



- ◆ Trabajo realizado por el equipo de la Biblioteca Digital de CEU-Universidad San Pablo
- ◆ Me comprometo a utilizar esta copia privada sin finalidad lucrativa, para fines de investigación y docencia, de acuerdo con el art. 37 de la M.T.R.L.P.I. (Modificación del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual del 7 julio del 2006)

4.5

Métodos para la determinación en plasma de actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo lipídico

Miguel A. Lasunción y Emilio Herrera
*Unidad de Dislipemias, Servicio de Bioquímica-Investigación.
Hospital Ramón y Cajal (Madrid)*

LIPOPROTEINA LIPASA

La determinación de la actividad de lipoproteína lipasa tiene interés por cuanto esta enzima es la máxima responsable del aclaramiento de los triglicéridos del plasma. Fisiológicamente la lipoproteína lipasa se encuentra enlazada a las células endoteliales y, por lo tanto, la actividad que se detecta en el plasma es mínima. De ahí que se recurra a valorarla en plasma posheparínico, aprovechando la acción de la heparina liberando esta enzima de su enclave. Debe tenerse presente que la actividad que se detecta en el plasma posheparínico es representativa de la global del organismo y que los diferentes tejidos tienen actividades características que responden ante estímulos hormonales o de otra índole, incluso de forma opuesta.

La actividad de lipoproteína lipasa se determina midiendo la hidrólisis de algún preparado que contenga triglicéridos radiactivos. Normalmente es una emulsión que tiene, además de los triglicéridos, fosfolípidos (que ayudan a estabilizar la emulsión) y apoproteína C-II, el activador de la lipoproteína lipasa. Puede recurrirse también a la utilización de lipoproteínas previamente marcadas con triglicéridos radiactivos. A continuación se describen las preparaciones de ambos tipos de sustratos así como el método de incubación y extracción de los ácidos grasos liberados.

Método 1

Emulsión de trioleína-¹⁴C

Se sigue el método de P. Nilsson-Ehle, M. C. Schotz. J. Lipid Res. 17: 536-541. 1972.

En un tubo de vidrio apto para el sonicador se adicionan 6 mg de trioleína, 3,3 mg de lecitina y 12,5 μ Ci de glicerol tri-(1-¹⁴C) oleato, evaporándose el disolvente bajo corriente de nitrógeno. Se añaden 5 ml de glicerol y se sonica la solución, en baño de hielo, 5 veces, 1 min. cada vez, con intervalos de parada de 1 min., a 15.000 micro-nes aproximadamente. Este preparado es estable durante un mes aproximadamente, conservado a temperatura ambiente, en oscuridad. La actividad específica es de alrededor de 4.000 dpm/ μ mol.

El día de su utilización se mezcla un volumen de ese preparado con medio volumen de plasma (como fuente de apo C-II) precalentado 10 min a 60° C, y otro volumen de tampón tris-HCl 0,2 M, pH 8,2, que contiene NaCl 0,15 M y albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos al 6 %. Los componentes se mezclan homogéneamente con el agitator. Esta mezcla de reacción se mantiene en baño de hielo para su utilización inmediata.

Ensayo

En tubos de vidrio colocados sobre baño de hielo se pipetea, por duplicado, 50 μ l de las muestras (plasmas posheparínicos), 50 μ l de NaCl 0,15 M o bien de NaCl 3,55 M (en este caso, para alcanzar una concentración final igual a 1 M y así inhibir la lipoproteína lipasa) y 100 μ l de la mezcla de reacción. Se incorporan también unos «blancos» (salino en vez de plasma posheparínico) y controles (plasma posheparínico humano o de rata, que se guardan alícuotados a -70° C).

Los tubos se incuban 30 min. a 37° C en un baño con agitación de 60 ciclos por minuto. La reacción se detiene por adición de 3,5 ml de cloroformo:heptano:metanol (1,25:1,41:1,0 v/v), se agitan los tubos y se les añade 1 ml de tampón borato (H_3BO_3/KCO_3) 0,1 M, pH 10,5. Se agitan con agitator durante 30 seg. y se centrifugan a temperatura ambiente 20 min. a 2.000 r.p.m. Se toma 1 ml de la fase superior, que se coloca en viales de radiactividad que contienen 10 ml de líquido de centelleo para muestras hidrosolubles. Se determinan las DPM.

