

23

BIBLIOTECA  C. QUIMICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Ciencias Químicas



ACTIVIDAD DE LA LIPOPROTEINA LIPASA
DEL CORAZON HUMANO.

TESIS PROFESIONAL

KAZUKO AOKI MAKI

MEXICO, D. F.

1963



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Ciencias Químicas

ACTIVIDAD DE LA LIPOPROTEINA LIPASA
DEL CORAZON HUMANO.

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 :

KAZUKO AOKI MAKI

MEXICO, D. F.

1963



**A mis padres,
con cariño e infinita gratitud**

A mi abuelita y hermanos

Al Dr. Edmundo Calva
Con eterno agradecimiento

A mi escuela

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

C O N T E N I D O

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

ANTECEDENTES Y PROPOSITOS

En un trabajo presentado por De Silva (1) 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 de la rata . De Silva demostró la especificidad de esta enzima sobre las lipoproteínas del suero con valores S_f^0 20-400, mediante el análisis colorimétrico del glicerol liberado al hidrolizarse los triglicéridos lipoproteicos.

Posteriormente en el mismo Departamento de Bioquímica, Mendoza (2), en 1962, confirmó la acción de la lipoproteína lipasa sobre las lipoproteínas S_f^0 20-400 haciendo el análisis cuantitativo con la ultracentrífuga de las muestras incubadas y comprobó experimentalmente que el grupo de lipoproteínas S_f^0 0-12 y S_f^0 12-20 se originaba de las lipoproteínas S_f^0 20-400.

En los trabajos anteriores, por razón de mayor disponibilidad, se utilizó como tejido con actividad enzimática el corazón de la rata y como sustrato las lipoproteínas concentradas del suero sanguíneo humano. El sistema era heterólogo en cuanto al origen de sus componentes. Con objeto de estudiar este mismo sistema, pero con preparaciones de una sola especie animal, se planeó el presente trabajo en el que tanto la enzima como el sustrato procedieran de su-

jetos humanos. Además, al disponerse de todas las partes del corazón de pacientes recién muertos, se trató de saber si la actividad enzimática tenía alguna distribución particular en este órgano, que permitiera aportar mayores datos sobre el papel fisiológico de la lipoproteína lipasa.

MATERIALES Y METODOS

Solución amortiguadora 1 M de glicina-NaOH.- Se preparó disolviendo 15.014 g de glicina en 100 ml de agua, ajustando el pH a 9.45 con solución 2 M de NaOH y aforando a 200 ml con agua.

Solución 2 M de CaCl_2 .- Se disolvieron 294.06 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en unos 200 ml de agua y se completó el volumen a un litro.

Solución de heparina sódica Abbott conteniendo 1000 unidades U.S.P./ml (aproximadamente 10 mg/ml).

El agua utilizada durante los experimentos fué bidestilada en aparato de vidrio.

Preparación de las lipoproteínas de la clase S_f^{20-400} (Lp 20-400).- Las mezclas de sangre humana se dejaban coagular a la temperatura del laboratorio durante 60 minutos y luego eran centrifugadas a 3,000 rev/min. El suero se transfería a tubos de celulosa de 6.5 ml de capacidad, poniendo 0 ml en cada uno, y se centrifugaban durante 22 horas a 35,000 rev/min y a una temperatura de 12 grados, en la ultracentrífuga preparadora Spinco Modelo LH. Después de transcurrido este tiempo las lipoproteínas se acumulaban en el mililitro superior y este volumen se extraía con todo cuidado con una pipeta capilar. La solución de lipoproteínas se conservaba en el cuarto refrigerado a 4°C. La determinación cuantitativa de estas lipoproteínas se hacía con la ultracentrífuga -

analítica Spinco Modelo E por la técnica descrita en un trabajo anterior (1).

Las concentraciones de las soluciones utilizadas como substrato figuran en la tabla 1.

Preparación del extracto de lipasa del corazón humano

Se usaron dos tipos de materiales: a) las orejuelas de la aurícula izquierda del corazón, obtenidas de los pacientes operados en el Instituto Nacional de Cardiología, a los que se les practicaba comisurotomía de la válvula mitral y b) el corazón de cadáveres humanos. En este último caso se tomaron muestras de diferentes partes del corazón con el objeto de estudiar la distribución de la actividad lipásica.

La orejuela se recibía en la sala de operaciones en un vaso sumergido en hielo y transcurrían alrededor de 20 a 30 minutos desde la obtención del material hasta el proceso de extracción. En cambio los tejidos de anfiteatro se tomaban de 8 a 10 horas después de muerto el individuo, conservándose el cadáver en el refrigerador del anfiteatro tan luego como era conveniente. Después de pesar los tejidos (5 a 20 g de cada una de las partes del corazón humano y el fragmento completo de orejuela), se fragmentaban y homogeneizaban en la licuadora a alta velocidad durante 60 segundos con 20 volúmenes de acetona enfriada (entre -20 y 0°C) y la suspensión resultante se filtraba con succión a través de papel filtro Whatman 1. El precipitado se reextraía con la licuadora en un volumen semejante al primero de acetona. En la segunda filtración el re

siduo obtenido se secaba por succión durante más o menos una hora, aplicándole una membrana de "parafilm" en vez de pasarle una corriente de nitrógeno como se hacía anteriormente para eliminar el exceso de acetona. El material obtenido ("residuo acetónico") se dejaba toda la noche en un desecador -- con CaCl_2 a succión continua. Todas las manipulaciones se -- efectuaban en el laboratorio refrigerado a 4°C .

Posteriormente, el residuo acetónico se extraía en -- frío con solución 0.025 M de NH_4OH (50 mg de residuo acetónico por mililitro de solución amoniacal) durante una hora con agitación continua y el material insoluble se separaba centrifugando la mezcla 15 min a 16,000 rev/min (15,000 x g) a 0°C en el cabezal 296 de la Centrífuga Internacional FR-2. -- Finalmente el líquido sobrenadante se liofilizaba en un aparato Virtis . El producto obtenido (extracto liofilizado) -- siempre se conserva en un desecador con vacío y a 4°C .

Los rendimientos de cada preparación se encuentran -- expuestos en las tablas 2,3 y 4.

Las soluciones de los extractos enzimáticos liofilizados se preparaban unos minutos antes de ser utilizadas y -- usando como solvente la solución 0.025 M de amoniacal.

Las preparaciones de corazones de rata, utilizadas -- como control, se hacían con el procedimiento descrito, obteniéndose un producto menos compacto y más fácil de cortar -- con tijeras que en el caso del material humano.

Incubación. - Las condiciones y la composición del me

dio para la incubación de las muestras de los extractos de tejidos humanos, fueron semejantes a las utilizadas para los extractos de rata (Figuras 8 y 9), excepto que, debido a la menor actividad enzimática específica de aquéllos, se usaron 20 miligramos de extracto liofilizado por mililitro de mezcla de incubación, en vez de 6.7 mg. El medio contenía: 0.500 ml de solución amortiguadora 1 M de glicina-NaOH, 0.010 ml de solución 2 M de CaCl_2 , 0.005 ml de solución de heparina sódica, 0.035 ml de agua, 0.250 ml de solución de Lp 20-400, y 0.200 ml de extracto enzimático. Con la adición de la enzima se iniciaba la reacción.

La preparación de la mezcla de incubación se efectuaba a temperatura ambiente y una vez tomadas las muestras iniciales para su análisis, se ponían a incubar a 38°C en un baño de agua.

En los sistemas testigos la enzima se substituía con solución 0.025 M de NH_4OH y en el caso de omitir cualquiera de los otros componentes el volumen del sistema se completaba con agua bidestilada.

Análisis.- La actividad enzimática se determinó por tres diferentes métodos: I.- Medición colorimétrica del glicerol (aparente) con el reactivo del ácido sulfúrico-ácido cromotrópico II.- Medición de la concentración de las lipoproteínas con la ultracentrífuga y III.- Medición enzimática del glicerol con el sistema glicerol cinasa- α D- glicerofosfato - deshidrogenasa.

Medición colorimétrica del glicerol (aparente)..-Las muestras de 0.050 ml se recogían en tubos de centrifuga mantenidos en hielo, conteniendo 0.1 ml de H_2SO_4 1 N. La determinación del glicerol se hizo por el procedimiento de Mac Fadyen, modificado por Korn y descrito en (1). 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 espectrofotómetro Coleman Universal.- La absorbencia de una alícuota conteniendo 100 m μ molas de D-manitol fué de 0.520 \pm 0.030 (desviación estándar) como promedio, pero se tomaron como referencias los diferentes valores obtenidos en cada serie de determinaciones.

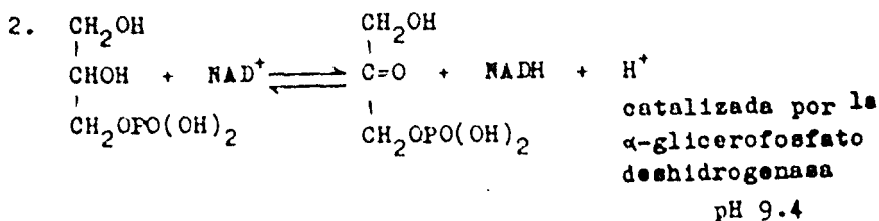
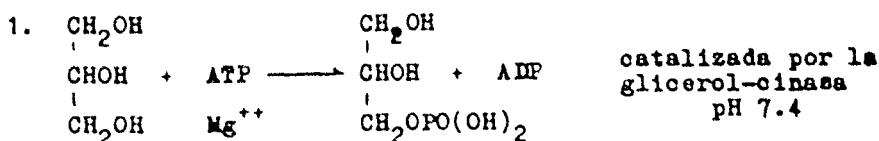
Las cifras obtenidas por este procedimiento se expresan como m μ molas de glicerol "aparente", en vista de que no coinciden, por ser mayores, con las obtenidas con el análisis de las lipoproteínas por ultracentrifugación ni con las obtenidas por el método enzimático, es probable que otros componentes de la mezcla incubada estén contribuyendo al valor medido coloriméricamente.

Medición de la concentración de las lipoproteínas con la ultracentrifuga..- Para medir la actividad enzimática por este procedimiento se tomaba una alícuota de 5 ml de la muestra de incubación y se recibían en los tubos de la ultracentrifuga conteniendo cristales de NaBr, pesado en la proporción de 230 mg por cada mililitro de la alícuota. Esta cantidad de sal (2.2 M) era la calculada para estar la dep

sidad de la alícuota a 1.203 y además inactivaba la enzima lipasa. Después de disolver el NaBr, se completaba el volumen a 6 ml con una solución de NaBr y NaCl de densidad 1.203 \pm 0.001 y las soluciones eran centrifugadas en el rotor 40.3 de la ultracentrífuga preparadora Spinco Modelo LH durante 22 horas a 38,000 rev/min (103,300 x g) y a 12°C.

