



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

“Comparación de los Métodos de Inmunodifusión y
Precipitación con Polianiones para la Determina-
ción Cuantitativa de Beta Lipoproteínas en Suero”.

347

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
p r e s e n t a :
María Elena Pang Chee



Universidad Nacional
Autónoma de México



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
AÑO. 1976
FECHA 14/
CÓDIGO 333



QUIMICA

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE:

Presidentes	Prof. :	FERNANDO VELEZ OROZCO
Vocal	"	RAMON GUEVARA ESTRADA
Secretario	"	DEA CORONADO PERDOMO
1er. Suplente	"	MARIO MIRANDA CASTRO
2o. Suplente	"	ALFREDO GARZON SERRA

Sitio donde se desarrolló el tema:

LABORATORIO DE BIOQUIMICA DEL CENTRO MEDICO "LA RAZA".

Nombre completo y firma del sustentante:



MARIA ELENA PANG-GHEE

Nombre completo y firma del asesor del tema:



DEA CORONADO PERDOMO

A MI ESPOSO :

GREGORIO CON AMOR Y TERNURA

A LA MEMORIA DE MI PADRE:
DN. FELICIANO PANG TANG
Y DÑA. JOSEFINA CHEE VDA. DE PANG.
Con cariño y agradecimiento.

A MIS HERMANOS:
JOSEFINA, FAUSTO, RAFAEL, VICTOR
MANUEL Y MARIA DE LOS ANGELES.
COMO EJEMPLD....

A LOS SRES.:

DN. GREGORIO MARQUEZ RIVERO.

DÑA. CONSUELO CARMONA DE MARQUEZ.

A MIS CUÑADOS :

ALEJANDRO Y ENRIQUE

A TODA MI FAMILIA
Y AMIGOS.

Agradecimiento infinito a la Srita.
Q.F.B Dea Coronado Perdomo por su -
enseñanza y consejos para realizar
este trabajo.

A los Profesores: Q.F.B Fernando Velez Orozco
y Q.F.B. Ramón Guevara Extrada por la ayuda y
orientación brindada a la culminación de la -
tesis.

A los demás miembros del H. Jurado
Y a todos mis maestros que contri-
buyeron a mi formación académica.

Hago patente mi agradecimiento al I.M.S.S. y en especial al - Dr. Pablo Rivera Hidalgo, Jefe del Laboratorio de Bioquímica del Centro Médico "LA RAZA". - Por la oportunidad que me brindaron para realizar esta tesis.

A todas las personas que directa e indirectamente intervinieron - en este trabajo.

INDICE

	Páginas
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	
Historia.	4
Lipoproteínas de baja densidad.	8
Aislamiento, composición y estructura.	8
Aislamiento y propiedades de la porción protéica.	11
Concentración de LBD.	15
Desórdenes metabólicos de las LBD.	17
Otros estudios presentados en las LBD.	18
Hipercolesterolemia sintomática en manifestaciones arterioscleróticas y otras enfermedades.	22
MATERIAL Y METODOS	
Material Biológico.	39
Determinación de Lípidos Totales.	40
Determinación Enzimática de Triglicéridos en suero.	42
Determinación del Colesterol y Esteres.	47
Determinación de Beta lipoproteínas (Método Bioquímico).	50

Determinación Inmunológica de las 8 lipoproteínas por Inmunodifusión en placa.	54
Método rápido para el aislamiento de lipoproteínas del suero humano por precipitación con polianiones.	57
RESULTADOS	62
DISCUSION	73
RESUMEN Y CONCLUSIONES	76
APENDICE	78
BIBLIOGRAFIA	89

I N T R O D U C C I O N

En la actualidad, se ha dado gran interés al estudio de las hiperlipoproteinemias, con el propósito de mejorar el diagnóstico de los trastornos en el metabolismo de los lípidos.

La importancia fundamental en la determinación de las lipoproteínas ha sido reconocida recientemente como un apoyo a la precisión del diagnóstico clínico, siempre que se presenta una dislipoproteinemia.

Se han mencionado dos tipos principales de padecimientos de esta índole: a) Tipo primario ó idiopático, de causa desconocida, --- que probablemente está determinado genéticamente como una enzimopatía congénita, y b) Tipo secundario, sintomático, relacionado con enfermedades metabólicas ó de otro tipo (diabetes, hepatitis, pancreatitis, nefrosis, arterioesclerosis, etc.)

El principal objetivo de esta tesis es el de establecer una comparación cuantitativa del estudio de las Beta lipoproteínas por -- los dos métodos diferentes: 1o.) La Inmunodifusión radial que es un método específico, en donde existe una relación antígeno/anticuerpo, entre la Beta lipoproteína sérica y el suero antibetalipoproteína disuelto en una placa de agar, y en la que resulta un halo de difusión visible y susceptible de medición, que se determina por extrapolación con una curva estándar y el 2o.) La precipitación de las Beta lipoproteínas por medio de polianiones como la heparina, en presencia de un catión bivalente, siendo la precipitación selectiva y completa, sin la necesidad de acudir a ultracentrifugación.

Este estudio se realizó en cien personas, tanto hombres como mujeres clínicamente "sanos" y con edades diferentes, obteniéndose - un patrón de valores de referencia, que se comparó con los valores - obtenidos en el estudio de cincuenta pacientes de diversos padecimientos.

GENERALIDADES

H I S T O R I A

Una de las actividades científicas más sobresalientes hasta la fecha es el estudio de las lipoproteínas, cuyo conocimiento se ha incrementado respecto a su composición, función y metabolismo, lo que nos proporciona bases fundamentales para comprender la etiología y patogenia de sus desórdenes.

Gofman¹ y colaboradores, en 1954, hacen una evaluación del transporte de las lipoproteínas, tanto en personas sanas como en pacientes con trastornos metabólicos y enfermedades arteriales del corazón.

Jencks², 1955, describió la electroforesis en papel, como un método cuantitativo de las lipoproteínas del suero, desarrollando una técnica de tinción apropiada.

Burstein y Samaille³, en 1958, perfeccionan un método de --cuantificación de Beta lipoproteínas, en presencia de CaCl_2 , con una fuerza iónica adecuada, donde la heparina precipita las lipoproteínas de baja densidad del suero de pacientes no lipémicos, siendo un proceso puramente químico y selectivo.

Por medio de electroforesis de papel, Lees y Hatch⁴, en --1963, hacen la separación de las diferentes familias de lipoproteínas, usando un amortiguador con albúmina.

Las características inmunológicas de las Beta lipoproteínas son estudiadas, en 1964, por Walton y Darke⁵. Simultáneamente, Fisher y Gurin⁶ demostraron, con respecto a la estructura de las lipoproteínas, la unión covalente que existe entre la porción peptídica de ellas con los ácidos grasos.

En 1965, Cawley⁷ usa la electroforesis en gel y el método - inmunológico, para establecer la inmunolectroforesis, haciendo comprensible el estudio de las lipoproteínas.

Levy y Fredrickson⁸, en 1966, exponen la relación existente entre las lipoproteínas y el transporte de lípidos en la abetalipoproteí-teinemia, que es un síndrome familiar donde la producción de las Beta lipoproteínas ó Beta apoproteína, se ve afectada por mutación.

Coles y Verheyden⁹ desarrollan la electroforesis de las lipoproteínas en cellogel, usando una técnica de tinción con negro de - sudán, en 1967.

En el mismo año, Fredrickson¹⁰ y colaboradores reportan una revisión completa sobre la estructura, función y metabolismo de las - cuatro familias de lipoproteínas, describiendo los patrones electrofo-réticos correspondientes a cada una de las elevaciones que se presentan.

En 1968, Chin y Blendenhorn¹¹ utilizan la electroforesis de lipoproteínas, cuyo soporte fué acetato de celulosa, con el colorante

rojo oleoso 0.

Un año después, R.G. Houston¹² basado en el método original de Boyle, hace la determinación de las Beta lipoproteínas, modificándolo para aumentar la sensibilidad y estabilizar sus componentes, dando los resultados en mg/ml de sangre, a cambio de las unidades originales K-agar.

En 1970 se publica un método rápido para aislar las Beta lipoproteínas y Prebeta lipoproteínas, por precipitación con polianiones como la heparina y un catión bivalente $MgCl_2$, con sacarosa ó $MnCl_2$ y la precipitación de las Alfa lipoproteínas llevada a cabo con ambos reactivos, ya sea con sulfato de dextrana y $MnCl_2$ ó fosfotungstato de sodio y $MgCl_2$, confirmando M. Burstein¹³ y cols., que el aislamiento de estas lipoproteínas fué libre de la contaminación por otras proteínas, probado por métodos inmunológicos y electroforéticos.

Wilcox, Davis y Deimberg¹⁴, aislaron, en 1971, las principales familias de lipoproteínas del plasma humano usando rotores de zona Ti 14 y Ti 15, en un proceso rápido, cuantitativo y menos laborioso que las técnicas seriadas, obteniéndose lipoproteínas no contaminadas por otras proteínas del suero, evitando lavados extensivos.

En 1972, Freedman¹⁵ y colaboradores cuantifican las Beta lipoproteínas bajo ciertas condiciones y guiándose por el contenido de colesterol, cuya estimación fué comparada con la de Fredrickson favorablemente.

Seidel, en 1973, dá a conocer los últimos avances en las investigaciones de lipoproteínas, enfocando los aspectos bioquímicos y clínicos.

Haciendo una separación electroforética de las lipoproteínas, Gros¹⁷ y cols. usan varios medios de soporte como acetato de celulosa, agarosa y poliacrilamida, haciendo un estudio comparativo de cada una de ellas.

Newall¹⁸ (1973) y Canal J. A.¹⁹, en 1974 hacen una valoración práctica para la determinación de las Beta lipoproteínas por medio de la nefelometría, basado en la propiedad de floculación selectiva, con la adición de sulfato de polisacárido y un catión bivalente, cuya turbidez es medida en el fluonefelómetro.

LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD

Las lipoproteínas de baja densidad, denominadas también como-Beta lipoproteínas por su movilidad electroforética, son las fracciones más abundantes en el plasma humano; sintetizadas por el hígado y quizás también por las células de la mucosa intestinal; su densidad y tamaño - es intermedia entre las lipoproteínas de alta densidad y las lipoproteí-
nas de muy baja densidad. Sobresalen por su alto contenido en coleste-
rol y ésteres, y su importancia fisiológica estriba en términos del - -
transporte del colesterol, tienen gran significación en la patogénesis-
de la aterosclerosis.

AISLAMIENTO, COMPOSICION Y ESTRUCTURA^{21,22.}

Los métodos utilizados para su aislamiento fueron la ultracen-
trifugación, la precipitación y el análisis inmunológico, definiendo el
tipo lipoprotéico al que pertenecen. Mientras mayor es una molécula de-
lipoproteína, más lípidos contiene y menor resulta su densidad y conte-
nido protéico; sólo resultan más ligeros los quilomicrones, que contie-
nen 95 á 98% de lípidos; todas las demás tienen una densidad superior a
la unidad y precipitan cuando se centrifugan en agua; en cambio, si se-
usa solución salina con densidad superior a la propia, flotan, por lo -
tanto, la centrifugación y flotación en soluciones salinas de diferentes
densidades se utiliza para el análisis de las lipoproteínas, reportando
para las Beta lipoproteínas densidades de 1.006-1.063 g/ml, siendo más-

frecuentemente encontrarlas en el rango de 1.019-1.063 g/ml, el contenido de lípidos fué de 75-78%, proteínas de 20-22%, y carbohidratos de 3-5% (fig. 1).

Los primeros que estudiaron el peso molecular de las LBD fueron Toro-Goyco y Bjorkliend-Katz, quiénes reportaron valores de 2.55 - por 10^6 y $2.8-3.0 \times 10^6$, respectivamente.

Por microfotografía electrónica, las Beta lipoproteínas presentan una estructura esférica, con un diámetro aproximado de 200-290-Å, se observa una superficie granular por medio de tinción negativa, y en ocasiones se ha observado una estructura fina.

Pollar y cols.²² determinan una ultraestructura para las lipoproteínas de baja densidad por medio de microscopía electrónica, interpretando imágenes que representan 20 subunidades protéicas globulares, con un diámetro de 50 Å, arregladas en un patrón dodecaedro, con una simetría icosaédrica total. La interpretación estuvo basada en un mapa de isodensidad de tres dimensiones, construido de las microfotografías electrónicas, donde la fosfolipasa C causa la agregación de las LBD, implicando que los fosfolípidos están en la superficie ocupando los lados del dodecaedro y los lípidos, menos polares, ocupan el centro de la molécula.

Forte y Nichols²² sugieren una subestructura filamentosa, posiblemente formando una superficie en forma de red, por la organización de las proteínas y fosfolípidos en las LBD.

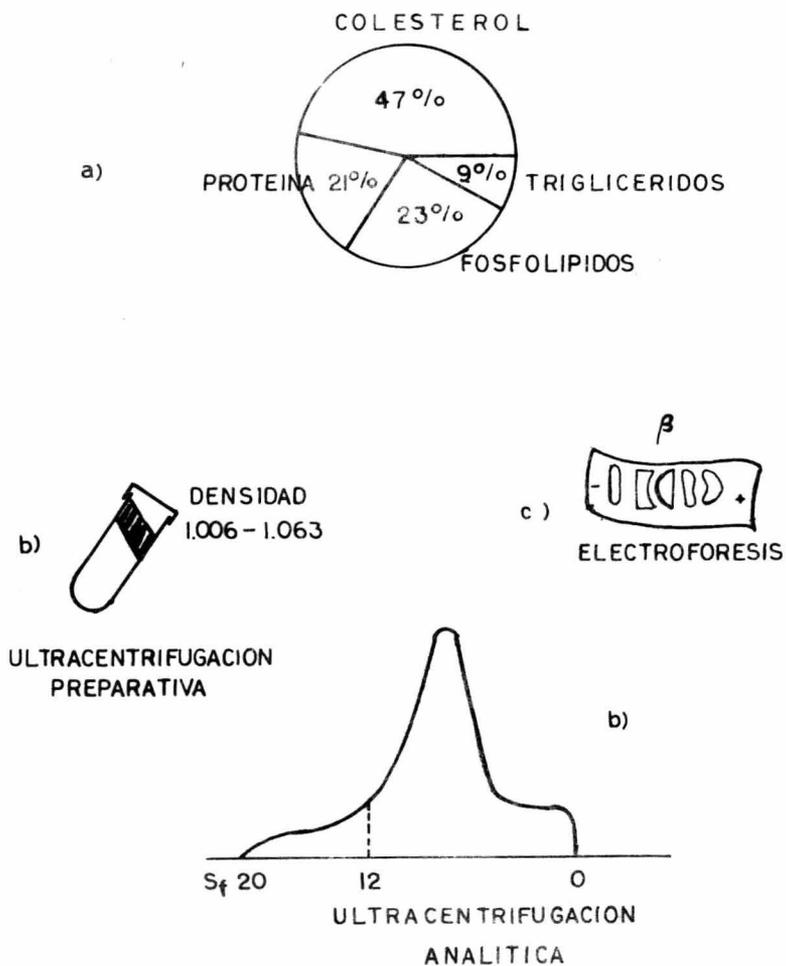


Fig. 1 *
 (a) Composición de las lipoproteínas de baja densidad
 (b) Comportamiento de las Beta lipoproteínas en la -
 ultracentrifugación preparativa y analítica.
 (c) Electroforesis de zona.

