das enzimas promoveu uma redução no $\Delta ABS_{(800\ segundos\ -\ 465\ segundos)}$, quando comparada com a forma nativa das enzimas. As cinéticas de reação com HDL, mesmo após a peguilação, apresentam crescimento da absorbância e cinética de reação semelhante às enzimas nativas, independente da molécula de mPEG-NHS utilizada ou se a reação é realizada na presença ou ausência de ácido fosfotúngstico ou α ciclodextrina.

As cinéticas de reação das enzimas com as lipoproteínas LDL e VLDL tiveram as mudanças mais drásticas. Após a peguilação, praticamente não há incremento da absorbância e a presença de ácido fosfotúngstico removeu a deflexão na cinética de reação para o substrato LDL.

5.5.1 Reagente enzimático-colorimétrico contendo 10 vezes a concentração de enzimas

Com a redução do $\Delta ABS_{(800\ segundos\ -\ 450\ segundos)}$ observado nos reagentes contendo as enzimas peguiladas em comparação com o que contém as enzima nativas, um segundo reagente foi elaborado com dez vezes mais a concentração nominal de enzimas peguiladas, no intuito de aumentar a sensibilidade do sistema. O reagente é composto por 10 kU/L de CE-PEG e 50 kU/L de ChOx-PEG. As cinéticas de reação das lipoproteínas utilizando o reagente com maior concentração de enzimas peguiladas foi avaliado sem a associação com poliânions e na presença de ácido fosfotúngstico e α-ciclodextrina sulfato associada ao dextran sulfato 0,05% p/v.

O aumento na concentração nominal das enzimas em 10 vezes acarretou em aumento no $\Delta ABS_{(800\ segundos\ -\ 465\ segundos)}$ para HDL e LDL, sem causar grandes modificações na cinética de reação com VLDL (**FIGURA 49)**. O aumento na concentração das enzimas não manteve a seletividade encontrada nos estudos anteriores. As reações que tem LDL como substrato apresentam incremento da absorbância (**FIGURA 50**). Assim como nos ensaios anteriores, as cinéticas de reação com o mPEG 10 kDa não se diferem das cinéticas enzimáticas com as enzimas peguiladas com polímero de 5 kDa (**FIGURAS 51 e 52**).

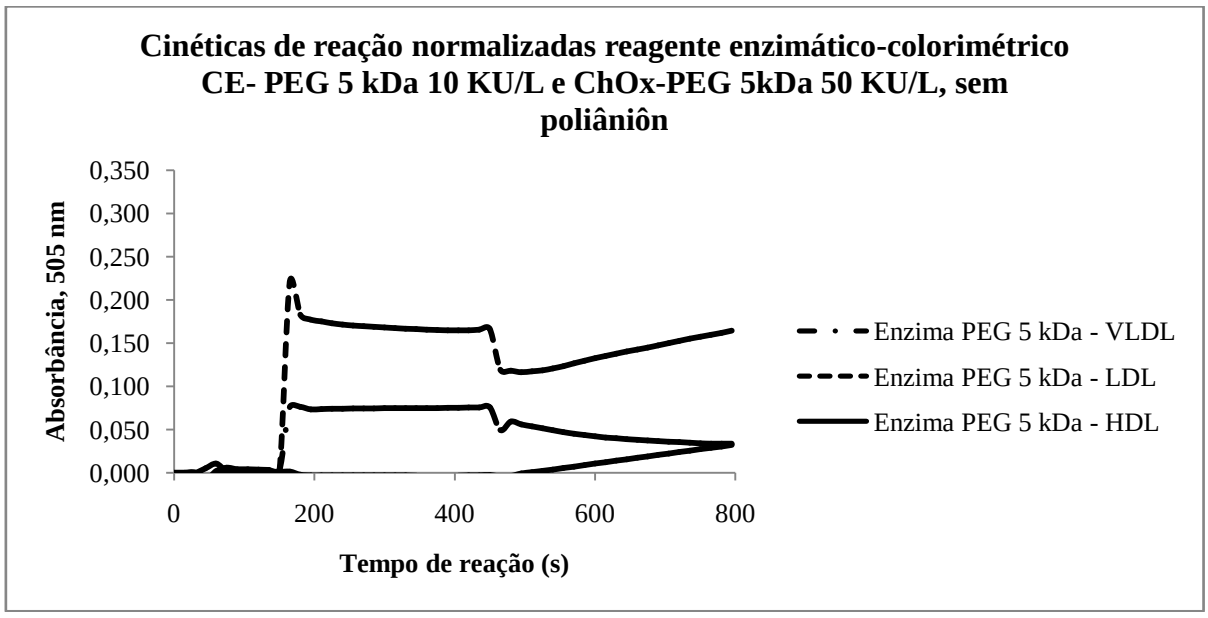


FIGURA 49 – Cinéticas de reação reagente enzimático-colorimétrico com 10 vezes a concentração de enzimas mPEG 5 kDa, sem poliânion.

O reagente enzimático-colorimétrico foi elaborado com uma concentração nominal de enzimas 10 vezes superior ao testado anteriormente. Concentrações finais de CE-PEG 10 kU/L e ChOx 50 kU/L. As cinéticas de reação foram avaliadas utilizando o analisador automático Labmax 240.

.

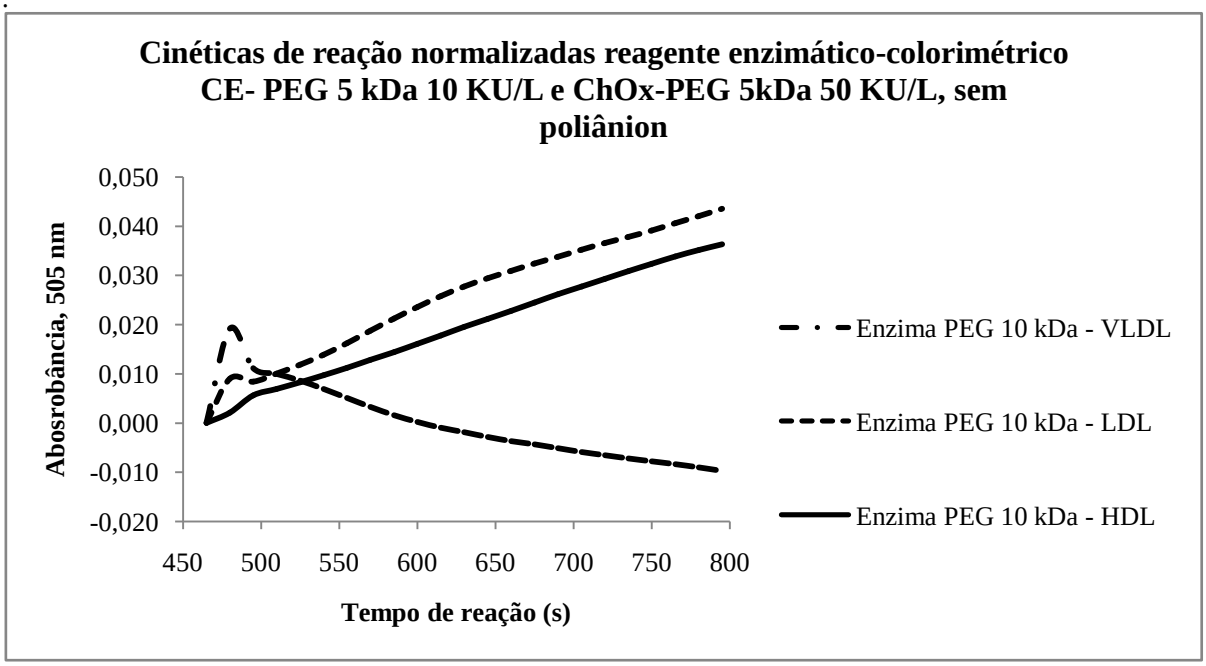


FIGURA 50 – Normalização das cinéticas de reação do reagente enzimático-colorimétrico com 10 vezes a concentração de enzimas mPEG 5 kDa, sem poliânion.

Cinéticas de reação da **FIGURA 49** são apresentadas normalizadas para ABS = 0,000.

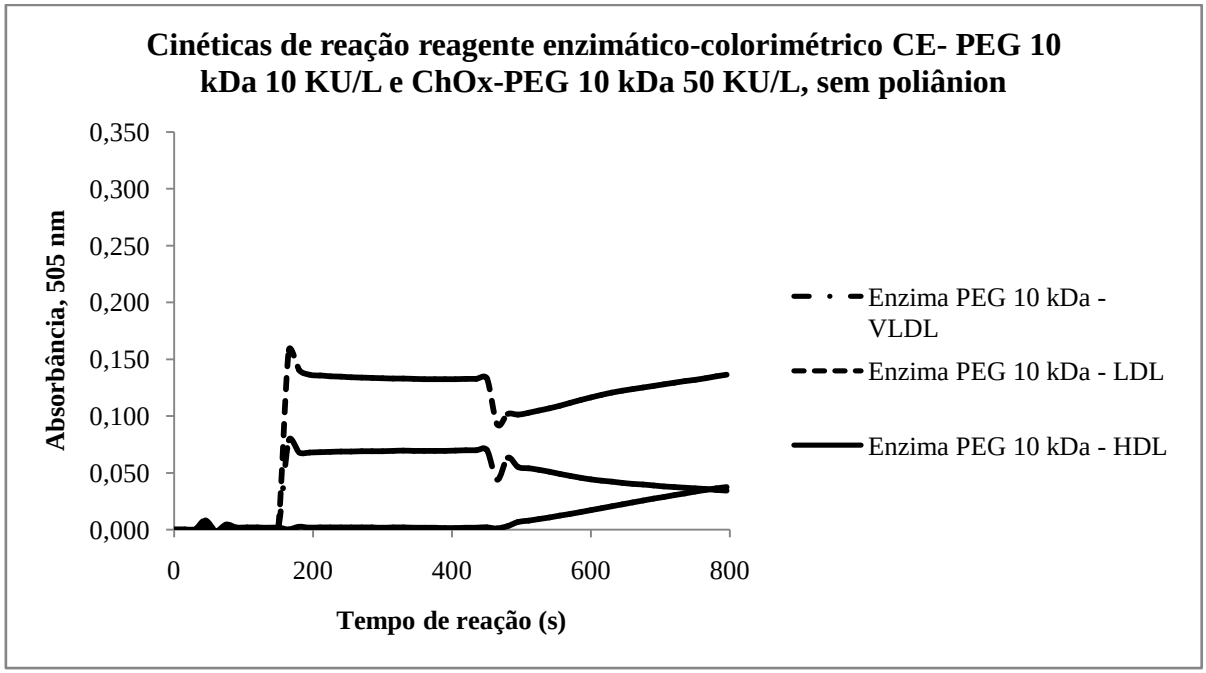


FIGURA 51 – Cinéticas de reação reagente enzimático-colorimétrico com 10 vezes a concentração de enzimas mPEG 10 kDa, sem poliânion.

Cinéticas de reação enzimáticas foram determinadas utilizando o reagente enzimático-colorimétrico com 10 vezes a concentração nominal de enzimas peguiladas. Testes foram realizados utilizando Labmax 240.

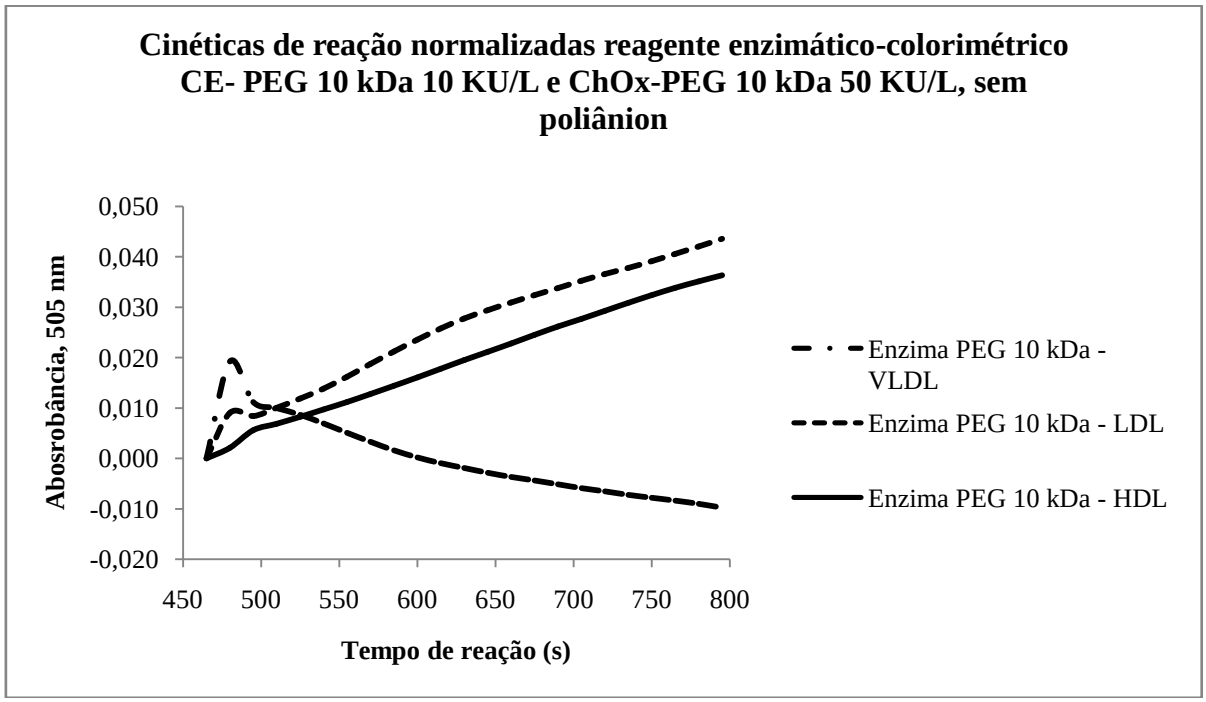


FIGURA 52 – Cinéticas de reação normalizadas reagente enzimático-colorimétrico com 10 vezes a concentração de enzimas mPEG 10 kDa, sem poliânion.
As cinéticas de reação são semelhantes às obtidas com as enzimas conjugadas com mPEG-NHS 5 kDa.

A presença do poliânion ácido fosfotúngstico na reação com LDL inibiu o crescimento da absorbância após a adição da PARTE 2 do reagente enzimático-colorimétrico. A partir dos 650 segundos a reação alcança um platô na absorbância. A reação com HDL e VLDL não apresentam diferença na cinética de reação quando comparada ao mesmo reagente sem o poliânion (**FIGURAS 53 e 54**).

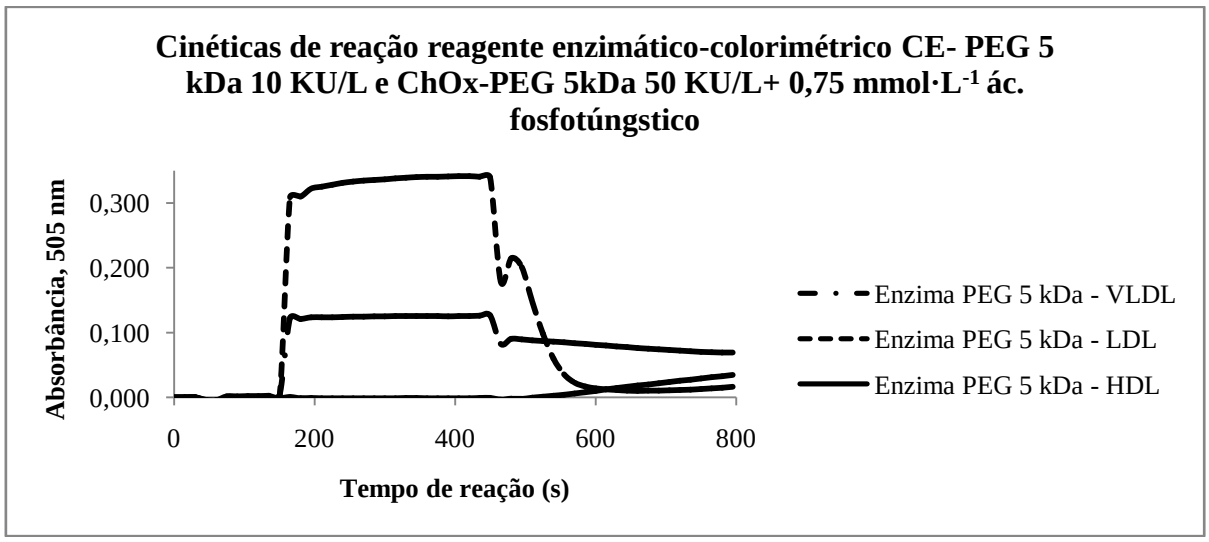


FIGURA 53 – Cinéticas de reação reagente enzimático-colorimétrico com 10 vezes a concentração de enzimas mPEG 5 kDa, associado a 0,75 mmol·L^{-1} de ácido fosfotúngstico.

