

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



INMUNOELECTROFORESIS DE LIPOPROTEINAS
EN ACETATO DE CELULOSA

159

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

MA. DE LOURDES IRIGOYEN CORIA
MEXICO, D. F. 1974



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CLAS. Tesis
ADQ. 1974
FECHA
PROC. H.T. 151



QUIMICA

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE

PRESIDENTE	FERNANDO VELEZ OROZCO
V O C A L	RAMON GUEVARA ESTRADA
SECRETARIO	DEA CORONADO PERDOMO
PRIMER SUPLENTE	MARIO MIRANDA CASTRO
SEGUNDO SUPLENTE	ALFREDO GARZON PARRA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Centro Médico "La Raza"

NOMBRE COMPLETO DEL SUSTENTANTE:

María de Lourdes Irigoyen Coria

NOMBRE COMPLETO DEL ASESOR DEL TEMA:

Profra. Dea Coronado Perdomo

A LA MEMORIA DE MIS ABUELITOS:

Sr. Arnulfo Coria Garcés
Sr. Gustavo Irigoyen Rico
Sra. Ernestina Dorantes de Coria

A MIS PADRES

Mi vida, un principio.....un final
ellos al principio, instrumento del creador
ellos después del principio, guías de mi ser
Mi vida, un principio.....un final
ellos al principio, ellos.....,ellos al final.

CON CARÍÑO A MI ABUELITA Y HERMANOS

Agradezco a las autoridades del I. M. S. S.
y en especial al Dr. Pablo Rivera Hidalgo, -
Jefe del Laboratorio Centro Médico "La Raza"
por su ayuda y orientación para la realiza--
ción de este trabajo.

Con admiración y respeto a la Profesora
Q. F. B. Dea Coronado Perdomo, quien
encauzó mis inquietudes hacia la culmi--
nación de mis estudios.

Con gratitud a todos mis maestros,
a quienes debo mi formación intelectual.

INDICE

	Página
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	5
Historia	5
Principios de inmunolectroforesis	9
Reacciones de caracterización	28
Aspecto inmunoquímico de:	
Quilomicrones	33
Pre-beta lipoproteína	33
Beta lipoproteína	40
Alfa lipoproteína	44
Clasificación de Hiperlipoproteinemias	46
MATERIAL Y METODOS	
Material biológico	55
Inmunolectroforesis de proteínas	57
Inmunolectroforesis de lipoproteínas	63
Determinación de Lípidos totales	66
Determinación de colesterol	69
Determinación de triglicéridos y grasas neutras	71
Determinación de lipoproteínas por electroforesis	77
RESULTADOS	84
DISCUSION	118
RESUMEN Y CONCLUSIONES	124
BIBLIOGRAFIA	129

INTRODUCCION

En la actualidad se piensa que las alteraciones de la concentración de lipoproteínas plasmáticas aceleran el desarrollo de la arterioesclerosis, considerada como la causa más importante de ~~muertes prematuras~~.

Desde que se descubrió que las placas ateromatosas contenían cantidades considerables de colesterol, se relacionó con el metabolismo lipídico estimulando enormemente la investigación sobre los lípidos en los últimos 15 años.

En un principio los investigadores sólo enfocaron la determinación química de los lípidos y posteriormente se pensó en la importancia de las lipoproteínas como transportadoras de ellos.

Las lipoproteínas tienen una influencia marcada en la utilización y degradación de los lípidos, su concentración plasmática está determinada por factores genéticos y ambientales vinculados a su metabolismo inmediato o bien a una interrelación estre--

cha entre el metabolismo lipídico y el de los hidratos de carbono.

Los métodos para la determinación de lipoproteínas comprenden: precipitación, electroforesis, filtración en gel y el análisis inmunológico.

La antigenicidad de las lipoproteínas nos permite efectuar el análisis inmunolectroforético, el cual combina la electroforesis y la inmunodifusión. Es importante detenernos y reflexionar sobre la antigenicidad de las lipoproteínas y su importancia en la especificidad de la reacción de precipitación antígeno-anticuerpo.

Las lipoproteínas son macromoléculas constituidas por una parte proteica (Apo-proteína) y una parte lipídica; la parte proteica es la que le confiere especificidad antigénica y probablemente esos determinantes antigénicos se encuentren en la superficie de la molécula.

Siempre que se habla de una reacción antígeno-anticuerpo se infiere una combinación específica entre los grupos específicos del anticuerpo y los grupos correspondientes del antígeno o del hapteno, esta etapa se realiza sin alteración visible pero al formarse los arcos de precipitación se hace visible.

Otra de las características de la antigenicidad es com

probada mediante los trabajos de Blumberg y Berg³², quienes han encontrado anticuerpos contra las lipoproteínas en pacientes que han recibido múltiples transfusiones.

Las lipoproteínas son designadas como isoantígenos que inducen la formación de anticuerpos en forma similar a la de los animales inyectados con heteroantígenos o isoantígenos.

En la actualidad el análisis inmunoelectroforético nos proporciona una excelente evidencia de la heterogeneidad molecular de las lipoproteínas y sus variantes genéticas; la demostración de la heterogeneidad se lleva a cabo en términos de propiedades inmunológicas y composición de aminoácidos.

La literatura reporta trabajos inmunoquímicos de lipoproteínas, estas han sido estudiadas ampliamente en forma nativa y aislada como Apo-proteína, por lo general se han utilizado sueros específicos anti-beta lipoproteína y anti-alfa lipoproteína.

La naturaleza de la beta lipoproteína, pre-beta lipoproteína y alfa lipoproteína en padecimientos genéticos como la enfermedad de Tangier, y la A-beta lipoproteinemia han sido tema de diversas investigaciones y no le han dado mucha importancia a la obtención de patrones inmunoelectroforéticos de lipoproteínas de acuerdo a la clasificación de hiperlipoproteinemias, con excep-

ción del tipo 11.

Es evidente que si la alteración de los lípidos produce alteración en la concentración de lipoproteínas probablemente los patrones inmunoelectroforéticos serían distintos; ya que tenemos conocimiento de los valores normales, en México, de las concentraciones de lípidos séricos y de lipoproteínas, nos permiten evidenciar las alteraciones patológicas; y como no conocemos los patrones inmunoelectroforéticos nos inquietó el estudio inmunoelectroforético de las lipoproteínas.

La presente tesis profesional tiene como propósito el estudio inmunquímico de las lipoproteínas en acetato de celulosa y comprende: obtención de patrones normales inmunoelectroforéticos y patrones correspondientes a la clasificación de Fredrickson.

La metodología empleada fue adaptada por nosotros, para la realización de esta tesis, partiendo de la técnica de inmunoelectroforesis de proteínas con modificaciones hechas que se explicaran en la metodología y discusión.

A pesar de que el análisis inmunoelectroforético ofrece una aplicación práctica limitada en el laboratorio de análisis clínicos, deseo que el contenido de este trabajo contribuya a una mejor comprensión del conocimiento inmunquímico y de ayuda para el diagnóstico en los trastornos del metabolismo lipídico.

GENERALIDADES

HISTORIA DEL ESTUDIO DE LAS LIPOPROTEINAS MEDIANTE LA INMUNOELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA Y OTROS MEDIOS DE SOPORTE.

El análisis inmunolectroforético a través del tiempo ha sufrido varias modificaciones hasta alcanzar las características adecuadas para su aplicación en la identificación inmunológica de las fracciones proteicas y lipoproteicas del suero.

En 1919 Tiselius A y Kabat después de realizar la electroforesis libre, separaron las proteínas de un suero y realizaron reacciones inmunológicas.

Se puede decir que Grabar y Williams son los creadores de la inmunolectroforesis como método de aislamiento de proteínas al combinar el método de electroforesis de zona usando como medio de soporte gel-agar y la técnica de la doble difusión.

A partir de 1953 una serie de investigadores se han dedicado al estudio del análisis inmunolectroforético en diversos

medios de soporte. Los medios de soporte más empleados son el gel-agar y la agarosa, como se puede apreciar por la infinidad de trabajos reportados.

El acetato de celulosa fue utilizado en este tipo de análisis en 1958 cuando Kohn¹ demostró que era adecuado, ya que permite la difusión regular y ordenada del antígeno y el anticuerpo.

Grunbaum y Dong² obtuvieron 35 líneas de precipitación específica empleando como medio de soporte el acetato de celulosa.

En 1960 Grunbaum observó las ventajas tanto del papel como las del agar reunidas en las membranas de acetato de celulosa; la fácil manipulación del papel y la amplitud de la aplicación similar a la de los geles.

Se siguieron haciendo modificaciones al método para ser usado con fines de diagnóstico en el laboratorio clínico, estas modificaciones fueron hechas por Grunbaum y Zec en 1963 y 1965.

La técnica "inmunoelectroforesis en acetato de celulosa" no resulta conveniente para su aplicación en el estudio de las lipoproteínas según lo mencionan los trabajos realizados por Grunbaum y Zec, quienes sugieren la extracción de lípidos y pro-

bablemente de lipoproteínas por solventes orgánicos utilizados en la técnica creada para proteínas. Es por ello que no encontramos en la literatura trabajos reportados para lipoproteínas.

En 1966 Fredrickson, Levy y Lees estudiaron ampliamente la naturaleza inmunoquímica de las alfa, beta y pre-beta lipoproteínas así como sus variantes genéticas y la heterogeneidad molecular.

La técnica de Ouchterlony en agar fue empleada por Blumberg (1964) para demostrar la especificidad múltiple antigénica de las lipoproteínas del suero detectada con sueros de pacientes transfundidos.

En 1968 Grabar y Burtin identificaron varias bandas de precipitación con las fracciones sudanófilas detectadas por electroforesis en agar, 3 clases de lipoproteínas fueron descritas de acuerdo a su movilidad electroforética y designadas como: quilomicrones, lipoproteínas lentas y lipoproteínas rápidas.

Recientemente Messerschmidt y Seedee en 1972 han propuesto un procedimiento para la separación de lípidos empleando como medio de soporte: cellogel (acetato de celulosa gelatinizado) y obtuvieron un patrón normal inmunoelectroforético de lipoproteínas, donde identificaron 2 bandas de precipitación correspon

dientes a la alfa y beta lipoproteína por su afinidad al colorante - rojo 7 B.

PRINCIPIOS DE INMUNOELECTROFORESIS

El análisis inmunolectroforético combina dos técnicas la electroforesis y la inmunodifusión. Consiste en la separación electroforética seguida de la difusión de anticuerpos precipitantes en el mismo medio de soporte, perpendicularmente a la dirección de la electroforesis.

En el análisis inmunolectroforético los anticuerpos precipitantes se unen a sus correspondientes antígenos para formar bandas de precipitación. Cada antígeno produce una banda independiente debido a la especificidad y sensibilidad de la reacción de precipitación.

ELECTROFORESIS

La migración de las proteínas en un campo eléctrico fue estudiada primero por Tiselius, quien usó medio líquido y se le conoce como electroforesis libre.

La electroforesis de zona usa un medio sólido como -

sostén o matriz del amortiguador en donde se encuentran las proteínas y en el cual viajan, el material sólido permite la adhesión de las proteínas después de la fijación. Los medios estabilizantes son: papel, gel-agar, acetato de celulosa, agarosa y acrilamida; el acetato de celulosa reúne cualidades importantes, éstas que dan resumidas en el siguiente cuadro.

CUADRO 1
PROPIEDADES DE LOS MEDIOS DE SOPORTE

Medio de Soporte	Tiempo	Agua de hidratación	Tamaño del poro
Papel	18 hrs.	Hidrofilico	--
Acetato de celulosa	30-45 min.	6 %	0.22 u
Gel-agar	30-45 min.	90 - 98 %	0.006 u
Agarosa	30-45 min.	90 - 98 %	0.006 u

Componentes básicos de la electroforesis.

- A). Inducción de la carga eléctrica en las proteínas.
- B). Campo eléctrico
- C). Solución amortiguadora
- D). Fuerza electroosmótica

A). Inducción de la carga eléctrica en las proteínas

Las proteínas son moléculas de elevado peso molecular formadas por unidades fundamentales L-aminoácidos, los cuales se unen entre sí por el enlace péptido. Las proteínas son anfotéricas y dependiendo del pH en que se encuentren toman la carga eléctrica.

B). Solución Amortiguadora

Definición: Es aquella que resiste la adición de ácidos o álcalis sin cambiar su pH, generalmente una solución amortiguadora está formada por una mezcla de un ácido débil Brønsted y su base conjugada.

La fuerza iónica de una solución amortiguadora está dada por:

$$u = I / 2 C Z^2$$

C = Molaridad de un ión

Z = Carga iónica

I = Suma de todos los iones

Dependiendo de la fuerza iónica se pueden obtener 3 tipos de electroforesis:

0.0375 u Macroelectroforesis

0.050 u Semimicroelectroforesis

0.075 u Microelectroforesis

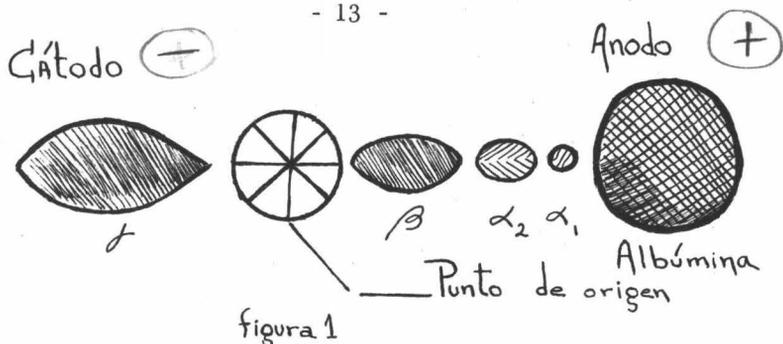
Carga eléctrica neta.

A mayor carga neta de la proteína, mayor separación electroforética.

Globulina pH 8.6
-
 pI 7.2
 1.4 carga neta

Albúmina pH 8.6
-
 pI 4.7
 3.9 carga neta

La albúmina está cargada más negativamente que la gamma globulina por lo que la albúmina migrará más hacia el ánodo. La ionicidad de la solución amortiguadora es importante ya que se incrementa la separación electroforética al decrecer la fuerza iónica, este hecho es fundamental para la inmunoelectroforesis.



D). Fuerza electroendosmótica

La electroósmosis o electroendósmosis es una fuerza de arrastre a través del acetato de celulosa con carga negativa y consiste en un movimiento en dirección opuesta a la corriente eléctrica. Esta fuerza se origina debido a que el acetato de celulosa no es una sustancia absolutamente neutra sino que posee grupos OH^- de acetilo lo que imparte una carga neta negativa.

El efecto electroendosmótico se evita mediante el amortiguador, los iones hidronio contrarrestan la carga negativa y se evita el movimiento hacia el ánodo.

La posición de un constituyente al finalizar la electroforesis es el resultado de su desplazamiento por la corriente eléctrica y del cambio de posición debido a la electroendósmosis.

Las sustancias neutras sólo serán transportadas por la corriente endosmótica y al final de la electroforesis ocuparán una posición que corresponde al punto de desplazamiento cero³⁻⁴⁻⁵.

Migración de partículas.

La separación de las partículas cargadas, a través - del acetato de celulosa, es inversamente proporcional a la longi tud del soporte y directamente proporcional al voltaje y al tiempo.

Distancia de la migración.

$$d = \frac{V t u}{l} \dots \dots \dots (1)$$

d = distancia de migración en cm

V = Voltaje en volts

t = Tiempo en segundos

l = Longitud del acetato de celulosa en cm

u = Movilidad de la proteína (distancia a la que migra).

Si la ecuación (1) se resuelve para u

$$dl = V t u \dots \dots \dots (2)$$

$$u = \frac{dl}{Vt} \dots \dots \dots (3)$$

Unidades:

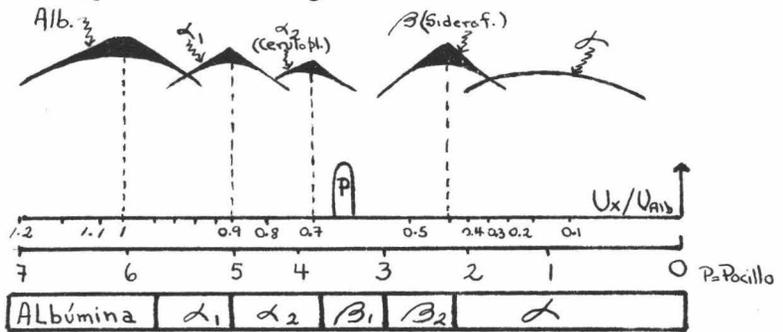
$$\frac{dl}{Vt} = \frac{\text{cm} \times \text{cm}}{\text{volts} \times \text{seg}} = \frac{\text{cm}^2}{\text{volts} \text{ seg}}$$

De este modo la movilidad se expresa en $\text{cm}^2 \times \text{volts}^{-1} \times \text{seg}^{-1}$. La determinación de la movilidad electroforéti

tica tiene aplicación en el estudio inmunoelectroforético.

Determinación: Se traza una perpendicular desde el vértice de la banda de precipitación cuya movilidad se quiere determinar a una línea paralela al eje de migración. La distancia entre esta perpendicular y el punto de movilidad cero sirve para calcular la movilidad electroforética.

La figura 2 muestra la posición de las bandas de precipitación específica en la migración electroforética.



Movilidades electroforéticas de los componentes proteicos del suero humano normal.

Componentes proteicos del suero humano normal	Movilidades medias $\text{cm}^2 \times \text{Volts}^{-1} \times \text{seg}^{-1}$
---	--

Globulinas

Macroglobulinas (B_2) B_2M

B_2C 2.00

B_2A

Componentes proteicos del suero humano normal		Movilidades	medias
		$\text{cm}^2 \times \text{Volts}^{-1}$	$\times \text{seg}^{-1}$
Siderofilina	B_I	2.83	
	$B_I B$	3.03	
	$B_I A$	3.23	
Haptoglobina	α_2	3.95	
	α_2	4.05	
Ceruloplasmina	α_2	4.16	
	α_2	4.43	
	α_2	4.52	
	α_{1A}	5.18	
Seroalbúmina		5.94	Valores de Schultze ⁴ gel-agar
Seromucoide	α_0	6.0	

Efecto del tamaño del poro y adsorción.

Hay dos factores que afectan la movilidad: tamaño del poro y la adsorción, esto es la adhesión de moléculas a la superficie de cuerpos sólidos, los efectos de la adsorción pueden contrarrestarse incrementando el pH.

IMUNODIFUSION⁴. - La fase de la inmunodifusión comienza cuando finaliza la electroforesis al depositar el antisuero perpendicularmente a la dirección de la electroforesis tan pronto como el suero ha sido absorbido.

Debido a la estructura de la membrana de acetato de celulosa a escala microscópica que es similar a la de una esponja; cuyos poros tienen un diámetro de 0.22 μ y una variación entre poro y poro constante, que permite una difusión regular y ordenada ¹. El antígeno y el anticuerpo difunden en todas direcciones y cuando se encuentran unos y otros en la proporción adecuada producen complejos insolubles que precipitan, estos precipitados forman bandas más o menos elipsoidales.

SISTEMA DE DOBLE DIFUSION "OUCHTERLONY".

En 1947 Ouchterlony desarrolló un método de difusión en gel que permite la difusión de ambos, el anticuerpo y el antígeno. Cuando se lleva a cabo la electroforesis obtenemos 5 diferentes fracciones: albúmina, alfa₁ globulina, alfa₂ globulina, beta globulina y gamma globulina. La figura 3 muestra las 5 fracciones: la globulina es la única fracción que aparece del lado izquierdo (cátodo) del punto de origen por lo que al reaccionar con el antisuero se formará una banda de precipitación en esa área.