(*) Biochemical Society Symposia, Número 33, pag. 20, 1971.

Las lipoproteínas de baja densidad no son de composición estereoquímica constante y ello posiblemente obedece a la debilidad relativa de las fuerzas intramoleculares, permitiendo la extracción de los lípidos menos polares con solventes tales como el éter.

Se observó una disminución en la relación colesterol/fosfolípidos y colesterol/proteínas en personas que recibieron una dieta rica en grasas poliinsaturadas (Spritz y Misbkel 1969), y un decremento del contenido de triglicéridos de LBD en pacientes con hiperbetalipoproteinemia (Slack y Mill²²).

Las interacciones hidrófobas son de gran importancia entre los lípidos y los grupos no polares de algunos aminoácidos; los grupos no polares constituyen el 42% del total de aminoácidos en las LBD (Margolis y Langdon, 1966)²¹.

AISLAMIENTO Y PROPIEDADES DE LA PORCIÓN PROTEICA

Las tres proteínas aisladas de las lipoproteínas del plasma, han sido designadas como Apoproteínas (ApoA, ApoB y ApoC), debido a que se encuentran en el estado libres de lípidos; cada una de ellas difiere por su residuo terminal, contenido total de aminoácidos y el comportamiento inmunoquímico.

Mediante la deslipidación ocurre la formación de pequeños componentes protéicos, que miden la mitad del tamaño que el precursor-

inmediato, por lo tanto el número total de cadenas polipeptídicas es -
parcialmente dependiente del contenido total de lípidos del complejo.

La Apoproteína B contiene el ácido glutámico como N-terminal y la serina como C-terminal y un conjunto de aminoácidos que difieren de la proteína A, particularmente en el contenido relativo de isoleucina, leucina, ácido glutámico y alanina.

Shore²¹, en 1957, establece la clasificación que aparece en la tabla A de otros péptidos menores con respecto a la ApoB:

Cantidad	Aminoácidos
Mayor	Serina (menor en LMBD)
Menor	Treonina (mayor en LAD)
Menor	Alanina (mayor en LMBD)

TABLA A.- Diferenciación de los péptidos -
menores con respecto a la ApoB.

Las ApoLBD se obtienen por extracción de las LBD con solventes orgánicos, por ser insolubles en amortiguadores acuosos, pero se puede alcanzar una completa solubilización en medios acuosos, que contengan sulfato de dodecil sódico, urea y detergentes, hidrocloreuro de guanidina y detergente, titulación a pH 11.5 ó succinilación.

Desde el punto de vista inmunológico, las mejores preparaciones fueron aquellas obtenidas con sales biliares ó detergentes neutrales, cuando son desprovistos de lípidos, se inducen cargas en la morfología y propiedades ópticas de las proteínas LBD.

Si comparamos las LBD con las ApoLBD preparadas por extracción con solventes orgánicos son más susceptibles a cambios en su conformación lo que nos indica que los lípidos intervienen en la estabilización de la estructura proteica.

Existe heterogenicidad en las subunidades ApoLBD, las que tienen dos determinantes antigénicos; por medio de la cromatografía con dietil amino etil (DEAE) se separaron dos fracciones que difieren en su composición de aminoácidos.

El polimorfismo genético de las LBD se muestra en dos aparentes sistemas independientes: el antigénico descrito por Blumberg, Dray y Robinson²¹ (1962) que tiene cuatro pares de variantes que son de interés, no solamente como marcadores genéticos, y la variante LpA que corresponde a una reciente variante LBD conteniendo una movilidad pre-beta atípica con densidad de 1.040 á 1.060 g/ml Beaumont, 1970.²¹

El peso molecular de ApoB varía de 25,000 á 27,000 ó de 36,000 á 38,000; tales variaciones se deben al origen del material y métodos usados para la deslipidación.

Durante muchos años hubo desconcierto con respecto a la homogeneidad antigénica de las lipoproteínas. La heterogeneidad aparente fué debida a la purificación incompleta de las LBD y la reactividad cruzada con alta dosis de lipoproteínas puede ser atribuida a separaciones inadecuadas de las LAD y las LMBD.

Las lipoproteínas de baja densidad muestran otras variantes en su composición:

- 1.- Fredrickson describe una hiperlipoproteinemia denominada como "Beta flotante" ó "Beta amplia", porque la densidad es baja (1.006), debido a su contenido anormal de triglicéridos y la banda es amplia en la electroforesis, extendiéndose de la zona beta a la prebeta.
- 2.- Las lipoproteínas en la mayoría de los pacientes con ictericia obstructiva presentan un alto contenido de fosfolípidos y alta proporción de colesterol libre y esterificado, donde el contenido proteínico comprende ApoC y albúmina.
- 3.- Las hormonas sexuales tienen un pequeño efecto sobre las LBD, los andrógenos tienden a incrementar y los estrógenos a disminuir la proporción de colesterol y proteínas.²¹

CONCENTRACION DE LAS LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD

La concentración de las LBD en plasma está influenciado por el medio ambiente y factores genéticos, sus niveles son comunmente -- elevados siendo heredados como una característica familiar dominante, también hay relación entre el nivel del colesterol en suero y el grupo sanguíneo del sistema ABO (con niveles altos del grupo A).

A partir de la tercera a la sexta década de la vida es fisiológico el incremento de la concentración de las LBD.²¹ Entre los -- factores ambientales más importantes tenemos la dieta diaria, las grasas saturadas aumentan el colesterol y los niveles de LBD (pero no de LMBD). Se elevan cuando la alimentación calórica es sustituida por -- carbohidratos u otras grasas,²¹ en cambio, si se ingieren grasas poliinsaturadas, regularmente baja el colesterol y el nivel LBD. así como los triglicéridos y la concentración LMBD (Beveridge y cols. 1974).

Graudy y Ahrens sugieren que las LBD bajan cuando el colesterol es eliminado del plasma; la concentración de las LBD varía de -- acuerdo al sexo; en los hombres los niveles se elevan durante la segunda a la sexta década, lo que se atribuye al balance andrógeno/estrógeno según Furman y cols. 1967.

El colesterol plasmático tiene una vida media de 58 días en personas sanas (Lewis, Myant 1967), por el contrario por medio del --

marcamiento de proteínas LBD con ^{131}I ó S-cistina se encontró que tienen una vida media de 3.5 á 7 días, siendo la relación bajísima posiblemente debido a la recirculación del colesterol entre el plasma y -- los depósitos extravasculares como el hígado e intestino delgado, mientras que las apoproteínas son más rápidamente catabolizadas y reemplazadas:

El colesterol de las LBD se deriva de diversas fuentes:

- a).- El colesterol endógeno proviene del hígado, intestino delgado y -- por síntesis cutánea (myant, 1968).
- b).- El colesterol de la dieta en forma esterificada es transportado -- en quilomicrones al intestino delgado, el cuál pierde su complemento de grasas dietéticas cuando está expuesto a la lipasa lipoprotéica, pasando a través de los capilares hasta llegar al tejido adiposo y muscular (Redgrave, 1970)/
- c).- La tercera fuente inmediata de colesterol es el no esterificado -- procedente de muchos tejidos periféricos, el cuál requiere del hígado para ser metabolizado ó excretado.

Como el 65-70% del colesterol del plasma está esterificado, -- una de sus principales fracciones viene del ácido linoléico (Lewis, -- 1968).²¹

DESORDENES METABOLICOS DE LAS LBD

La hiperbetalipoproteinemia es una de las hiperlipidemias -- más comunes debido a algún defecto en el catabolismo de las LBD (Quintao y cols. 1971), y se ha comprobado que uno de los mecanismos reguladores por el cuál el hombre responde a un incremento en la toma del colesterol de la dieta, es la excreción fecal de esteroides neutros, por lo tanto, es concebible que en la hiperbetalipoproteinemia primaria la presencia de esteroides fecales es normal y que la hipercolesterolemia puede dañar el catabolismo de las beta lipoproteínas.

En el hipotiroidismo, se presenta una concentración alta de LBD, y Wietlienen (1968) reporta una reducción de la excreción fecal - de esteroides neutros por la administración de la hormona tiroidea.

La aterosclerosis es una enfermedad de etiología múltiple -- que resulta de varias lesiones metabólicas, y la concentración elevada de LBD parece ser una de las causas importantes.

La síntesis de inhibidores de proteínas, tal como la puromicina, causan la acumulación de lípidos en el intestino y en las células hepáticas y por lo tanto inhiben la síntesis ó la liberación de las lipoproteínas del plasma.

OTROS ESTUDIOS PRESENTADOS EN LAS LBD

La modificación química de los grupos funcionales en las LBD ha sido usada para definir las propiedades superficiales de las partículas. Margolis y Langdon observaron tres tipos de grupos reactivos:

- 1.- Grupos con reactividad completa con respecto a la cadena de las lipoproteínas nativas (grupo amino).
- 2.- Grupos con reactividad limitada en las LBD nativas y las LBD deslipidadas (histidina y tirosina).
- 3.- Grupos de reactividad limitada en LBD nativas, pero con reactividad incrementada después de la deslipidación (grupos disulfuros).

La succinilación de las Beta lipoproteínas ha sido usada en diversos laboratorios, la reacción no afecta a la composición química, la hidrodinámica ni a las propiedades ópticas ó morfológicas de las -- mismas. Las LBD succiniladas no son precipitadas por polianiones como sulfato de amilopectina, sulfato de dextrana ó heparina, y reaccionan con antisueros antiLBD y anti-ApoLBD.

Otros estudios hechos como la metsinación, acetilación dia--zoación, guaninación, amidación, reducción y alquilación, se han utili-- zado para modificar las LBD, aunque las propiedades fisicoquímicas de-

los productos resultantes no se han comparado cuidadosamente.

La información de interés estructural fué obtenida de estudios acerca de la degradación enzimática de las LBD, el ácido siálico es liberado por la neurominidasa casi cuantitativamente, sugiriendo - que ocupa una posición terminal en la cadena de los carbohidratos en la superficie de la molécula y es probable que no esté involucrado en la unión lipídica.

Con respecto a las enzimas lipolíticas tenemos la fosfolipasa A, que fué encontrada al hidrolizar más del 97% de lecitina.

En presencia de albúmina bovina, de fosfatil dietanolamina y fosfatil diserina, se observó una reacción cinética de primer orden, con un producto con propiedades hidrodinámicas, inmunológicas y morfológicas similares a las LBD nativas. Tales resultados sugieren que -- los fosfolípidos están cerca de la superficie de la molécula y que la unión 2-éster no es de vital importancia para la estabilidad de las - Beta lipoproteínas.

Otro experimento hecho sugiere que los fosfolípidos ocupan la parte superficial de la molécula, debido a que la fosfolipasa C y D fueron encontradas después de la agregación de las LBD incubadas -- por un período corto; tal agregación se evita cambiando la carga superficial de la partícula, por succilación.

Las enzimas proteolíticas producen una digestión parcial de las porciones proteicas de las LBD, y la consecuencia estructural, es una función del tiempo de hidrólisis expresándose como un aumento en la solubilidad de los lípidos ó acelerando la velocidad de flotación.

T A B L A B

ESTADOS DE DEFICIENCIA EN LAS BETA LIPOPROTEINAS*

ENFERMEDAD	FOSFOLIPIDOS mg/dl	COLESTEROL mg/dl	GLICERIDOS mg/dl	DETERMINACIONES Y EXAMENES ADICIONALES.
ABETALIPOPROTEINEMIA Características clínicas: Retraso del crecimiento y mala absorción en la infancia. Déficit neurológico progresivo en la infancia tardía.	35-95	20-90	0-20	Acantocitosis en la sangre periférica; Biopsia hepática e intestinal revelan células espumosas y vacuoladas; la electroforesis lipoprotéica muestra la ausencia de Beta lipoproteínas.
HIPOBETALIPOPROTEINEMIA Características clínicas: Dificultades neuromusculares progresivas en la vida adulta.	75-190	60-170	15-75	Prueba de fragilidad eritrocítica; estudios de absorción intestinal; la electroforesis lipoprotéica revela deficiencia de Beta lipoproteínas.

* Tomados de los datos de D.D. Fredrickson, R.I. Levy y R.S. Lees: Fat-Transport in lipoproteins an integrated approach to mechanisms and disorders. New Eng. J. Med. 276:34,94, 1967.

HIPERCOLESTEROLEMIA SINTOMÁTICA EN MANIFESTACIONES ARTERIOSCLERÓTICAS Y OTRAS ENFERMEDADES.^{21,22}

Los niveles elevados de colesterol y Beta lipoproteínas son vistos frecuentemente en trastornos circulatorios de naturaleza arteriosclerótica, cuya aparición simultánea dá dos lesiones principales: la placa rica en lípidos y el espesamiento fibroso. Estos fenómenos - conducen a: isquemia del corazón; del sistema nervioso central; de -- las extremidades, y de otros sistemas orgánicos, existiendo completa- asociación a trombosis que llevan a la obstrucción total de vasos san- guíneos.

La relación estrecha entre la arteriosclerosis e hiperlipi- demias se manifiesta por:

- 1.- Los lípidos forman uno de los dos componentes principales de la - lesión arteriosclerosa.
- 2.- El colesterol esterificado es cuantitativamente la parte más impor- tante, en su mayoría procede casi por completo de las lipoproteí- nas de la sangre.
- 3.- Una correlación positiva entre la hiperlipidemia y la enfermedad- cardíaca coronaria, como un síntoma esencial de la arteriosclero- sis humana, ejemplo angina de pecho e infarto de miocardio por - alteraciones coronario-arterioscleróticas antes de los 15 años de edad, en la hipercolesterolemia familiar acompañada con xantomato- sis.

4.- En animales se pueden reproducir lesiones arterioscleróticas mediante una hipercolesterolemia inducida dietéticamente y de duración -- prolongada; en estos casos, la fibrosis, las calcificaciones, las - proliferaciones vasculares, las hemorragias y la trombosis son consecuencia del ateroma que engendra la fibrosis.

5.- El papel central que juegan los lípidos séricos en forma de hiperlipidemias (dislipidemias).

En la hiperlipidemia aterogénica se elevan: el colesterol, - las lipoproteínas de baja densidad; los lípidos postprandiales; los tri glicéridos, y los fosfátidos. Clínicamente se encuentran xantomas cutáneos ó tendinosos (xantelasmas y arcos lipóideos); el aspecto del suero es claro ó lechoso. Su estudio se basa en la separación de lipoproteínas por medio de la electroforesis, análisis de las mismas por flotación, - prueba oral de la tolerancia de lípidos con una sobrecarga de vitamina-A y la comprobación eventual de la respuesta dietética a cambios en el contenido de grasas e hidratos de carbono en la alimentación.