Cinéticas de reação do reagente enzimático-colorimétrico com CE-5kDa 10 KU/L e ChOx-10kDa 50 KU/L associado a 0,75 mmol·L^{-1}

Com a normalização das cinéticas de reação (**FIGURA 54**) fica mais evidente a formação do platô na reação aos 600 segundos de reação com LDL como substrato. A adição do poliânion foi eficaz na inibição do incremento da absorbância.

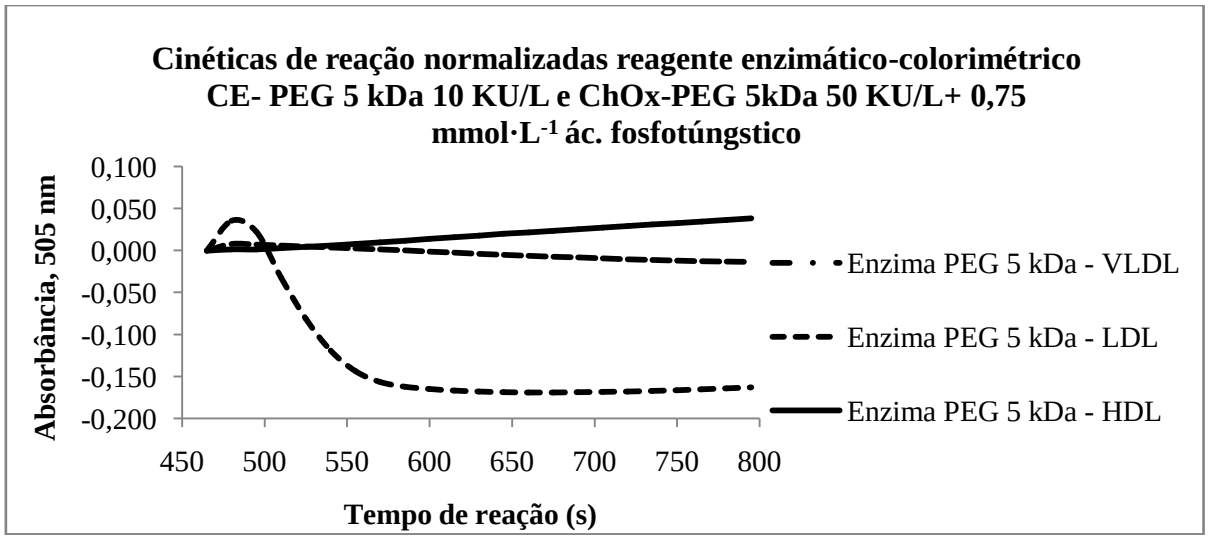


FIGURA 54 – Normalização das cinéticas de reação reagente enzimático-colorimétrico com 10 vezes a concentração de enzimas mPEG 5 kDa, associado a 0,75 mmol·L^{-1} de ácido fosfotúngtico.

RESULTADOS

A adição de ácido fosfotúngstico ao reagente enzimático colorimétrico contendo enzimas peguiladas com mPEG-NHS 10 kDa (**FIGURAS 55 e 56**), teve a mesma ação as lipoproteínas quando comparado ao reagente contendo enzimas peguiladas com mPEG-NHS 5 kDa associado ao ácido fosfotungstico.

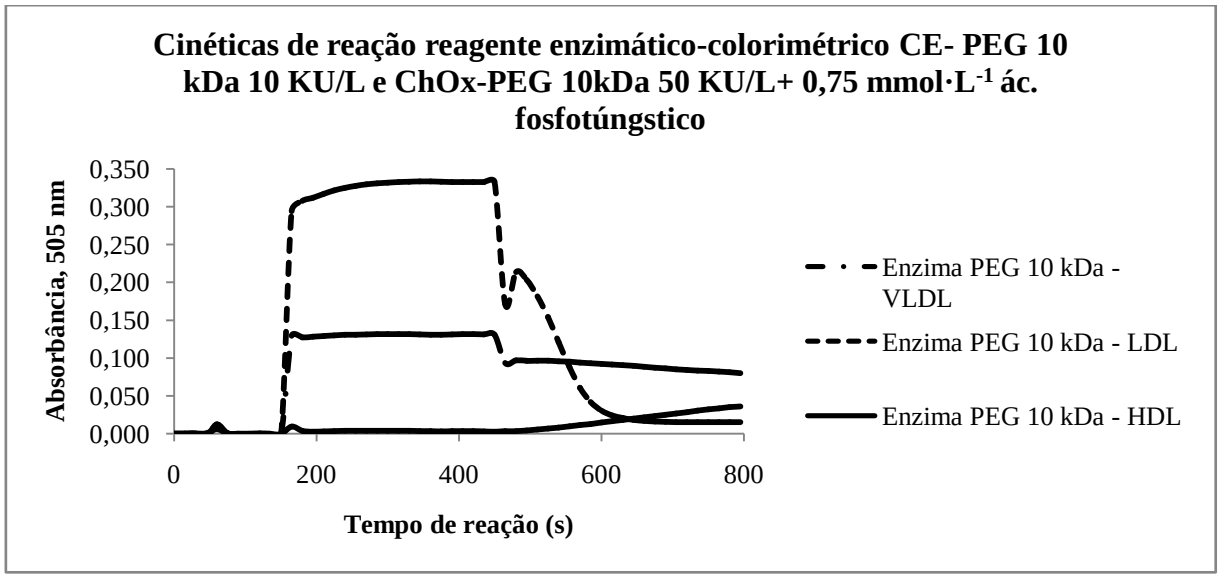


FIGURA 55 – Cinéticas de reação reagente enzimático-colorimétrico com 10 vezes a concentração de enzimas mPEG 10 kDa, associado a 0,75 mmol·L^{-1} de ácido fosfotúngstico.

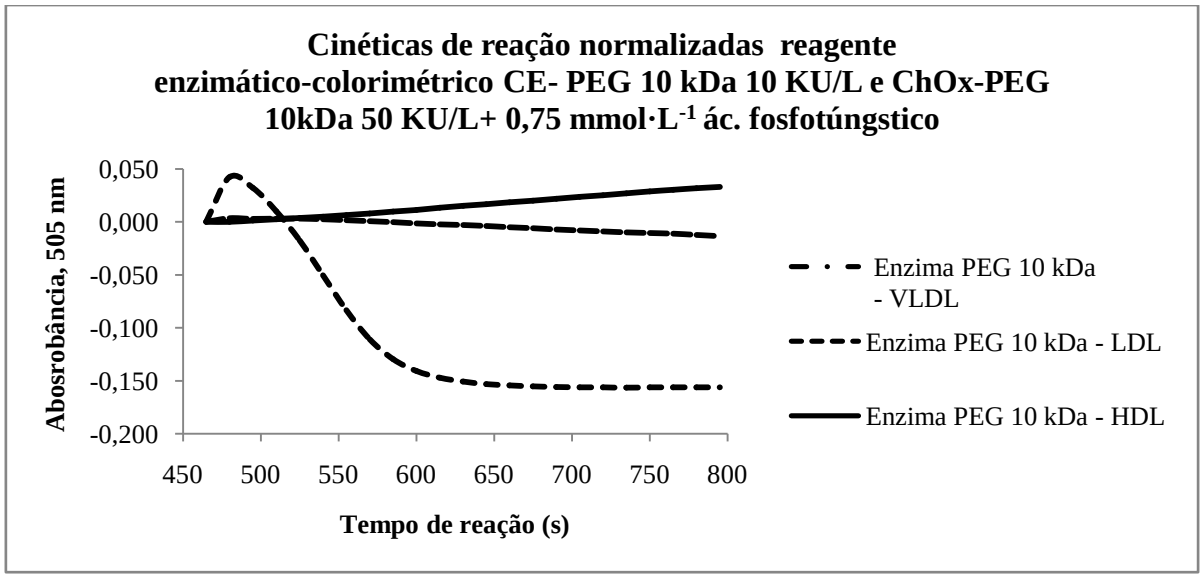


FIGURA 56 – Normalização das cinéticas de reação reagente enzimático-colorimétrico com 10 vezes a concentração de enzimas mPEG 10 kDa, associado a 0,75 mmol·L^{-1} de ácido fosfotúngstico.

A α-ciclodextrina sulfato, utilizada na concentração de 0,5 mmol·L^{-1} e associada ao dextran sulfato não foi capaz de inibir o incremento da absorbância na reação com a LDL, como obtido para ácido fosfotúngstico, independente da massa molecular do polietilenoglicol utilizado para a peguilação das enzimas (**FIGURAS 57, 58 59 e 60)**.

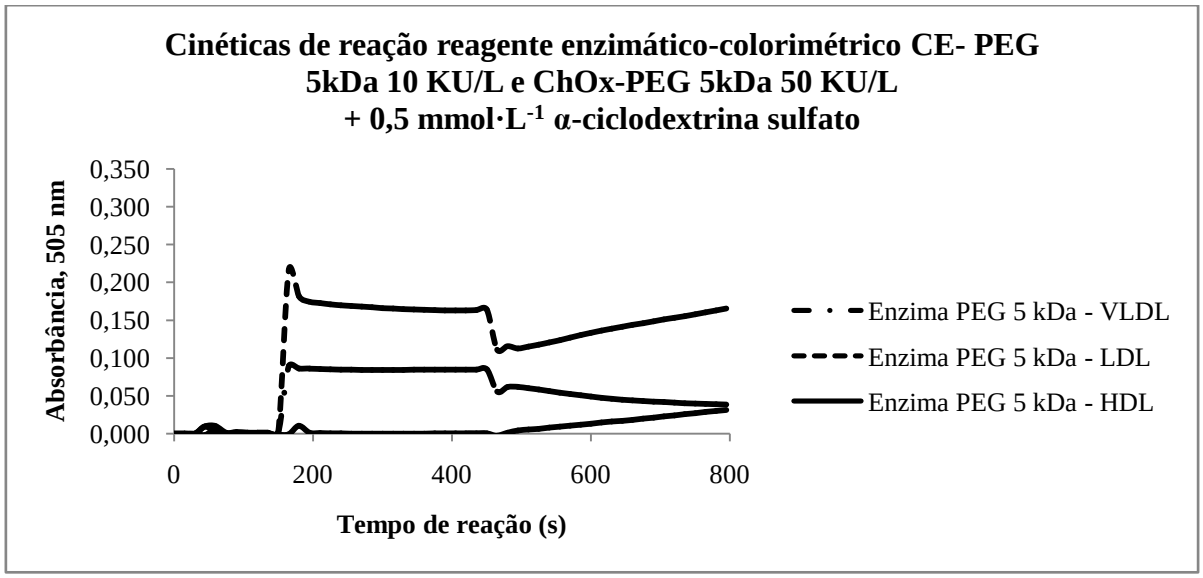


FIGURA 57 - Cinéticas de reação reagente enzimático-colorimétrico com 10 vezes a concentração de enzimas mPEG 5 kDa + 0,5 mmol·L^{-1} α-ciclodextrina sulfato

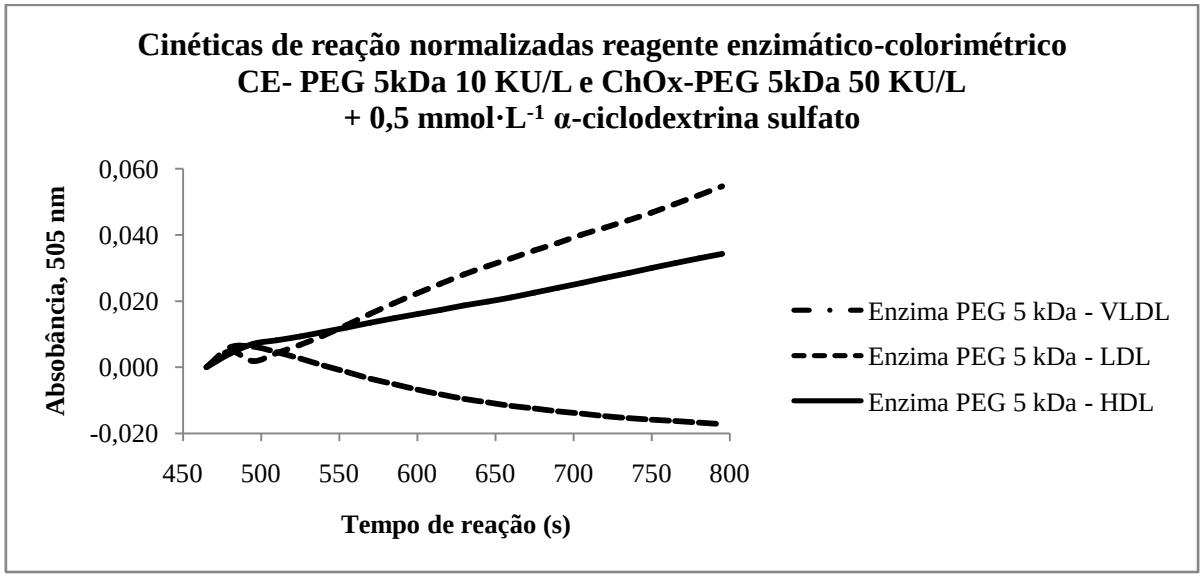


FIGURA 58 – Normalização das cinéticas de reação reagente enzimático-colorimétrico com 10 a concentração de enzimas mPEG 5 kDa + 0,5 mmol·L^{-1} α-ciclodextrina sulfato.

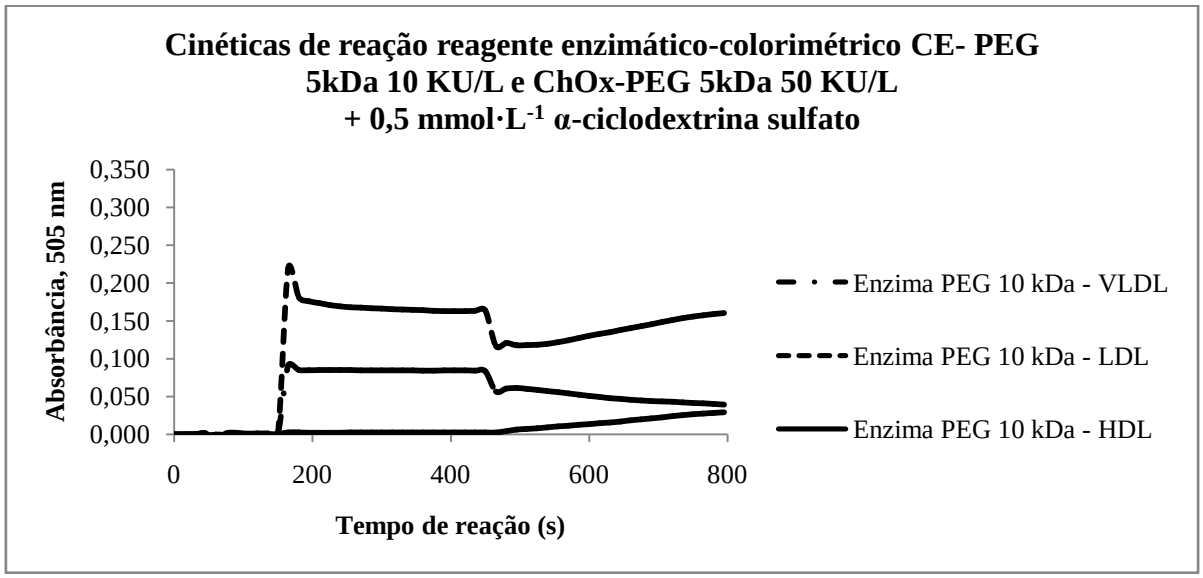


FIGURA 59 - Cinéticas de reação reagente enzimático-colorimétrico com 10 vezes a concentração de enzimas mPEG 10 kDa + 0,5 mmol·L^{-1} α-ciclodextrina sulfato

A associação de 0,5 mM de α-ciclodextrina sulfato ao reagente contendo enzimas peguiladas com mPEG-NHS 10 kDa não impediu a elevação da absorbância na reação com a LDL.