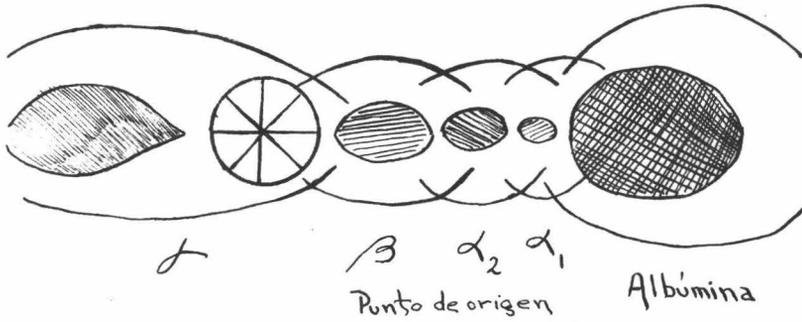


Figura 3

Si utilizamos un suero anti albúmina observaremos lo siguiente:

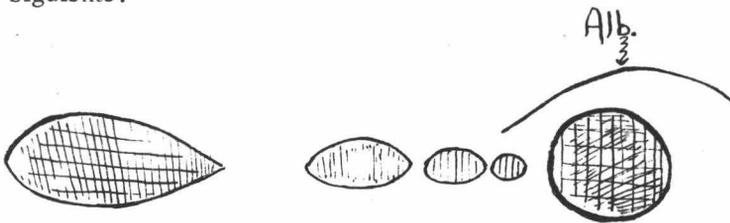


Figura 4

Si se hiciera lo mismo con anti alfa₁, anti alfa₂ y anti beta obtendríamos el patrón inmunolectroforético de la figura 5.

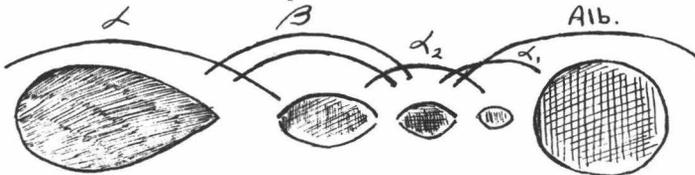
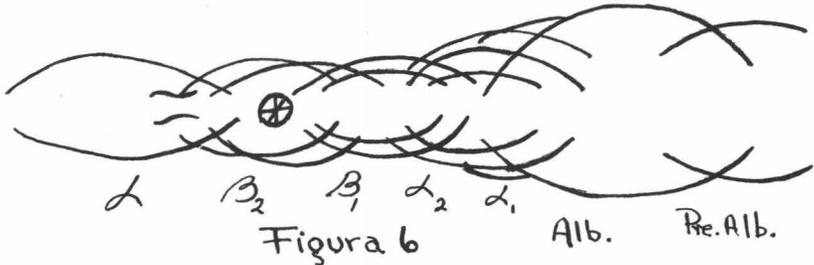


Figura 5

Utilizando un suero polivalente se pueden obtener 29_
bandas de precipitación. Figura 6.



REACCION DE PRECIPITACION ESPECIFICA

La reacción serológica entre el antígeno y el anticuerpo es una reacción de naturaleza química. Se desarrolla en dos etapas: a) combinación específica y b) reacción observable (precipitación).

a). Combinación específica entre los grupos específicos del anticuerpo y los grupos correspondientes del antígeno o -- del hapteno, esta etapa se realiza sin alteración visible extremadamente rápida con mayor intercambio energético con relación a la segunda; mayor especificidad detectada solo indirectamente.

b). Reacción observable es detectada directamente al formarse las bandas de precipitación. Esta etapa se caracteriza por el decremento en la velocidad e intercambio energético⁷.

a). Primera etapa: Combinación específica.

Naturaleza de la unión antígeno-anticuerpo. La unión es de naturaleza química y debida a la combinación de los grupos reactivos específicos.

Estos grupos reactivos son los determinantes antigénicos cuya especificidad está dada por el número y disposición de los diversos aminoácidos en la superficie de las moléculas. Esto se apoya en el hecho de que los antígenos reaccionan con moléculas esféricas.

TIPO DE UNION

En un principio se pensó que la unión se debía solamente a las fuerzas de Coulomb, atracción entre cargas negativas y positivas y por ende la combinación entre el antígeno y el anticuerpo se debía principalmente a la atracción entre los grupos amino y carboxilo. Este mecanismo iónico fue señalado por Heidelber^g y Kendall en 1929 y tenía como puntos de apoyo: la rapidez de la reacción de combinación y la poderosa influencia de los grupos polares.

Unión covalente Landsteiner "..... por la velocidad y la facil reversibilidad, las reacciones antígeno-anticuerpo se diferencian de las que son producto de las valencias primarias y se asemejan a la formación de compuestos iónicos y moleculares⁷.

En la actualidad se piensa que las fuerzas de Van der Waals son las más importantes para mantener juntos el antígeno y el anticuerpo. Esta fuerza es una especie de atracción intermolecular y actúa entre dos moléculas de una misma clase. Cuando una molécula tiene un momento dipolar instantáneo provoca un cambio eléctrico igual, que actúa polarizando a las moléculas cercanas, trae como consecuencia, que los electrones de la segunda molécula produzcan una fuerza de atracción sobre la primera molécula.

La atracción de Van der Waals aumenta en forma inversamente proporcional a las distancias interatómicas por lo tanto la atracción no es muy importante cuando las moléculas están muy separadas.

Segunda etapa (REACCION OBSERVABLE)

Reacción de precipitación. - Esta etapa es detectada por la formación de una banda de precipitación.

Existen cuatro factores que determinan la reacción de precipitación:

- a). Antigenicidad
- b). Inmuno suero (concentración óptima)

- c) Concentración del antígeno
- d) Distancia entre la aplicación de la muestra y los canales laterales.

a). Antigenicidad

Antígeno; este término ha sido usado en dos sentidos, primero como una sustancia que introducida en el organismo induce la producción de anticuerpos o bien como una sustancia que reacciona en forma visible con los anticuerpos.

Condiciones de antigenicidad: a) difusible, b) tamaño y peso molecular, c) estructura rígida de los grupos determinantes y d) su estructura química (proteínas, carbohidratos).

Las lipoproteínas son antigénicas, su especificidad es conferida por la parte proteica de las macromoléculas (Apo-lipoproteína) y pertenecen al grupo de las proteínas globulares (solubles).

Mediante anticuerpos específicos han sido demostrados dos antígenos determinantes antigénicos principales; uno se encuentra en las alfa lipoproteínas (LAD) y el otro en las beta lipoproteínas (LBD)⁹.

También se han descrito otros antígenos determinantes

de las LAD, la heterogeneidad molecular ha sido investigada desde el descubrimiento por Lindgren y Gofman en 1951, ellos observaron mediante la ultracentrifugación analítica dos picos.

Levy y Fredrickson encontraron dos antígenos al hacerlos reaccionar con suero anti LAD estos fueron designados como LpB el antígeno rico en lípidos migra más hacia el ánodo. Levy y Fredrickson concluyeron que además de LAD existían dos fracciones más: LAD₂ y LAD₃, la composición de aminoácidos de las dos fracciones son idénticas.

La LpA se encuentra normalmente en un suero fresco y se lleva a cabo la conversión a LpB durante el almacenamiento o durante la ultracentrifugación¹⁰.

La beta lipoproteína ha sido estudiada como una haptoglobina los lípidos contribuyen de modo mínimo como hapteno, esto se demuestra mediante reacciones inmunoquímicas utilizando como antígenos: productos a los cuales se les extrajeron lípidos el resultado es que no reaccionan con los anticuerpos.

La beta lipoproteína fue detectada por Allison y Blumberg por inmunodifusión cuando encontraron un anticuerpo que reaccionaba con el suero normal humano, este anticuerpo se producía en personas que habían recibido múltiples transfusiones pos-

teriormente se demostró que el antígeno era beta lipoproteína (LBD).

La beta lipoproteína parece tener sólo un componente por electroforesis e inmunoelectroforesis, pero mediante una inmunodifusión selectiva llevada a cabo por Berg se han encontrado dos antígenos que se encuentran en la misma molécula¹².

La pre-beta lipoproteína (LMBD) está constituida -- por la Apo-A, Apo-B y Apo-C¹²⁻³⁰⁻⁹

b). Inmunesuero.

Definición: Es un suero que posee anticuerpos contra el suero normal humano. Existen dos tipos de sueros: - - -

a) Suero anti humano polivalente y b) Suero específico anti proteínas plasmáticas.

a). Suero anti humano polivalente. - En la inmunoelectroforesis con el suero de caballo se observa una distribución diferente de las líneas de precipitación con relación a las producidas con antisuero de conejo.

Los antisueros de conejo forman complejos solubles sólo en presencia de un exceso de antígeno⁵, la mayoría de los anticuerpos del conejo se encuentran predominantemente en la fracción

ción euglobulínica que le da un carácter menos soluble; los anticuerpos de conejo no exhiben prezona con exceso de anticuerpo⁷.

Los antisueros de caballo forman complejos solubles en presencia de un exceso de anticuerpos. Estos anticuerpos son de tipo floculante y dan precipitados en una zona estrecha de relación antígeno-anticuerpo además tienen carácter pseudoglobulínico - más soluble por lo que exhiben prezona con un exceso de anticuerpo.

b). Suero específico anti proteínas plasmáticas.

En el análisis inmunolectroforético de lipoproteínas se utilizan: -

1) Suero anti alfa lipoproteínas y 2) Suero anti beta lipoproteínas.

1). Suero anti alfa lipoproteína. - Este se puede preparar en caballo y en conejo (Pasteur, París). Para la preparación de este suero fueron inyectados conejos intramuscularmente - dos veces por semana durante 6 semanas con LAD cada inyección contenía 3 mg de proteínas mezcladas con un adyuvante completo - de Freund's, los animales fueron sangrados después de una semana de la última inyección¹⁷.

El aislamiento de las LAD se puede hacer por precipitación con sulfato de dextrana y $MnCl_2$ o mediante la precipitación con fosfotungstato de sodio y $MgCl_2$.

2). Suero anti beta lipoproteína. - Burstein en 1972 describe un nuevo método para preparar antisuero de conejo específico contra LBD. Los conejos fueron inyectados 2 veces por semana con suero libre de LMBD (2 ml) durante 4 semanas por vía intravenosa los animales son sangrados después de una semana de la última inyección. Posteriormente este suero es sometido a agotamientos sucesivos por el suero B (desprovisto de LBD y LMBD) el precipitado específico es eliminado mediante centrifugación. Este procedimiento se repite varias veces hasta que al agregar el suero B al antisuero de conejo no se observe enturbiamiento¹⁶.

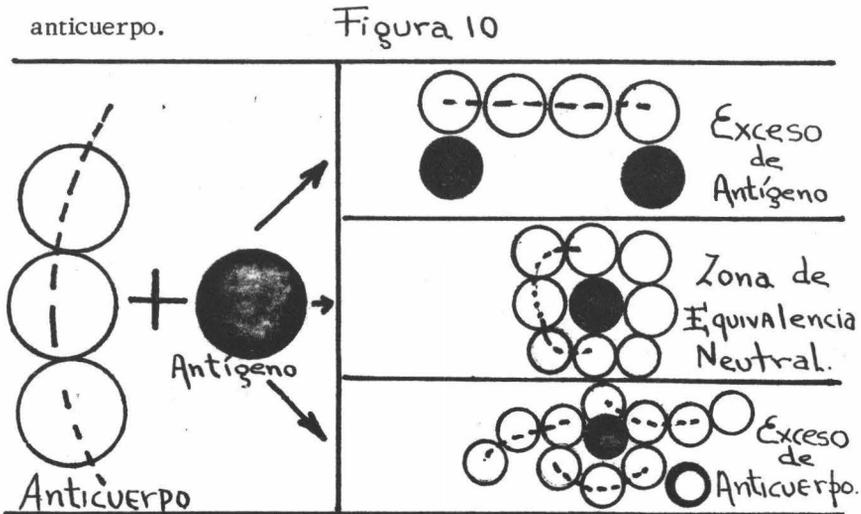
CONCENTRACION DEL ANTIGENO Y DEL ANTICUERPO

Composición del precipitado. - El precipitado contiene tanto el antígeno como el anticuerpo predominando los anticuerpos.

La relación antígeno-anticuerpo es crítica ya que puede presentarse una zona de inhibición; ésta puede definirse como aquella en la que existe insuficiente anticuerpo para precipitar el antígeno presente formándose complejos solubles.

Estos complejos solubles producen ensanchamiento en las bandas de precipitación o bien la inhibición completa de la reacción de precipitación.

En la figura 10 se expone esquemáticamente la reacción de precipitación y su relación con la concentración antígeno-anticuerpo.



MANERA HIPOTETICA DE COMBINACION⁷

Estos factores varían en función del fin que se persigue:

a). Cuando se tiene un antígeno en baja concentración se puede aplicar varias veces para su detección; esto provoca un efecto desfavorable en la detección de componentes mayores como es el caso de la seroalbúmina debido a la formación de complejos solubles en exceso de antígeno.

b). Si el antisuero es pobre en un anticuerpo determinado será necesario utilizar un volumen mayor de este antisuero

para detectar el antígeno correspondiente.

(d). Distancia entre la aplicación y el canal lateral.

Si la distancia entre la aplicación y el canal del anti cuerpo es demasiado pequeña, el antígeno difunde rápidamente y existe el riesgo de que no se aprecie la banda de precipitación⁵.- A mayor distancia existe mayor posibilidad en la detección del -- precipitado aunque el período de difusión sea mayor²⁴.

Medios de difusión: a) Cámara húmeda y b) Aceite mineral.

Influencia de la temperatura.- La temperatura debe - mantenerse constante o al menos evitar cambios bruscos produción dose el fenómeno de Leeseging. La precipitación se acelera al incrementar la temperatura a 37° C.

Reacciones de caracterización de los constituyentes lipoproteicos.

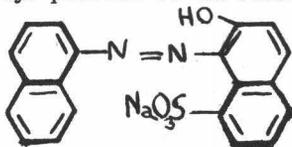
Métodos generales. - En 1955 Bjorklund usó reacciones coloreadas para identificar los precipitados específicos por el método de Ouchterlony. Posteriormente Uriel y Scheidegger en el mismo año publicaron un procedimiento para la caracterización.

Reacciones de caracterización:

- a). Afinidad por ciertos colorantes
- b). Radiactividad
- c). Fluorescencia

Tinción de proteínas. - Mediante el uso de colorantes biológicos ácidos: rojo ponceau, negro de amida, azul de bromo - fenol.

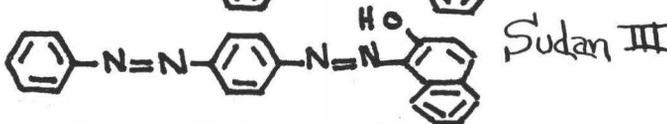
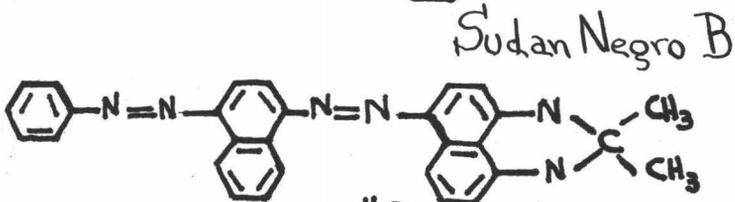
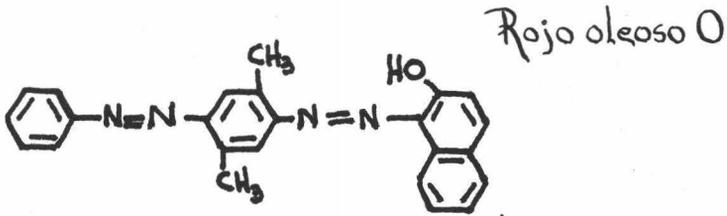
El rojo ponceau es un colorante azoico ácido.



TINCION DE LIPIDOS Y PROTEINAS

El primer colorante de este grupo se utilizó en histopatología y fue el Sudan III (1896) posteriormente en 1901 el Sudan IV (rojo escarlata) ambos colorantes pertenecen al grupo de los colorantes diazoicos ácidos.

El rojo oleoso 0 se comenzó a usar como colorante de grasas en 1926, pero se popularizó en 1943 cuando Lillie y Ashburn lo prepararon.



La mayoría de estos colorantes se preparan en soluciones saturadas en etanol al 60 %⁵⁻²⁰⁻²¹ aunque algunos utilizan metanol al 70 %.

El rojo 7B es otro colorante diazoico parecido al rojo oleoso y a los sudanes⁷⁻¹³⁻²²

Este colorante presenta ventajas sobre los otros cuando es preparado en forma especial¹³ se demostró que una simple fijación con una mezcla de ácido pícrico y ácido acético después de la electroforesis, seguida por la tinción con el colorante modificado tal como fue usado por Colfs dan como resultado una excelente coloración de lipoproteínas y una completa decoloración del fondo.

Especificidad de los colorantes.

La mayor parte de las sustancias colorantes lipófilas se unen con las lipoproteínas por afinidad física y no por unión química²⁴. Esta afinidad depende de un fenómeno físico de solubilidad diferencial y se considera específica de los lípidos, en especial de los lípidos simples (grasas neutras) el colesterol y sus ésteres absorben poco a temperatura ambiente²³, pero en mayor grado a temperatura de 37° C.

Identificación e interpretación de los constituyentes proteícos y lipoproteícos.

Los constituyentes de una mezcla pueden identificarse por su:

- a). Movilidad electroforética
- b). Especificidad inmunoquímica
- c). Afinidad por los colorantes

Determinación del número de constituyentes.

Las bandas de precipitación no pueden superponerse a menos que dos sustancias tengan la misma movilidad electroforética y que sus velocidades de difusión y las proporciones antígeno-anticuerpo sean muy semejantes y por ende se formen en el mismo sitio.



Exceso de antígeno



Antígenos distintos



Difícil de interpretar.

1. Exceso de antígeno por ende aumento en la concentración de lipoproteína esto produce una modificación en las bandas en este caso existe ensanchamiento de la banda e incluso la subdivisión en 2 líneas que se unen en el centro.

2. Disminución de antígeno. Se acompaña de una banda de precipitación menos intensa, más corta y delgada⁵.

APLICACION DEL ANALISIS INMUNOELECTROFORETICO AL ESTUDIO DE LAS LIPOPROTEINAS DEL SUERO

QUILOMICRONES. - Por medio del análisis inmunolectroforético Grabar y Burtín⁵ identificaron a los quilomicrones y los definieron como: conglomerados de glóbulos grasos con un bajo contenido de proteínas, observándose solo una mancha en el origen.

Han sido identificadas inmunológicamente varias proteínas plasmáticas incluyendo albúmina y gamma globulina después de repetidos lavados, aunque se cree que los quilomicrones absorben en la superficie proteínas plasmáticas²⁷.

PRE-BETA LIPOPROTEINA. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LA PORCION PROTEICA. - En un principio se pensó que la porción proteica era unicamente Apo-B idéntica a la de las beta lipoproteínas; posteriormente fueron definidas y caracterizadas 3 apo-proteínas (Apo-A, Apo-B y Apo-C).

Mediante una combinación de filtración en gel usando

Sephadex G-150 y cromatografía de intercambio iónico en acetato de celulosa se ha podido demostrar la heterogeneidad de las LMBD.

