

Efecto *in vitro* del poliestradiol sobre la actividad lecitina:colesterol aciltransferasa en plasma de rata

J. M. Gandarias, M. Lacort y B. Ochoa

Departamento de Fisiología y Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad del País Vasco
Bilbao

(Recibido el 29 de julio de 1981)

J. M. GANDARIAS, M. LACORT and B. OCHOA. *In vitro effect of Polyestradiol on Lecithin:Cholesterol Acyltransferase Activity*. Rev. esp. Fisiol., 38, 291-294, 1982.

The *in vitro* effect of increasing amounts of polyestradiol on LCAT activity was measured in plasma of male and female rats. The results showed that the hormone decreased the enzyme activity in both sexes. The concentration of polyestradiol required for this inhibitory effect was greater in male than in female plasma. No correlation was found between LCAT activity and polyestradiol concentration.

El contenido de colesterol esterificado en hígado es un neto reflejo de la captura de colesterol plasmático por el hepatocito (2) y está, por tanto, relacionado con el recambio y catabolismo hepático de lipoproteínas. La lecitina:colesterol aciltransferasa (EC. 2.3.1.43) es un enzima directamente implicado en estos procesos. Actúa sobre las HDL nacientes secretadas por el hígado, enriqueciéndolas en colesterol esterificado (11) y, además, colabora con la lipoproteína lipasa en la

conversión de remanentes de quilomicrones y VLDL en LDL (8, 12).

En trabajos anteriores se ha demostrado que la administración de dosis farmacológicas de estrógenos incrementa el contenido hepático de colesterol esterificado (6, 9, 19) al tiempo que modifica el perfil de lipoproteínas (5), y se ha descrito que similares tratamientos hormonales no modifican la actividad de la LCAT plasmática expresada como porcentaje de colesterol libre que se esterifica, ni afectan el curso de la reacción con el tiempo (7). Sin embargo, cuando la LCAT se expresa en función de la concentración de sustrato sí se observan variaciones significativas. Diversos estudios apoyan la existencia de una correlación positiva entre velocidad inicial de esterificación de

Abreviaturas empleadas

LCAT: Lecitina:colesterol aciltransferasa.
HDL: Lipoproteínas de alta densidad
LDL: Lipoproteínas de baja densidad.
VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad.

colecsterol plasmático y concentración de sustrato (1, 14, 15, 18), si bien existen algunos trabajos discrepantes (4, 13). Dado que el estradiol, en ratas, es hipocolesterolemizante, la alteración enzimática observada podría deberse a la acción primaria de la hormona sobre el nivel de colecsterol plasmático, sustrato del enzima. Para excluir dicho efecto, hemos realizado el presente trabajo en el que se estudia *in vitro* el efecto del poliestradiol sobre la velocidad inicial de esterificación del colecsterol en plasma de rata.

Material y métodos

Se emplearon ratas machos (200 g) y hembras (170 g) de raza Wistar. Recibieron una dieta estándar y tuvieron libre acceso al agua. Se les mantuvo en ciclos de 12 horas luz/oscuridad. Tras 18 horas de ayuno, los animales se desangraron bajo ligera anestesia de éter. Como anticoagulante se empleó heparina. Del plasma obtenido se realizaron las determinaciones enzimáticas en el plazo de 1-2 horas.

El fosfato de poliestradiol fue obtenido de Abelló, S. A.; (^3H)colecsterol, de actividad específica 9,5 Ci/mmol de Radiochemical Centre; ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) de Boehringer Mannheim; albúmina humana cristalizada de Behring-Werke A.G.; 1,4-di-2,5 fenil oxazolil benceno (POPOP) de Hopkin y Williams Ltd. El resto de reactivos se obtuvieron de Merck.

