

176



BIBLIOTECA DE C. QUÍMICAS

**Demostración Experimental de la Transformación
Enzimática de las Lipoproteínas de Baja
Densidad del Suero Sanguíneo.**

MA. DEL CARMEN MENDOZA DIAZ BARRISA

MEXICO, D. F.

1962

81115



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.

- **Demostración Experimental de la Transformación Enzimática de las Lipoproteínas de Baja Densidad del Suero Sanguíneo.**

T E S I S

Que para obtener el título de:

Q U I M I C O

p r e s e n t a :

BA. DEL CARMEN MEDDOZA DIAZ BARRIGA

A la memoria de mi padre
Sr. J. Jesús Mendoza Areiga

A mi madre
Sra. Etelvina Oz. B. Vda. de Mendoza
con veneración eterna

A mis hermanos

Al Dr. Edmundo Calva

A mis maestros y compañeros.

A mi Escuela

Este trabajo se realizó en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología bajo la dirección del Dr. Edmundo Calva.

011111:30

1. Information
2. Description
3. Summary ; Abstract
4. Data
5. Illustration
6. Language
7. Language
8. Language

ANTECEDENTES

Desde 1950, los estudios de Gofman, Lindgren, Elliot, Mantz, Hewitt, Strisover, Herring y Lyon (1), llamaron la atención sobre la posible existencia de una relación directa entre los niveles plasmáticos de las lipoproteínas S_f 10-30 y el grado de las lesiones ateroscleróticas provocadas en los conejos, o entre los niveles plasmáticos de las lipoproteínas S_f 10-20 y el antecedente de infarto del miocardio en personas de uno u otro sexo.

Graham, Lyon, Gofman, Jones, Yankley y Simonton (2), un año después, observaron que la inyección de heparina en humanos normales y en conejos con aterosclerosis experimental, producía cambios dramáticos en las lipoproteínas del plasma. Durante algunas horas, o en ciertos casos hasta varios días, una sola inyección de heparina hacía desaparecer las lipoproteínas S_f 20-100 y disminuía notablemente las S_f 10-20, cuando éstas estaban elevadas; concomitantemente se producía un aumento en la concentración de las moléculas cuyos S_f eran menores de 10. Estos autores también hicieron notar que la heparina, administrada a conejos que estaban siendo alimentados con colesterol, retardaba la aparición de niveles altos de moléculas S_f 10-50 y suprimía el desarrollo de la aterosclerosis. Como estudios posteriores han mostrado que la heparina provoca, entre otros efectos biológicos, el aumento en el plasma de la lipoproteína lipasa y de otras enzimas (12,13) debe considerarse que las observaciones de Graham y

C O N T E N I D O

- I Antecedentes**
- II Propósitos**
- III Materiales y Métodos**
- IV Resultados**
- V Discusión**
- VI Conclusiones**
- VII Bibliografía**

ANTECEDENTES

Desde 1950, los estudios de Gofman, Lindgren, Elliot, - Mantz, Hewitt, Strisower, Herring y Lyon (1), llamaron la atención sobre la posible existencia de una relación directa entre - los niveles plasmáticos de las lipoproteínas S_p 10-30 y el grado de las lesiones ateroscleróticas provocadas en los conejos, o entre los niveles plasmáticos de las lipoproteínas S_p 10-20 y el - antecedente de infarto del miocardio en personas de uno u otro - sexo.

Graham, Lyon, Gofman, Jones, Yankley y Siamonten (2), un año después, observaron que la inyección de heparina en humanos normales y en conejos con aterosclerosis experimental, producía cambios dramáticos en las lipoproteínas del plasma. Durante algunas horas, o en ciertos casos hasta varios días, una sola inyección de heparina hacía desaparecer las lipoproteínas S_p 20-100 y disminuía notablemente las S_p 10-20, cuando éstas estaban elevadas; concomitantemente se producía un aumento en la concentración de las moléculas cuyos S_p eran menores de 10. Estos autores también hicieron notar que la heparina, administrada a conejos - que estaban siendo alimentados con colesterol, retardaba la aparición de niveles altos de moléculas S_p 10-50 y suprimía el desarrollo de la aterosclerosis. Como estudios posteriores han mostrado que la heparina provoca, entre otros efectos biológicos, el aumento en el plasma de la lipoproteína lipasa y de otras enzimas (12,13) debe considerarse que las observaciones de Graham y

sus colaboradores (2), mostraron por primera vez la posibilidad de las transformaciones enzimáticas in vivo de las distintas clases de lipoproteínas.

En una segunda publicación del mismo año, Graham et al. (3) ilustraron con fotografías de los análisis a la ultracentrífuga, los cambios que ocurrían en el plasma in vivo después de la inyección de heparina, tanto en personas normales como en aquellos enfermos que habían sufrido infarto del miocardio y que tenían valores altos de lipoproteínas S_F 20-100 y S_F 10-20. A los veinte minutos de la inyección de 100 mg de heparina, las lipoproteínas S_F 20-100 casi desaparecían y aumentaban tanto las S_F 10-20 en las siguientes seis horas las S_F 12-20 a su vez disminuían y aumentaban tanto las S_F 10-12 como las S_F 6-10 y, finalmente, transcurridas 24 horas se encontraban de nuevo los valores iniciales. Con la heparina de absorción lenta los efectos sobre las lipoproteínas se prolongaron hasta por 72 horas. En todos los casos pareció no haber reducción de la respuesta aun después de numerosas inyecciones de heparina. por otra parte, estos mismos autores (3) refieren que el plasma de personas que habían recibido heparina, agregado in vitro al suero normal, alteraba el espectro lipoproteico.

En 1952, Anfinsen, Boyle y Brown (4) publicaron las fotografías del análisis con la ultracentrífuga de las preparaciones de lipoproteínas, antes y después de incubar el suero, de un enfermo de infarto del miocardio, con el factor aclarante purificado. Este factor, contenido en la fracción III-1,2,3, lo obtuvie-

ron del plasma sanguíneo extraído después de inyectar heparina a personas normales. Con la ultracentrífuga analítica cuantificaron las lipoproteínas separadas de la mezcla de incubación por centrifugación, durante 18 horas, de muestras alícuotas ajustadas previamente a la densidad de 1.063. Sus resultados indicaron que por la acción, del factor aclarante, durante 5 horas a 37°, disminuía la concentración de las lipoproteínas S_F 30-150 y de las S_F 20-30 y aumentaban las S_F 10-20. No observaron cambios en las S_F 3-10.

En la misma época, Lindgren, Freeman y Graham (5), aislaron la fracción del plasma de individuos que habían recibido heparina y que sedimentaba a una densidad mayor de 1.063 y estudiaron su efecto in vitro sobre lipoproteínas aisladas de baja densidad. Esta fracción activa, que contenía las proteínas del plasma y las lipoproteínas de alta densidad, producía la disminución o aun la desaparición de las lipoproteínas S_F 20-200 y la aparición, de novo, de lipoproteínas S_F 4-20, aun cuando en cantidades no equivalentes. Los autores comprobaron que la densidad de las moléculas producidas era semejante a la de las lipoproteínas S_F 4-20 que se encuentran en el suero humano y como identificaron oleato en el precipitado formado durante la incubación, sugirieron que como parte del mecanismo de transformación intervenía la hidrólisis de enlaces éster de los glicéridos.

También en 1952, Boyle, Bragdon y Brown (6) presentaron un estudio sobre los productos que se formaban al incubar, a 37° durante 3 horas, el plasma postheparínico de personas alimentadas con una dieta rica en grasas. En los espectros obtenidos por ultra

centrifugación de las muestras, ajustadas a la densidad de 1.21, Boyle y sus colaboradores notaron una disminución de las lipoproteínas de baja densidad, en particular de las S_f 10-20 y de las S_f 20-80, y un aumento, no consistente, del grupo S_f 3-8. También encontraron un aumento significativo en el grupo llamado, - por estos autores, $\alpha_{1,1}$, que corresponde a la clase de alta densidad. Este aumento de las lipoproteínas de alta densidad no había sido notado en los trabajos anteriores.

Shore, Nichols y Freeman (7) sugirieron, en 1953, que las transformaciones de las lipoproteínas, inducidas por heparina, - dependían de la activación de una enzima lipolítica que actuaba sobre los triglicéridos.

En contraste con las conclusiones de los trabajos anteriores, Yasugi, Gofman, de Lalla, Templin y Oshima (8), en 1958, -- mostraron por una parte, que había una correlación negativa, significativamente importante, entre los niveles de las lipoproteínas S_f 0-12 y S_f 12-20 y las concentraciones de "heparina" en la sangre y por otra, que no existía ninguna relación aparente entre los niveles de "heparina" y los de lipoproteínas con valores -- S_f mayores de 20, o con las de alta densidad. Yasugi y sus colaboradores concluyeron que, aun cuando los mecanismos no están -- claros, parece que la concentración de sustancias heparínicas fisiológicas está relacionada cuantitativamente con los niveles de algunas de las lipoproteínas plasmáticas.

Shore y Shore (9) en una comunicación breve publicada en 1959, señalaron que al incubar lipasa plasmática antiheparínica, libre de lipoproteínas de baja densidad, con lipoproteínas --

S_f 20-150, obtuvieron moléculas de movilidad electroforética muy cercana, aunque no idéntica, a las lipoproteínas normales — S_f 12-20. Por otra parte comprobaron que los ácidos aspártico y glutámico, la serina y la treonina, eran los aminoácidos NH₂-terminales, tanto de la fracción proteica de las lipoproteínas — S_f 20-150 que persistían después de la incubación, como de las — S_f 12-20 que se producían enzimáticamente de novo y de las lipoproteínas nativas S_f 20-150 y S_f 12-20. Shore y Shore sugirieron, frente a estas analogías y a la naturaleza lipolítica de la enzima, que todas las proteínas en las lipoproteínas S_f 20-150 están unidas cuando menos a triglicéridos y que existe una relación metabólica entre las lipoproteínas S_f 20-150 y las S_f 12-20.

En un trabajo presentado por De Silva (10) en 1961 y desarrollado en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología, se establecieron las condiciones óptimas para estudiar in vitro la actividad de la lipoproteína lipasa del corazón sobre las lipoproteínas del suero sanguíneo. En la mezcla de incubación, que contenía iones calcio, heparina y amortiguador — de glicina a pH 9.25, la lipasa sólo tuvo acción sobre las lipoproteínas S_f⁰ 20-400, como se juzgó por el "glicerol" liberado y esta actividad enzimática fue inhibida por las lipoproteínas — S_f⁰ 0-20, por las de alta densidad 2 + 3 y por la fracción albumina-globulinas del suero.

Shore y Shore (11) publicaron en este año 1962, mayores datos sobre su trabajo presentado anteriormente (9). Con base a las cifras obtenidas para las velocidades de flotación, la

movilidad electroforética, la clase de aminoácidos NH_2 -terminales y la composición química, nuevamente concluyen que es muy -- probable que por la acción lipolítica del plasma postheparínico las lipoproteínas S_f 11-20 se hayan formado de novo e in vitro a partir de las lipoproteínas S_f 20-400, particularmente del subgrupo S_f 20-70.

PROPOSITOS

El propósito del presente trabajo es contribuir al conocimiento de los mecanismos homeostáticos, que determinan las concentraciones relativas de las diferentes clases de lipoproteínas del plasma y en particular, estudiar sus transformaciones por efecto de la enzima lipoproteína lipasa aislada del corazón.

El análisis de los cambios del patrón lipoproteico observado in vivo como consecuencia de la inyección de heparina a un organismo (2,3), implica ciertas dificultades en cuanto a la interpretación de los resultados. En primer lugar, la heparina libera hacia el plasma en algunas especies, particularmente en el hombre, no sólo la lipasa específica para las lipoproteínas — S₂ 20-400 sino cantidades variables de una o más actividades esterolíticas o lipolíticas (12,13) y en segundo lugar, es probable que los niveles plasmáticos de las lipoproteínas sean el resultado de la intervención no sólo de agentes enzimáticos sino de otros factores homeostáticos (14,15).