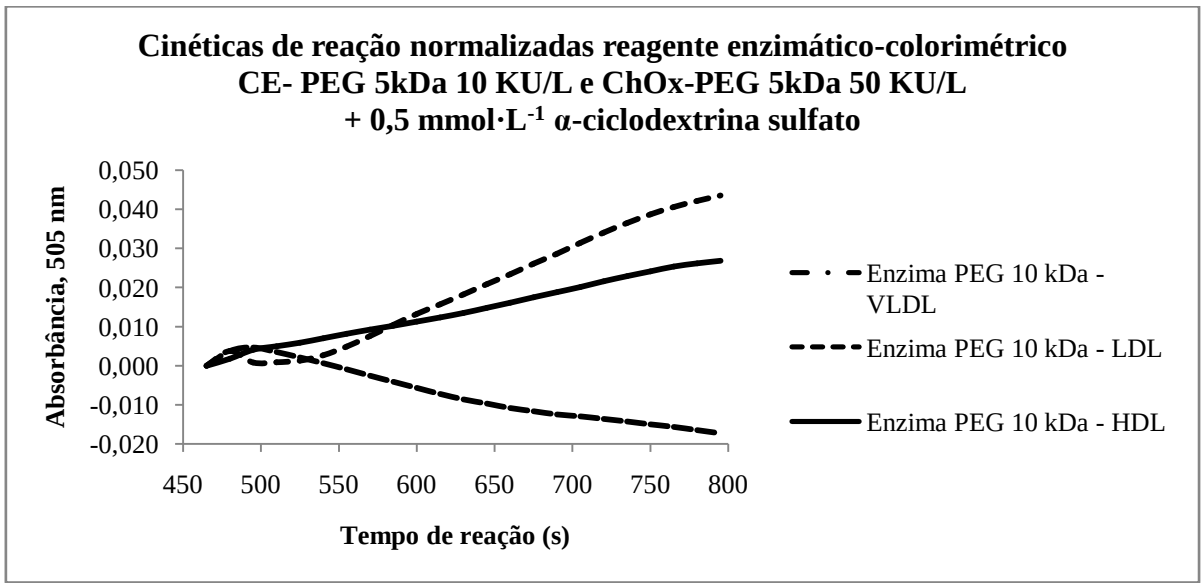


FIGURA 60 – Cinéticas de reação normalizadas reagente enzimático-colorimétrico com 10 vezes a concentração de enzimas mPEG 10 kDa + 0,5 mmol·L^{-1} α-ciclodextrina sulfato.

RESULTADOS

O aumento de dez vezes na concentração nominal das enzimas peguiladas promoveu o aumento do $\Delta ABS_{(800\ segundos\ -\ 465\ segundos)}$ da reação com as lipoproteínas HDL e LDL. Entretanto, o aumento da concentração das enzimas promoveu queda de especificidade do sistema, evidenciado pelo incremento de absorbância da reação com LDL. Com a adição do ácido fosfotúngstico ao reagente, a reação com LDL não apresentou mais incremento de absorbância após a adição da PARTE 2 do reagente. A reação das demais lipoproteínas não foi afetada. A adição de 0,5 mM de α-ciclodextrina evidenciou ser incapaz de evitar a elevação da absorbância após a adição da PARTE 2 do reagente.

Apesar das cinéticas de reação do reagente com maior concentração de enzimas serem visualmente semelhante às reações com enzimas nativas, elas são estatisticamente distintas (**Tabela 19**). Após a adição do ácido fosfotúngstico a cinética de reação utilizando LDL como substrato deixa de apresentar correlação com o reagente elaborado com enzimas nativas.

Todas as comparações apresentaram | t valor | maior que t crítico. A hipótese nula é descartada. A adição do poliânion altera as cinéticas de reação das lipoproteínas. Há elevada correlação entre as cinéticas de reação, mesmo após a modificação enzimática e adição do poliânion. Exceto para a cinética de reação do LDL na presença de ácido fosfotúngstico.

Tabela 19 – Teste *t*-Student para comparativo das cinéticas enzimáticas.

Teste de *t*-Student, comparativo das cinéticas de reação entre as enzimas nativas e enzimas peguiladas na presença e ausência de ácido fosfotúngstico.

Teste t bicaudal para dados emparelhados
H_0:μ_d =0 – adição do poliânion e a modificação enzimática não promoveu alteração das cinéticas de reação
H_1:$\mu_d \neq 0$ – adição do poliânion e a modificação enzimática promoveu alteração das cinéticas de reação

5.5.2

n amostral – 11 intervalos de medição de absorbância (650-800 segundos de reação)
t crítico 3,17 – para *n* = 11 e *p (0,01)*

Se | *t* valor | > rejeita-se hipótese nula.

	Ácido fosfotúngstico + Enzimas PEG		**Enzimas PEG**	
	HDL	LDL	HDL	LDL
t valor	31,24	116,93	27,48	-5,88
Correlação de Pearson (r)	0,999	-0,775	1,000	1,000

Os cálculos estatísticos foram realizados com MS-Excel 2010 - Microsoft

Tabela 20 – Atividade residual das reações catalisadas pelas enzimas peguiladas

Reagente enzimático-colorimétrico	Lipoproteínas HDL $\Delta ABS_{(800s-650s)}$ / ativ. residual	LDL $\Delta ABS_{(800s-650s)}$ / ativ. residual	VLDL $\Delta ABS_{(800s-465s)}$ / ativ. residual
Enzimas nativas e sem poliânion	0,0259 / 100%	0,0362 / 100%	0,0248/100%
Enzimas 5 kDa mPEG	0,0018 / 7,0%	0,0052 / 14,3%	-0,0038/ -17,0%
Enzimas 10 kDa mPEG	0,0014 / 5,5%	0,0042 / 11,7%	-0,0030/ -13,4%
Enzimas 5 kDa mPEG + ac. Fosfotúngstico 0,75 mmol·L^{-1}	0,0012 / 4,6%	-0,0001 / -0,2%	-0,0039 / -17,8%
Enzimas 10 kDa mPEG + ac. Fosfotúngstico 0,75 mmol·L^{-1}	0,0005 / 1,9%	0,0019 / 5,2%	-0,0055 / -24,6%
Enzimas 5 kDa mPEG + α-ciclodextrina sulfato 0,5 mmol·L^{-1}	0,0013 / 5,1%	0,0004 / 1,1%	- 0,0070 / -28,1%
Enzimas 10 kDa mPEG + α-ciclodextrina sulfato 0,5 mmol·L^{-1}	0,0017 / 6,6%	-0,0004 / 1,1%	-0,00643 / -25,9%
10x [ ] Enzimas 5 kDa mPEG	0,0161 / 62,4%	0,02385 / 65,9%	-0,0179 / 72,4%
10x [ ] Enzimas 10 kDa mPEG	0,0155 / 60,0%	0,0145/ 40,1%	-0,0120 / -48,5%
10x [ ] Enzimas 5 kDa mPEG + ac. Fosfotúngstico 0,75 mmol·L^{-1}	0,0176 / 68,0%	0,0051 / 14,0%	- 0,0146 / -58,9%
10x [ ] Enzimas 10 kDa mPEG + ac. Fosfotúngstico 0,75 mmol·L^{-1}	0,0167 /64,63%	-0,0001 / -0,3%	-0,0122 / -49,2%
10x [ ] Enzimas 5 kDa mPEG + α-ciclodextrina sulfato 0,5 mmol·L^{-1}	0,0147 / 56,8 %	0,0239 / 65,9%	-0,0206 / -83,1
10x [ ] Enzimas 10 kDa mPEG + α-ciclodextrina sulfato 0,5 mmol·L^{-1}	0,0123 / 47,5%	0,0229 / 63,1%	-0,0199 / -80.2

1- Para o cálculo de atividade residual, o ΔABS para o reagente enzimático-colorimétrico com enzimas nativas e sem poliânion foi considerado como 100%.
2- Para a medição de ΔABS para as cinéticas de reação com HDL e LDL utiliza-se o intervalo entre 650 a 800 segundos para determinar a variação de absorbância em platôs formados em algumas das cinéticas de reação.
3- Utiliza-se o intervalo entre 465 a 800 segundos para determinação ΔABS para as reações com VLDL devido à característica de ponto final da cinética de reação da lipoproteína. Intervalos de tempo menores resultariam em valores de ΔABS próximos de 0.

RESULTADOS

O reagente contendo a associação de 0,75 mmol·L^{-1} de ácido fosfotúngstico mais 10 kU/L de CE e 50 kU/L de ChOx, conjugadas com mPEG-NHS 10 kDa apresentou a capacidade de inibir a ação das enzimas sobre as ApoB-lipoproteínas e maior sensibilidade para detecção no produto corado pelo espectrofotômetro avaliadas. Combinação semelhante à citada acima, empregando enzimas conjugadas com mPEG-NHS 5kDa, também foi eficaz para a inibição da reação das lipoproteínas LDL e VLDL. Entretanto, há um pequeno incremento na absorbância para a reação que utiliza o LDL como substrato, indicando que a associação 0,75 mmol·L^{-1} de ácido fosfotúngstico mais 10 kU/L de CE e 50 kU/L de ChOx-conjugadas com mPEG-NHS 10 seja a mais eficaz para a inibição das reações com LDL e VLDL.

5.6 Determinação da variação de entalpia aparente de reação e constante de Michaelis-Menten.

5.6.1 Enzimas nativas – substrato lipoproteínas.

Foram avaliados diferentes parâmetros nos ensaios realizados no microcalorímetro, variando-se concentração de enzima, substrato, volume de injeção e tempo de reação até a definição do protocolo mais adequado para o cálculo de ΔH_{app} de reação e de K_m das enzimas nativas. Entretanto, todos os protocolos avaliados para a enzima colesterol oxidase não forneceram resultados satisfatórios para determinação de ΔH_{app} ou K_m utilizando as lipoproteínas como substrato. As deflexões resultantes da catálise pela ChOx não retornavam à linha base e apresentavam DP baixo, com termograma pouco diferente do branco reacional.

A hidrólise da amostra de VLDL por CE não liberou calor suficiente para discriminar a reação de hidrólise do branco reacional, o que impossibilitou a determinação de ΔH_{app} e K_m para a catálise desse substrato.

. A **FIGURA 61** apresenta o termograma da reação de hidrólise do HDL pela CE, que libera para o meio 2,44 kcal/mol de linoleato de colesterila.

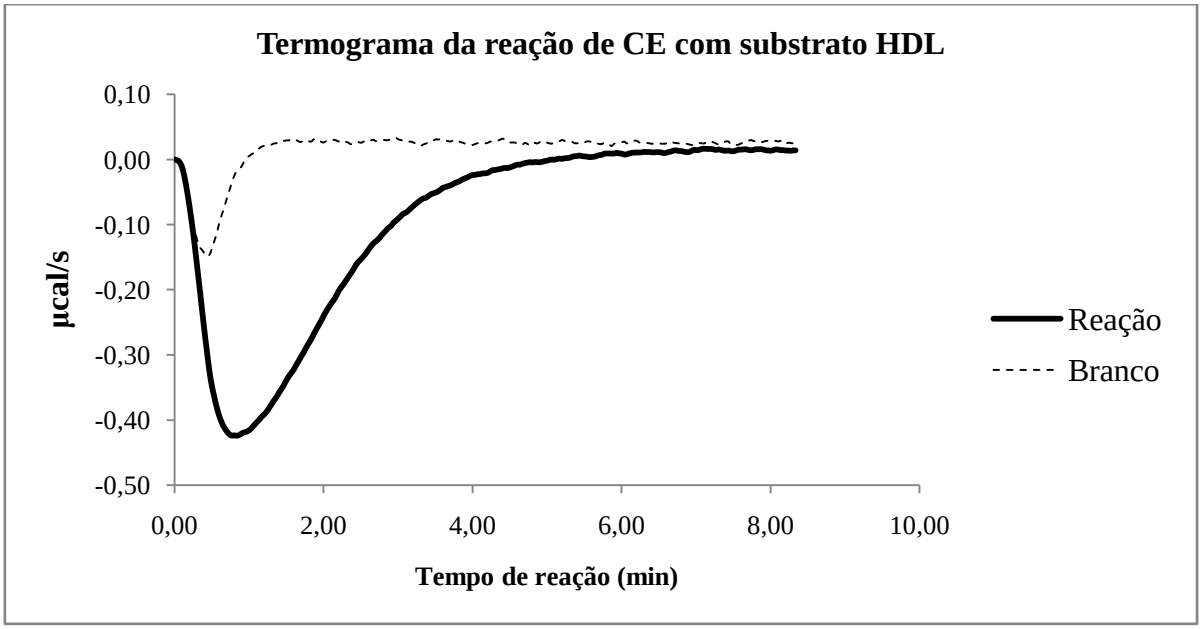


FIGURA 61 – Termograma da reação de CE com substrato HDL.
Ensaio realizado com injeção única de 10 µL de amostra. Ensaio realizado em tampão fosfato 10 mmol·L^{-1} pH 7,0 + NaCl 0,9% p/v, 37 ºC, Área corrigida da deflexão é de -41,3 µcal

Posterior à determinação da entalpia de reação para a hidrólise de HDL pela CE, foi realizado a titulação isotérmica da reação enzimática (**FIGURA 62**). A cinética enzimática (**FIGURA 63**) é obtida por transformação matemática dos dados provenientes da titulação da hidrólise de HDL. A determinação da velocidade de reação é calculada pela equação $v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{1}{V \cdot \Delta H_{app}} \cdot \frac{dq}{dt}$

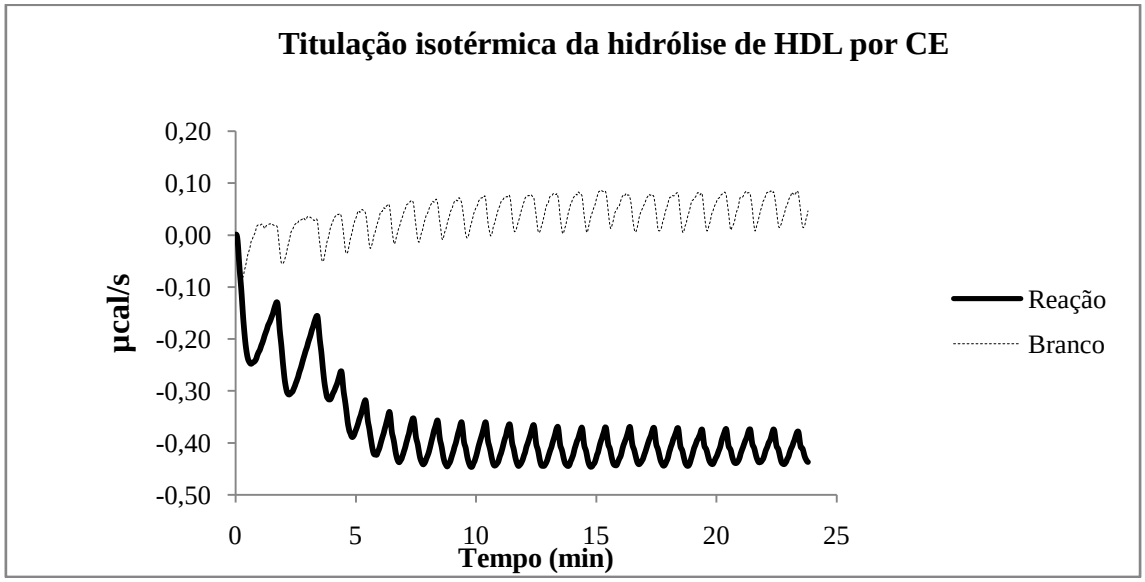


FIGURA 62 – Titulação isotérmica da hidrólise de HDL por CE.
Injeções consecutivas, intervaladas a cada 1 minuto de 5,0µL/min de amostra de HDL com concentração de linoleato de colesterila 1,69 mmol·L^{-1}. Ensaio realizado em tampão fosfato 10 mmol·L^{-1} pH 7,0 + NaCl 0,9% p/v, 37 ºC. Deflexões na curva são causadas pela hidrólise de lipídeos presentes na lipoproteína.