La radiactividad total en los tubos se determina contando las DPM de una alícuota de 25 μ l del sustrato (por cuadruplicado).

Para el cálculo de la actividad de lipoproteína lipasa en la muestra, a las DPM se le restan las de los correspondientes tubos con NaCl 1 M, y se considera la radiactividad específica del sustrato en el tubo de ensayo (es decir, hay que considerar la cantidad de triglicéridos del sustrato añadido y también los de la muestra) y la efectividad de extracción de los ácidos grasos libres (siendo el volumen de la fase orgánica superior de 2,45 ml y la eficacia de extracción de los ácidos grasos del 70 %). Con esta técnica, la actividad de lipoproteína lipasa en el plasma posheparínico humano (obtenido a los 10 min. de la inyección i.v. de 50 U de heparina por kg de peso corporal) es del orden de 500 pkat/ml. La presencia de una elevada concentración de VLDL en la muestra puede acarrear una paradójica inhibición de la lipoproteína lipasa, al competir las VLDL con la emulsión de la trioleína- ^{14}C .

El cálculo de la actividad en pkat/ml se resume en:

$$\frac{(DPM \text{ muestra} - DPM \text{ 1 M NaCl})}{DPM \text{ totales de 25 } \mu\text{l}} \times 9.7222 \times (623,4 + 50 \times TG \text{ muestra}),$$

siendo TG la concentración de triglicéridos en la muestra (mM).

Método 2

— Marcaje de VLDL con trioleína- 3H

Para el marcaje de las VLDL con trioleína radiactiva se aprovecha la acción de la proteína transferidora de lípidos neutros que está presente en el plasma humano. Las alternativas son múltiples, variando las proporciones de los diferentes componentes. A continuación se describe una de las más sencillas.

Se depositan 10 μ Ci de glicerol tri(8,9n- 3H) oleato en un frasco y se evapora el disolvente bajo corriente de nitrógeno. Se añaden 50 μ l de dimetilsulfóxido, cuidando que moje el espacio ocupado por la trioleína radiactiva, para disolverla. A continuación se añaden 200 ml de plasma humano. Se coloca el frasco en un baño a 37° C con agitación de 60 ciclos por minuto durante 18 h. El plasma se trasvasa a tubos de ultracentrífuga, completando el volumen con 0,15 M NaCl, y se centrifugan a 100.000xg durante 18 h, a 25° C. Se recoge el sobrenadante, que contiene las VLDL, se dializa frente a 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA. Na_2 y se determinan la concentración de triglicéridos y las DPM, para calcular la actividad específica, que debe ser del orden de 400 DPM/nmol. La concentración de triglicéridos debe ajustarse a 6,3 mM (diluyendo con la solución de NaCl y EDTA o bien concentrando). Estas VLDL- 3H se pueden conservar congeladas. Con el tiempo aumenta la proporción de ácidos grasos libres radiactivos, que nunca deben superar el 1 % de la radiactividad total.

— Ensayo

En tubos de vidrio, en baño de hielo, se pipetea por duplicado 100 μ l de tampón tris-HCl 0,2 M, conteniendo NaCl 0,15 M y albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos al 18 %, pH 8,2, 50 μ l de NaCl 0,15 M, 50 μ l de las VLDL- 3H y 10 μ l de muestra (plasma posheparínico). En otros tantos tubos, donde se pretende inhibir la lipoproteína lipasa, se añade lo mismo excepto el NaCl 0,15 M, que se sustituye por NaCl 3,42 M; en ellos, la concentración final de NaCl será 1 M. Se incorporan también unos «blancos» (salino en

vez de plasma posheparínico) y controles (plasma posheparínico humano o de rata, que se conservan alicuotados a -70°C).