En la aterogénesis existen dos teorías contradictorias:

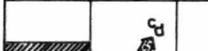
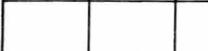
- a).- La infiltración lipídica, en la cuál los lípidos precedentes de la sangre se acumulan progresivamente en la pared arterial.
- b).- La teoría de la degeneración, donde la alteración primaria se realiza con elementos de la propia pared arterial.

Sin embargo, ambos conceptos se resumen en una teoría conjunta, basada en que normalmente las lipoproteínas y el colesterol pasan de la sangre a la pared arterial, deduciendo de ello que:

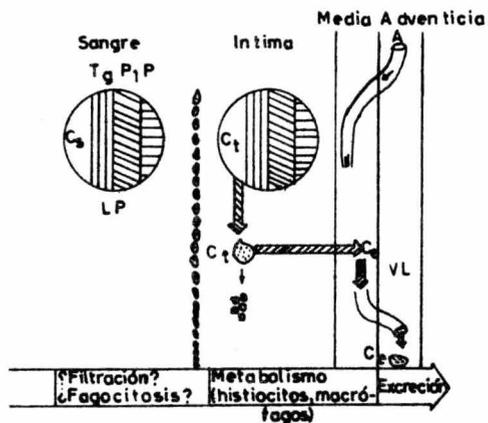
- i).- Hay una excreción del colesterol ó de sus metabolitos (en forma esterificada) a través de vena y vasos linfáticos de la adventicia.
- ii).- Los depósitos de colesterol en las arterias (no están capacitadas para la síntesis), se deben a la transferencia (t) y a la excreción (e); como se supone que la capacidad de excreción es limitada, existe un máximo de excreción (C.e.m.) describiéndose los motivos que llevan a la formación del ateroma (esquemas 1 y 2).

La cantidad de colesterol excretado (C.e.) corresponde a la cantidad cedida desde la sangre a la pared arterial (C.t.) si no hay depósitos de colesterol (C.d. = 0). Por el contrario, cuando se producen los depósitos, el C.e. disminuye hasta ser más pequeño que C.t., ó bien cuando C.t. se incrementa y supera a C.e.m., siendo el mismo resultado en ambos casos, la formación del ateroma y el mecanismo fundamental sería diferente: El metabolismo alterado en el primer caso --- (C.e. < C.t.), y el desbordamiento del metabolismo normal de la arteria, por excesiva entrada de colesterol desde el espacio intravascular y en el segundo caso (C.t. > C.e.m.).

La alteración de C.t. depende del colesterol del suero e incrementado es la unión entre la hipercolesterolemia y arteriosclerosis, también C.t. variará de acuerdo con el vehículo colesteroínico aclarando las diferencias entre el poder aterógeno de las hiperlipidemias intensas, y quizás el papel de los complejos antígeno/anticuerpo en las hiperlipidemias por autoanticuerpos. Y por último dependerá de las condiciones de presión sobre las relaciones entre la hipertensión y ateroma.

Sangre	Arteria	Sangre	
C_s	C_t	C_e	Transfer. normal $C_e \leq C_{em}$ $C_e = C_t$
			Arteriosclerosis $C_s \nearrow$ $C_t > C_{em}$
			Arteriosclerosis $C_{em} \searrow$ $C_e < C_t$

Esquema 1 C_s = colesterol sanguíneo
 C_t = colesterol que penetra en la pared arterial
 C_{em} = excreción máxima de colesterol
 C_e = colesterol eliminado a través de venas y vasos linfáticos.
 C_d = Cantidad almacenada



Esquema 2 LP = Lipoproteínas
 Tg = Triglicéridos
 Pl = Fosfátidos.
 P = Parte protéica
 Cs, Ct, Ce (véase esquema 1)
 A = Arteria
 VL = Venas, linfáticos.

Los factores que influyen sobre C.e.m. son menos conocidos - pero la causa de la disminución de la misma es debido a oscilaciones - de la presión, microtrombosis parietales, flujos hormonales sobre las células arteriales, anticuerpos, influjos físicos y químicos y aquí reside la clave de la inmunidad relativa del sexo femenino puesto que -- los estrógenos influyen favorablemente sobre el metabolismo lipídico - de las células mesenquimales.

Estos esquemas hacen comprensibles el papel de la hipercolesterolemia, así como la posibilidad de una arteriosclerosis sin colesterol elevado, y la colaboración de diversos factores en la aterogénesis humana.

En las enfermedades como hipotiroidismo, nefrosis y cirrosis biliar están asociados con la elevación de los niveles de colesterol, esto se indica en la tabla C.

T A B L A C

ENFERMEDAD	TRIGLICERIDOS/LIPOPROTEINAS	COLEST./LIPOPROTEINAS
Hipotiroidismo	++ / PreB y Qms.	+++ / Beta
Sínd. Nefrótico	++++ / PreB	++ / Beta
Embarazo	+++ / PreB	++ / Beta

Lípidos séricos y lipoproteínas en las hiperlipidemias secundarias.

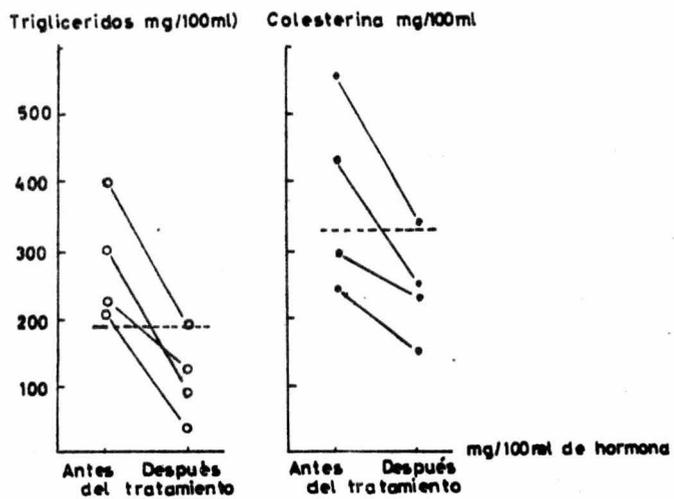
En hipotiroidismo se eleva la relación del colesterol/triglicéridos, donde los niveles lipídicos se normalizan mediante un tratamiento eficiente con la hormona tiroidea especialmente en el mixedema, por lo tanto es útil para el diagnóstico y como una medida terapéutica eficaz. (fig. 2).

Investigando la causa y patogenia de la hiperlipidemia nefrótica, se rechaza la posibilidad de una alteración primaria del metabolismo de grasas como motivo principal del síndrome nefrótico, y, parece que la elevación de grasas sanguíneas se encuentra en la relación con la pérdida de albúmina y de otras sustancias plasmáticas (fig. 3).

Según Baxter (1961) la relación entre la concentración de albúmina y colesterol es inversa, y por medio de infusiones de albúmina hay una mejoría clara en la hiperlipidemia (fig. 4).

El principio patogénico de la hiperlipidemia nefrótica se cree que es una alteración del sistema lipoproteín-lipasa, perdiéndose la enzima en la orina y existiendo un déficit del receptor de ácidos grasos (albúmina) ó la presencia de inhibidores ó resistencia del sustrato (Roseman y cols.).

Svanborg (1951) explica que la hiperlipidemia nefrótica es una anomalía renal del metabolismo lipídico con alteraciones en el curso de procesos enzimáticos del riñón, en cambio, otros postulan la desaparición de una sustancia antilipidémica producida por el riñón ó la producción por el riñón nefrótico de un agente hiperlipidemiante.



----- Límite superior de la zona normal
(50 a 59 años).

Fig. 2 Acción de la hormona tiroidea sobre lípidos séricos en pacientes con mixedema (O'Hara y cols. 1966).

Se encuentran, entre el metabolismo lipídico y el de los carbohidratos, interrelaciones estrechas donde los puntos básicos son la glucosa y los ácidos grasos libres, que se explican en las figs. 5, 6 y 7. Los diabéticos tienen elevados los ácidos grasos libres que proporcionan el sustrato para la formación de prebeta lipoproteínas y los triglicéridos están incrementados.

La cetoacidosis originan hiperlipidemias con aumento de triglicéridos y quilomicrones que a su vez está ligado a un defecto del metabolismo de carbohidratos, es reversible inducida por grasas con actividad disminuida de la lipoprotein-lipasa por falta crónica de insulina que responde rápidamente al tratamiento con la misma (hiperlipidemia adquirida en la diabetes descompensada).

En cambio en la diabetes lipopatrónica son personas insulino-resistentes con atrofia generalizada en el adipocito presentando hepatomegalia, escasa cetosis y típica hipertrigliceridemia.

En la hepatitis de diversas etiologías se presentan diferentes tipos de hiperlipidemias, así, en las hepatopatías por cirrosis biliar se forman Beta lipoproteínas anormales, con un aumento elevado de triglicéridos y disminución de péptidos, apareciendo xantomas planos y nodular-tuberosos.

Una hiperbetalipoproteinemia con aumento de colesterol y fosfolípidos con un decremento de las Alfa lipoproteínas se debe a una hepatosis colostásica. El síndrome de Zieve muestra como síntomas princi

pales hiperlipidemia, acompañada de ictericia y de anemia hemolítica - por lo tanto, hay un aumento de tamaño del hígado y las concentraciones de bilirrubina, de fosfatasa alcalina y de transaminasas, están incrementadas.

Por último, tenemos hipertrigliceridemia, con dolores agudos abdominales, debida a una pancreatitis aguda, presentando en algunos - casos el colesterol normal.

COLESTEROL mg / 100ml

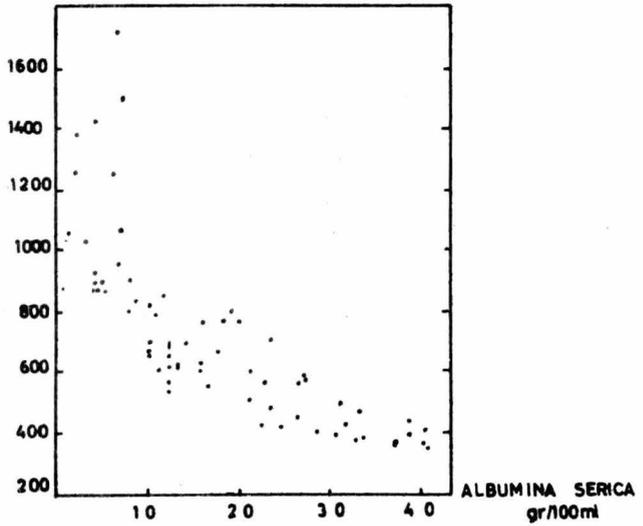


Fig. 3 Relación entre colesterol y albúmina en el síndrome nefrótico.

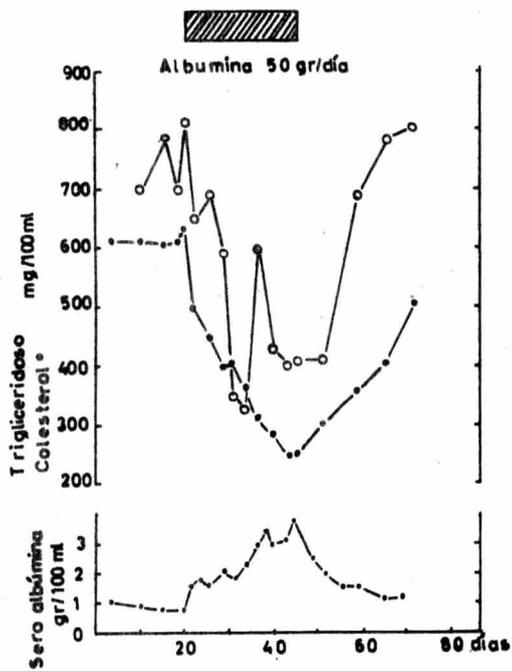


Fig. 4 Relación entre infusiones de albúmina y lípidos séricos en un paciente con síndrome nefrótico, (Baxter).

NORMALIDAD

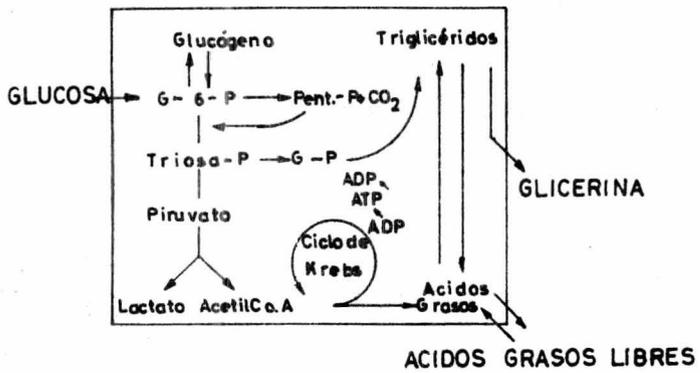


Fig. 5 Vías principales del metabolismo graso e hidrocarbonado en una célula grasa en actividad basal.

EFEECTO INSULINICO

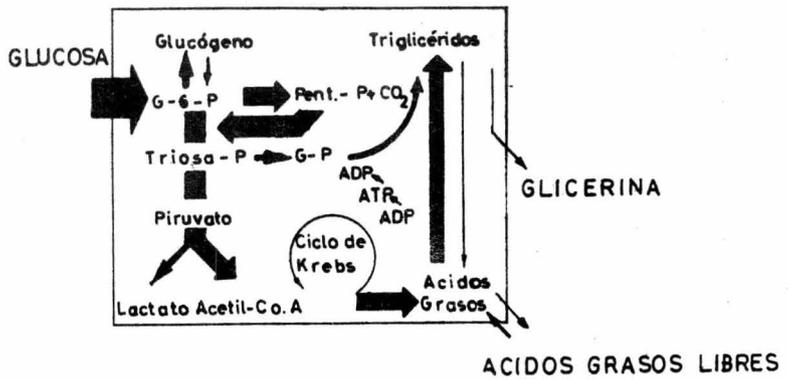


Fig.6 Vías principales del metabolismo graso e hidrocarbonado bajo la acción de la insulina.

DIABETES

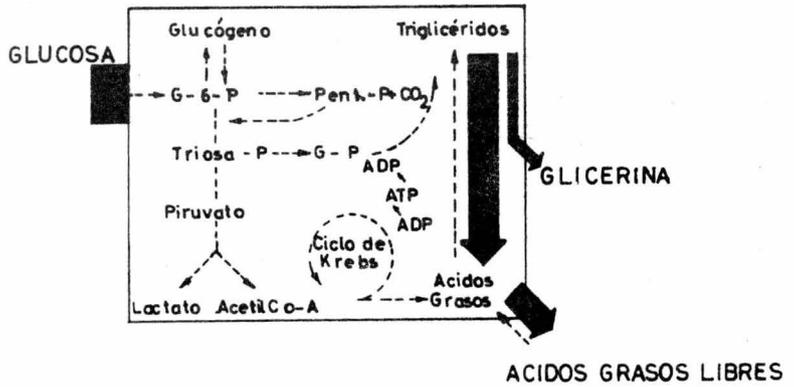


Fig. 7 Vías principales del metabolismo graso e hidrocarbonado en carencia ó inactividad de la insulina.

Nota : El grosor de las flechas corresponde a la velocidad de la reacción metabólica correspondiente (Jeanrenaud).