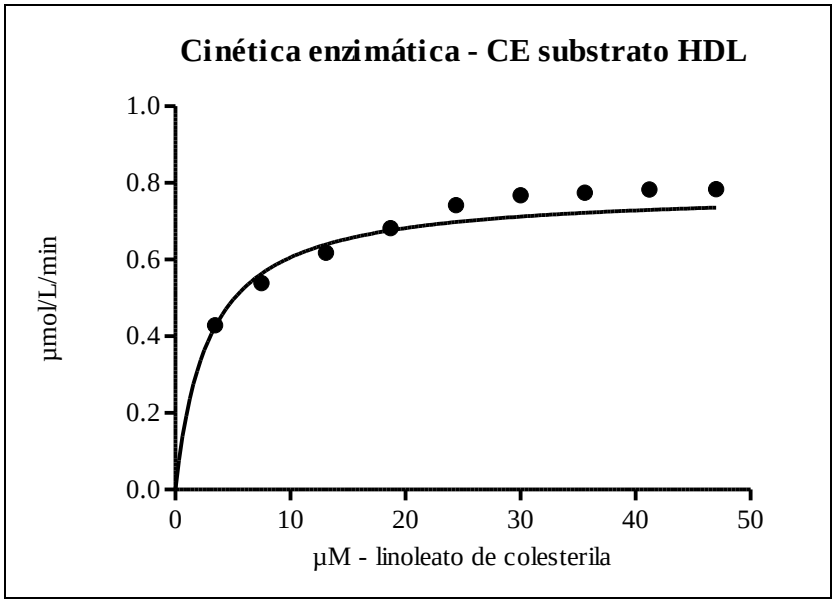


FIGURA 63 – Cinética enzimática – CE substrato HDL.

RESULTADOS

Como a determinação do K_m foi realizada utilizando a linearização de Lineweaver-Burk é necessário aplicar regressão dos mínimos quadrados aos dados para definir a inclinação e intercepto da curva. A regressão dos mínimos quadrados leva em consideração os valores absolutos dos pontos da curva e como consequência os menores valores com maiores inversos têm maior impacto para determinação da inclinação da curva. A exatidão dos resultados na região mais próxima do intercepto da curva é comprometida. Para minimizar o impacto dos pontos de maiores inversos, utilizam-se pesos estatísticos na regressão linear (JAIN, 2010).

Os inversos da velocidade de reação e a concentração de substrato foram utilizados para a linearização dos resultados da cinética de reação das de hidrólise do HDL pela CE (**FIGURA 64**).

.

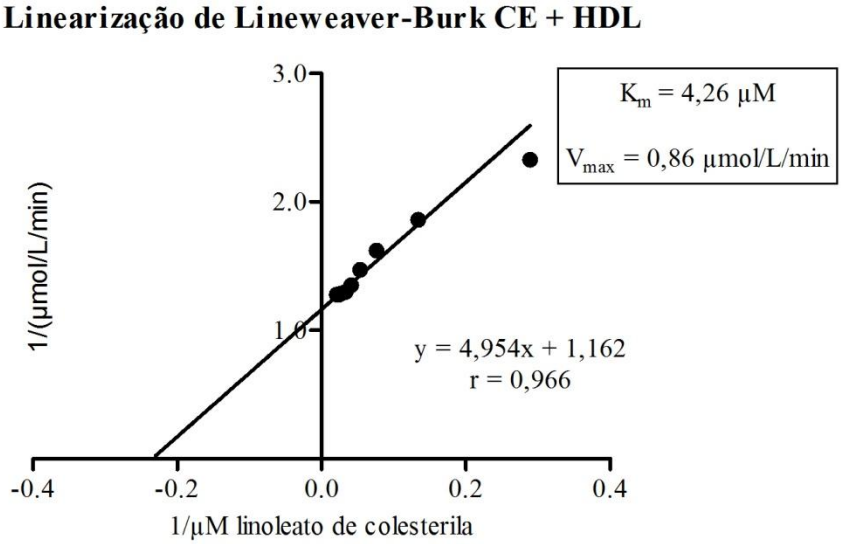


FIGURA 64 – Linearização de Lineweaver-Burk para CE + HDL.
Correlação linear ajustada por peso estatístico de cada ponto. Fator de peso utilizado $1/x^2$. Regressão realizada em GraphPad Prism 5.03.

A ΔH_{app},(**FIGURA 65**) , titulação isotérmica de hidrólise do substrato (**FIGURA 66**), cinética enzimática (**FIGURA 67**) e determinação de valor de K_m também foram (**FIGURA 68**) também foram determinados para CE nativa utilizando LDL como substrato, por meio de ITC.

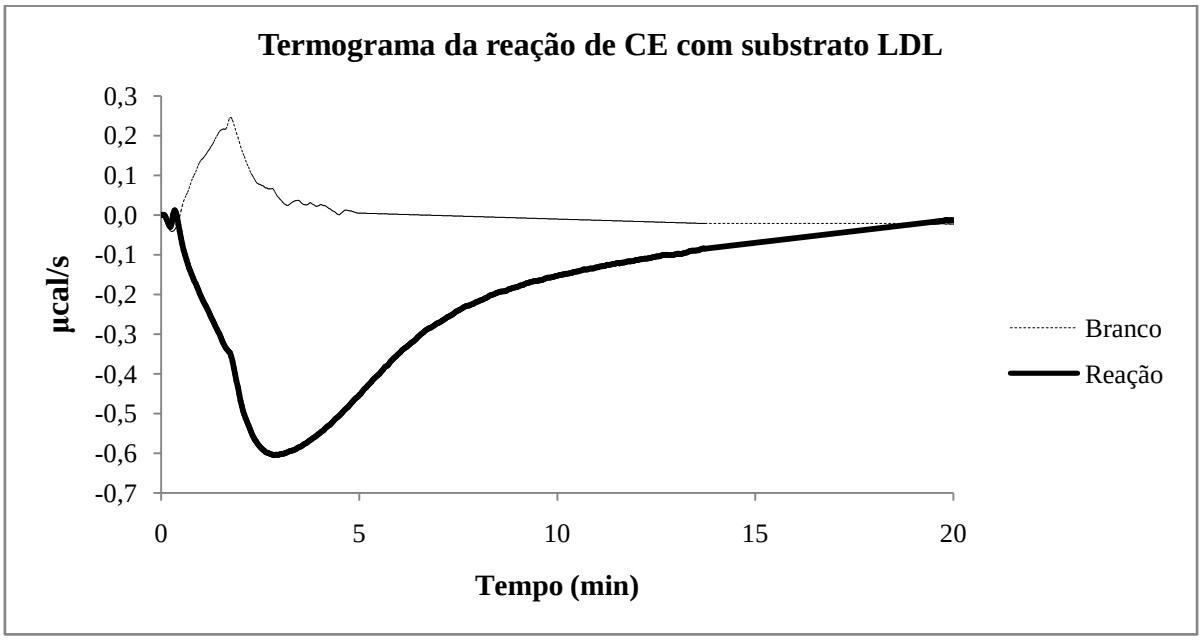


FIGURA 65 – Termograma da reação de CE com substrato LDL.
Ensaio realizado com injeção única de 40 µL de amostra em tampão fosfato 10 mmol·L^{-1} pH 7,0 + NaCl 0,9% p/v, 37 ºC. Área corrigida da deflexão é de -278,7 µcal. A reação de hidrólise do LDL pela CE libera para o meio -1,96 kcal/mol de linoleato de colesterila.

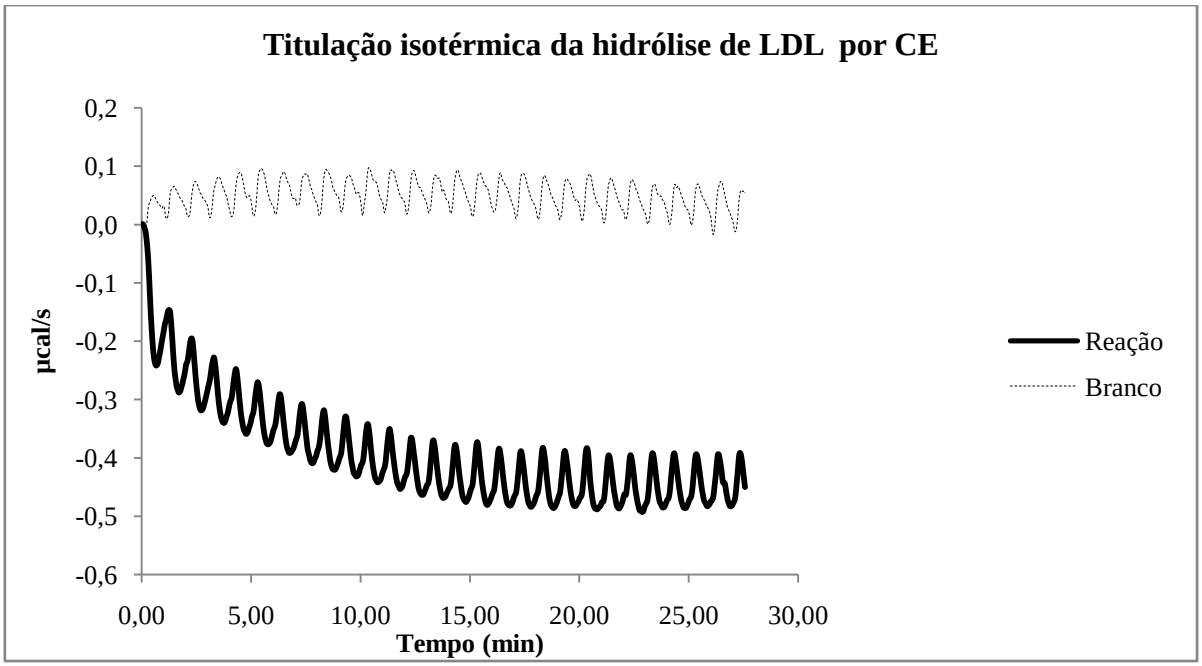


FIGURA 66 – Titulação isotérmica da hidrólise de LDL por CE.
Ensaio realizado em tampão fosfato 10 mmol·L^{-1} pH 7,0 + NaCl 0,9% p/v, 37 ºC, com injeção de 5,0µL/min de amostra de LDL com concentração de linoleato de colesterila 3,56 mmol·L^{-1}. Deflexões na curva são causadas pela hidrólise de lipídeos presentes na lipoproteína.

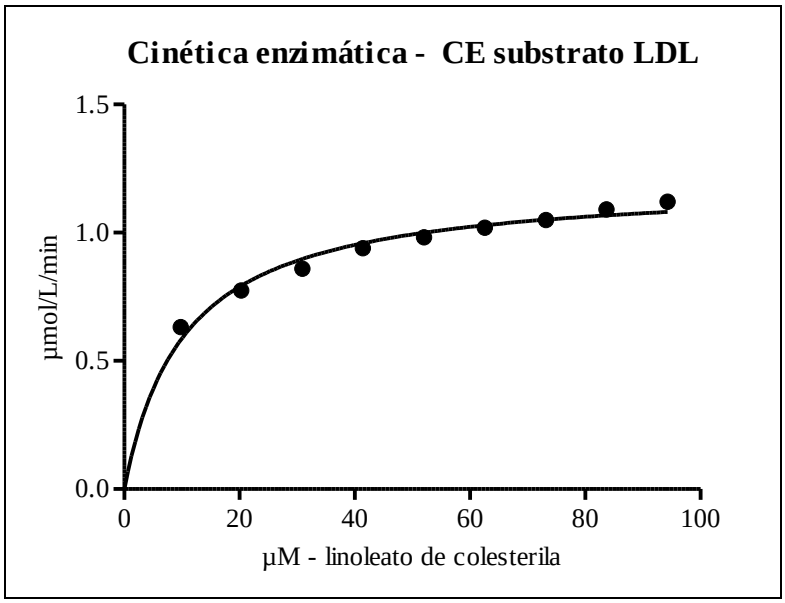


FIGURA 67 – Cinética enzimática – CE substrato LDL.
A cinética enzimática é obtida por transformação matemática dos dados provenientes da titulação da hidrólise de LDL (fig.66).

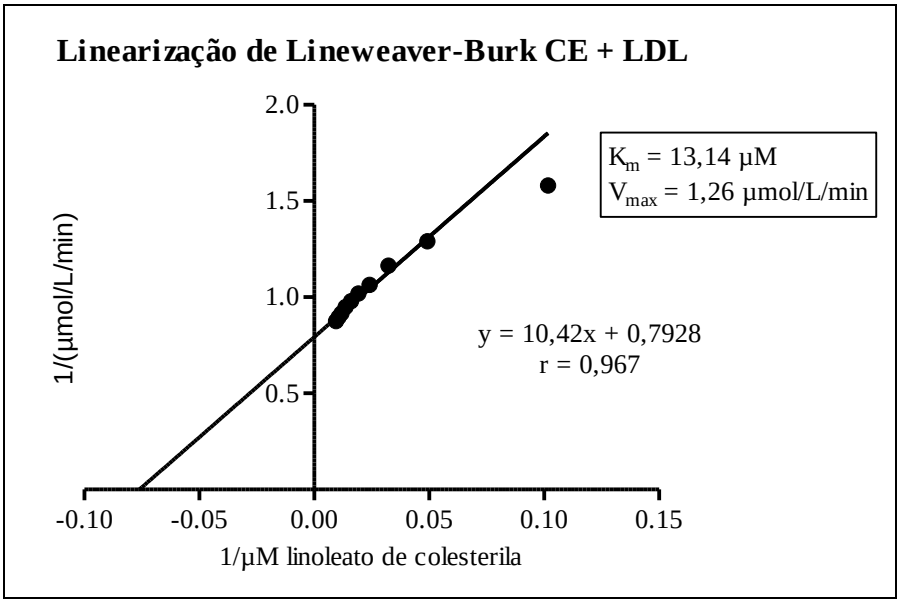


FIGURA 68 – Linearização de Lineweaver-Burk para CE + HDL.
Correlação linear ajustada por peso estatístico de cada ponto. Fator de peso utilizado $1/x^2$. Regressão realizada em GraphPad Prism 5.03.

O resumo dos resultados é apresentado na **Tabela 21.**

Tabela 21 – Parâmetros enzimáticos para colesterol esterase nativa

Parâmetro	**Substrato**	
	HDL	*LDL*
ΔH_{app}	-2,44 kcal/mol de linoleato de colesterila	-1,96 kcal/mol de linoleato de colesterila
K_m	4,26 µmol·L^{-1}	13,14 µmol·L^{-1}

Parâmetros definidos em tampão fosfato 10 mmol·L^{-1} pH 7,0 + NaCl 0,9% p/v a 37 ºC.

5.6.2 Colesterol esterase peguilada – substrato lipoproteínas.

Os mesmos passos operacionais no microcalorímetro para determinação de ΔH_{app} e K_m nas enzimas nativas foram realizados para CE-PEG- 10 kDa. Um menor número de ensaios foram realizados com ChOx-PEG e VLDL como substrato, mas os resultados foram insatisfatórios, assim como os outros obtidos anteriormente.

Durante a tentativa de determinação do K_m para CE-PEG 10 kDa com LDL como substrato, as injeções de amostra resultavam em deflexões de mesma magnitude. Mesmo variando-se concentração da enzima ou amostra a alturas das deflexões eram as mesmas. Dessa maneira não é possível observar um aumento na velocidade da reação, o que impediu a determinação do K_m. Porém, foi possível determinar a ΔH_{app} da reação de hidrólise para CE-PEG utilizando LDL como substrato (**FIGURA 73**).

Para a CE-PEG utilizado HDL como substrato a determinação dos parâmetros cinéticos foram obtidos satisfatoriamente. Os resultados estão demonstrados nas **FIGURAS 69, 70, 71 e 72**.