En los estudios hechos anteriormente in vitro se utilizó, como preparación enzimática, con las implicaciones anotadas en el párrafo anterior, el plasma postheparínico completo (3,6) o alguna de sus fracciones separadas por precipitación (4) o por centrifugación (5,9,11) y no el extracto preparado del tejido miocárdico (16). Además, salvo algunos trabajos (5,9,11), la mayor parte de las observaciones se hicieron utilizando como sustrato el suero total (3,4,6) en vez de las lipoproteínas separadas por

ultracentrifugación y, aparte de que los cambios en los niveles de lipoproteínas transformadas resultan menos claros por estar presente un mayor número de componentes, se sabe (10) que algunos de ellos inhiben la actividad lipásica sobre las lipoproteínas — S₂ 20-400.

La densidad de 1.063 de las mezclas de incubación analizadas con la ultracentrífuga (2,3,4,5) no fue adecuada para observar cambios en las lipoproteínas de alta densidad y en la única serie (6) ajustada a 1.21 el aumento de estas lipoproteínas fue significativo.

Finalmente, debe notarse que los análisis realizados, a juzgar por las fotografías publicadas, son poco satisfactorios para su examen cuantitativo, en vista de que no se incluye el registro de la línea correspondiente al solvente y de que los trazos ópticos obtenidos con el diafragma "schlieren" de barra no son de la fineza de los proyectados por la línea metálica de la placa de fases. Además, en varios experimentos las concentraciones fueron demasiado altas, los patrones no quedaron incluidos en su totalidad en la placa fotográfica (3,4,6) y los resultados debieron ser sujetos a las correcciones propias de este tipo de análisis (18).

En resumen, para explorar y tratar de aclarar el mecanismo de acción de uno de los factores activos en la determinación de los niveles plasmáticos de lipoproteínas, convenía estudiar in vitro estas transformaciones utilizando clases definidas de lipoproteínas separadas por ultracentrifugación y enzima tisular

preparada de extractos del músculo cardíaco e incubando en las condiciones óptimas establecidas (10). Además era preciso analizar con la ultracentrífuga las alícuotas de la mezcla de incubación a la densidad de 1.20, empleando la placa de fases e incluyendo el registro de la línea basal correspondiente al solvente.

MATERIALES Y METODOS

La solución de heparina sódica Abbott contenía aproximadamente 10 mg por ml (1,000 unidades U S P).

La solución amortiguadora 1.0 M de glicina se preparó disolviendo 15.014 g de glicina (Nutritional Biochemicals Corporation) en unos 100 ml de agua, ajustando el pH a 9.45 con solución 2 M de NaOH y completando el volumen a 200 ml con agua. El pH del medio al final del periodo de incubación resultaba ser de 9.25 a 9.30. Las mediciones se hicieron con el potenciómetro Beckman Modelo G.

El agua que se utilizó para las soluciones de los componentes de la mezcla de incubación fue bidestilada en aparato de vidrio.

SEPARACION DE LAS DISTINTAS CLASES DE LIPOPROTEINAS DEL SUERO HUMANO USADAS COMO SUBSTRATO.

Las soluciones de lipoproteínas se prepararon empleando las mezclas de sueros sanguíneos, obtenidas de las personas que acuden a los laboratorios clínicos — del Instituto Nacional de Cardiología. En uno de los experimentos se usó el suero de un solo donador (Preparaciones 12 y 13).

También se prepararon soluciones de lipoproteínas a partir del suero de una enferma de xantomatosis hipercolesterolémica (Preparaciones 8, 9, 10 y 11).

Las técnicas de ultracentrifugación usadas para preparar y analizar las soluciones de las distintas clases de lipoproteí-

nas fueron las descritas en un trabajo anterior (10) y las concentraciones, medidas con la ultracentrífuga Spinco E, figuran en las Tablas 1 y 2.

Lipoproteínas S_f^{20} 20-400*.— Las soluciones de lipoproteínas S_f^{20} 20-400, seis veces concentradas con respecto a su nivel en el suero (6 Co), se obtuvieron extrayendo el mililitro superior de los 6 ml de suero que se centrifugaron durante 22 horas en la ultracentrífuga preparadora Spinco Modelo LH (10).

Las soluciones 15 Co, se prepararon centrifugando la mezcla de 5 ml de la solución 6 Co y 1 ml de solución de NaCl de densidad 1.006 y extrayendo los 2 ml superiores de cada tubo.

Las soluciones 30 Co se obtuvieron como las 15 Co, excepto que las lipoproteínas se extrajeron totalmente en el mililitro superior.

Para la separación de las lipoproteínas S_f^{20} 20-400 de la enferma de xantomatosis hipercolesterolémica, se ponían 2 ml de suero en los tubos de solución y 4 ml de solución de NaCl de densidad 1.006. Con este procedimiento el mililitro superior contenía 2 veces la cantidad de lipoproteínas S_f^{20} 20-400 presentes en el suero de la enferma (2 Co).

* S_f^{20} se usa para expresar la velocidad de flotación de las lipoproteínas de baja densidad medida en un medio de NaCl y de NaBr de densidad 1.203 g/ml, pero referida a la emigración que tienen en un medio de NaCl de densidad 1.003 g/ml (18). Esta conversión se hizo para emplear la nomenclatura de Gofman con más comodidad (19) y en base a los datos experimentales del Batte et al. (20).

Lipoproteínas de la clase S_f^0 0-20.— Después de extraer las lipoproteínas S_f^0 20-400 de los sueros normales, se desechaba el mililitro siguiente que no contenía proteínas ni lipoproteínas y a los 4 restantes se les agregaban 2 ml de solución de KCl de densidad 1.182 para ajustar la mezcla a la densidad de 1.063. Las condiciones de centrifugación y extracción fueron semejantes a las descritas anteriormente (10) y la concentración final de estas lipoproteínas resultaba ser 6 Co.

Lipoproteínas de la clase S_f^0 20-400 libres de quilomicrones.— Para separar los quilomicrones se centrifugaba el suero a 27,000 rev/min ($51,715 \times g$) y a 13° durante 30 minutos. Una vez eliminado el mililitro superior, se agregaba al residuo solución de NaCl de densidad 1.006 para restaurar el volumen inicial y, después de centrifugar la mezcla, el mililitro superior que contenía estas lipoproteínas 5 Co con respecto al suero (Preparación 12), se recogía como en las preparaciones anteriores.

En el caso del suero de la enfermedad de xantomatosis se centrifugó, en las condiciones descritas, una mezcla de 2 ml de suero y 4 ml de solución de NaCl de densidad 1.006. El residuo, después de descartar el mililitro con los quilomicrones, se restauraba a 6 ml con la solución de NaCl y la mezcla, al ser centrifugada, concentraba 1.6 veces (1.6 Co) a las lipoproteínas S_f^0 20-400 (Preparación 10).

Este método separaba no sólo los quilomicrones sino una parte de las lipoproteínas S_f^0 20-400 como se ve en los datos -

TABLA 1

SOLUCIONES DE LIPOPROTEINAS S₂ 20-400

Preparación (n ^o)	Concentración (mg/ml)	Valores Co
2	5.30	6
3	5.78	6
4 ⁺	—	30
8	34.82	2 ⁺⁺
9	28.24	2 ⁺⁺
10 ⁺⁺⁺	15.32	2 ⁺⁺
11	41.20	1.6 ⁺⁺
12 ⁺⁺⁺	1.09	6
13	2.61	5

♦ Esta preparación se hizo concentrando por centrifugación la inmediata anterior.

♦♦ El suero utilizado para estas soluciones provenía de una enferma de xantomatosis hipercolesterolémica.

+++ Las preparaciones 10 y 12 fueron hechas a partir del suero usado para las 11 y 13, respectivamente, pero libre de quilomicrones.

TABLA 2

SOLUCIONES DE LIPOPROTEINAS S₂⁰ 0-20

Preparación (n ^o)	Concentración (mg/ml)	Valores Co
2	16.74	6
3	22.00	6
4	13.38	6

de la Tabla 1 (comparar las Preparaciones 10 con 11 y 12 con 13).

PREPARACION DEL EXTRACTO ENZIMATICO.- Se usaron ratas Wistar, -- machos, de 150 a 200 g de peso, alimentadas con Api-rata (Api-Aba, S.A. México) ad libitum.

La preparación del residuo acetónico del corazón se hizo -- como está descrito en (10) y para acelerar la evaporación de la -- acetona se ventiló una hora con nitrógeno y luego se dejó 18 ho-- ras a succión continua en el desecador con CaCl_2 y a la temperatu-- ra del cuarto refrigerado (3 a 5° C).

La suspensión amoniacal del residuo acetónico se centrifu-- gó 15 minutos a 16,000 rev/min (15,000 x g), a 0°, en el cabezal 296 de la centrifuga International ER - 2 y el sobrenadante se -- liofilizó (10).

Las soluciones de los extractos enzimáticos se preparaban poco antes de iniciar cada incubación, disolviendo 33.3 mg por -- mililitro de solución 0.025 M de NH_4OH (Tabla 3).

INCUBACION.- La incubación del sistema se hizo en frascos erlen-- meyer y cada 0.8 ml de medio contenían 0.500 ml de solución -- amortiguadora 1 M de glicina - NaOH, pH 9.45; 0.010 ml de solu-- ción 2 M de CaCl_2 y 0.005 ml de la solución de heparina sódica - (50 μg). Los 0.285 ml restantes comprendían el volumen de la -- solución con la cantidad de lipoproteínas señalada en cada expe-- rimento y agua. La mezcla se tenía a la temperatura ambiente y -- la reacción se iniciaba con la adición de 0.2 ml del extracto en

TABLA 3

PREPARACIONES DEL EXTRACTO ENZIMATICO.

Preparación (n ^{da})	Número de animales.	Peso húmedo de los corazones. (g)	Residuo acetónico (% del peso húmedo)		Extracto liofilizado (g) % del Residuo acetónico	
1	30	19.6	4.12	21	1.42	38
3	25	16.6	3.68	22	0.90	28
5	25	16.6	3.41	20	1.16	34

TABLA 3

PREPARACIONES DEL EXTRACTO ENZIMATICO.

Preparación (núm)	Número de animales.	Peso húmedo de los corazones. (g)	Residuo acetónico (g)	(% del peso húmedo)	Extracto liofilizado (g)	% del Residuo acetónico
1	30	19.6	4.12	21	1.42	38
3	25	16.6	3.68	22	0.90	28
5	25	16.6	3.41	20	1.16	34

simático e incubando a 38° en un baño de agua. Los frascos eran agitados de vez en cuando durante la incubación y al tomar las muestras para los análisis. En los sistemas testigos la enzima se sustituyó con solución 0.025 M de NH_4OH . El volumen total de la mezcla de incubación fue de 10 a 30 ml y las alícuotas tomadas a los distintos tiempos fueron: a) 0.05 ml para la medición de glicerol aparente (por duplicado) y b) 3.0 a 5.0 ml para la separación y medición de las lipoproteínas.

MEDICION ESPECTOFOTOMETRICA DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.— La actividad enzimática se determinó espectofotométricamente, por la absorbencia de las alícuotas de la mezcla de incubación tratadas sucesivamente con ácido peryódico y con la mezcla sulfúrico-cromotrópico, para cuantificar formaldehído según el procedimiento de MacFadyen, modificado por Korn y descrito en (10). El color desarrollado en el volumen final de 9.45 ml de mezcla reaccionante se leyó a 570 m μ en las cubetas de 19 x 105 mm del Coleman Universal, contra un testigo de reactivos. La absorbencia de una alícuota conteniendo 100 μ mol de D-manitol fue de 0.514 ± 0.022 (desviación estándar), con un valor máximo de 0.540 y un valor mínimo de 0.457, en 37 muestras.

Los valores de la absorbencia, promedio de duplicados de la mezcla de incubación, se refirieron a la absorbencia que tenía la alícuota de 100 μ mol de manitol analizada también por duplicado en cada serie de determinaciones.

Glicerol aparente.— Las cifras obtenidas por el procedimiento anti

rior se expresan como μ molas de glicerol aparente, en vista de que la reacción no es específica para este compuesto y de que es probable que otros componentes de la mezcla incubada estén contribuyendo al valor medido.