El mililitro de la parte superior que podía contener lipoproteínas de las clases S_F^o 20-400, S_F^o 0-20 y de alta densidad, se transfería cuidadosamente con un gotero a un tubo aforado de 1 ml. El análisis del contenido de lipoproteínas se hacía en la ultracentrífuga analítica como se encuentra descrito en un trabajo anterior (2).

Medición enzimática del glicerol..- El método se basa en la medición espectrofotométrica del NADH formado en cantidad equivalente al glicerol presente y de acuerdo con las siguientes reacciones:



El equilibrio de la reacción 2 favorece la síntesis del glicerol-1-fosfato, a pH 7.1; pero si se trabaja a pH - 9.4 y se atrapa la dihidroxiacetonafofato con hidrazina el cambio es hacia la derecha.

La descripción del método se detalla en (3) y la -- marcha del mismo se encuentra representada esquemáticamente en la Figura 1.

La mezcla de la primera incubación para la síntesis del glicerol-1-fosfato, contenía:

<u>Soluciones</u>	<u>Mililitros</u>
Amortiguador de K_2HPO_4 (0.125 M, pH 7.4)	0.20
KP, 0.25 M	0.10
MgCl ₂ , 0.01 M	0.10
Cisteína, 0.2 M	0.10
ATP, 0.06 M	0.05
Sobrenadante de la 2a. centrifugación	0.40

Después de estabilizar el sistema durante unos minu-
tos a 38° C, se iniciaba la reacción con la adición de 0.05
ml de la enzima glicerol-cinasa (solución en $(NH_4)_2SO_4$ 1.9-
M) preparada en el laboratorio (3).

La segunda incubación se hacía directamente en las
celdillas del espectrofotómetro Beckman DU, tomando un mili-
litro del sobrenadante de la 3a. centrifugación que se reci-
bía en 0.006 ml de NaOH concentrada, cantidad suficiente pa-
ra llevar el pH de la solución a 7, a esto se le adicionaba:

0.5 ml del amortiguador de hidrasina 2 M pH 9.4 y 0.5 ml de sol. de NAD^+ 0.003 M. La mezcla se conservaba a 37°C hasta su estabilización y la reacción se iniciaba con la adición de 0.01 ml de la enzima glicerofosfato deshidrogenasa, preparada en el laboratorio (3). Se hacían 2 lecturas de la absorbencia, una antes de agregar la enzima al sistema y otra 2 minutos después, la diferencia se expresaba en milimicro-molas de glicerol, de acuerdo con las lecturas de muestras testigos que contenían glicerol.

METODO PARA LA DETERMINACION ENZIMATICA.
DEL GLICEROL

FIGURA 1

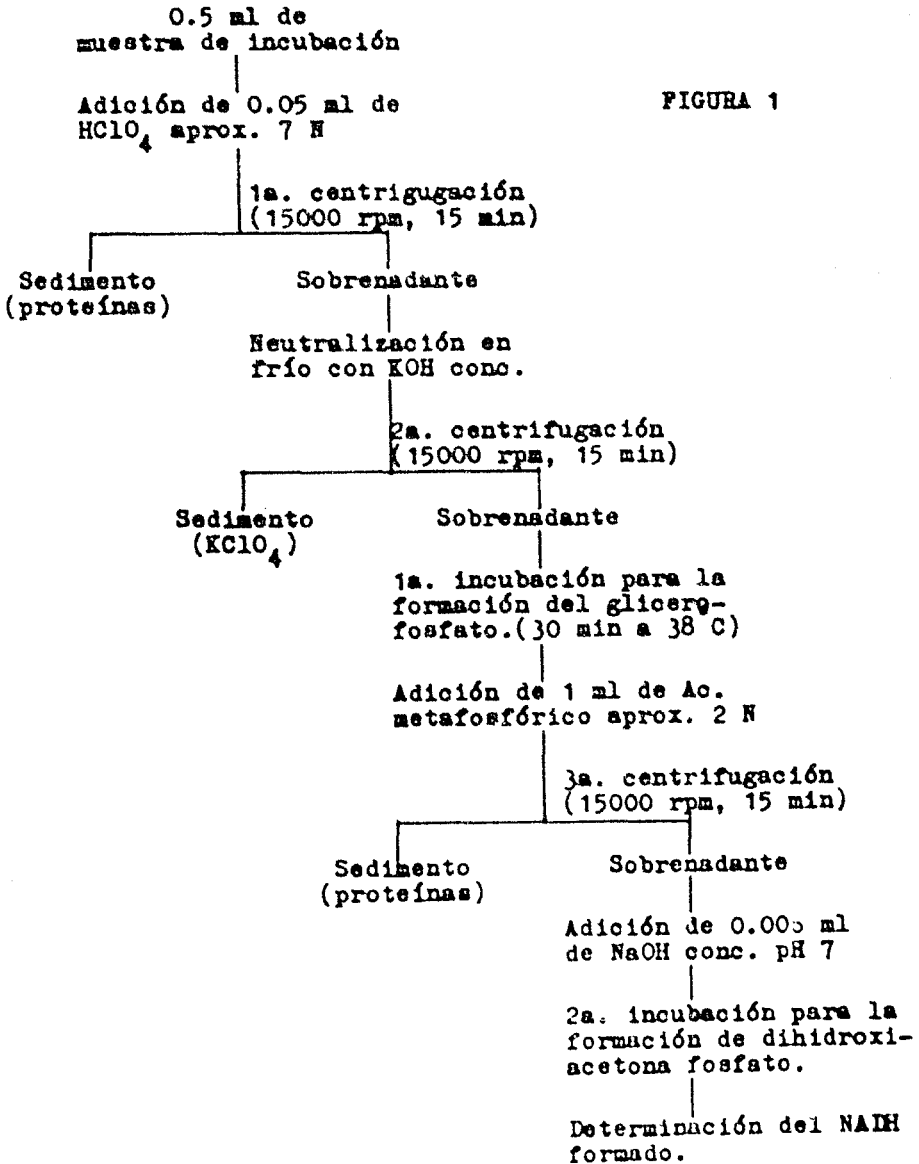


TABLA 1

SOLUCIONES DE LIPOPROTEINAS S_p 20-400
DEL SUERO HUMANO

Preparación (n ^o)	Concentración (mg/ml)
1	7.03
2	6.60
3	10.38
4	5.91
5	5.01
6	7.47
7	6.06
8	7.14
9	—
10	—
11	11.40
12	5.71
13	6.02

La concentración de las soluciones de lipoproteínas era 6 veces mayor que la que tenían en el suero sanguíneo.

TABLA 2

PREPARACIONES DEL EXTRACTO ENZIMATICO DE
EXTRACCIONES DE RATA

Preparación	Tejido (peso húmedo) (g)	Residuo acetónico (g)	% del peso húmedo)	Extracto liofilizado (g)	% del residuo acetónico)
R ₁	15.0	3.027	20.2	1.088	36.0
R ₂	1.8	0.325	18.0	0.042	13.0
R ₃	1.5	0.310	20.7	0.053	17.0
R ₄	16.0	3.139	19.6	0.895	28.1
R ₅	18.0	3.512	19.5	—	—
R ₆	15.0	3.303	22.0	1.024	31.0

R₁ significa que los corzones provenían de un lote de 25 ratas híster, machos de 150 a 200 gramos; excepto las preparaciones R₂ y R₃ que fueron hechas con 3 animales.

TABLA 3

PREPARACIONES DEL EXTRACTO ENZIMATICO
DE LAS GREJUELAS DE CORAZONES HUMANOS

Preparación	Tejido (peso húmedo) (g)	Residuo acetónico (g)	(% del peso húmedo)	Extracto liofilizado (g)	(% del residuo acetónico)
Ov ₁	2.7	0.313	11.5	0.111	35.4
Ov ₂	4.4	0.636	14.4	0.199	31.4
Ov ₃	2.5	0.310	12.6	0.110	35.6
Ov ₄	1.9	0.239	12.6	0.078	32.6
Ov ₅	3.8	0.457	12.0	0.155	34.0
Ov ₆	2.2	0.258	11.7	0.058	22.4
Ov ₁₀	2.2	0.217	10.0	0.044	20.3
Ov ₁₂₋₁₆	8.2	0.932	11.3	0.365	39.0
Ov ₁₇₋₂₄	15.0	1.150	7.7	0.578	33.0
Ov ₂₅₋₃₁	17.0	2.603	15.4	0.773	29.7
Ov ₃₂₋₃₆	6.4	0.798	12.5	0.227	28.4
Ov ₃₇₋₅₀	30.5	3.023	10.0	0.681	22.6
Ov ₅₂₋₆₅	27.0	3.475	12.6	0.600	17.9

Ov, significa que se trata de tejido de la orejuela izquierda de enfermos operados en la sala de cirugía. A la preparación de cada paciente se le asignó un número.

TABLA 4

PREPARACIONES DE LOS EXTRACTOS ENZIMATICOS
DE CORAZON HUMANO

Tejido	Peso húmedo (g)	Residuo acetónico (% del peso húmedo)		Extracto liofilizado (% del residuo acetónico)	
CORAZON NUM. 1					
Vd	5.0	0.663	13.2	0.161	24.3
Vi	21.3	3.635	17.0	0.824	22.7
P	19.0	2.932	15.4	0.692	23.6
T	16.8	2.698	16.1	0.651	24.1
CORAZON NUM. 2					
Od	13.2	1.549	11.7	0.533	34.4
Al	17.0	2.109	12.4	0.562	26.5
Vd	15.8	2.817	17.8	0.652	23.1
Vi	15.5	3.018	19.5	0.957	31.7
P	17.8	3.356	18.8	0.836	24.1
T	15.9	2.771	17.4	0.615	22.2

TABLA 4
(continuación)

Tejido	Peso húmedo (g)	Residuo acetónico (g)	(% del peso húmedo)	Extracto liofilizado (g)	(% del residuo acetónico)
CORAZON NUM. 3					
Ad	8.5	1.540	13.4	0.329	21.4
Al	11.5	1.161	13.7	0.406	35.1
Vd	15.0	2.386	15.9	0.622	26.0
Vl	15.0	2.842	18.9	0.732	25.8
P	12.5	2.097	16.8	0.531	25.3
T	15.0	2.742	18.2	0.708	25.8
CORAZON NUM. 4					
Od	7.0	0.751	10.7	0.162	21.5
Ad	10.0	0.967	9.7	0.145	14.9
Al	11.0	0.988	9.0	0.119	12.1
Vd	16.5	1.789	12.0	0.382	19.2
Vl	14.0	2.057	14.7	0.498	24.2
T	15.5	2.258	14.6	0.529	23.4

TABLA 4
(continuación)

Tejido	Peso húmedo (g)	Residuo acetónico (g)	(% del peso húmedo)	Extracto (g)	liofilizado (% del residuo acetónico)
CORAZON NUM. 5					
Vd	19.0	3.746	19.8	1.180	31.4
CORAZON NUM. 6					
Od	2.4	0.494	20.6	0.096	19.5
Ad	2.7	0.570	21.1	0.115	20.1
Oi	2.0	0.308	15.4	0.068	22.2
Ai	6.0	0.984	16.4	0.172	17.4
Vd	15.0	2.279	15.2	0.454	19.9
Vi	15.0	2.555	17.0	0.544	21.3
T	15.0	2.414	16.1	0.466	19.3

Abreviaturas:

Od: orejuela derecha; Ad: aurícula derecha; Oi: orejuela izquierda; Ai: aurícula izquierda; Vd: ventrículo derecho; Vi: ventrículo izquierdo; P: punta del corazón; T: tabique del corazón.

