

Esterificación del colesterol en el plasma humano

M. Pocovi, J. M.^a Ordovas y F. Grande

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad de Zaragoza
Zaragoza-9

(Recibido el 19 de octubre de 1981)

M. POCОВI, J. M.^a ORDOVAS and F. GRANDE. *Cholesterol Esterification in Human Plasma*. Rev. esp. Fisiol., 38, 209-214. 1982.

The initial rates of the reaction catalized by the lecithin: cholesterol acyltransferase, were measured in the plasmas of two groups of normal subjects (20 males and 20 females) of the same age (average 20 years). The determination of the initial rate of lecithin: cholesterol acyltransferase reaction in human plasma was measured by a method based on the determination of plasma unesterified cholesterol by gas-liquid chromatography. With this technique the plasma esterification reaction is linear to approx. 75 min.

The influence of sex, concentration of cholesterol total, high density lipoprotein cholesterol and unesterified cholesterol on the initial rate of plasma cholesterol esterification has been shown.

La enzima lecitín:colesterol aciltransferasa (LCAT) cataliza la transferencia de un ácido graso de la posición C₂ de la lecitina al grupo hidroxilo de la posición 3 del colesterol, que se encuentra en las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (4). La LCAT contribuye de forma indirecta a rebajar el contenido de colesterol libre de otras lipoproteínas (4). La reacción catalizada por la LCAT es responsable de la formación de la mayor parte de los ésteres de colesterol del plasma (4, 13), desempeñando un importante papel en el catabolismo de las lipoproteínas y en el transporte del colesterol desde los tejidos periféricos al hígado (4, 5).

La actividad de la LCAT está disminuida en las enfermedades hepáticas (3,

17) y su ausencia constituye un error congénito del metabolismo (13).

A pesar del interés de esta enzima para el conocimiento del metabolismo de las lipoproteínas del plasma y el diagnóstico clínico, los progresos en el estudio de la LCAT se han visto dificultados por la falta de un método de análisis sencillo y preciso (10). Debido a que la reacción es relativamente lenta en el plasma de sujetos normales, las determinaciones colorimétricas de colesterol libre o fosfatidilcolina no son lo suficientemente sensibles para medir la velocidad inicial de la reacción catalizada por la LCAT. Las determinaciones mediante el uso de radioisótopos (16) requieren el equilibrio previo del colesterol exógeno radiactivo con

el colesterol endógeno, lo cual ha sido objeto de críticas (15). Los métodos enzimáticos (12) presentan el inconveniente de necesitar enzimas purificadas, por regla general, difíciles de conseguir y caras.

El objeto de este trabajo ha sido desarrollar un procedimiento relativamente sencillo y digno de confianza para determinar la velocidad inicial de esterificación del colesterol del plasma y determinar la influencia del sexo, colesterol total, libre y en HDL sobre la actividad del LCAT.

Material y métodos

Materiales biológicos. El presente trabajo se llevó a cabo con 40 estudiantes de la Universidad de Zaragoza. La sangre venosa se obtuvo de los sujetos tras un ayuno de 12 horas. Las muestras se recogieron en tubos de ensayo, previamente enfriados, que contenían 1 mg de la sal disódica del ácido etilén diamino tetraacético (EDTA) por ml de sangre. El plasma se separó inmediatamente y se mantuvo a baja temperatura (0-4° C) hasta su análisis.

Análisis de colesterol y lipoproteínas. El colesterol total y colesterol en HDL se determinaron según el método de HUANG *et al.* (6). La precipitación de lipoproteínas de baja y muy baja densidad se llevó a cabo con fosfotungstato sódico y magnesio (9). La concentración de colesterol libre se determinó por cromatografía de gases como se describe a continuación.

Determinación de la esterificación del colesterol en el plasma. La esterificación del colesterol en el plasma se determinó midiendo la disminución en la concentración del colesterol libre (antes y después de la incubación) por cromatografía gas-liquido. Para cada determinación de la velocidad de la reacción catalizada por la LCAT se tomaron dos alícuotas (500 μ l) del mismo plasma y se colocaron en dos

tubos de ensayo con tapón roscado; uno de los cuales se incubaba a 37° C en un baño provisto de agitación. En otro tubo se detenía la esterificación añadiendo 5 ml de cloroformo:metanol 2:1 (v/v). A la fase clorofórmica se le añadía una cantidad conocida de estándar interno. La mezcla se agitaba con un agitador magnético y después de dejar reposar durante 10 min, se centrifugaba a 3.000 r.p.m., 15 min. El sobrenadante se decantaba en otro tubo de ensayo y al objeto de separar las dos fases se le añadía 2 ml de disolución tampón (1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA a pH 7,3). El tubo se agitaba fuertemente y luego se centrifugaba a 3.000 r.p.m., 5 min. Se transferían 3 ml de la fase clorofórmica a un tubo de forma cónica, evaporándose el disolvente bajo corriente de nitrógeno a baja temperatura (60-70° C). Los lípidos del plasma sometido a incubación fueron aislados por el mismo procedimiento. El residuo se disolvía en 200 μ l de cloroformo. Con una microjeringa se inyectaba un volumen que contenía 0,6-1,2 μ g de colesterol en un cromatógrafo de gases, Pye Unicam serie 204, equipado con un detector de ionización de llama de H₂ y un integrador electrónico, Minigrator.

