

INSTITUTO DE CARDIOLOGIA Y CIRUGIA CARDIOVASCULAR

Un método para la determinación de lipasa lipoproteínica en corazón y tejido adiposo epididimal

Por los Dres.:

M. LAVIN PALMIERI* y D.
SANCHEZ SERRANO*

Lavín Palmieri, M.; D. Sánchez Serrano. *Un método para la determinación de lipasa lipoproteínica en corazón y tejido adiposo epididimal*. Rev Cub Med (Supl.) 21: 1, 1982.

Se propone un método relativamente económico y de equipamiento sencillo, para la determinación de actividad de lipasa lipoproteínica en corazón y tejido adiposo epididimal de rata. Este método emplea intralipid como sustrato artificial, albúmina bovina fracción V, suero de caballo y solución amortiguadora $\text{CINH}_4/\text{NH}_4\text{OH}$ 0,1M, pH 8,6 en el medio de incubación. El análisis de varianza de la regresión indica buena linealidad cuando se compara actividad enzimática vs. tiempo en ambos tejidos ($p < 0,01$), actividad enzimática vs. cantidad de tejido adiposo (como medida de la concentración de enzima en el homogeneizado) ($p < 0,01$), actividad vs. cantidad de tejido cardíaco ($p < 0,05$). La inhibición de la actividad por CINA y sulfato de protamina (1M y Lmg/ml en el medio de incubación, respectivamente), mostró resultados estadísticamente significativos ($p = 0,025$), demostrando la especialidad del método.

INTRODUCCION

En los métodos usuales para la determinación de la actividad de lipasa lipoproteínica¹ (LPL) en tejidos, se emplea una alta tecnología y resultan costosos en su ejecución. Así, es frecuente la obtención de la enzima purificada en forma de polvo de acetona—éter²⁻⁴, que exige un elevado consumo de estos reactivos, o el empleo de métodos isotópicos^{5,6} que utilizan reactivos y equipos altamente especializados.

El propósito de este trabajo fue desarrollar un método eficaz y relativamente económico que no utilizase reactivos o equipos sofisticados, para la determinación de la actividad LPL en laboratorio de investigación.

MATERIAL Y METODO

Animales

Se utilizaron 18 ratas albinas, machos, de 300-350 g de peso corporal. Las ratas fueron albergadas en jaulas de 42x20x30 cm en número de 2—4 animales por jaula, con pienso ratonina y agua *ad libitum*, y períodos de luz y oscuridad naturales. Todos los animales experimentaron un período de habituación a estas condiciones no menor de una semana, antes de ser utilizados en los experimentos, que comenzaron entre 8 y 9 am. Los animales ayunados fueron privados del alimento y mantenidos con agua durante las 16-18 horas previas al experimento.

Ensayo enzimático

Las ratas fueron anestesiadas con éter, y se les extrajo el corazón aún latiendo, así como también el cuerpo adiposo epididimal izquierdo. Los tejidos fueron lavados 2 6 3 veces con suero fisiológico frío y secados en papel de filtro.

Las cantidades pesadas y el volumen total de medio de incubación (MI) difirieron según el tipo de experimento, pero las proporciones de los constituyentes permanecieron aproximadamente constantes.

Los tejidos fueron homogeneizados en morteros previamente enfriados, utilizando arena de mar purificada y solución amortiguadora fría $\text{NH}_3/\text{ClNH}_4$ 0,1 M, pH 8,6.

Las proporciones finales de los constituyentes del MI fueron: 135 mg de albúmina bovina fracción V; 0,3 mi de intralipid 10%; 2,7 mi de suero de caballo ayunado; y 3,0 mi de homogeneizado que contenía unos 60 mg de ventrículos o 150—200 mg de tejido adiposo (excepto indicación contraria). El pH real del MI fue 8,2.

Se incubó el medio a 37° C con agitación durante 1 hora, en matraces de 25 mi de capacidad con aire como fase gaseosa. Fueron tomadas alícuotas de 1 mi (por duplicado) antes y después de la incubación, y se determinó el contenido de los ácidos grasos no esterificados (AGNE) mediante el método de *Dole y Meinertz*⁹, modificado¹⁰.