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO.- Se analizaron cien sueros de personas aparentemente sanas, cincuenta y cinco del sexo femenino y cuarenta y cinco del sexo masculino con edades que fluctuaron entre los 13 y 60 años, con abstención alimenticia de 8 á 12 horas.

Estas muestras fueron seleccionadas por un análisis cuantitativo completo que comprendió las determinaciones de Lípidos totales, Triglicéridos, Colesterol total y esterificado.

Después de verificar que dichas muestras caían dentro de los límites normales establecidos se prosiguió a la determinación de las Beta lipoproteínas por el método de Inmunodifusión radial simple y por precipitación con heparina más un catión bivalente, (M. Burs-tein).

Los datos obtenidos de estas valoraciones sirvieron para establecer una tabla de valores normales en el contenido de Beta lipoproteínas y de colesterol de una población que en su mayoría procede del personal del Centro Médico "La Raza".

Por otra parte se estudiaron cincuenta sueros de pacientes con diferentes diagnósticos como : Hepatitis, Diabetes y pancreatitis, con las mismas determinaciones y técnicas usadas por los sujetos "sanos".

DETERMINACION DE LIPIDOS TOTALES.- TECNICA DE N. ZOLLNER Y K. KIRSCH.²⁵

Fundamento: Se calienta el suero sin desproteinización previa con ácido sulfúrico concentrado para efectuar la hidrólisis lipídica. A continuación se trata con reactivo de ácido fosfórico vainillina, en esta reacción, los lípidos del suero, - producen un color rosado que se determina fotométricamente y la concentración de lípidos totales en suero se obtiene comparando con la solución patrón.

Mat. Biológico. Suero sanguíneo.

Aparatos: Espectrofotómetro Coleman Jr. II.

Material: Tubos de 13 x 100 mm.
Pipetas de 2,5 y 10 ml.
Micropipetas de 0.050 ml.

Reactivos: (1) Reactivo de color: ácido fosfórico 11.9 M y vainillina 8 mM.
(2) Solución patrón de lípidos concentración de 1000 mg/dl.
(3) Acido sulfúrico 95-97%.

Técnica: Pipetear en tubos marcados lo siguiente:

	Problema	Patrón	Blanco
Suero	0.05 ml	--	--
Sol. Patrón (2)	--	0.05 ml	--
H ₂ SO ₄ (3)	2.0 ml	2.0 ml	--

Mezclar perfectamente; calentar los tubos durante 10 minutos en agua - hirviendo; dejar enfriar durante 5 minutos en agua fría; medir de esta mezcla reactiva en tubos limpios:

	Problema	Patrón	Blanco
Mezcla reactiva	0.1 ml	0.1 ml	--
H ₂ SO ₄ (3)	--	--	0.1 ml
Reac. de color (1)	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml

Mezclar y medir después de 40-50 minutos la absorbancia de los problemas y del patrón contra el blanco de reactivos.

Longitud de onda óptima : 530 nm.

Filtro: 510-560 nm.

Espesor de la celdilla: 1 cm.

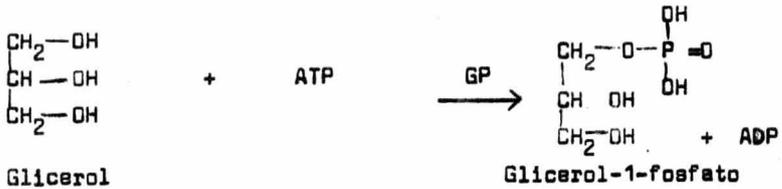
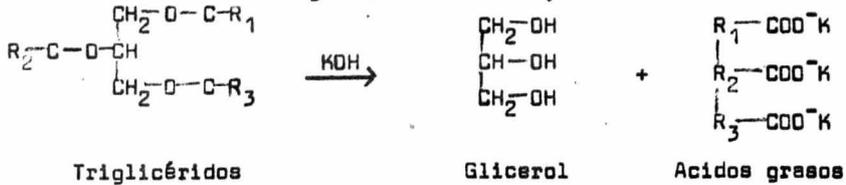
$$\text{Cálculos: mg/dl de Lípidos totales} = \frac{A_{\text{problema}} \times 1000}{A_{\text{patrón}}}$$

A = Absorbancia

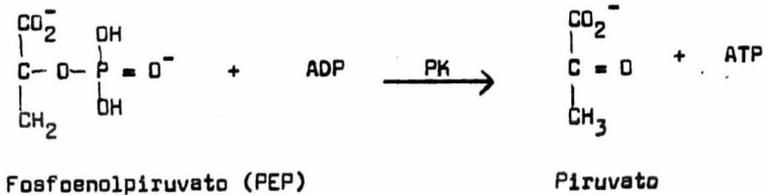
VALORES DE REFERENCIA: 600-1000 mg/dl.

DETERMINACION ENZIMATICA DE TRIGLICERIDOS EN SUERO.- TECNICA DE M. --
EGGSTEIN Y F. H. KREUTZ.²⁶

Fundamento: Los triglicéridos son hidrolizados por saponificación en -
ácidos grasos y glicerol libre, este fosforilado con ATP en
una reacción enzimática, catalizada por glicerocinasa (GK),
resultando glicero-1-fosfato y ADP :



En una reacción auxiliar con la enzima piruvatocinasa (PK), el ADP ----
reacciona con el fosfoenolpiruvato para transformarse en ATP y piruvato.



5.- Solución etanólica de KOH 0.5N (hidróxido de potasio 3.3 g, agua - bidestilada 10 ml, etanol c.b.p. 100 ml).

6.- Sulfato de magnesio 0.15 M ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$).

PROCEDIMIENTO:

SAPONIFICACION DE TRIGLICERIDOS:

Pipetear en tubos de centrifuga:

Suero	0.20 ml
Potasa alcoholica	0.50 ml

Mezclar, tapar los tubos, incubar entre 55-70° C por 30 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente, y agregar:

Sol. de $MgSO_4$	1.0 ml
------------------	--------

Mezclar y centrifugar.

DETERMINACION DEL GLICEROL LIBERADO:

Pipetear en celdillas 10 x 75 mm:

Solución (1)	1.0 ml
Solución (2)	0.05 ml
Sobrenadante	0.20 ml
Suspensión (3)	0.01 ml

Mezclar y dejar reposar 10 minutos y leer la absorbancia contra blanco de aire (A_1) a 365 nm y añadir:

Suspensión (4)	0.01 ml
Volumen total	1.27 ml

Mezclar y leer a los 10 minutos la absorbancia contra el blanco de aire (A_2) a 365 nm.

$$\Delta A = A_1 - A_2$$

Nota: Todas las cantidades tomadas son para la determinación "semimicro"

CALCULOS: GLICEROL TOTAL = GLICEROL DE TRIGLICERIDOS+GLICEROL LIBRE

$$\text{Glicerol total} = \frac{A \times V \times PM}{C.a. \times D \times V_m} \times 8.5$$

ΔA : Diferencias de lecturas

V : Volumen final del micrométodo 1.27 ml

PM : Peso molecular del glicerol = 92

C.a. : Coeficiente de absorción $6.22 \text{ cm}^2/\text{micromol}$ a 340 nm

D : Paso de luz = 1 cm.

V_m : Volumen de la muestra 0.2 ml (micromuestra)

8.5 : Es el factor de dilución de la muestra debido a la saponificación que resulta de:

$$\frac{0.2 + 0.5 + 1.0}{0.2} = 8.5$$

El factor para glicerol total derivado de la fórmula es = para 340 nm

$$\Delta A \times 78.6 = \text{mg/dl de glicerol total}$$

mg/dl de TRIGLICERIDOS = (mg/dl de glicerol total - 1 mg/dl de glicerol)
x 9.62

El factor 9.62 se deriva de la relación Peso molecular de triglicéridos
(885) entre el peso molecular del glicerol (92) .

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

El glicerol libre se determina usando la fórmula para glicerol total -
pero sin multiplicar por 8.5 puesto que no hay dilución en la muestra -
a 340 nm $\Delta A \times 9.3 =$ mg/dl de glicerol libre.

VALORES DE REFERENCIA DE TRIGLICERIDOS = 74 - 172 mg/dl.

DETERMINACION DEL COLESTEROL Y ESTERES.--(METODO DE BABSON SHAPIRO Y -- PHILLIPS).²⁷

Fundamento: El acetato de etil-estanol extrae el colesterol del suero, que con gel de hidróxido de aluminio absorbente elimina la interferencia de la bilirrubina y el extracto centrifugado reacciona con el cloruro férrico y H_2SO_4 para dar una coloración amarilla parduzca que es lineal hasta 500 mg de colesterol/100 ml, determinándose simultáneamente los ésteres con la adición de digitonina para formar el digitónido correspondiente.

Material -

Biológico: Suero sanguíneo, plasma ó sangre total.

Material: Fotocolorímetro

Baño de agua fría

Centrífuga

Pipetas de 5 y 10 ml

Micropipetas de 0.100 y 0.250 ml

Tubos de 13 x 100 y 18 x 150 mm.

Reactivos: a) Reactivo de extracción.- Mezclar volúmenes iguales de acetato de etilo, grado analítico, y estanol grado analítico. El acetato de etilo debe estar libre de ácido acético y el estanol debe ser absoluto, debido que el agua y el ácido acético impiden la adsorción de la bilirrubina por el gel de aluminio.

- b) Gel de aluminio ($Al(OH)_3$)
- c) Acido sulfúrico Q.P.
- d) Reactivo de color: disolver 100 mg de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ en 100 ml de acetato de etilo grado reactivo, (proteger el cloruro férrico de la luz).
- e) Solución patrón en suero para colesterol sérico elevado.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Marcar tubos de ensayo 13 x 100 mm, para el blanco de reactivos, - el patrón, y los sueros problemas.
- 2.- Colocar 3.0 ml de reactivo de extracción en cada tubo.
- 3.- Añadir 120 mg de $Al(OH)_3$ en cada tubo.
- 4.- Añadir 0.2 ml de suero (0.2 ml de sol. (e) para el patrón y 0.2 ml de agua para el blanco); tapar, agitar enérgicamente y dejar reposar por lo menos dos minutos para que se efectúe la adsorción, invertir cuando sea necesario para mantener la suspensión.
- 5.- Centrifugar a velocidad moderada durante 2 á 3 minutos.
- 6.- Tomar 0.5 ml del extracto de cada tubo, y agregar 2.5 ml del reactivo de color a cada uno; mezclar.
- 7.- Añadir 2.0 ml de ácido sulfúrico concentrado, mezclar perfectamente y dejar enfriar.

8.- Leer la absorbancia del patrón y del problema en longitud de onda a 550 nm contra blanco de reactivos.

Para determinar simultáneamente los ésteres del colesterol y colesterol total: Añadir los siguientes pasos después del No. 6 del procedimiento anterior.

6a.-Después de retirar una ó mas partes alícuotas de cada tubo para de terminar colesterol total, añadir 7 mg de digitonina con una pequeña espátula a cada tubo de extracción incluyendo el blanco, tapar - y agitar durante 20 segundos para precipitar el colesterol libre -- como digitónido.

6b.-Centrifugar.

6c.-Tomar 0.5 ml de extracto de cada tubo, y agregar 2.5 ml de reactivo de color, dentro de tubos marcados y mezclar.

Para determinar colesterol total: se usan los valores de los ésteres del colesterol del patrón en los cálculos.

Para determinar colesterol libre: restar el valor de los ésteres del colesterol del valor del colesterol total.

$$\text{CALCULOS: mg/dl de Colesterol} = \frac{A \text{ suero prob.}}{A \text{ del patrón}} \times \text{mg/dl patrón.}$$

VALORES DE REFERENCIA: COLESTEROL total : 125 á 250 mg/dl.

COL. ESTERIF. : 50 al 75% del Colest. total.

DETERMINACION DE BETA LIPOPROTEINAS.- METODO BIOQUIMICO²⁸ *

Fundamento : Las Beta lipoproteínas son precipitadas con heparina y --
CaCl₂, puesto que contienen alrededor del 35% de colesterol, es determinado dicho contenido por la combinación con el anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado para -
formar una solución verde azulosa (Reacción de Liebermann).
Y la intensidad de la coloración es proporcional al contenido de colesterol, y por lo consiguiente también al cont
nido de Beta lipoproteínas.

Material

Biológico: Sueros frescos libre de hemolisis.

Aparatos:

Espectrofotómetro ó fotocolorímetro.

Baño de agua de 20-25° C.

Centrífuga clínica.

Material

Tubos de 13 x 100 mm

Pipetas de 2 y 5 ml.

Micropipetas de 0.050 ml.

Reactivos:

1) Sol. patrón de colesterol 200 mg de colesterol por 100 ml de ácido acético glacial).

2) Sol. de cloruro de calcio-heparina (25mM de CaCl₂, --- 0.0125 mg/dl de heparina, 3.8 mM de NaCl).

3) Reac. de colesterol (50mM de ácido dimetilbenzosulfónico, 7.0 M de ácido acético, 6.5 M de anhídrido acético).

4) Acido sulfúrico Q.P.

PROCEDIMIENTO: En tubos limpios pipetear los siguientes:

Suero Problema	0.05 ml
Sol. CaCl_2 /heparina	2.0 ml

Mezclar perfectamente y reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 3000 rpm por 15 minutos, separar el sobrenadante cuidadosamente y desecharlo, eliminar cualquier sobrenadante residual por escurrimiento sobre una hoja de papel filtro seco y utilizarlo como el tubo problema, obtenido en el paso anterior.

	Blanco	Patrón	Problema
Agua destilada	0.05 ml	-	-
Sol. Patrón de Colest.	-	0.05 ml	-
Sol. React. de colest.	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml

Mezclar y reposar todos los tubos en un baño de agua a 20-25°C durante 5 minutos y adicionar 0.50 ml de ácido sulfúrico Q.P. a todos los tubos mezclar rápidamente y dejar en un baño de agua por un lapso de 10 minutos, vaciar a celdillas secas y medir la Absorbancia de la muestra - - (A_{muestra}) y del patrón ($A_{\text{patrón}}$) contra el blanco de reactivos.

Nota.- Para determinaciones arriba de 1700 mg/dl de Beta lipoproteínas se hacen diluciones con 0.2 ml de suero más 0.2 ml de sol. salina fisiológica tomando de esta mezcla 0.05 ml y el resultado final por dos.

* Equipos comercializado Boehringer TC-Lp cat. No. 15945 TLAG para -
(25-50 determinaciones).

Longitud de onda: 560-580 nm

Celdillas de vidrio: 1 cm.

Temperatura: 20-25° C.

CALCULOS:

$$\text{mg/dl de Beta lipoproteínas} = \frac{A_{\text{problema}}}{A_{\text{patrón}}} \times 570$$

$$\text{mg/dl de Colest. de B Lipoprot.} = \frac{A_{\text{problema}}}{A_{\text{patrón}}} \times 200$$

A = Absorbancia.