Aproximadamente el 40 % de la proteína de las LMBD parece ser idéntica al componente proteico principal de las LBD y el 50 % está representado por 3 polipéptidos que se definen en términos de su C - terminal:

1. Apo LP-ser rica en lisina y no contiene tirosina, histidina y cisteína, tiene un peso molecular de 7000 daltons, mediante dicrosimo circular y dispersión rotacional se observa un -- contenido de alfa hélice, este polipéptido tiene una movilidad de - gamma globulina.

2. Apo LP- glu contiene cistina, cisteína o histidina y tiene un peso molecular de 10 000 daltons su configuración es el azar y tiene una movilidad de beta ₁ - alfa ₂.

3. Apo LP-ala ; el tercero y más abundante, existen 2 formas Apo LP-ala₁ y Apo LP - ala₂ conteniendo 1 a 2 moles de ácido siálico por mol de proteína respectivamente. La -- Apo LP-ala no contiene isoleucina, cisteína y cistina; tiene un peso molecular aproximado de 10 000 daltons y su configuración es _ el azar. La movilidad electroforética es alfa₂ y alfa₂-alfa₁ res_

pectivamente, para Apo LP - ala₁ y Apo LP ala₂.

Gustafson¹⁴ encontró algunos residuos N-terminal - - (treonina, serina) que difieren de aquellos en la Apo-A y Apo-B.

El aislamiento de la apolipoproteína C se llevó a cabo mediante la extracción de lípidos de las LMBD con heptano y definida como una proteína con un peso molecular de 834 000, sin embargo aunque parece homogénea, en la ultracentrifugación analítica ésta migra como una doble banda con posición de pre-albúmina en gel y contiene ambos N-terminal serina y treonina.

La Apo-C reacciona con suero anti alfa y anti beta y aparentemente tiene mayor afinidad por los fosfolípidos.

INMUNOQUIMICA.

El análisis inmunoelectroforético llevado a cabo por varios investigadores¹⁴ y principalmente el efectuado por Levy y colaboradores³⁰ nos proporcionan una excelente evidencia de la heterogeneidad molecular de la pre-beta y sus variantes genéticas.

Inmunoquímicamente la pre-beta lipoproteína nativa -- reacciona con suero anti-beta lipoproteína dando una reacción cruzada de identidad; con suero anti-alfa no reacciona por lo que se pensó que la pre-beta era homogénea.

La demostración de la heterogeneidad de la pre-beta se lleva a cabo mediante la descomposición in vivo o in vitro:

Descomposición in vivo.

La hidrólisis de los glicéridos intravascularmente produce la disociación de la Apo-A de la pre-beta lipoproteína; la hidrólisis se efectúa al inyectar una solución de heparina de sodio (10 U / Kg de peso) cuando hay una elevación de glicéridos endógenos debido a la inducción por ingestión de carbohidratos, después de 10 minutos extrajeron el plasma y observaron cambios en los patrones electroforéticos de las lipoproteínas.

Al efectuarse la lipólisis in vivo hay un incremento en el plasma de alfa y beta lipoproteínas y un decremento o desaparición de la pre-beta. Este resultado también se observó en sujetos alimentados con diversas dietas; la concentración de la pre-beta variaba inversamente con la concentración de alfa y beta lipoproteína dando una buena evidencia de que la Apo-A y Apo-B forman complejos con triglicéridos.

Descomposición in vitro.

Mediante la extracción con éter de los lípidos de la pre-beta lipoproteína se obtienen por electroforesis en papel dos

bandas con movilidad de alfa y beta respectivamente.

La beta lipoproteína conservaba su movilidad después del tratamiento con éter; la extracción con éter-etanol produce -- desnaturalización de la beta lipoproteína y permanece en el origen (electroforesis) y otra banda con movilidad de alfa globulina y al hacerlos reaccionar con sueros específicos anti beta y anti alfa, -- únicamente reaccionaban con suero anti alfa lipoproteína.

La técnica de Ouchterlony utilizando como antígeno la extracción de la pre-beta formó una línea de identidad con el extracto de alfa lipoproteínas, posteriormente esta alfa (obtenida -- por deslipidación) fue identificada como alfa LP_B por Levy y colaboradores en 1965.

Esto demuestra que la pre-beta lipoproteína en sujetos normales contiene dos antígenos; uno idéntico a la beta lipoproteína y el otro a las alfa lipoproteínas después de una extracción con éter-etanol.

Los estudios inmunoquímicos están sintetizados en la siguiente tabla:

REACTIVIDAD INMUNOQUIMICA DE LAS LIPOPROTEINAS

	Suero anti-alfa lipoproteína	Suero anti-beta lipoproteína
Pre-beta lipoproteína		
Nativa	+	+
extraída en éter	+	+
extraída en éter-etanol	+	-
Beta lipoproteína		
Nativa	-	+
extraída en éter	-	+
extraída en éter-etanol	-	-
Alfa lipoproteína		
Nativa	+	-
extraída en éter	+	-
extraída en éter-etanol	+	-

Tabla tomada de Robert I. Levy y colaboradores³⁰.

Lipoproteínas aisladas por ultracentrifugación.

Interrelaciones entre la LMBD con la LBD y LAD²⁷.

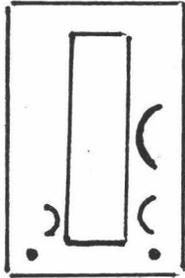
Grabar y Burtin⁵ mencionan los trabajos realizados por Heide y colaboradores en 1960 quienes indican la existencia de dos lipoproteínas lentas: una produce una banda de precipitación bastante larga a la que llamaron lipoproteína alfa₂ de densidad igual o menor de 1.019 y la otra más corta e intensa que se separa del pocillo por lo que se llama beta₁ lipoproteína de densidad 1.020-1.063.

Por lo tanto existen 2 lipoproteínas lentas inmunológicamente diferentes aunque se pueden superponer ya que tienen determinantes antigénicos comunes.

Esquema de los patrones inmunolectroforéticos de lipoproteínas



Obtenido en gel-agar⁵.



Inmuno electroforesis en agarosa
Sueros anti alfa y anti beta

BETA LIPOPROTEINA. - Aislamiento y propiedades de la porción proteíca.

La fracción proteíca es una beta globulina, a esta fracción se le denomina Apo-B y se diferencia de la Apo-A por su contenido de aminoácidos N-terminal.

La porción proteíca fue obtenida por deslipidación de LBD con solventes orgánicos (éter, n-heptano) es insoluble en amortiguadores acuosos y solubles en medios acuosos que contengan: dodecil de sodio, urea y detergentes, hidrocloreto de guanidina (todos estos agentes polimerizantes) a pH 11.5 a baja temperatura.

El péptido principal de las LBD ha sido caracterizado como N-terminal glutámico y C-terminal serina; las LBD tienen péptidos en menor concentración con C-terminal alanina (5-15%) y treonina, los cuales respectivamente son los péptidos que se encuentran en mayor concentración en la LMBD y LAD²⁷ e inversamente el péptido C-terminal serina se encuentra en la LMBD y LAD.

El contenido de beta lipoproteína difiere de Apo-A particularmente en el contenido relativo de isoleucina, leucina, ácido glutámico y alanina⁹.

INMUNOQUIMICA. - Heterogeneidad molecular de las beta lipoproteínas, la homogeneidad antigénica fue apoyada por Storiko y Fisher (1965) y la heterogeneidad por Laurence Shean (1962).

Recientes investigaciones realizadas por Alaupovic -- (1968 - 1971) se deciden en definitiva por la heterogeneidad en término de propiedades inmunológicas y composición de aminoácidos.

Pratt y Dangerfield han demostrado la heterogeneidad usando electroforesis, gradiente de poliacrilamida, formándose dos o más bandas. Las LBD muestran un polimorfismo genético en dos sistemas independientes aparentemente: Allison y Blumberg encontraron por la técnica de "Ouchterlony" un anticuerpo que reaccionaba con el suero de personas normales, ese anticuerpo se producía en algunas personas que habían recibido múltiples transfusiones; posteriormente Blumberg³² propuso el símbolo Lp para lipoproteínas al comprobar que el anticuerpo reaccionaba con beta lipoproteína, las LBD en este caso actúan como isoantígenos.

La identificación del polimorfismo genético se hizo -- mediante técnicas inmunológicas (precipitación cruzada), la frecuencia de la formación de precipitinas en pacientes con Talasemia parece ser mayor que en otros pacientes con hemofilia, anemia y leucemia sin embargo este punto no ha sido aclarado.

El otro sistema fue encontrado por Berg (1963) y lo designó Lp para un locus para genes determinantes específicos de tectados con suero anti lipoproteínas humanas de conejo.

Berg encontró 2 variantes: Lp (a) positivo y Lp (a) negativa las bandas de precipitación fueron caracterizadas por afinidad a colorantes lipídicos¹²⁻³⁴.

La relación entre los antígenos de Allison y Blumberg y aquellos encontrados con anti beta lipoproteína fueron estudiadas por Berg empleando inmunodifusión en gel y demostró que no hay relaciones antigénicas entre los dos sistemas; estas dos marcas antigénicas no han sido separadas electroforéticamente, esto se debe a que las dos partes separadas de la molécula de beta lipoproteína están envueltas.

Grabar y Burtin⁵ mencionan los trabajos realizados por Burstein y Samaille quienes mencionan a las lipoproteínas lentas con una movilidad de beta₁ globulina (papel) y que en gel-agar produce una banda de precipitación con movilidad de alfa globulina generalmente densa y gruesa; comienza casi en el pocillo no es muy incurvada y siempre queda lejos del canal del anticuerpo superponiéndose en ocasiones parcialmente con la banda macroglobulina alfa₂.

Otras variaciones en composición:

1. Fredrickson, Levy y Lees (1967) describen una hiperlipoproteinemia a veces familiar y poco común en la cual las LBD adquieren una atípica baja densidad (1.006) debida a un anormal contenido de triglicéridos.

En la fracción de LMBD hay entonces dos componentes; uno en LMBD normal y otra lipoproteína anormal con características de Apo LBD (Quarfordt, Levy y Fredrickson 1971), esta alteración es conocida como Beta amplia o "Broad" porque debido a su baja densidad y su ancha banda vista en electroforesis difunde de la zona beta a la pre-beta.

2. Seegers ha reportado la presencia de una doble beta lipoproteína³³; la variante de beta lipoproteína tiene diferente movilidad electroforética y características de tinción.

Al realizar la electroforesis se encontraron 2 bandas: una densamente teñida en la región beta lipoproteína y que corresponde a la beta lipoproteína y la otra menos densamente teñida y que tiene mayor movilidad hacia el ánodo (zona pre-beta). Esto sugiere que hay una diferencia de cargas debido al incremento en la movilidad en papel; el componente anormal tenía un tamaño mayor como lo indica (su movilidad menos anódica en gel-almidón).

A diferencia de la beta amplia el componente anormal tiene mayor densidad (1.063-1.21), se demostró por inmunodifusión que la fracción LAD contenía ambos el esperado alfa lipoproteína y beta lipoproteína por todo esto se confirma que ese componente inmunológico beta anormal diferente en carga, tamaño molecular y densidad.

3. Las hormonas sexuales tienen un pequeño efecto sobre las LBD, los andrógenos tienden a incrementar y los estrógenos a disminuir la relación colesterol/proteína.

ALFA LIPOPROTEINA

AISLAMIENTO Y PROPIEDADES DE LA PORCION PROTEICA

La porción proteica de las LAD se obtiene por extracción con solventes orgánicos a baja temperatura; mediante estudios por cromatografía en Sephadex se ha visto que se puede eluir una clase de péptidos de la LAD.

La heterogeneidad de la Apo-A esta ahora mejor establecida aunque existe controversia en la naturaleza exacta y número de polipéptidos; al separar por cromatografía en DEAE celulosa se encontraron 2 polipéptidos con una composición distinta de aminoácidos y nombrados de acuerdo a su residuo C-terminal como -

R-glicina y R-treonina^{II}.

INMUNOQUIMICA

Las alfa lipoproteínas y su Apo-A son menos antigénicas que las LBD, generalmente el suero anti-alfa lipoproteína presenta reacciones cruzadas. Se han descrito varios determinantes antigénicos de las alfa lipoproteínas y se ha demostrado su heterogeneidad molecular; Fredrickson y Levy en 1965 encontraron dos antígenos al hacerlos reaccionar con el suero anti LAD y fueron designados como LpA y LpB, el antígeno rico en lípidos migra -- más hacia el ánodo.

Grabar y Burtin⁵ describen a las lipoproteínas lentas y rápidas en gel-agar; las rápidas tienen una movilidad de alfa₁ - globulina en papel; mayor densidad y menor concentración de lípidos 33 % se caracterizó por su afinidad a los colorantes sudanófilos a nivel de seroalbúmina y se tiñe relativamente poco.

HIPERLIPIDEMIAS

En la actualidad es la alteración más frecuente y la más importante en la práctica médica ya que tiene una incidencia en los adultos entre el 10-15 %, se originan por diversas causas y su etiología en muchos casos es desconocida.

HIPERLIPIDEMIAS PRIMARIAS. - Fredrickson y Lees (1965) han propuesto un sistema para la clasificación de hiperlipoproteínemias en base a la separación electroforética³⁹. Ellos describen 5 tipos de fenotipos de lipoproteínemias, los cuales son detectados por electroforesis de lipoproteínas, concentración de colesterol y triglicéridos. La clasificación se ve simplificada por el hecho de que las alfa lipoproteínas apenas se modifican, sobre todo, no existe en la actualidad ninguna hiper alfa - lipoproteinemia absoluta.

TIPO I.

Sinonimias: Hiperquilomicronemia, enfermedad de Burger Grutz esencial, hiperlipidemia inducida por grasas, hiperlipidemia exógena. Es un fenotipo raro parece ser homocigoto para un alelo mutante que controla la actividad del sistema lipolítico requerido para la remoción de triglicéridos exógenos.

CARACTERISTICAS SERICAS DEL TIPO I

Aspecto del Suero	Electroforesis	Ultracentrifugación	Colesterol	Triglicéridos	Curva de tolerancia glúcida	Actividad lipolítica Posthep
Parte superior lechosa	Quilomicrones, beta disminuida, pre beta N o L. A.	S _f más de 400, M. A.	N	M. A	N	Disminuida o reducida.

N = Normal

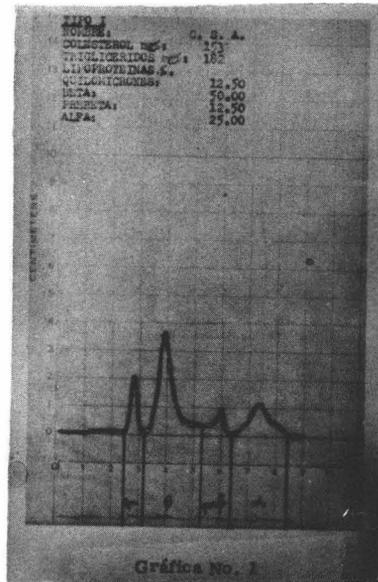
L. A = Ligeramente aumentado

M. A = Muy aumentado

CARACTERISTICAS CLINICAS. - Hepatoesplenomegalia, xantomatosis eruptiva y dolores abdominales.

INMUNOQUIMICA

Inmunoprecipitación con anti-beta lipoproteína da un precipitado variable.



TIPO II

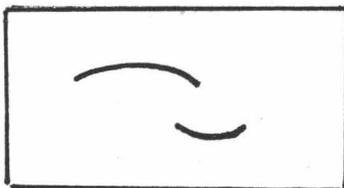
Sinonimias. - Hiperbeta lipoproteinemias de tipo familiar, xantomatosis tendinosas, hipercolesterolemia esencial. -

Es la mutante más común que afecta las concentraciones de lipoproteínas; la pre-beta a medida que va perdiendo triglicéridos se va transformando en beta lipoproteína que luego puede ser depurada y utilizada en el hígado por el S R E. La escuela sueca ha demostrado que en estos pacientes está bloqueado el mecanismo de depuración de la beta lipoproteína ocasionando su acumulación.

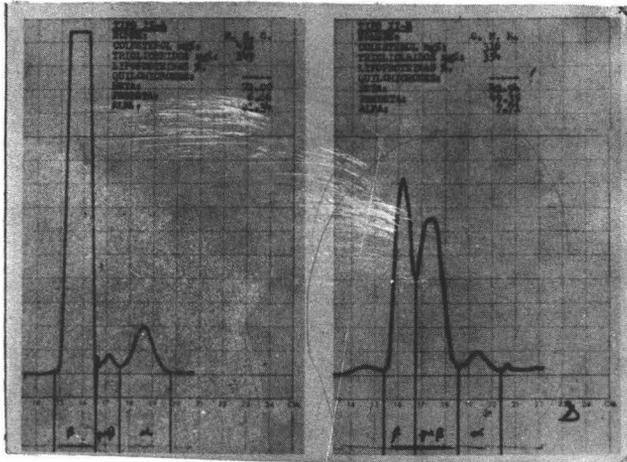
CARACTERISTICAS SERICAS DEL TIPO II

Tipo	Aspecto del Suero	Electroforesis	Ultracentrifugación	Colesterol	Triglicéridos	Curva tolerancia glúcida	Actividad lipolítica post-hep
Ila	claro ó turbio	Beta A Pre-beta N	S _F 0-20 M. A. 20-400 N. 400 N.	M. A	N	N	N
Ilb	ligeramente lechoso	Beta A Pre-beta A	0-20 A 20-400 A	M. A	A	N	N

Características clínicas. - Dos tipos de xantomas: los tendinosos en los extensores (tendón de aquiles, manos y pies) y los tuberosos en la superficie de los extensores (codos, rodillas y manos y arteriosclerosis acelerada).



Inmunolectroforesis empleando suero anti-beta Lipoproteína. - Parte superior suero control normal inferior suero del paciente ⁸.



PATRON ELECTROFORETICO DEL TIPO Ila y Iib

TIPO III.

Sinonimias. - Beta amplia, "broad", hiperbeta e hiperprebeta lipoproteinemia familiar.

Se demostró que pertenece a una variante genética; - la mutante se comporta gen autosómico recesivo y se caracteriza por la presencia de un complejo anormal de Apo beta lipoproteína y triglicéridos, probablemente se debe a un bloqueo en la degradación de lipoproteína a nivel de las S_f 30.

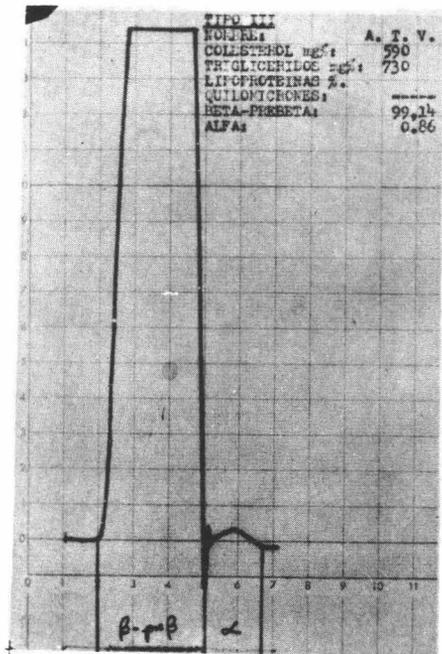
CARACTERISTICAS SERICAS DEL TIPO III

Aspecto del Suero	Electroforesis	Ultracentrifugación	Colesterol	Triglicéridos	Curva tolerancia glúcida	Actividad lipolítica post-hep.
Lechoso	Banda única	S_f 12-20 M. A. 20-400 A	A	M. A.	Anormal	N

Características clínicas. - Xantomatosis de tipo palpebral tendinoso y palmar; dolor abdominal en las crisis agudas, arterioesclerosis en arterias periféricas y coronarias en estado avanzado.