Glicerol calculado.— El glicerol calculado para una alícuota de la mezcla de incubación tomada a un tiempo determinado, se obtuvo como la diferencia entre las μ molas de glicéridos hidrolizados de las lipoproteínas S_F^O 20-400 y las μ molas de los glicéridos fijados en las lipoproteínas S_F^O 0-20 formadas. Para calcular esta diferencia se tomaron de los análisis de las alícuotas de las mezclas de incubación, los valores en miligramos de las lipoproteínas hidrolizadas y de las formadas y se convirtieron en miligramos de glicéridos considerando, de acuerdo con Lindgren y Nichols (19), que las lipoproteínas S_F^O 20-400 contienen aproximadamente un 50% de su peso de triglicéridos y las S_F^O 0-20 un 10%. Finalmente, los miligramos de glicéridos de las lipoproteínas S_F^O 20-400 y de las S_F^O 0-20 se transformaron a μ molas de glicéridos dividiendo entre 860 y entre 872 respectivamente, cifras que representan el peso molecular de su componente triglicérido. Este triglicérido se refiere al que contiene enterificado el ácido graso promedio, que se calculó de los datos publicados por Nichols *et al.* — (20), sobre la composición porcentual de los ácidos grasos de las lipoproteínas analizadas por cromatografía en fase gaseosa.

MEDICION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA POR EL ANALISIS CON LA ULTRACENTRIFUGA.— Las alícuotas de la mezcla de incubación (3.0 ml, ex

perimentos 1, 2 y 4; 3.5 ml, experimentos 5; 4.0 ml, experimentos 6 y 5.0 ml, experimentos 7) se recibían en los tubos de la ultracentrífuga que contenían NaBr, pesado en la proporción de 230 mg por ml de alícuota. Esta cantidad de sal (2.2 M), además de inactivar a la lipasa (17), era la calculada para ajustar la densidad de 1.022 g/ml de la mezcla de incubación a 1.203. Después de disolver el NaBr se completaba a 6 ml ("alícuotas diluidas") con una solución de NaBr y NaCl de densidad 1.203 ± 0.001 (281.6 g de NaBr y 11.33 g de NaCl por litro).

Las soluciones se centrifugaban en el rotor 40.3 de la ultracentrífuga preparadora Spinco Modelo LH, durante 22 horas a 38,000 rev/min ($103,300 \times g$) y a 12°C .

El mililitro de la parte superior, que contenía todas las lipoproteínas, se transfería cuidadosamente con un gotero a un tubo aforado de 1 ml. En algunos casos se formaba un precipitado sobre la pared del tubo, lo que probablemente no permitió la extracción completa de las lipoproteínas.

En los dos primeros experimentos se midió la densidad de las "alícuotas diluidas" (Tabla 4) antes de centrifugarlas y en los cuatro últimos la del 1.5 ml subyacente al que contenía las lipoproteínas después de la centrifugación ("solución subyacente") (Tabla 5). En todos los casos la centrifugación preparadora se hizo a las densidades anotadas en las Tablas. A partir de estos valores, se calculó la cantidad de NaBr que debía ser agregada a las soluciones para tener la densidad de 1.203 antes de proceder al análisis cuantitativo de las lipo-

proteínas.

Una vez ajustada la densidad, se transferían 0.45 ml de la muestra incubada a uno de los sectores de la celda doble de la ultracentrífuga analítica Spinco Modelo E y 0.45 ml de la solución solvente al otro sector y se centrifugaban a 42,040 rev/min ($133,637 \times g$) a 26°C . En esta forma se tenían superpuestos en la fotografía los trazos, de los gradientes del índice de refracción (dn/dx) en función de la distancia del centro de rotación (x), correspondientes a la muestra con lipoproteínas y al solvente. La deformación del trazo de la solución solvente representa la redistribución de los iones salinos durante la centrifugación; de esta manera, a cualquier distancia del centro de rotación, la diferencia entre el trazo de la línea basal y el de las lipoproteínas corresponde a los gradientes debidos fundamentalmente a estas últimas. Además, como se usaba el rotor para dos celdas, se analizaban simultáneamente las alícuotas de la mezcla con enzima (trazo superior de las fotografías) y sin enzima (trazo inferior), utilizando la lente angular y la lente plana ordinaria en cada celda, respectivamente.

Durante el análisis se tomaban manualmente fotografías a los 0, 2, 14 y 64 minutos después de alcanzarse la velocidad de 42,040 rev/min, para visualizar la gama completa de las diferentes clases de lipoproteínas.

El tiempo para acelerar el motor de la centrífuga del reposo a la velocidad de 42,040 rev/min fue de 4 min 30 seg. -

TABLA 4

DENSIDADES DE LAS ALICUOTAS DE LA MEZCLA DE INCUBACION.

(Alicuotas diluidas)

Tiempo de - incubación (min)	Densidades (g/ml)	
	Experimento 1	Experimento 2
0	1.189	1.190
	1.189	1.191
30	1.188	—
	1.190	—
60	1.190	1.191
	1.191	1.191

Los valores de cada par corresponden, el primero a la mezcla de incubación con enzima y el segundo al testigo sin enzima.

TABLA 5

DENSIDADES DE LAS ALICUOTAS DE LA MEZCLA DE INCUBACION.

(Solución subyacente)

Experimento (min)	Densidades (g/ml)
4	1.192 1.191
5 (1)	1.187 1.184
5 (11)	1.186 1.184
6 (a)	1.182 1.183
6 (b)	1.182 1.182
7 (a)	1.176 _____
7 (b)	1.175 _____

Los valores de onda par corresponden, el primero a la mezcla con enzima y el segundo al testigo sin enzima, ambas alícuotas se tomaron al iniciarse la incubación.

La emigración de las lipoproteínas en ese periodo, se consideró equivalente a la que hubieran tenido sujetas a la velocidad máxima un tiempo igual al tercio del periodo de aceleración o sea 90 segundos (18).

Cálculo de los resultados.— Las fotografías de los trazos se amplificaban cinco veces y en los dibujos obtenidos se marcaban los límites de migración para cada clase de lipoproteínas. Las distancias de los límites (x_2) con respecto al centro de rotación del rotor se calcularon mediante la ecuación establecida por Svedberg y Katsurai (21) para el coeficiente de flotación:

$$S_f = - \frac{2.303}{\omega^2 (t_2 - t_1)} \log \frac{x_2}{x_1}$$

S_f : coeficiente de flotación de la clase de lipoproteínas, considerado a la densidad de 1.20 (22) y expresado en cm/seg/dina/gramo (diferente del valor numérico que en este trabajo se expresa como S_f^0)

ω : velocidad angular durante el análisis, igual a $2\pi \times 42,040/60$, rev/seg.

t_2 : tiempo en segundos a que se tomó la fotografía después de haber alcanzado la velocidad de 42,040 rev/min, más el tiempo equivalente del periodo de aceleración (90 seg)

t_1 : tiempo cero

x_2 : distancia en centímetros desde el centro de rotación — hasta el límite de emigración de la banda de lipoproteínas, al tiempo t_2

x_1 : distancia del centro de rotación a la base de la pieza — central de la celda, igual a 7.215 cm.

El valor encontrado para x_2 se multiplicó por el factor de amplificación de los lentes de la cámara (2.14) y por la amplificación del dibujo (5 veces), para poder usar esta distancia a la escala del dibujo de los trazos.

Una vez limitadas las bandas en los dibujos, se midió — su superficie con un planímetro ($\text{cm}^2 \pm 0.1$) y estas áreas se convertían a unidades de concentración aplicando la fórmula derivada por Pickels (18).

$$C = \frac{A}{N} \frac{1000 \tan \theta}{L T H \pi R^2 \Delta r}$$

C : miligramos de lipoproteínas contenidas en un mililitro de la solución analizada

A : área en cm^2 de la banda de lipoproteínas, promedio de 2 ó 4 mediciones

N : factor por el cual se concentraron las lipoproteínas duran

te la ultracentrifugación preparadora o sea el volumen de la alícuota de la mesola de incubación.

θ : ángulo de la línea metálica de la placa de fases con respecto a la hendidura luminosa

1000: factor de corrección de las unidades

L : distancia en milímetros del centro de la lente condensadora superior a la placa de fases

T : espesor en milímetros de la pieza central de la celda o sean los milímetros del espesor de solución que atraviesan los rayos de la lámpara de mercurio

M : amplificación del radio de la pieza central de la celda o sea de la distancia entre el vértice y su base y que equivale a la amplificación del sistema óptico de la cámara fotográfica

m : amplificación de la distancia entre las paredes laterales de la pieza central de la celda, y que equivale a la amplificación por la lente cilíndrica

E : amplificación del dibujo con respecto a la fotografía

Δr : incremento de la refracción específica de las lipoproteínas con respecto a la solución salina de fondo, expresada en 100 ml/g.

Algunos de estos factores son constantes porque dependen unos del método y otros de las características de la ultracentrífuga. En este estudio los valores y sus desviaciones fijadas empíricamente son las siguientes:

$$\begin{aligned}
 \theta &= 45^\circ \\
 L &= 577.4 \pm 0.3 \text{ mm} \\
 T &= 12.0 \pm 0.3 \text{ mm} \\
 M &= 2.14 \pm 0.03 \\
 n &= 3.74 \pm 0.03 \\
 E &= 5 \\
 \Delta r &= 0.00145 \pm 0.00005 \frac{100 \text{ ml}}{\text{g}}
 \end{aligned}$$

El valor 0.00145 para Δr — corresponde a todas las clases de lipoproteínas (22), cuando se analizan en un medio de NaBr de densidad 1.20

Con estos valores se calculó el siguiente factor constante:

$$\frac{1000 \tan \theta}{L T M n E^2 \Delta r} = 0.50 \pm 0.05$$

Por otra parte, el área de los dibujos debería equivular estrictamente a la concentración de las lipoproteínas, pero como cada análisis se hace cuando la solución ya no es homogénea, es necesario corregir por la deformación debida a los efectos de la concentración radial y a la no homogeneidad del campo centrifugo en toda la extensión de la celda. Con tal propósito, — una vez calculadas las concentraciones, con la ecuación de — Pickels, se corrigieron mediante la siguiente fórmula (18):

$$C_0 = C (x/x_1)^2$$

C_0 : concentración corregida de las lipoproteínas para conocer su concentración inicial en la solución analizada (mg/ml)

C : concentración calculada con la ecuación de Pickels — (mg/ml)

x_1 : distancia del centro de rotación a la base de la pieza — central de la celda, 7.215 cm

x : distancia en centímetros del centro de rotación a la línea, perpendicular a la basal, que divide el área del patrón lipoproteico en dos partes iguales.

Aunque el trazo de esta línea, se hace a juicio personal, se pueden seguir algunas directivas generales. Cuando el área considerada es la de un triángulo sensiblemente isósceles,

con su lado menor sobre la línea basal, la línea que la divide en dos partes aproximadamente iguales pasa por el vértice. Si el área semeja un cuadrilátero rectángulo, se toma como referencia la línea perpendicular a la mitad de su base. Por último, y este es el caso más frecuente, si el área tiende a parecerse a un triángulo rectángulo, uno de cuyos catetos queda sobre la línea basal y el otro sobre uno de los límites de emigración, entonces la perpendicular al tercio de la longitud del cateto basal, medida esta distancia a partir de su intersección con el otro cateto, dividirá el área en dos partes tanto más iguales cuanto más regular sea la forma triangular del área.

Finalmente, como las velocidades de flotación de las diferentes clases de lipoproteínas permanecen casi constantes, en los márgenes de concentración analizados, el efecto Johnston-Ogston es mínimo (22) y en consecuencia no se aplicó corrección alguna por esta deformación.

RESULTADOS

EFFECTO DE LA LIPASA SOBRE LAS LIPOPROTEINAS S_F^0 20-400.- La concentración de las soluciones de lipoproteínas S_F^0 20-400 usadas como substratos, varió desde 0.23 hasta 8.2 miligramos por mililitro de mezcla de incubación al tiempo cero (Tabla 6). En los experimentos 1, 2, 7(a) y 7(b) se emplearon soluciones de lipoproteínas de sueros normales y en los 4, 5(1), 6(a) y 6(b) las preparadas a partir del suero de una enferma de xantomatosis hipercolesterolémica; para los experimentos 6(a) y 7(a) se usaron lipoproteínas de sueros libres de quilomicrones.