Las columnas de vidrio utilizadas (longitud 2 m, diámetro interior 1/8") fueron rellenas con un 3 % de OV-17 sobre Gas-Chrom 80/100 (Xpctrix S.A.). El gas portador era helio; flujo 40 ml/min; temperatura de la columna 280° C. La concentración de colesterol libre se determinaba en cada alícuota de plasma a partir de la relación de las áreas integradas de los picos que corresponden al estándar interno y al colesterol no esterificado, teniendo en cuenta, además, la concentración del estándar interno añadido y el correspondiente factor de respuesta.

Los factores de respuesta para cada estándar interno (colestano, butirato de colesterol y acetato de colesterol [Sigma]) se determinaron a partir de la relación de

áreas de los picos que se obtienen al inyectar muestras estándar de igual concentración de estándar interno y colesterol libre (Merck).

Análisis estadístico. La significación de las diferencias de los valores obtenidos entre los grupos estudiados se llevó a cabo utilizando la prueba *t* de Student para variables no apareadas (14). El análisis de la significación de los coeficientes de correlación se hizo mediante la prueba *t* de Fischer (14). Los valores de *p* menores o iguales a 0,02 fueron considerados significativos.

Resultados

Evaluación de los factores que afectan la determinación de colesterol libre por cromatografía de gases. El factor de respuesta para cada estándar interno se calculó como el valor medio del cociente entre las áreas de los picos correspondientes al estándar interno y a la solución estándar de colesterol, en 15 muestras estándar de igual concentración de estándar

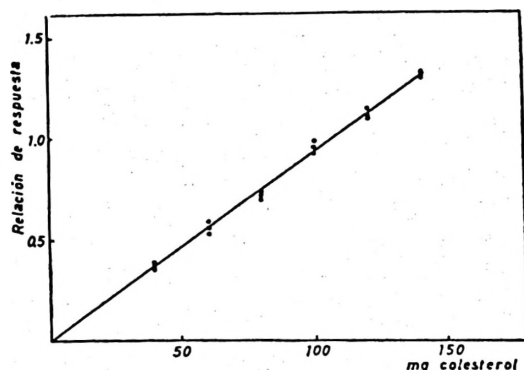


Fig. 1. Linealidad del factor de respuesta para el butirato de colesterol.

La relación de respuesta es la razón entre las áreas de los picos del colesterol libre a butirato de colesterol. La concentración de butirato de colesterol se mantuvo constante (120 mg/100 ml disolución) y la de colesterol libre variable (40-140 mg/100 ml disolución).

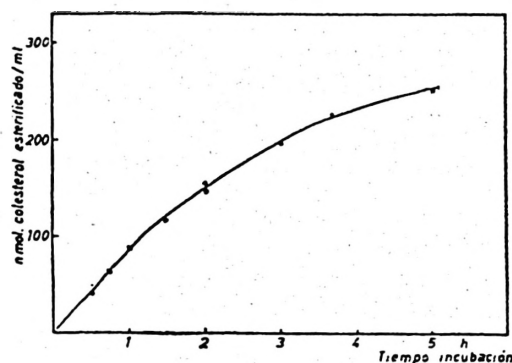


Fig. 2. Curva de esterificación del colesterol del plasma en función del tiempo.

Plasma de un sujeto normal (colesterol total 176, colesterol libre 43 y colesterol en HDL 42 mg/100 ml).

interno y colesterol (120 mg de cada uno/100 ml de disolvente). El factor de respuesta que mostró menor variación (0,4 %) entre todos los estudiados fue el del butirato de colesterol. Por esta razón el butirato de colesterol fue elegido como estándar interno habitual.

Al objeto de conocer el rango de concentraciones de colesterol para el que es aplicable el factor de respuesta, se evaluó la linealidad de la relación de respuestas, que es la razón entre las áreas de los picos del colesterol libre a butirato de colesterol. La figura 1 demuestra que la relación de respuestas es lineal en el rango de 40 a 140 mg de colesterol libre/100 ml de disolución.