INMUNOQUIMICA

Inmunoprecipitación intensa.



PATRON ELECTROFORETICO TIPO III

TIPO IV.

Sinonimias. - Hiperprebetalipoproteinemia, hiperlipemia inducida por hidratos de carbono, hiperlipemia endógena.

Se comporta como una mutante autosómica simple.

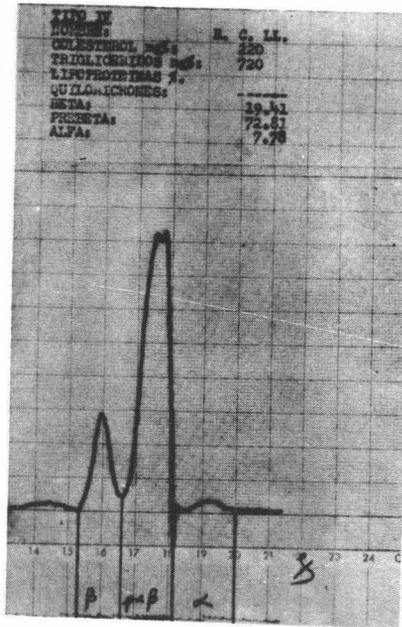
CARACTERISTICAS SERICAS DEL TIPO IV

Aspecto del	Electroforesis	Ultracentrifugación	Colesterol	Triglicéridos	Curva tolerancia glucídica	Actividad lipolítica post-hep.
Turbio o lechoso	Beta N o L.D. pre-beta A	S _f 20-400A	N o A	M. A	Anormal	N

Características clínicas. - Xantomas eruptivos, lipemia retinal, hepatoesplenomegalia. La obesidad y la diabetes se asocian con frecuencia sobre todo en acidosis cuando la carencia de hidratos de carbono celular provoca lipolisis intensa.

INMUNOQUIMICA

Inmunoprecipitación intensa, el patrón inmunolectroforético no se ha obtenido.



PATRON ELECTROFORETICO TIPO IV

TIPO V 38-39

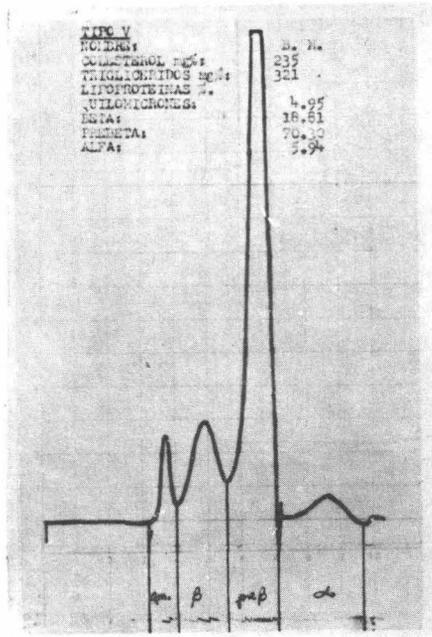
Sinonimias. - Hiperlipoproteinemia mixta: endógena y exogena. Es una forma rara de hiperlipoproteinemia familiar y está caracterizada por la combinación de los tipos I y IV, es decir, con una dieta normal y después de 12 horas de ayuno hay un aumento de quilomicrones y pre-beta lipoproteína en la sangre.

La forma familiar posiblemente sea homocigota o autosómica dominante.

INMUNOQUIMICA. - Inmunoprecipitación intensa.

CARACTERISTICAS SERICAS DEL TIPO V

Aspecto del Suero	Electroforesis	Ultracentrifugación	Colesterol	Triglicéridos	Curva de tolerancia glúcida	Actividad lipolítica post-hep.
Lechosos	Quilomicrones Beta N ó D Pre-beta A	S _f 400 A 20-400 A	A	M. A	Anormal	Disminuida Anormal



PATRON ELECTROFORÉTICO TIPO V

MATERIAL Y METODOS

Material biológico. - El material biológico utilizado fue suero, obtenido de 57 personas, dividido en 2 grupos:

Grupo A. - 32 personas aparentemente sanas; 15 del sexo femenino y 17 del sexo masculino cuyas edades fluctuaron entre 13 y 48 años.

Grupo B. - 25 personas con hiperlipoproteinemias; 16 pacientes con el tipo IV (3 del sexo femenino y 13 del sexo masculino), 2 pacientes con el tipo V (sexo femenino), 5 personas con el tipo II (3 del masculino y 2 del sexo femenino), I del tipo Beta amplia o III y 1 suero de una persona que presentaba una variante de un tipo conocido.

Toma de la muestra. - La muestra de sangre fue obtenida en condiciones basales (ayuno no menos de 12 horas).

Debe evitarse una actividad muscular excesiva antes de la punción, administración de heparina o una situación de stress, ya que estos factores influyen en el metabolismo de los lípidos.

Algunos investigadores recomiendan hacer la determinación en suero en vez de plasma ya que da mejores resultados para la separación de las fracciones de las lipoproteínas. En ca

so de utilizar plasma, debe usarse como anticoagulante EDTA en la concentración de 1 mg/ml, este evita los productos de oxidación de las lipoproteínas. No debe utilizarse suero hemolizado.

Almacenamiento. - Las determinaciones deben efectuarse en sueros frescos, el almacenamiento por más de 24 horas en refrigeración a 4° C produce un incremento de alfa₁ lipoproteínas un decremento de la pre-beta lipoproteína a los 7, 14 y 21 días.

En congelación se observó un incremento de los quilomicrones y decremento de las pre-beta lipoproteínas. Los resultados del trabajo realizado por Messerschmidt¹³ sostienen que debe evitarse la congelación y la refrigeración por más de 24 horas.

Los sueros utilizados para la obtención de patrones normales de lipoproteínas por inmunoelectroforesis se escogieron teniendo como criterio la normalidad de:

1. Lípidos totales
2. Colesterol
3. Triglicéridos
4. Electroforesis de lipoproteínas

y al comprobar que éstos se encontraban dentro de los límites de la normalidad, se procedió a la determinación de lipoproteínas -- por inmunoelectroforesis en acetato de celulosa.

Los patrones así obtenidos se tomaron como normales y se compararon con los obtenidos de personas con hiperlipoproteinemia.

M E T O D O S

INMUNOELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN ACE--TATO DE CELULOSA⁶. (Técnica original publicada por Spinco - División of Beckman Instruments Inc., Stanford Industrial Park - - Palo Alto, California. Agosto 1967).

Fundamento. - El análisis inmunolectroforético combina dos técnicas: la electroforesis y la inmunodifusión. En la inmunolectroforesis los anticuerpos precipitantes se unen a sus correspondientes antígenos para formar arcos de precipitación; cada antígeno produce un arco independiente debido a la especificidad y sensibilidad de la reacción de precipitación.

Equipo:

- a). Cámara de microzona
- b). Fuente de poder
- c). Aplicador de la muestra
- d). Micropipeta (aplicador del inmunosuero)
- e). Celdilla para el lavado de proteínas

- f). Sistema impresor (platos para imprimir y rodillo)
- g). Puente
- h). Membranas de acetato de celulosa (de la Casa Beckman).
- i). Horno a una temperatura de 80-100° C.
- j). Papel secante
- k). Pinzas
- l). Micas

Reactivos:

- a). Amortiguador Veronal (Barbital), con una fuerza iónica de 9.9375, pH 8.6.

Dietilbarbiturato de sodio.	15.40 g
Acido dietilbarbitúrico.	2.76 g
Agua destilada c.b.p.	2000 ml
- b). Solución colorante:

Rojo Ponceau S.	0.5 g
Acido tricloroacético.	7.5 g
Acido sulfosalicílico.	7.5 g
Agua destilada c.b.p.	250 ml
- c). Solución decolorante

Acido acético.	5 ml
Agua destilada.	95 ml

- d). Solución fijadora
Alcohol etílico absoluto
- e). Aceite mineral
- f). Eter de petróleo
- g). Suero anti-humano polivalente (Hyland)

Procedimiento:

1. Llenar la celdilla electroforética con la solución amortiguadora hasta el nivel, evitar que el amortiguador moje el centro de partición de la celdilla o alrededor del sifón; taparla.



2. Colocar el puente abierto sobre un vaso.

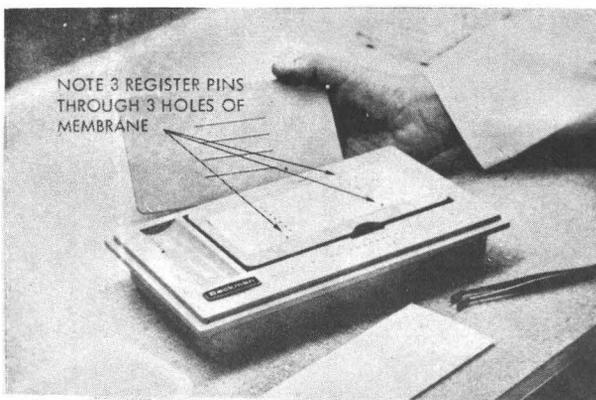


3. Colocar la membrana de acetato de celulosa en el amortiguador para que se sature de la solución durante 20 minutos antes de iniciar la electroforesis.

4. Colocar los platos de impresión de relieve.

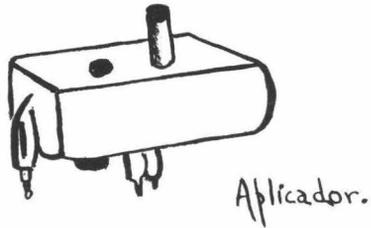
5. Remover la membrana de la solución amortiguadora, quitar el excedente del líquido entre secantes.

6. Colocar la membrana en el plato inferior de im presión, alineándola con los 3 postes de referencia, después se - coloca el plato superior de impresión acoplándola con la parte inferior. Presionar el rodillo hacia abajo (produce impresión for_ mando un canal en la membrana de acetato de celulosa).



7. Colocar la membraná en el puente, cerrar éste_ y pasarlo a la celdilla asegurando que las puertas de la membrana estén sumergidas en el amortiguador sin tocar alguna superficie de ella; cerrarla inmediatamente; esperar 5 minutos para asegurar el equilibrio del puente electroforético.

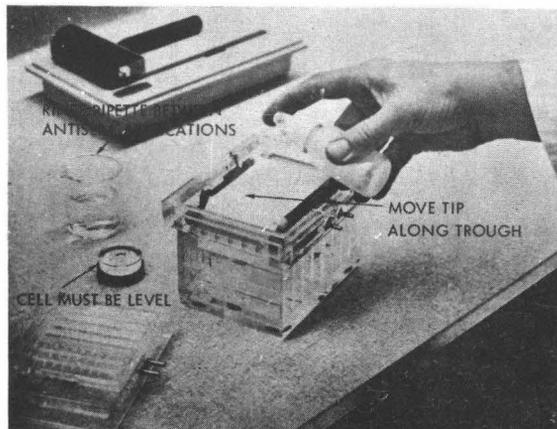
8. Aplicar 1 ul de suero, el aplicador equivale a - 0.5 ul (por lo que se aplica 2 veces); hacer las aplicaciones en - las posiciones 1, 3, 5 y 7 para 4 canales en el caso de usar 3 ca_ nales en las posiciones 3 y 6 (10 segundos).



9. Tapar la celdilla, encender la fuente de poder, - aplicar voltaje constante 150 V durante 40 minutos.

10. Desconectar la fuente de poder.

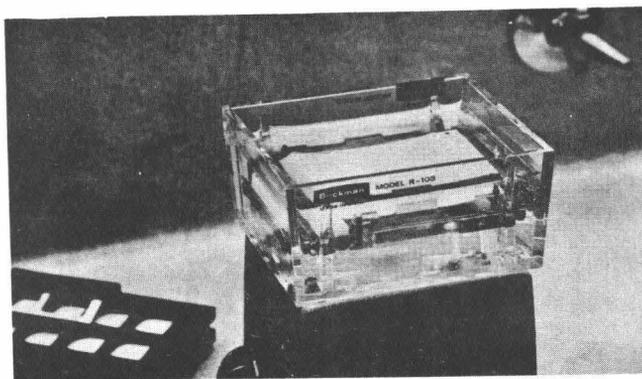
11. Llenar la micropipeta con antisuero, cortar los extremos de la membrana con una navaja para mejorar la absorción y depositar el anti-suero uniformemente a lo largo de la canaladura; dejar 5 minutos. Nota: evitar la formación de burbujas.



12. Remover la membrana del puente y sumergirla en ACEITE MINERAL evitando formación de burbujas. Dejar la membrana en aceite por 66 a 72 horas para 3 canales y de 20 a 24 horas para 4 a una temperatura de 16 a 27^o C.

13. ENJUAGUE Y LAVADO DE LA MEMBRANA. Escurrir el aceite de la membrana; enjuagar dos veces con éter de petróleo durante períodos de 30 segundos.

14. Colocar la membrana en el puente, pasarlo a una bandeja con solución salina isotónica, lavar 3 veces y mantener la agitación magnética por 15 minutos (durante 3 veces).



15. Pasar la membrana ayudado de unas pinzas en el colorante durante 7 minutos.

16. Lavar el exceso de colorante con ácido acético al 5% hasta decoloración completa del fondo.

17. Colocar la membrana en la solución fijadora por 1 a 2 minutos.
18. Secar la membrana entre secantes.
19. Enmicarla.
20. Estudiar los patrones a través de la luz.

INMUNOELECTROFORESIS DE LIPOPROTEINAS EN ACETATO DE CELULOSA

Fundamento. - Es igual que en la inmunolectroforesis de proteínas.

Equipo. - Es el mismo equipo de la inmunolectroforesis de proteínas, solo varía la membrana de acetato de celulosa - (Sepraphore III de la casa Gelman).

Reactivos:

- a). Amortiguador Veronal (Barbital)

La misma preparación, ver inmunolectroforesis de proteínas.

- b). Solución colorante.

Rojo 7B.	0.1 g
Alcohol etílico.	60 ml
Agua destilada.	40 ml

Ponerla a reflujo durante 15 minutos.

Debe prepararse inmediatamente antes de ser usada; se coloca la membrana en la solución colorante a una temperatura aproximada entre 40-45° C. Nota: Se utiliza sin filtrar.

c). Solución decolorante:

Hipoclorito de sodio.	2 ml
Acido acético al 15 %.	98 ml

Se prepara en el momento de usarse (se utiliza una vez).

d). Solución aclarante

Dimetilformamida.	30 ml
Agua destilada c.b.p.	100 ml

e). Aceite mineral

f). Tolueno

g). Suero anti-humano polivalente (Hyland) y suero específico anti-beta lipoproteína (Hoeschst).

Procedimiento. - Los pasos 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 son iguales que en la inmunoelectroforesis de proteínas.

8. Aplicar 2 ul de suero (se aplica 4 veces) en las posiciones 1, 3, 4, 7 para 4 canales.

Los pasos 9 y 10 son iguales. Ver inmunoelectroforesis de proteínas.

11. Aplicar con la micropipeta 30 ul de antisuero; - dejar 5 minutos.

12. Remover la membrana del puente y sumergirla con Aceite mineral. Dejar la membrana en aceite por 66 a 72 - horas para 3 canales y de 20 a 24 horas para 4 a una temperatura de 38° C.

13. ENJUAGUE Y LAVADO DE LA MEMBRANA. Escurrir el aceite de la membrana; se enjuaga una vez con tolueno - durante 2 minutos.

El paso 14 es el mismo, ver inmunolectroforesis de proteínas.

15. Se debe colocar la membrana en el colorante durante 16-24 horas a 37° C.

16. Lavar el exceso de colorante con agua de la llave hasta que no lo arrastre.

17. Pasar la membrana a la solución decolorante y y observar cómo ocurre la decoloración; cuando desaparecen las gamma globulinas se saca la membrana (1 minuto).

18. Pasar la membrana a la solución aclaradora durante 5 minutos. Nota *

19. Montar la membrana en placa de vidrio y llevar al horno a una temperatura de $80-100^{\circ}$ C aproximadamente durante 15 minutos hasta obtener transparencia completa.

20. Dejar enfriar y enmascarar.

21. Etiquetar la membrana y estudiar los patrones a través de la luz.

NOTA: * Este paso no se encuentra en la técnica original pero se deseaba conservar la determinación y además una mejor presentación.

DETERMINACION DE LIPIDOS TOTALES

(Método de Zöllner y Kirsch K).

Fundamento: El suero se desproteíniza, previamente se calienta con ácido sulfúrico a 100° C y los productos de degradación de los lípidos se tratan con el reactivo ácido fosfórico - - vainillina. Los lípidos del suero producen una coloración rosa - que se determina por fotolorimetría.

Material:

- a). Fotocolorímetro (Leitz)
- b). Pipetas de 2, 5 y 10 ml
- c). Micropipeta de 50 lambdas
- d). Tubos de 13 x 100 mms
- e). Baño de agua hirviente

Material biológico: Suero sanguíneo

Reactivos:

- a). Acido fosfórico
- b). Vainillina
- c). Acido sulfúrico 95-97 %
- d). Solución patrón de lípidos, conteniendo 1000 mg%

Preparación:

Reactivo de color.	Acido fosfórico	11.9 m
Acido fosfórico.		116.6 g
Agua destilada c.b.p.		100 ml

Vainillina 0.008 M

Vainillina.		1.224 g
Agua destilada c.b.p.		1000 ml

Mezclar a volúmenes iguales ambos reactivos. Nota:

Tanto el reactivo de color como el patrón son de uso inmediato.

Procedimiento: En tubos marcados a medir:

	Blanco	Patrón	Problema
Sólución patrón	---	0.05 ml	---
S u e r o	---	---	0.05 ml
Acido sulfúrico 95-97 %	---	2.0 ml	2.0 ml

Mezclar bien, calentar 10 minutos en agua hirviendo _
enfriar en agua; de esta mezcla reactiva poner en un tubo de en-
saye limpio:

	Blanco	Patrón	Problema
Mezcla reactiva	---	0.1 ml	0.1 ml
Acido sulfúrico 95-97 %	0.1 ml	---	---
Reactivo de color	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml

Mezclar bien y pasados 40 a 50 minutos, comparar las
absorbancias del problema y del patrón con el blanco a una longi-
tud de onda de 535nm.

Cálculo s :

$$\frac{\text{Absorbancia del problema} \times \text{Conc. del patrón}}{\text{Absorbancia del patrón}} = \text{mg \% de Lípidos}$$

Valores Normales: 600 - 1000mg %

DETERMINACION DE COLESTEROL ⁴¹⁻⁴²

(Método de Babson, Shapiro y Phillips)

Fundamento: El colesterol es extraído del suero con alcohol-éter el que se mezcla con gel de hidróxido de aluminio -- (Seramox) adsorbente inerte que elimina la interferencia de la bilirrubina. El extracto centrifugado se trata con cloruro férrico y ácido sulfúrico dando un color que es lineal por lo menos en 500 - mg% de colesterol. Para determinar los ésteres de colesterol se hace una precipitación con digitonina.