Libерación de glicerol aparente (Tabla 7).- En todos los casos la enzima hidrolizó de las lipoproteínas S_F^0 20-400 uno o varios compuestos cromogénicos reconocidos con el reactivo cromotrópico-sulfúrico. La velocidad de liberación de estos compuestos formaldehídicos, referidos como glicerol aparente, fue sensiblemente constante en las dos primeras horas de incubación en el experimento 4 y en la primera hora de los experimentos 1 y 7(b), esto es, tanto con lipoproteínas de suero normal como con aquellas de la enferma de xantomatosis hipercolesterolémica. Por otra parte, en el experimento 5, en el que se usaron lipoproteínas de esta enferma, pero en cantidad diez veces menor, la actividad aunque siguió aumentando después de la primera hora de incubación no se mantuvo constante más allá de este tiempo. La enzima liberó iguales cantidades de "glicerol", cuando actuaba sobre cantidades semejantes de-

substrato, sin distinguir si las lipoproteínas provenían del suero de xantomatosis (Experimento 5) o del suero normal (Experimento 1). Finalmente, aun cuando los experimentos 6 y 7 parecen ilustrar que hay una mayor liberación de glicerol al usar lipoproteínas preparadas de suero completo, debe tenerse en cuenta que las concentraciones de substrato son menores en las soluciones preparadas de los sueros sin quilomicrones (Tabla 6).

Cambios en la concentración de las lipoproteínas (Tabla 8 y 9) (Figuras 1, 2, 3, 4, 5 y 6).— La lipasa produjo en todas las mezclas incubadas, disminución de las lipoproteínas S_F^0 20-400, usadas como substrato y, lo que es más importante, determinó la aparición de las lipoproteínas de las subclases S_F^0 12-20 y S_F^0 0-12. En los casos en que se usó suero normal para la preparación de lipoproteínas, la degradación de la subclase S_F^0 20-100 fue mayor que la de la S_F^0 100-400 (Experimentos 1, 2, 7(a) y 7(b); mientras que con las lipoproteínas aisladas del suero de la enfermedad de xantomatosis, resultó una mayor degradación de la subclase S_F^0 100-400 (Experimentos 4, 5(1), 6(a) y 6(b). En ningún caso las fotografías tomadas a los 64 minutos mostraron la presencia de lipoproteínas de alta densidad 2 + 3. Los resultados en los experimentos 1 y 2 fueron muy semejantes entre sí.— En el experimento 4 con lipoproteínas del suero de xantomatosis, hubo degradación tanto de las lipoproteínas S_F^0 100-400 como de las S_F^0 20-100 en las primeras dos horas de incubación y luego no se observó cambio en las tres horas siguientes; la formación

TABLA 6

CARACTERISTICAS DE LAS MEZCLAS DE INCUBACION
CON SUBSTRATO S₂⁰ 20-400

Incubación (min)	Preparación enzimática (min)	SOLUCION DE LIPOPROTEINAS Preparación (min)	Concentración - en la mezcla de incubación. (mg/ml)
1	1	2	0.91 0.83
2	1	4	1.2 1.2
4	3	8	6.5 8.2
5(1)	3	9	0.97 0.79
6(a)	5	10	1.8 1.8
6(b)	5	11	3.3 3.4
7(a)	5	12	0.23
7(b)	5	13	0.43

Cada par de valores se refiere a la cantidad de sustrato medido al tiempo cero en la mezcla de incubación con enzima y sin enzima respectivamente.

En las incubaciones min. 6 y min. 7 se usaron lipoproteínas sin quilomicrones (a) y con quilomicrones (b).

TABLA 7

LIBERACION ENZIMATICA DE MATERIAL FORMALDEHIDROGENO USANDO
COMO SUESTRATO LIPOPROTEINAS S₂ 20-400.

Tiempo de incubación. (min)	Δ Absorbencia alícuota (0.05 ml)
Experimento 1	
30	0.093
	0.005
60	0.174
	0.013
Experimento 2	
60	0.210
	0.000
Experimento 4	
30	0.148
	0.000
60	0.328
	0.000
120	0.680
	0.020
180	0.945
	0.015
240	1.09
	0.012

TABLA 7
(continuación)

Tiempo de incubación. (min)	Δ Absorbencia alícuota (0.05 ml)
Experimento 5(1)	
60	0.190 - 0.016
120	0.234 - 0.009
180	0.226 - 0.019
240	0.241 - 0.013
Experimento 6(a)	
60	0.224 0.000
120	0.335 0.003
Experimento 6(b)	
60	0.260 - 0.013
120	0.480 - 0.008

TABLA 7
(continuación)

Tiempo de incubación. (min)	Δ Absorbencia alícuota (0.05 ml)
Experimento 7(a)	
Experimento 7(b)	

Los valores de cada par corresponden, el primero a la mezcla de incubación con enzima y el segundo al testigo sin enzima.

de las S_F^0 12-20 fué mayor en la primera hora y no se modificó - a partir de la segunda; las del grupo S_F^0 0-12 parece que continuaban apareciendo a lo largo de las cuatro horas de incubación, si el valor encontrado en la primera hora no se toma en cuenta o bien, si los valores de la segunda y de la tercera hora son bajos por errores de manipulación (ver métodos), entonces la cantidad formada de este grupo no cambia a partir de la primera hora de incubación. Los datos de los experimentos 5(1), - 6(a) y 6(b), con las lipoproteínas del suero anterior, pero a menor concentración, muestran que la clase S_F^0 20-400 disminuyó sólo en la primera hora y, asimismo, las lipoproteínas S_F^0 0-20 formadas lo fueron sólo en ese lapso. Los experimentos 7(a) y 7(b) ilustran que estas degradaciones y formaciones son muy rápidas y ocurren en los primeros treinta minutos de incubación. Es aparente también que los valores medidos en las alícuotas - de las mezclas de incubación que contenían lipoproteínas preparadas de sueros completos, fueron mayores que en aquéllas de - los sueros a los que se les habían quitado los quilomicrones. Finalmente debe observarse que en ausencia de lipasa no hay - cambios significativos en las concentraciones de las lipoproteínas.

TABLA 8

CONCENTRACIONES MEDIDAS EN LOS ANALISIS
CON LA ULTRACENTRIFUGA

Tiempo de - incubación (min)	CLASES DE LIPOPROTEINAS (mg/3.0 ml de mezcla de incubación)			
	100 - 400	20 - 100	12 - 20	0 - 12
Experimento 1				
0	0.64 0.69	2.1 1.8	—	—
60	0.00 0.66	0.60 1.6	0.38 0.081	0.17 0.00
Experimento 2				
0	0.97 0.92	2.6 2.8	—	—
60	0.20 1.0	1.2 2.7	0.62 0.00	0.075 0.00
Experimento 4*				
0	11. 15.	8.5 9.6	0.16 0.040	0.00 0.00
60	6.7 14.	7.1 9.6	0.84 0.31	0.68 0.00
120	3.8 16.	4.8 7.7	1.1 0.0	0.18 0.00
180	2.5 12.	4.2 7.7	1.2 0.0	0.39 0.00
240	2.5 15.	4.2 8.6	1.1 0.081	0.70 0.00

* Estos muestras se diluyeron 1:2 para su análisis en la ultracentrífuga.

TABLA 8
(continuación)

Tiempo de - incubación (min)	CLASES DE LIPOPROTEÍNAS (mg/3.5 ml de mezcla de incubación)			
	100 - 400	20 - 100	12 - 20	0 - 12
Experimento 5(1)				
0	2.4 1.9	1.0 0.88	—	—
60	0.17 1.8	0.70 0.91	0.21 0.00	0.13 0.00
120	0.26 1.8	0.85 0.92	0.27 0.00	0.22 0.00
180	0.14 2.3	0.34 1.1	0.24 0.00	0.11 0.00
240	0.14 2.1	0.48 1.1	0.28 0.00	0.11 0.00

TABLA 8
(continuación)

Tiempo de - incubación (min)	CLASES DE LIPOPROTEINAS (mg/4.0 ml de mezcla de incubación)			
	100 - 400	20 - 100	12 - 20	0 - 12
Experimento 6(a)				
0	3.0	4.2	0.17	0.00
	2.7	4.3	0.091	0.00
60	1.1	2.9	0.91	0.41
	2.5	4.0	0.00	0.00
120	0.46	2.1	0.79	0.46
	2.3	3.6	0.00	0.00
Experimento 6(b)				
0	7.2	6.0	0.025	0.00
	7.6	5.9	0.00	0.00
60	1.5	2.3	0.36	0.053
	8.5	6.7	0.020	0.00
120	1.5	2.8	0.70	0.50
	9.8	5.7	0.00	0.00

TABLA 8
(continuación)

Tiempo de - incubación (min)	CLASES DE LIPOPROTEINAS (mg/5.0 ml de mezcla de incubación)			
	100 - 400	20 - 100	12 - 20	0 - 12
Experimento 7(a)				
0	0.34	0.79	0.10	0.00
30	0.00	0.13	0.34	0.46
60	0.00	0.16	0.11	0.62
120	0.00	0.059	0.13	0.55
Experimento 7(b)				
0	0.73	1.4	0.33	0.00
30	0.023	0.55	0.46	0.23
60	0.00	0.32	0.42	0.92
120	0.00	0.12	0.21	0.73

Los valores de cada par corresponden el primero a la mezcla de incubación con enzima y el segundo al testigo sin enzima.

Los apóstrofes significan que no se hicieron los análisis respectivos.

TRANSFORMACIONES DE LAS LIPOPROTEINAS DEL SUERO
POR ACCION DE LA LIPASA DEL CORAZON

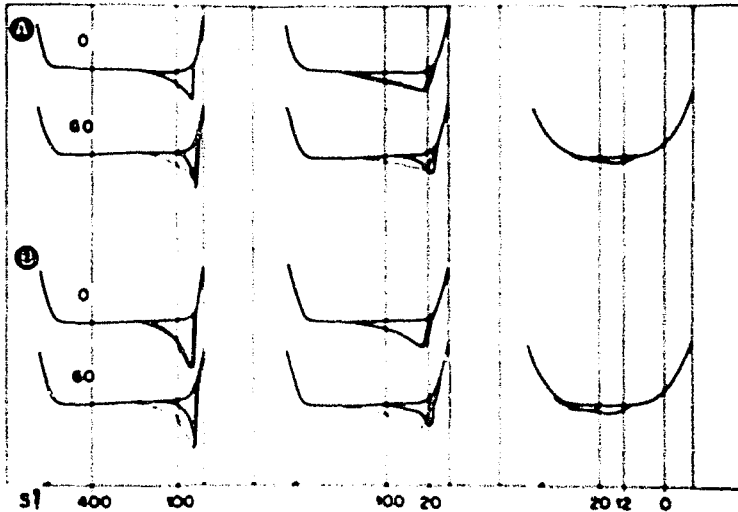


FIGURA 1

Análisis con la ultracentrífuga de las mezclas de incubación con enzima (trazo continuo) y sin enzima (trazo interrumpido).— Las cifras de la izquierda indican el tiempo de incubación en minutos y las líneas verticales los límites de los valores S_{20}^0 correspondientes a cada clase de lipoproteínas. Cuando la superposición de los trazos fue completa sólo se dibujó uno de ellos (A : Experimento 1; B : Experimento 2).

TRANSFORMACIONES DE LAS LIPOPROTEINAS DEL SUERO
POR ACCION DE LA LIPASA DEL CORAZON

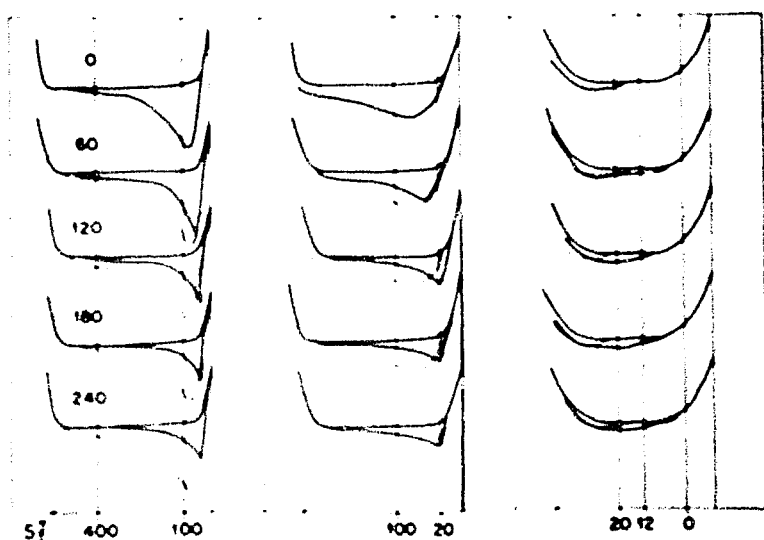


FIGURA 2

Análisis con la ultracentrífuga de las mezclas de incubación con enzima (trazo continuo) y sin enzima (trazo interrumpido).— Las cifras de la izquierda indican el tiempo de incubación en minutos y las líneas verticales los límites de los valores S_{20}^0 correspondientes a cada clase de lipoproteínas. — Cuando la superposición de los trazos fue completa sólo se dibujó uno de ellos (Experimento 4).

