

Las lipoproteínas de baja densidad del suero humano. I. Aislamiento y caracterización cromatográfica, electroforética e inmunoquímica.*

FELIX CORDOBA**

LA ANTIGENICIDAD de las lipoproteínas es notable, ya que producen anticuerpos en los animales de experimentación, en cantidades comparables o mayores que las proteínas simples, lo que de inmediato hace pensar en el efecto adyuvante de los lípidos en éstas moléculas. Por otra parte, las lipoproteínas tienen varias características fisicoquímicas entre las que se encuentra el tamaño molecular variable de 165,000 a cerca de 3,000,000, la presencia de los lípidos asociados íntimamente a la estructura protéica, el comportamiento *sui generis* en solventes acuosos, por ejemplo, de los quilomicrones con contenido de grasas cercano al 95% del peso total, que las apartan de la mayoría de los antígenos protéicos comunmente estudiados¹.

Un estudio experimental que nos permitiera correlacionar su comportamiento inmunológico con algunas de estas propiedades fisicoquímicas sería de utilidad, tanto desde el punto de vista fundamental, como para mejor entender su papel eventual en importantes procesos patológicos vagamente definidos. La clasificación inmunológica, podría en el futuro servir mejor para una caracterización racional de éstos materiales, basada en la actualidad, casi exclusivamente en diferencias de flotaciones en la ultracentrífuga². Es fácil imaginar la existencia de complejos lípido-proteína cuyas proporciones de derivados esteroides, estructuras de fosfolípidos y composición de ácidos grasos sea muy diferente y que, sin embargo, tanto los índices de flotación (Sf) como las cantidades totales de "grasa" los hagan aparecer como muy semejantes.

* Una parte de este trabajo se desarrolló en el Depto. de Microbiología Médica, de la Escuela de Medicina, de la Universidad de California del Sur (University of Southern California) en Los Angeles, Estados Unidos, durante el año de 1959.

** Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, C. U. México 20, D. F. México.

Varios autores^{3,4,5}, han hecho notar que las lipoproteínas pertenecen desde el punto de vista inmunológico a una clase de antígenos diferenciables por ultracentrifugación pero que bajo condiciones adecuadas pueden comportarse como el mismo antígeno. Sin embargo, contribuciones más recientes⁶ obtenidas por precipitaciones en geles de agar, demuestran varios antígenos que reaccionarían con sus correspondientes anticuerpos, aún en las mismas especies puras obtenidas por flotación.

Con el uso del método de los eritrocitos sensibilizados con el ácido tánico se ha podido demostrar dos clases de lipoproteínas beta⁷; una de ellas, capaz de absorber los anticuerpos contra la otra clase en forma parcial, indicando en cierto grado que la segunda clase de lipoproteínas es diferente de la primera.

Recientemente se ha publicado un trabajo describiendo un método de medida de coeficientes de difusión en antígenos y anticuerpos⁸. Algunas de nuestras muestras de lipoproteínas fueron caracterizadas con esta técnica y los resultados serán objeto de una publicación posterior.

MATERIAL Y MÉTODOS

a). *Preparación de lipoproteínas por ultracentrifugación*^{9, 10}.

Se compraron en los bancos de sangre locales mezclas de sueros humanos del material usado para transfusiones. Con estas mezclas se llenaron los tubos de plástico del rotor 40.3 de la ultracentrífuga "Spinco" (preparadora) y se centrifugaron a 30,000 R. P. M. a una temperatura de 18° C. durante 24 hrs. Al finalizar este período, los tubos se sacaron cuidadosamente del rotor y fueron colocados en un soporte *ad hoc* para evitar agitaciones. Las capas de lipoproteínas opalescentes fueron cuidadosamente aisladas en matraces diferentes por medio de pipetas Pasteur. Este primer fraccionamiento dividió el suero en una fracción superior (Top) compuesta fundamentalmente de quilomicrones, una segunda llamada T-2 que no contiene lipoproteínas y que, una vez medida, fue descartada, una tercera fracción T-3 azul opaco, rica en lipoproteínas de baja densidad al igual que la siguiente de color amarillo intenso, y que se denominó T-4. La fracción T-5 todavía contenía lipoproteínas en pequeña cantidad (fracción alfa) y el fondo del tubo presentaba una

