

Determinación de la actividad Lecitín:Coolesterol Aciltransferasa por un método radioisotópico

M. R. Ras,* S. Masdeu, C. Miquel, J. C. Frisón, J. Rubiés-Prat y S. Schwartz

Servicio de Bioquímica
y Departamento de Medicina Interna
Ciudad Sanitaria de la Seguridad Social
Universidad Autónoma
Barcelona

(Recibido el 27 de junio de 1975)

M. R. RAS, S. MASDEU, C. MIQUEL, J. C. FRISON, J. RUBIES-PRAT and S. SCHWARTZ. *Determination of Lecithin:Cholesterol Acyltransferase Activity by a Radioisotopic Assay*. Rev. esp. Fisiol., 32, 95-98. 1976.

A method for determining Lecithin:Cholesterol Acyltransferase (LCAT) activity is presented. Trace amounts of labelled cholesterol are added to inactivated homologous substrate from a pool of normal serum. LCAT activity is determined measuring the cholesterol esterification, and is expressed as micrograms of cholesterol esters formed per milliliter plasma per hour. LCAT time-course, reproducibility, activity after serum storage at 4° C, and normal values from 20 healthy subjects are studied.

En 1935 SPERRY (10) observó que incubando el plasma a 37° C durante varias horas se producía una esterificación del coolesterol. Posteriormente, GLOMSET (2) presenta la evidencia de que la formación de los ésteres del coolesterol es catalizada por una enzima que transfiere un grupo acilo desde la posición beta de la lecitina al coolesterol. Esta enzima se ha denominado Lecitín:Coolesterol Aciltransferasa (LCAT) y parece ser el contribuyente más importante a la formación de los ésteres del coolesterol circulantes en el plasma.

Los substratos sobre los que actúa la LCAT, el coolesterol y la lecitina están ligados a varias lipoproteínas, aunque se muestra específica con respecto a las lipoproteínas de alta densidad (HDL).

El objeto de este trabajo es presentar nuestros resultados obtenidos en la determinación de la actividad LCAT utilizando coolesterol C¹⁴ en el suero de sujetos normales.

Material y métodos

Selección de sujetos normales. Se ha determinado la actividad LCAT en 20 individuos varones normales, de edad comprendida entre 15 y 40 años. Ninguno de ellos tenía antecedentes de hepatopatía, dislipemia ni otras enfermedades metabó-

* Petición de separatas: Dr. M. R. Ras, Servicio de Bioquímica, Ciudad Sanitaria de la Seguridad Social, Avda. Valle Hebrón, s/n, Barcelona - 16 (España).

licas. Las cifras de glicemia, bilirrubina, transaminasas y fosfatasa alcalina eran normales. Todas las muestras han sido obtenidas entre las 8 y las 9 a.m., después de una noche en ayunas.

Determinaciones de lípidos. Se han determinado los siguientes parámetros lipídicos: colesterol total, triglicéridos, lípidos totales, electroforesis de lipoproteínas, cromatografía en capa fina de lípidos neutros, ésteres de colesterol y fosfolípidos. Todos se hallaban dentro de los límites normales.

Determinación de la actividad LCAT en el suero. La actividad LCAT se determina por la cantidad de colesterol esterificado que se produce en el substrato. Este se prepara con una mezcla de sueros normales inactivada a 56° C durante 20 minutos. Se ajusta al colesterol libre a 30 mg/ 100 ml con suero salino, separándose alícuotas de 1 ml y congelándose. Para preparar el colesterol-26-C¹⁴ de actividad 58 mCi/mM N.E.N. unido a la solución de albúmina, se utiliza 0,1 ml de la solución con actividad inicial de 0,1 mCi/ml que se dispersa en unos gramos de aceite en un erlenmeyer de 50 ml. Se evapora por desecación bajo atmósfera de nitrógeno, añadiéndose 10 ml de una solución de albúmina humana (Behring Werke) al 30 % e incubándose en agitación continua durante seis horas. Se utiliza el sobrenadante después de centrifugar, conservándose esta solución en la nevera a 4° C hasta un máximo de 15 días.