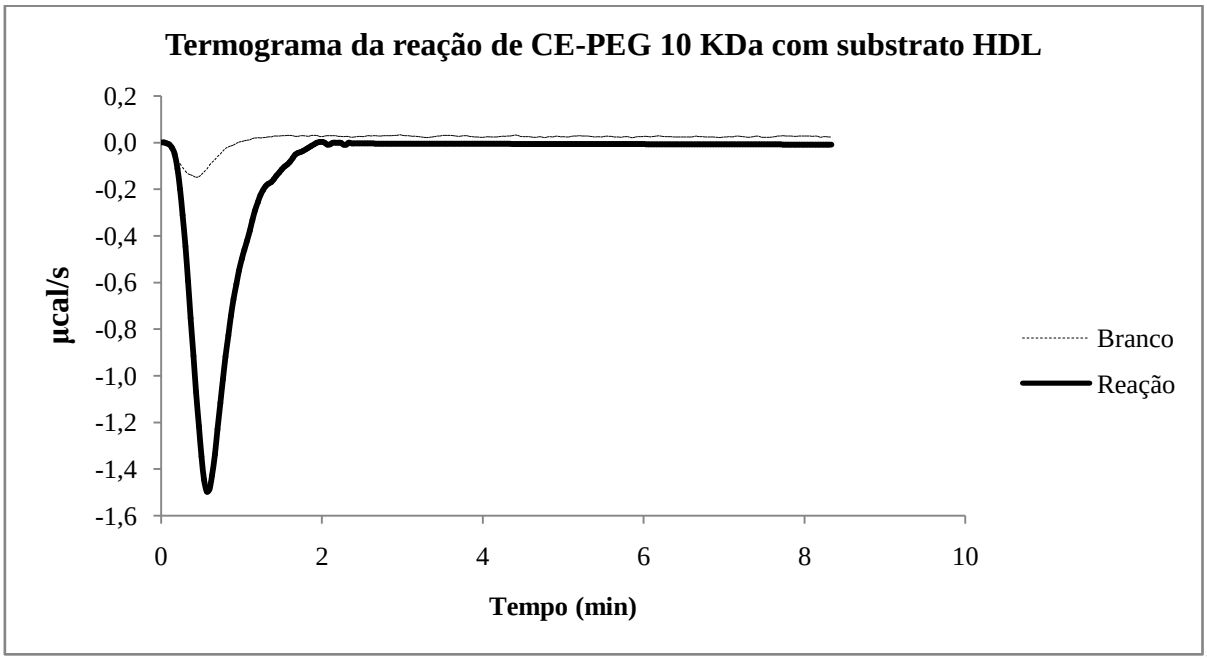


FIGURA 69 - Termograma da reação de CE-PEG 10 kDa com substrato HDL.
Ensaio realizado com injeção única de 10 µL de amostra. Ensaio realizado em tampão fosfato 10 mmol·L^{-1} pH 7,0 + NaCl 0,9% p/v. 37 ºC. Área corrigida da deflexão é de -48,5 µcal. A reação de hidrólise do HDL pela CE-PEG 10 kDa libera para o meio -2.87 kcal/mol de linoleato de colesterila.

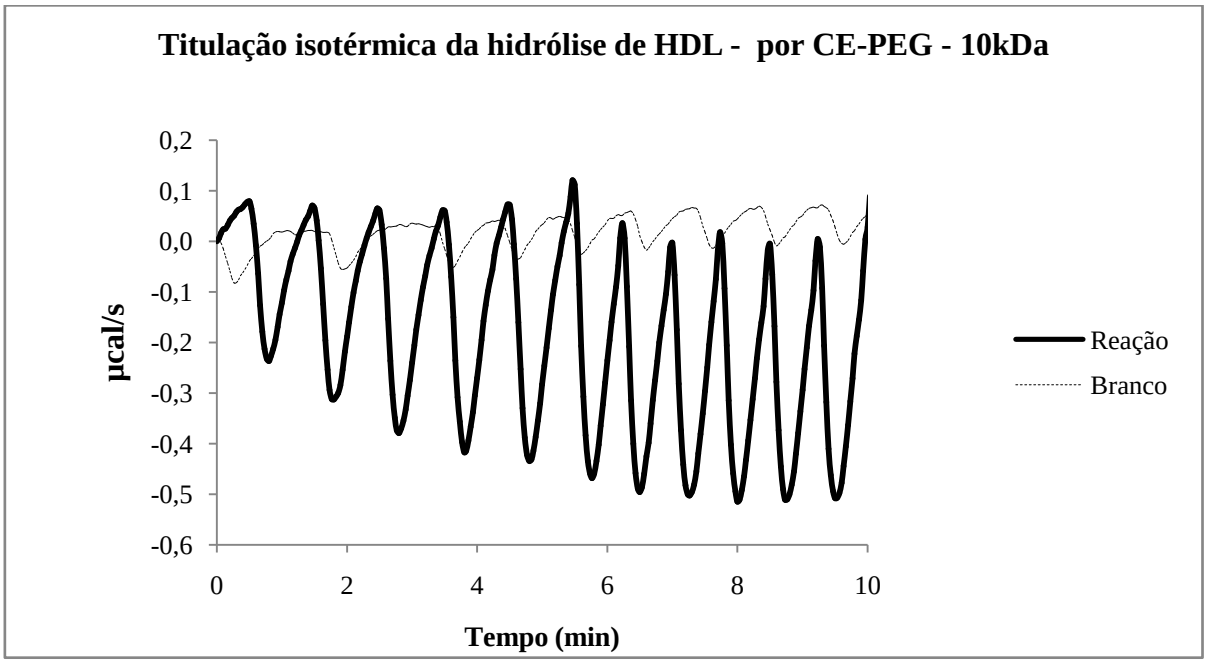


FIGURA 70 – Titulação isotérmica da hidrólise de HDL por CE-PEG – 10 kDa.
Injeção de 5,0µL/min de amostra de HDL com concentração de linoleato de colesterila 1,69 mmol·L^{-1}. Ensaio realizado em tampão fosfato 10 mmol·L^{-1} pH 7,0 + NaCl 0,9% p/v, 37 ºC. Deflexões na curva são causadas pela hidrólise de lipídeos presentes na lipoproteína.

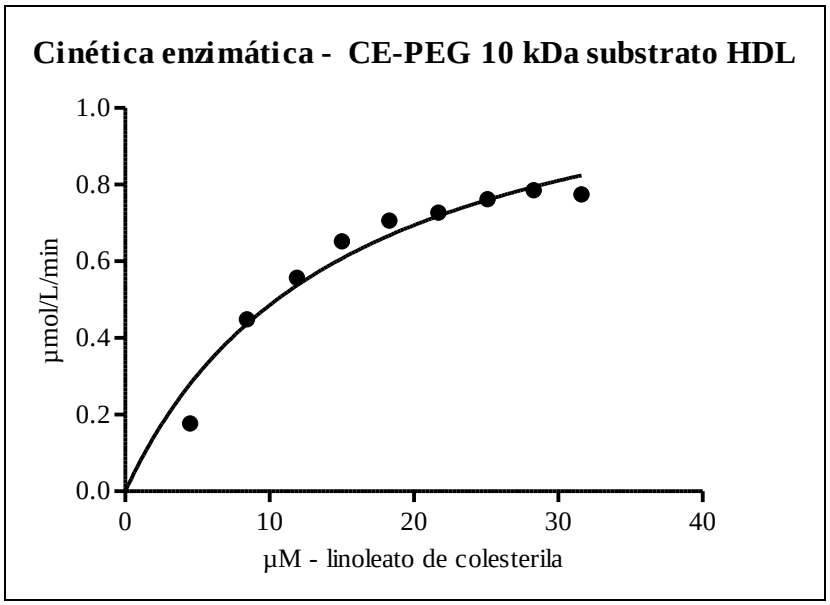


FIGURA 71 – Cinética enzimática – CE substrato HDL.
Cinética enzimática é obtida por transformação matemática dos dados provenientes da titulação da hidrólise de HDL pela enzima CE-PEG 10 kDa (fig.70).

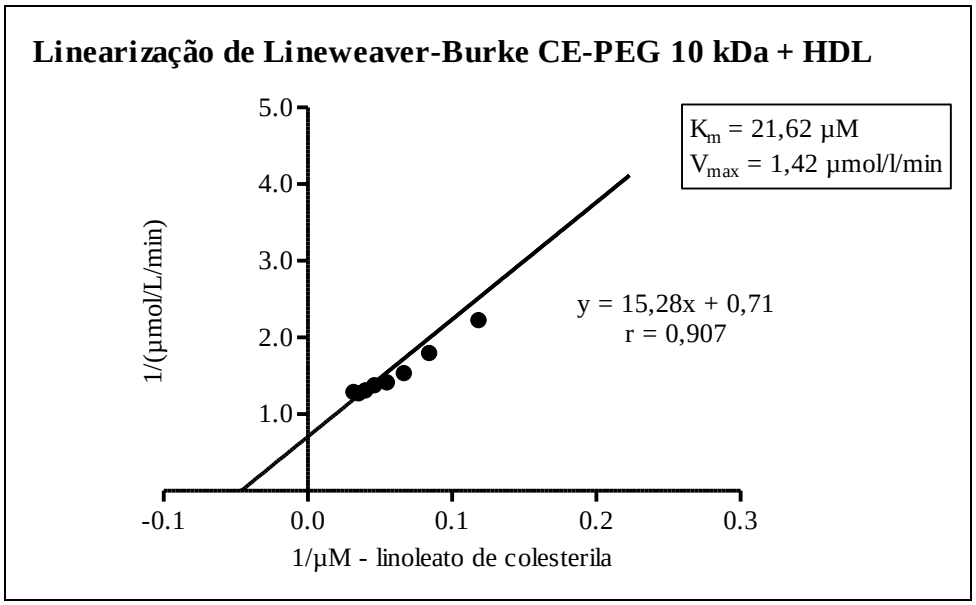


FIGURA 72 – Linearização de Lineweaver-Burk para CE-PEG 10 kDa + HDL.
Correlação linear ajustada por peso estatístico de cada ponto. Fator de peso utilizado $1/x^2$. Regressão realizada em GraphPad Prism 5.03.

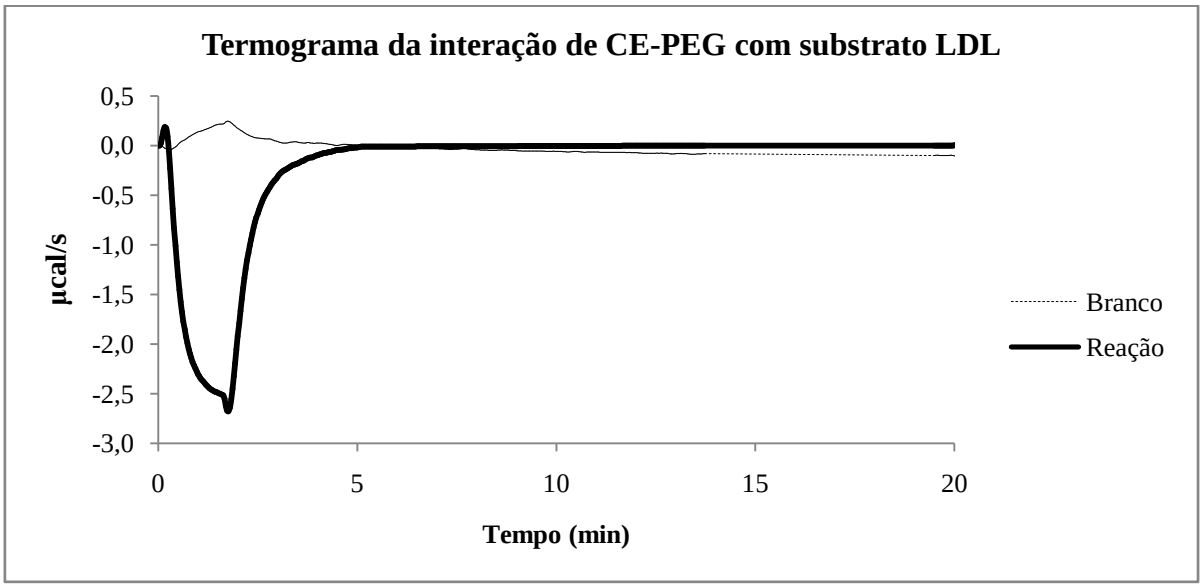


FIGURA 73 – Termograma da reação de CE-PEG 10 kDa com substrato LDL.
Área corrigida da deflexão negativa é de -304,3 µcal. Ensaio realizado em tampão fosfato 10 mmol·L^{-1} pH 7,0 + NaCl 0,9% p/v. 37 ºC. A reação de interação do LDL pela CE-PEG – 10 kDa libera para o meio -2,14 kcal/mol de linoleato de colesterila.

Todos os resultados obtidos utilizando ITC para a determinação dos parâmetros cinéticos das enzimas CE nativa e após a peguilação estão resumidos na **Tabela 22**.

Tabela 22 – Parâmetros enzimáticos para colesterol esterase

	Substrato	
Parâmetro enzimático	*HDL*	*LDL*
CE nativa		
ΔH_{app}	-2,44 kcal/mol de linoleato de colesterila	-1,96 kcal/mol de linoleato de colesterila
K_m	4,26 µmol·L^{-1}	13,14 µmol·L^{-1}
CE – PEG 10 kDa		
ΔH_{app}	-2,87 kcal/mol de linoleato de colesterila	-2,14 kcal/mol de linoleato de colesterila
K_m	21,62 µmol·L^{-1}	Não determinado

Parâmetros definidos em tampão fosfato 10 mmol·L^{-1} pH 7,0 + NaCl 0,9% p/v a 37 ºC.

6 DISCUSSÃO

6.1 Separação de lipoproteínas e determinação de suas características químicas e proteicas.

A separação das lipoproteínas ocorreu de maneira satisfatória. O aspecto de distribuição das faixas das lipoproteínas (**FIGURA 74**) ficou semelhante ao encontrado por Chung *et al.* (1980). Como os pacientes estavam em jejum de 12 horas, as amostras de soro são ausentes de partículas de quilomicra, assegurando que a faixa superior de lipoproteínas é composta exclusivamente de VLDL.

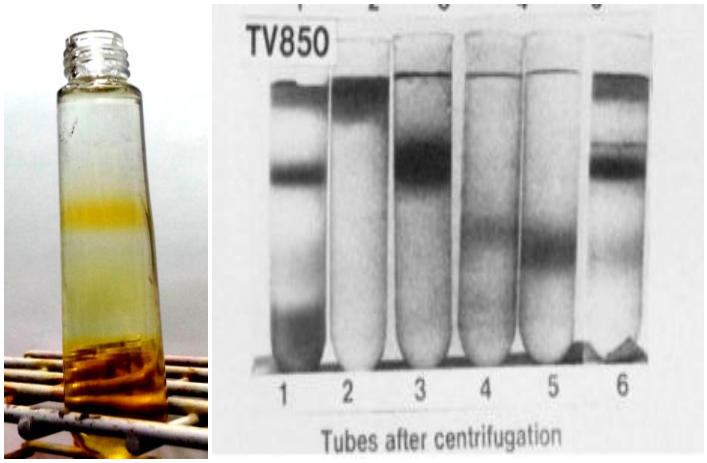


FIGURA 74 – Separação de lipoproteínas por gradiente descontínuo de densidade.
Tubo de ultracentrífuga utilizado na separação das lipoproteínas, comparado com o obtido por Chung *et. al*. (1980). Plasma humano (1); VLDL Humano (2); LDL Humano (3); HDL Humano (4); HDL Humano (5), Mistura de VLDL, LDL e HDL (6). *Fonte*: CHUNG *et al*., (1980)

A confirmação da separação foi realizada por testes imunoturbidimétricos. Como esperado, a faixa inferior, local com densidade mais elevada no tubo, continha a maior concentração de ApoA1, proteína de principal presença no HDL. As duas faixas superiores, situadas em região com menor densidade no tubo, continham duas faixas de lipoproteínas com elevada concentração de ApoB100. Sendo a faixa intermediária corresponde ao LDL e a superior ao VLDL.