Actividad enzimática vs. tiempo

Se utilizaron 3 ratas ayunadas para corazón y 3 ratas no ayunadas para tejido adiposo. Los volúmenes de constituyentes y las cantidades de tejido expresados en el acápite anterior fueron multiplicados por el factor 2,5. Se agregó heparina a concentración final de IU/ml de MI. De ese modo pudieron extraerse 2 alícuotas de 1 mi a los tiempos 0, 15, 30, 60, 90 y 120. minutos de incubación.

El volumen total de MI fue un poco mayor de 15 mi, y se consideró para los cálculos.

Actividad enzimática vs. cantidad de tejido

Se utilizó el mismo número de animales ayunados y no ayunados que en el experimento anterior, homogeneizando unos 600 mg de ventrículos o alrededor de 1, 5 g de tejido adiposo en 10 ml de solución amortiguadora fría que contenía heparina (1 UI/ml de dicha solución); se le agregó 0,5, 1,0, 2,0 ó 3,0 ml de homogeneizado a sendos matraces que contenían 3,0 ml de sustrato, albúmina y suero en las proporciones habituales. Se completó el volumen a 6,0 ml con solución amortiguadora y se ajustó la concentración de heparina (1UI/ml de MI). Las pequeñas diferencias en volumen entre los matraces fueron consideradas en los cálculos.

Inhibición por CINA y sulfato de protamina

A 3,0 ml de medio de ensayo constituido por albúmina, intralipid y suero de caballo en las proporciones usuales, y que contenían 6 UI de heparina se agregó 3,0 ml de homogeneizado de ventrículo en solución amortiguadora (unos 20 mg de tejido/ml de homogeneizado). Al matraz control se agregó 1,0 ml de suero fisiológico y a otros dos matraces se agregó 1,0 ml de solución concentrada de CINA ó 1,0 ml de solución de sulfato de protamina (7 mg/ml) en suero fisiológico. Las concentraciones finales de CINA y protamina por ml de MI fueron: 1 mg y 1 mg, respectivamente. La concentración final de heparina en todos los matraces fue 0,86 UI/ml de MI.

Expresión de los resultados

La actividad LPL fue expresada en microequivalentes de AGNE liberados por g de tejido húmedo por hora de incubación.

Análisis estadístico

Se utilizó el análisis de varianza de la regresión y el *test* de correlación de *Pearson* para los experimentos de linealidad, y el *test* de muestras pareadas de *Wilcoxon* (1 cola) para el experimento de inhibición. El nivel de significación estadística fijado fue 5%.

RESULTADOS

En los gráficos 1, 2, 3 y 4 aparecen los resultados de la actividad enzimática en función del tiempo y en función de la cantidad de tejido en los matraces de incubación; esto último es una medida de la concentración de enzima presente.

El análisis de varianza de la regresión dio resultados significativos: $p < 0,05$ para actividad enzimática vs. cantidad tejido cardíaco y $p < 0,01$ para las otras tres situaciones.

Esto demuestra que los datos obtenidos se ajustan a una línea recta. Adicionalmente, los altos coeficientes de correlación (r) que aparecen en los gráficos, indican buena linealidad en las cuatro situaciones.

