

INSTITUTO DE CARDIOLOGIA Y CIRUGIA CARDIOVASCULAR

Actividad de lipasa de lipoproteínas: aplicación de un método al tejido cerebral

Por el Dr.: MARCELINO LAVIN PALMIERI

Lavin Palmieri, M. *Actividad de Lipasa de lipoproteínas: aplicación de un método al tejido cerebral.*

Se expone un método para la determinación de actividad de la lipasa de lipoproteínas (LPL) en cerebro de rata. El método es una ligera modificación de otro empleado en la detección de la actividad LPL en corazón y tejido adiposo epididimal de rata. El análisis de varianza de la regresión mostró buena linealidad para actividad enzimática vs. cantidad de tejido ($p < 0,05$) y actividad enzimática vs. tiempo ($p < 0,005$) en los rangos investigados. Los coeficientes de correlación fueron $r = 0,967$ y $r = 0,980$ respectivamente. El cloruro de sodio y el sulfato de protamina inhibieron significativamente a la LPL cerebral ($p = 0,025$) a concentraciones de 1 M y 1 mg/ml de medio de incubación, respectivamente.

INTRODUCCION

En un trabajo anterior se expuso una técnica para la determinación de la actividad de lipasa de lipoproteínas (LPL) en corazón y tejido adiposo epididimal de rata.¹ Este método resulta económico y emplea equipos sencillos y de bajo costo.

La detección de actividad LPL en cerebro es un hallazgo relativamente reciente,^{2,3} y su presencia en este tejido adquiere una singular importancia por haberse invocado su implicación en la génesis del proceso aterosclerótico,⁴ el cual afecta, entre otros vasos, las arterias del tejido cerebral.⁵

El presente trabajo se realizó con el objetivo de demostrar la eficacia de este método para la determinación de la actividad de LPL en el tejido cerebral.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron 28 ratas albinas, machos, de 300-350 g de peso corporal, procedentes de la endocría del departamento, a las que se suministró alimento y agua *ad libitum*.

* Médico especialista del laboratorio de bioquímica del Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular.

Ensayo enzimático

Las ratas fueron sacrificadas con éter, y el cerebro fue extraído rápidamente, lavado 2-3 veces con suero fisiológico frío, secado en papel de filtro, pesado y utilizado de inmediato. Las cantidades pesadas y el volumen total de medio de incubación (MI) variaron según el tipo de experimento, pero las proporciones de los constituyentes permanecieron constantes. El tejido fue homogenizado con solución amortiguadora fría (NH₃/CINH₄ 0,1 M) en pH 8,6; en un homogenizador tipo Petter con pistón de cristal, aplicando 12 golpes de 5 seg de duración cada uno. Las proporciones finales de los constituyentes en el MI fueron: 130 mg de albúmina bovina fracción V, 1,0 ml de Lipofundín 10 %, 1,87 ml de suero de caballo, 6 UI de heparina (1 UI/ml de MI) y 3 ml de homogenizado, cuya concentración de tejido varió según el experimento. El pH real del MI fue 8,2. El medio, sin homogenizado, fue preincubado durante 30 min y la incubación procedió a 37 °C con agitación durante 1 h (excepto indicación contraria), en matraces de 25 ml de capacidad con aire como fase gaseosa. Alícuotas de 1 ml (por duplicado) fueron tomadas antes y después de la incubación, determinándose el contenido de ácidos grasos no esterificados (AGNE) liberados por la enzima como medida de su actividad, según *Dole y Meinertz*,⁶ modificado.⁷ Aunque habitualmente la hidrólisis espontánea de la emulsión artificial de triglicéridos es despreciable, se procesó un blanco de hidrólisis en forma simultánea.

Actividad enzimática vs. tiempo

Se utilizaron cerebros procedentes de 6 ratas y las alícuotas fueron extraídas de 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 y 75 min. La concentración de tejido fue aproximadamente 100 mg/ml de MI.

Actividad enzimática vs. cantidad de tejido

Se utilizaron 16 ratas. La concentración de tejido fue aproximadamente 100 mg/ml de homogenizado. A 4 matraces que contenían 3 ml de medio de ensayo (constituyentes sin homogenizado) se agregaron 0,5; 1,0; 1,5; y 2,0 ml de homogenizado. El volumen total fue llevado a 6 ml por matraz con solución amortiguadora.

Inhibición por cloruro de sodio (NaCl) y sulfato de protamina

A 3,0 ml de medio de ensayo se agregó 3,0 ml de homogenizado (20 mg de tejido/ml). Al matraz control se agregó 1,0 ml de suero fisiológico y a otros dos matraces 1,0 ml de solución concentrada de NaCl o 1,0 ml de solución de sulfato de protamina en suero fisiológico. Las concentraciones finales de NaCl y protamina por ml de MI fueron 1M y 1 mg respectivamente.

Expresión de los resultados

La actividad LPL de cerebro fue expresada en microequivalentes de AGNE liberados por peso de tejido húmedo o por tiempo de incubación, o referida a gramos de tejido por hora de incubación, según el caso.