RESULTADOS

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS EXTRACTOS DE OREJUELAS DE LOS CORAZONES DE PERSONAS OPERADAS.

Medición del glicerol (aparente).- El método colorimétrico utilizando el reactivo cromotrópico-sulfúrico reveló -- que hay liberación de glicerol (aparente) al incubar las lipoproteínas S_F^0 20-400 con los extractos de las orejuelas de la aurícula izquierda (Tabla 5). La actividad específica varió -- de 15 a 29 milimicromolas por hora por miligramo de extracto, valores que son 5 a 9 veces menores que los obtenidos con los extractos de corazones de rata (Tabla 6, experimentos 1y 2).

Los resultados expuestos en la Tabla 7 y más fácilmente apreciables en las Figuras 4, 5, 6 y 7, nos muestran que -- la actividad lipoproteína lipasa de las orejuelas tiene un -- comportamiento semejante a la de los corazones de rata (Figuras 2 y 3)(Tabla 6). Aunque debe notarse que en el experimento 12-f de la Tabla 7, sólo se inactivó por el calor un 58%, -- en contraste con la inactivación de 90 a 100% que se obtuvo -- con la preparación de corazones de rata (Tabla 6, experimento 1-f y 2-f).

Medición de la concentración de las lipoproteínas.-La lipasa de los extractos de orejuelas de corazón humano produce, por una parte, disminución de las lipoproteínas S_F^0 20-400 usadas como sustrato y por otra parte, aparición de las lipoproteínas S_F^0 12-20 y S_F^0 0-12 (Tablas 8 y 9) (Figuras 10, 11 y

12). Esta conversión es semejante a la demostrada anteriormente con la lipasa del corazón de rata (2). Los datos de los experimentos 9, 14 y 16 (Tabla 9) parecen indicar que la disminución del subgrupo S_f° 100-400 es mayor en la primera hora de incubación; en contraste con las del subgrupo S_f° 20-100, en donde la mayor degradación se observa durante la segunda hora. En los análisis de las muestras del tiempo cero, se notó una pequeña cantidad de lipoproteínas S_f° 12-20 y S_f° 0-12, pero en todo los casos esta cantidad aumentó sensiblemente durante la incubación. Finalmente debe notarse que en ausencia de lipasa no hubo cambios significativos en las concentraciones de las lipoproteínas, a juzgar por los trazos obtenidos con las muestras testigo (línea de trazos interrumpidos de las Figuras 10 y 11).

Medición enzimática del glicerol.- La aplicación del método enzimático permitió medir, en forma específica, el glicerol liberado durante la hidrólisis enzimática de las lipoproteínas S_f° 20-400. Las actividades específicas con este método fueron de 19 y 17 milimicromolas por hora por miligramo de extracto de orejuelas, en los experimentos 14 y 15 (Tabla 10).

TABLA 5

LIBERACION DE GLICEROL ("APARENTE") USANDO
EXTRACTOS ENZIMATICOS DE CREJUELAS DE CORAZONES HUMANOS.

Exp. (núm)	Preparación enzimática	A absorbencia n/alícuota de 0.05 ml	Actividad ⁺ específica	Preparación de lipoproteínas (núm)
3	Ov ₁	0.102	18.8	1
4	Ov ₂	0.118	23.1	1
5	Ov ₁₂₋₁₆	0.071	13.6	2
6	Ov ₁₇₋₂₄	0.115	23.1	3
7	Ov ₂₅₋₃₁	0.148	29.0	4
8	Ov ₂₅₋₃₁	0.100	19.5	4
9	Ov ₂₅₋₃₁	0.134	25.1	4
10	Ov ₂₅₋₃₁	0.140	26.4	5
11	Ov ₃₇₋₅₀	0.140	25.9	7
12	Ov ₃₇₋₅₀	0.142	26.2	9
13	Ov ₃₇₋₅₀	0.143	25.6	9
14	Ov ₃₇₋₅₀	0.124	23.8	12
15	Ov ₅₂₋₆₅	0.135	27.2	10
16	Ov ₅₂₋₆₅	0.080	15.4	12

⁺ μ moles de glicerol (aparente) liberadas en una hora de incubación por miligramo de extracto liofilizado.

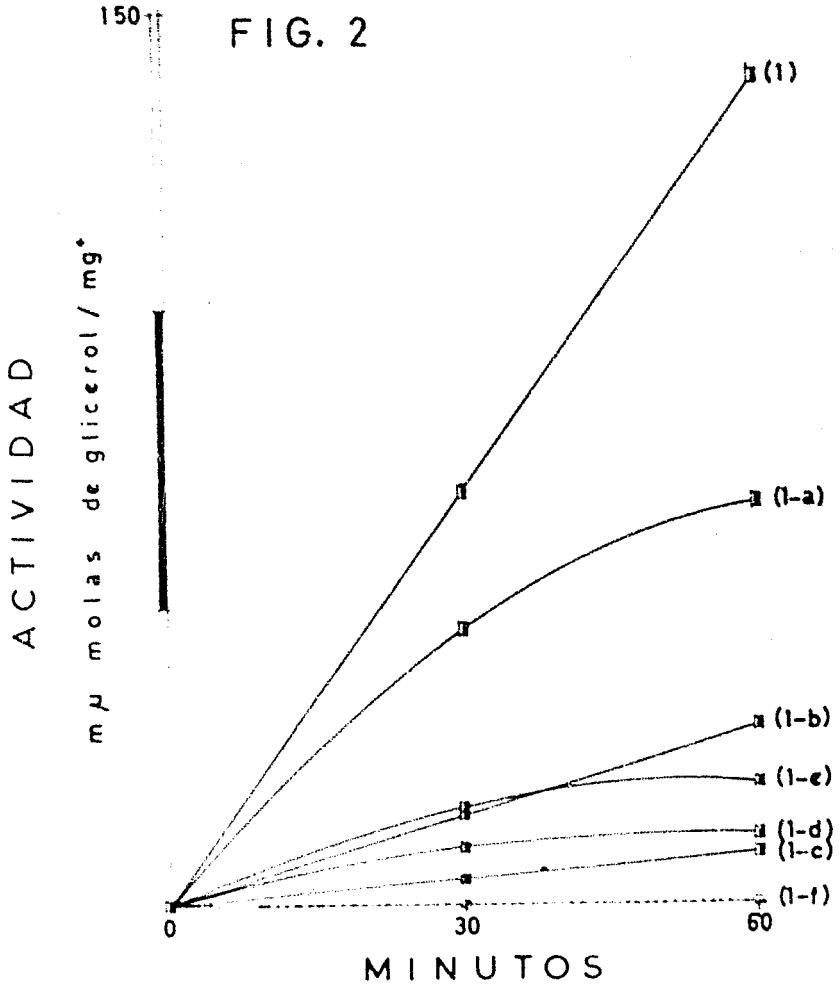
TABLA 6

MODIFICACION DE LA ACTIVIDAD LIPASICA DE LOS EXTRACTOS
DE CORAZONES DE RATA⁺ EN DIFERENTES CONDICIONES DE INCUBACION.

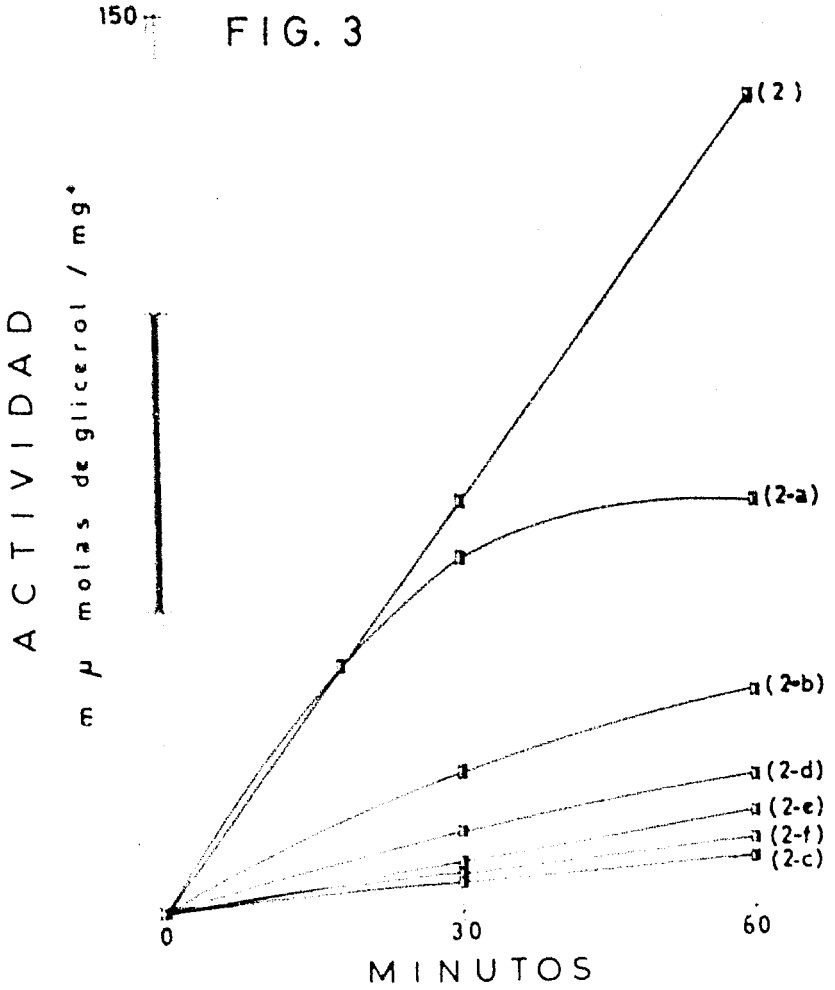
Exp. (número)	Características de la mezcla de incubación	Δ Absorbencia h/alícuota(0.05ml)	Actividad ⁺⁺ específica
1	Completa	0.237	140.0
1(a)	Sin Ca ⁺⁺	0.120	69.6
1(b)	Sin heparina	0.056	33.2
1(c)	Sin Lp _{S_f} ^o 20-400	0.016	8.6
1(d)	Con NaCl, 0.3 M	0.024	14.3
1(e)	Con protamina, 5mg/ml	0.038	22.4
1(f)	Extracto calentado	0.000	00.0
2	Completa	0.230	138.0
2(a)	Sin Ca ⁺⁺	0.132	69.0
2(b)	Sin heparina	0.062	37.2
2(c)	Sin Lp _{S_f} ^o 20-400	0.016	8.6
2(d)	Con NaCl, 0.3 M	0.037	22.2
2(e)	Con protamina, 5mg/ml	0.028	16.5
2(f)	Extracto calentado	0.021	11.7