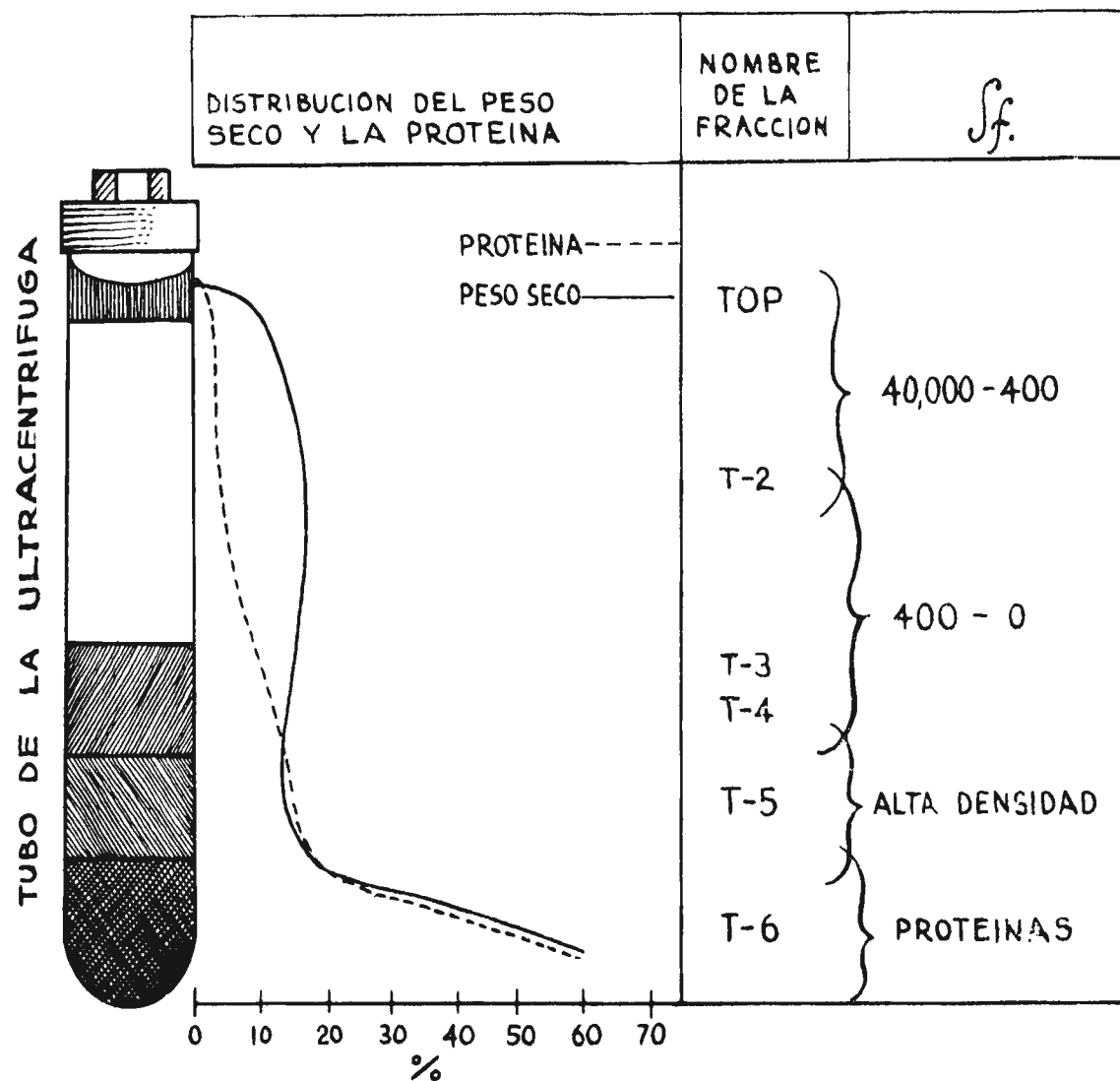


Fig. 1. Separación preparadora por ultracentrifugación de las lipoproteínas del suero humano. Sf., son los índices de flotación de las lipoproteínas; las de baja densidad se localizan en las fracciones T-3 y T-4; los quilomicrones flotan en la fracción Top. (ver texto).

masa semisólida, gelatinosa, formada por la concentración de las proteínas simples; albúminas y globulinas. (Ver Fig. 1).