La actividad de la LCAT se midió según el método de STOKKE y NORUM (17), que se basa en medir el colecsterol libre radiactivo que se esterifica tras una incubación *in vitro* por la acción del enzima. 100 μl de plasma problema, 20 μl de DTNB (concentración final 1,4 mM) y 30 μl de una suspensión albúmina-(^3H)colecsterol se preincubaron en baño termostático a 37° C con agitación constante, durante 4 horas, a fin de que el (^3H)co-

lecsterol se equilibrara con el endógeno de las lipoproteínas. La adición de 20 μl de 2-mercaptoetanol 0,1 M, reactivante del enzima, marcó el comienzo de la reacción de transesterificación. En este instante se añadieron a las mezclas de ensayo 10 μl de poliestradiol disuelto en solución de tampón fosfato, en cantidades variables que oscilaron entre 0,1 y 2 μg . Paralelamente, se realizaron pruebas en blanco, en las que se adicionaron 10 μl de la solución tampón. Tras 20 minutos de incubación, la reacción se detuvo con 20 volúmenes de cloroformo/metanol (2:1). Se extrajeron los lípidos totales de cada incubado y se separaron por cromatografía en capa delgada (10), midiendo la radiactividad de las fracciones de colecsterol libre y esterificado en un contador de centelleo líquido Nuclear-Chicago.

La velocidad de esterificación del colecsterol plasmático se calculó como porcentaje de radiactividad incorporada en la fracción de colecsterol esterificado en el tiempo de incubación.

Las diferencias estadísticas de los resultados se calcularon por el test de la *t* de Student.

Resultados y Discusión

En la tabla I se muestran los porcentajes de esterificación del colecsterol plasmático tras la adición de poliestradiol en cantidades que oscilaron entre 0,1 y 2 μg por incubado. Este rango de concentraciones se escogió tras un estudio previo, en el que se determinaron por radioinmunoensayo los niveles de estradiol circulantes en el plasma de ratas tratadas con dosis farmacológicas de la hormona (datos no publicados). El poliestradiol inhibe la actividad de la LCAT en plasma de ratas hembras, observándose grados de inhibición similares para todas las concentraciones empleadas. En caso de ratas machos, el poliestradiol disminuye la actividad enzimática empleando entre 1 y

Tabla I. Efecto *in vitro* del poliestradiol sobre la velocidad de esterificación del colesterol en plasma de ratas machos y hembras.

La actividad de la LCAT está expresada como porcentaje de colesterol esterificado en 20 minutos de incubación. El volumen total de los incubados fue de 0,180 ml. Los resultados se expresan como valores medios \pm error estándar medio ($n = 4$). ^a N.S., ^b $P \leq 0,05$, ^c $P \leq 0,005$.

Sexo	Control	μg poliestradiol/incubado				
		0,1	0,5	1	1,5	2
Machos	7,62 \pm 0,33	7,53 \pm 0,11 ^a	7,48 \pm 0,23 ^a	6,70 \pm 0,22 ^c	6,79 \pm 0,37 ^b	7,45 \pm 0,31 ^a
Hembras	6,42 \pm 0,08	5,78 \pm 0,18 ^c	5,78 \pm 0,16 ^c	6,14 \pm 0,14 ^b	5,90 \pm 0,08 ^c	5,71 \pm 0,12 ^c

1,5 μg por incubado. Estos datos indican que la respuesta del enzima a las distintas concentraciones hormonales es variable según el sexo del animal y que no existe correlación entre el grado de inhibición y la concentración de poliestradiol.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo discrepan de los obtenidos previamente *in vivo*, en los que dosis farmacológicas de poliestradiol no modificaron la velocidad inicial de esterificación del colesterol plasmático (7). Son hechos conocidos que la administración de estrógenos al animal integro incrementa el nivel de VLDL plasmáticas y que estas lipoproteínas ricas en triacilgliceroles son activadoras de la LCAT (5, 6, 12). Además, el hígado aislado y perfundido de ratas hembras sintetiza y libera más LCAT que el de ratas macho (15). Ambas acciones podrían explicar la aparente falta de efecto que se observa tras la administración de estrógenos: la evidente inhibición que la presencia del poliestradiol produce en la actividad de la LCAT quedaría enmascarada por una mayor concentración en el plasma del enzima y de factores activadores como VLDL y triacilgliceroles. Resultados discrepantes en experimentos *in vivo* e *in vitro* han sido obtenidos en diversos estudios sobre sustancias que modifican la velocidad de esterificación del colesterol plasmático (3, 16).