⁺ Preparación enzimática R₄

⁺⁺ Ver el pie de la Tabla 5



Ver Tabla 6



Ver Tabla 6

TABLA 7

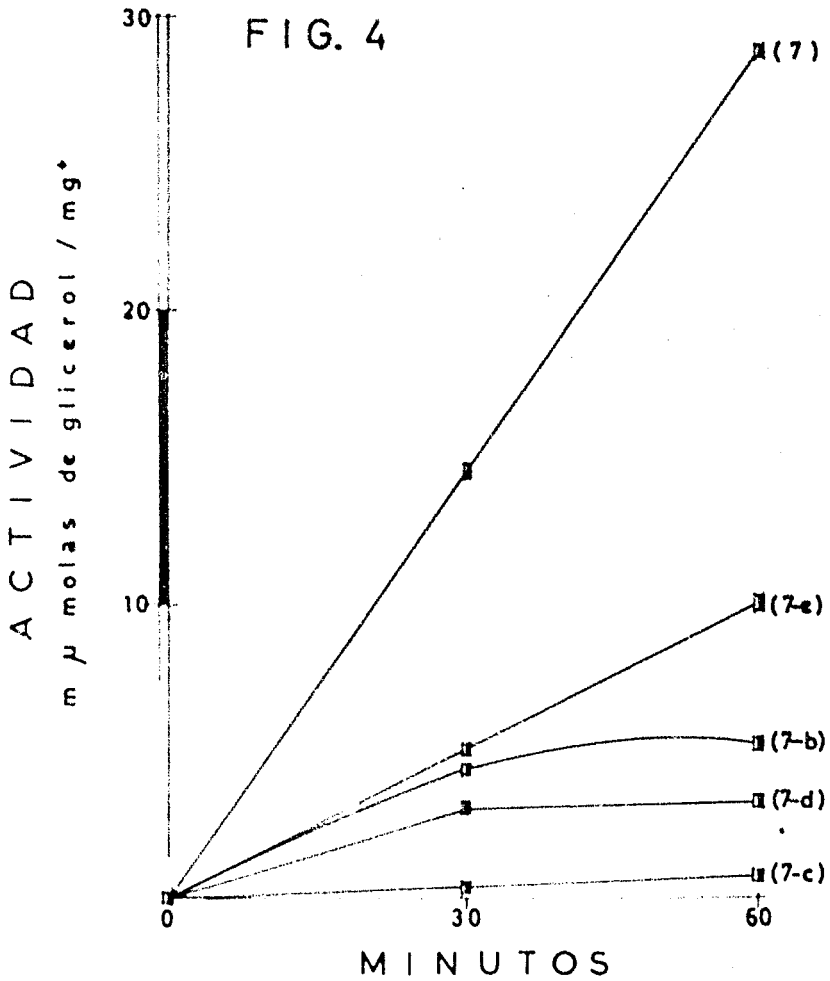
MODIFICACION DE LA ACTIVIDAD LIPASICA DE LOS EXTRACTOS
DE OREJUELAS DE CORAZONES HUMANOS EN DIFERENTES
CONDICIONES DE INCUBACION

Exp. (mím)	Características de la mezcla de incubación	A Absorbencia h/alícuota(0.05ml)	Actividad ⁺ específica
7	Completa	0.148	29.0
7(b)	Sin heparina	0.030	5.5
7(c)	Sin $Lp_{S_r}^o$ 20-400	0.005	0.9
7(d)	Con NaCl, 0.3 M	0.018	3.3
7(e)	Con protamina, 5mg/ml	0.056	10.2
12	Completa	0.142	26.2
12(b)	Sin heparina	0.055	10.1
12(c)	Sin $Lp_{S_r}^o$ 20-400	0.036	6.6
12(d)	Con NaCl, 0.3 M	0.040	7.2
12(e)	Con protamina, 5mg/ml	0.015	2.7
12(f)	Extracto calentado	0.059	10.5

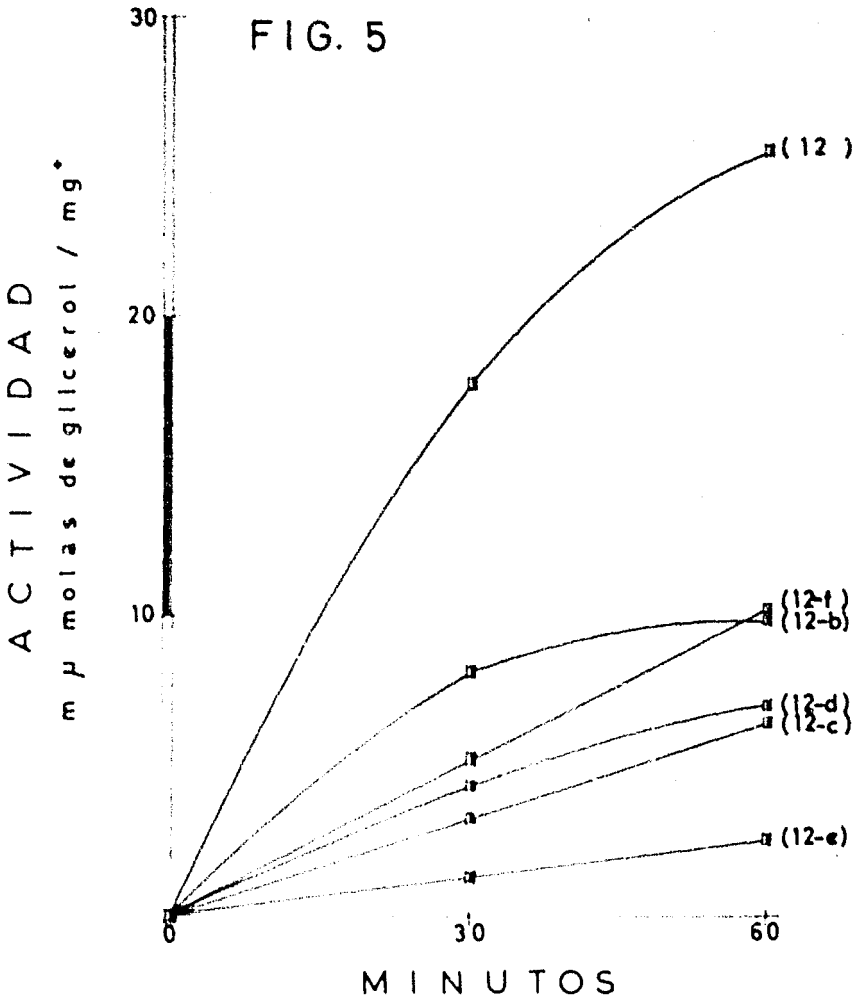
TABLA 7
(continuación)

Exp. (núm)	Características de la mezcla de incubación	Δ Absorbencia h/alícuota(0.05ml)	Actividad ⁺ específica
5	Completa	0.071	13.6
5(a)	Sin Ca ⁺⁺	0.055	10.6
15	Completa	0.135	27.2
15(c)	Sin Lp S _f ^o 20-400	0.018	3.6
15(c)	Sin Lp S _f ^o 20-400	0.015	2.9

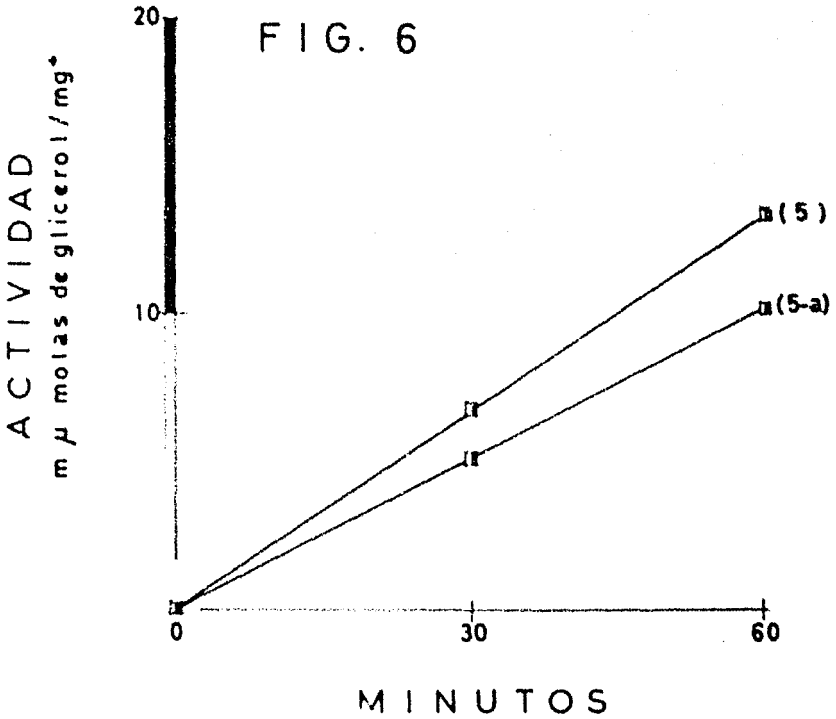
⁺ Ver el pie de la tabla 5.