Esta determinación está basada sobre el contenido de colesterol de las Beta lipoproteínas, el factor 200 representa la concentración en mg/dl de colesterol-patrón y el factor 570 usado para los cálculos de las Beta lipoproteínas es derivado de la siguiente manera: Puesto que las Beta lipoproteínas contienen aproximadamente el 35% de colesterol y los-200 mg/dl del colesterol-patrón son equivalentes al factor 570 mg/dl de las Beta lipoproteínas.

$$\begin{array}{l} 35\% \text{ colest.} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 100\% \text{ de Beta lipoprot.} \\ 200 \text{ mg/dl patrón} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad \times \end{array}$$

X = 570 mg de Beta lipoproteínas.

VALORES DE REFERENCIA: 360 á 640 mg/dl de Beta lipoproteínas en suero.

Nota.- Disolver completamente el precipitado después de la adición del ácido sulfúrico, cuidando que la temperatura no suba pues el colesterol es muy sensible, cuando se trata de sueros hiperlipémicos es imposible precipitar las Beta lipoproteínas aunque se hagan diluciones de dichos sueros.

DETERMINACION INMUNOLOGICA DE LAS BETA LIPOPROTEINAS POR EL METODO DE INMUNODIFUSION EN PLACA.²⁹

Fundamento: El suero aplicado (antígeno) se difunde radialmente en una capa de agar uniformemente delgada conteniendo un anticuerpo específico (suero anti β -lipoproteínas), que después de cierto tiempo reaccionan combinándose para formar una zona anular de precipitación, cuyo diámetro es directamente proporcional a la concentración de antígeno en el suero muestreado e inversamente proporcional a la concentración del anticuerpo y cuando la difusión es completa se grafican el cuadrado del diámetro del anillo de precipitación contra la concentración del patrón.

Reactivos: Placas de Inmunodifusión M-Partigen (Behring) que contienen antisuero monoespecífico contra las Beta lipoproteínas disuelto en una capa de agar gel.

Material: Pipetas de 1 ml
Capilares calibrados de 0.005 ml
Cámara húmeda.
Regla
Papel milimétrico

PROCEDIMIENTO:

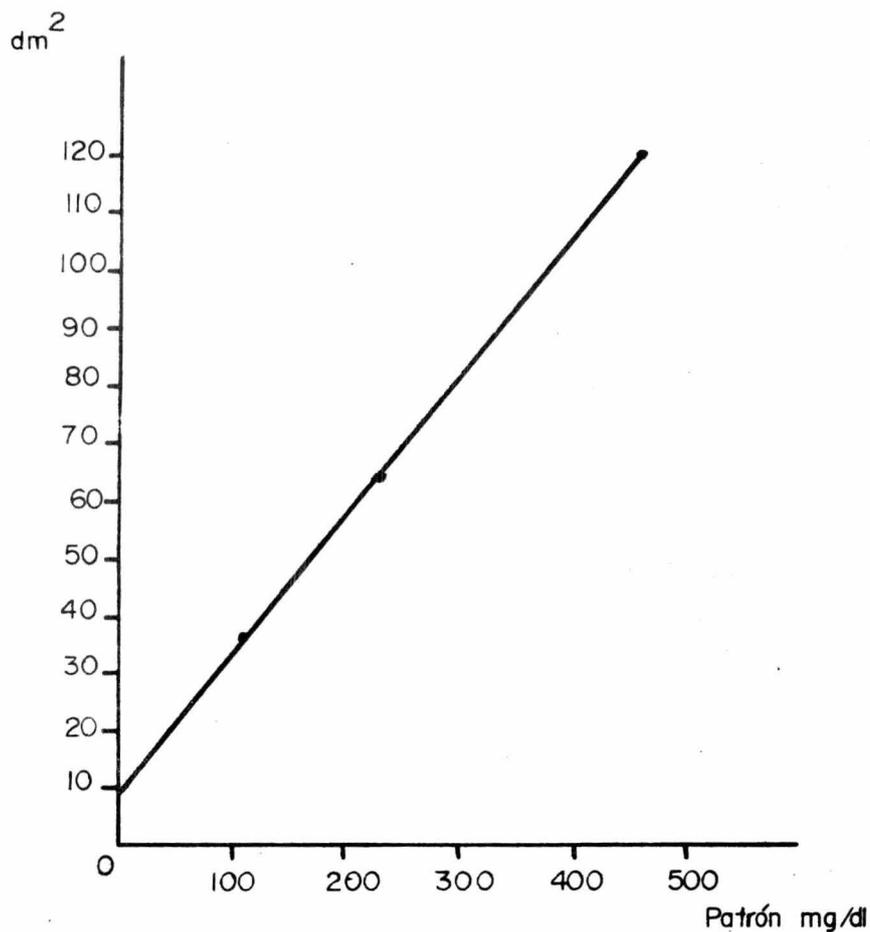
- 1.- Sacar la placa de la bolsa de aluminio y revisar cuidadosamente -- los pozos para verificar que no contengan agua de condensación, en caso contrario dejar la placa abierta durante 5 minutos para que se evapore el agua.
- 2.- Llenar los pozos 1,2 y 3 con 0.005 ml de la sol. patrón de Beta li poproteínas correspondiente, (dils. 1:4, 1:2 y 1:1, respectivamente) y en los pozos restantes colocar 0.005 ml de sueros problemas.
- 3.- Tapar la placa y dejar a temp. ambiente en una cámara húmeda por 48 horas.
- 4.- Medir el diámetro de la zona de precipitación en las tres diluciones del patrón, utilizando la regla y empleando la escala de valores elevados al cuadrado.
- 5.- Graficar estos valores en el eje de las ordenadas contra las concentraciones de las dils. del patrón que se sitúan en el eje de las abscisas, obteniéndose una línea recta. (válido por 2 semanas).
- 6.- Medir el diámetro de la zona de precipitación de los problemas, también en la escala de valores al cuadrado y buscar sus valores correspondientes en la curva de calibración, para obtener así en el eje de las abscisas la concentración en mg/dl.

CALCULOS: SE Llevan a cabo extrapolando en la curva de referencia.

VALORES DE REFERENCIA: 250 á 800 mg/dl en suero.

Gráfica de Referencia para Beta-Lipoproteínas

METODO INMUNOLOGICO



Dilución	dm ²	mg/dl
1:1	121	460
1:2	64	230
1:4	37.2	115

METODO RAPIDO PARA EL AISLAMIENTO DE LIPOPROTEINAS DEL SUERO HUMANO POR PRECIPITACION CON POLIANIONES.¹³

Una mezcla de Beta y Prebeta lipoproteínas pueden ser precipitadas con heparina y $MnCl_2$ ó sacarosa con $MgCl_2$, sin la necesidad de recurrir a la ultracentrifugación siendo la precipitación reversible, selectiva y completa.

El aislamiento altamente concentrado de lipoproteínas fué obtenido libre de otras proteínas plasmáticas comprobado por métodos inmunológicos y electroforéticos.

Fundamento: Los sulfatos de polisacáridos a pH neutro pueden formar complejos insolubles con las lipoproteínas de baja densidad -- del suero, por esa razón, los polisacáridos de bajo peso molecular se usan tal como la heparina y cationes bivalentes para precipitar las LBD, bajando la fuerza iónica del medio con sacarosa cuando se utiliza Mg^{2+} ó Ca^{2+}

Material: Tubos de centrifuga con tapón esmerilado de 5 ml
Bolsas de diálisis
Vaso de precipitado de 1000 ml
Centrífuga
Baño de agua a 37° C.

Reactivos: Heparina sódica al 5% en 0.15M de NaCl
 $MgCl_2$ 2M
Sacarosa Q.P.
NaCl 5%
Amortiguador Tris HCl 0.02M pH 7.7

Citrato de sodio al 10%
Amortiguador Tris-HCl-NaCl conteniendo NaCl al 1%
BaCl₂ al 5%.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Disolver 0.5 g de sacaros en 0.5 ml de suero humano, expandiendo - el volumen a 0.8 ml.
- 2.- Añadir 0.08 ml de heparina sódica al 5% y 0.4 ml de MgCl₂ 2M.
- 3.- Inmediatamente aparece una turbidez después de 15 minutos y centrifugar la mezcla en tubos tapados durante 30 minutos por 6000 g.
- 4.- Debido a la alta densidad del medio por la sacarosa, las lipoproteínas flotan formando una película sobre la superficie del sobrenadante claro.
- 5.- Desechar el sobrenadante y centrifugar por 1 min. para sedimentar - la película.
- 6.- Disolver el precipitado con 0.10 ml de NaCl al 5% e incubar a 37° C durante 30 minutos.
- 7.- Eliminar las proteínas séricas contaminantes con la adición de 0.5 ml de amortiguador Tris HCl y 0.125 ml de MgCl₂ 2M.
- 8.- Puesto que la fuerza iónica es baja la precipitación de las lipoproteínas ocurre sin la presencia de sacarosa, sedimentar el precipitado por 10 minutos a 6000 g, disolver otra vez con 0.1 ml de NaCl al 5%, reprecipitar las lipoproteínas para eliminar las últimas trazas de impurezas.

- 9.- Disolver el precipitado lavado en 0.25 ml de citrato de sodio al 10% y dializar durante 24 horas con 200 ml del amortiguador Tris-HCl-NaCl para desechar el citrato y el catión Mg^{2+}
- 10.- Para quitar la heparina transferir la bolsa de diálisis a un recipiente con $BaCl_2$ al 5% durante 24 horas y eliminar la sal insoluble formada heparina-ión bario por centrifugación a $4^{\circ} C$.
- 11.- Dializar nuevamente el sobrenadante con el regulador Tris-HCl-NaCl para desplazar el cloruro de bario.
- 12.- El resultado es una solución amarilla clara concentrada de lipoproteínas.

Por este método se obtiene una mezcla de LBD y LMBD que pueden ser separadas una de la otra por ultracentrifugación después de 24 horas a -100,000 g formando una capa opaca en la superficie del tubo las LMBD y un sedimento amarillo claro de Beta lipoproteínas en el fondo del tubo.

RESULTADOS:

Se obtuvo una solución concentrada de lipoproteínas siguiendo las instrucciones anteriores, cuya pureza fué corroborada por un análisis electroforético resultando una banda correspondiente a la fracción Beta y un trazo densitométrico indicando el 100% de Beta lipoproteínas (Foto 1).

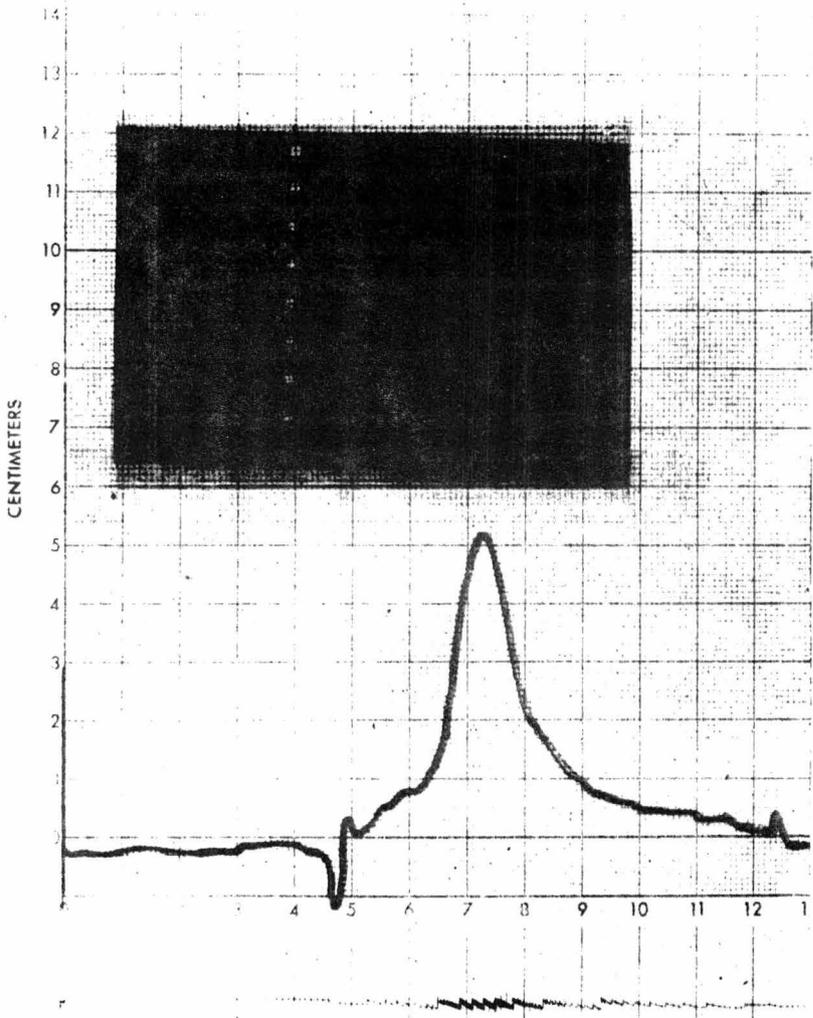


Foto (1) Electroforesis en acetato de celulosa y trazo densitométrico de una solución concentrada de β -lipoproteínas.

RESULTADOS

TABLA I.- VALORES OBTENIDOS DE 55 SUEROS DE MUJERES APARENTEMENTE - -
" SANAS "

No.	Lípidos totales mg/dl	Trigli- céricos mg/dl	Colest. total mg/dl	Colest. esterif. mg/dl	Col. de B- lipoprot. mg/dl	B-Lps. Bioq. mg/dl	B-Lps. Inmuno. mg/dl
1	1000	163	250	179	207	590	596
2	1000	159	250	158	209	596	600
3	1000	105	250	195	204	580	584
4	948	76	249	181	204	580	591
5	1000	135	246	175	186	530	538
6	500	90	238	130	144	410	428
7	912	126	237	120	174	496	500
8	1000	150	234	166	210	598	600
9	1000	80	232	182	154	438	442
10	626	105	222	142	143	406	415
11	780	90	218	113	95	271	280
12	874	126	214	131	168	479	485
13	748	105	214	145	196	560	570
14	1000	119	214	160	197	562	568
15	1000	148	212	141	156	444	450
16	567	105	212	128	176	500	509
17	798	90	210	135	192	548	555
18	1000	172	208	132	147	418	438
19	814	90	201	138	160	457	460
20	900	107	193	139	157	445	447
21	540	40	190	106	150	428	448
22	680	90	189	107	157	448	452

No.	lípidos totales mg/dl	Trigli- céridos mg/dl	Colest. total mg/dl	Colest. esterif. mg/dl	Colo de B- lipoprot. mg/dl	B-Lps. Biqq. mg/dl	B-Lps. Inmuno. mg/dl
23	840	83	187	118	178	407	410
24	960	119	185	73	147	419	420
25	758	76	184	152	132	377	378
26	758	97	184	141	135	385	390
27	644	56	181	113	147	418	420
28	840	109	181	102	154	438	443
29	777	76	179	122	150	426	432
30	750	140	178	131	113	323	324
31	655	176	178	96	138	393	405
32	916	133	178	131	152	432	432
33	755	190	178	65	154	439	442
34	975	133	177	137	147	420	426
35	880	176	176	135	156	445	451
36	486	76	175	85	127	363	378
37	711	90	168	115	139	375	382
38	458	52	162	130	122	348	358
39	592	47	156	119	135	384	390
40	666	90	156	119	135	384	390
41	552	119	156	105	130	369	374
42	800	87	156	93	126	360	366
43	576	126	155	119	110	314	324
44	800	130	151	87	139	397	408
45	640	60	148	92	77	220	221
46	456	62	143	114	132	351	352
47	670	40	142	82	122	349	352

No.	Lípidos totales mg/dl	Triglicéridos mg/dl	Colest. total mg/dl	Colest. esterif. mg/dl	Col. de B- lipoprot. mg/dl	B-Lps. Biq. mg/dl	B-Lps. Inmuno mg/dl
48	530	76	141	82	107	305	323
49	496	47	135	71	80	226	226
50	600	64	134	92	114	325	328
51	900	97	129	90	122	348	356
52	639	68	127	86	119	339	341
53	536	76	127	77	105	299	300
54	452	40	127	77	114	325	331
55	642	90	126	65	95	271	273
M	752.67	101.31	184.42	120.34	146.49	413.78	420.04
Sx	177.12	37.86	37.03	32.10	33.02	92.69	93.19
ES	23.87	5.10	4.99	4.33	4.45	12.49	12.56

* Los valores se expresan en mg/dl de : Lípidos totales, Triglicéridos, Colesterol total, colesterol esterificado, Colesterol de Beta lipoproteínas, Beta lipoproteínas por el método Bioquímico y Beta lipoproteínas por el método Inmunológico; enlistados en forma decreciente tomando como base la cantidad de colesterol total.