Las fracciones T-3 y T-4 fueron usadas posteriormente en otra serie de ultracentrifugaciones llenando parcialmente los tubos de plástico con soluciones de NaCl de densidades conocidas¹⁰. Las fracciones T-3-2-1, T-3-1-2 etc. y las T-4-1-2 etc., son por lo tanto originadas de T-3 y T-4.

Debido a la baja cantidad relativa de las lipoproteínas en el suero, la concentración por un paso inicial de ultracentrifugación parece oportuna, sin embargo, teniendo en cuenta la naturaleza de este estudio, no se hizo indispensable la serie de ultracentrifugaciones necesarias cuando este aparato es el instrumento de elección en el estudio de estas moléculas¹⁰.

El material inicial en nuestros estudios comprendió en todos los casos las fracciones crudas T-3 y T-4.

b). Producción de antisueros.

Conejos blancos adultos de la raza "Nueva Zelandia" mantenidos con dieta de Purina fueron empleados para las inmunizaciones. Se sometieron a inyecciones por vía intracutánea en cantidades de 1 ml de mezcla de sueros humanos por cinco veces semanarias, durante cuatro semanas. Una semana después de la última inyección, los conejos se sangraron de un corte en la vena marginal de la oreja colectándose 50 ml de sangre en tubos de plástico. Los animales fueron sangrados una vez más, después de recibir inyecciones por dos semanas adicionales. La sangre se dejó coagular en el refrigerador y el suero obtenido fué clarificado por centrifugación, ensayado para determinar el contenido de anticuerpos (ver adelante) y conservado en el congelador a -30° C. Las muestras de varios sangrados fueron ensayados en su poder de precipitación contra suero humano normal por la prueba del "anillo", en tubos de vidrio de los usados para puntos de fusión. Los sueros fueron mezclados de acuerdo con el resultado de esta prueba.

Para la producción de anticuerpos se usaron también monos adultos, *Rhesus* y Araña, comprados localmente y alojados en una granja de animales con clima acondicionado. Estos animales fueron inyectados inicialmente con sueros humanos preparados con adyuvantes según Freund y col.¹¹ y posteriormente con inyecciones intracutáneas de 1 ml de suero humano fluido, (sin adyuvantes) cada semana. A intervalos de siete días

se efectuaron sangrados directamente del corazón de los animales. Los sueros de estas sangrías fueron analizados y conservados como los de conejo.

Suero de caballo anti-suero humano. Se usó una muestra de suero de caballo antiglobulinas humanas que se conservaba en el refrigerador en este laboratorio. Este suero fue centrifugado añadiéndole para su uso "Mertiolato" en concentración final de 1:10,000.

c). Difusión en gel en cajas de Petri¹².

Para la preparación de las cajas de Petri se empleó Agar de la marca "Oxoid" especial para inmunodifusión, por su claridad en concentración del 1% preparado en salina (0.9% NaCl) con Mertiolato como preservador. El agua calentada en el autoclave se decantó en cajas de 10X100 m. m. Las cajas tenían sobrepuestas una tapa de plástico acrílico que fijaba cinco moldes circulares de 0.9 cm. de diámetro; uno central y cuatro laterales dispuestos a una distancia fija de 2.5 cm. del central (centro a centro). El propósito de este molde es el de producir, una vez enfriado el agar, cinco huecos cilíndricos que son usados como recipientes de los antígenos y anticuerpos. Durante el proceso de difusión las cajas fueron almacenadas en un incubador microbiológico con un recipiente de agua en el fondo para evitar su desecación prematura. Se hicieron exámenes y mediciones diariamente⁸.

d). Cromatografía de las lipoproteínas en Dietilaminoetilcelulosa (DEAE)¹³

Para la cromatografía se usaron columnas de vidrio de 50X25 cm. provistas de tapones de vidrio esmerilado. Se empacaron con cinco gramos del intercambiador iónico por cada 300 mgrs. de proteína. La celulosa fue equilibrada previamente con el amortiguador de fosfatos a una concentración de 0.005 M y a pH de 7.0. El material de la columna se eluyó en pasos sucesivos por aumento de la concentración de los fosfatos (ver adelante).