Material:

- a). Fotocolorímetro (Leitz)
- b). Pipetas de 5 a 10 ml
- c). Micropipetas de 100 y 250 lambdas
- d). Tubos de 13 x 100 y 18 x 150 mms
- e). Baño de agua fría

Material biológico: Suero sanguíneo

Reactivos:

- a). Alcohol-éter
- b). Acido sulfúrico concentrado
- c). Cloruro férrico
- d). Acetato de etilo

e). Patrón: Serachol comercial (346 mg %)

Preparación:

Reactivo de color

Cloruro férrico ($\text{Fe Cl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$).... 100 mg

Acetato de etilo Q.P 100 ml

Protegerlo de la luz.

Procedimiento:

- a). Marcar tubos de 13 x 100 patrón, blancos de - reactivos y suero problema.
- b). Colocar 0.1 ml (100 lambdas), 0.1 ml de Sera- chol para el patrón y 0.1 ml de agua destilada_ para el blanco.
- c). Añadir 1.5 ml de reactivo de extracción en cada tubo.
- d). Añadir 60 mg de gel de hidróxido de aluminio.
- e). Agitar muy bien y dejar reposar 5 minutos.
- f). Centrifugar a 1500 rpm durante 3 a 5 minutos
- g). En tubos de 18 x 150 mms medir 0.025 ml del extracto y 1.5 ml de reactivo de color, mezclar.
- h). Añadir a cada tubo 1 ml de ácido sulfúrico con- centrado estratificando, agitar el tubo para mez_ clar, dejar 20 minutos en baño de agua fría.

- i). Leer la absorbancia del patrón y del problema_ en una longitud de onda de 550 nm, contra blan_ co de reactivos.

Cálculos:

$$\frac{\text{Absorbancia Problema} \times \text{Conc. del patrón}}{\text{Absorbancia del Patrón}} = \text{mg } \% \text{ de colesterol total}$$

Valores Normales: Colesterol Total 125 a 250 mg %

Esteres de colesterol 50-75 % de colesterol total

TRIGLICERIDOS GLICEROL Y GRASAS NEUTRAS⁴³⁻²³
(M. Eggstein y F.H. Kreutz)

Determinación Enzimática de Glicerol y Triglicéridos en Suero (Ultravioleta con NADH).

Fundamento: Los triglicéridos mediante la saponifica_ ción son hidrolizados en ácidos grasos y glicerol libre. El glice_ rol es fosforilado con ATP en una reacción catalizada por la enzi_ ma gliceroquinasa (GK) obteniendo como producto L-glicerol-I- - fosfato y ADP.

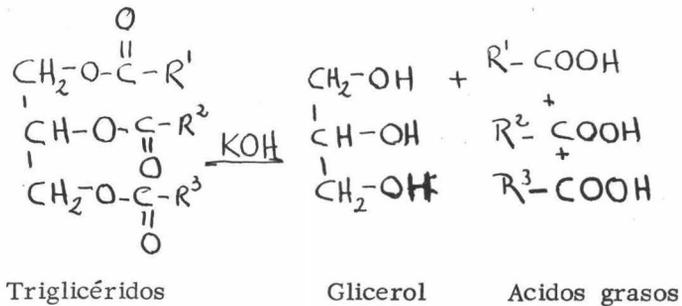
Mediante otra reacción enzimática catalizada por la - piruvato quinasa el ADP reacciona con el fosfoenolpiruvato obte- -

niendo como producto piruvato y ATP, posteriormente el piruvato más NADH_2 reaccionan catalizados por la deshidrogenasa láctica, - se produce lactato y NAD.

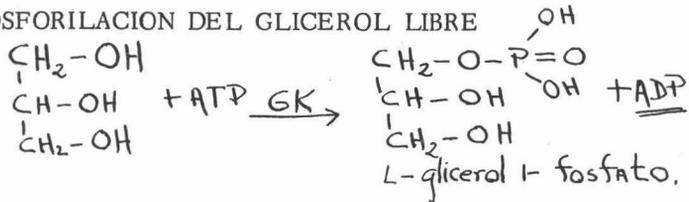
La cantidad de NADH_2 consumida durante la reacción es proporcional a la cantidad de glicerol presente en la muestra. - El NADH puede ser medido por su absorbancia a 340 o 366 mu.

REACCIONES EMPLEADAS EN LA DETERMINACION ENZIMATICA DE GLICEROL

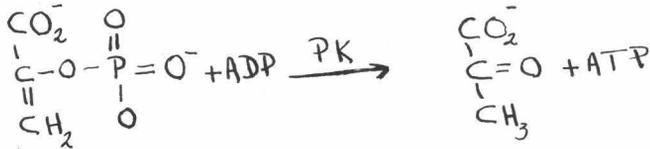
(1)



(2) FOSFORILACION DEL GLICEROL LIBRE



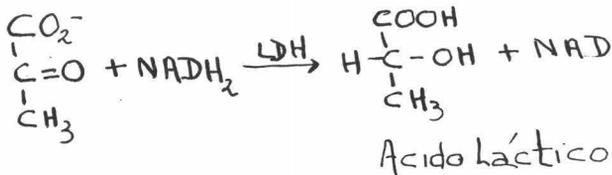
(3) REACCION ENZIMATICA AUXILIAR



Fosfoenolpiruvato
(PEP)

Piruvato

(4) REACCION ENZIMATICA FINAL



Reactivos:

- Amortiguador
- NADH / ATP / PEP
- LDH / PK
- GK
- Sulfato de magnesio 0.15 M
- Hidróxido de potasio 0.5 N en etanol

Preparación:

- Amortiguador (0.1 M trietanolamina, pH 7.6, - MgSO₄ 0.004 M). Se disuelve el contenido de la botella No. 1 con 150 ml de agua destilada. -

La solución es estable a temperatura ambiente durante 2 meses.

- b). NADH/ATP/PEP (NADH 0.006 M, 0.033 M ATP, PEP 0.011 M) se reconstituye el frasco No. 2 con 2 ml de agua destilada. La solución es estable a temperatura de refrigeración durante un año.
- c). LDH/PK (LDH 2 mg, 1 mg PK/ml). Se utiliza la suspensión del frasco 3 sin diluir. Es estable a temperatura de refrigeración durante un año.
- d). GK (2 mg de GK/ml).
Se usa la suspensión del frasco 4 sin diluir, es estable a temperatura de refrigeración durante un año
- e). Potasa alcohólica (0.5 N)
- | | |
|-------------------------------|--------|
| Hidróxido de potasio. | 3.3 g |
| Agua bidestilada. | 10 ml |
| Etanol c.b.p. | 100 ml |
- f). Sulfato de magnesio 0.15 M
- | | |
|-------------------------------|--------|
| $MgSO_4 - 7 H_2O$ | 3.7 g |
| Agua destilada c.b.p. | 100 ml |

Premezcla: 13 ml de a)
0.5 ml de b)
0.1 ml de c)

NOTA:

Mediante la saponificación obtenemos glicerol de los triglicéridos, en la sangre tenemos glicerol libre en una cantidad constante aproximadamente 1 mg % (10 mg % triglicéridos), por lo tanto no necesitamos saponificar para determinar glicerol libre.

De este modo este método nos determina glicerol total (glicerol de triglicéridos más glicerol libre).

PROCEDIMIENTO:

- a). Pipetear 0.2 ml de suero
- b). Pipetear 0.5 ml de KOH (saponificación)
Mezclar e incubar en baño maría a 55°C - 70°C durante 30 minutos.
- c). Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- d). Pipetear 1 ml de MgSO_4 , mezclar y centrifugar.

DETERMINACION DE LA MUESTRA

- e). Pipetear 0.2 ml del sobrenadante
- f). Pipetear 1.05 ml de la premezcla (reactivos a, b, c). Leer a los 10 minutos E_1 en densidad

óptica (blanco de aire) a 365 mu.

g). Pipetear 0.01 ml de la suspensión d). Leer a los 10 minutos E_2 en densidad óptica contra blanco de aire a 365 mu.

NOTA: Todas las cantidades son para la determinación semimicrométodo.

CALCULOS:

El volumen total macrométodo = 3.14 ml

El volumen total micrométodo = 1.27 ml

La diferencia es menor del 1 % y no produce error y por lo tanto el factor o factores usados en la macro pueden ser usados en la semi-micro.

GLICEROL TOTAL

$$\frac{\Delta DO \times V \times PM}{\text{Coeficiente de absor-} \quad \text{trayectoria de} \quad \text{Vm la} \quad \times 8.5 = \text{mg}\%$$

luz D

ΔDO	Diferencia de lecturas
V	Volumen total 3.14 ml
PM	Peso molecular del glicero- l = 92
Coeficiente de absor- bancia	3.30 $\text{cm}^2/\text{u mol}$ a 366 mu 6.22 $\text{cm}^2/\text{u mol}$ a 340 mu

D. Trayectoria de la luz = 1 cm
Vm Volumen de la muestra =
0.50 ml

FACTOR PARA EL GLICEROL TOTAL DERIVADO DE LA FOR
MULA

$$a \ 366 \text{ mu D.O.} \times 149 = \text{mg } \%$$

$$a \ 340 \text{ mu D.O.} \times 78.6 = \text{mg } \%$$

$$\Delta \text{ D.O} = E_1 - E_2$$

Triglicéridos

$$(\text{Glicerol total mg } \% - 1\text{mg}\%) \times 9.62 = \text{triglicéridos mg}\%$$

Factor 9.62 se deriva de la relación entre el peso mo
lecular de triglicéridos (885) y el peso molecular del glicerol --
(92).

$$\frac{885}{92} = 9.62$$

Valores normales: 74-172 mg %

DETERMINACION DE LIPOPROTEINAS POR ELECTROFORE-
SIS 12-13-20-21-40

(Método: Electroforesis en microzona)

Fundamento:

El principio de la electroforesis se basa en el
movimiento de partículas (lipoproteínas) en un campo eléctrico,

utilizando como medio de soporte la membrana de acetato de celu
losa

Material:

- a). Cámara de microzona
- b). Densitómetro
- c). Refrigerante
- d). Aplicador Beckman
- e). Membranas de acetato de celulosa, Sepraphore
III de la Casa Gelman
- f). Papeles absorbentes
- g). Pinzas y micas

Reactivos:

- a). Amortiguador Veronal (Barbital), con una fuerza
iónica de 0.075 y pH 8.6.
Dietilbarbiturato de sodio. 15.40 g
Acido dietilbarbitúrico. 2.76 g
Agua destilada c.b.p. 1000 ml
- b). Solución colorante Rojo Oleoso 0
Rojo oleoso 0 1 g
Alcohol metílico. 700 ml
Agua destilada. 300 ml
Ponerla a reflujo durante 15 minutos, se utiliza

sin filtrar se conserva a 37°C, el colorante puede ser reusado hasta 2 veces; se puede conservar sin usar hasta 1 semana.

c). Solución decolorante.

Hipoclorito de sodio.	2 ml
Acido acético al 15 %.	98 ml

Se prepara en el momento de usarse (sólo se utiliza una vez).

d). Solución aclaradora:

Dimetilformamida al 30 %	
Dimetilformamida.	30 ml
Agua destilada c.b.p.	100 ml

Material biológico: Suero sanguíneo

Procedimiento:

1. Colocar la membrana Sepraphore III de la Casa Gelman en el amortiguador para que se sature de la solución durante 20 minutos antes de iniciar la electroforesis.
2. Sacar la membrana utilizando pinzas y secar el exceso de líquido con 2 papeles absorbentes.
3. Colocar la membrana en el punto de referencia del puente y luego se introduce en la cámara



Se conecta durante 5 minutos para que se sature la cámara.

4. Aplicar 1 ul de suero por medio del aplicador - Casa Beckman (se aplica 4 veces ya que cada aplicación equivale a 0.25 ul).
5. Encender la fuente de poder y retirar la membrana en caso de que toque las paredes de la celdilla. Se lleva a 200 voltios de 30-45 minutos (40').
6. Apagar la fuente de poder y retirar la membrana con las pinzas colocándola de inmediato en el colorante.
7. La membrana se deja incubar en el colorante a 37 % C. de 14-24 horas.
8. Lavar el exceso de colorante con agua destilada, hasta que no haya colorante sobre la membrana de 3-5 minutos.
9. Pasar la membrana a la solución de hipoclorito acético y observar su decoloración que ocurre de 1 a 2 minutos. Nota *
10. Pasar la membrana a la solución de dimetil forma mida al 30 % durante 5 minutos.
11. Montar la membrana en una placa de vidrio cui

dadosamente lavada.

12. Se lleva al horno (85-100^o C) aproximadamente 10 a 15 minutos el tiempo necesario para su transparencia completa.
13. Se deja enfriar un poco y se enmica.
14. Se lleva la mica al densitómetro (Analytrol), se obtiene la gráfica y se calculan los porcentajes de cada fracción.

Cálculos:

El densitómetro mide y registra la intensidad de la luz que pasa a través de cada fracción en la muestra obteniéndose una curva de densidad. El área bajo esta curva es proporcional a la cantidad de colorante y éste a su vez a la concentración de lipoproteínas presentes.

La densitometría se lleva a cabo en el Analytrol Microzone Scanning Attachment Modelo R-102.

La membrana enmicada se coloca en el carro, que tiene una rendija o abertura de 66 mm de longitud por 13 mm de anchura. El motor tiene una potencia de 6 rpm. La velocidad de medición es de 48 mm por minuto.

Se ajusta a cero utilizando lecturas en una línea base

(cero en la hoja de matrícula) y a 8 en el extremo.

A partir de la gráfica obtenida se calculan las fracciones y se reporta en porcentaje.

Valores Normales:

Fracción beta: 59 \pm 6

Fracción pre-beta: 17 \pm 4

Fracción alfa: 27 \pm 5

NOTA *

La decoloración es un paso crítico ya que se podrían decolorar las fracciones lipoproteicas.

R E S U L T A D O S

LIPIDOS EN SANGRE

No.	Sexo	Edad	Lípidos Totales mg%	Triglicéridos mg%	Colesterol mg%	BETA %	PRE-BETA %	ALFA %
1	F	42	1054	140	218	71.86	12.30	15.84
2	F	38	918	97	188	64.53	20.39	15.13
3	F	40	912	126	237	61.53	12.82	25.64
4	F	39	832	112	198	60.34	13.80	25.86
5	F	35	770	120	244	60.22	22.72	17.04
6	F	41	768	105	241	60.00	12.00	28.00
7	F	30	728	133	228	59.90	13.90	26.30
8	F	38	710	65	208	59.28	21.34	22.39
9	F	33	702	76	148	59.13	24.73	15.04
10	F	40	650	145	210	58.30	14.60	27.10
11	F	22	600	40	198	56.33	16.90	27.76
12	F	40	583	157	182	55.93	5.08	38.98
13	F	34	571	111	175	55.45	25.67	18.91
14	F	40	540	58	203	50.00	20.00	30.00
15	F	22	480	62	156	50.00	18.75	31.25
16	M	48	1118	148	168	73.80	8.72	17.44
17	M	17	917	97	196	68.75	12.50	18.75
18	M	13	760	76	167	65.13	17.26	19.60
19	M	28	752	108	217	62.86	11.43	25.71
20	M	38	750	90	148	60.80	17.40	21.80
21	M	28	714	65	217	60.40	10.80	28.80
22	M	22	690	70	188	58.90	16.10	25.00
23	M	32	670	100	190	57.45	17.02	15.53
24	M	38	650	80	190	57.12	17.40	25.73
25	M	47	650	119	157	55.78	15.36	28.95
26	M	16	646	62	108	55.17	17.24	27.58
27	M	13	640	36	181	53.90	21.70	29.39
28	M	40	640	143	209	52.20	15.40	32.40
29	M	46	624	68	219	50.00	22.90	27.10
30	M	16	552	86	180	48.75	20.00	33.25
31	M	18	552	68	154	48.15	14.81	37.04
32	M	15	490	78	146	36.10		63.90

NOTA: Los valores obtenidos se ordenaron en forma decreciente tomando como referencia la concentración de lípidos totales y Beta lipoproteína.

Se determinaron mediante cálculos estadísticos la media aritmética y la desviación estandar.

Lípidos totales	M = 721	en mujeres	D.S = 159
	M = 787	en hombres	D.S = 170
Triglicéridos	M = 103	en mujeres	D.S = 36
	M = 87	en hombres	D.S = 29.1
Colesterol total	M = 202	en mujeres	D.S = 29
	M = 178	en hombres	D.S = 33.5
BETA Lipoproteína	M = 58.84	en mujeres	D.S = 5.3
	M = 56.76	en hombres	D.S = 6.9
PRE-BETA	M = 16.98	en mujeres	D.S = 5.6
	M = 15.06	en hombres	D.S = 3.7
ALFA	M = 24.98	en mujeres	D.S = 6.9
	M = 18.40	en hombres	D.S = 10.90

CALCULOS ESTADISTICOS

$$M = \frac{\sum f}{n}$$

M = Media aritmética

$\sum f$ = Suma de los valores obtenidos

n = Número de pacientes

$$D.S = \sqrt{\frac{\sum (f - M)^2}{n-1}}$$

D.S = Desviación estandar

$\sum (f-M)^2$ = Sumatoria de las diferencias al cuadrado

n-1 = Número de pacientes - 1 (ya que $n < 100$)

COMENTARIO:

La concentración de lípidos totales, fue mayor en los hombres que en las mujeres; esto se explica, ya que esta regulada por factores hormonales.

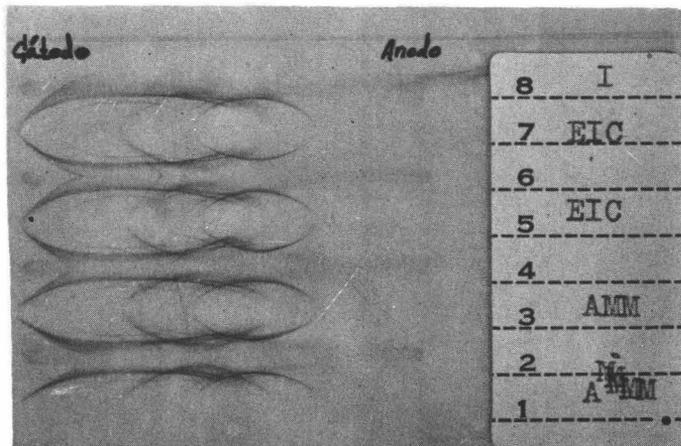
No encontré grandes diferencias entre las concentraciones de las fracciones lipoproteicas.

RESULTADOS Y COMENTARIOS

El resultado de la adaptación de la técnica se puede resumir en los siguientes puntos:

1. Reproducibilidad del método.
2. Obtención de los patrones normales inmunoelectroforéticos de lipoproteínas.
3. Obtención de los patrones inmunoelectroforéticos de los tipos de hiperlipoproteinemias según Fredrickson.

1.- Reproducibilidad del método.- Se comprobó en la forma usual aplicando una muestra varias veces en las distintas posiciones (1, 3, 5 y 7). La figura 1 y 2 nos muestran un patrón inmunoelectroforético de suero normal obtenido con suero antihumano polivalente y teñido para proteínas y lipoproteínas respectivamente.