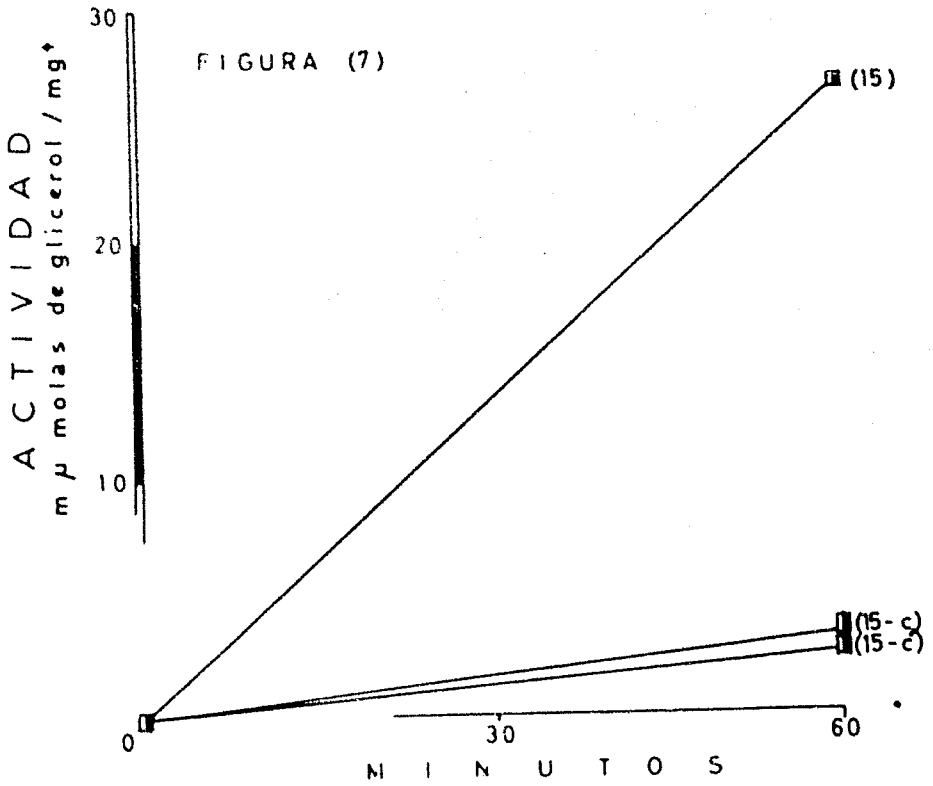
Ver Tabla 7



Ver Tabla 7



Ver Tabla 7



Ver Tabla 7

FIG. 8

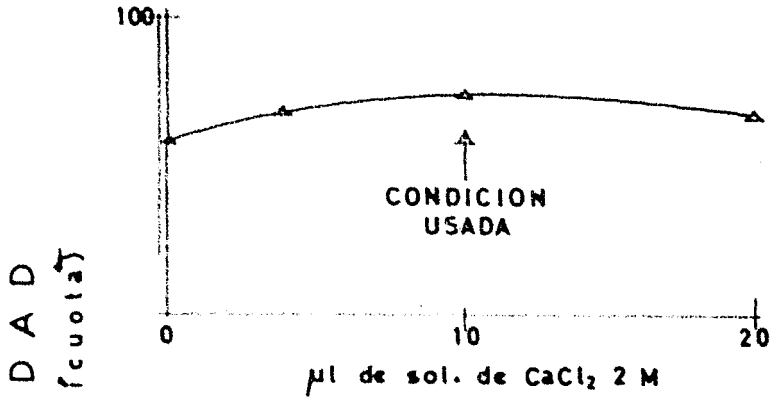


FIG. 9

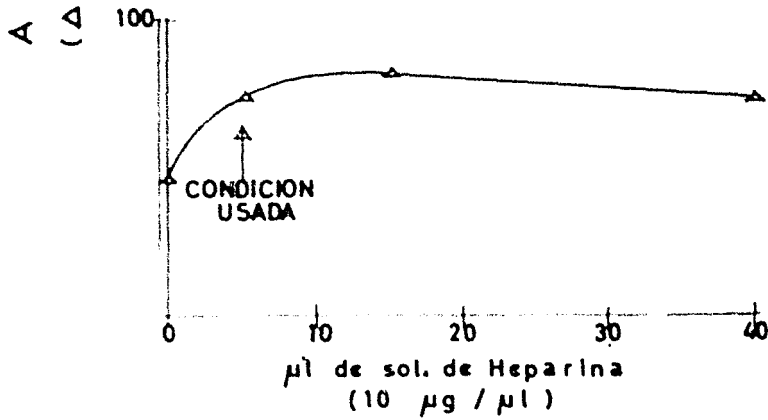


TABLA 8

CONCENTRACIONES MEDIDAS EN LOS ANALISIS CON LA
ULTRACENTRIFUGA DE LAS MEZCLAS DE INCUBACION.

Tiempo de incubación (min)	CLASES DE LIPOPROTEINAS (mg/5.Cml de mezcla de incubación)			
	100-400	20-100	12-20	0-12
Experimento 9				
0	2.030	5.751	0.775	0.127
60	1.188	4.920	1.032	0.408
120	0.374	3.520	1.240	0.434
Experimento 14				
0	1.546	3.108	0.701	0.870
60	0.435	2.016	0.659	1.099
120	0.126	1.314	0.721	1.414
Experimento 16				
0	1.927	2.963	0.638	0.889
60	0.847	2.723	0.637	0.967
120	0.550	1.991	0.886	1.246

En estos experimentos se usaron extractos de orejuelas (ver Tabla 5).

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

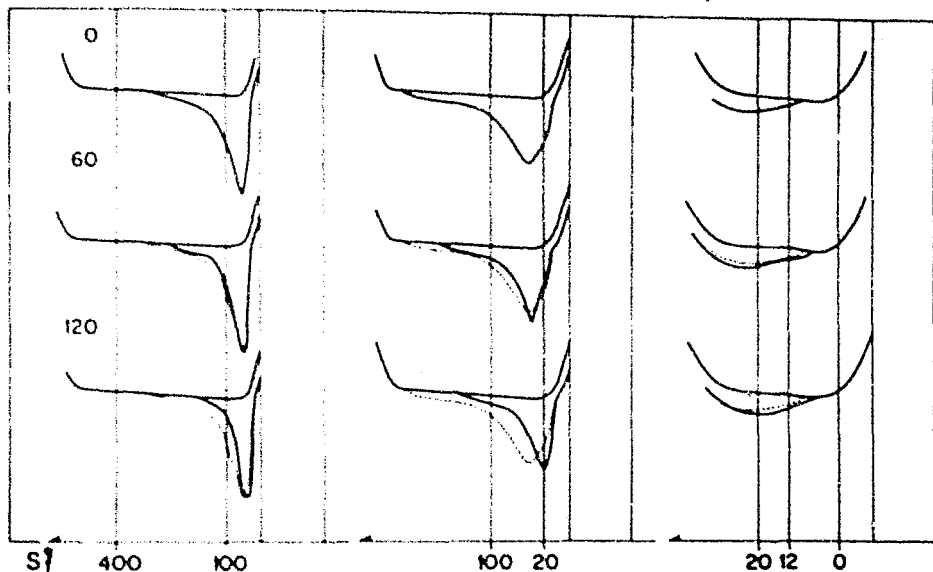


FIGURA 10

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_f^0 correspondientes a cada clase de lipoproteínas.— Cuando la superposición de los trazos fue completa sólo se dibujó uno de ellos.

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

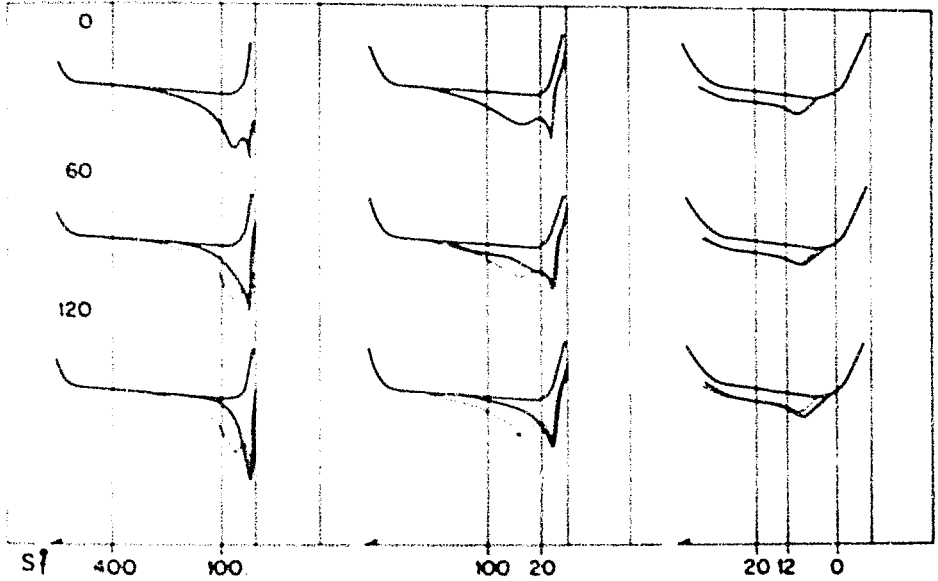


FIGURA 11

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_2^0 correspondientes a cada clase de lipoproteína.- Cuando la superposición de los trazos fue completa sólo se dibujó uno de ellos.

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

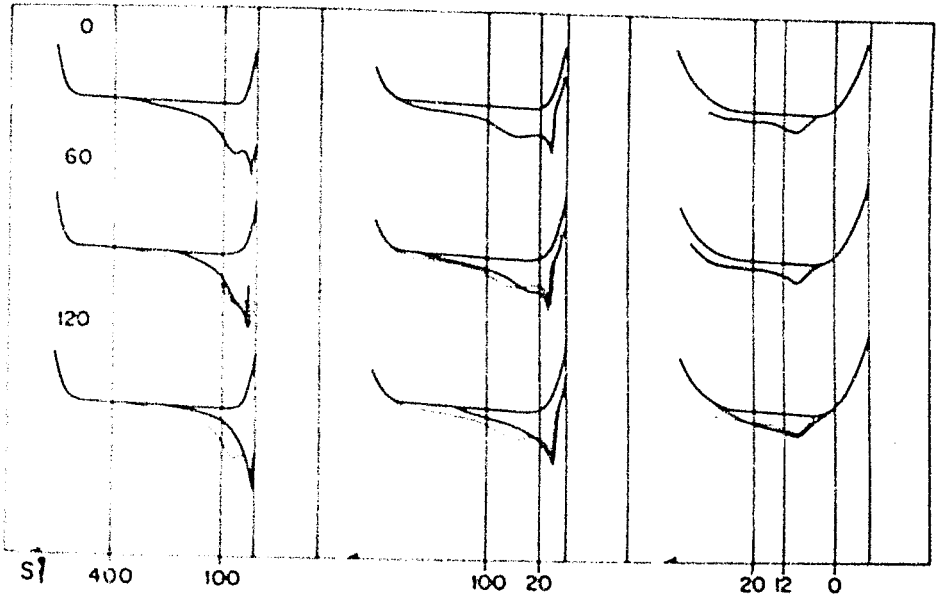


FIGURA 12

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_f^0 correspondientes a cada clase de lipoproteínas.- Cuando la superposición de los trazos fue completa sólo se dibujó uno de ellos.

TABLA 9

CAMBIOS EN LA CONCENTRACION DE LAS LIPOPROTEINAS
POR EFECTO DE LA LIPASA DEL CORAZON HUMANO.

Tiempo de incubación (min)	CLASES DE LIPOPROTEINAS (mg/ml de mezcla de incubación)			
	100-400	20-100	12-20	0-12
	Experimento 9			
60	-0.168	-0.166	+0.051	+0.056
120	-0.331	-0.446	+0.093	+0.061
	Experimento 14			
60	-0.222	-0.218	-0.008	+0.046
120	-0.284	-0.359	+0.004	+0.109
	Experimento 16			
60	-0.216	-0.048	0.000	+0.016
120	-0.275	-0.194	+0.050	+0.071

En estos experimentos se usaron extractos de orejuelas (ver Tabla 5).

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

TABLA 10

MEDIDA DE LA ACTIVIDAD LIPASA DE LAS OREJUELAS DEL
CORAZON HUMANO UTILIZANDO EL SISTEMA
GLICEROL-CINASA Y GLICEROFOSFATO-DESHIDROGENASA

Exp. (número)	Preparación enzimática	Tiempo de incubación (min)	GLICEROL <u>m/u molas</u> mg
14	Ov 37-50	0	0.0
		60	19.0
		120	38.0
15	Ov 52-65	0	0.0
		60	17.0

* Miligramo de extracto liofilizado de orejuela.

Comparación de los resultados obtenidos por los tres métodos de análisis.— Con el objeto de comparar los datos obtenidos por el método colorimétrico, por el balance de las lipoproteínas y por el método enzimático, se encuentran resumidos algunos experimentos en la Tabla 11.