Previamente a la cromatografía, las lipoproteínas aisladas en las fracciones de la ultracentrifugación T-3 y T-4 fueron dializadas en frío durante

24 hr. contra el "buffer" de fosfatos usado para montar la columna. Se observó la formación de una pequeña cantidad de precipitado de globulinas gama correspondientes al 15% de la proteína total de la muestra medida por el Biuret. Este precipitado fue descartado por centrifugación antes de usar el sobrenadante para las columnas.

Las condiciones de un experimento de cromatografía típico fueron 11 ml de la mezcla de T-3 y T-4 equivalente a 280 mgrs. fueron equilibrados en el primer solvente, centrifugados y pipeteados cuidadosamente encima de la celulosa empacada en la columna que había sido lavada hasta que el efluente dió reacción negativa al Biuret. El flujo fue regulado a 1 ml/min. separándose fracciones de 5 ml con un colector "Packard". Los pasos de elución fueron los siguientes:

1.	Fosfato de sodio	0.005 M	pH 7.0
2.	„	0.025 M	„
3.	„	0.050 M	„
4.	Fosfato de sodio y Cloruro de sodio	0.05 M 0.02 M	Ph 6.0 —
5.	Hidróxido de sodio para lavado	0.1 N	

La concentración de proteína en las soluciones eluidas se determinó con el reactivo de Biuret¹⁴ usando 1 ml. de cada tubo, aforando a 4 ml. con el reactivo y solución salina, incubando a 37° C. durante 15 min., enfriando y leyendo la D. O. a 525 milimicras en un colorímetro Beckman B. Como estándar se usó una solución de albúmina humana purificada.

El contenido de los tubos de cada región de alta concentración de proteína fue mezclado, lográndose de esta manera cinco regiones o picos de concentración cromatográfica de cada fraccionamiento, que fueron enumerados P—, P—2, . . . hasta P—5 (ver diagrama de elución) y concentrados en el refrigerador por diálisis contra una solución de Polivinilpirrolidona al 30%¹⁵. Después de la concentración fueron analizados por difusión en geles de agar, inmunoelectroforesis y electroforesis en almidón. La recuperación de las proteínas de la columna fue del 75%, variando poco en cada experimento. No se intentó usar cuarto refrigerado y tampoco se empleó para la columna cabezal de presión.

e). *Electroforesis en gel de almidón.*

Los métodos usados en este procedimiento son, con pequeñas modificaciones, los descritos por Smithies y col.¹⁶. Se usaron recipientes cúbicos de material acrílico con una capacidad de 4 lts. de buffer. Los geles fueron preparados pesando 12.5 a 13 grms. de almidón de papa parcialmente hidrolizado, obtenido de Connaught Laboratories, Toronto, Canadá, por cada 100 ml. del buffer preparado con 18 gr. de H_3BO_3 y 5 gr. de NaOH a pH6. Esta suspensión se calentó en la llama directa del mechero teniendo cuidado de agitar constantemente, de otra manera se forman grumos insolubles, o se quema el almidón. Se continúa el calentamiento hasta que se forme una pasta viscosa muy difícil de agitar pero que poco a poco pierde solidez tornándose más flúida. En este momento se fija un tapón de hule en la boca del matraz y se hace el vacío con una bomba o con la tromba de agua de manera de provocar la ebullición de la solución que se continúa unos segundos (el propósito de esta maniobra es el de suprimir las burbujas que estropearían la calidad final del gel). La solución viscosa y desgasificada, se pone en charolas de plástico acrílico que tienen tiras del papel filtro impregnadas con el buffer para que funcionen como electrodos. El gel, una vez enfriado ligeramente, se tapa con una capa de plástico delgado (Saran Wrap) para evitar su desecación y se deja reposar durante la noche. Al día siguiente se efectúan pequeñas incisiones con la navaja de afeitar cuidando de que el corte sea perpendicular a la longitud del gel y del tamaño apropiado. (Esta dimensión, en nuestros experimentos, fue de 2 cm. la altura del gel 1 cm. recientemente hemos empleado geles de las siguientes dimensiones: 18 X 3 X 0.5 cm.).