Se incuban 0,6 ml del substrato con 0,3 ml de colesterol-C¹⁴-albúmina durante 12 horas, con lo que se consigue un equilibrio del colesterol libre aportado exógenamente y el colesterol de las lipoproteínas séricas, añadiéndose 0,1 ml del suero problema e incubándose toda la mezcla en un agitador metabólico a 37° C durante seis horas. Se utiliza un blanco sin el suero problema y todas las muestras y el blanco se determinan por duplicado.

La extracción de los lípidos se efectúa con cloroformo-metanol (Merck) 2:1 y la separación del colesterol libre del esterificado por cromatografía en capa fina (Desaga), utilizando los siguientes solventes: éter de petróleo 40-70°:éter etílico:ácido acético (90:10:1) en placas de Silicagel G (Merck). Las manchas se visualizan pulverizando con ácido fosfomolibdico al 15 % en etanol, separándose éstas por rascado y colocando el silicagel obtenido en el líquido de centelleo. Posteriormente se leen en un contador de radiaciones beta Tracerlab ICN.

Resultados

El conocimiento del colesterol libre de la mezcla inicial permite deducir el colesterol esterificado. Los resultados se expresan en μg de colesterol esterificado por ml de suero problema y por hora de reacción ($\mu\text{g}/\text{ml}/\text{h}$). En los 20 casos estudiados se han realizado las determinaciones por duplicado, siendo la actividad media de $20,3 \pm 5 \mu\text{g}/\text{ml}/\text{h}$.

Se han realizado pruebas de reproducibilidad en un suero con actividad normal y en otro con actividad baja, habiéndose cambiado en una ocasión el substrato y la solución de colesterol-C¹⁴-albúmina (tabla I).

Al efectuar determinaciones cada hora en el transcurso de la reacción se observa la linealidad de la misma hasta las seis horas; este fenómeno se ha comprobado en dos de las muestras, de actividad diferente y cada punto por duplicado (fig. 1).

Tabla I. Estudio de la reproductibilidad de la determinación de la actividad LCAT en dos sueros con actividad normal (13 determinaciones) y con actividad baja (15 determinaciones), respectivamente.

Suero	Actividad LCAT $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{h}$	Coefficiente de variación %
Actividad normal (13)	$29,2 \pm 1,9$	6,5
Actividad baja (15)	$10,2 \pm 2,0$	19,0

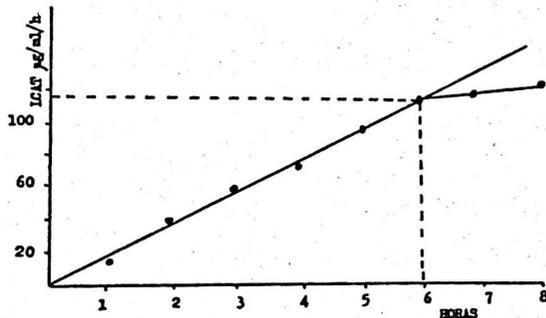


Fig. 1. Estudio de la linealidad de la reacción de la determinación de la actividad LCAT en un suero normal.

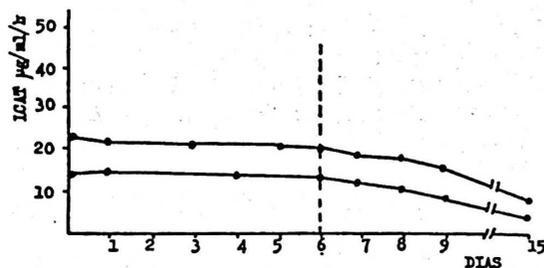


Fig. 2. Conservación de la actividad LCAT de dos sueros conservados a 4° C durante 15 días.

Se observa una progresiva caída de la actividad LCAT a partir del sexto día.

Finalmente, se han efectuado determinaciones sucesivas en dos sueros conservados en nevera durante 15 días a 4° C. Los resultados obtenidos indican buena reproducibilidad hasta los seis días, obteniéndose a los 15 días una pérdida media de actividad de un 15 % (fig. 2).