Los lípidos del extracto lipídico se aplicaron a una placa de cromatografía en capa fina y se eluyeron con hexano:éter dietílico:acético 80:20:1 (v/v/v). Los lípidos totales, a excepción del colesterol libre, se disolvieron en cloroformo e inyectaron en el cromatógrafo de gases. No se encontró ningún compuesto con el mismo tiempo de retención que el colesterol libre. También se realizaron cromatogramas del extracto lipídico sin estándar interno y se comprobó que ningún pico

Tabla I. *Niveles de colesterol del plasma y actividad de la LCAT.*
Valores medios y desviaciones estándar (SD) de las 40 muestras analizadas (20 hombres y 20 mujeres). Entre paréntesis figuran los valores máximo y mínimo de cada uno de los parámetros determinados. NS = No significativo.

	Colesterol total (mg $\times$ dl ⁻¹)	% Colesterol en HDL	% Colesterol libre	LCAT (nmol $\times$ ml ⁻¹ $\times$ h ⁻¹)	Edad
Hombres	163 $\pm$ 31 (226-112)	30,1 $\pm$ 7,0 (42,7-17,0)	23,1 $\pm$ 1,7 (26,5-20,2)	66,7 $\pm$ 12,2 (85-43)	19,9 $\pm$ 3,0 (25-16)
Mujeres	172 $\pm$ 28 (255-130)	33,4 $\pm$ 11,7 (55,2-14,8)	24,4 $\pm$ 1,3 (26,5-22,1)	75,2 $\pm$ 9,5 (90-56)	20,9 $\pm$ 2,2 (24-16)
Significación	NS	NS	p < 0,01	p < 0,012	NS

de los lípidos del plasma coincidía con el del estándar interno.

Para asegurar que se medía la velocidad inicial de la reacción de esterificación, se midió la concentración de colesterol esterificado en función del tiempo de incubación. La reacción es lineal hasta un tiempo de incubación de 75 min aproximadamente (fig. 2).

La reproducibilidad y precisión del método se comprobaron mediante 10 series de determinaciones de colesterol libre en el mismo plasma. El coeficiente de variación de las 10 determinaciones oscilaba entre 0,2 y 0,8 %.

Influencia del sexo, concentraciones de colesterol total, libre y en HDL sobre la velocidad inicial de esterificación del colesterol del plasma. La tabla I muestra los niveles de colesterol total, tanto por ciento de colesterol libre con respecto al total, tanto por ciento de colesterol en HDL con respecto al total y velocidad inicial de esterificación del colesterol del plasma de dos grupos de sujetos normales, 20 hombres y 20 mujeres, de la misma edad. El grupo de mujeres estudiado no había tomado nunca anticonceptivos orales.

Estos resultados indican que la media de los niveles de colesterol total y tanto por ciento de colesterol en HDL no presenta diferencias significativas entre el grupo de hombres y el de mujeres. Sin

Tabla II. *Coeficientes de correlación.*

	Hombres	Mujeres
LCAT vs Colest. total	0,616 *	0,263 **
LCAT vs % Colest. HDL	-0,672 *	-0,395 **
LCAT vs % Colest. libre	0,657 *	+0,514 **

* p < 0,01 ** No significativo

embargo, la media del tanto por ciento de colesterol libre es significativamente más alta (p < 0,01) en las mujeres (24,4 DE $\pm$ 1,3) que en los hombres (23,1 DE $\pm$ 1,7). Análogamente se observa que la velocidad de esterificación del colesterol es más alta en las mujeres (75,2 DE $\pm$ 9,5) que en los hombres (66,7 DE $\pm$ 12,2) (p < 0,012).

La actividad de la LCAT muestra una correlación positiva (p < 0,01) con el colesterol total y con el tanto por ciento de colesterol libre y una correlación negativa (p < 0,01) con el tanto por ciento de colesterol en HDL, en el grupo de hombres estudiados. Sin embargo, no se ha encontrado correlación significativa entre estos parámetros en el grupo de mujeres de la misma edad (tabla II).

Discusión

Hace años se demostró que la velocidad de esterificación del colesterol del plasma humano varía con la edad y que los sujetos normales del mismo sexo y edad

no presentan diferencias apreciables de la actividad de la LCAT (18). Por lo tanto, las diferencias que observamos en la actividad de la LCAT en los grupos estudiados podemos atribuirlos a diferencias debidas al sexo. El hecho que las mujeres presenten una media de velocidad de esterificación superior a los hombres, quizá se deba a que el tanto por ciento de colesterol libre, sustrato de la enzima, es superior en las mujeres que en los hombres. Estos resultados discrepan de los de MARCEL y VEZINA (10), quienes encuentran que la actividad de la LCAT es superior en hombres que en mujeres. Esta diferencia con nuestras observaciones probablemente se deben a que los grupos estudiados por estos autores eran muy pequeños (8 hombres y 7 mujeres) y el rango de edades demasiado amplio (hombres 24-36 años y mujeres 23-43 años).