Los tubos se incuban 30 min. a 37°C en un baño con agitación a 60 ciclos por minuto. La reacción se detiene por adición de 3,5 ml de cloroformo:heptano:metanol (1,25:1,41:1,0 v/v), se agitan los tubos y se les añade 1 ml de tampón borato ($\text{H}_3\text{BO}_3/\text{KCO}_3$) 0,1 M, pH 10,5. Se agitan con agitadubos durante 30 seg. y se centrifugan a temperatura ambiente 20 min a 2.000 r.p.m. Se toma 1 ml de la fase superior, que se coloca en viales de radiactividad que contienen 10 ml de líquido de centelleo para muestras hidrosolubles. Se determinan las DPM.

La radiactividad total en los tubos se determina contando las DPM de una alicuota de 50 μl del sustrato (por cuadruplicado).

Para el cálculo de la actividad de lipoproteína lipasa en la muestra, a las DPM se le restan las de los correspondientes tubos con NaCl 1 M, y se considera la radiactividad específica del sustrato en el tubo de ensayo (es decir, hay que considerar la cantidad de triglicéridos de la VLDL- ^3H añadidas y también los de la muestra) y la efectividad de extracción de los ácidos grasos libres (siendo el volumen de la fase orgánica superior de 2,45 ml y la eficacia de extracción de los ácidos grasos del 70 %). Con esta técnica, la actividad de lipoproteína lipasa en el plasma posheparínico humano (obtenido a los 10 min. de la inyección i.v. de 50 U de heparina por kg de peso corporal) es del orden de 500 pkat/ml.

El cálculo de la actividad en pkat/ml se resume en:

$$\frac{(\text{DPM muestra} - \text{DPM 1 M NaCl}) \times 94,44 \times (50 \times \text{TG-VLDL} + 10 \times \text{TG muestra})}{\text{DPM totales de } 50 \mu\text{l}}$$

siendo TG la concentración de triglicéridos en las VLDL- ^3H o en la muestra, expresada en mM.

LIPASA HEPATICA ENDOTELIAL

La actividad de lipasa hepática endotelial para el diagnóstico clínico se suele determinar en plasma posheparínico aprovechando su capacidad para hidrolizar triglicéridos. Por lo tanto, el sustrato suele ser una emulsión de triglicéridos radiactivos y se valora la aparición de ácidos grasos libres radiactivos. La actividad de lipoproteína lipasa (que tam-

bién está presente en el plasma posheparínico) se inhibe mediante la adición de NaCl a una concentración final de 1 M, o bien anticuerpos específicos contra ella. En nuestro caso seguimos el método de JK Huttunen, CH Ehnholm, PKJ Kinnunen, EA Nikkila, *Clin Chim Acta* 63: 335-347, 1975.

Reactivos

Tampón tris-HCl 0,1 M, pH 8,5, conteniendo NaCl 1,5 M y albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos al 6 % (esta solución se conserva alicuotada en el congelador).

Goma arábica al 5% en agua destilada (una vez preparada, se filtra y se conserva alicuotada en el congelador).

Preparación de la emulsión

Para un volumen final de 7,5 ml, en un tubo de vidrio adecuado para el sonicador, añadir 35 mg de trioleína y 6 μCi de trioleína radiactiva (marcados los ácidos grasos en el carbono 1 con ^{14}C). Evaporar el disolvente con corriente de nitrógeno. Añadir 2,5 ml de goma arábica al 5 % y sonicar 3 veces durante 60 seg., con intervalos de pausa de otros 60 seg., en baño de hielo y evitando la formación de burbujas. Finalmente se añaden 5 ml del tampón tris-HCl y se agita con agitadubos. La actividad específica de este sustrato es de alrededor de 350 dpm/ μmol . Este sustrato debe utilizarse el mismo día de su preparación.