Discusión

La técnica que se ha estandarizado corresponde a la descrita por GLOMSET y WRIGHT (3), utilizándose como sustrato de la reacción una mezcla de sueros normales inactivada a 56° C, para destruir toda la actividad LCAT. De este modo se determina si los niveles de la enzima son normales, aumentados o disminuidos. Para estudiar de un modo más aproxima-

do lo que ocurre *in vivo* debería utilizarse como sustrato el propio suero, según descripción de STOKKE *et al.* (11, 12). Por este proceder el suero autólogo sirve a la vez de fuente de enzima y de sustrato, determinándose la verdadera actividad LCAT, pero en el caso de aumentos o descensos de esta actividad no es posible conocer si la alteración es debida a una alteración en la producción de la enzima o a una alteración en la composición del sustrato; debiendo tener en cuenta la existencia de activadores e/o inhibidores que pueden modificar el resultado de la reacción.

SIMON *et al.* (4, 7-9) comparando los resultados obtenidos con suero autólogo y suero homólogo como sustrato, observan que para los casos con cifras de actividad LCAT normales y elevadas hay notables diferencias, siendo más altas las cifras cuando se utiliza como sustrato suero autólogo. Para niveles inferiores a 15 µg/ml/h la correlación de ambos métodos es buena. AKKANUNA *et al.* (1) utilizan como sustrato lipoproteínas de alta densidad (HDL) sin que ello parezca suponer una ventaja en cuanto a la validez de los resultados.

Otro aspecto que debe tenerse en cuenta es que la incubación del sustrato a 56° C puede producir cambios en las lipoproteínas, especialmente las HDL que son las que intervienen más directamente en la reacción. Las HDL incubadas a esta temperatura pueden ser un sustrato de peor calidad que las HDL nativas, y por otra parte la incubación a 56° C puede hacer cambiar la apetencia por las LDL y VLDL que sirven de aceptores de colesterol esterificado y de lecitina para las HDL (5, 6).

Aun teniendo en cuenta estas limitaciones, se emplea en general una mezcla de sueros inactivada para la determinación de la actividad LCAT. Actualmente no ha sido posible aún estandarizar internacionalmente de manera completamente satisfactoria esta técnica enzimática, y hasta

que no dispongamos de un método inmunológico, la técnica descrita en el presente artículo parece puede ser de suficiente utilidad para el estudio de la actividad LCAT.

Resumen

Se describe un método para la determinación de la actividad Lecitín-Colesterol Aciltransferasa (LCAT). Se determina la cantidad de colesterol esterificado que se produce en una solución de colesterol C¹⁴ unido a albúmina, sustrato de suero homólogo inactivado y suero problema. Este método es útil para la determinación de la actividad enzimática excluyendo el posible efecto de activadores e/o inhibidores en el suero problema.

Bibliografía

1. AKANUMA, Y., KUZUYA, T., HAYASHI, M., IDE, T. y KUZUYA, N.: *Europ. J. Clin. Invest.*, **3**, 136-141, 1973.
2. GLOMSET, J. A.: *Biochim. Biophys. Acta*, **65**, 128-135, 1962.
3. GLOMSET, J. A. y WRIGHT, J. L.: *Biochim. Biophys. Acta*, **89**, 266-271, 1964.
4. KEPKAY, D. Z., POON, R. y SIMON, J. B.: *J. Lab. clin. Med.*, **81**, 172-181, 1973.
5. NORUM, R. K.: *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, **33**, Suppl. 137, 7-13, 1974.
6. NORUM, R. K. y GJONE, E.: *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, **33**, 191-197, 1974.
7. SIMON, J. B.: *J. Lab. clin. Med.*, **77**, 891-900, 1971.
8. SIMON, J. B.: *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, **33**, Suppl. 137, 107-113, 1974.
9. SIMON, J. B. y SCHEIG, R.: *New Engl. J. Med.*, **283**, 841-846, 1970.
10. SPERRY, W. M.: *J. Biol. Chem.*, **111**, 467-478, 1935.
11. STOKKE, K. T., FJELD, N. B., KLUGGE, T. H. y SKREDE, S.: *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, **33**, 199-206, 1974.
12. STOKKE, K. T. y NORUM, K. R.: *Scand. J. clin. Lab. Invest.*, **27**, 21-27, 1971.