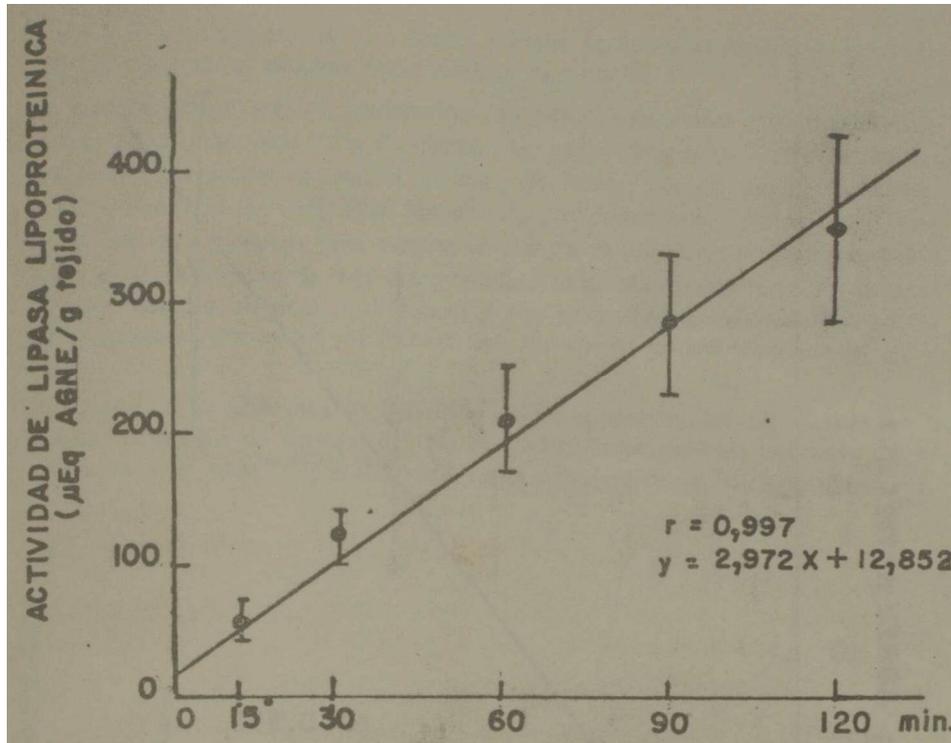


Gráfico 1.
Actividad de lipasa lipoproteínica de corazón en función del tiempo de incubación. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones + ESM.

En el cuadro aparecen los resultados del experimento realizados con los inhibidores.

DISCUSION

El método de determinación de la actividad LPL descrito en este trabajo se basa, fundamentalmente, en el de *Mallov*¹¹ y en el de *Boberg y Carlsan*¹². Estos últimos demostraron que el intralipid, de adquisición relativamente fácil, es entre varios substratos artificiales el de comportamiento más parecido al de los quilomi- crones plasmáticos.

La elección de la solución amortiguadora pareció acertada porque es sabido que el ion amonio es uno de los activadores de la enzima².

El empleo de suero de rata¹³ en el medio de incubación parece dudoso por ser, aunque pequeña, mayor la actividad LPL sérica en esta especie, comparada con otras¹⁴. Además, resulta muy engorrosa su obtención en grandes cantidades, así como la obtención de suero de perro¹¹ en nuestro medio. Sin embargo, el suero