Ensayo

En tubos de vidrio, por duplicado, se pipetea 50 μl de los plasmas posheparínicos (muestras) o de salino (blancos) y 150 μl del sustrato. Se agitan con agitadubos y se incuban 30 min. a 37°C en un baño con agitación a 40 ciclos por minuto. Se para la reacción añadiendo 3,5 ml de cloroformo:heptano:metanol (1,25:1,41:1,0 v/v), se agitan los tubos y se les adiciona 1 ml de tampón borato ($\text{H}_3\text{BO}_3/\text{KCO}_3$) 0,1 M, pH 10,5. Se agitan con agitadubos durante 30 seg. y se centrifugan a temperatura ambiente durante 20 min. a 2.000 r.p.m. Se toma 1 ml de la fase superior, que se coloca en viales de radiactividad que contienen 10 ml de líquido de centelleo para muestras hidrosolubles. Se determinan las DPM.

La radiactividad total en los tubos se determina contando las DPM de una alícuota de 25 μ l del sustrato (por cuadruplicado).

Para el cálculo de la actividad de la muestra, a las DPM se les restan las del blanco y se considera la radiactividad específica del sustrato y la efectividad de extracción de los ácidos grasos libres (el volumen de la fase orgánica superior es de 2,45 ml y la extracción de los ácidos grasos es del 70 %). En otros casos puede interesar considerar la radiactividad específica de la trioleína- C^{14} en el tubo de ensayo, es decir, tener en cuenta también los triglicéridos de la propia muestra. Como controles interensayo pueden utilizarse plasmas posheparínicos humanos o bien una mezcla de plasmas posheparínicos de rata, conservados a -70° C en alícuotas. Con este método, la actividad de lipasa hepática en plasmas posheparínicos (obtenidos a los 10 min después de la inyección i.v. de 50 U de heparina por kg de peso corporal) es del orden de 1.000-500 pkat/ml en la mujer y de 1.000 pkat/ml en el hombre.

El cálculo de la actividad en pkat/ml se resume en:

$$\frac{(\text{DPM muestra} - \text{DPM blanco})}{\text{DPM totales de } 25 \mu\text{l}} \times 6.48 \times (791 + 50 \times \text{TG muestra})$$

siendo TG la concentración de triglicéridos en la muestra (mM).

LECITINA: COLESTEROL ACILTRANSFERASA

La actividad de LCAT en plasma se estima determinando la velocidad de esterificación del colesterol libre. En algunos métodos se determina químicamente la formación de colesterol esterificado a partir del libre de la propia muestra, pero tienen más sensibilidad los que utilizan como sustrato proteoliposomas que contienen colesterol radiactivo y determinan el colesterol esterificado radiactivo formado tras su incubación en presencia de la muestra. El proteoliposoma debe contener, además de colesterol, fosfatidilcolina (que actuará como dador de ácidos grasos para la esterificación) y apolipoproteína A-I (que es activadora de la LCAT).

El método que se propone es el de CH Chen, JJ Albers, *J Lipid Res* 23: 680-691, 1982.

Purificación parcial de la apo A-I

El plasma humano se ultracentrifuga a $d=1,25$ kg/l a $100.00 \times g$ durante 48 h y el sobrenadante obtenido se vuelve a ultracentrifugar, pero esta vez a $d=1,21$ kg/l. En la parte superior del tubo se recogen las lipoproteínas, que se deslipidan por tratamiento con 10 volúmenes de éter:etanol (3/1, v/v), a 4° C. Después de agitar se centrifugan los tubos, se desechan los sobrenadantes y se repite el proceso. El precipitado se redissuelve con guanidina-HCl 4 M durante 4 h a 37° C y la solución se dializa exhaustivamente frente a tampón tris-HCl 0,03 M, urea 6 M, pH 8,0. La muestra se aplica en una columna de DEAE celulosa (40 ml de gel) y se desarrolla la cromatografía con un gradiente lineal de 500 ml total de tampón tris-HCl 0,03-0,07 M, urea 6 M, pH 8,0. La apo A-I eluye aproximadamente a una concentración de tris-HCl de 0,05 M. La apo A-I se dializa frente a tampón tris-HCl 0,01 M, NaCl 0,14 M, EDTA. Na_2 0,001 M, pH 7,4, se lleva a una concentración de 1 mg/ml y se guarda en alícuotas a -70° C.