Las influencias de la concentración de enzima y sustratos sobre la velocidad de esterificación del colesterol no pueden identificarse con el método utilizado. La correlación positiva entre la LCAT y el colesterol total o el tanto por ciento de colesterol libre en el grupo de hombres estudiado hace suponer que la concentración enzimática es la misma y que la actividad de la LCAT depende de la concentración de sustrato, colesterol libre.

La falta de correlación significativa entre la LCAT y el colesterol total, tanto por ciento de colesterol libre y tanto por ciento de colesterol en HDL en el grupo de mujeres, en contraste con los hombres, coincide con los resultados de GILLET y SILVA (2) en una población brasileña. Este hecho puede atribuirse, en parte, a las variaciones de los niveles de lípidos del plasma durante el ciclo menstrual (7, 8).

Por otra parte, la correlación negativa entre el tanto por ciento de colesterol en HDL y la actividad de la LCAT en el grupo de hombres, podría explicarse teniendo en cuenta que la HDL se puede separar en dos fracciones HDL₂ y HDL₃

y se ha demostrado que la HDL₂ es un inhibidor de la reacción, mientras que la HDL₃ no ejerce efecto alguno sobre la misma (1, 11). Al aumentar la concentración de colesterol en HDL podría ocurrir que también lo hiciese la fracción HDL₂, inhibiendo la reacción.

El método que hemos descrito para determinar la velocidad inicial de esterificación del colesterol es similar al publicado por MARTEL y VEZINA (10). En la forma utilizada por nosotros el método ofrece la ventaja de no necesitar la obtención del trimetil silil éter de colesterol para analizar el colesterol libre, con la consiguiente ganancia en sencillez y tiempo. Se ha demostrado que en el plasma de sujetos normales la linealidad de la esterificación se cumple hasta los 75 min y que la reproductibilidad del método es satisfactoria.

Resumen

Se miden en plasma de sujetos normales (20 hombres y 20 mujeres) de la misma edad (media 20 años) las velocidades iniciales de la reacción catalizada por la lecitín:colesterol aciltransferasa por un método basado en la determinación del colesterol libre plasmático por cromatografía gas-líquido. Con esta técnica la reacción de esterificación en el plasma es lineal hasta aproximadamente 75 min.

También se muestra la influencia del sexo, concentración de colesterol total, colesterol en la lipoproteína de alta densidad y colesterol libre, sobre la velocidad inicial de esterificación del colesterol plasmático.

Bibliografía

1. FIELDING, C. J. y FIELDING, P. E.: *FEBS Lett.*, 15, 355-358, 1971.
2. GILLET, M. P. T. y SILVA, T. B.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 38, Supp. 150, 118-123, 1978.
3. GJONE, E. y NORUM, K. R.: *Acta Med. Scand.*, 187, 153-158, 1970.
4. GLOMSET, J. A.: *J. Lipid Res.*, 9, 155-167, 1968.

5. GLOMSET, J. A. y NORUM, K. R.: En «Advances in Lipid Research». Vol. 2 (Paoletti, R. y Kritchevsky, D., eds.). Academic Press, Nueva York, 1973, pp. 1-63.
6. HUANG, T. C., CHEN, C. P., WEFLER, V. y RAFTERY, A.: *Anal. Chem.*, **33**, 1405-1406, 1961.
7. KIM, H. J. y KALKHOFF, K.: *Metabolism*, **28**, 663-668, 1979.
8. LACKO, A. G., VARMA, K. G., RUTENBERG, H. L. y SOLOFF, L. A.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **33**, 29-34, 1974.
9. LÓPEZ-VIRELLA, M. F., STONE, D., ELLIS, S. y COLWELL, J. A.: *Clin. Chem.*, **23**, 882-884, 1977.
10. MARCEL, Y. L. y VEZINA, C.: *Biochim. Biophys. Acta*, **306**, 497-504, 1973.
11. MARCEL, Y. L. y VEZINA, C.: *J. Biol. Chem.*, **248**, 8254-8259, 1973.
12. NAGASAKI, T. y AKANUMA, Y.: *Clin. Chim. Acta*, **75**, 371-375, 1977.
13. NORUM, K. R. y GJONE, E.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **20**, 231-243, 1967.
14. PASCUA, M.: «Metodología bioestadística» (2.^a ed.). Editorial Paz Montalvo, Madrid, 1974.
15. ROSE, H. G.: *Biochim. Biophys. Acta*, **152**, 728-741, 1968.
16. STOKKE, K. T. y NORUM, K. R.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **27**, 21-27, 1971.
17. TURNER, K. B., MCCORMACK, G. H. Jr. y RICHARDS, A.: *J. Clin. Invest.*, **32**, 801-806, 1953.
18. WAGNER, A. y POINDEXTER, C. A.: *J. Lab. Clin. Med.*, **40**, 321-323, 1952.