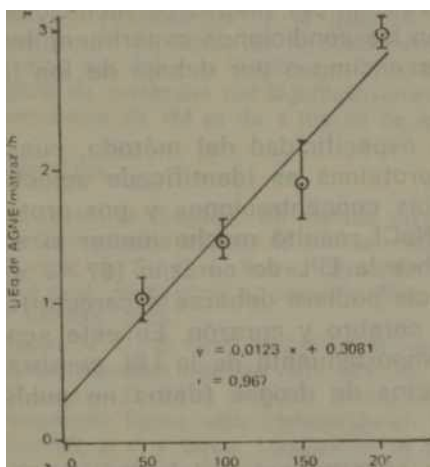
Análisis estadístico

Se utilizaron 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 y 2 se muestra la actividad enzimática en función de la cantidad de tejido incubado en los matraces y en función del tiempo transcurrido, respectivamente. En el primer caso hubo una elevada correlación positiva ($r = 0,967$) y el análisis de varianza mostró linealidad significativa ($p < 0,05$). Para la variable "tiempo" la correlación también fue elevada ($r = 0,980$) y el análisis de varianza demostró linealidad ($p < 0,005$).

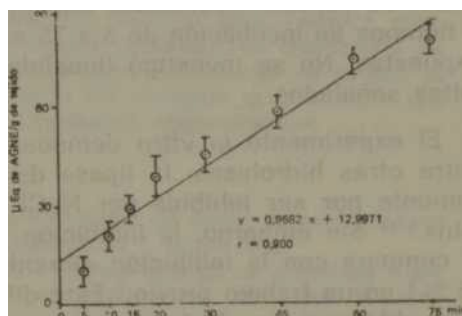
Gráfico 1



mg de tejido/matraz. de incubación

Actividad de la lipasa de lipoproteínas de cerebro de rata, en función de la concentración de tejido en el matraz de incubación; $p < 0,05$ según el análisis de varianza de la regresión; $n = 8$ en cada punto. ($\bar{x} \pm ESM$).

Gráfico 2



Actividad de la lipasa de lipoproteínas de cerebro de rata, en función del tiempo de incubación; $p < 0,005$ según el análisis de varianza de la regresión; $n = 6$ en cada punto ($\bar{x} \pm ESM$).

En el experimento de inhibición (cuadro), tanto el NaCl como el sulfato de protamina inhibieron significativamente la actividad de la enzima ($p = 0.025$). El promedio de inhibición fue 67 % y 47 % respectivamente.

CUADRO
EFECTO INHIBIDOR DEL SULFATO DE PROTAMINA (1 mg/ml) Y DEL NaCl (1 M) SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA LIPASA DE LIPOPROTEINAS (LPL) EN CEREBRO DE RATA (Experimentos pareados)

	Control	NaCl	% de inhibición	Protamina	% de inhibición
	68,8	31,0	54,9	36,8	46,4
Actividad de LPL	80,9	21,7	73,1	32,6	59,7
(p, Eq de AGNE/g/h)	54,2	11,0	79,6	22,9	57,6
	84,3	27,7	67,0	44,2	47,5
	88,3	45,8	48,1	46,9	46,8
	80,9	26,6	67,1	46,5	42,4
Mediana	80,9	27,2*	66,4	40,5*	47,2

Valores versus control, $p = 0,025$ (Test de Wilcoxon, 1 cola)

DISCUSION

Los resultados demuestran cumplimiento de la linealidad para cantidades de cerebro fluctuantes entre 50 y 200 mg por matraz de incubación y tiempos de incubación de 5 a 75 min, en las condiciones experimentales expuestas. No se investigó linealidad por encima o por debajo de los límites señalados.

El experimento *in vitro* demuestra la especificidad del método, pues, entre otras hidrolasas, la lipasa de lipoproteínas es identificada selectivamente por ser inhibida por NaCl a altas concentraciones y por protamina.^{8,12} Sin embargo, la inhibición por NaCl resultó mucho menor si se la compara con la inhibición ejercida sobre la LPL de corazón (67 % vs 95 %) en un trabajo previo.¹ Esta diferencia pudiera deberse a características diferenciales de las isoenzimas de cerebro y corazón. En este sentido, hemos hallado recientemente un comportamiento de la LPL cerebral diferente al de la cardíaca bajo los efectos de drogas (datos no publicados).

En relación a las proporciones de los constituyentes del MI, sólo se ha variado aquí la concentración de la emulsión artificial de triglicéridos, aumentándola (y, por ende, disminuyendo la de suero, para mantener un volumen constante). Esto se hizo porque en experimentos previos se halló que la actividad de LPL cerebral era óptima a esta concentración de triglicéridos. Es posible que ello se deba a menor similitud del lipofundín con el sustrato natural (quilomicrones) en comparación con el Intralipid.¹³

El método de Lavín y Sánchez¹ resulta mucho más económico en el uso de reactivos, pues no emplea acetona^{14,15} ni costosos reactivos isotópicos.^{16,17} Brinda, además, la alternativa de varios sustratos artificiales y los valores de actividad enzimática encontrados (ver cuadro) están dentro de los límites reportados por Mallov y Alousi.¹⁸

Agradecimiento

Deseo expresar mi agradecimiento a la compañera Ana Maltas por su excelente trabajo técnico.