TRANSFORMACIONES DE LAS LIPOPROTEINAS DEL SUERO
POR ACCION DE LA LIPASA DEL CORAZON

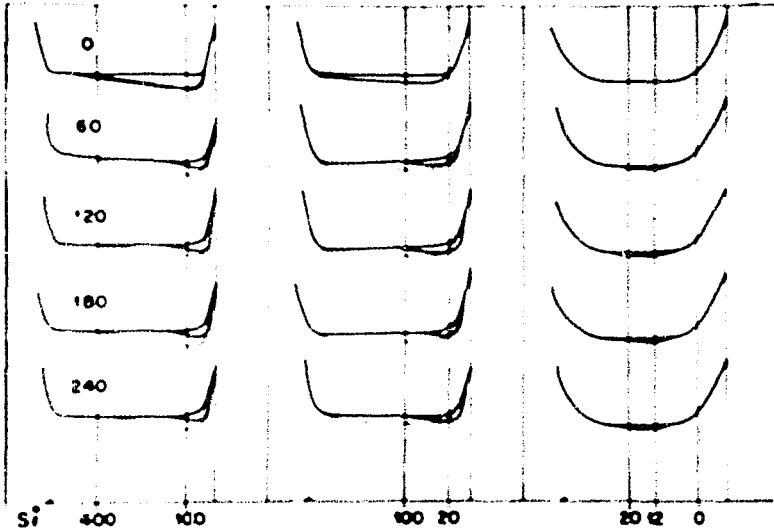


FIGURA 3

Análisis con la ultracentrífuga de las mezclas de incubación con enzima (trazo continuo) y sin enzima (trazo interrumpido).— Las cifras de la izquierda indican el tiempo de incubación en minutos y las líneas verticales los límites de los valores S_0^0 correspondientes a cada clase de lipoproteínas. La superposición de los trazos fué completa a los tiempos cero. Los trazos para la mezcla sin enzima, que permanecieron iguales a los del tiempo cero, no se dibujaron en todos los casos (Experimento 5(1)).

TRANSFORMACIONES DE LAS LIPOPROTEINAS DEL SUERO
POR ACCION DE LA LIPASA DEL CORAZON

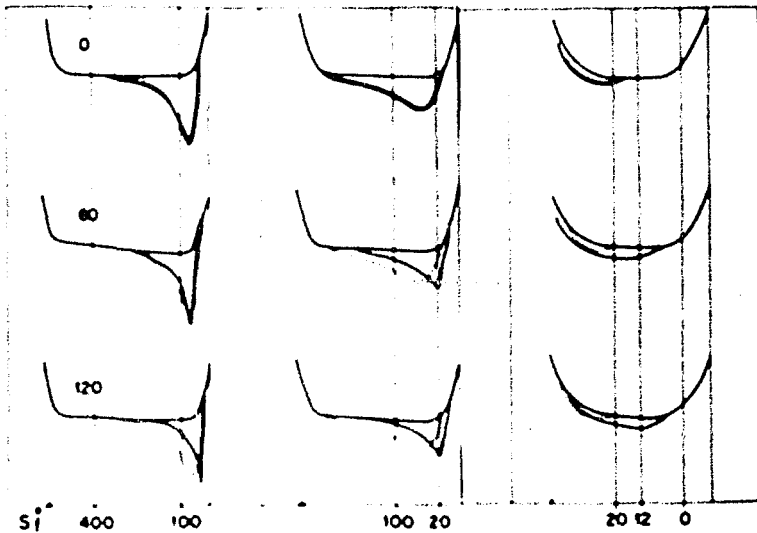


FIGURA 4

Análisis con la ultracentrífuga de las mezclas de — incubación con enzima (trazo continuo) y sin enzima (trazo in-
terumpido).— Las cifras de la izquierda indican el tiempo de
incubación en minutos y las líneas verticales los límites de
los valores S_2^0 correspondientes a cada clase de lipoproteínas
(Experimento 6(a)).

TRANSFORMACIONES DE LAS LIPOPROTEINAS DEL SUERO POR ACCION DE LA LIPASA DEL CORAZON

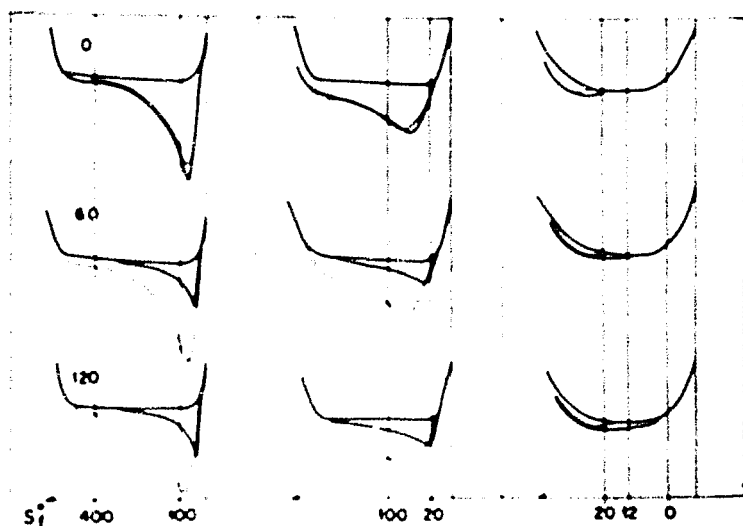


FIGURA 5

Análisis con la ultracentrífuga de las mezclas de incubación con enzima (trazo continuo) y sin enzima (trazo interrumpido).— Las cifras de la izquierda indican el tiempo de incubación en minutos y las líneas verticales los límites de los valores S_{20}^0 correspondientes a cada clase de lipoproteínas (Experimento 6(b)).

TRANSFORMACIONES DE LAS LIPOPROTEINAS DEL SUERO POR ACCION DE LA LIPASA DEL CORAZON

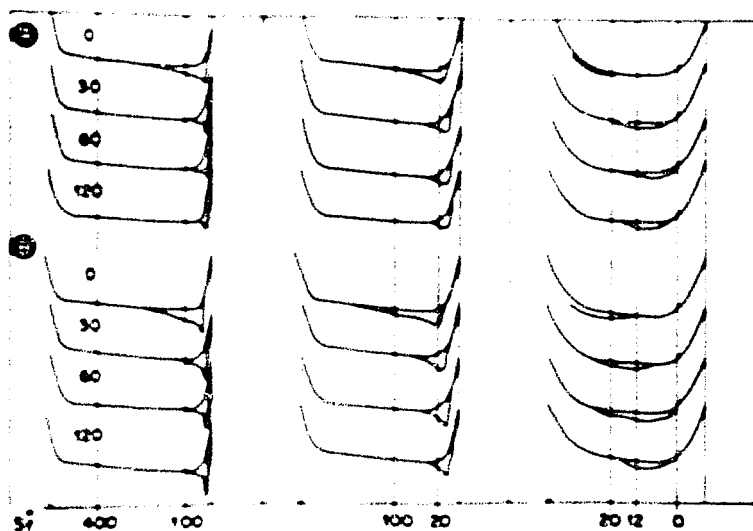


FIGURA 6

Análisis con la ultracentrífuga de las mezclas de incubación con enzima.- Las cifras de la izquierda indican el tiempo de incubación en minutos y las líneas verticales los límites de los valores S_{20}^0 correspondientes a cada clase de lipoproteínas (A : Experimento 7(a); B : Experimento 7(b)).

TABLA 9
CAMBIO EN LA CONCENTRACION DE LAS LIPOPROTEINAS
POR EFECTO DE LA LIPASA DEL CORAZON

Tiempo de - incubación (min)	CLASE DE LIPOPROTEINAS (mg/ml ^o)			
	S _f ^o 100-400	S _f ^o 20-100	S _f ^o 12-20	S _f ^o 0-12
Experimento 1				
60	- 0.21 - 0.01	- 0.50 - 0.07	+ 0.13 + 0.03	+ 0.06 0.00
Experimento 2				
60	- 0.26 + 0.03	- 0.47 - 0.03	+ 0.21 0.00	+ 0.03 0.00
Experimento 4				
60	- 1.4 - 0.3	- 0.46 0.00	+ 0.22 + 0.09	+ 0.23 0.00
120	- 2.4 + 0.3	- 1.2 - 0.63	+ 0.31 - 0.01	+ 0.06 0.00
180	- 2.8 - 1.0	- 1.4 - 0.63	+ 0.34 - 0.01	+ 0.13 0.00
240	- 2.8 0.0	- 1.4 - 0.33	+ 0.31 + 0.01	+ 0.23 0.00
Experimento 5(1)				
60	- 0.64 - 0.02	- 0.09 + 0.01	+ 0.06 0.00	+ 0.04 0.00
120	- 0.61 - 0.02	- 0.04 + 0.01	+ 0.08 0.00	+ 0.06 0.00
180	- 0.65 + 0.11	- 0.19 + 0.06	+ 0.07 0.00	+ 0.03 0.00
240	- 0.65 + 0.06	- 0.15 + 0.06	+ 0.08 0.00	+ 0.03 0.00

* Mililitros de mezcla de incubación.

TABLA 9
(continuación)

Tiempo de - incubación (min)	CLASES DE LIPOPROTEÍNAS (mg/ml*)			
	S _F ⁰ 100-400	S _F ⁰ 20-100	S _F ⁰ 12-20	S _F ⁰ 0-12
Experimento 6(a)				
60	- 0.47 - 0.05	- 0.32 - 0.08	+ 0.18 - 0.02	+ 0.10 0.00
120	- 0.64 - 0.10	- 0.52 - 0.17	+ 0.16 - 0.02	+ 0.12 0.00
Experimento 6(b)				
60	- 1.4 + 0.22	- 0.92 + 0.20	+ 0.08 0.00	+ 0.01 0.00
120	- 1.4 + 0.55	- 0.80 - 0.05	+ 0.17 0.00	+ 0.12 0.00
Experimento 7(a)				
30	- 0.068	- 0.13	+ 0.05	+ 0.09
60	- 0.068	- 0.13	0.00	+ 0.12
120	- 0.068	- 0.15	+ 0.01	+ 0.11
Experimento 7(b)				
30	- 0.14	- 0.17	+ 0.03	+ 0.05
60	- 0.15	- 0.22	+ 0.02	+ 0.18
120	- 0.15	- 0.26	- 0.02	+ 0.15

*Mililitros de mezcla de incubación.

Los valores de cada par corresponden, el primero a la mezcla de incubación con enzima y el segundo al control sin enzima.

Los signos (-) indican desaparición y los (+) formación de las lipoproteínas correspondientes con respecto al valor medido al iniciarse la incubación.

COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS POR LOS DOS METODOS DE ANALISIS.

Con el objeto de comparar la medición espectrofotométrica - del glicerol aparente con el balance de las lipoproteínas obtenido por los análisis con la ultracentrífuga, se obtuvieron las cifras correspondientes al glicerol medido y al calculado, respectivamente (Tabla 10). En todos los casos (Figuras 7 a 12), excepto en la alícuota de los 60 min del experimento 6(b), la cantidad de material cromógeno medido fue 1.2 a 2.7 veces mayor que el calculado. Al parecer dicha discrepancia se hace mayor a lo largo del período de incubación (Experimentos 4, 6(b), 7(a) y 7(b)) (Figuras 9, 11 y 12) aunque esto no sucedió en todos los casos (Experimentos 5(i) y 6(a)) (Figuras 10 y 11).

TABLA 10

COMPARACION DE LOS RESULTADOS

Periodo de incubación (min)	GLICEROL (m/μmoles/ml/ng*)		Relación A/B
	Medido con el reactivo cromotrópico A	Calculado del balance de las lipoproteínas B	
Experimento 1			
60	99	58(80)	1.7
Experimento 2			
60	120	62(105)	1.9
Experimento 4			
60	190	159	1.2
120	392	310	1.3
180	546	360	1.5
240	629	359(570)	1.7
Experimento 5(1)			
60	109	64	1.7
120	134	55	2.4
180	129	72	1.8
240	138	68(85)	2.0

*Mililitros de mezcla de incubación y miligramos de extracto enzimático.