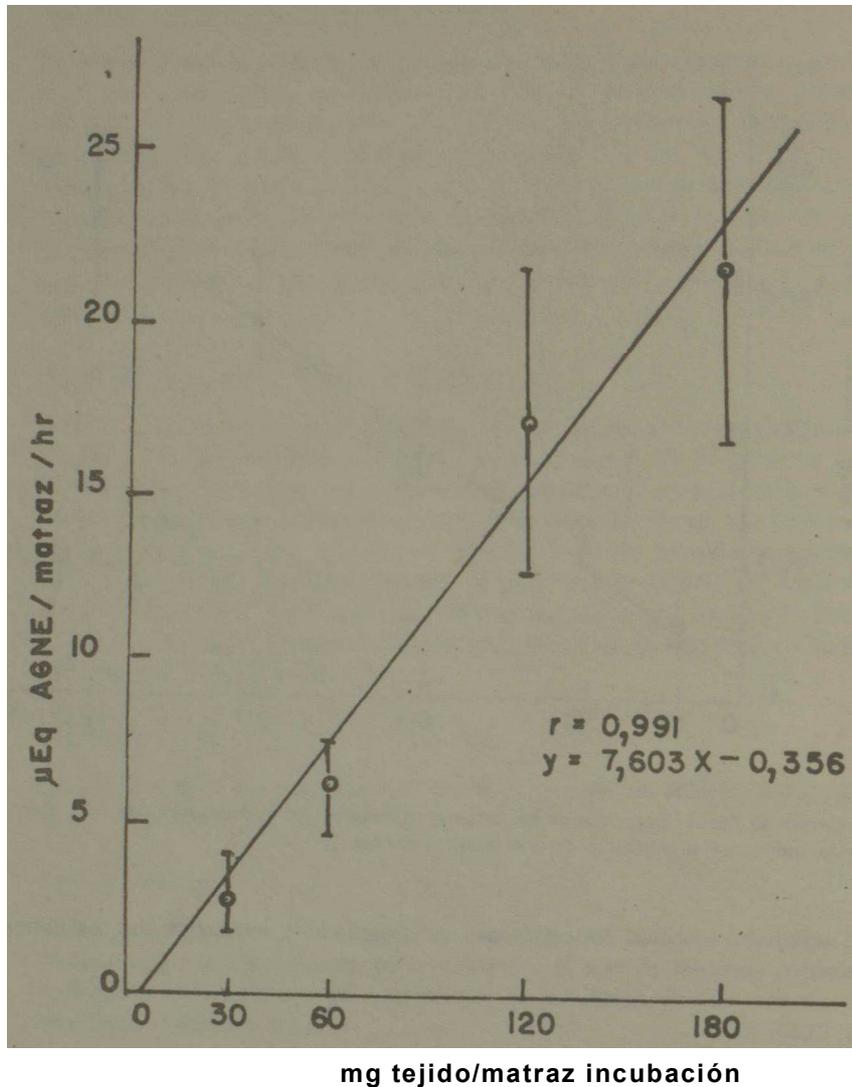


Gráfico 2.

Relación entre concentración de enzima en homogeneizados de corazón y velocidad de liberación de ácidos grasos no esterificados. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones + ESM.

de caballo ayunado se puede adquirir en grandes cantidades con relativa facilidad, y congelarse distribuido en pequeñas porciones que sólo se descongelan una vez, al ser utilizadas. Este suero posee la ventaja adicional de baja concentración de AGNE (generalmente 0.4 mM o menor), y sólo presenta la pequeña dificultad de su color amarillo intenso, que puede obviarse al titularse si posee alguna experiencia 13.

Los elevados coeficientes de correlación hallados justifican el empleo de suero de caballo, intralipid y solución amortiguadora de amonio.

En relación con el método titulométrico empleado aquí, *Bober* (15) recomienda el empleo de sustratos libres de glicerol para poder determinar el glicerol como producto de la acción enzimática, en lugar de AGNE, por ser más reproducibles y más específicos los resultados. Sin embargo, el método de *Dole* continúa siendo la referencia obligada para mostrar la eficacia de cualquier método colorimétrico, si no se dispone de métodos y equipos más sofisticados, como los que emplean isótopos. Además, el intralipid utiliza glicerol como vehículo, lo cual hace imposible el empleo de un método que se base en la determinación del glicerol.

Por último, el experimento de inhibición indica la especificidad del método empleado. La enzima de corazón de rata es inhibida selectivamente por CINA IM y sulfato de orotamina^{16,17}, a diferencia de la hidrolasa de triacilglicéridos hepática¹⁸.