TABLA II.- VALORES OBTENIDOS DE 45 SUEROS DE HOMBRES APARENTEMENTE - -
" SANDS " *

No.	Lípidos total mg/dl	Trigli- céridos mg/dl	Coolest. total mg/dl	Coolest. esterif. mg/dl	Col. de B- lipoprot. mg/dl	B-Lps. Bioq. mg/dl	B-Lps. Inmuno. mg/dl
1	1000	170	250	189	222	633	640
2	1000	169	248	173	205	585	594
3	878	100	246	137	202	577	581
4	915	172	238	160	203	579	586
5	880	105	234	180	201	574	587
6	861	139	234	100	164	467	478
7	898	107	232	148	197	560	560
8	1000	172	230	160	151	430	440
9	920	171	229	141	154	435	450
10	856	169	223	117	159	454	458
11	717	133	214	122	200	570	580
12	1000	158	212	137	200	570	590
13	740	100	210	169	138	393	398
14	814	126	200	134	139	395	406
15	782	106	200	146	146	416	425
16	825	140	197	109	186	529	539
17	750	82	194	167	160	455	466
18	770	126	192	126	139	395	410
19	907	140	192	114	184	523	530
20	944	134	192	152	127	362	378
21	724	90	192	109	158	450	460

No.	Lípidos totales mg/dl	Triglicéridos mg/dl	Colest. total mg/dl	Colest. esterif. mg/dl	Col. de B- lipoprot. mg/dl	B-Lps. Bioq. mg/dl	B-Lps. Inmuno. mg/dl
22	962	110	191	141	175	498	500
23	729	119	190	152	140	399	406
24	620	86	190	107	122	348	352
25	770	172	188	89	128	366	378
26	893	97	187	139	139	396	406
27	755	171	185	102	167	475	490
28	900	153	180	124	165	479	480
29	814	162	180	114	113	320	333
30	760	96	177	144	162	460	460
31	688	63	173	122	105	298	300
32	635	83	169	125	109	310	320
33	686	83	165	110	160	455	460
34	814	132	160	116	132	376	380
35	660	76	159	90	133	379	390
36	720	126	157	102	146	415	425
37	660	105	149	109	143	406	406
38	750	143	147	102	124	353	358
39	500	96	135	74	109	311	318
40	537	87	134	76	126	358	358
41	541	56	129	75	92	262	266
42	480	105	128	95	113	321	333
43	577	83	126	74	116	331	333
44	408	119	120	82	108	308	324
45	406	68	119	80	86	244	258
M	765.47	120.0	186.20	122.98	149.96	427.11	436.53
Sx	157.49	34.22	37.30	30.37	33.94	97.00	96.99
ES	23.47	5.10	5.56	4.53	5.06	14.46	14.45

* Los valores obtenidos se enlistaron de la misma forma que la Tabla I.

TABLA III.- VALORES OBTENIDOS DE 20 SUEROS CON HEPATITIS*

No.	Lípidos totales mg/dl	Trigli- céridos mg/dl	Colest. total mg/dl	Colest. esterif. mg/dl	Col. de B- lipoprot. mg/dl	B-Lps. Bioq. mg/dl	B-Lps. Inmuno. mg/dl
1	3655	491	1340	1020	1266	3608	3630
2	3125	482	1290	624	1173	3544	3554
3	3250	419	1160	566	1118	3188	3220
4	1630	345	410	264	353	1007	1095
5	1892	305	382	226	324	895	918
6	1150	190	333	212	291	829	840
7	1190	312	396	173	317	905	923
8	1254	179	345	198	290	826	853
9	1247	176	330	201	292	832	840
10	1220	455	294	198	215	612	635
11	1260	405	280	147	256	727	750
12	1144	219	272	183	220	627	640
13	1098	157	270	158	240	684	700
14	1118	157	268	173	246	701	720
15	1040	192	266	168	210	598	617
16	1130	184	263	150	228	650	671
17	1044	219	254	168	204	580	598
18	1030	205	250	140	200	570	593
19	1420	455	242	144	217	618	630
20	940	140	220	123	192	547	556

* Los valores obtenidos se enlistaron de la misma forma que en la Tabla I.

TABLA IV.- VALORES OBTENIDOS DE 15 SUEROS CON DIABETES *

No.	Lípidos totales mg/dl	Trigli- céridos mg/dl	Colest. total mg/dl	Colest. esterif. mg/dl	Col. de B- lipoprot. mg/dl	B-Lps. Bioq. mg/dl	B-Lps. Inmuno. mg/dl
1	1145	190	276	182	212	603	615
2	1103	209	258	132	200	570	581
3	1070	175	248	175	186	530	542
4	1076	226	234	170	144	410	427
5	857	90	230	212	203	579	586
6	855	176	220	96	176	503	516
7	826	62	218	120	161	460	464
8	756	102	173	98	156	446	448
9	625	126	165	138	132	377	380
10	674	178	152	70	139	396	400
11	750	140	128	58	117	333	336
12	792	93	120	72	100	285	289
13	535	108	118	72	102	292	300
14	593	108	113	75	100	285	290
15	400	48	112	50	104	297	302

* Los valores obtenidos se enlistaron de la misma forma que en la tabla I.

TABLA V.- VALORES OBTENIDOS DE 15 SUEROS CON PANCREATITIS*

No.	Lípidos totales mg/dl	Trigli- céridos mg/dl	Colest. total mg/dl	Colest. esteref. mg/dl	Col. de B- lipoprot. mg/dl	B-Lps. Bioq. mg/dl	B-Lps. Inmuno. mg/dl
1	1092	248	271	198	195	555	570
2	940	198	240	188	211	600	605
3	915	291	238	160	212	604	626
4	856	219	230	127	149	424	434
5	1600	291	225	183	200	569	574
6	1002	288	206	169	174	496	516
7	1500	250	183	128	168	479	587
8	981	312	181	102	154	438	445
9	860	262	160	115	143	407	411
10	632	180	155	122	137	390	394
11	775	172	150	119	119	340	350
12	880	195	132	97	134	382	408
13	812	183	123	90	121	346	350
14	760	205	120	88	100	285	286
15	800	185	107	75	86	244	248

* Los valores obtenidos se enlistaron de la misma forma que en la Tabla I.

TABLA VI.- ECUACIONES DE LAS RECTAS Y CORRELACION LINEAL (r) DE LA COMPARACION ESTADISTICA DE LOS METODOS BIOQUIMICOS E INMUNOLOGICOS EN MUJERES Y HOMBRES.* (GRAFICA II).

BETA LIPOPROTEINAS (Met. Inmunológico)	contra	BETA LIPOPROTEINAS (Met. Bioquímico)
---	--------	---

$$E_y = 42685$$

$$E_x = 41834$$

$$E_y^2 = 19114970$$

$$E_x^2 = 18503898$$

$$E_{xy} = 18896491$$

$$a_0 = -6.75$$

$$b_0 = -77.56$$

$$a_1 = 1.04$$

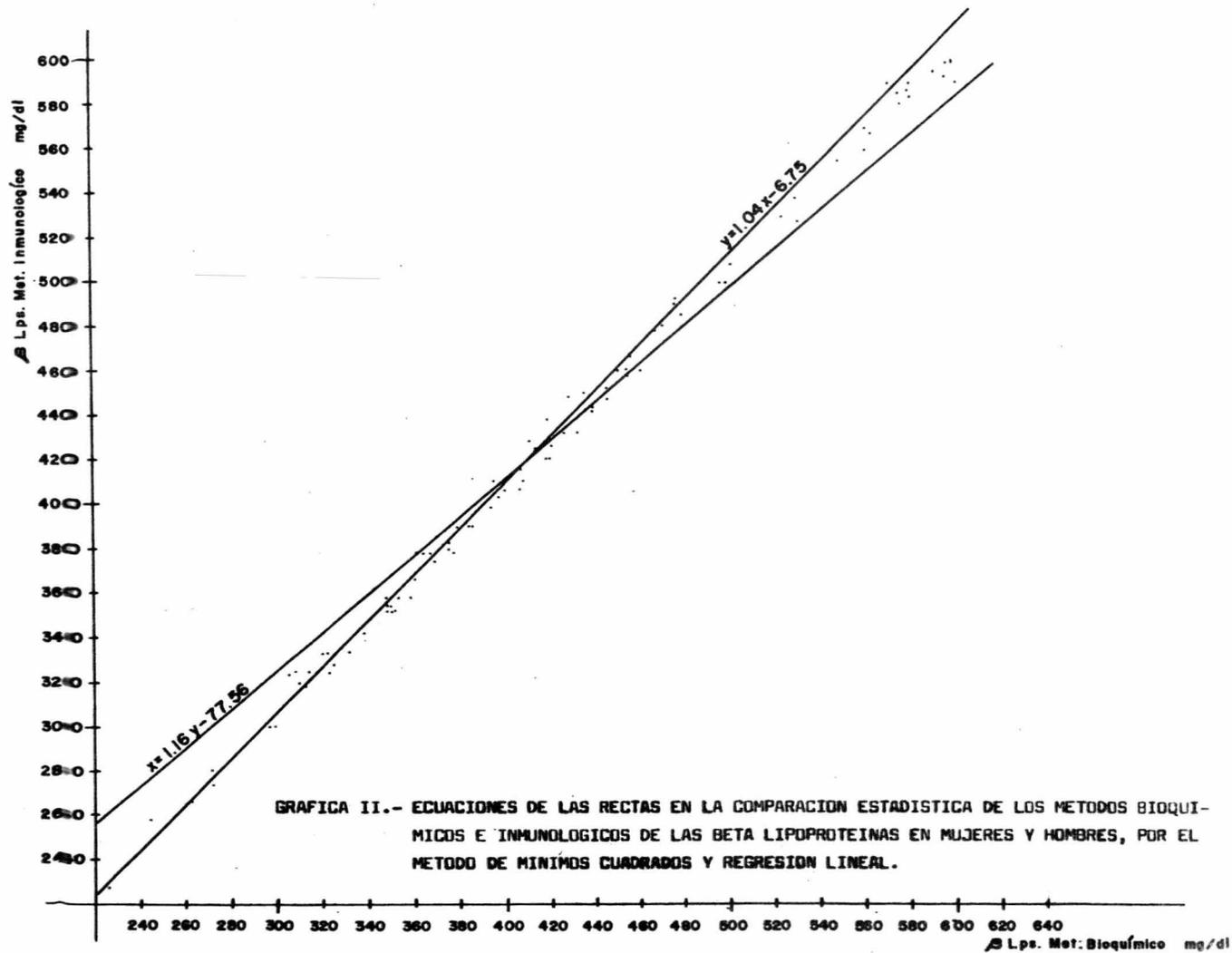
$$b_1 = 1.16$$

$$Y = 1.04 X - 6.75$$

$$X = 1.16 Y - 77.56$$

$$r = 1.00476$$

* Los valores obtenidos fueron calculados por medio del método de - Mínimos cuadrados y Regresión lineal cuyas fórmulas se encuentran en el Apéndice A.



GRAFICA II.- ECUACIONES DE LAS RECTAS EN LA COMPARACION ESTADISTICA DE LOS METODOS BIOQUIMICOS E INMUNOLOGICOS DE LAS BETA LIPOPROTEINAS EN MUJERES Y HOMBRES, POR EL METODO DE MINIMOS CUADRADOS Y REGRESION LINEAL.

TABLA VII.- COMPARACION ESTADISTICA DE LOS METODOS BIOQUIMICO E INMUNO
LOGICO DE LAS BETA LIPOPROTEINAS, RELACIONADO CON EL SEXO
FEMENINO Y MASCULINO POR LA t DE "STUDENT".*

BETA LIPOPROT. vs BETA LIPOPROT. (Met. Bioq.)		BETA LIPOPROT. vs BETA LIPOPROT. (Met. Inmuno.)		BETA LIPOPROT. vs BETA LIPOPROT. (Met. Bioq.)		BETA LIPOPROT. vs BETA LIPOPROT. (Met. Inmuno.)	
MUJERES		MUJERES		HOMBRES		HOMBRES	
M	= 413.78			M	= 420.04		
Sx	= 92.69			Sx	= 93.19		
t ₁₀₈	= 0.350			t ₈₈	= 0.320		
n	= 55			n	= 45		
Grado de libert. = 108				Grado de libert. = 88			
0.7 < P < 0.8				0.7 < P < 0.8			
BETA LIPOPROT. vs BETA LIPOPROT. (Met. Bioq.)		BETA LIPOPROT. vs BETA LIPOPROT. (Met. Bioq.)		BETA LIPOPROT. vs BETA LIPOPROT. (Met. Inmuno.)		BETA LIPOPROT. vs BETA LIPOPROT. (Met. Inmuno.)	
MUJERES		HOMBRES		MUJERES		HOMBRES	
M	= 420.44			M	= 428.28		
Sx	= 94.66			Sx	= 95.05		
t ₉₈	= 0.410			t ₉₈	= 0.410		
n	= 100			n	= 100		
Grado de libert. = 98				Grado de libert. = 98			
0.6 < P < 0.7				0.6 < P < 0.7			

* Los valores obtenidos fueron calculados por medio de la t de "Student" cuyas formulas se encuentran en el Apéndice A.

DISCUSION DE RESULTADOS

Para realizar el objetivo de nuestro trabajo se hizo primero las determinaciones de Lípidos totales, Triglicéridos, Colesterol total y Esterificado de los cien casos estudiados, donde la M de todos los parámetros analizados se ajustaron dentro de los valores medios - que no sobrepasaron los límites de aceptación, señalando únicamente - que el colesterol total tanto en mujeres como en hombres fueron prácticamente los mismos, pues presentaron diferencias mínimas.