SUMMARY

Lavin Palmieri, M. *Lipoprotein lipase activity. Application of a method to brain tissue.*

A method for determination of lipoprotein lipase (LPL) activity in rat brain is exposed. The method is a slight modification of another one used for detections of LPL activity in rat heart and epididymal adipose tissue. Regression variance analysis showed good linear response for enzymatic activity vs tissue quantity ($p < 0,05$) and enzymatic activity vs time ($p < 0,005$) within the ranges investigated. Correlation coefficient were $r = 0,967$ and $r = 0,980$, respectively. Sodium chloride and protamine sulfate inhibited significantly brain LPL ($p = 0,025$) at 1M and 1 mg/ml incubation medium concentrations, respectively.

RÉSUMÉ

Lavin Palmieri, M. *Activité de la lipoprotéine-lipase: Application d'une méthode au tissu cérébral.*

L'auteur expose une méthode pour la détermination de l'activité de la lipoprotéine-lipase (LPL) dans le cerveau de rat. La méthode est une légère modification d'une autre employée dans le dépistage de l'activité de LPL dans le coeur et le tissu adipeux épидидymaire de rat. L'analyse de variance de la régression a montré une bonne linéarité pour l'activité enzymatique contre la quantité de tissu ($p < 0,05$) et pour l'activité enzymatique contre le temps ($p < 0,005$) dans les limites étudiées. Les coefficients de corrélation ont été $r = 0,967$ et $r = 0,980$ respectivement. Le chlorure de sodium et le sulfate de protamine ont significativement inhibé la LPL cérébrale ($p = 0,025$) à des concentrations de 1M et de 1 mg/ml de milieu d'incubation, respectivement.

BIBLIOGRAFIA

1. Lavín, M.; D. Sánchez: Un método para la determinación de lipasa lipoproteínica en corazón y tejido adiposo epididimal. Rev Cub Med Suppl 1, 21:26, 1982.
2. Vyvoda, O. S.; C. E. Rowe: Glyceride lipases in nerve endings of guinea-pig brain and their stimulation by noradrenaline, 5-hydroxy-triptamine and adrenaline. Biochem J 132:233, 1973.
3. Cabot, M. C.; S. Gatt: Hydrolysis of neutral glycerides by lipases of rat brain micro-somes. Biochim Biophys Acta 431:105, 1976.
4. Zilvermit, D. B.: A proposal linking atherogenesis to the interaction of endothelial lipoprotein lipase with triglyceride-rich lipoproteins. Circ Res 33:633, 1973.
5. Cornhill, J. F. y otros: Localization of atherosclerotic lesions in the human basilar artery. Atherosclerosis 35:77, 1980.
6. Dole, V. P.; H. Meinertz: Microdetermination of long chain fatty acids in plasma and tissue. J Biol Chem 235:2595, 1960.
7. Salaman, M. R.; D. S. Robinson: Enzymes of Lipid Metabolism, Pergamon Press, New York, 1961. P. 218.
8. Brady, M.: The properties of the lipoprotein lipases of rat heart, lung and adipose tissue. Biochim Biophys Acta 137:140, 1967.
9. Greten, H.: A further characterization of lipoprotein lipase. Biochim Biophys Acta 164:185, 1968.

R.C.M.

MARZO, 1985

10. *clialek, T. y otros*: Interference with the transport of heparin-releasable lipoprotein lipase in the perfused rat heart by colchicine and vinbáistine. *Biochim Biophys Acta* 388:260, 1975.
11. *Twu, J. S. y otros*: Rat heart lipoprotein lipase. *Atherosclerosis* 22:463, 1975.
12. *Henson, L. C. y otros*: Lipoprotein lipase in cultured heart cells: characteristics and cellular location. *Biochim Biophys Acta* 487:212, 1977.
13. *Boberg, J.; L. A. Carlson*: Determinaron of heparin-induced lipoprotein lipase activity in human plasm. *Clin Chim Acta* 10:420, 1964.
14. *Whayne, T. F.; J. M. Felts*: Activation of lipoprotein lipase. *Circ Res* 28:649, 1971.
15. *Lisch, H. J. y otros*: Activation of adipose tissue lipoprotein lipase by lipoprotein fractions from normáis and patients with type V hiperlipoproteinemia. *Klin Wochenschr* 56:1067, 1978.
16. *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) releas- able by heparin in the perfused rat heart. *J Lipid Res* 11:111, 1970.
17. *Lukens, T. W.; J. Borensztajn*: Effects of C apoproteins on the activity of endothelim- bound lipoprotein lipase. *Biochem J* 175:1143, 1978.
18. *Mallov, S.; A. A. Alousi*: Effect of altered cardiac metabolism and work on lipoprotein lipase activity of heart. *Am J Physiol* 212:1158, 1967.

Recibido: 26 de abril de 1983.

Aprobado: 29 de junio de 1983.

Dr. *Marcelino Lavin Palmieri*

Dpto. de Bioquímica

Instituto de Cardiología y Cirugía

Cardiovascular 17 y A, Vedado, Habana.