Las cifras entre paréntesis se refieren al glicerol calculado de la cantidad inicial de lipoproteínas 39, 20-400 usadas como sustrato.

TABLE 10
(continuación)

Periodo de incubación (min)	GLICERIL (m Amolios/ml/mg*)		Relación A/B
	Medido con el reactivo cromotrópico A	Calculado del balance de las lípido-proteínas B	
Experimento 6(a)			
60	129	64	2.0
120	194	96(157)	2.0
Experimento 6(b)			
60	150	201	0.7
120	277	187(288)	1.5
Experimento 7(a)			
30	29	15	1.9
60	36	15	2.4
120	50	17(21)	2.9
Experimento 7(b)			
30	36	26	1.4
60	61	29	2.1
120	78	34(38)	2.3

*Mililitros de mezcla de incubación y miligramos de extracto enzimático.

Las cifras entre paréntesis se refieren al glicerol calculado de la cantidad inicial de lípido y proteína S₂ 20-400 usando como estándar 10.

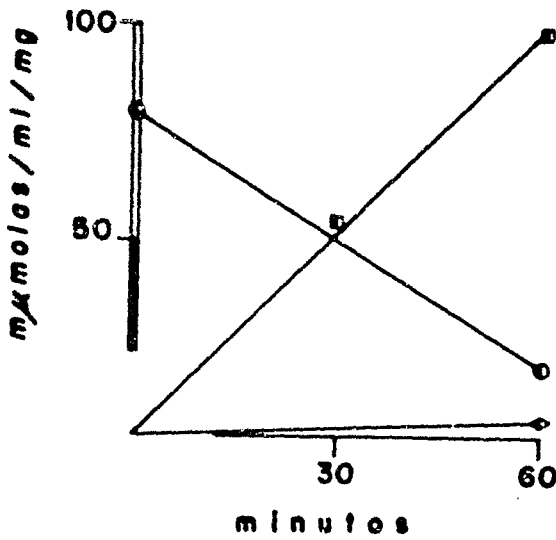


FIGURA 7

Comparación del glicerol medido (■—■) con el -
 calculado de las lipoproteínas hidrolizadas S₂ 20-400 —
 (●—●) y de las lipoproteínas formadas S₂ 0-20 —
 (◊—◊), durante la incubación con lipasa (Experimento
 1).

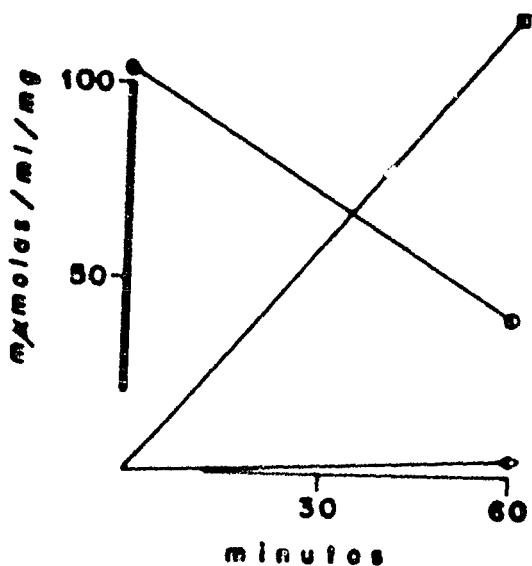


FIGURA 8

Comparación del glicerol medido (□—□) con el -
calculado de las lipoproteínas hidrolizadas S_1^{20-400} —
(○—○) y de las lipoproteínas sintetizadas S_1^{0-20} -
(◀—◀), durante la incubación con lipasa (Experimento
2.)

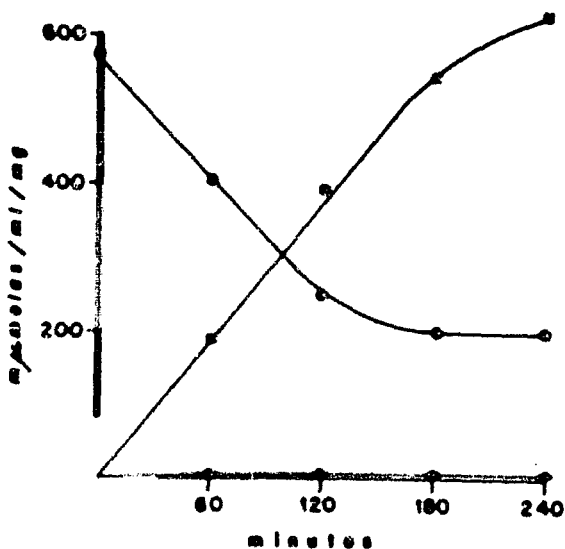


FIGURA 9

Comparación del glicerol medido (■—■) con el -
calculado de las lipoproteínas hidrolizadas S_F^0 20-400 —
(●—●) y de las lipoproteínas sintetizadas S_F^0 0-20 —
(◈—◈), durante la incubación con lipasa (Experimento -
4).

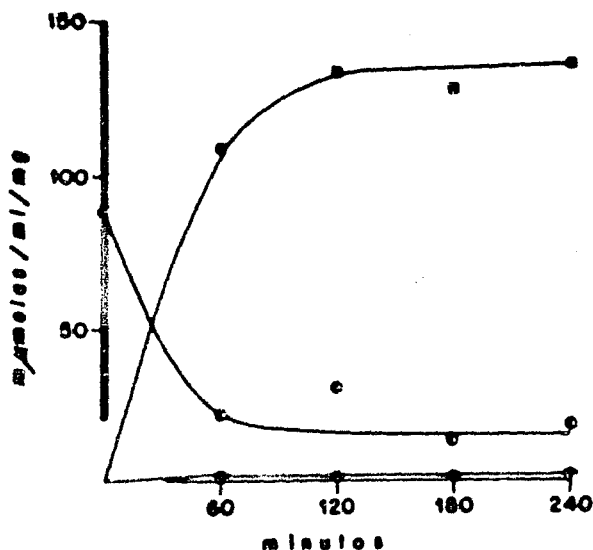


FIGURA 10

Comparación del glicerol medido (■—■) con el -
 calculado de las lipoproteínas hidrolizadas S_F^0 20-400 —
 (●—●) y de las lipoproteínas sintetizadas S_F^0 0-20 —
 (◊—◊), durante la incubación con lipasa (Experimento -
 1(1)).

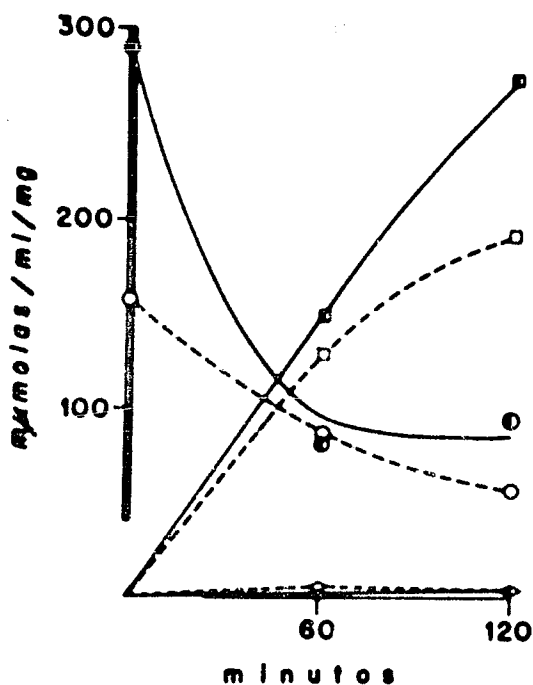


FIGURA 11

Comparación del glicerol medido (■—■) con el calculado de las lipoproteínas hidrolizadas S_F^{20-400} (●—●) y de las lipoproteínas sintetizadas S_F^{0-20} (◊—◊), durante la incubación con lipasa (Experimento 6(b)).

Las gráficas marcadas con líneas interrumpidas corresponden a experimentos similares, pero usando lipoproteínas — preparadas del suero al que se le quitaron los quilomicrones — por ultracentrifugación previa (Experimento 6(a)).

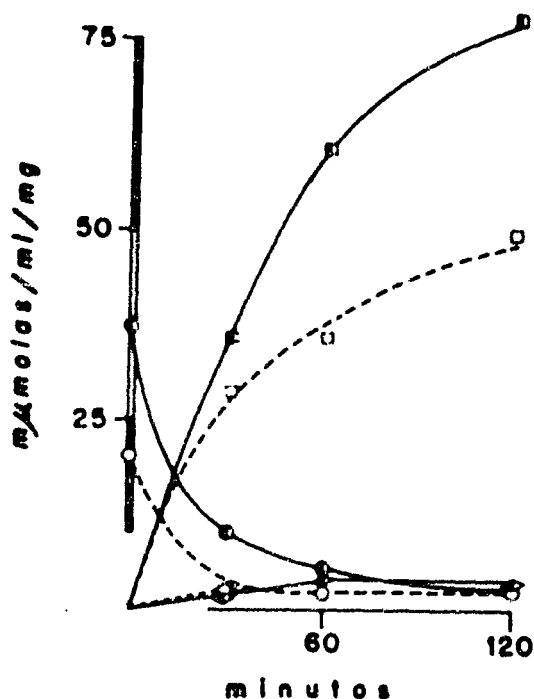


FIGURA 12

Comparación del glicerol medido (■—■) con el calculado de las lipoproteínas hidrolizadas S_F^0 20-400 (●—●) y de las lipoproteínas sintetizadas S_F^0 0-20 (◄—◄), durante la incubación con lipasa (Experimento 7 (b)).

Las gráficas marcadas con líneas interrumpidas corresponden a experimentos similares, pero usando lipoproteínas preparadas del suero al que se le quitaron los quilomicrones - por ultracentrifugación previa (Experimento 7 (a)).

EFFECTO DE LA LIPASA SOBRE LAS LIPOPROTEINAS S_f^0 0-20.- Se estudió la acción de la lipasa sobre las lipoproteínas S_f^0 0-20, una vez que se había dializado su solución contra agua bidestilada para reducir la concentración de las sales NaBr y KBr (10). Las condiciones de incubación fueron análogas a las usadas para el sustrato S_f^0 20-400. (Tabla 11). A juzgar tanto por la medida del glicerol aparente como por la cuantificación de las lipoproteínas - con la ultracentrifuga analítica (Tabla 12), no se observó acción de la enzima sobre las lipoproteínas S_f^0 0-20 (Figura 13).

TABLA 11

CARACTERISTICAS DE LAS MEZCLAS DE INCUBACION CON
SUBSTRATO S_2^0 0-20

Incubación (min)	Preparación enzimática (min)	SOLUCION DE LIPOPROTEINAS**	
		Preparación (min)	Concentración de la mezcla de incubación ⁺ (mg/ml)
5(11)	3	2+3+4	1.54
			1.34

* El par de valores se refiere a la cantidad de sustrato medida al tiempo cero en la mezcla de incubación con enzima y - sin enzima, respectivamente.

** La mezcla de soluciones de estas lipoproteínas (8.8 ml) se dializó durante 3 horas contra 1,000 ml de agua bidestilada (3 cambios). La concentración final de Na^+ y K^+ fue de 0.4 y - 3.2 meq/l, respectivamente.

TABLA 12

RESULTADOS DE LA INCUBACION
DE LA LIPASA CON LIPOPROTEINAS S_F⁰ 0-20 .

Tiempo de - incubación (min)	<u>Δ Absorbencia</u>		<u>Lipoproteínas S_F⁰ 0-20 (mg)</u>	
	<u>alícuota (0.05 ml)</u>		<u>alícuota (3.5 ml)</u>	
Experimento 5 (11)				
60	-	0.003	-	0.16
		C.008		0.08
120		0.008		0.09
	-	0.008		0.17
180		0.012	-	0.12
	-	C.014		0.17
240		0.018	-	0.17
	-	0.015		0.01

La mezcla de incubación contenía 0.100 ml de solución -
dializada de lipoproteínas S_F⁰ 0-20 y los componentes descritos
en Materiales y Métodos.

Los valores de cada par corresponden el primero a la --
mezcla de incubación con enzima y el segundo al testigo sin en-
zima.