Existen varias técnicas de aplicación de la muestra en el gel siendo las siguientes condiciones importantes: evitar exceso de muestra, obtener un corte perfectamente recto y limpio y evitar fugas de la muestra por los extremos. En nuestros experimentos usamos principalmente el método de inserción de papel filtro Whatman No. 3 impregnado en las soluciones y depositado en el interior del corte. En otras variantes se puede sacar el papel después de un cierto tiempo de dejar pasar la corriente ya que los componentes de la muestra ya han penetrado al interior del gel. De esta manera se evitan distorsiones y sobre todo el "coleo" del material parcialmente desnaturalizado por el contacto con el papel filtro. Todavía otra modificación consiste en efectuar una pequeña inserción de cierto

espesor (0.05 cm.) la cual se llena con la muestra suspendida como pasta en gránulos de almidón.

Una vez aplicada la muestra, se cubre la superficie del gel ya sea con vaselina sólida calentada hasta fusión o con el mismo plástico delgado mencionado anteriormente. Las charolas con los geles son fijadas encima de los recipientes del buffer y se pasa la corriente. En la mayoría de los experimentos descritos aquí, se usó el 'Buffer' de Poulik¹⁷ con Tris y citrato. La corriente se obtuvo de una fuente de poder, de voltaje regulable (Heathkit P-2) suministrando alrededor de 25 v. y 7 ma./cm., por un período aproximado de 30 hrs. con el aparato en el refrigerador. Al finalizar la migración se separan los electrodos de papel y se hacen rebanadas a lo largo del gel usando un cuchillo de hoja delgada muy afilada (en geles de menor tamaño se puede usar con ventaja una hoja de afeitar cortada a la mitad). La rebanada, con la cara inferior vuelta hacia arriba, se deposita en una charola de vidrio donde es teñida con los colorantes específicos. Para proteínas el colorante Amido Negro (Naphtalene Black., Harleco) en solución saturada de Metanol, agua y Ac. acético, 50:50:10.,v/v durante 10 min. seguidos de lavados con el mismo solvente hasta aclarar el almidón del fondo. Este proceso toma generalmente 24 hr. Para la tinción de lípidos se deshidrataron parcialmente las rebanadas paralelas con el solvente mencionado durante 24 hr., y luego fueron sumergidas en una solución saturada de Negro Sudán en etanol al 96% por un tiempo de 8 hr. seguido de lavados en el mismo solvente.

Una vez teñidos los geles fueron fotografiados, haciendo a su vez diagramas de las bandas coloreadas.

f). *Inmunoelectroforesis.*

Los métodos usados fueron esencialmente los descritos por Grabar et al¹⁸ utilizando Agar marca "Oxoid" a una concentración del 1% en "buffer" de barbital de la siguiente composición: Acido barbitúrico U. S. P. 22 gr., hidróxido de sodio Q. P. 4 gr. para cada litro con agua destilada, resultando un pH de 8.6 y fuerza iónica de 0.1. Se usaron placas de vidrio de 10X20 cm., con electrodos de papel filtro en los extremos, preparadas con agar y en buffer de media concentración. Todo el aparato fue colocado en el interior del refrigerador. Se pasó una corriente de 20 v. y 4 ma. por Cm. durante 36 horas. Al cabo de este tiempo, la albúmina (en el caso de sueros) ha migrado a una distancia de 10 cm. del origen. La aplicación de la muestra se logró con agar fundido al 5%,

en mezcla con el material para electroforesis para obtener la misma concentración final de agar que en el medio de soporte. La muestra, así premezclada, es pipeteada en agujeros hechos en el agar (generalmente el agujero circular es de 0.8 cm. de diámetro, aunque en algunos casos se usaron canaladuras de 1.5 X 0.3 cm.) que tiene un espesor de 0.4 cm. Es importante equilibrar el material que se va a correr para evitar distorsiones debidas a sales. Esto se hace por diálisis de la muestra en frío contra el buffer usado.