Después de establecer la metodología correcta se prosiguió a valorar las Beta lipoproteínas por los dos métodos: Inmunológico y Bioquímico, siendo el primero muy específico por el tipo de reacción-antígeno/anticuerpo que se lleva a cabo formando un halo de difusión-completa, en cambio el segundo es una precipitación de las Beta lipoproteínas con polianiones, basado en el contenido del 35% de colesterol que contienen ellas mismas.

Las Beta lipoproteínas para el método Inmunológico son ligeramente mayores que para el método Bioquímico, sin embargo, clínicamente no ofrecen diferencias significativas para ambos sexos, indicando que se puede usar indiferentemente cualquier método basándose en los resultados obtenidos. (Tabla I y II).

Los datos de los cuadros patológicos encontramos en Hepatitis valores muy dispersos, en cambio en Diabetes y Pancreatitis se asemejan a los casos normales. (Tabla III, IV y V).

El factor de correlación lineal en la comparación estadística de los métodos Bioquímico e Inmunológico para mujeres y hombres es aceptable por los resultados obtenidos. (Tabla VI), lo mismo se puede decir con respecto a la t de Student puesto que las Probabilidades calculadas en las diferentes combinaciones se hallan en el mismo rango. (Tabla VII).

Y por último haremos mención de la precipitación de Beta lipoproteínas con heparina y un catión bivalente de un suero analizado, donde se obtuvo una solución concentrada de lipoproteínas, que electroforéticamente resultó una banda que en el trazo densitométrico corresponde al 100% de Beta lipoproteínas. (Foto 1).

RESUMEN Y CONCLUSIONES

R E S U M E N

- 1.- Revisión de los aspectos históricos, bioquímicos, fisiológicos y patológicos de las Beta lipoproteínas.
- 2.- Definición de la metodología adecuada cuantificando Lípidos totales, Triglicéridos, Colesterol total y Colesterol esterificado para determinar el patrón bioquímico lipídico de cada muestra.
- 3.- Dosificación de las Beta lipoproteínas por los métodos: Bioquímico - (Precipitación con polianiones), e Inmunológico (Inmunodifusión Radial simple).
- 4.- Elaboración del análisis Estadístico de los cien casos normales y patológicos (Hepatitis, Diabetes y Pancreatitis), y determinación de la Media (M), Desviación estándar (Sx) y Error estándar (ES).
- 5.- Obtención de la gráfica y ecuaciones de las Rectas de regresión (Y,X) por el método de Mínimos cuadrados y su correlación lineal (r) para fines comparativos de los métodos Bioquímico e Inmunológico de los cien casos normales.
- 6.- Comparación Estadística de los dos métodos mencionados anteriormente por la t de "Student", obteniendo las Probabilidades tanto en hombres como en mujeres.

C O N C L U S I O N E S

- a).- Para los casos analizados en esta tesis y de acuerdo a las técnicas usadas para la determinación de Beta lipoproteínas, apoyándose en los cálculos estadísticos empleados para los métodos Bioquímico e Inmunológico, podemos concluir que no hay una diferencia significativa entre ambos, en base a los resultados desarrollados en este trabajo.
- b).- Lo mismo se puede concluir con respecto al contenido de Beta lipoproteínas, relacionado con el sexo femenino y sexo masculino no hubo una discrepancia significativa, señalando únicamente que en las mujeres es menor debido a factores hormonales.

A P E N D I C E

APENDICE A.- FORMULAS EMPLEADAS PARA LOS CALCULOS ESTADISTICOS

1.- Media $M = \frac{Ex}{n}$

2.- Desviación estándar $Sx = \sqrt{\frac{E(x - \bar{x})^2}{n}}$

3.- Error estándar $ES = \frac{Sx}{\sqrt{n}}$

4.- Desviación estándar para dos muestras:

$$Sx = \sqrt{\frac{E(x_1 - \bar{x}_1)^2 + E(x_2 - \bar{x}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

5.- t de Student $t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{Sx} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$

Grados de libertad = $n_1 + n_2 - 2$

6.- Ecuaciones de las Rectas de regresión por el método de Mínimos cuadrados:

$$Y = a_0 + a_1 X$$

$$X = b_0 + b_1 Y$$

$$EY = a_0 N + a_1 EX$$

$$EX = b_0 N + b_1 EY$$

$$EXY = a_0 EX + a_1 EX^2$$

$$EXY = b_0 EY + b_1 EY^2$$



$$a_0 = \frac{(EY) (EX^2) - (EX) (EXY)}{N EX^2 - (EX)^2}$$

$$b_0 = \frac{(EX) (EY^2) - (EY) (EXY)}{N EY^2 - (EY)^2}$$

$$a_1 = \frac{N EXY - (EX) (EY)}{N EX^2 - (EX)^2}$$

$$b_1 = \frac{N EXY - (EX) (EY)}{N EY^2 - (EY)^2}$$

7.- Coeficiente de correlación lineal:

$$r = \frac{E_{xy}}{\sqrt{(E_{x^2}) (E_{y^2})}}$$

8.- Error Típico de la estima:

$$S_{yx} = \sqrt{\frac{E (Y_{\text{pract.}} - Y_{\text{calc.}})^2}{N}}$$

$$S_{xy} = \sqrt{\frac{E (X_{\text{pract.}} - X_{\text{calc.}})^2}{N}}$$

9.- Porcentaje del Error típico de la estima:

$$\% S_{yx} = \frac{S_{yx}}{M} 100 \quad \% S_{xy} = \frac{S_{xy}}{M} 100$$

APENDICE B.-COEFICIENTES DE CORRELACION DE LOS VALORES NORMALES Y PATOLOGICOS.

M U J E R E S	MET. BIOQUIMICO	MET. INMUNOLOGICO
B-Lps./L.T.	0.985890	0.994310
B-Lps./T.G.	0.953300	0.960316
B-Lps./C.T.	0.991612	0.992432
B-Lps./C.E.	0.984257	0.984214
H O M B R E S		
B-Lps./L.T.	0.988160	0.983310
B-Lps./T.G.	0.967670	0.968700
B-Lps./C.T.	0.990970	0.991450
B-Lps./C.E.	0.958690	0.980820
HEPATITIS		
B-Lps./L.T.	0.955370	0.964910
B-Lps./T.G.	0.856840	0.861240
B-Lps./C.T.	1.001720	1.002160
B-Lps./C.E.	0.976269	0.976880
D I A B E T E S		
B-Lps./L.T.	0.960100	0.986580
B-Lps./T.G.	0.944230	0.945940
B-Lps./C.T.	0.994740	0.995270
B-Lps./C.E.	1.044370	1.044370
P A N C R E A T I T I S		
B-Lps./L.T.	0.972560	0.977250
B-Lps./T.G.	0.980250	0.979110
B-Lps./C.T.	0.993800	0.991130
B-Lps./C.E.	0.994850	0.989440

APENDICE C.- APLICACION DE LAS FORMULAS 6,7,8 y 9 DEL APENDICE A EN
COLESTEROL TOTAL vs BETA LIPOPROTEINAS POR LOS METODOS
BIOQUIMICO E INMUNOLOGICO.

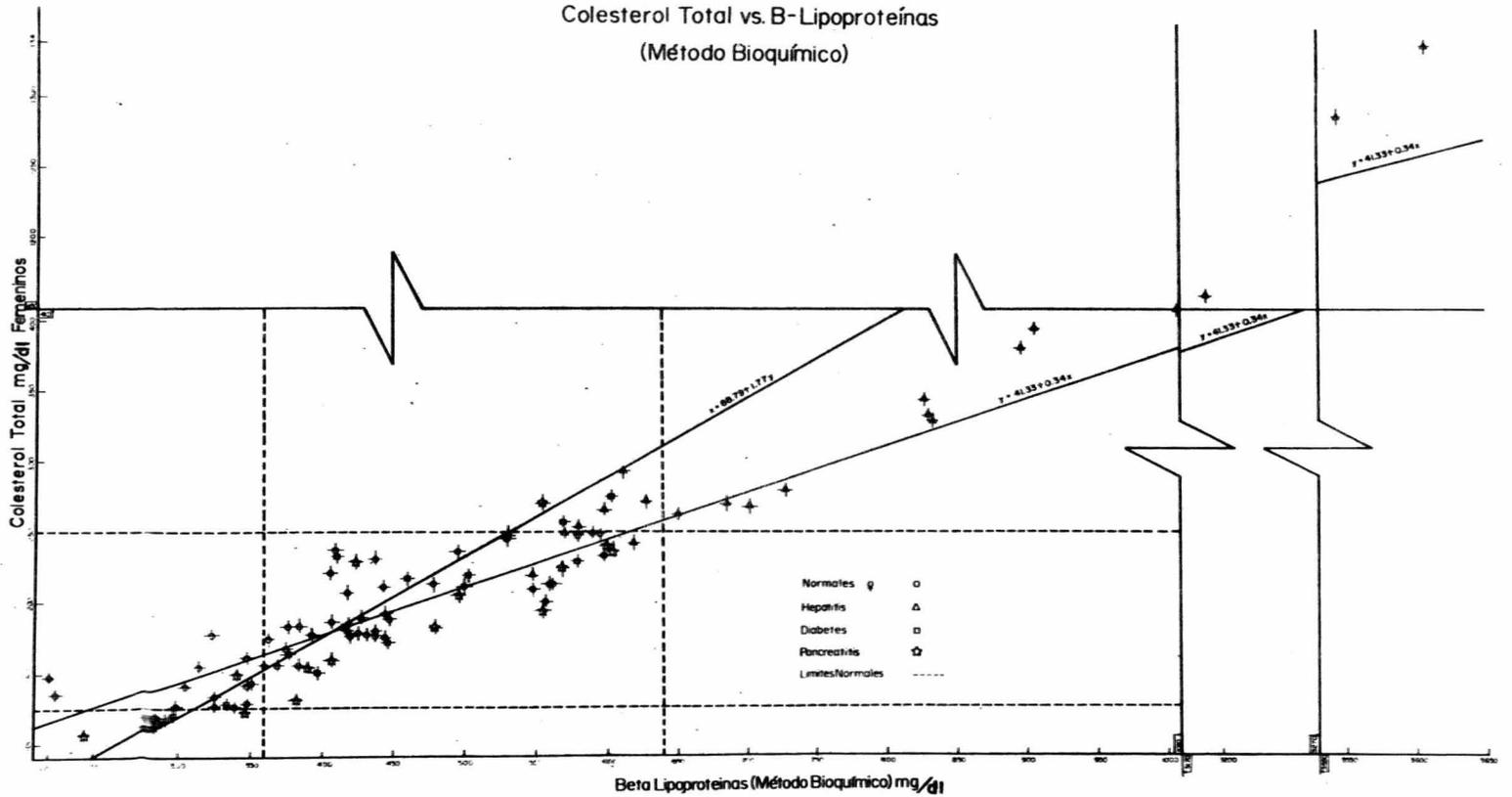
COLESTEROL TOTAL vs BETA LIPOPROTEINAS

	MUJERES		HOMBRES	
	(B)	(I)	(B)	(I)
EX	22858	22102	18976	19583
EX ²	9880820	10172598	8632078	8942372
EY	10143	10143	83970	83970
EY ²	1944585	1944585	1626357	1626357
EXY	43466623	4413978	3711086	3780994
a ₀	41.33	46.88	71.07	55.30
a ₁	0.34	0.33	0.27	0.30
b ₀	88.79	37.53	-112.18	37.34
b ₁	1.77	2.07	2.86	2.13
Y	41.33+0.34X	46.88+33X	71.07+0.27X	55.30+0.30X
X	88.79+1.77Y	37.53+2.07Y	2.86Y-112.18	37.34+2.13Y
r	0.991612	0.992432	0.990970	0.991450
S _{yx}	21.84	21.53	22.29	21.85
%S _{yx}	11.84	11.68	11.92	11.68
S _{xy}	54.99	53.36	64.79	56.65
%S _{xy}	13.23	12.70	15.17	12.95

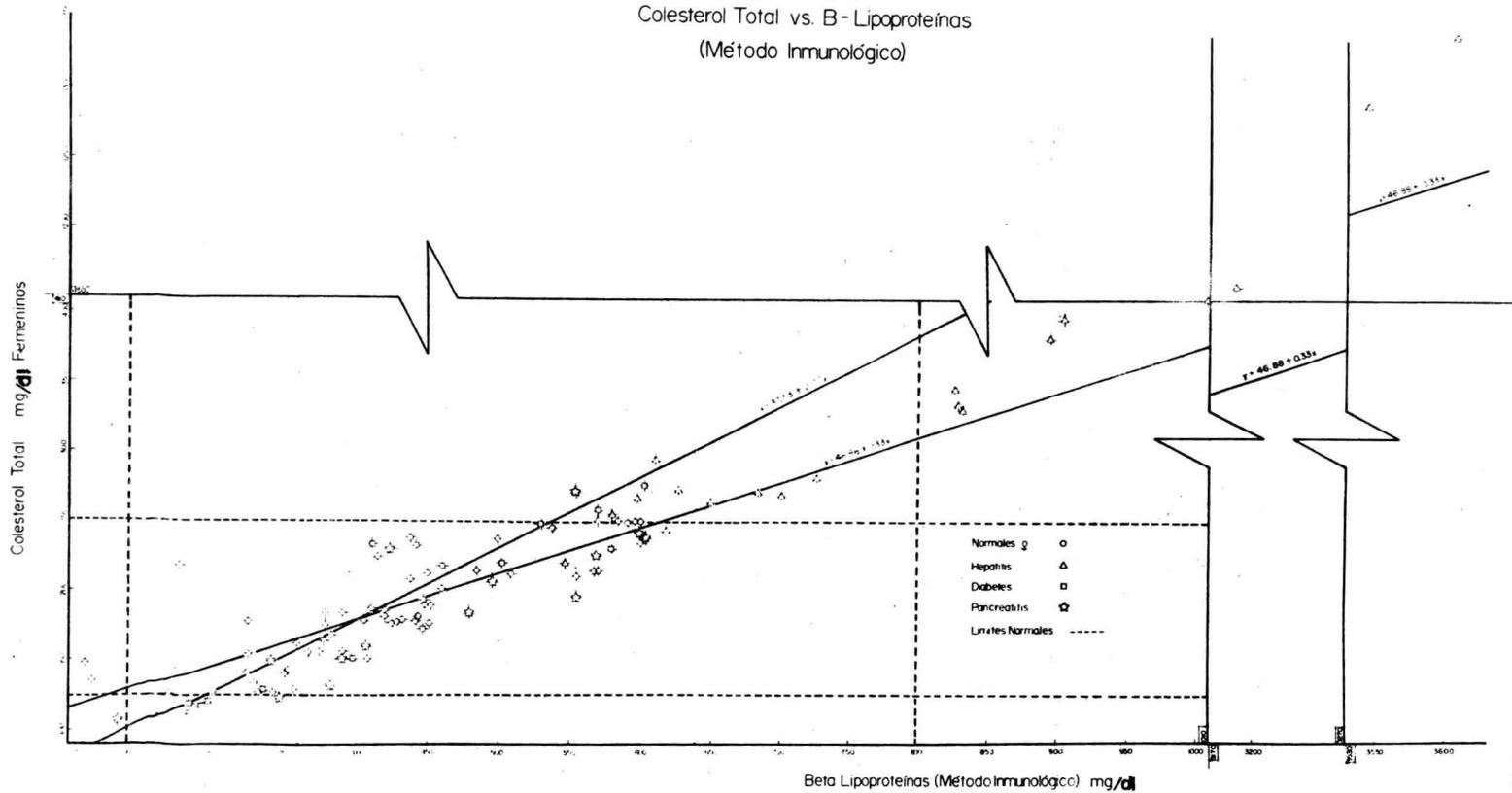
En las gráficas 1,2,3 y 4 se hace una integración de los resultados de la fracción principal que corresponde al colesterol total contra Beta lipoproteínas por los métodos Bioquímico e Inmunológico (Apéndice C), y los valores patológicos (Hepatitis, Diabetes y Pancreatitis), señalando los límites normales de cada determinación en mujeres y hombres con el objeto de apreciar la correlación existente entre ambos.