As pequenas quantidades de Apo B100 na faixa que corresponde ao HDL e ApoA1 na de LDL podem ter sido causadas pela utilização de seringas para a remoção das lipoproteínas do tubo de centrifugação. Apesar de ter sido utilizado diferentes seringas para remoção de cada faixa de lipoproteína é difícil delimitar o início e o fim de cada faixa.

DISCUSSÃO

Outro motivo provável deve-se ao fato das lipoproteínas estarem distribuídas em um intervalo de densidade hidratada que possui fim e início comuns, resultando em um valor de densidade no qual seja possível encontrar partículas de HDL e LDL. O reagente imunoturbidimétrico também pode ter contribuído para a detecção de pequenas concentrações do contaminante. Como o reagente utilizado para o ensaio foi desenvolvido para determinações de apolipoproteínas em soro humano e não em frações do soro, sua sensibilidade analítica é ajustada para concentrações de lipoproteínas mais próximas da normalidade. Logo, quando se utiliza o reagente para quantificação de ApoB100 na amostra de HDL, as absorbâncias resultantes do ensaio estão próximas do limite de detecção do ensaio, região na qual a imprecisão do ensaio é maior, o que pode acarretar resultados com maior variação em torno do valor real da amostra. O mesmo se aplica para a detecção de ApoA1 nas partículas de LDL.

A separação de LDL e VLDL foi confirmada também pelos testes químicos. A fração correspondente ao LDL teve a maior concentração de colesterol total, diferente da fração VLDL, que continha grande quantidade de triglicérides e baixa concentração de colesterol total. A distribuição de colesterol e triglicérides, como foi encontrada nas frações das lipoproteínas, se deve ao papel fisiológico de cada uma. A LDL que possui maior concentração de colesterol total é a principal lipoproteína responsável pelo transporte de colesterol do fígado para os tecidos, já a VLDL tem como principal função o transporte de triglicérides (JONAS, 2008). As partículas de HDL e LDL apresentaram 82% e 75% de relação de colesterol esterificado por colesterol total, respectivamente. A maior porção de colesterol esterificado demonstra que a maior quantidade de colesterol transportado por essas lipoproteínas está no cerne na micela, o que corresponde ao demonstrado por Skipski (1967).

Mesmo com a possível contaminação cruzada entre as frações de lipoproteínas, o método desenvolvido por Chung *et al.* (1980) permite a separação das três classes de lipoproteínas com um grau de pureza adequado em um único ensaio, o que reduz o volume de amostra e trabalho necessário, caso fosse separado uma classe de lipoproteína por ensaio. Como a separação é rápida e seguida de diálise, mesmo a elevada concentração de sal não alterou significativamente as apolipoproteínas, já que elas foram reconhecidas pelos anticorpos dos reagentes imunoturbidimétricos e apresentavam concentrações séricas dentro do relatado por Jonas (2008).

DISCUSSÃO

6.2 Peguilação das enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase

É curioso que em nenhum momento Sugiuchi *et al.* (1995) tenham abordado o mecanismo pelo qual a peguilação das enzimas CE e ChOx reduzem a interação com LDL e VLDL. Nem mesmo outros pesquisadores como Warnick *et al*. (2001), que escreveram uma revisão sobre determinação de c-HDL, tentaram criar hipóteses ou investigar o mecanismo da inibição. Ambos apresentam somente os resultados obtidos com a peguilação. Sugiuchi *et al*. (1995) relatam a importância da conjugação com mPEG de alto peso molecular para dificultar a penetração das moléculas do polímero no interior das enzimas e eventual peguilação de regiões no sitio ativo, o que reduziria drasticamente a atividade da enzima.

Sugiuchi *et al*. (1995) realizaram a conjugação das proteínas com mPEG-NHS 6 kDa. Durante a prospecção por matérias primas não foi encontrado uma molécula de mPEG com essa massa molar, foram selecionadas então duas molécula de mPEG, com massa molar de 5 kDa e 10 kDa. Os ensaios seriam realizados com ambas as moléculas.

O processo de conjugação com mPEG-NHS é relativamente simples e prático, não sendo necessárias condições especiais para a realização do processo. Entretanto, o carbamato no mPEG-NHS tem baixa estabilidade e precisa ser adicionado no estado sólido ao tampão alcalino contendo as enzimas (ROBERTS *et al*., 2002; NANOCS, 2014). Caso houvesse a possibilidade de se utilizar uma solução de mPEG-NHS, o processo de peguilação poderia ser melhor controlado, resultando em conjugações mais uniformes, já que poderia ser mantida uma relação constante da solução de amostra que entraria em contato com a solução de mPEG-NHS.

O reagente de ninidrina atendeu as nossas necessidades para a determinação do grau de conjugação das enzimas, entretanto a reação com ninidrina é mais utilizada para a determinação de concentração de aminoácidos. Como há necessidade de aquecimento para realizar o ensaio, algumas proteínas podem desnaturar o que não ocorreria com um aminoácido. Os ensaios realizados com a enzima colesterol oxidase nativa resultaram na formação de um coágulo que pode ter acarretado em redução da disponibilidade dos grupos amino para reagir com a ninidrina. Como consequência o teste pode ter subestimado a quantidade total de aminas disponíveis para a conjugação com mPEG- NHS. Porém, a solução de enzima colesterol oxidase que passou pelo processo de conjugação com mPEG não

levou à formação de coágulos após o aquecimento, o que corrobora os resultado obtidos por Hiroto *et al.* (1992) de que a peguilação aumenta a estabilidade térmica das proteínas.

O grau de peguilação atingido foi satisfatório, com valores próximos dos obtidos por Sugiuchi *et al*. (1995). Os autores relataram em seu trabalho um grau de peguilação de 45,0% para a CE e 41,7% para ChOx, sendo que os grupos amino foram determinados com trinitrobenzeno sulfato. No presente trabalho foram encontrados graus de peguilação de 44,2% e 41,0% para mPEG-NHS de 5 kDa e 10 KDa para CE, respectivamente. A ChOx foi peguilada em graus de peguilação inferiores aos encontrados por Sugiuchi *et al* (1995), mas o resultado pode ter sido falseado devido à coagulação da enzima nativa durante a determinação de grupos amino. As enzimas peguiladas com molécula de mPEG NHS de 10 kDa têm menor grau de peguilação quando comparadas com mPEG-NHS 5 kDa. Isso ocorreu provavelmente por que a molécula com maior cadeia não consegue penetrar tão profundamente quanto o polímero de cadeia menor e uma menor quantidade de resíduos aminados estão disponíveis para realizar a conjugação.

Como consequência da peguilação houve perda considerável da capacidade catalítica das enzimas e os valores de atividade enzimática fornecidos pelo fabricante não puderam ser considerados. Para contornar esse problema foi considerada uma atividade nominal referente às soluções de enzimas nativas que foram utilizadas para peguilação. Para manter essa relação de atividade com as enzimas nativas foi determinado que a purificação das enzimas peguiladas não fosse realizada. Após a definição de que as enzimas peguiladas não fossem purificadas foi verificado se *N*-hidroxissuccinamida e mPEG, não conjugado com as proteínas, poderiam interferir de alguma maneira nas reações enzimáticas. Testes realizados com as enzimas nativas adicionando-se concentrações de 5% de PEG 8 kDa e 50 $mmol \cdot L^{-1}$ de *N*-hidroxissuccinamida à PARTE 2 do reagente enzimático-colorimétrico não afetaram o sistema. As concentrações de mPEG e *N*-hidroxissuccinamida resultante da conjugação das enzimas são muito inferiores às concentrações que foram avaliadas.

DISCUSSÃO

6.3 Estudo enzimático colorimétrico e seleção de poliânions

Todos os testes espectrofotométricos foram realizados com uma variação do reagente proposto por Sugiuchi *et al*. (1995). O reagente foi modificado de tal modo que diferentes poliânions pudessem ser avaliados como possíveis inibidores da reação de CE e ChOx com as apoB100-lipoproteínas. A troca do cromógeno não afeta o sistema, pois a participação do cromógeno ocorre na reação acoplada à peroxidase e não é critico para catálise das reações por CE e ChOx. A quinoneimina formada com o fenol apresenta um coeficiente de absortividade molar inferior ao formado com EMSE (FOSSATI e PRENCIPE; 1978), o que afeta a sensibilidade do reagente, entretanto, as absorbâncias oriundas dos testes foram suficientes para realização dos ensaios e avaliação dos dados. A alteração do cromógeno ocorreu devido ao seu elevado custo de aquisição.

Warnick *et al*. (2001) e Kondo *et al*. (1999) relatam a ação dos poliânions em conjunto com os cátions bivalentes como os responsáveis pela formação de grandes complexos solúveis de LDL e VLDL de difícil acesso ao centro ativo das enzimas. Assim, somente o HDL fica disponível para ser hidrolisado e oxidado pelas CE e ChOx, respectivamente. Os poliânions foram selecionados de acordo com trabalhos de pesquisadores que desenvolveram métodos para determinação de c-HDL ou estudaram a sua interação com as lipoproteínas.

Como representante dos glicosaminoglicanos a intenção era de se avaliar a heparina sódica, entretanto a obtenção da matéria prima mostrou-se uma tarefa hercúlea, com inúmeras restrições de aquisição pela Agência Nacional de Saúde (ANVISA). Diante de tal dificuldade, foi selecionado o sulfato de condroitina, que não é um glicosaminoglicano descrito para a realização de testes de determinação de c-HDL (WARNICK *et al*., 2001; ARRANZ *et al*., 1994), porém sua interação com apoB100-lipoproteinas é bem caracterizada por Olsson *et al*. (2001).

Com exceção da sacarose octassulfato, foram encontrados trabalhos que relacionavam os poliânions avaliados interagindo com as lipoproteínas que contêm apoB100. A seleção da sacarose octassulfato está relacionada à proximidade de sua estrutura com a α-ciclodextrina sulfato. Ambas são moléculas com grande número de substituinte sulfato, elevada carga negativa em pH 7,0 e derivadas da modificação de um carboidrato. Como maioria dos poliânions utilizados é aplicada em métodos de precipitação, a concentração dos

poliânions utilizada foi reduzida em relação aos métodos de precipitação para evitar a formação de turvação no meio reacional.

Os resultados demonstraram que todos os poliânions inibem parcialmente e de maneira não seletiva a interação das enzimas do sistema com as lipoproteínas. As variações nas concentrações dos poliânions não apresentam linearidade na relação inibição versus concentração de poliânion, mas como se trata de interação de cargas entre três íons (Mg^{++}, poliânions e resíduos de aminoácidos positivos na ApoB100) essa relação linear, ou até mesmo uma resposta em formato de sino, não seria de se esperar.

Os resultados de inibição utilizando α-ciclodextrina sulfato foram inferiores aos esperados. A avaliação de qual concentração de α-ciclodextrina sulfato seria necessária para total inibição da catálise de LDL e VLDL realizada por Sugiuchi *et al*. (1995) foi realizada com CE-PEG, ChOx nativa. Os pesquisadores definiram que 2,0 $mmol \cdot L^{-1}$ do poliânion, associado a 0,5 g/L de dextran sulfato, eram suficientes para total inibição, sem afetar a interação das enzimas com HDL.

Apesar da avaliação do potencial de inibição neste trabalho ter sido realizado com enzimas nativas, a α-ciclodextrina afetou negativamente a catálise das enzimas utilizando o HDL como substrato, o que não era esperado. Mesmo a associação do poliânion com dextran sulfato não foi capaz de realizar inibições superiores às encontradas com ácido fosfotúngstico.

Dentre todos os poliânions avaliados o ácido fosfotúngstico, na concentração de 0,75 $mmol \cdot L^{-1}$, foi o único que apresentou seletividade em inibir somente a reação com LDL e VLDL, sendo assim, foi selecionado para avaliação de seu potencial inibitório com as enzimas peguiladas. Durante a realização dos testes verificou-se um incremento na velocidade de reação com HDL na presença de 0,75 $mmol \cdot L^{-1}$ de ácido fosfotúngstico, o que não era esperado. Lopes-Virella (1977) criador do método de precipitação com ácido fosfotúngstico não cita qualquer incremento de velocidade na reação durante a determinação de c-HDL. Mas é importante ressaltar que a mensuração da absorbância para os testes de determinação de c-HDL, pelo método de precipitação, é realizada após o substrato ter sido completamente consumido, dificultando a verificação de qualquer incremento na velocidade de reação. Não foram encontrados relatos na literatura sobre essa relação. Mais estudos seriam necessários para verificar o mecanismo desse fenômeno. Concentrações superiores a 1,5 $mmol \cdot L^{-1}$ de ácido fosfotúngstico promoviam turvação do sistema quando se utilizava LDL ou VLDL como amostra, devido à formação de complexos insolúveis com as lipoproteínas.

DISCUSSÃO

6.3.1 Ensaios de determinação da atividade residual para enzimas peguiladas associadas a 0,75 mmol·L^{-1} de ácido fosfotúngstico.

A conjugação das enzimas com mPEG-NHS promoveu uma redução média de suas atividades em quase 10 vezes, possivelmente devido à ligação de moléculas de mPEG na proximidade ou dentro do sítio catalítico das enzimas. Sugiuchi *et al*. (1995) evidenciaram uma atividade residual de 28,8% para colesterol esterase após peguilação, utilizando linoleato de colesterila como substrato para a enzima. Dados sobre colesterol oxidase não foram apresentados por Sugiuchi *et al*. (1995).

Após a peguilação, o $\Delta ABS_{(800\text{-}650\ segundos)}$ das reações tiveram uma redução drástica, quando utilizada a mesma concentração nominal de 1,0 kU/L de CE-PEG e 5,0kU/L ChOx-PEG, o que tornou difícil a afirmação de que a conjugação com mPEG-NHS foi suficiente para inibir a reação com LDL e VLDL. Como a redução média (considerando as reações com HDL e LDL) no $\Delta ABS_{(800\text{-}650\ segundos)}$ foi de aproximadamente 10 vezes, as concentrações nominais das enzimas foram ajustadas para 10 kU/L de CE-PEG e 50 kU/L de ChOx-PEG. Com o aumento das concentrações das enzimas houve incremento da sensibilidade do método o que permitiu melhor visualização das reações.

As reações que ocorreram com o VLDL apresentaram uma redução na absorbância após a adição da PARTE 2 do reagente enzimático-colorimétrico, resultando em $\Delta ABS_{(800\text{-}650\ segundos)}$ com valores negativos. Para esse tipo de ensaio um ΔABS negativo não tem significado, entretanto a queda na absorbância pode ser causada pela dissociação de complexos formados por VLDL após a adição da PARTE 2. Como a amostra de VLDL é ligeiramente turva, a formação de complexos é mais evidente. Independente da composição do reagente utilizado, a inibição do VLDL ocorreu de maneira satisfatória.

Diferente do VLDL, para a inibição da reação com LDL a presença do poliânion é essencial. A presença do ácido fosfotúngstico promoveu a formação de um platô na absorbância após a adição da PARTE 2, o que pode ser entendido como supressão total das reações. A formação do platô não foi evidenciado na reação realizada somente com as enzimas peguiladas. O aumento da cadeia do mPEG, parece influenciar a capacidade de inibição. O mPEG-NHS 10 kDa inibiu a reação de maneira mais eficiente que o mPEG-NHS 5 kDa, na presença de ácido fosfotúngstico. Esses resultados estão de acordo com os achados de Sugiuchi *et al*. (1995), de que a inibição da reação com LDL só foi alcançada após a adição de poliânions no meio reacional.

DISCUSSÃO

O aumento da concentração nominal das enzimas conseguimos recuperar a sensibilidade do ensaio quando utilizado HDL como substrato. A cinética de reação continuou com característica linear. A peguilação das enzimas ou o poliânion têm pouco impacto na cinética de reação do HDL, sendo que a perda de sensibilidade do sistema é facilmente corrigida pelo incremento da concentração das enzimas.