La superficie del agar se cubrió con el plástico delgado para evitar la desecación. Al fin de la migración eléctrica se sacan las placas de vidrio del refrigerador, efectuándose en el agar dos cortes paralelos a la dirección mayor, cerca del borde, de 0.4 cm. de ancho y 14 cm. de largo, a una distancia de 0.8 cm. del borde externo del depósito central. Este canal se llena con la solución de anticuerpos premezclados con agar al 5%. Se cubrió el agar nuevamente con "Saran Wrap" y se depositó en un recipiente cerrado y nivelado para esperar la difusión y aparición de los precipitados. El tiempo de difusión, en el caso de lipoproteínas de peso molecular elevado, fué de 2 a 3 semanas. Se recomienda el examen periódico de las placas observándolas con una luz azul dirigida por detrás. Al finalizar la difusión, se despega el plástico y se lavan las placas en solución salina durante 3-4 días cambiando la solución al menos dos veces diarias. El secado de las placas se efectuó, a la temperatura ambiente, cubriendo el agar firmemente con papel filtro que promueve un secado uniforme y absorbe el resto de sales y proteínas (es conveniente hacer un pequeño agujero con un alfiler en el sitio donde estaban las muestras para evitar burbujas que se atrapan en el secado). El teñido fue hecho de acuerdo con los métodos de Uriel y Sheidegger¹⁹: Azocarmín 2 gr., ácido acético 150 ml., glicerol 150 ml. y agua destilada a un litro (filtrar antes de usar). Las placas se sumergen en este colorante durante 24 hr. y se lavan después hasta que el Agar de fondo esté transparente con 15% de glicerol y 15% de ac. acético en agua. Posteriormente son secadas bajo un secador eléctrico y se separan del vidrio para su conservación montadas en una cartulina blanca. El colorante mencionado tiñe específicamente las proteínas. Para los lípidos se usó el Sudán negro en solución saturada alcohólica al 50% durante 8 hr. Las combinaciones de tinción para lípidos y proteínas fueron a) Sudán negro y Azocarmín y b) Sudán IV (lípidos) y Negro de amido 10-B (proteínas).

RESULTADOS Y COMENTARIOS

Se cromatografiaron en celulosa DEAE las fracciones T-3 y T-4 obtenidas por ultracentrifugación con los resultados de tres experimentos que se presentan en la Fig. 2.

Se puede observar una separación de las proteínas de la mezcla desdoblándose en cinco regiones de concentración. La zona correspondiente a P-1 (primer pico) baja rápidamente de la columna al iniciar el experimento, apareciendo el material eluído como solución turbia que se aclara totalmente al agregar dos gotas de NaCl al 10% por resolubilización de las lipoproteínas (ver adelante). Cuando los tubos con este material han sido tratados de esta manera, se pueden conservar las lipoproteínas más de una semana en el refrigerador sin dar precipitados. Se colectaron 200 ml. del primer solvente y al pasar al segundo se aprecia la aparición de otra fracción, bien separada de la primera, que se denominó P-2. La fracción P-3 aparece cuando la concentración de fosfatos es 10 veces mayor que la inicial arrastrando la mayoría de las proteínas en la mezcla (47.5% y 57.5% en dos experimentos y en el tercero, únicamente 10.7% de proteína, aparentemente debido a migración irregular, ya que en este caso la siguiente fracción P-4, apareció más concentrada). Tanto la fracción P-4 como la P-5 se eluyen al usar un solvente con pH de 6.0 con 0.05 M de NaCl.

La fracción P-2, al aparecer de la columna también se encuentra en solución apalescente siendo asimismo redisuelta por la adición de sal. El contenido de los tubos, comprendido en cada zona de elución, fué mezclado y concentrado por diálisis en frío contra una solución de Polivinilpirrolidona (P. V. P.) al 30%¹⁵. Este paso no altera la solubilidad de P-1, pero sí la de P-2, que se recupera parcialmente precipitada y se dividió entonces en P-2 soluble y P-2 precipitada (pp). Esta segunda fracción no pudo ya redisolverse totalmente con NaCl o modificando el pH a 8.0 con NaOH.