Como puede observarse la cantidad de material cromógeno medido fue de 1.8 a 2.9 veces mayor que el calculado — por el análisis con la ultracentrífuga (discrepancias muy parecidas se encontraron anteriormente con extractos enzimáticos de corazones de rata (2) y de 1.2 a 2.1 veces el glicerol determinado por el sistema glicerol-cinasa y glicerofosfato-deshidrogenasa (Figuras 13, 14, 15 y 16).

TABLA 11

COMPARACION DE LOS RESULTADOS

Período de incubación (min)	GLICEROL (m/u molas/mg ⁺)				
	A	B	$\frac{A}{B}$	C	$\frac{A}{C}$
Experimento 9					
60	26.1	9.1	2.9	—	—
120	38.9	21.7	1.8	—	—
Experimento 14					
60	23.8	12.6	1.9	19.0	1.2
120	43.7	18.0	2.4	38.0	1.2
Experimento 15					
60	27.2	—	—	17.0	1.6
Experimento 16					
60	15.4	7.6	2.0	7.4	2.1
120	29.8	13.0	2.3	—	—

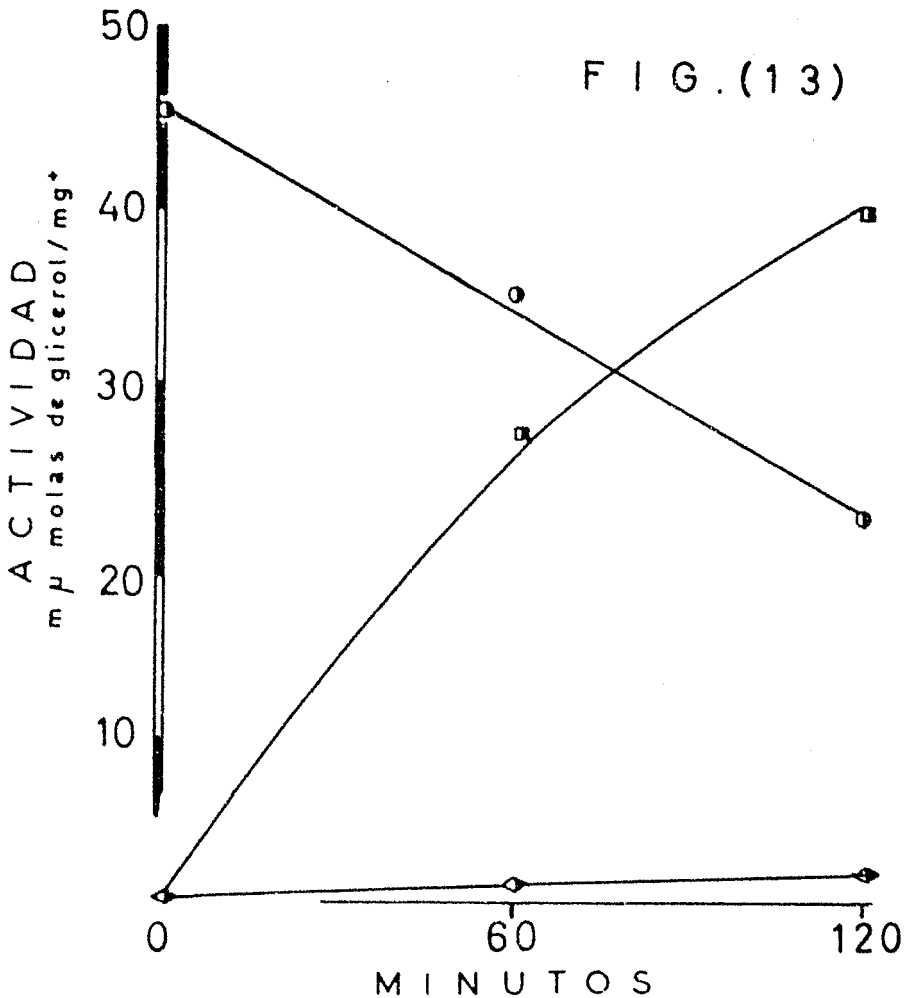
* Miligramo de extracto liofilizado de orejuelas.

A: medido con el método colorimétrico

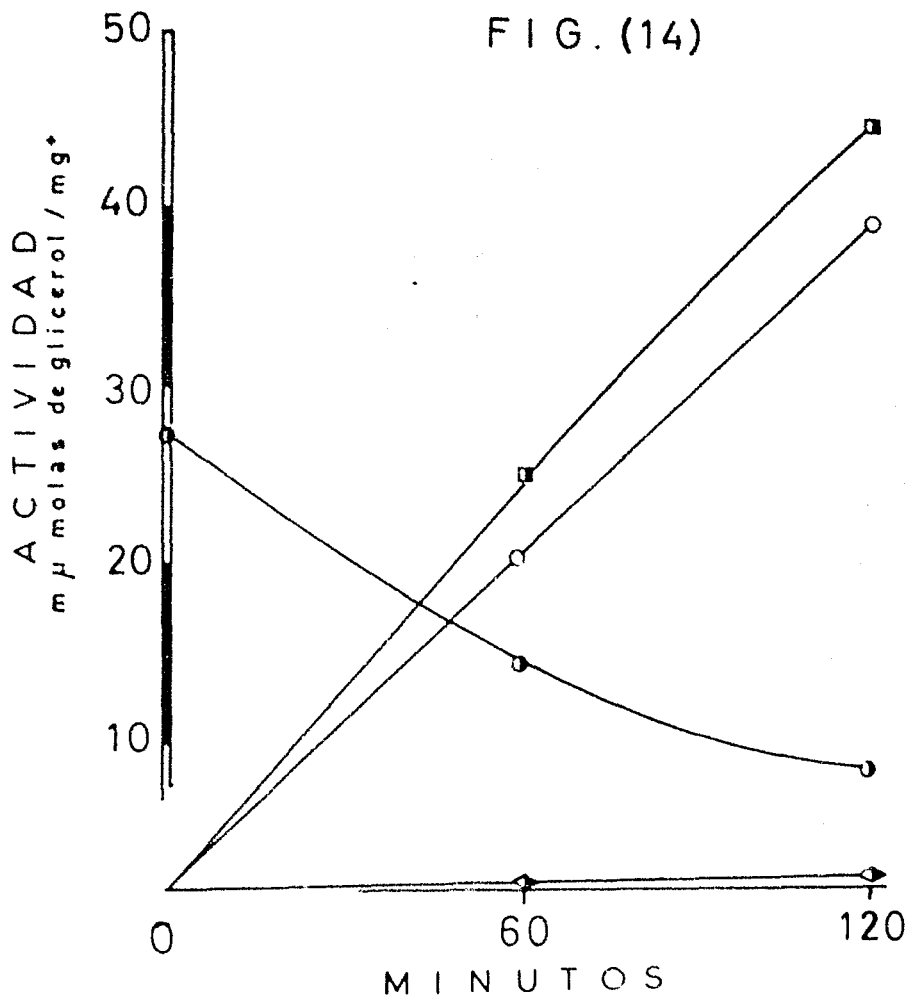
B: calculado del balance de las lipoproteínas.

C: determinado por el método enzimático.

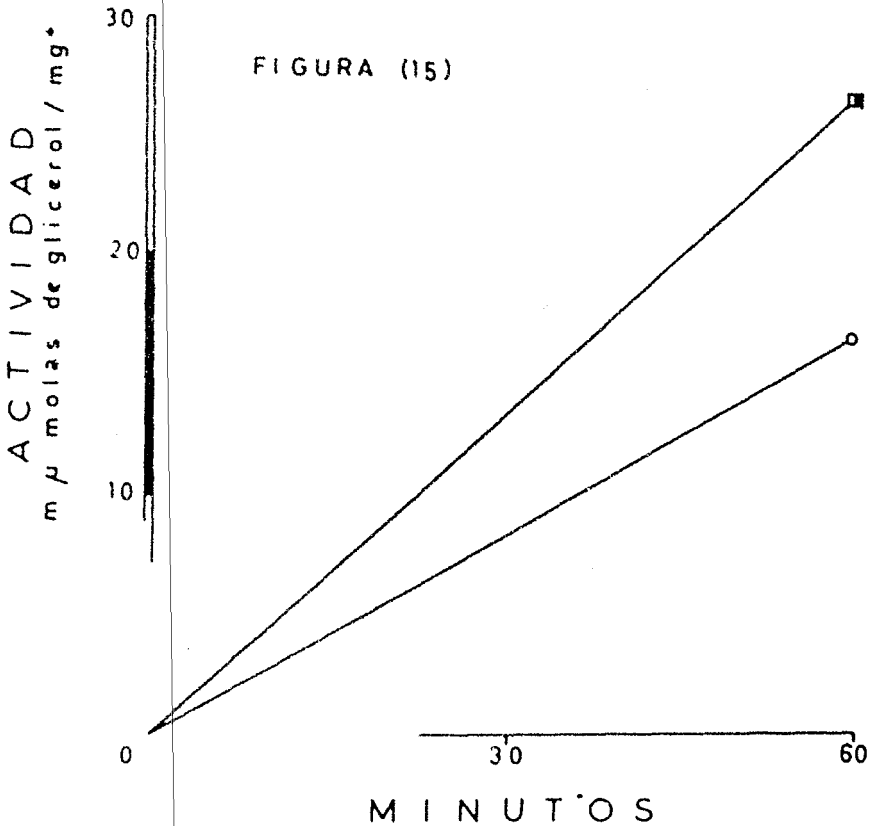
Los guiones significan que no se hicieron los análisis respectivos.