O teste t de Student aplicado às cinéticas de reação dos reagentes evidenciou que a modificação das enzimas e a adição do ácido fosfotúngstico causam modificações nas cinéticas enzimáticas em comparação às enzimas nativas. Parte desse resultado também se deve ao modelo estatístico utilizado para análise. O teste t de Student para dados pareados considera o valor da média dos dados para realizar comparação. Como as curvas apresentam médias de absorbância distintas era de se esperar que o teste considerasse as diferença entre as médias estatisticamente relevantes. Mas o teste estatístico apresenta validade, já que demonstra que as modificações realizadas nas enzimas e associações com o poliânion produzem respostas distintas das enzimas nativas.

Mas os dados estatísticos mais relevantes são obtidos com a correlação de Pearson. As cinéticas de reação do reagente contendo as enzimas peguiladas, sem poliânion, apresentam correlações elevadas com o controle, mesmo para a reação com LDL como substrato. Tal fato indica que um incremento de absorbância na reação do LDL realizado com o reagente elaborado com enzimas nativas é acompanhado por crescimento de absorbância no reagente com enzimas peguiladas. Entretanto, essa correlação elevada para a reação com LDL não existe para o reagente com ácido fosfotúngstico. Se associarmos os resultados do teste t de Student com a correlação de Pearson temos que a reação do LDL com o reagente com ácido fosfotúngstico é diferente e não correlacionável com o controle. Embora a reação do reagente contendo ácido fosfotúngstico com a LDL seja distinta do controle, a reação com HDL já apresenta elevada correlação.

Esses resultados demonstram que a associação das enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase conjugadas com mPEG 10 kDa associadas a 0,75 $mmol \cdot L^{-1}$ de ácido fosfotúngstico é capaz de inibir as reação com LDL e VLDL, sem afetar drasticamente a reação das mesmas enzimas com HDL.

Não foi possível replicar os resultados obtidos por Sugiuchi *et al*. (1995) apesar de terem sido utilizados os mesmos poliânion e enzimas peguiladas. A única diferença foi a

massa molar dos mPEGs utilizados nos presentes trabalhos (5 kDa e 10 kDa) contrastando com o mPEG 6 kDa utilizado no trabalho original.

6.4 Determinação de variação da entalpia aparente de reação e constante de Michaelis-Menten.

A grande vantagem da utilização da microcalorimetria de titulação isotérmica para esse trabalho é a possibilidade de se verificar a formação de produto da reação da enzima colesterol esterase sem a necessidade de reações acopladas, que seriam necessárias caso fosse utilizado um espectrofotômetro. Assim, todos os dados informados pelo equipamento são resultantes da interação enzima substrato, diminuindo a possibilidade de interferência pela adição de mais substâncias ao meio. (FREIRE *et al.*, 1990).

Como mencionado previamente em **Resultados**, não foi possível obter sinais do microcalorímetro adequados para o cálculo de parâmetros cinéticos para colesterol oxidase e VLDL hidrolisado por colesterol esterase. O calor liberado por essas reações era pouco distinto do branco e as reações catalisadas pela ChOx não retornavam à linha de base. Vários protocolos foram avaliados, mas todos sem sucesso.

6.4.1 Determinação de ΔH_{app}

Para determinação da ΔH de hidrólise de lipídeos pela CE é necessário contabilizar a contribuição da troca de calor proveniente das diferentes interações que ocorrem no sistema, que são descritas como: a interação substrato-enzima, calor de diluição da lipoproteína, calor de diluição da solução de enzimas e calor de ionização do tampão (TODD e GOMEZ, 2011). O calor de diluição da lipoproteína foi determinado pela realização do branco da reação com a solubilização das lipoproteínas em tampão. Os calores provenientes da diluição da solução de enzimas e ionização de tampão foramminimizados pela utilização do mesmo tampão fosfato empregado na diálise das lipoproteínas e solubilização das enzimas. O tampão fosfato apresenta entalpia de ionização igual a 0,22 kcal/mol, insignificante quando comparado ao calor liberado pela reação de hidrólise de lipídeos (GOLDBERG *et al*., 2002). No entanto, o calor da interação enzima-substrato não pode ser calculado, já que a hidrólise do substrato procede à interação e acabam sendo contabilizados juntos. Por esses motivos a utilização do termo ΔH_{app} é mais adequada para a situação.

Seria interessante que o cálculo de ΔH_{app} e K_m fossem realizados por mol de lipoproteína, mas realizar esse cálculo para todas as classes de lipoproteínas não é simples. Para LDL existe a relação de uma cópia de ApoB100 para cada partícula de lipoproteína, logo um mol de ApoB100 corresponde a um mol de LDL. Entretanto, para o HDL pode existir

mais de uma cópia de ApoA1 por partícula e isso impede uma extrapolação semelhante como ocorre com o LDL (BOLANOS-GARCIA e MIGUEL, 2003). Como não foi possível determinar a molaridade de HDL, os resultados foram normalizados pelo conteúdo de éster de colesterol de cada uma das lipoproteínas. O éster de colesterol é calculado como massa de linoleato de colesterila, molécula usualmente utilizada para testes de atividade da CE (ROCHE, 2009). Mesmo a normalização dos resultados por linoleato de colesterila não estaria completamente correto, já que a CE realiza a hidrólise de uma variedade de substratos nas lipoproteínas (HUI e HOWLES, 2002). Após fazer essas considerações foram determinados ΔH_{app} e K_m para CE utilizando os substratos HDL e LDL, os resultados de entalpia foram expressos com $kcal \cdot mol^{-1}$ de linoleato de colesterila e a constante de Michaelis-Menten foi calculada como $\mu mol \cdot L^{-1}$ de linoleato de colesterila.

A reação de hidrólise dos lipídios nas lipoproteínas pela CE é exotérmica, com valores de ΔH_{app} de -2,44 $kcal \cdot mol^{-1}$ para HDL e -1,96 $kcal \cdot mol^{-1}$ para LDL. A diferença pode estar associada à diferença de composição e proporção lipídica de cada lipoproteína e sua interação com a enzima. Após a peguilação, os valores de ΔH_{app} modificaram para -2,87 $kcal \cdot mol^{-1}$ para HDL e -2,14 $kcal \cdot mol^{-1}$ para LDL. Mesmo após a modificação os valores são próximos da enzima nativa, em parte porque o substrato e a reação catalisada são as mesmas. A diferença dos valores entre as enzimas nativas e enzimas peguiladas estaria relacionada com provável mudança na interação entre CE PEG e as lipoproteínas que, devido às limitações do ensaio, são contabilizados como calor de reação.

6.4.2 Determinação de K_m

A interação enzima lipoproteínas pode ser representada esquematicamente como (**FIGURA 75**)

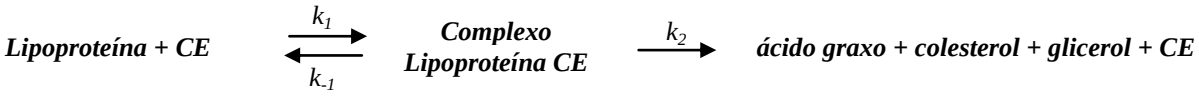


FIGURA 75 – Esquema da interação entre CE e lipoproteína.
k_1 – constante cinética de formação do complexo enzima-substrato; k_{-1} – constante cinética de dissociação do complexo enzima-substrato; k_2 – constante catalítica. Não foram considerados no esquema moléculas de água envolvidas na hidrólise, demais lipídeos presentes na lipoproteína ou estequiometria da reação.

DISCUSSÃO

O K_m para a CE nativa difere de acordo com a lipoproteína utilizada. Mesmo a reação catalisada pela CE sendo indiferente para ambas as lipoproteínas avaliadas, as diferenças estruturais entre HDL e LDL impactam na maneira como a enzima interage com a lipoproteína. Isso é plausível, já que as constantes k_1 e k_{-1} que são envolvidas na interação enzima substrato são componentes de K_m (**Equação 14**). Seria possível que o conteúdo proteico do invólucro externo ou o tamanho das lipoproteínas seja fator impeditivo para a formação do complexo enzima-substrato o que justificaria o maior K_m com LDL em relação ao HDL.

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (14)$$

O termograma da titulação de hidrólise do HDL pela enzima CE-PEG não apresenta o formato usual de uma titulação para determinação de K_m, mas adições consecutivas do substrato promoveram a formação de deflexões de diferentes alturas, até o momento em que atingiram um platô. O tratamento dos dados da titulação permitiu determinar a cinética da enzima com HDL e cálculo do K_m para a enzima peguilada. As deflexões com LDL apresentavam todas a mesma magnitude. Menores concentrações do substrato foram avaliadas, mas não diferiam do branco de reação. Esses fatores impediram que a determinação de K_m para CE-PEG com LDL fosse realizada.

Sugiuchi *et al*. (1995) não verificaram modificação do K_m das enzimas CE e ChOx após a peguilação. Os autores utilizaram como substrato para a reação o linoleato de colesterila. Apesar dessa molécula ser substrato da enzima CE, ela não representa a complexidade de uma lipoproteína. No presente trabalho o K_m da enzima peguilada foi determinado com HDL, um substrato mais complexo que linoleato de colesterila e mais próximo da realidade para qual a enzima será utilizada. O K_m observado para a enzima peguilada é 5,1 vezes maior que o da enzima nativa, o que evidencia que a modificação enzimática afeta a interação entre enzima e substrato. Se utilizarmos o resultado obtido por Sugiuchi *et al.* (1995) e os obtidos neste trabalho é possível propor uma hipótese para o mecanismo pelo qual a peguilação reduz a interação entre enzima e substrato.

A hipótese seria de que as moléculas de mPEG adicionadas à superfície das enzimas criem um emaranhado de ramificações de polímero que dificulta a aproximação da

lipoproteína com o sítio ativo da enzima, o que minimizaria a formação do complexo enzima-substrato, diminuindo o valor de k_1, denominador da equação para determinação de $K_{m.}$. Como LDL e VLDL formam grande complexos solúveis na presença do poliânion e cátion bivalente, juntamente com as ramificações de mPEG, as suas interações com as enzimas seriam extremamente desfavorecidas. Uma vez atingido o sitio ativo da enzima os lipídeos seriam hidrolisados normalmente, mantendo-se o valor de k_2. Uma redução de k_1 e mantendo-se k_2 resultaria em aumento do $K_{m.}$

6.5 A reação é entalpica ou entropicamente dirigida?

Uma das maneiras para a determinação da energia livre (ΔG) de uma interação seria definir a constante de dissociação no equilíbrio (K_d) e aplica-la **na Equação 15**.

$$\Delta G = RTLnK_d \quad (15)$$

Em que R seria a constante dos gases ideais e T a temperatura em graus Kelvin. Mas só com os dados que foram obtidos, ΔH_{app} e K_m,não seria possível determinar K_d.

Cohlberg (1979) aborda a utilização de K_m como constante aparente de dissociação e a proximidade dos valores de K_m e K_d, dado as devidas ressalvas. K_d é determinado no equilíbrio e considera a reversibilidade da ligação entre enzima e substrato e pode ser como descrito na **Equação 16.**

$K_d = \frac{[E][S]}{[ES]}$ no equilíbrio (16)

K_m pode ser definido (**Equação 17**) como constante de dissociação aparente se considerando o modelo de estado estacionário, no qual o fornecimento de substrato para o meio se iguala a quantidade de produto liberado. Dessa maneira a relação [E][S]/[ES] também é mantida constante. Mas o estado estacionário se difere do equilíbrio por que novos substratos são adicionados ao meio já que ocorre sua conversão em produto, diferente do equilíbrio em que os substratos envolvidos na ligação e dissociação da enzima são os mesmos.

DISCUSSÃO

$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]}$ no estado estacionário

(17)

Apesar das semelhanças para cálculo das constantes de dissociação e Michaelis-Menten, a K_d (**Equação 18**) não considera a constante catalítica da enzima como o K_m. Já K_m sempre apresentará valores maiores que K_d, nessa aproximação com apenas um complexo formado. Entretanto, esses valores podem se aproximar quando a capacidade catalítica da enzima é baixa resultando em um k_2 de baixo valor. O contrário também é valido, enzimas com alta capacidade catalítica apresentam k_2 elevado, o que distancia K_m de K_d.

$$K_d = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

(18)

Considerando todas essas ressalvas pode-se assumir que $K_m \cong K_d$ e realizar um exercício para determinar se a reação de hidrólise dos lipídeos nas lipoproteínas entálpica ou entropicamente dirigida.

A entropia aparente da reação pode ser determinada pela **Equação 19.**

$$\Delta G_{app} = \Delta H_{app} - T\Delta S_{app}$$

(19)

DISCUSSÃO

Após a determinação dos valores de ΔG_{app}, ΔH_{app} e $-T\Delta S_{app}$ (**Tabela 23**), temos que a reação é exergônica, exotérmica e com aumento da entropia do sistema. Tanto a entalpia quanto a entropia favorecem a espontaneidade da reação. O ganho de entropia exerce maior participação em ΔG_{app} (**FIGURA 76**).

Tabela 23 – Determinação de ΔG_{app} para as reações de hidrólise realizadas por CE

	Enzima – Lipoproteína	
	CE – HDL	**CE – LDL**
ΔH_{app}	-2,44 kcal/mol	-1,96 kcal/mol
ΔS_{app}	1,72 x 10^{-2} kcal/mol	1,68 x 10^{-2} kcal/mol
$-T\Delta S_{app}$	-5,33 kcal/mol	-5,21 kcal/mol
ΔG_{app}	-7,77 kcal/mol	-7,17 kcal/mol

R= 1,987 cal·K^{-1}·mol^{-1}
T= 310,15 K

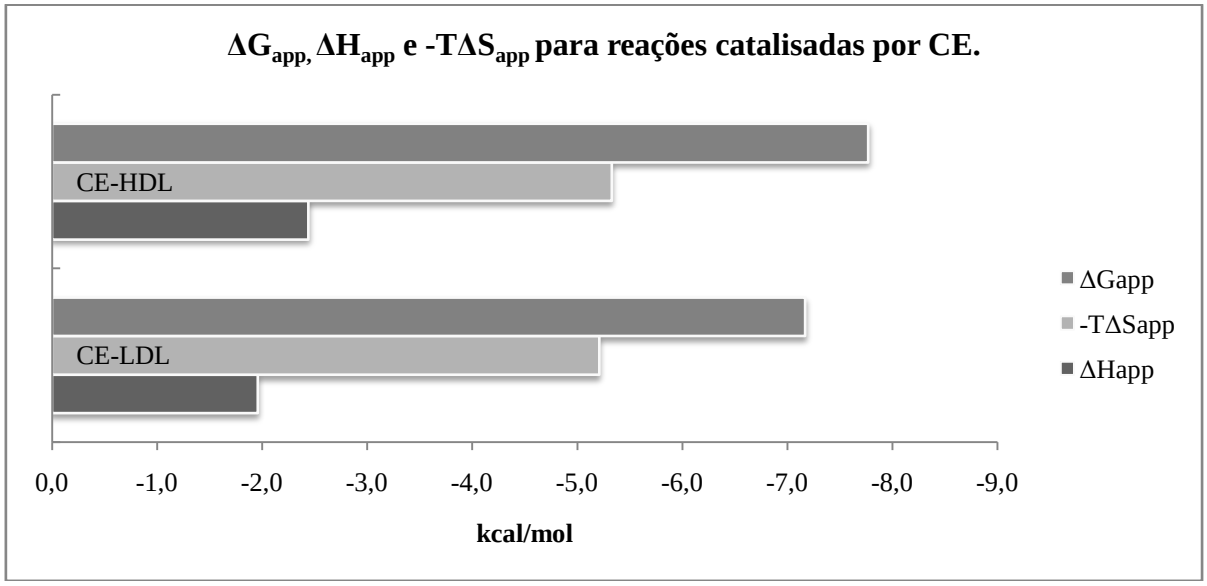


FIGURA 76 - Valores de ΔG_{app}, ΔH_{app} e $-T\Delta S_{app}$ para reações catalisadas por CE.

ΔH_{app} e $-T\Delta S_{app}$ contribuem para a espontaneidade da reação. Maior contribuição para ΔG_{app} é proveniente do aumento da entalpia.