Las fracciones P-3, P-4 y P-5 también precipitaron parcialmente después de la concentración pero, como su contenido en lipoproteínas es prácticamente nulo, con excepción de la P-3, no se trabajaron detalladamente.

Se hicieron algunas determinaciones de la relación peso seco/proteína en varios de los materiales aislados tanto por centrifugación como después de la cromatografía. La T-3 y T-4 se analizó en varios experimentos dando valores de 1.4, 1.34 y 2.2 indicando el contenido aproximado de

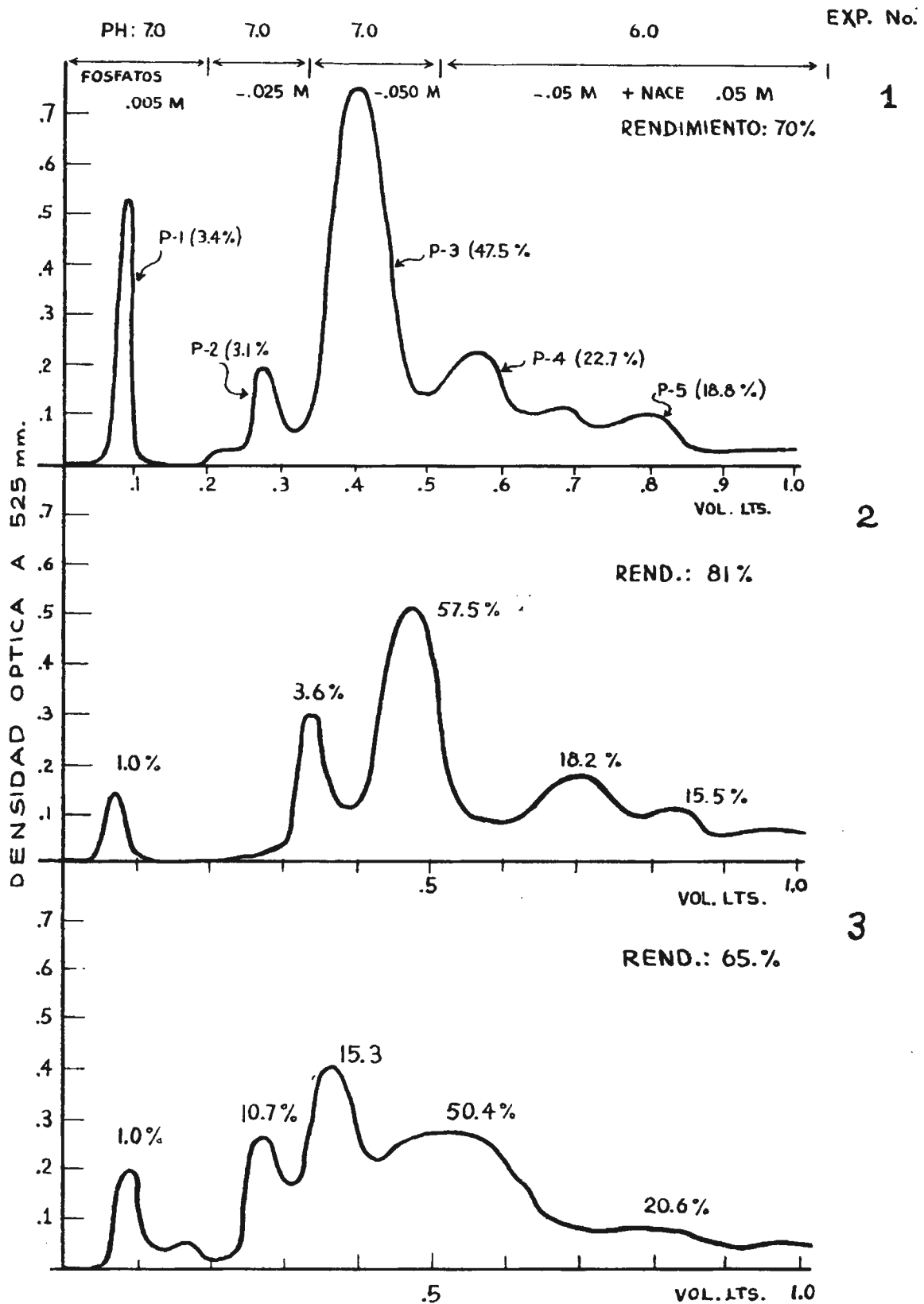


Fig. 2. Resultados de tres experimentos de separación cromatográfica en columnas de celulosa DEAE de las lipoproteínas obtenidas por ultracentrifugación de las fracciones T-3 y T-4. Las lipoproteínas se localizan en las zonas P-1 y P-3 de cada diagrama de elución. (Ver el texto para detalles del procedimiento).