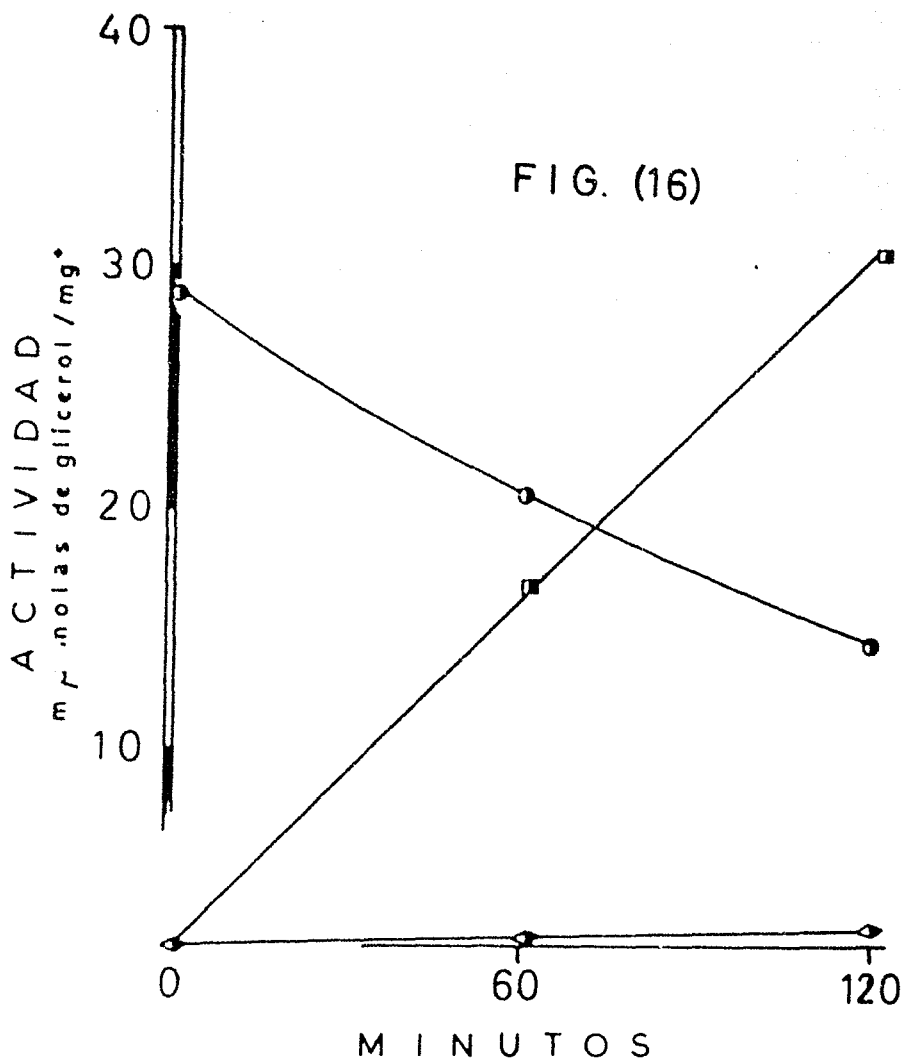
Comparación del glicerol medido por el método colorimétrico (■—■) con el calculado de las lipoproteínas hidrolizadas S_f⁰ 20-400 (●—●) y de las lipoproteínas sintetizadas (◊—◊), durante la incubación con lipasa. (Experimento 9).



Comparación del glicerol medido por el método colorimétrico (■—■), el calculado de las lipoproteínas hidrolizadas S_r^0 20-400 (●—●) y de las lipoproteínas sintetizadas (◊—◊), y el medido por el método enzimático (○—○) (Experimento 14).



Comparación del glicerol medido por el método colorimétrico (■—■) y por el método enzimático (○—○) (Experimento 15).



Comparación del glicerol medido por el método colorimétrico (■—■) con el calculado de las lipoproteínas hidrolizadas S_f^{20-400} (●—●) y de las lipoproteínas sintetizadas (◈—◈), (Experimento 16).

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS EXTRACTOS DE
DIVERSAS PORCIONES DEL CORAZÓN
DE CADAVERES HUMANOS

Se utilizaron seis corazones de cadáveres humanos, cuyos datos necrópsicos pertinentes figuran en la Tabla 7.

Medición del glicerol (aparente).- En general las actividades específicas fueron menores (Tabla 12) a las obtenidas con los tejidos de las orejuelas extirpadas durante las intervenciones quirúrgicas (Tabla 5). Los valores de porciones semejantes de tejido fueron diferentes en los distintos corazones, y aun la distribución de la actividad no fue semejante en todos los corazones.

En ausencia del sustrato la liberación de glicerol (aparente) medida fue muy baja y semejante a la observada con las preparaciones de rata, (Tabla 13); sin embargo, en algunos extractos de corazón de cadáver el material cromogénico liberado durante la incubación, en ausencia de lipoproteínas, fue de mayor cuantía.

Medición de la concentración de las lipoproteínas.- Las fotografías tomadas en la ultracentrífuga analítica (Fig. 17) mostraron que el extracto enzimático del ventrículo del corazón del cadáver transforma las lipoproteínas S_r^0 20-400 en lipoproteínas S_r^0 0-20 (Tabla 14), siendo este comportamiento semejante a los extractos de rata y al de las orejuelas extirpadas en la sala de operaciones.

Medición enzimática del glicerol.- Los extractos del corazón del cadáver humano liberan glicerol de las lipoproteínas S_f^0 20-400 a juzgar por los resultados obtenidos con la enzima específica (Tabla 16). La relación con la actividad medida por el reactivo cromotrópico-sulfúrico es de 1.0 a 2.9, muy semejante a la encontrada para los extractos de las orejuelas y para los corazones de rata.

TAHLA 12

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA
DE CORAZONES DE CADAVERES

Exp. (n ^o)	Tejido	A absorbencia h/alfcuota de 0.05 ml	Actividad [†] especifica	Preparación de lipoproteínas (n ^o)
CORAZON NUM. 1				
17	Vd	0.033	5.9	7
18	V1	0.043	7.7	7
19	P	0.031	5.6	7
20	T	0.040	7.2	7
CORAZON NUM. 2				
21	Od	0.090	16.2	7
22	A1	0.116	21.0	7
23	Vd	0.134	24.2	7
24	Vd	0.085	15.7	7
25	Vd	0.123	22.8	7
26	Vd	0.119	22.3	7
27	V1	0.063	11.4	7
28	P	0.053	9.6	7
29	T	0.056	10.1	7

TABLE 12
(continuación)

Exp. (núm)	Tejido	A absorbencia h/alícuota de 0.05 ml	Actividad [†] específica	Preparación de lipoproteínas (núm)
CORAZON NUM. 3				
30	A..	0.103	19.3	7
31	Ad	0.084	15.0	8
32	A1	0.063	11.8	7
33	A1	0.052	8.9	8
34	7d	0.081	15.1	7
35	Vd	0.055	10.6	7
36	Vd	0.107	19.8	11
37	V1	0.046	8.6	7
38	P	0.054	10.1	7
39	T	0.065	12.1	7
CORAZON NUM. 4				
40	Od	0.058	11.0	12
41	Ad	0.079	15.8	12
42	A1	0.074	15.8	12
43	Vd	0.060	11.3	12
44	V1	0.071	13.4	12
45	T	0.102	21.7	12

TABLA 12
(continuación)

Exp. (núm)	Tejido	Δ absorbencia h/alícuota de 0.05 ml	Actividad [†] específica	Preparación de lipoproteínas (núm)
CORAZON NUM. 5				
46	Vd	0.135	26.8	4
CORAZON NUM. 6				
47	Od	0.031	5.8	13
48	Ad	0.036	6.8	13
49	O1	0.031	5.8	13
50	A1	0.065	12.2	13
51	Vd	0.100	18.7	13
52	V1	0.025	4.7	13
53	T	0.054	10.1	13

[†]Ver pie de la Tabla 5.

TABLA 13

EFEECTO DEL SUBSTRATO.

Exp. (número)	Tejido	ACTIVIDAD ESPECÍFICA ⁺	
		Sistema completo	Sin substrato (c)
CORAZON NUM. 4			
40	Od	11.0	1.8
41	Ad	16.8	1.6
43	Vd	11.3	0.0
44	Vi	13.4	4.3
45	T	21.7	5.9

⁺ m/u molas de glicerol/h/mg de extracto liofilizado.

TABLA 14

CONCENTRACIONES MEDIDAS EN LOS ANALISIS
CON LA ULTRACENTRIFUGA.

Tiempo de incubación (min)	CLASES DE LIPOPROTEINAS (mg/5.0ml de mezcla de incubación)			
	100-400	20-100	12-20	0-12
Experimento 46 (Corazón núm. 5)				
0	2.030	4.085	0.775	0.127
60	0.870	4.140	0.815	0.096
120	1.030	3.660	0.960	0.388

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

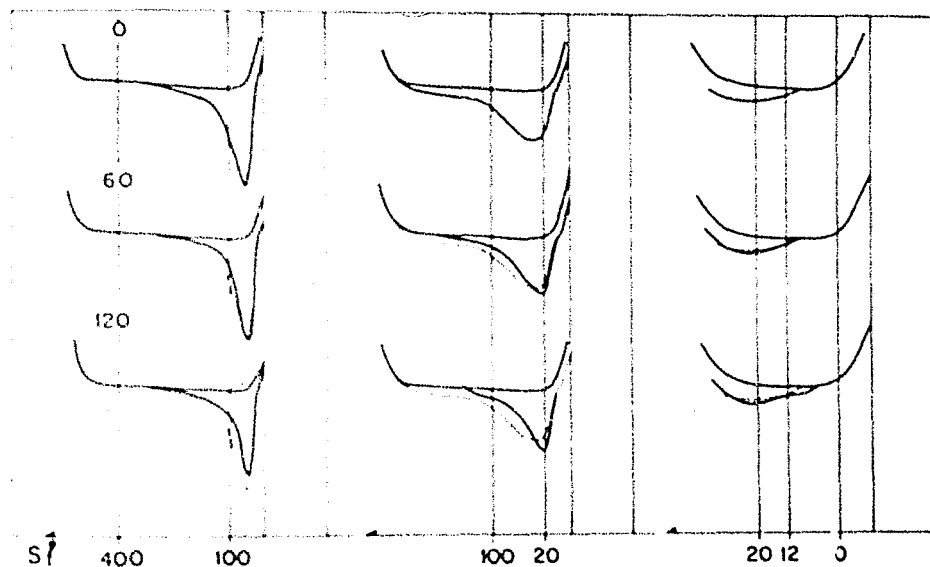


FIGURA 17

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_f^0 correspondientes a cada clase de lipoproteínas.- Cuando la superposición de los trazos fue completa sólo se dibujó uno de ellos.

TABLA 15

CAMBIOS EN LA CONCENTRACION DE LAS LIPOPROTEINAS
POR EFECTO DE LOS EXTRACTOS ENZIMATICOS DE CORAZON
DE CADAVERES HUMANOS.

Tiempo de incubación (min)	CLASES DE LIPOPROTEINAS (mg/ml de mezcla de incubación)			
	100-400	20-100	12-20	0-12
Experimento 46				
60	-0.232	+0.011	+0.008	-0.006
120	-0.200	-0.085	+0.037	+0.052

TABLA 16

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL METODO COLORIMETRICO
Y EL METODO ENZIMATICO USANDO EXTRACTOS DE CORAZONES
DE CADAVERES HUMANOS.

Exp. (min)	GLICEROL (mg/ml molas / mg ⁺)		$\frac{A}{C}$
	Medido con el reactivo del cromotrópico A	Determinado por el método enzimático C	
CORAZON HUM. 3			
36	19.8	16.8	1.2
CORAZON HUM. 4.			
40	11.0	5.8	1.9
41	16.8	5.8	2.9
42	15.8	10.0	1.6
43	11.3	10.8	1.0
44	13.4	13.2	1.0
45	21.7	19.8	1.1

*Miligramos de extracto liofilizado.