Uma possível explicação para a maior participação da entropia no direcionamento da reação pode ser o ganho de graus de liberdade que ocorre com a abertura da micela e liberação de produtos de reação da hidrólise dos ésteres de colesterol e triglicérides. Mesmo

com a formação de ligações de hidrogênio com os produtos da hidrólise que reduz o grau de liberdade das moléculas de água, a desorganização do interior hidrofóbico da lipoproteína e liberação de mais substâncias para o meio compensa a perda de entropia ocasionada pela formação de novas ligações de hidrogênio.

Apesar das varias considerações para se definir que a entropia tem maior participação na espontaneidade da reação, o exercício é válido para entendimento das reações que ocorrem decorrentes da hidrólise das lipoproteínas pela colesterol esterase.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos com esse estudo permitiu verificar que o poliânion ácido fosfotúngstico, além da α-ciclodextrina sulfato, também inibem seletivamente a ação das enzimas colesterol esterase e colesterol oxidase sobre a lipoproteína LDL e VLDL, em um sistema homogêneo para a determinação de colestro – HDL. A concentração de 0,75 mM do ácido fosfotúngtico se mostra a mais eficaz, no sistema avaliado, para a inibição das enzimas sobre LDL e VLDL.

Assim como, foi verificado que a alteração química da enzima colesterol esterase, por meio de ligação covalente de polietilenoglicol, a sua superfície promove alteração na sua interação com HDL e LDL, que pôde ser indentificado pela alteração do Km para esses substratos.

8 PERSPECTIVAS

Seria de grande valia verificar se outras hidrolases e lipases comercialmente disponíveis se comportam de maneira semelhante à enzima colesterol esterase peguilada na presença das apoB100 lipoproteínas.

Um segundo ponto importante seria a purificação das enzimas peguiladas e estudar como a alteração da sua estrutura com a conjugação com monometoxipolietilenoglicol altera sua estabilidade térmica.

Os resultados obtidos poderão servir de base para o desenvolvimento futuro de um sistema para a determinação direta de cHDL.

REFERÊNCIAS

ALLAIN, C. C. *et al*. Enzymatic determination of total serum cholesterol. Washington, USA, **Clin Chem**, v. 20, n. 4, p. 470-475, 1974.

ARRANZ, M.; ESTEBAN, M.; PALACIOS, M. Métodos recomendados para la determinación de la concetración de colesterol en suero o plasma y en otros especímenes biológicos. **Quím Clín**, v.13, n.7, p. 496-503, 1994.

BAILON, P.; BERTHOLD, W. Polyethylene glycol-conjugated pharmaceutical proteins. **Pharmaceut Sci Tech Today**, v. 1, n. 8, p. 352-356, 1998.

BARR, D. P.; RUSS, E. M.; EDER, H. A. Protein-lipid relationships in human plasma: II. In atherosclerosis and related conditions. New York, USA, **Am J Med**, v. 11, n. 4, p. 480-493, 1951.

BOLANOS-GARCIA, V. M.; MIGUEL, R. N. On the structure and function of apolipoproteins: more than a family of lipid-binding proteins. Oxfrod , UK, **Prog Biophys Mol Biol**, v. 83, n. 1, p. 47-68, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **DATASUS** Tecnologia da Informação a Serviço do SUS. Base de dados nacional referente ao período de jan. 2013 até dez. 2013. Brasília, DF, 2013. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm. exe?sia/cnv/qauf.def>. Acesso em: 14/02/15

BURSTEIN, M. S. H. R. *et al*. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. Bethesda, USA, **J lipid Res**, v. 11, n. 6, p. 583-595, 1970.

CARR, Timothy P.; ANDRESEN, Catharine J.; RUDEL, Lawrence L. Enzymatic determination of triglyceride, free cholesterol, and total cholesterol in tissue lipid extracts. **Clinical biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 39-42, 1993.

CASTELLI, W. P. *et al*. HDL cholesterol and other lipids in coronary heart disease. The cooperative lipoprotein phenotyping study. **Circul**, v. 55, n. 5, p. 767-772, 1977.

CHEN, L. *et al*. The Binding and Release of Oxygen and Hydrogen Peroxide Are Directed by a Hydrophobic Tunnel in Cholesterol Oxidase†. Washington, USA, **Biochem**, v. 47, n. 19, p. 5368-5377, 2008.

CHUNG, Byung H. *et al*. Preparative and quantitative isolation of plasma lipoproteins: rapid, single discontinuous density gradient ultracentrifugation in a vertical rotor. **Journal of lipid research**, v. 21, n. 3, p. 284-291, 1980.

COHLBERG, Jeffrey A. Km as an apparent dissociation constant. **Journal of Chemical Education**, v. 56, n. 8, p. 512, 1979.

CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. New York, USA, **Methods Enzymol** Lipases. v. 284, p. 3-27, 1997.

DAVIS, F. F. The origin of pegnology. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 54, n. 4, p. 457-458, 2002.

FINLEY, P. R. *et al*. Cholesterol in high-density lipoprotein: use of Mg2+/dextran sulfate in its enzymic measurement. Washington, USA, **Clin Chem**, v. 24, n. 6, p. 931-933, 1978.

FOSSATI, P.; PRENCIPE, L. [Emerson-Trinder reaction: study of various chromogens and analyses of the principle interferences (author's transl)].**Quaderni Sclavo di diagnostica clinica e di laboratorio**, v. 14, n. 2, p. 164-177, 1978.

FREIRE, E.; MAYORGA, O. L.; STRAUME, M.. Isothermal titration calorimetry. Washington, USA, **Anal Chem**, v. 62, n. 18, p. 950A-959A, 1990.

FUERTGES, F.; ABUCHOWSKI, A. The clinical efficacy of poly (ethylene glycol)-modified proteins. Amsterdam, NL, **J Control Release**, v. 11, n. 1, p. 139-148, 1990.

GLUE, P. *et al*. Pegylated interferon-α2b: Pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety, and preliminary efficacy data*. Hoboken, USA, **Clin Pharmacol Ther**, v. 68, n. 5, p. 556-567, 2000.

GOLDBERG, Robert N.; KISHORE, Nand; LENNEN, Rebecca M. Thermodynamic quantities for the ionization reactions of buffers. **Journal of physical and chemical reference data**, v. 31, n. 2, p. 231-370, 2002.

HAINLINE, A. *et al*. (Ed.). **Manual of laboratory operations: lipid and lipoprotein analysis**. 2nd ed. Bethesda, MD: National Heart, Lung and Blood Institute, Lipid Research Clinics Program, 1982.

HARRIS, N. E. I. L.; GALPCHIAN, V.; RIFAI, N. Three routine methods for measuring high-density lipoprotein cholesterol compared with the Reference Method. Washington, USA, **Clin Chem**, v. 42, n. 5, p. 738-743, 1996.

HENZLER, K.; HAUPT, B.; BALLAUFF, M. Enzymatic activity of immobilized enzyme determined by isothermal titration calorimetry. Orlando, USA, **Anal Biochem**, v. 378, n. 2, p. 184-189, 2008.

HIROTO, M. *et al*. Chemical modification of lipase with a comb-shaped synthetic copolymer of polyoxyethylene allyl methyl diether and maleic anhydride. Dordrecht, NL, **Biotechnol Lett**, v. 14, n. 7, p. 559-564, 1992.

HUANG, Y. *et al*. An abundant dysfunctional apolipoprotein A1 in human atheroma. New York, USA, **Nature Med**, v. 20, n. 2, p. 193-203, 2014.

HUI, D. Y.; HOWLES, P. N. Carboxyl ester lipase structure-function relationship and physiological role in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. Bethesda, USA, **J Lipid Res**, v. 43, n. 12, p. 2017-2030, 2002.

JAIN, Ram B. Comparison of three weighting schemes in weighted regression analysis for use in a chemistry laboratory. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 3, p. 270-279, 2010.

JONAS, A. Lipoprotein structure. **New Compreh Biochem**, v. 36, p. 485-506, 2008.

JOSÉ, N. M.; PRADO, L. A. S. Almeida. Hybrid organic-inorganic materials: preparation and some applications. **Quimica Nova**, v. 28, n. 2, p. 281-288, 2005.

KAKUYAMA, T.; KIMURA, S.; HASHIGUCHI, Y. Fully automated determination of HDL-cholesterol from human serum with Hitachi 911. Washington, USA, **Clin Chem**, v. 40, p. 1104, 1994.

KONDO, A. *et al*. Dynamic reaction in a homogeneous HDL-cholesterol assay visualized by electron microscopy. . Washington, USA, **Clin Chem**, v. 45, n. 11, p. 1974-1980, 1999.

KOZLOWSKI, A.; HARRIS, J. M. Improvements in protein PEGylation: pegylated interferons for treatment of hepatitis C. Amsterdam, NL, **J Control Release**, v. 72, n. 1, p. 217-224, 2001.

LADBURY, J. E.; DOYLE, M. L. (Ed.). **Biocalorimetry 2: applications of calorimetry in the biological sciences**. Chichester, UK, John Wiley & Sons, 2004.

LINDAHL, U.; HOOK, M. Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules. Palo Alto, USA, **Ann Rev Biochem**, v. 47, n. 1, p. 385-417, 1978.

LOPES-VIRELLA, M. F. *et al*. Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. Washington, USA, **Clin Chem**, v. 23, n. 5, p. 882-884, 1977.

MAHLEY, R. W. *et al*. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. **Journal of lipid research**, v. 25, n. 12, p. 1277-1294, 1984.

MARTINEZ, J. C. *et al*. Isothermal titration calorimetry: thermodynamic analysis of the binding thermograms of molecular recognition events by using equilibrium models. **INTECH Open Access Publisher**, 2013.

OLSSON, Urban; ÖSTERGREN-LUNDÉN, Gunnel; MOSES, Jonatan. Glycosaminoglycan-lipoprotein interaction. **Glycoconjugate journal**, v. 18, n. 10, p. 789-797, 2001.

PEARSON, S.; STERN, S.; MCGAVACK, T. H. Rapid, Accurate Method for Determination of Total Chlolesterol in Serum. Washington, USA,**Anal Chem**, v. 25, n. 5, p. 813-814, 1953.

ROBERTS, M. J.; BENTLEY, M. D.; HARRIS, J. M. Chemistry for peptide and protein PEGylation. Amsterdam, NL, **Adv Drug Deliv Rev**, v. 54, n. 4, p. 459-476, 2002.

SKIPSKI, V. P. *et al*. Lipid composition of human serum lipoproteins. London, UK, **Biochem J**, v. 104, p. 340-352, 1967.

SRINIVASAN, S. R.; RADHAKRISHNAMURTHY, B; BERENSON, Gerald S. Studies on the interaction of heparin with serum lipoproteins in the presence of Ca 2+, Mg 2+, and Mn 2+. New York, USA, **Arch Biochem Biophys**, v. 170, p. 334-340, 1975.

SUGIUCHI, H *et al*. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glycol-modified enzymes and sulfated alpha-cyclodextrin. Washington, USA, **Clin Chem**, v. 41, n. 5, p. 717-723, 1995.

TIETZ, N. W.; BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. Fundamentos de Química Clínica. **Guanabara Koogan SA, Rio de Janeiro–RJ, 6ª Edição**, 2008.

TODD, M. J.; GOMEZ, J. Enzyme kinetics determined using calorimetry: a general assay for enzyme activity? Orlando, USA, **Anal Biochem**, v. 296, n. 2, p. 179-187, 2001.

TRINDER, P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. London, UK, **Ann Clin Biochem**, n. 6, 1969.

VRIELINK, A.; GHISLA, S. Cholesterol oxidase: biochemistry and structural features. Oxford, UK, **Febs J**, v. 276, n. 23, p. 6826-6843, 2009.

WARNICK, G. R.; ALBERS, J. J. A comprehensive evaluation of the heparin-manganese precipitation procedure for estimating high density lipoprotein cholesterol. Bethesda, USA, **J Lipid Res**, v. 19, n. 1, p. 65-76, 1978.

WARNICK, G. R.; ALBERS, J. J. Heparin--Mn2+ quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol: an ultrafiltration procedure for lipemic samples. Washington, USA, **Clin Chem**, v. 24, n. 6, p. 900-904, 1978.

WARNICK, G. R.; BENDERSON, J.; ALBERS, J. J. Dextran sulfate-Mg2+ precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. Washington, USA, **Clin Chem**, v. 28, n. 6, p. 1379-1388, 1982.

WARNICK, G. R.; NAUCK, M.; RIFAI, N. Evolution of methods for measurement of HDL-cholesterol: from ultracentrifugation to homogeneous assays. Washington, USA, **Clin Chem**, v. 47, n. 9, p. 1579-1596, 2001.

WILLIAMS, B. A.; TOONE, E. J. Calorimetric evaluation of enzyme kinetic parameters. Columbus, USA, **J Org Chem**, v. 58, n. 13, p. 3507-3510, 1993.

YUE, Q. K. *et al*. Crystal structure determination of cholesterol oxidase from Streptomyces and structural characterization of key active site mutants. Washington, USA, **Biochem**, v. 38, n. 14, p. 4277-4286, 1999.

APÊNDICE 1

ESPECIFICAÇÕES PARA ENZIMA COLESTEROL ESTERASE - ROCHE

Cholesterol Esterase from Pseudomonas species, lyophilizate cod. 11 520 857 103

Nomenclature: Sterol-ester acylhydrolase

Molecular weight: ~129 kD

Isoelectric point: 4.5

Michaelis constant (Phosphate buffer, pH 7.5): Cholesterol oleate: 7×10^{-5} mol/l

Inhibitors: Heavy metals such as Cu^{2+}, Ag^{+}, Zn^{2+}

Activators: Detergents

pH optimum: 6.0-8.0; (maximum at pH 7.6)

Temperature dependence: Not possible to determine under assay conditions due to turbidity of Thesit at temperatures above +27°C.

pH stability: 6.0-6.5

Thermal stability: Below +20°C

Specificity: Cholesterol esterase is an enzyme of lipid metabolism and gives complete cleavage of all serum cholesterol esters.

Remark: This Cholesterol esterase is especially suited for liquid stable applications with extended shelf life requirements.

Appearance: Brownish lyophilizate

Solubility: Clear, brown solution in water (c=50 mg/ml)

pH value (c=50 mg/ml in water): 7.0-8.0

Activity (+25°C, cholesterol oleate): ≥100 U/mg lyophilizate

Specific Activity: ≥100 U/mg protein

Protein (Biuret): No limit

Contaminants (expressed as percentage of Cholesterol Esterase activity):

ATPase: ≤0.005
Catalase: ≤1.00
Glycerokinase: ≤0.001
Glucose oxidase: ≤0.001
Hexokinase: ≤0.005
"NADH oxidase": ≤0.001
Uricase: ≤0.005

Stability: At +2 to +8°C within specification range for 12 months.

APÊNDICE 2

ESPECIFICAÇÕES PARA ENZIMA COLESTEROL OXIDASE - ROCHE

Cholesterol Oxidase from Brevibacterium sp., expressed in E.coli, lyophilizate cod. 11479709103

Nomenclature: Cholesterol:oxygen oxidoreductase

Molecular weight: 60 kD (native and SDS)

Isoelectric point: ~5.0

Michaelis constant (Phosphate buffer, 0.5 mol/l, pH 7.5; +25°C): Cholesterol: 1 x 10^{-4} mol/l

Inhibitors: Hg^{2+}, $ZnCl_2$, SDS

Activators: Non ionic detergents

pH optimum: 5.5-8.0

pH stability: 5.0-10.0

Thermal stability: Up to +55°C

Storage and Stability: No decrease in activity over 6 weeks at +35°C

Specificity:

Appearance: Yellow lyophilizate

Solubility: Clear, yellowish solution in water (c=10 mg/ml)

cholesterol 100%
pregnenolon 52%
stigmasterol 17%
dehydroandrosterone 0.5%
androsterone 0%
estradiol 0%
cholate 0%

pH value: 6.0-7.0

Protein (Biuret): 0.1-0.3 mg/mg lyophilizate

Activity (+25°C, cholesterol): 10-20 U/mg lyophilizate

Contaminants (expressed as percentage of Cholesterol Oxidase activity):

Catalase: ≤6.0
Glucose oxidase: ≤0.01
"NADH oxidase": ≤0.01
Uricase: ≤0.01

Stability: At -15 to -25°C within specification range for 12 months. Store dry. Protect from light.