Preparación de los proteoliposomas

En un vial de centelleo de vidrio, pipetear 160 μ l de ($4-^{14}C$)-colesterol (0,05 mCi/1,25 ml, en benceno), 154 μ l de lecitina (50 mg/ml en etanol, conservada a 20° C). Se evaporan los disolventes con corriente de nitrógeno. Se añaden 2,8 ml de tampón tris-HCl 0,01 M, pH 7,4, conteniendo NaCl 0,14 M y EDTA. Na_2 0,001 M (tampón TES), 880 μ l de apo A-I (1 mg/ml en tampón TES, conservada a 70° C) y 300 μ l de colato sódico (314 mg/ml en tampón TES, conservado a 4° C). Se agita vigorosamente con agitatorios durante 60 seg, tres veces, con intervalos de pausa entre ellos, y se incuba la mezcla a 24° C, 20 min. con agitación de 100 ciclos por minuto. La mezcla se coloca en tubo de diálisis y se dializa durante 20 h a 4° C frente al tampón TES. Se recoge la mezcla y se ajusta su volumen a 4 ml con el tampón TES. Agitar suavemente y conservar este sustrato a 4° C para su utilización hasta un máximo de 1 mes.

Ensayo

En tubos de ensayo colocados en baño de hielo, pipetear 20 μ l del sustrato y 25 μ l de albúmina

sérica humana (2 % en el tampón TES). Incubar a 37° C durante 20 min. con agitación. Añadir ahora 10 µl de beta-mercaptoetanol (50 mM en el tampón TES), y 45 µl de las muestras (normalmente, plasmas diluidos 1:14 en tampón TES) (es preferible que el plasma sea fresco, que puede conservarse hasta 2 semanas a 4° C; si se utiliza plasma congelado, el control debe haberse congelado también puesto que pierden algo de actividad; la LCAT purificada pierde mucha actividad al congelarse). En otros tubos se adiciona tampón TES en vez de muestra («blancos» y «totales»). Se incuban a 37° C en un baño con agitación durante 30 min. (conviene hacer ensayos de linealidad e idoneidad del tiempo de incubación previamente). Tras la incubación se colocan los tubos en un baño de hielo y a los que contienen las muestras y a los «blancos» se les añade 1 ml de digitonina (1% en etanol); a los tubos «totales» se les añade 1 ml de etanol. Se agitan y a continuación se les adiciona a todos 50 µl de colesterol (5 mg/ml de etanol). Se agitan, se centrifugan a 2.800 r.p.m. a 6° C durante 20-30 min. y se toman 0,85 ml de sobrenadante para el conteo de la radiactividad.

Alternativamente, en vez de precipitar el colesterol libre con digitonina, se puede recurrir a se-

parar el colesterol libre del esterificado mediante cromatografía en capa fina. Para ello se detiene la reacción mediante la adición de 2 ml de etanol del 95% y, tras agitación, se les añade a los tubos 5 ml de hexano que contiene transportadores (se prepara disolviendo en 1.000 ml de hexano, 1 ml de una solución de colesterol libre [1 mg/ml] y de colesterol-oleato [1 mg/ml] en cloroformo). Se agitan los tubos vigorosamente y se centrifugan para separar las fases. Se trasvasa la fase superior (de hexano) a otro tubo y al anterior se le vuelven a añadir 3 ml de hexano con transportadores. Se repite el proceso y se junta la nueva fase superior con la anterior. Los 8 ml de fase superior se evaporan con corriente de nitrógeno y el residuo se redisuelve en 0,25 ml de cloroformo. Alícuotas de esta solución se utilizan para la cromatografía en placas recubiertas de gel de sílice H. La cromatografía se desarrolla con éter de petróleo:acetato de etilo (85:15, v/v). Se revela la placa con vapores de yodo y se raspa la banda de colesterol esterificado (la que más migra) para el conteo de la radiactividad.

La actividad de LCAT se expresa en términos de velocidad de esterificación de colesterol (en % del inicial o en nmoles/h/ml de plasma).