TABLA 17

DATOS DE LOS CORAZONES DE CADAVERES HUMANOS

Corazón (Núm.).	Edad del sujeto (años)	Sexo	Período Postmortem (h)	Enfermedad	Colaborador ⁺⁺
1	—	—	—	Hepatitis infecciosa Aterosclerosis	(1)
2	<u>77</u>	—	—	Diabetes Mellitus Aterosclerosis	(1)
3	<u>36</u>	—	—	Meningo encefalitis tuberculosa	(1)
4	<u>22</u>	<u>F</u>	<u>8</u>	Pancarditis reumática cicatrizada Doble Lesión mitral y tricuspídea Insuficiencia cardíaca	(2)
5	—	—	—	—	—
6	<u>63</u>	<u>M</u>	<u>6</u>	Diabetes Mellitus Aterosclerosis Glomeroesclerosis	(2)

* Tiempo transcurrido entre la muerte del sujeto y la precipitación con acetona a -20 de las proteínas tisulares.

** Médicos que suministraron el material humano de cadáver.

- 1) Dr. José Upeguy, Hospital de la Raza, I.M.S.S.
- 2) Dr. Raúl Contreras, Departamento de Anatomía Patológica del Instituto Nacional de Cardiología.

D I S C U S I O N

La concentración de todas las soluciones de lipoproteínas utilizadas (Tabla 1) permitió tener, en el volumen agregado a la mezcla de incubación, la cantidad suficiente, 1.2 mg por mililitro, para que la cinética de la reacción fuese de orden cero (1, 2, y 4); esto es, el sistema estaba saturado con el sustrato y por lo mismo la actividad medida en todos los casos no dependió significativamente de la concentración de las lipoproteínas.

La proporción del residuo acetónico con respecto al peso de los corazones de rata fue de 18 a 22% y la del extracto liofilizado con respecto al residuo acetónico fue de 28 a 36% (Tabla 2). Estos valores son semejantes a los establecidos anteriormente (1, 2). En cambio fueron de 7.7 a 15.4% y de 17.9 a 35.6% respectivamente, tratándose de las orejuelas obtenidas de pacientes operados (Tabla 3) y de 9.0 a 20.6% y de 12.1 a 35.1% respectivamente, en tejidos de corazones de cadáveres (Tabla 4). Aunque en general las cantidades obtenidas en los tejidos humanos son menores, también es cierto que hay una variabilidad notable en los diferentes experimentos y además, en algunos se obtuvieron valores iguales o mayores que los más altos registrados en las preparaciones de la rata. Por otra parte, si se relaciona la cantidad de extracto liofilizado con el peso húmedo del tejido, los valores son del mismo orden para los ventrículos humanos y para el corazón de la

rata, en el que la mayor parte del tejido utilizado es ventrículo, y un poco menores, aunque dentro del mismo orden para las orejuelas y aurículas humanas.

Ahora bien, si se examinan los datos de las Tablas 4 y 3 para el mismo tipo de tejido de los diferentes corazones humanos se observa que los porcentajes tanto del residuo acético como del extracto liofilizado no son los mismos. Por esto, las variaciones parecen deberse a la técnica misma de preparación, como se había concluido anteriormente (2) y no a diferencias en los componentes anatómicos de las distintas porciones del corazón.

Los trabajos anteriores (1) habían permitido conocer la relativa inestabilidad, tanto a -7 como a 37°C , de la solución enzimática preparada con el extracto liofilizado. Con este motivo se extendieron las observaciones para saber el cambio de actividad que ocurriera en el corazón después de muerto el animal. Las preparaciones R_2 y R_3 (Tabla 2) procedían de ratas que fueron sacrificadas y en seguida conservadas en el refrigerador a 5°C por 4 y 8 horas, respectivamente. En vista de que la actividad específica, 105 y 122 milimicromolus de glicerol (aparente) por hora por miligramo de extracto, fue semejante a los valores, entre 90 y 175, obtenidos con órganos extirpados inmediatamente después de la muerte del animal, se concluyó, que si después de la muerte, el cadáver o el órgano extraído, se conservan a baja temperatura la actividad enzimática no se modifica sensiblemente --

hasta por 8 horas.

Al iniciarse este trabajo se utilizaron precisamente las mismas condiciones de incubación establecidas para el estudio de la actividad enzimática con el extracto de corazones de rata (1). Como se observara que la actividad con los extractos humanos era muy baja, se hicieron incubaciones en medios con diferente pH, así como con cantidades variables de los activadores (Figuras 8 y 9). Los resultados mostraron que el comportamiento de la actividad era cualitativamente semejante en ambos casos, por lo que, para aumentar los valores de los parámetros a medir: glicerol y lipoproteínas, se decidió utilizar las mismas condiciones de incubación, pero con una mayor concentración del extracto liofilizado: 20 mg en vez de 6.7 mg del preparado de rata.

Corroborando observaciones anteriores (2), se encontró, tanto por la aplicación del método enzimático para medir glicerol como por el análisis con la ultracentrífuga, que el extracto de los tejidos cardiacos humanos hidrolizan las lipoproteínas S_F^0 20-400 con formación de las LP S_F^0 12-20 y S_F^0 0-12 y liberación de glicerol. Pero nuevamente se observó, como en el caso de los extractos de rata, que durante la incubación se liberan compuestos cromogénicos que aumentan el valor del glicerol (aparente) medido por el reactivo cromotrópico-sulfúrico; pero no el medido enzimáticamente o el calculado por los cambios de concentración de las lipoproteínas. Estos compuestos cromogénicos podrían ser azúcares, y en particular

galactosa, manosa y glucosamina, que recientemente se han encontrado entre los componentes de las lipoproteínas S_F^0 20-400 (5) o bien el aminoácido serina. En cualquier caso tendría - que aceptarse, que los compuestos se liberan durante la incubación y que sin esta separación, no desarrollan color con el reactivo del cromotrópico. Aunque se hicieron análisis por - cromatografía y electroforesis en papel, de alícuotas de la - mezcla de incubación, no se logró revelar por estos métodos - la presencia de azúcares o del aminoácido serina, tanto en -- las muestras del tiempo cero como en las de 60 minutos. Además se probó que en las condiciones del análisis, la capacidad cromogénica de la serina era muy baja en relación con la del glicerol o la del manitol, por lo que si contribuyese como factor cromogénico debería estar a una concentración relativamente alta. Por el momento no se tiene una explicación - adecuada para la discrepancia entre el método colorimétrico y el método enzimático. Si se comparan los valores obtenidos - por el método enzimático y los calculados por los cambios de concentración de lipoproteínas medidos con la ultracentrífuga, se observa que los segundos son menores que los primeros, lo que podría deberse a dos causas: 1) que para calcular el glicerol liberado de las LP S_F^0 20-400 que se hidrolizan y el fijado en las LP S_F^c 0-20 que se sintetizan, se utilizaron los - datos de composición química establecidos por Lindgren y Nichols (7) y por Nichols, Rehnberg y Lindgren (8) y estos pueden no corresponder precisamente a la composición de las lipo

proteínas usadas en el presente trabajo; 2) la otra razón de discrepancia es que cuando se repite el análisis de una misma muestra sometida cada vez a un período de ultracentrifugación, los valores de las lipoproteínas disminuyen (2).

Los resultados experimentales muestran que la actividad lipoproteína-lípasa por unidad de peso del extracto liofilizado, es menor en los tejidos cardíacos humanos que en los de rata.

Cuando se compara la actividad específica de los corazones de cadáver con la de las orejuelas, se nota que los valores de los primeros son, en general, menores. Estas diferencias no pueden ser atribuidas a la edad de los sujetos de quienes se tomó el tejido, ya que las orejuelas provenían de pacientes cuyas edades fluctuaban entre 10 y 50 años y -- los corazones de cadáveres no mostraron diferencias consistentes a este respecto, véase por ejemplo los datos del corazón núm 4 y 6 (Tabla 12) que provienen de personas de 22 y 63 años respectivamente. Es posible que la menor actividad específica se deba en gran parte a que los cadáveres no se conservaron en el refrigerador inmediatamente después de la muerte de los sujetos, y la variabilidad se debe en mucho, a la reproducibilidad poco satisfactoria del método de preparación del extracto liofilizado. Tampoco se pueden establecer relaciones entre la actividad medida y las enfermedades padecidas, pues cuando tuvieron enfermedades aparentemente semejantes, véase el corazón número 2 y el corazón núm 6 (Tablas

12 y 17), los valores no fueron del mismo orden. En el caso del corazón núm 1, la muy baja actividad pudiera explicarse por la presencia de pigmentos biliares, pues se sabe que la lipoproteína lipasa es inhibida por estos compuestos (6).

Finalmente, los estudios sobre la distribución de -- esta actividad enzimática en las diferentes porciones del co razón, no permiten establecer ninguna relación funcional.

C O N C L U S I O N

Los extractos de corazones humanos tanto de los fragmentos obtenidos en enfermos operados, como en los preparados de corazones de cadáveres, tienen actividad de lipoproteína - lipasa demostrable por la liberación de glicerol y por cambios en el patrón lipoproteico.

La actividad enzimática parece ser semejante a la observada en los extractos de corazones de rata, en vista de la semejanza de las condiciones de incubación y la respuesta a los activadores.

La cantidad de enzima por peso de tejido es menor en el corazón humano que en el de rata.

La distribución anatómica de la actividad lipásica parece ser general en todo el corazón humano.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-De Silva-Rubio, M.M.: Caracterización de la actividad lipásica de un extracto del corazón sobre las lipoproteínas del suero sanguíneo, Tesis Profesional (Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología), Escuela Nacional de Ciencias Químicas, U.N.A.M., México (1961).
- 2.-Mendoza D.B., M.C.: Demostración experimental de la transformación enzimática de las lipoproteínas de baja densidad del suero sanguíneo, Tesis Profesional, (Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología), Escuela Nacional de Ciencias Químicas, U.N.A.M., México (1962).
- 3.-Hernández, H.: Estudio comparativo de un método químico y dos enzimáticos en la determinación del glicerol producido en la mezcla de incubación de la lipoproteína lipasa, Tesis Profesional, (Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología), Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, I.P.N., México, (1963).
- 4.-Neilands, J.B. y Stump, P.K.: Reaction rates, en el libro: *Outlines of Enzyme Chemistry*, John Wiley and Sons, Inc., - New York, Segunda ed., pág. 89-90 (1958).
- 5.-Abraham, S., Hillyard, E.A. y Chaikoff, I.L.: Components of serum and egg yolk lipoproteins: galactose, mannose, - glucosamine and sialic acid, *Arch. Biochem. Biophys.*, 89, - 74-78 (1960).
- 6.-Korn, E.D.: The assay of lipoprotein lipase in vivo and in vitro, en el libro: *Methods of Biochemical Analysis*, editado por D. Glick, Interscience Publishers, Inc., New York, Vol. 1, pág. 166 (1959).
- 7.-Lindgren, F.T. y Nichols, A.V.: Structure and function of human serum lipoproteins, en el libro: *The Plasma Proteins* editado por P.W. Putnam, Academic Press, New York and London, Vol. 2, pág. 16-25 (1960).
- 8.-Nichols A.V., Rehnberg, C.S. y Lindgren, F.T.: Gas Chromatographic analysis of fatty acids from dialyzed lipoproteins, *J. Lipid Res.*, 2, 203-207 (1961).