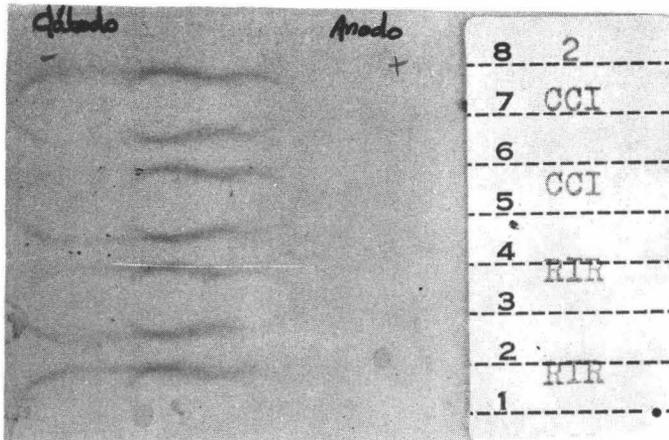


FIGURA 2

2.- Patrones normales de lipoproteínas por inmunoelectroforesis en acetato de celulosa. - La identificación e interpretación de los constituyentes lipoproteícos se determinó aplicando el siguiente criterio:

- a). Movilidad electroforética
- b). Especificidad inmunoquímica
- c). Afinidad por los colorantes

Mediante el análisis inmunoelectroforético se determinaron las tres clases de lipoproteínas.

BETA LIPOPROTEINAS

El análisis inmunoelectroforético se realizó con la be

ta lipoproteína nativa.

La beta lipoproteína se encuentra en la región de las beta globulinas, donde aparentemente se encontraron 3 constituyentes proteícos:

1. Transferrina⁶, por lo general produce una banda extensa cerca del canal del anticuerpo; debido a el exceso de antígeno se produce un ensanchamiento del arco de precipitación el cual no se tiñe con los colorantes del Sudán (Rojo 7B); sino que fue detectado por la tinción para proteínas. Ver figura 3.

2. Homopéxina⁶, produce un arco extenso y claro con una curvatura bastante marcada y se tiñe con colorantes para proteínas. Ver figura 3.

3. Beta Lipoproteína. - La beta lipoproteína reacciona inmunológicamente con suero anti-humano polivalente y con suero específico anti-beta lipoproteína.

Con el suero anti-humano polivalente produce un arco de precipitación que se tiñe con los colorantes de Sudán, aunque también es detectada con colorantes para proteínas. Este arco de precipitación tiene una movilidad electroforética de $1.1 \text{ cm}^2 \cdot \text{volts}^{-1} \cdot \text{seg}^{-1}$, comienza casi en el punto de origen no es muy in

curvado y siempre queda lejos del canal del anticuerpo.

Con el suero específico anti-beta lipoproteína produce un arco que en su extremo anódico se subdivide en 2 líneas. Ver figura 3, 4 y 14.

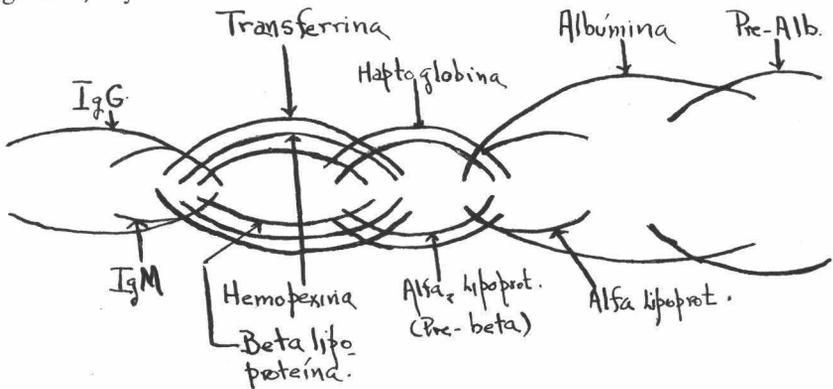


FIGURA 3

Patrón normal de proteínas por inmunoelectroforesis, obtenido con suero anti-humano polivalente.

PRE-BETA LIPOPROTEINA (ALFA₂ LIPOPROTEINA).

El análisis inmunoelectroforético se realizó con la pre beta lipoproteína nativa.

Se encuentra en la región electroforética de las alfa₂ globulinas, donde encontramos 2 constituyentes:

1. Haptoglobulina, produce un arco de precipitación

fino pero claro con una curvatura bastante marcada y se encuentra próximo al canal del anticuerpo.

2. PRE-BETA LIPOPROTEINA (ALFA₂-LIPOPROTEINA).

Produce un arco de precipitación que se tiñe con los colorantes de Sudán (Rojo 7B), la pre-beta reacciona inmunológicamente con suero anti-humano polivalente y con suero específico anti-beta lipoproteína.

Con el suero anti-humano polivalente da una reacción de identidad parcial con la beta lipoproteína nativa, esto se debe a que tienen determinantes antigénicos comunes. Ver figura 5.

La pre-beta lipoproteína reacciona con el suero específico anti-beta lipoproteína dando una reacción de identidad. Ver figura 14.

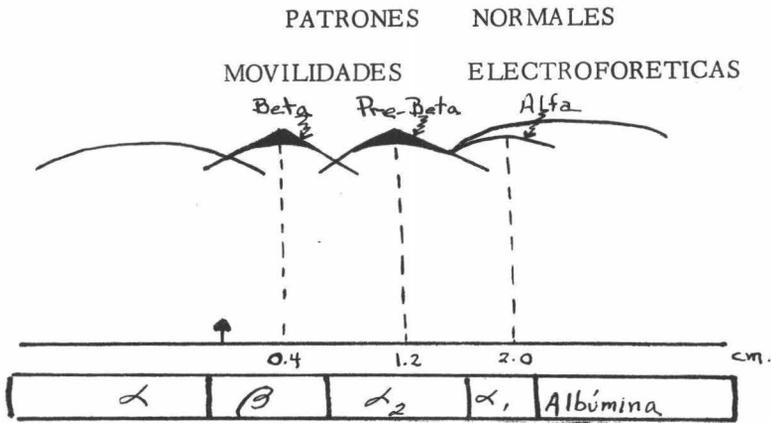
ALFA LIPOPROTEINA

El análisis inmunoelectroforético se realizó con la alfa lipoproteína nativa.

Se encuentra en la región electroforética de las alfa₁ globulinas.

La alfa lipoproteína produce un arco de precipitación

que se tiñe levemente con los colorantes, se encuentra a nivel de la albúmina. Ver figura 3 y 5. Tiene una movilidad electroforética de $5.9 \text{ cm}^2 \text{ volts}^{-1} \times \text{seg}^{-1}$ ver figura 4; reacciona inmunológicamente con el suero anti-humano polivalente y con el suero específico anti beta lipoproteína no reacciona.



Determinación de las movilidades electroforéticas

Fórmula d = $\frac{Vtu}{l}$ (1)

 dl = Vtu (2)

 u = $\frac{dl}{Vt}$ (3)

Beta lipoproteína = $\frac{0.4 \times 14.3}{200 \times 2400} = 1.1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ Volts}^{-1} \text{ seg}^{-1}$

Pre-beta lipoproteína = $\frac{1.2 \times 14.3}{200 \times 2400} = 3.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ Volts}^{-1} \text{ seg}^{-1}$

$$\text{Alfa lipoproteína} = \frac{2.0 \times 14.3}{200 \times 2400} = 5.9 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ Volts}^{-1} \text{ Seg}^{-1}$$

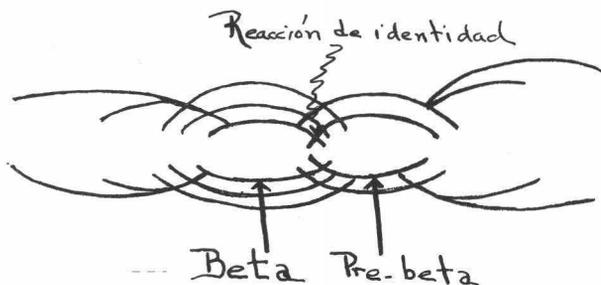
TABLA DE MOVILIDADES ELECTROFORETICAS

Componentes lipoproteicos del suero normal humano	Movilidades electroforéticas $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ Volts}^{-1} \text{ seg}^{-1}$	Amplitud del arco cm
Beta lipoproteína	1.1	1.7
Pre-beta lipoproteína	3.5	1.3
Alfa lipoproteína	5.9	1.2

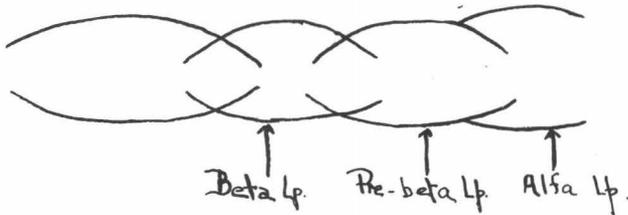
Valores obtenidos de los sueros de 32 personas aparentemente sanas.

FIGURA 4

INMUNOELECTROFORESIS DE LIPOPROTEINAS



Patrón inmunoelectroforético obtenido con antisuero polivalente empleando como antígeno un suero normal; teñido con Rojo Ponceau S.



Patrón inmunolectroforético de lipoproteínas empleado suero anti-humano polivalente y como antígeno un suero normal. Obsérvese las características diferenciales de los dos patrones inmunolectroforéticos y la correspondencia de la beta lipoproteína con la beta globulina y la pre-beta lipoproteína con la alfa₂ lipoproteína.

FIGURA 5

3. PATRONES INMUNOELECTROFORETICOS DE LOS TIPOS DE HIPERLIPOPROTEINEMIAS PRIMARIAS SEGUN FREDRICKSON.

No.	Sexo	Edad	LIPIDOS EN SANGRE			TIPO IIa		
			Lípidos totales mg%	Triglicéridos mg%	Coolesterol mg%	BETA %	PRE-BETA %	ALFA %
1	F	47	891	140	318	100	-	-
2	F	59	800	162	223	73.60	10.40	15.90
3	F	65	405	40	163	71.00	13.20	15.80
4	M	60	1000	168	280	86.00	10.00	4.00
5	M	50	960	154	275	77.55	12.24	10.24

TIPO IIa. - Este tipo se caracteriza por un aumento en la concentración de las beta lipoproteínas observándose un arco de precipitación que presenta un ensanchamiento en el vértice, con movilidad y amplitud mayor que la beta lipoproteína normal y mayor afinidad por el colorante Rojo 7B. Ver figura 7 y 6.

Al reaccionar con suero específico anti-beta lipoproteína dá un arco de precipitación con mayor amplitud (dependiendo de la concentración del antígeno).

La pre-beta lipoproteína conserva su movilidad electroforética, sin embargo la amplitud del arco disminuye al aumentar la concentración de la beta lipoproteína; ver figura 7 y 8.

TIPO III

LIPIDOS EN SANGRE TIPO III								
No.	Sexo	Edad	Lípidos totales mg%	Triglicé- ridos mg%	Coleste- rol mg%	BETA %	PRE-BETA %	ALFA %
1	F	44	6870	5100	970	BETA	AMPLIA	

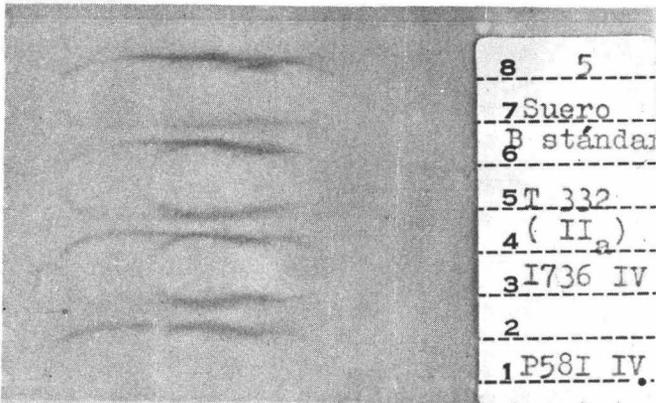


FIGURA 6

Patrón inmunoelectroforético de lipoproteínas correspondiente al tipo IIa, obtenido con suero anti-humano polivalente.

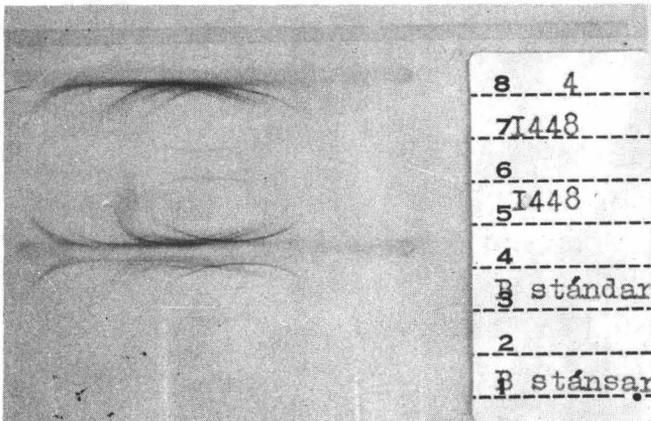
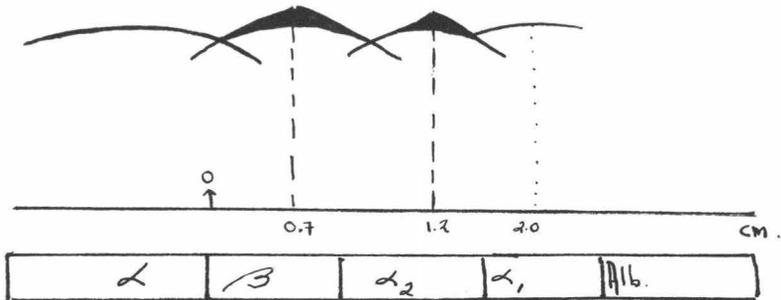


FIGURA 7

TIPO IIa

MOVILIDADES ELECTROFORETICAS



Determinación de las movilidades electroforéticas.

Fórmula $d = \frac{V t u}{I} \dots \dots \dots (1)$

$dI = Vtu \dots \dots \dots (2)$

$u = \frac{dI}{Vt} \dots \dots \dots (3)$

Beta lipoproteína = $\frac{0.7 \times 14.3}{100 \times 2400} = 2.0 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ Volts}^{-1} \text{ seg}^{-1}$

Pre-beta lipoproteína = $\frac{1.2 \times 14.3}{200 \times 1400} = 3.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ Volts}^{-1} \text{ seg}^{-1}$

Alfa lipoproteína = $\frac{2.0 \times 14.3}{200 \times 2400} = 5.9 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ Volts}^{-1} \text{ seg}^{-1}$

TABLA DE MOVILIDADES ELECTROFORETICAS

Componentes lipoproteicos del suero tipo Ila	Movilidades electroforéticas 10^{-5} Volts ⁻¹ seg ⁻¹	Amplitud del arco del arco cm
Beta lipoproteína	2.0	2.0
Pre-beta lipoproteína	3.5	1.0
Alfa lipoproteína	5.9	1.2

Valores obtenidos de los sueros de 5 personas con el tipo Ila.

FIGURA 8

TIPO III

Este tipo se caracteriza por la presencia de dos componentes en la región de las LMBD (pre-beta lipoproteína); uno LMBD normal y otro lipoproteína anormal con características de Apo-LBD.

Esta alteración conocida como Beta amplia produce un patrón inmunoelectroforético muy singular.

Se observa la difusión de la beta anormal a la zona Pre-beta produciéndose una reacción de inmunoprecipitación intensa en esta zona.

Lo más interesante de este patrón es el arco de pre-

cipitación tan característico de la beta anormal; el cual migra de la zona beta a la pre-beta. Se determinó su movilidad electroforética y fue idéntica a la de la pre-beta ($3.5 \text{ cm}^2 \text{ volts}^{-1} \text{ seg}^{-1}$), la amplitud del arco fue mayor (2.2 cm) a la de la pre-beta, la cual en este tipo se encontró aumentada.

La beta lipoproteína y la pre-beta lipoproteína se encontraron con sus movilidades electroforéticas normales aunque en menor concentración la primera. Ver figura 9.

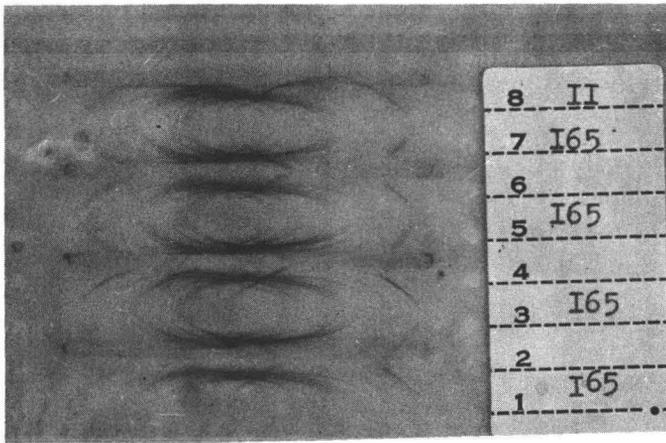
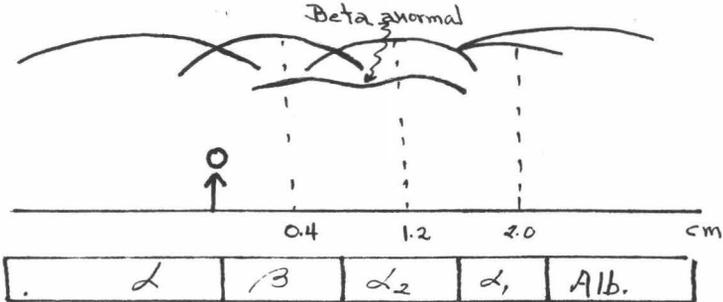


FIGURA 9

TIPO III

MOVILIDADES ELECTROFORÉTICAS



Determinación de las movilidades electroforéticas

Fórmula: $d = \frac{Vtu}{I} \dots \dots \dots (1)$

$dI = Vtu \dots \dots \dots (2)$

$u = \frac{dI}{Vt} \dots \dots \dots (3)$

Beta lipoproteína = $\frac{0.4 \times 14.3}{200 \times 2400} = 1.1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ Volts}^{-1} \text{ Seg}^{-1}$

Pre-beta lipoproteína = $\frac{1.2 \times 14.3}{200 \times 2400} = 3.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ Volts}^{-1} \text{ seg}^{-1}$

Beta anormal = $\frac{1.2 \times 14.3}{200 \times 2400} = 3.5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ Volts}^{-1} \text{ seg}^{-1}$

Alfa lipoproteína = $\frac{2.0 \times 14.3}{200 \times 2400} = 5.9 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ Volts}^{-1} \text{ seg}^{-1}$

MOVILIDADES ELECTROFORETICAS

Componentes lipoproteicos del suero tipo III	Movilidades electroforéticas $10^{-5} \text{cm}^2 \text{Volts}^{-1} \text{seg}^{-1}$	Amplitud del arco cm
Beta lipoproteína	1.1	1.7
Pre-beta lipoproteína	3.5	1.9
Beta anormal	3.5	2.2
Alfa lipoproteína	5.9	1.2

Valores obtenidos del suero de una persona del tipo III

FIGURA 10

LIPIDOS EN SANGRE TIPO IV

No.	Sexo	Edad	Lípidos totales mg%	Triglicé- ridos mg%	Coleste- rol mg%	BETA %	PRE-BETA %	ALFA %
1	F	38	2280	970	362	45.30	30.10	24.60
2	F	43	1870	380	300	44.44	40.74	14.82
3	F	55	1807	380	300	44.44	40.74	14.82
4	F	50	1750	812	250	33.54	58.70	7.74
5	F	50	1655	740	255	23.30	72.83	3.87
6	F	48	840	226	198	9.63	87.95	2.40
7	M	39	2000	880	320	46.00	38.00	16.00
8	M	25	1655	738	255	11.11	88.80	0.00
9	M	46	1211	296	204	44.80	41.40	13.80
10	M	55	967	148	284	50.00	22.90	27.10
11	M	65	940	190	190	44.70	31.90	17.40
12	M	48	800	220	225	48.38	30.64	20.96
13	M	44	762	220	225	56.52	28.98	14.49
14	M	45	756	219	219	64.50	29.00	6.50
15	M	47	756	219	220	53.30	34.60	11.90
16	M	30	499	105	156	56.60	23.30	20.10

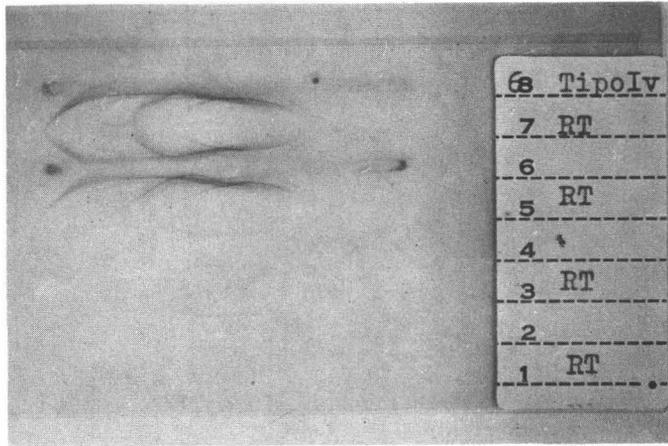
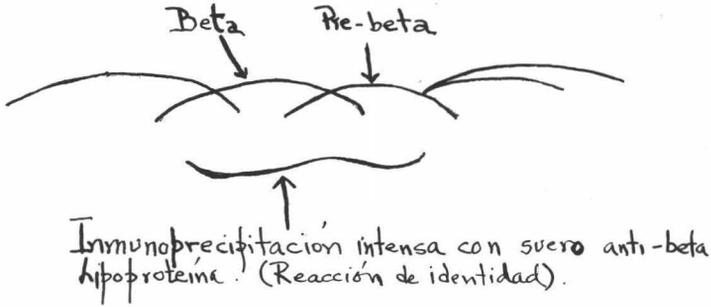
TIPO IV

Este tipo se caracteriza por un aumento de la pre-beta lipoproteína, su movilidad electroforética no varía pero la amplitud y su afinidad por el colorante de Sudán (Rojo 7B) se incrementa.