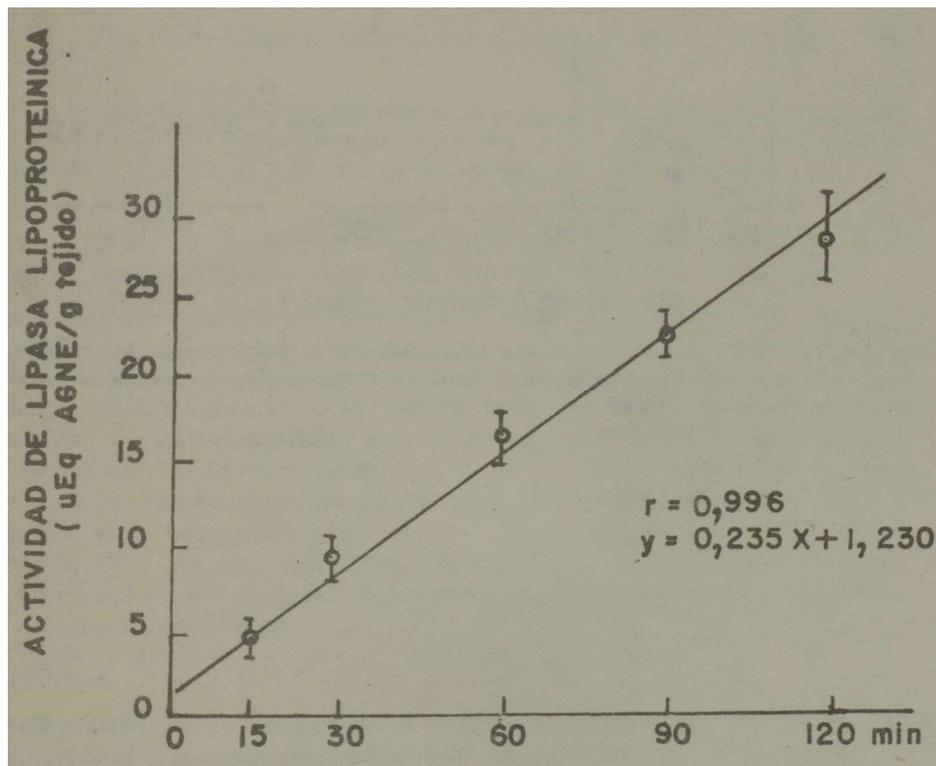


Gráfico 3. Actividad de lipasa lipoproteínica de tejido adiposo en función del tiempo de incubación. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones + ESM.

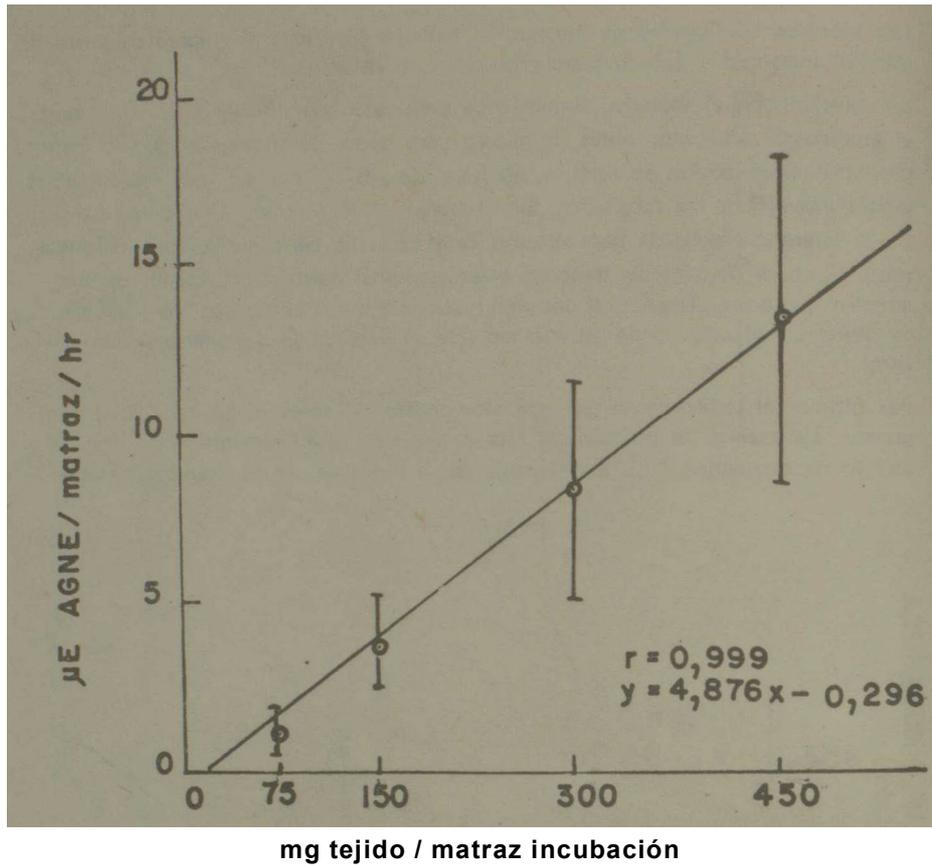


Gráfico 4.
Relación entre concentración de enzima en homogeneizados de tejido adiposo epididimal y velocidad de liberación de ácidos grasos no esterificados. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones + ESM.

CUADRO

INHIBICION DE LIPASA LIPOPROTEINICA CARDIACA POR CINA Y SULFATO DE PROTAMINA

CONTROL	PROTAMINA (1 mg/ml)	% DE INHIBICION	CINa (IM)	% DE INHIBICION
62	34	45	5	92
ACTIVIDAD 137	62	55	7	95
86	46	47	5	94
74	20	73	3	96
114	37	68	16	86
73	17	77	1	99
80	36*	62	39*	95

* Valores versus control, $p = 0,025$ (test de WUcoxon, 1 cola)

Nota: Actividad está expresada en microequivalentes de agne/g de tejido húmedo/horas de incubación.