El efecto inhibitorio del poliestradiol en la reacción de la LCAT plasmática es difícil de interpretar. Se descarta la posibilidad de una interferencia de la hormona

en el intercambio (H^3)colesterol y el endógeno de lipoproteínas, ya que la adición del poliestradiol al ensayo se realiza tras las 4 horas de preincubación necesarias para alcanzar el máximo equilibrio isotópico (1). Se sugieren, para el poliestradiol, dos posibles niveles de activación: bien directamente sobre el enzima plasmático, bien sobre el sustrato de la LCAT, interaccionando con el colesterol de las lipoproteínas durante la incubación y, por tanto, retardando su esterificación. Se requieren posteriores investigaciones para dilucidar cuál de los dos postulados es el correcto.

Resumen

Se estudia el efecto *in vitro* de cantidades crecientes de poliestradiol sobre la actividad de la LCAT en plasma de ratas machos y hembras. En ambos sexos la hormona disminuye la actividad enzimática. La concentración hormonal necesaria para producir la inhibición es superior en el plasma de ratas machos que de hembras. No se encuentra correlación entre actividad de la LCAT y concentración de poliestradiol.

Bibliografía

- ADLKOFER, F., ARMBRECHT, U. y SCHLEUSNER, H.: *Horm. Met. Res.*, **6**, 142-146, 1974.
- ANDERSEN, J. M., NERVI, F. O. y DIETSCHY, J. M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **489**, 298-307, 1977.
- CISTERNAS, J. R.: *Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.*, **12**, 317-324, 1979.

4. FROHLICH, J., BERNSTEIN, V. y BERNSTEIN, M.: *Clin. Chim. Acta*, 65, 79-82, 1975.
5. GANDARIAS, J. M., ABAD, C., LACORT, M. y OCHOA, B.: *Rev. Clin. Esp.*, 157, 269-273, 1980.
6. GANDARIAS, J. M., LACORT, M., AINZ, L. F., GOIRIENA, J. J. y OCHOA, B.: *Abst. XVI Congreso Nacional SECF*, 1977.
7. GANDARIAS, J. M., LACORT, M., OCHOA, B. y QUIROGA, M.: *Lipids*, 16, 449-453, 1981.
8. GLOMSET, J. A.: *J. Lipid Res.*, 9, 155-167, 1968.
9. HILL, P. y MARTIN, W. G.: *Can. J. Biochem.*, 50, 474-483, 1972.
10. KRELL, K. y HASHIM, S. A.: *J. Lipid Res.*, 4, 407-416, 1963.
11. LEISS, O., MURAWSKI, U. y EGGE, H.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 38, sup. 150, 77-84, 1978.
12. MARCEL, Y. L. y VEZINA, C.: *J. Biol. Chem.*, 248, 8254-8259, 1973.
13. PORTMAN, O. W. y SUGANO, M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 105, 532-540, 1964.
14. RAY, E., BELLINI, F., STOUDET, G., HEMPERLY, S. y ROTHBLAT, G.: *Biochim. Biophys. Acta*, 617, 318-334, 1980.
15. SOLER-ARGILAGA, C., RUSSELL, R. L., GOH, E. H. y HEIMBERG, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 488, 69-75, 1977.
16. SOLER-ARGILAGA, C., RUSSELL, R. L. y HEIMBERG, M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 17, 135-139, 1977.
17. STOKKE, K. T. y NORUM, K. R.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 27, 21-27, 1971.
18. VALLENTIN, L. y VIKROT, O.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 35, 661-667, 1975.
19. WEINSTEIN, I., TURNER, F. C., SOLER-ARGILAGA, C. y HEIMBERG, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 530, 394-401, 1978.