Al reaccionar la beta y la pre-beta con el suero anti humano polivalente se observa la reacción de identidad parcial; ver figura 11.

El suero tipo IV al reaccionar con el suero anti-beta lipoproteína da una reacción inmunoquímica muy intensa, en la zona pre-beta se observa casi una duplicación del arco; éste comprende de la zona beta y casi la totalidad de la pre-beta dando una reacción de identidad (11 y 13).

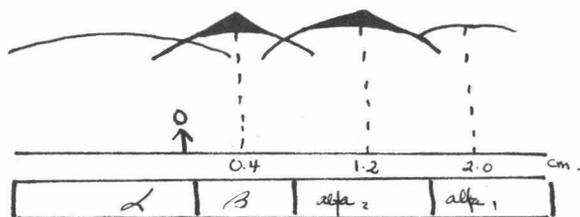
Este fenómeno se observó en el caso de una persona (EIC) que por electroforesis no reveló pre-beta lipoproteína y -- que al análisis inmunolectroforético utilizando suero específico anti beta lipoproteína se produjo un arco correspondiente a la beta lipoproteína que en su extremo anódico se subdividió en 2 líneas; una de ellas correspondió al determinante antigénico en común de la pre-beta que había reaccionado levemente y la otra al determinante antigénico de la beta lipoproteína. (Ver figura 14); la cual al aumentar la concentración de la pre-beta también lo hace la amplitud del arco (ver . figura 11).



Patrón immunoelectroforético de lipoproteínas obtenido con suero anti humano polivalente (parte superior) al reaccionar la beta y la pre-beta se observa la reacción de identidad parcial. Tinción con Rojo Ponceau S. Obsérvese un aumento en la amplitud y afinidad al colorante.

TIPO IV

MOVILIDADES ELECTROFORÉTICAS



Determinación de las movilidades electroforéticas

Fórmula: $d = \frac{Vtu}{I} \dots \dots \dots (1)$

$dI = Vtu \dots \dots \dots (2)$

$u = \frac{dI}{Vt} \dots \dots \dots (3)$

Beta lipoproteína = $\frac{0.4 \times 14.3}{200 \times 2400} = 1.1 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{Volts}^{-1} \text{seg}^{-1}$

Pre-beta lipoproteína = $\frac{2.0 \times 14.3}{200 \times 2400} = 3.5 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{Volts}^{-1} \text{seg}^{-1}$

Alfa lipoproteína = $\frac{2.0 \times 14.3}{200 \times 2400} = 5.9 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{Volts}^{-1} \text{seg}^{-1}$

MOVILIDADES ELECTROFORETICAS

Componentes lipoproteicos del suero tipo IV	Movilidades electroforéticas $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{Volts}^{-1} \text{seg}^{-1}$	Amplitud del arco cm
Beta lipoproteína	1.1	1.3
Pre-beta lipoproteína	3.5	1.7
Alfa lipoproteína	5.9	1.2

Valores obtenidos del suero de 16 personas del tipo -

IV.

FIGURA 12

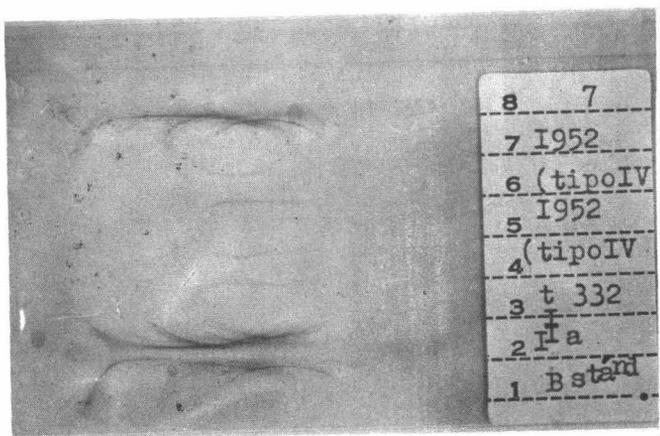


FIGURA 13

Patrón inmunoelectroforético de lipoproteínas del tipo IV en la parte central se encuentra reaccionando con suero anti-beta, obsérvese la amplitud del arco que comprende la zona beta y abarca casi la totalidad de la pre-beta dando una reacción de identidad.

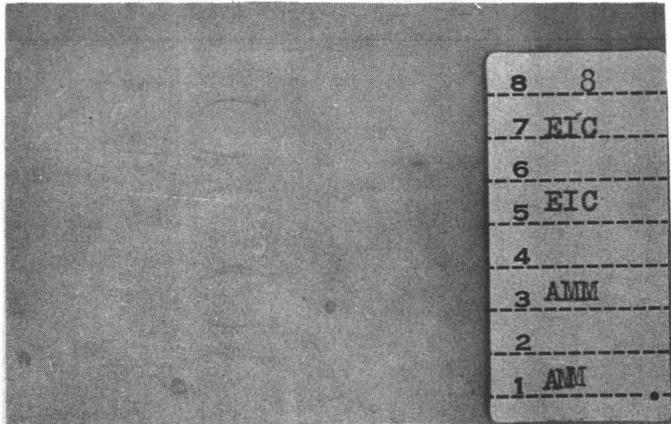
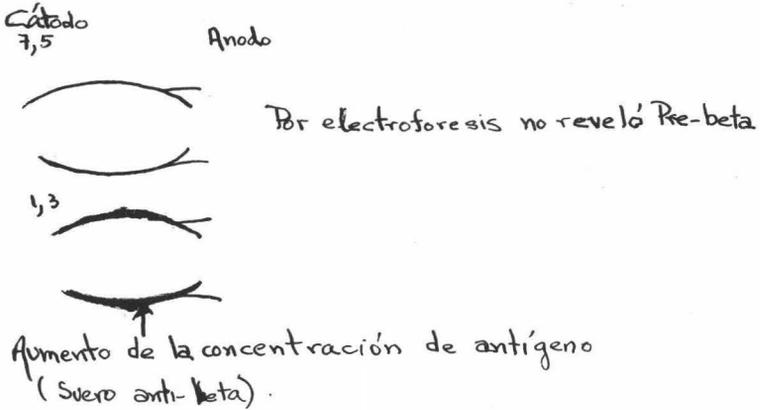


FIGURA 14

Patrón inmunoelectroforético de lipoproteínas obtenido con suero específico anti beta lipoproteína, en la parte superior se utilizó como antígeno el suero de EIC que no tenía por electroforesis pre-beta lipoproteína y en la parte inferior un suero normal. - Obsérvese el arco correspondiente a la beta lipoproteína y su extremo anódico el cual se subdivide en 2 líneas. Tinción Rojo Ponceau S.

TIPO V

Se caracteriza por el incremento de la pre-beta lipoproteína y la presencia de quilomicrones.

Quilomicrones. - Normalmente no existen en el suero normal; aislamiento y caracterización: el suero obtenido en ayunas se dejó en reposo a 4^o C durante 24 horas, para apreciar la capa que sobrenada debido a los quilomicrones.

Se tomaron 2 ul de esa capa y se efectuó el análisis inmunoelectroforético este reveló que los quilomicrones no fueron aislados libres de contaminaciones y que también se encontraban proteínas y lipoproteínas séricas. Debido a la composición química rica en grasas neutras estos se tiñen intensamente con el colorante Rojo 7 B; la imagen electroforética ofrece solo una mancha en el origen la cual tiene afinidad por los colorantes para lípidos y no se tiñe para proteínas (Fig. 17).

No hubo reacción inmunoquímica. Esto se deduce por que no hubo formación de arcos de precipitación; el que no se lleve a cabo la reacción de precipitación antígeno-anticuerpo implica que los quilomicrones no son antigénicos.

En la región de las LMBD se encuentra un arco de

precipitación que se identifica como pre-beta lipoproteína con una movilidad normal pero mayor amplitud y afinidad por el colorante Rojo 7 B. Ver figura 15.

LIPIDOS EN SANGRE

No.	Paciente	Edad	Sexo	Colesterol total mg%	Lípidos totales mg%	Triglicéridos mg%	Beta %	Pre-beta %	Alfa %
1	D	47	M	294	2976	2050	5.0	87.7	7.3
2	LC	35	M	280	2380	1050	-	90.0	10.0

Presencia de quilomicrones.

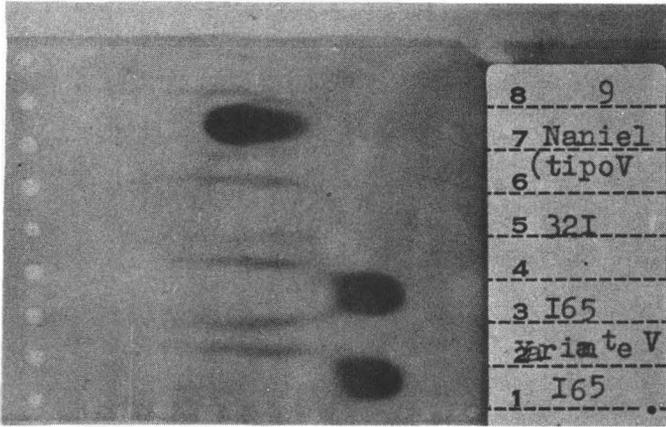
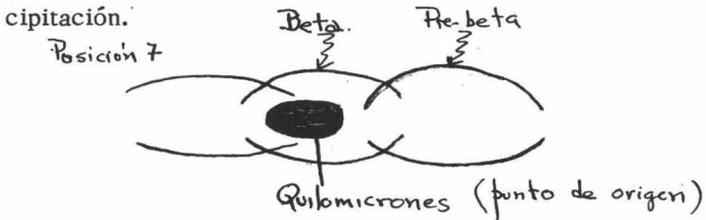
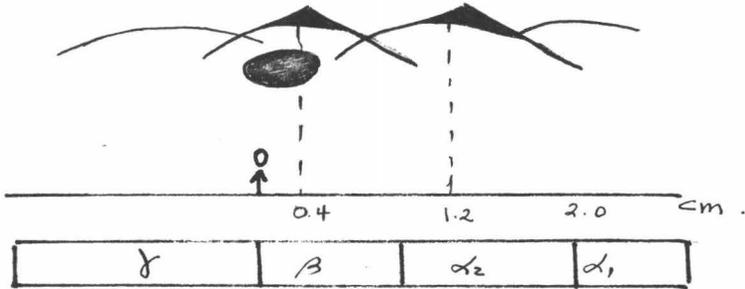


FIGURA 15

Patrón inmunoelectroforético de lipoproteínas obtenido con suero anti-humano polivalente usando como antígeno un suero tipo V; obsérvese la parte superior donde los quilomicrones permanecen en el punto de aplicación y no hay formación de arco de precipitación.



TIPO V
MOVILIDAD ELECTROFORETICAS



Determinación de las movilidades electroforéticas

Fórmula: $d = \frac{Vtu}{l} \dots \dots \dots (1)$

$d_l = Vtu \dots \dots \dots (2)$

$u = \frac{dl}{Vt} \dots \dots \dots (3)$

Beta lipoproteína = $\frac{0.4 \times 14.3}{200 \times 2400} = 1.1 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{Volts}^{-1} \text{seg}^{-1}$

Pre-beta lipoproteína = $\frac{1.2 \times 14.3}{200 \times 2400} = 3.5 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{Volts}^{-1} \text{seg}^{-1}$

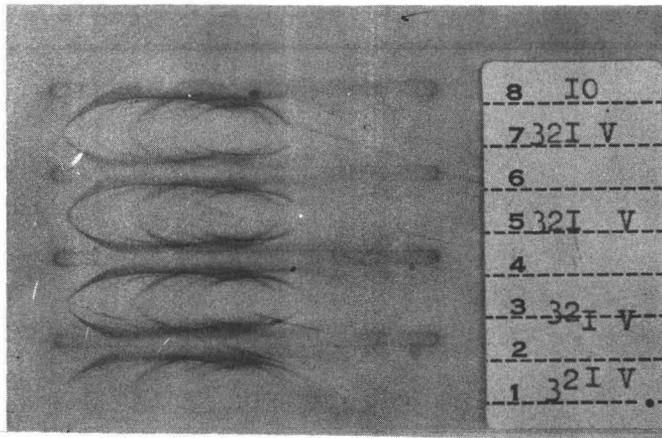
Alfa lipoproteína = $\frac{2.0 \times 14.3}{200 \times 2400} = 5.9 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{Volts}^{-1} \text{seg}^{-1}$

MOVILIDADES ELECTROFORETICAS

Componentes lipoproteicos del suero tipo V	Movilidades electroforéticas $10^{-5} \frac{\text{cm}^2 \text{Volts}^{-1}}{\text{seg}}$	Amplitud del arco cm
Beta lipoproteína	1.1	1.3
Pre-beta lipoproteína	3.5	1.7
Alfa lipoproteína	5.9	1.2
Quilomicrones	Punto de origen	-

Valores obtenidos de los sueros de 2 personas con el tipo V

FIGURA 16



Patrón inmunoelectroforético de lipoproteínas del tipo V obtenido con suero anti humano polivalente. Tinción para proteínas con Rojo Ponceau S, obsérvese cómo los quilomicrones no se tiñen; la pre-beta lipoproteína está incrementada.

VARIANTE DEL TIPO III

En un paciente al efectuar la electroforesis se obtuvo un patrón tipo III (fig. 19) y presencia de quilomicrones, por lo que nos interesó realizar el análisis inmunoelectroforético; el cual nos reveló la presencia de 2 componentes en la región pre-beta lipoproteína, uno LMBD normal y otra LBD anormal, ver figura 18. La LBD anormal produce un arco de precipitación que difunde de la zona beta a la pre-beta; los quilomicrones normalmente no migran en acetato de celulosa y la anormalidad de este patrón radica en la movilidad de ellos.

En la paciente ya que se encontró una movilidad de α_1 globulina se hizo una segunda determinación inmunoelectroforética, después de que el paciente se le dió tratamiento medicamentoso. En esta segunda determinación encontramos una movilidad de los quilomicrones en la región de las α_2 globulinas, Ver figuras 18 y 20. Probablemente la movilidad de los quilomicrones se deba a una carga eléctrica neta inducida por un aumento de la concentración de beta lipoproteína en su composición; como lo demuestra la teoría sobre la síntesis de quilomicrones en donde el pequeño componente proteico de ellos (péptido de LBD) parece ser esencial para su formación y función.

Además del mecanismo de síntesis se sugiere la deficiencia de la lipasa lipoprotéica que impide la remoción de los quilomicrones debido a que se disminuye la disponibilidad de insulina *.

LIPIDOS EN SANGRE

No.	Paciente	Edad	Sexo	Colesterol total mg%	Lípidos totales mg%	Triglicéridos mg%	Electroforesis %
1	DSM	44	F	970	6870	5100	Beta amplia 86.3 quilomicrones 13.7

* Diagnóstico Diabetes mellitus e Hipertensión.

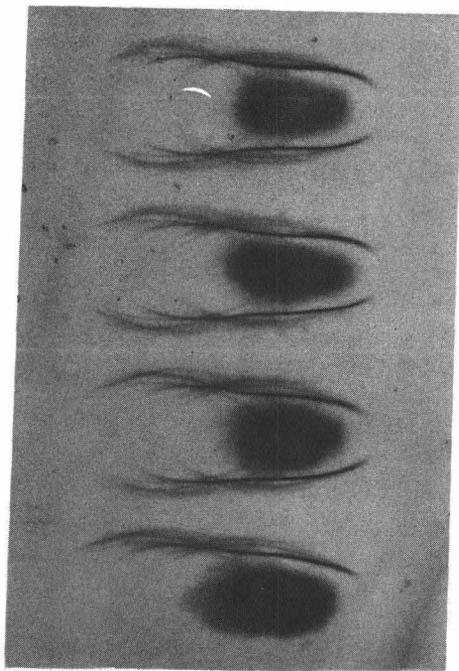


FIGURA 18

Patrón inmunoelectroforético de lipoproteínas de una variante del tipo III; la cual consiste en la movilidad electroforética de α_2 de los quilomicrones, normalmente los quilomicrones no migran en acetato de celulosa.