(Las concentraciones de los inhibidores se refieren al medio de incubación).

Este método puede resultar útil para realizar trabajos con LPL de humano si se consideran las similitudes existentes entre esta enzima y la de rata en cuanto a estructura y acción de estimuladores e inhibidores^{16,19}.

SUMMARY

Lavín Palmieri, M.; D. Sánchez Serrano. *A method for lipoprotein lipase determination at heart and epididymal fat tissue.* Rev Cub Med (Supl.) 21: 1, 1982.

A method comparatively economical and of simple instrumentation to determine lipoprotein lipase activity at heart and epididymal fat tissues of the rat is proposed. This method uses intralipid as artificial substrate, bovine albumin fraction V, horse serum, and $\text{CIN}_4/\text{NH}_4\text{OH}$ O,IM, pH 8,6 tamponade solution at the incubation medium. Variance of regression analysis suggests good linearity when enzymatic activity versus time for both tissues ($p < 0,01$), enzymatic activity versus fat tissue amount (as measure of enzyme concentration in the homogenized) ($p < 0,01$), and activity versus heart tissue amount ($p < 0,05$) are compared. The activity inhibition by CINa and protamine sulfate (IM and 1mg/ml at the incubation medium, respectively) showed significant statistical results ($p = 0,025$) demonstrating the specificity of the method.

RESUME

Lavín Palmieri, M.; D. Sánchez Serrano. *Une méthode pour le dosage de la lipoprotéine-lipase dans le coeur et le tissu adipeux épидидymaire.* Rev Cub Med (Supl.) 21: 1, 1982.

Les auteurs proposent une méthode relativement économique et d'équipement simple, pour le dosage de l'activité de la lipoprotéine-lipase dans le coeur et le tissu

adipeux épидидymaire de rats. Cette méthode utilise intralipid en tant que substrat artificiel, albumine bovine fraction V, sérum de cheval et solution tampon $\text{CINH}_4/\text{NH}_4\text{OH}$ 0,1 M, pH 8,6, dans le milieu d'incubation. L'analyse de variance de la régression indique une bonne linéarité, lorsque l'on compare l'activité enzymatique contre temps dans les deux tissus ($p < 0,01$), activité enzymatique contre quantité de tissu adipeux (comme mesure de la concentration d'enzyme dans l'homogénéisé) ($p < 0,01$), et activité contre quantité de tissu cardiaque ($p < 0,05$). L'inhibition de l'activité par CINa et sulfate de protamine (1M et 1 mg/ml dans le milieu d'incubation, respectivement), a montré des résultats statistiquement significatifs ($p = 0,025$), ce qui a démontré la spécificité de la méthode.

PE301IE

JlaBHH naJTKMnepH, M.; ;L CaHnec CeppaHO. MeToa no onpeaeJie HHH JinnonpoTeHHOBofl Jiana3u B cepune H B an0no3Hoa ammajwMajiB HO0 TKSH0. ' Rev Cub Med (Supl.) 21: 1. 1982.

IpejyaraeTCfl OTHOCHTeJiLHO 3K0H0Mn'iHmc MeTOH oneHB nocroro o6 opynoBcHM, no onpeflejieHHio aKTHBHocTH juaonnoTeaHOBpS Jiana3u b cepune **Z** b aimno3Hofi 3muuinHMaji>Hoft Ticam kphch. 3tot MeTo,u nnaM0HH6T BHTpajianiul b KanecTBe cy6CTpaKTa nckyCTBeHHoro 6whb ero ajibdyMHa \$paKnaa v, kohcho8° chbopotkh h T6pM03H0p0 pacT coga CINH4/NH4 O,1E', pH 8,6 b HHKytiaiiinoHHoc cpe^e. AHajiH3 H3MeH8HaH Derpecca yicasuBaeT Ha xopomyffi JLHHPftHOCTB, Korjia cpa BHBBaeTCH 3H3P!MaTH^0CKaH 8KTHBH0CTB va . BpeMfl B O6eHX TKaHjIX- ($p < 0,01$), 3H30MaTHnecKafl skthbhoctb vs . KOJKnecTBO ajxano3- HOif TK8HO [K8K Cpe^Hee KOHlieHTpaUilH SftSHMa B r0M0reHH3aaUH) - ip-;0,01) H aKTHBHOCTh vs . KajiH^PCTBO CepC^WOj} TKaHK 1 D 0,05) TopMOHepae aKTHBHOCTh **cuja** n 6ejrKOBopo **cyjiblarA**. (IM h Imt/mj! b BHKyOannorTHoi cpejie, cooTBeCTBeHHo) aajio pe3yjitath co cTa THCTHHeCKOtt TOTOH 3p0HM SHa^HTejILHye t,p =P 0,025), yK83HBa/I - cnenadiH^HOCTB MeT0.ua.