TRANSFORMACIONES DE LAS LIPOPROTEINAS DEL SUERO
POR ACCION DE LA LIPASA DEL CORAZON

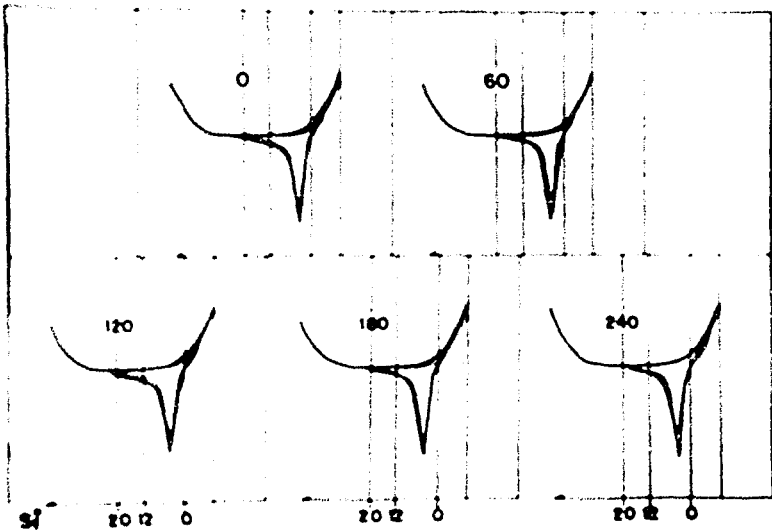


FIGURA 13

Análisis con la ultracentrífuga de las mezclas de incubación con enzima (trazo continuo) y sin enzima (trazo interrumpido).— Las cifras en los cuadros indican el tiempo de incubación en minutos y las líneas verticales los límites de los valores 3_2^0 correspondientes a cada clase de lipoproteínas (Experimento 5 (11)).

DISCUSION

No hubo diferencias cualitativas entre las lipoproteínas preparadas del suero de personas normales y las de la enferma de xantomatosis hipercolesterolémica (Tabla 7) (Figura 14), al menos desde el punto de vista de su utilización como sustrato por la lipasa cardiaca y juzgando por el material formaldehidógeno liberado (glicerol aparente); lo que sugiere que en este padecimiento no hay formación de moléculas diferentes a las fisiológicas y que la alteración metabólica se manifiesta por la acumulación de lipoproteínas S_z^0 20-400, particularmente de las S_z^0 100-400, con estructuras semejantes a las normales.

En todos los experimentos el "glicerol" medido fue función únicamente de la cantidad de sustrato agregado y las diferentes preparaciones enzimáticas tuvieron iguales actividades por miligramo de extracto (Figura 14).

Las diferencias en los resultados con sustratos obtenidos de los sueros que se centrifugaron para separarles los quilomicrones y los de sueros completos, fueron sólo cuantitativas (Figuras 11 y 12) y al parecer debidas a la menor cantidad de lipoproteínas 20-400 presentes en el correspondiente sustrato (Experimentos 6(a) y 6(b), 7(a) y 7(b)).

Los datos de las Tablas 8 y 9 y el estudio de los trazos obtenidos al analizar con la ultracentrífuga las alícuotas de la mezcla de incubación (Figuras 1 a 6), muestran que la lipasa del corazón utiliza las lipoproteínas S_z^0 20-400 como sustrato y for-

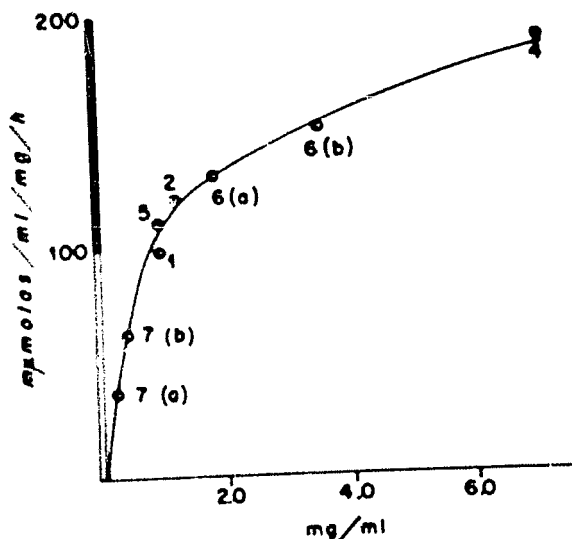


FIGURA 14

El glicerol medido ($\mu\text{moles/ml/mg/h}$) dependió de la — cantidad de lipoproteínas S_f^{20-400} usadas como sustrato (mg/ml de mezcla de incubación) y la actividad de las preparaciones en — zimas. En los diferentes experimentos fue semejante. — Las oí — fras anotadas en los puntos de la gráfica se refieren al número del experimento correspondiente (datos de las Tablas 6 y 10).

na lipoproteínas que por sus características de flotación — corresponden a las S_f^0 0-20 fisiológicas. Aunque es necesario — otro tipo de caracterización para confirmar la semejanza entre ambos grupos, es posible que los datos obtenidos por Shore y — Shore (11), sobre composición química y compartimiento electroforético de las lipoproteínas formadas por el plasma postheparínico, sean aplicables a los resultados presentados aquí y re — fuercen la posibilidad de que estas lipoproteínas sintetizadas in vitro sean semejantes a las nativas.

La acción hidrolítica de la enzima sobre las lipoproteínas S_f^0 20-400 ocurrió solamente en la primera hora de incubación (Experimentos 5, 6(b), 7(a) y 7 (b)) (Figuras 10, 11 y — 12); aunque en algunos casos se prolongó dos horas (Experimentos 4 y 6(a)) (Figuras 9 y 11). La formación de las S_f^0 0-20 se limitó a los primeros 60 minutos en todos los experimentos incluyendo el 4 y 6(a) (Figuras 9, 10, 11 y 12). Esto es, con excepción de estos dos últimos, la formación de lipoproteínas — S_f^0 0-20 ocurrió únicamente durante la hidrólisis de las — S_f^0 20-400.

Si se consideran separadamente las subclases S_f^0 100-400 y S_f^0 20-100, se observa que la lipasa actuó tanto sobre uno como sobre otro de estos grupos (Tablas 8 y 9); pero en los casos en que el sustrato contenía una mayor proporción de las lipoproteínas S_f^0 100-400 como fueron las soluciones preparadas — del suero de la enferma de xantomatosis (Experimentos 4, 5(1),

TABLA 13

**RELACIONES ENTRE LA PARTE PROTICA DE LAS LIPOPROTEINAS
HIDROLIZADAS Y LAS FORMADAS POR LA LIPASA**

Tiempo de - incubación (min)	Proteína - lipolíticas* (según la muestra de incubación)					
	S ₂ 100-400	S ₂ 10-100	S ₂ 20-400	S ₂ 10-20	S ₂ 0-10	S ₂ 0-20
Experimento 1						
60	0.021	0.050	0.071	0.030	0.015	0.047
Experimento 2						
60	0.026	0.047	0.073	0.032	0.007	0.039
Experimento 4						
60	0.140	0.046	0.186	0.035	0.037	0.112
120	0.240	0.120	0.300	0.077	0.015	0.092
180	0.280	0.140	0.420	0.085	0.032	0.117
240	0.280	0.140	0.420	0.077	0.037	0.134
Experimento 5(1)						
60	0.064	0.009	0.073	0.015	0.010	0.025
120	0.061	0.004	0.065	0.020	0.015	0.035
180	0.065	0.019	0.074	0.018	0.007	0.025
240	0.065	0.015	0.070	0.020	0.007	0.027

* Los porcentajes usados en las columnas de proteínas para todo el grupo de lipoproteínas S₂ 20-400 y para el de S₂ 0-20 fueron 10 y 25 respectivamente (19).

TABLA 1) (continuación)

Tiempo de - incubación (min.)	Proteínas calculadas* (mg/ml de muestra de incubación)					
	S_2^0 100-400	S_2^0 20-100	S_2^0 20-400	S_2^0 10-20	S_2^0 0-12	S_2^0 0-20
Experimento 6 (a)						
60	0.047	0.032	0.079	0.045	0.025	0.070
120	0.044	0.032	0.126	0.040	0.030	0.070
Experimento 6 (b)						
60	0.140	0.072	0.132	0.080	0.062	0.021
120	0.140	0.060	0.220	0.042	0.030	0.072
Experimento 7 (a)						
30	0.007	0.013	0.020	0.012	0.022	0.034
60	0.007	0.013	0.020	0.000	0.030	0.030
120	0.007	0.015	0.022	0.002	0.027	0.029
Experimento 7 (b)						
30	0.014	0.017	0.031	0.007	0.012	0.019
60	0.015	0.021	0.037	0.005	0.045	0.050
120	0.015	0.021	0.041	0.000	0.037	0.037

* Los porcentajes están en los cálculos de proteínas para todo el grupo de lipoproteínas S_2^0 20-400 y para el de S_2^0 0-20 fueron 10 y 25 respectivamente (19).

6(a) y 6(b)), la mayor degradación fue la de dicho subgrupo y en los sustratos de sueros normales, con una mayor proporción de la subclase S_F^0 20-100 (Experimentos 1, 2, 7(a) y 7(b)), ésta fue la más hidrolizada.

En lo que se refiere a la relación cuantitativa entre las lipoproteínas S_F^0 20-100 hidrolizadas y las S_F^0 0-20 formadas y tomando como base la cantidad de proteínas que figura en la composición respectiva de cada clase (19), los datos calculados a partir de los cambios observados con la ultracentrífuga (Tabla 13) parecen sugerir que en la parte proteica correspondiente a las lipoproteínas de la subclase 20-100 la que aparece casi cuantitativamente en las lipoproteínas S_F^0 0-20 formadas (Experimentos 1, 2, 4, 5 (1) y 6 (b)). Esta correspondencia no siempre se observa y así en algunos experimentos, 6(a), 7(a) y 7(b)), la cantidad calculada de proteínas derivadas de las S_F^0 20-100 degradadas no alcanza para constituir la parte proteica de las S_F^0 0-20 formadas, precisamente cuando se usó sustrato del que se habían separado quilomicrones y una parte de lipoproteínas S_F^0 100-400 y que por lo mismo contenía una cantidad baja de lipoproteínas hidrolizables. Sin embargo, es posible que en tales soluciones no haya lipoproteínas S_F^0 100-400 o que su cantidad sea pequeña y que entonces el área que se ve en el análisis con la ultracentrífuga correspondiera únicamente al grupo S_F^0 20-100. Por todo esto puede sugerirse, a título de hipótesis para trabajos posteriores, que la parte proteica de las lipoproteínas 0-20 formadas in vitro proviene únicamente de la parte proteica de las lipoproteínas

20-100 hidrolizadas en esas condiciones.

Ahora bien, para explicar esta conversión por efecto de un extracto que se supone actúa sólo por su capacidad lipolítica, es necesario aceptar que la parte proteica de las moléculas de lipoproteínas S_F^0 20-100 y S_F^0 0-20, es fundamentalmente la misma y que existe como complejo lipoproteico muy semejante en ambas clases. La conformación molecular de cada tipo de macromolécula sería debida a la forma y proporción en que estén agrupados estos complejos por un núcleo o matriz, que en el caso de las S_F^0 20-100 sería esencialmente de triglicéridos. La lipoproteína lipasa al hidrolizar ciertos enlaces, al parecer exclusivamente glicéridos, liberaría subunidades lipoproteicas que directamente constituyen macromoléculas de los grupos S_F^0 0-20. De no ser así habría que aceptar que el extracto enzimático no sólo tiene múltiples actividades sino que éstas se ponen en juego en las condiciones de incubación, cosa nada probable. Los resultados de Shore y Shore (11) al comprobar que los aminoácidos NH_2 -terminales son los mismos para ambas clases de lipoproteínas, y aunque esta comunidad de aminoácidos no necesariamente signifique que los componentes proteicos sean idénticos, apoyan la posibilidad de estas interconversiones y dan base a la posible presencia de cadenas lipoproteicas complejas como subunidades comunes a ambas lipoproteínas.