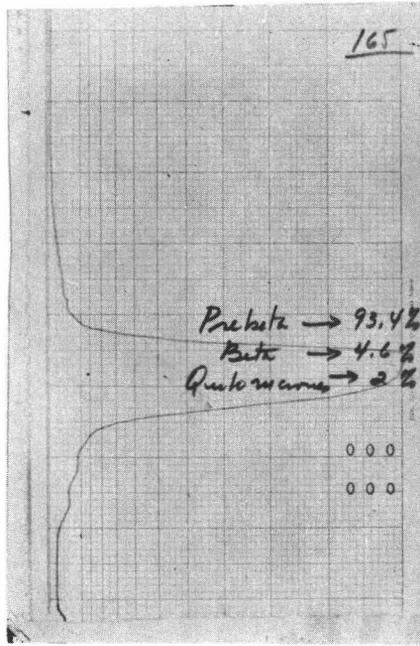


FIGURA 19

Patrón electroforético

VARIANTES DEL TIPO III

MOVILIDADES ELECTROFORETICAS

Beta anormal



Determinación de las movilidades electroforéticas.

$$\text{Fórmula: } d = \frac{Vtu}{l} \dots \dots \dots (1)$$

$$dl = Vtu \dots \dots \dots (2)$$

$$u = \frac{dl}{Vt} \dots \dots \dots (3)$$

$$\text{Beta lipoproteína} = \frac{0.4 \times 14.3}{200 \times 2400} = 1.1 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{Volts}^{-1} \text{seg}^{-1}$$

$$\text{Pre-beta lipoproteína} = \frac{1.2 \times 14.3}{200 \times 2400} = 3.5 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{Volts}^{-1} \text{seg}^{-1}$$

$$\text{Beta anormal} = \frac{1.2 \times 14.3}{200 \times 2400} = 3.5 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{Volts}^{-1} \text{seg}^{-1}$$

$$\text{Alfa lipoproteína} = \frac{2.0 \times 14.3}{200 \times 2400} = 5.9 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{Volts}^{-1} \text{seg}^{-1}$$

MOVILIDADES ELECTROFORETICAS

Componentes lipoproteicos del suero variante tipo III	Movilidad electroforética. $10^{-5} \text{Volts}^{-1} \text{seg}^{-1}$	Amplitud del arco cm
Beta lipoproteína	1.1	1.7
Pre-beta lipoproteína	3.5	1.9
Beta anormal	3.5	2.2
Quilomicrones	alfa ₂	-
Alfa lipoproteína	5.9	1.2

Valores obtenidos del suero de una persona de una variante tipo III

FIGURA 20

DISCUSION

Al pensar en la adaptación de la técnica de inmuno--
electroforesis de proteínas aplicada a la determinación de las li--
poproteínas sabíamos que íbamos a tropezar con varias dificulta--
des, tales como:

ANALISIS INMUNOELECTROFORETICO DE LIPOPROTEINAS EN - -
ACETATO DE CELULOSA

Técnicas de aislamiento e identificación	Factores determinantes
ELECTROFORESIS	{ pH fuerza iónica tamaño del poro adsorción } { Posición de los arcos de precipitación }
↓ INMUNODIFUSION	{ Medio de difusión Temperatura } { Fenómeno de Leeseqing }
↓ REACCION DE PRECIPITACION	{ Antigenicidad Concentración óptima del antígeno Concentración óptima del anticuerpo }
↓ REMOVER EL MEDIO DE DI- FUSION	{ Distancia entre la aplicación del antígeno y el canal del anticuerpo } { Solvente orgánico Extrae los lípidos; y lipoproteínas }
↓ LAVADO	{ Precipitados inespecíficos Movilidad electroforética Especificidad inmunológica } { Determi- nación }
↓ REACCIONES DE CARACTERI- ZACION	{ del número de componen- tes. Temperatura } { Afinidad por ciertos colorantes }
↓ ACLARAMIENTO	{ Fijador }
↓ INTERPRETACION E IDENTIFICACION DE LOS CONSTITUYENTES LIPOPROTEICOS	

Estas variantes, una vez estudiadas nos proporcionaron la forma de hacer las modificaciones siguientes: medio de soporte corriente con voltaje constante y colorante específico para lípidos. Sin embargo no resultó satisfactoria, ya que los arcos de precipitación correspondientes a las fracciones lipídicas no aparecían; únicamente aparecía uno en la región de las beta globulinas.

Debido a las dificultades encontradas, requería ser modificada para la obtención de una técnica adecuada para la determinación de lipoproteínas.

Primero se trato de modificar el tiempo de enjuague de la membrana con éter de petróleo, disminuyendo el tiempo a la mitad pero no se consiguió evitar la deslipidación. El siguiente paso fue cambiar el medio de difusión para no utilizar el éter de petróleo; los medios de difusión experimentados fueron: cámara húmeda y glicerol con sus respectivos solventes. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

Membrana	Medio de difusión	Disolvente	Tiempo	Observaciones
1	Aceite-mineral éter-petróleo		60"	Decoloración parcial de los arcos, - se encontró un arco en la zona beta <u>g</u> lo bulinas.
2	Aceite-mineral éter-petróleo		65"	Semejante a la primera membrana.
3	Aceite-mineral éter-petróleo		75"	Decoloración total de los arcos.
4	Aceite-mineral éter-petróleo		80"	Decoloración total
5	Aceite-mineral éter-petróleo		100"	Características semejantes a las <u>mem</u> branas 3,4 y 5.
6	Glicerol-agua	agua	-	Se disolvió la membrana y el antisuero no reaccionó
7	Cámara húmeda	agua	-	No hubo una buena inmunodifusión
8	Aceite-mineral éter-petróleo		15"	Decoloración de los arcos.

Posteriormente al notar que el exceso de éter de petróleo disolvía los lípidos y posiblemente las lipoproteínas e impedía la formación de arcos de precipitación y la tinción de las - - fracciones lipoproteicas era necesario encontrar un solvente - - - "IDEAL" que no extrajera los lípidos, pero que a la vez disolviera el aceite mineral (medio de difusión).

Después de utilizar diferentes solventes como: benceno, alcohol, isopropílico y tolueno; decidimos utilizar el tolueno ya que en los extractos de ellos se determinó colesterol siendo este un extracto que no presentó reacción colorida que demostrara la presencia de colesterol, debido a esto fue el utilizado para la remoción del medio de difusión (aceite-mineral).

Así pues, el tolueno reunía una de las dos cualidades del solvente ideal; la otra se demostraría al realizar la inmunoelectroforesis de lipoproteínas.

CONCENTRACION DEL ANTIGENO Y EL ANTICUERPO

Las lipoproteínas son antígenos que se encuentran en el suero en baja concentración, por lo que se requería una mayor aplicación de antígeno (suero) y así hacer más visible la reacción antígeno-anticuerpo (región de las beta lipoproteínas, de la pre-beta y alfa lipoproteína).

Esta fue encontrada después de variar las concentraciones de suero y anti-suero, la concentración óptima fue la de 2 ul y 30 ul de suero anti-humano polivalente y 20 ul de suero anti-beta lipoproteína.

SOLUCION COLORANTE

Al comenzar el estudio el colorante usado fue el Rojo Oleoso, pero no se obtuvo una buena tinción, probablemente se deba a que el arco de precipitación contiene tanto el antígeno como el anticuerpo, predominando los anticuerpos. Es decir, que la cantidad de lípidos presentes en los arcos de precipitación es menor que en la electroforesis de lipoproteínas.

Utilizamos diferentes colorantes de la familia de los sudanes, variando diversos factores como: preparación (relación de solventes alcohol-agua), tiempo de incubación e inclusive la adición de sustancias fijadoras del colorante como: ácido sulfosalicílico e hidróxido de sodio con el fin de coagular las proteínas y así fijar el colorante, ya que éste tiene una acción muy enérgica (corrosiva) y destruye las membranas.

TABLA 2

Colorante	Preparación	Decolorante	Tiempo de incubación	Resultado
Rojo oleoso	Metanol 70 ml Agua 30 ml 0.1g de colorante	Hipoclorito al 2% con ácido acético al 15 %	16-24 hrs.	No satisfactorio
Sudán Negro B	Cantidad de colorante a saturación con etanol 60%	Etanol 60%	2- 4 hrs.	No satisfactorio, tinción de todas las fracciones
Sudán Negro	160 ml de Sudán negro y 0.1 ml de NaOH al 30%	Etanol 60%	2- 4 hrs	No satisfactorio
Sudán IV	Cantidad de colorantes a saturación con etanol al 60%	Etanol 60%	2- 4 hrs	No satisfactorio
Rojo 7B _a	150 mg de colorante, 30 ml etanol 60 ml de etilen glicol 60 ml de NaOH	Hipoclorito al 2 %	6-24 hrs	Buena tinción pero destrucción de la membrana.
Rojo 7B _b	0.1 g de colorante, 70 ml de metanol y 30 ml de agua (reflujo)	Hipoclorito al 2%	6-24 hrs	No satisfactorio
Rojo 7B _c	0.1 g de colorante, 70 ml de etanol y 30 ml de agua (reflujo).	Hipoclorito al 2% con ácido acético; al 15%	16-24 hrs	SATISFACTORIO
Rojo 7B _d	0.1g de colorante, 70 ml de etanol, 10 ml de ATCA al 3%, 20ml de ácido sulfosalicílico	Hipoclorito al 1% con ácido acético al 15%	16-24 hrs	No satisfactorio

RESUMEN Y CONCLUSIONES

RESUMEN

1. Se hace una breve historia sobre el análisis inmunolectroforético en diferentes medios de soporte, descripción de los principios de electroforesis y la inmunodifusión. Énfasis en la reacción de precipitación específica y en los factores que la determinan, así como las bases para la identificación y caracterización de los constituyentes proteicos y lipoproteicos de acuerdo a sus propiedades inmunoquímicas, electroforéticas y afinidad por ciertos colorantes.

2. Generalidades de lipoproteínas mencionando el aspecto inmunoquímico: aislamiento y caracterización de la porción proteica, demostración de la heterogeneidad molecular de las lipoproteínas y sus variantes genéticas.

Clasificación de las hiperpoproteinemias primarias según Fredrickson y Lees.

3. Descripción del material biológico empleado; métodos de determinación de lípidos totales, colesterol, triglicéridos y electroforesis de lipoproteínas; mencionando los reactivos, procedimientos y cálculos empleados.

Desarrollo de la adaptación de la técnica "inmunolectroforesis de proteínas en acetato de celulosa" a la determinación de lipoproteínas.

4. Se reportan los resultados obtenidos en 32 personas aparentemente sanas y en 25 personas con alteraciones de lípidos.

5. Identificación e interpretación de los constituyentes proteicos y lipoproteicos; se determinan las 4 clases de lipoproteínas por regiones electroforéticas y se hace un breve análisis de cada una de ellas de acuerdo a su aislamiento, afinidad por el colorante Rojo 7B.

Patrones normales inmunoelectroforéticos de lipoproteínas					
	Suero anti- humano po- livalente	Suero anti- beta lipo- proteína.	Movilidad electrofo- rética.	Afini- dad al Rojo 7B	Imagen inmu- noelectroforé- tica
Pre-beta (nativa)	+	+	3.5 alfa ₂	+	Arco incurvado cerca del canal
Beta (nativa)	+	+	1.1 beta	+	Arco que co- mienza casi en el punto de ori- gen no es muy - incurvado y que da lejos del ca- nal
Alfa	+	-	5.9	+	No es muy incur- vado

6. Determinación de los patrones inmunoelectroforé-
ticos según Fredrickson de las hiperlipoproteinemias.

	Suero anti- humano po- livalente.	Suero anti- beta lipopro- teína	Conc. del antíg.	Movi- lidad del origen	Amplitud del arco	Afinidad al Rojo 7B
TIPO I (no fueron aislados)	-	-	-	origen	-	+++++
TIPO II _a	++	++	++			
Beta (nativa)	++	++	++	2.0	mayor	+++
Pre-beta (nativa)	+	+	+	3.5	menor	++

	Suero anti- humano po- livalente	Suero anti- beta lipo- proteína.	Conc. del antíg.	Movi- lidad	Amplitud del arco	Afinidad al Rojo 7B
TIPO III						
Beta (nativa)	+	+	+	1.1	normal	+
Pre-beta (nativa)	+	+	+	3.5	normal o aumentada	++
Beta-anormal (nativa)	++++	++	++	3.5	mayor	++++
TIPO IV						
Beta (nativa)	+	+	+	1.1	menor	+
Pre-beta (nativa)	++	+++	+++	3.5	mayor	+++
TIPO V						
Quilomicrones (no fueron ais- lados)	-	-	-	origen	-	+++++
Pre-beta (nativa)	++	++	+++	3.5	mayor	++
B e t a (nativa)	+	++	+	1.1	normal o disminuida	+

CONCLUSIONES

1. Por lo anteriormente expuesto, podemos concluir que la técnica adaptada por nosotros sí reúne las características adecuadas, para efectuar el estudio inmunoquímico de las fracciones lipoproteicas.

2. El colorante Rojo 7 B presenta ventajas sobre los otros colorantes ensayados.

3. La técnica adaptada es un método semicuantitativo que sí puede utilizarse en el laboratorio de bioquímica clínica especializado como ayuda; ya que abre un campo para la investigación de los trastornos del metabolismo lipídico y diferencia en forma objetiva las fracciones lipoproteicas anormales, como lo demuestran las figuras 11 y 18 correspondientes a los patrones IV y III de Fredrickson.

BIBLIOGRAFIA

- GRUNBAUM, B.W. y ZEC, J.
"Application of an improved Microelectrophoresis technique and immunoelectrophoresis of the serum proteins on cellulose acetate".
Microchemical Journal 7, 41-53, 1963.
- GRUNBAUM, B.W. y DONG, L.
"An improved method for immunoelectrophoresis with cellulose acetate".
Nature 194, 185, 186, 1962.
- ZEC, J.
"Immunoelectrophoresis on cellulose acetate membranes: A method with controlled application of antiserum".
Microchemical Journal 9, 510-521, 1965.
- CAWLEY, L.P.
Electrophoresis and Immunoelectrophoresis
Little, Brown and Company Boston. 1969.
- GRABAR, P. y BURTIN, P.
Immunoelectroforesis
Primera edición en español.
Editorial Toray - Masson, S.A. Barcelona. 1968.

MANUAL BECKMAN

"Model R-103 Immunoelectrophoresis Accessory".
Published by Spinco Division of Beckman Instruments
Inc., Stanford Industrial Park, Palo Alto, California,
1967.

BOYD, W. C.

Fundamentos de inmunología. Segunda edición.
Editorial Universitaria de Buenos Aires.
Argentina. 1963.

HEER, E. E. y MARGNI, R. A.

Electroforesis e Immunoelectroforesis.
Primera edición. Editorial Interamericana. 1971.

FREDRICKSON, D. S., LEVY, R. I. y LEES, R.S.

"Fat transport in lipoproteins an integrated approach
to mechanisms and disorders". The new england
journal of medicine, Vol. 276 No. 1, 34-42, 1967.

BORUT, T. C. y FREDRICKSON, A.

"Immunochemistry heterogeneity of lipoproteins"
Immunochemistry an Internacional Journal, 8,
851-864, 1971.

SHORE, B. y SHORE, V.

"Isolation and characterization of polipetides of human
serum lipoproteins".
Biochemistry Vol. 8, No. 11, 4510-4516, 1969.

CAWLEY, L.P. y MINARD, B.

"Characterization of serum lipoproteins"
Clin.Chem. Acta, 12: 105-110, 1965.

MESSERSCHMIDT, M.J. y SEDES, P.D.

Immunoelectroforesis of lipoproteins in cellogel.
Clinica Chimica Acta 36,51-60, 1972.

BURSTEIN, M.

"Antiserum de lapin immunise contre les lipo proteines humaines de faible densité (1.006-1.063)".
Nouvelle Revue Francaise d' Hématologia, Vol. 12, No. 2
251-257, 1972.

FREDRICKSON, D.S., LEVY, R.I. y LEES, R.S.

"Fat transport in lipoproteins - an integrated approach to machanisus and disorders"
The new england journal of medicine Vol. 276,
No. 2, 94-102, 1967.

BURSTEIN, M., SCHOLNICK, H.R. y MORFIN, R.

"Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polynions".
Journal of Lipid Research 11, 583 - 594, 1970.

BURSTEIN, M.

"Nouvelle technique d' isolement d' anticorps spécifiques et, en particulier, de l' anticorps anti B lipoprotéines"
Vox Sang. 9, 22-24, 1964.

CHIN, H.P., y BLANKENHORSn, D.H.

"Separation and quantitative analysis of serum lipo-protein by means of electrophoresis on acetate".
Clin. Chim. Acta 20: 305-314, 1968.

ACTUALIDADES DIAGNOSTICAS,

Manual Boehringer. 1972.

FREDRICKSON, D. S., LEVY, R.I. y LEES, R.S.

"Fat transport in lipoproteins - an integrated approach to mechanisms and disorders"
The new england journal of medicine Vol. 276, No. 3
148-276, 1967.

BECKERING, R.E. Jr. y ELLEFSON, R.D.

"A Rapid Method for Lipoprotein Electrophoresis using Cellulose Acetate as Support Medium"
Am. J. Clin. Path. 53: 84-88, 1970.

FIESER Y FIESER

Química Orgánica. Cuarta Edición.
Editorial Grijalvo. México 1968.

HARTMANN, G. y WYSS, F. et al

Hiperlipidemias. Aspectos fisiopatológicos, clínicos
y terapéuticos.
Editorial Científico-Médica
México. 1972

SCHNEIDER, W. y BERNDT, H.

Inmunolectroforesis, Método y Atlas.
Primera Edición.
Editorial Médica Panamericana, S. A.
Buenos Aires. 1973.

FISHER, W. and GURIN, S.

"Structure of lipoproteins: Covaleantly bound fatty
acids". Science 143: 362, 1964.

ANUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY

Vol. 41, 1972.

SMELLIE, R. M. S.

"Plasma Lipoproteins".
Biochemical Society Symposium No. 33 held in
University College, London. April. Academic Press,
London (1971).

FERRANS, V.J. and FREDRICKSON, M.D.

"Chylomicrons and the formation of foam cells in the
type 1 hiperlipoproteinemia"
The American Journal of Pathology 70: No. 2
253-261, 1973.

HOUSSAY, F. A.

Fisiología Humana. Cuarta edición.
Editorial El Ateneo. Argentina. 1969.

- LEVY, R.I., LEES, R.S. and FREDRICKSON D.S.
"The Nature of Pre-beta (Very Low Density)
Lipoproteins".
Journal of Clinical Investigation Vol. 45, No. 1
63-76, 1966.
- TIETZ, N: W.
Química Clínica Moderna, Primera Edición en Español.
Editorial Interamericana.
México 1970.
- BLUMBERG, B.S., ALTER, H. J. and ERLANDSON, M.
"Multiple Antigenic Specificities of serum lipoproteins
detected with sera of Transfused patients".
Vox Sang. 9: 128-145, 1964.
- SEEGERS, W., HIRSCHHORN, K. BURNETT.
"Double beta lipoprotein: A new genetic variant in man.
Science 147: 303-304, 1965.
- HARPER, H. A.
Manual de Química Fisiológica. Tercera Edición.
Editorial El Manual Moderno. México 1971.
- LEVY, R.I., FREDRICKSON, D.S. and LASTER.
"The Lipoproteins and Lipid transport in Abetalipo-
proteinemia".
Journal of Clinical Investigation Vol. 15 No. 4,
531-541, 1966.
- FREDRICKSON, D.S., LEVY, R.I. and LEES, R.S.
"Fat transport in lipoproteins An integrated approach to
mechanisms and disorders". The New England
Journal of Medicine. Vol. 276. No. 4, 215-225, 1967.
- FREDRICKSON, D.S., LEVY, R.I. and LEES, R.S.
"Fat transport in lipoproteins - An integrated approach
to mechanisms and disorders". The New England
Journal of Medicine, Vol. 276 No.5, 273-281, 1967.

REBOLLAR, M.J.

"Hiperlipoproteinemia Familiar Tipo V"
Rev. Clin. Esp. 128: 271-276, 1973.

REBOLLAR, M.J., VALOR P., BONILLA, G.

"Hiperlipoproteinemia Familiar Tipo V. Estudio de
dos familias".
Revista Clínica Española, Tomo 128,
No. 4, 299-308, 1972.

FLETCHER, J.M. and STYLIU, M.H.

"A simple method for separating serum lipoproteins
by electrophoresis on cellulose acetate".
Clinical Chemistry, Vol. 16, No. 5, 362-365, 1970.

BABSON, A.L., SHAPIRO, D.O., and PHILLIPS, G.E.

Clin Chim Acta 7: 800, 1962.

BLOOR, W.R.J.

Biol. Chem 24: 227, 1916.

BOEHRINGER MANNHEIM CORPORATION

"Triglycerides, Glycerol and neutral fat, Determination
of glycerol and triglycerides (neutral fat) in serum
(U V - Method with NADH).