BIBLIOGRAFIA

1. Kom, E.D. The assay of lipoprotein lipase in vivo and in vitro. Methods Biochem Anal 7: 145, 1959.
2. Wayne, T.F.; J.M. Felts. Activation of lipoprotein lipase. Circ Res 28: 649, 1971.
3. Borensztajn, J. et al. Effect of fasting on the clearing factor lipasa (lipoprotein lipase) activity of fresh and defatted preparations of rat heart muscle. J Lipid Res 11: 102, 1970.
4. Lisch, H.J. et al. Activation of adipose tissue lipoprotein lipase by lipoprotein fractions from normals and patients with type V hyperlipoproteinemia. Klin Wochenschr 56: 1067, 1978.
5. Borensztajn J.; D.S. Robinson. The effect of fasting on the utilization of chylomicron triglyceride fatty acids in relation to clearing factor lipase

- (lipoprotein lipase) releasable by heparin in the perfused rat heart. *J. Lipid Res* 11: 111, 1970.
6. *Blanchette-Mackie, E.J.; R.O. Scow*. Effects of lipoprotein lipase on the structure of chylomicrons. *J Cell Biol* 58: 689, 1973.
 7. *Chajek, T. et al*. Colchicine—induced inhibition of plasma lipoprotein lipase release in the intact rat. *Biochim Biophys Acta* 380: 127, 1975.
 8. *Lukens, T.W.; J. Borensztajn*. Effects of C apoproteins on the activity of endothelium-bound lipoprotein lipase. *Biochem J* 175: 1143, 1978.
 9. *Dolq, V.P.; H. Meinertz*. Microdetermination of long chain fatty acids in plasma and tissue. *J Biol Chem* 235: 2595, 1960.
 10. *Salamm, M.R.; D.S. Robinson*. Enzymes of lipid metabolism. P. 218. Pergamon Press, New York, 1961.
 11. *Mallov, S*. Aortic lipoprotein lipase activity in relation to species, age, sex and blood pressure. *Circ Res* 14: 353—363, 1964.
 12. *Boberg, J.; L.A. Carlson*. Determination of heparin induced lipoprotein lipase activity in human plasma. *Clin chim Acta* 10: 420, 1964.
 13. *Whayne, T.F.; J.M. Felts*. Activation of lipoprotein lipase. *Circ Res* 27: 941, 1970.
 14. *Zemplényi, et al*. Relationship of lipolytic and esterolytic activity of the aorta to susceptibility to experimental atherosclerosis. *Cir Res* 7: 286, 1959.
 15. *Boberg, J*. Quantitative determination of heparin released lipoprotein lipase activity in human plasma. *Lipids* 5: 452, 1970.
 16. *Twu, J-Sh. et al*. Rat heart lipoprotein lipase. *Atherosclerosis* 22: 463, 1975.
 17. *Henson, L.C. et al*. Lipoprotein lipase in cultured heart cells: characteristics and cellular location. *Biochim Biophys Acta* 487 : 212, 1977.
 18. *La Rosa, J.C. et al*. Comparison of the triglyceride lipase of liver, adipose tissue and port heparin plasma. *J Lipid Res* 13: 356, 1972.
 19. *Twu, J—Sh. et al*. Purification and characterization of lipoprotein lipase from human heart. *Atherosclerosis* 24: 119, 1976.

Recibido: diciembre 12, 1980.

Aprobado: diciembre 13, 1980.

Dr. *M. Lavín Palmieri*

Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular

17 y A, Vedado. La Habana.

RCMS - 1982