Por otra parte, el resto de las lipoproteínas S_F^0 20-400 y en particular de la subclase S_F^0 100-400, que no parecen convergir en lipoproteínas S_F^0 0-20, posiblemente formen grupos de -

lipoproteínas no reconocibles con el método utilizado, como serían aquéllas de muy baja densidad y alto peso molecular, con valores S_2^0 mayores de 400 que por no ser suficientemente discretas para marcar límites de flotación definidos y por dispersar la luz intensamente, pasarían inadvertidos al análisis; o bien puede ser que los restos de estas moléculas no identificables y de densidad mayor de 1.20, se encuentren en la fracción proteica que sedimenta.

Shore y Shore (11) encontraron radioactividad en la fracción del fondo de la solución centrifugada y la atribuyen al intercambio de I^{131} a lo largo del experimento en el que utilizaron lipoproteínas marcadas con I^{131} y plasma postheparínico. Puede ser esa la explicación o bien que efectivamente se formen productos de densidad mayor de 1.20.

El hecho de que se haya medido una mayor cantidad de material formaldehídrico que la equivalente al balance de las lipoproteínas degradadas y de las formadas e inclusive mayor que la cantidad de glicéridos puestos en la mezcla de incubación como lipoproteínas S_2^0 20-400 (Tabla 10), así como el dato de que la liberación de dicho material cromogénico se haya prolongado más tiempo que aquel en que ocurre la desaparición de lipoproteínas (Figuras 9, 10, 11 y 12), plantea las siguientes posibilidades: a) que la conversión de las lecturas de absorbencia del complejo formaldehído-cromotrópico a milimicromolas de glicerol no sea correcta. Si fuese esto, la discrepancia tendría un valor constante en todos los experimentos y además las cifras

no seguirían aumentando cuando ya no se mide desaparición - de lipoproteínas. A mayor abundancia, la corrección del método cuantitativo se valoró usando como patrones D-manitol, glicerol y β -glicerofosfato y en los tres casos la equivalencia con los valores teóricos fue satisfactoria (23).

- b) que el exceso de material cromogénico se derive de una contaminación del sustrato lipoproteínas S_F^{20} 20-400 por quilomicrones. Se puede excluir esta posibilidad porque la discrepancia se siguió observando en las soluciones que no tenían quilomicrones por haber sido sometido el suero a centrifugación preliminar.
- c) que las mediciones de las lipoproteínas en las alícuotas de la mezcla de incubación, no fuesen correctas por los siguientes motivos:
 - i) durante la centrifugación de las alícuotas acumuló, (ver Materiales y Métodos) cerca del mililitro del sobrenadante que contenía las lipoproteínas, un precipitado adherido a la pared del tubo, en el que podría haberse quedado involucrada una porción de estas lipoproteínas y
 - ii) es probable que durante los períodos y bajo las condiciones de la ultracentrifugación se pierda una parte de las lipoproteínas por desnaturalización o por las maniobras mismas del método, como parecen indicarlo las discrepancias entre la cantidad de lipoproteínas calculada de —

acuerdo con la concentración de la solución usada (Tabla 1) y la que se midió posteriormente en la alícuota de la mezcla de incubación al tiempo cero en cada experimento (Tabla 6). Para aclarar este último punto, se sometió una muestra de lipoproteínas, obtenida por el método descrito a un segundo periodo de centrifugación semejante al primero y los datos (24) muestran que hay pérdida de lipoproteínas en todas las condiciones de densidad estudiadas, incluyendo aquellas semejantes a las de los análisis de las mezclas de incubación. El hecho de que estos errores no sean constantes en los diferentes análisis está de acuerdo con las condiciones que parecen producirlos.

Es muy probable que las pérdidas discutidas en i) y en ii), expliquen parcialmente la falta de equivalencia de los datos mencionados.

d) existe una tercera posibilidad, que la lipasa libere durante la incubación otros compuestos cromogénicos aparte del glicerol. Estos compuestos podrían ser azúcares, y en particular galactosa, manosa y glucosamina, que recientemente se han encontrado entre los componentes de las moléculas de lipoproteínas 3^0 20-400 (25). Este problema está siendo investigado en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardioloxía (23).

A pesar de esta falta de equivalencia cuantitativa en—

tre los dos métodos de análisis utilizados, es indudable que la lipasa hidroliza a las lipoproteínas S_2^0 20-400 y que el componente proteico y lipídico de las S_2^0 0-20 formadas, se deriva enteramente de aquel sustrato.

Al igual que Shore y Shore (11) no se encontraron en el presente estudio lipoproteínas de alta densidad producidas por la lipólisis de las S_2^0 20-400.

La observación anteriormente hecha (10) en el sentido — de que no se libera "glicerol" de las lipoproteínas S_2^0 0-20, se ha corroborado ahora con el análisis en la ultracentrífuga de — las alícuotas de la mezcla de incubación. Por lo tanto, se puede concluir que en las condiciones experimentales utilizadas, — la enzima hidroliza solamente el grupo S_2^0 20-400 y no actúa sobre las S_2^0 0-20.

Finalmente, debe dejarse asentado que es necesario lograr una separación más discreta de las diferentes clases de lipoproteínas y una preparación más purificada de la lipoproteína lipasa para obtener datos precisos sobre las conversiones de estas moléculas plasmáticas y su posible significación metabólica.

CONCLUSIONES

Se estableció que la lipoproteína lízana, preparada del corazón de la rata, hidroliza in vitro a las lipoproteínas del plasma humano de la clase S_f^0 20-400 y forma, particularmente a partir del subgrupo S_f^0 20-100, a lipoproteínas con características de flotación semejantes a las S_f^0 0-20 fisiológicas.

Se comprobó que el material formaldehídgeno medido en exceso del que corresponde a la cantidad de lipoproteínas S_f^0 20-400 utilizada como sustrato, no deriva de quilomicrones que contaminen la muestra.

Se sugiere que la falta de equivalencia entre el método colorimétrico que mide material formaldehídgeno y la ultracentrífuga que mide las lipoproteínas en las alícuotas de la mezcla de incubación, aunque en parte depende de la manipulación y de los efectos de la ultracentrifugación repetida de las muestras, parece deberse a que la reacción colorimétrica está midiendo material formaldehídgeno derivado no sólo del glicerol, originalmente presente en los triglicéridos de las lipoproteínas, sino de otros compuestos.

Se demostró que la parte proteica y lipídica de las lipoproteínas S_f^0 0-20 formadas in vitro derivan de las S_f^0 20-100 y se propone que las moléculas de lipoproteínas S_f^0 20-100 y las de S_f^0 0-20 tienen complejos lipoproteicos comunes que no se modifican por la reacción de la lízana y que las lipoproteínas S_f^0 20-100 parecen contener estos complejos agrupados en una ma-

triz o núcleo de triglicéridos, que al ser atacado por la lipasa libera agrupamientos lipoproteicos en una matriz con diferente proporción de lípidos y con características de flotación semejantes a las lipoproteínas S_f^0 0-20.

Se demostró, incidentalmente, que en la enfermedad de xantomatosis hipercolesterolémica utilizada para estudio, y que contiene en su plasma un exceso de lipoproteínas S_f^0 20-400 — en relación con las personas normales, la desviación metabólica parece debida a una acumulación de lipoproteínas S_f^0 100-400, que conservan las características de las lipoproteínas normales, al menos desde el punto de vista de su utilización como sustrato por la lipasa.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Gofman, J.W., Lindgren, P., Elliot, H., Mantz, W., Hewitt, J., Strisover, B., Herring, V. y Lyon, T.P.: The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis, *Science*, 111, - 166 (1950).
- 2.- Graham, D.M., Lyon, T.P., Gofman, J.W., Jones, H.B., Yan-
kley, A. y Simonton, J.: The influence of heparin on lipo-
protein metabolism and atherosclerosis, *Circulation*, 4, -
465 (1951).
- 3.- Graham, D.M., Lyon, T.P., Gofman, J.W., Jones, H.B., Yan-
kley, A., Simonton, J. y White, S.: Blood lipids and human
atherosclerosis, II-The influence of heparin upon lipopro-
tein metabolism, *Circulation*, 4, 666-673 (1951).
- 4.- Anfinsen, C.B., Boyle, E. y Brown, R.K.: The role of hepa-
rin in lipoprotein metabolism, *Science*, 115, 583-586 (1952).
- 5.- Lindgren, P.T., Freeman, N.K. y Graham, D.M.: In vitro li-
poprotein transformations, *Circulation*, 6, 474-475 (1952).
- 6.- Boyle, E., Bragdon, J.H. y Brown, R.K.: Role of heparin in
vitro degradation of alpha₂ lipoproteins in human plasma, -
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 81, 475-477 (1952).
- 7.- Shore, B., Nichols, A.V. y Freeman, N.K.: Evidence for li-
polytic action by human plasma obtained after intravenous
administration of heparin, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, -
83, 216-220 (1953).
- 8.- Yanagi, T., Gofman, J. W., de Lalla, O., Tamplin, A.R., y -
Oshima, K.: Relationship of blood heparin levels to serum
lipoproteins and cholesterol levels in fasting subjects, -
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 98, 46-49 (1958).
- 9.- Shore, B. y Shore, V.: Action of lipoprotein lipase on hu-
man B₂ 20-50 lipoprotein, *Federation Proc.*, 18, 323 (1959).
- 10.- De Silva-Rufo, M.M.: Caracterización de la actividad lipá-
sica de un extracto de plasma sobre las lipoproteínas --
del suero sanguíneo, Tesis Profesional, Escuela Nacional -
de Medicina y Quirúrgica, U.N.A.M., México (1961).
- 11.- Shore, B. y Shore, V.: Some Physical and Chemical proper-
ties of the lipoprotein released by lipolysis of human se-
rum B₂ 20-50 lipoprotein by post-heparin plasma, *J. Athero-
scler. Res.*, 4, 114-116 (1962).

- 12.- Shore, B. y Shore, V.: Heparin released lipolytic and esterolytic activities of human and rabbit plasmas, *Am. J. Physiol.*, 201 (5), 915-922 (1961).
- 13.- Hall, D.A.: The characterization of a new lipolytic enzyme in pancreatic extracts, *Biochem. J.*, 78, 491-499 (1961).
- 14.- Connor, W.E. y Eckstein, J.W.: The removal of lipoprotein-lipase from the blood by the normal and diseased liver, *J. Clin. Invest.*, 38, 1746-1755 (1959).
- 15.- Marsh, J.B. y Wherret, A.P.: The synthesis of plasma lipoprotein by rat liver, *J. Biol. Chem.*, 234, 3196-3200 (1959).
- 16.- Korn, E.D.: The assay of lipoprotein lipase in vivo and in vitro, en *Methods of Biochemical Analysis*, editado por D. Glick, Interscience Publishers, Inc., New York, Vol. 7, — pag. 168-170 (1959).
- 17.- Calva, E., García-Hernández, M., de Silva-Rubio, M. y Méndez, R.: Lipoprotein lipase activity from rat heart on human serum lipoproteins (para ser publicado).
- 18.- De Lalla, G.F. y Gofman, J.W.: Ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins, en el libro *Methods of Biochemical Analysis*, editado por D. Glick, Interscience Publishers, Inc., New York, Vol. 1, pag. 459-478 (1954).
- 19.- Lindgren, P.T. y Nichols, A.V.: Structure and function of human serum lipoproteins, en el libro *The plasma Proteins*, editado por F.W. Putnam, Academic Press, New York and London, Vol. 2, pag. 16-25 (1960).
- 20.- Nichols, A.V., Rehnberg, C.B. y Lindgren, P.T.: Gas chromatographic analysis of fatty acids from dialyzed lipoproteins, *J. Lipid Res.*, 2, 203-207 (1961).
- 21.- Svedberg, T. y Petersen, K.O.: *The Ultracentrifuge*, Oxford Univ. Press, London and New York, Johnson Reprint Corporation, New York, pag. 273 (1940).
- 22.- Del Balso, L., Lindgren, P.T. y Nichols, A.V.: Ultracentrifugal method for the determination of serum lipoproteins, *Anal. Chem.*, 31, 1127-1132 (1959).
- 23.- Calva, E. y Aoki-Maki, K.: Comunicación personal.
- 24.- Calva, E., García-Hernández, M. y Méndez, R.: Datos no publicados.
- 25.- Abraham, S., Billyard, L.A. y Shalkoff, I.L.: Components of serum and egg yolk lipoproteins: galactose, mannose, glucose, nine and stearic acid, *Arch. Biochem. Biophys.*, 89, 74-78 (1960).