Las pendientes obtenidas en cada gráfica se observa que su coeficiente de correlación lineal (r) es cercano a la unidad, indicando que guardan cierta relación entre ambos métodos y solamente - dará resultados ligeramente bajos el método Bioquímico que el método Inmunológico considerándose más específico.

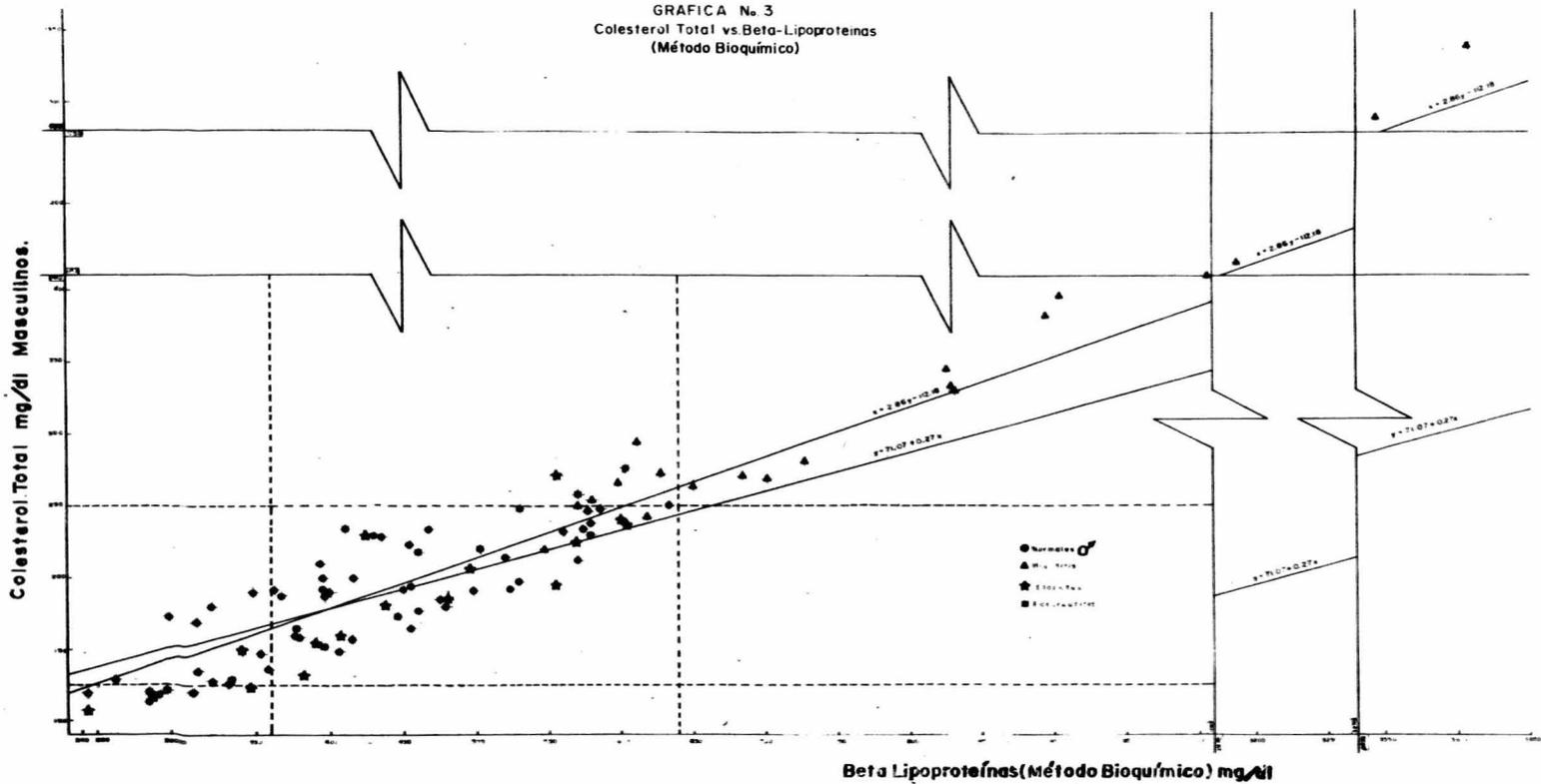
GRAFICA No. I
 Colesterol Total vs. B-Lipoproteínas
 (Método Bioquímico)



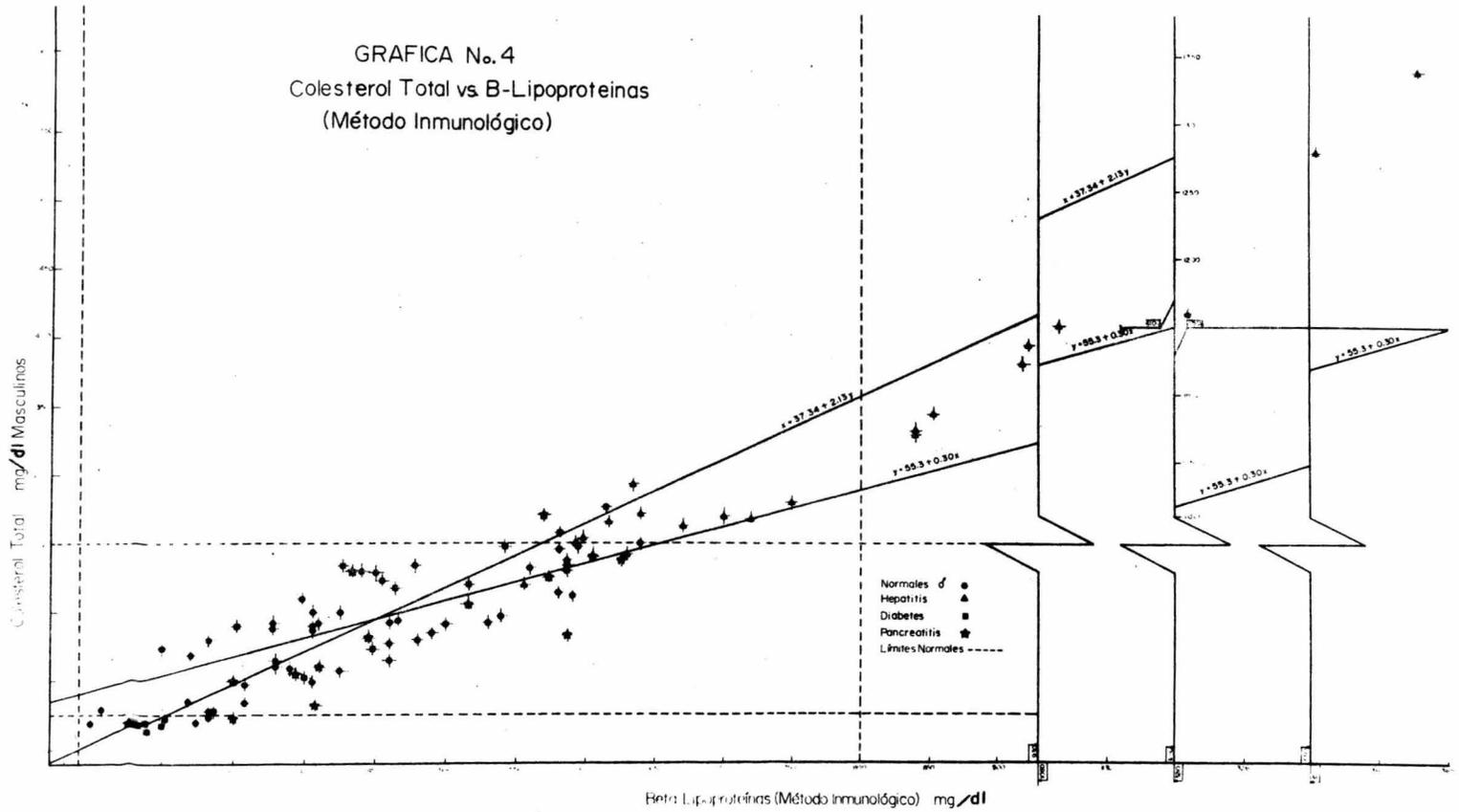
GRAFICA No. 2
 Colesterol Total vs. B-Lipoproteínas
 (Método Inmunológico)



GRAFICA No 3
 Colesterol Total vs Beta-Lipoproteinas
 (Método Bioquímico)



GRAFICA No. 4
 Colesterol Total vs B-Lipoproteínas
 (Método Inmunológico)



BIBLIOGRAFIA

- 1.- Gofman et. al. "The serum lipoprotein transport system in health, metabolic disorders, atherosclerosis and coronary artery disease" Plasma (Milano) 1954, 2, 413.
- 2.- Jencks. W.P. and E.L. Durrum. Paper electrophoresis as quantitative method the staining of serum lipoproteins. J. Clin. Invest. 34:1437-1448 (1955).
- 3.- M. Burstein et J. Samaille. Dosage des B-lipoproteines sériques après précipitation sélective par L'heparine. La Presse Medicale, Vol. 66, No. 43 pag. 974-5 (1958).
- 4.- Lees, R.S. and Hatch F.T. Sharper separation of lipoprotein species by paper electrophoresis in albumin-containing buffer. J. Lab. Clin. Med. 61: 518-528, (1963).
- 5.- Walton, D.W. and S.J. Darke. Immunological characteristics of human low density lipoproteins. Immunochemistry 1964, 1, 267.
- 6.- Waldo R.F. and Samuel Gurin. Structure of lipoproteins: Covalently bound fatty acids. Science, Vol. 143, pag. 362-3 Jan. 1964.
- 7.- Cawley L.P., Scneider, D., Eberhardt, L. Harrouch, J. and Millsap G. A simple semi-automated method of immunoelectrophoresis. Clin. Chim. Acta 12: 105-110 (1965).
- 8.- Robert I. Levy, Donald S. Fredrickson, and Leonard Laster. "The lipoproteins and lipid transport in Abetalipoproteinemia". Journal of Clinical investigation Vol. 45 No. 4 pag 531-41 (1966).
- 9.- Coles B. and Verheyden J. Electrophoresis of serum lipoproteins on cellogel. Clinica Chimica Acta 18, 325, 1967
- 10.- Donald S. Fredrickson, Robert I. Levy and Robert S. Lees. "Fat transport in Lipoproteins—An integrated approach to mechanisms and disorders".

- The New England Journal of Medicine Vol. 276 1967 pag. 34-44 Jan 5; 94-103 Jan. 12; 148-156 Jan 19 215-225 Jan. 26; 273-81 Feb. 2.
- 11.-Chin, H.P. and Blankenhorn H. David. Separation and quantitative analysis of serum lipoproteins by means of electrophoresis on cellulose acetate. Clin. Chim. Acta, 20 (1968) 305-314.
 - 12.-R.G. Houston. Determinación de la Beta lipoproteínas en el suero. Das medizinische Laboratorium Vol. XXII No. 5 Mayo (1969), 195-98.
 - 13.-M. Burstein, H.R. Scholnick and R. Morfin. Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. Journal of Lipid Research Vol. 11 583-95, (1970).
 - 14.-Henry G. Eilcox, Donal C. Davis. and Murray Heimberg. "The isolation of lipoproteins from human plasma by ultracentrifugation in zonal rotors". Journal of Lipid Research Vol. 12, 160-72, 1971.
 - 15.-Freedman et al. Quantitation of B-lipoproteins Cholesterol. Clin. Biochem. 5: 83-7 Jun. 1972.
 - 16.-Seidel D. Advances in lipoprotein research Biochemical and clinical aspects. Nutr. Metab. 15: 9-16, 1973.
 - 17.-Gros M. et al. "Electrophoretical separation of pre-stained serum lipoproteins a cellulosa acetate, agarose gel and polyacrilamide. Clin. Chim. Acta. 45: 165-7 30 Apr. 1973.
 - 18.-Newall R.G. The determination of Low density lipoproteins by micro-nephelometry: A practical assessment. Med. Lab. Technol. 30: 297-9 Jul. 1973.
 - 19.-Canal J. Autoanalysis of serum lipids of the B and PreB group of lipoprotein. (Determinación par voie automatique des lipides sériques du bloc (B+PreB) lipoproteines). Path. Biol. (paris) 1974. 22/2 (173-178).

- 20.-Mancini G., Carbonara A.O. and Heremans J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, Pergamon Press Vol. 2 235-254. Great Britain (1965).
- 21.-Semlitz, R.M.S. "Plasma Lipoproteins" Biochemical Society Symposium No. 33 Academic Press. April. London (1971).
- 22.-Angelo M. Scanu and Charlene Wisdom. Serum Lipoproteins structure and function. *Annual Review of Biochemistry* Vol. 41 703-26 1972.
- 23.-Hartmann. G. and Wyss, F. Hiperlipidemias. Aspectos Fisiopatológicos, Clínicos y Terapéuticos. ED. Científico-Médica.Mex. 1972.
- 24.-Behringwerke products for the quantitative determination of plasma protein. Ed. Hoechst Pharmaceuticals. Inglaterra, 1971.
- 25.-N. Zöllner and K. Kirsch. *S. ges. exp. Med.* 135,545. (1962).
- 26.-Boehringer Mannheim Corporation. Determination of Glycerol and triglycerides (Neutral fat) in serum. (U.V.-Method with NADH) TC-GL cat. No. 15989 TNA.
- 27.-Babson, A.L., Shapiro, P.O. and Phillips, G.E. *Clin. Chim. acta* 7: 800, 1962.
- 28.-Boehringer Mannheim Corporation. Determination of Beta-lipoprotein concentration in serum. TC/LP cat. No. 15945 TLAG.
- 29.-Boehringerwerke A. G. Marburg-Lahn. B-Lipoprotein Standard for quantitative immunological determination of B-lipoprotein. Jan. 1973.
- 30.-M. Burstein . Antiserum de lapin immunisé contre les lipoprotéines humaines de faible densité (1.006-1.063). *Nouvelle Revue Française d'Hématologie* 1972 tomo 12 No. 2 pag. 251-257.
- 31.-M. Burstein. Nouvelle Technique d'isolement d'anticorps spécifiques et, en particulier, d'anticorps anti B-Lipoprotéines. *Vox Sang.* 9: 22-24 1964.
- 32.-Hulda Bancroft. *Introducción a la Bioestadística*. 7a. Ed. EUDEBA Buenos Aires, Argentina (1971).