lípidos en relación con la proteína (ver Fig. 1). Se practicó este mismo tipo de análisis en la fracción P-2 de la columna, obteniéndose valores de 8.1 y de 11.9 que señalan el enriquecimiento relativo de lípidos en esta muestra. Debido a la inestabilidad física de éstas moléculas es conveniente hacer notar que los valores aquí dados, sólo son una indicación gruesa de la composición de estos materiales.

Resultados de las pruebas cualitativas de difusión del material cromatografiado.

La prueba inmunológica en placas de Ouchterlony¹² usando anticuerpos de caballo —contra sueros humanos normales— produjeron, con la fracción P-1 una sola línea de precipitación, positiva a las tinciones de lípidos y proteínas. En esta fracción no se pudo detectar ningún otro antígeno. La fracción P-2, por el contrario, al ser ensayada en las mismas condiciones que la P-1 dió una línea de precipitación similar a la de la fracción anterior con afinidades iguales a los colorantes y que demostró una reacción de identidad inmunoquímica con ella. En ésta misma preparación se detectó igualmente albúmina y otro componente no identificado. La fracción P-2 se repurificó en cromatografía en columna, en las condiciones detalladas con anterioridad, obteniéndose así dos componentes; uno que correspondía a la lipoproteína y el otro al compuesto desconocido mencionado arriba; este último, fácilmente visible con anti suero de caballo, pero difícilmente visible con antisueros de conejo. Con esta misma proteína se obtuvo una línea de precipitación con identidad parcial al precipitado formado con globulina gamma humana. La repurificación permitió separar la albúmina contaminante de estas fracciones. Es de hacer notar que las globulinas gama presentes originalmente en los sueros humanos usados, y en las fracciones T-3 y T-4, desaparecen de estas soluciones (al menos desde el sensible punto de vista inmunoquímico) por la diálisis contra el buffer inicial de fosfatos de baja concentración, ya que el precipitado formado en este paso por estos componentes es desechado por centrifugación previa a la cromatografía. Los análisis electroforéticos de T-3 y T-4 no presentan regiones detectables correspondientes a la movilidad de las globulinas gama humanas. (Ver adelante).

La fracción P-3 al ser analizada por difusión en geles de agar presentó la composición de lipoproteínas contaminadas con otros antígenos.

siendo además una preparación muy inestable. Los antígenos presentes en las fracciones P-4 y P-5 no dieron ya reacción de lípidos.

Resultados de los análisis inmunoelectroforéticos

El análisis inmunoelectroforético de las fracciones del suero humano obtenidas por ultracentrifugación permitió identificar los componentes que se detallan en la Tabla 1.

El análisis inmunoelectroforético de las fracciones T-3 y T-4, pasadas previamente por la columna cromatográfica, dió los resultados que se presentan en la Tabla 2.

Como es posible observar en la Tabla 1, las fracciones de lipoproteínas obtenidas por ultracentrifugación se encuentran generalmente contaminadas con albúmina y otros antígenos. Así por ejemplo, la subfracción T-5 que todavía da reacciones de lipoproteínas, presenta además casi todos los componentes del suero humano; las fracciones T-4 y sus subcomponentes, muy ricas en lipoproteínas, tienen también albúmina y dos antígenos extra y lo mismo se puede decir de las fracciones de ultracentrifugación denominadas T-3. Por el contrario, y como se puede ver en la Tabla 2 cuando las mezclas de fracciones T-3 y T-4 son pasadas a través de la columna cromatográfica se obtiene de una manera rápida una primera fracción de lipoproteínas puras. Consistentemente, en varios experimentos se aisló esta primera fracción denominada P-1. La recuperación de ésta proteína fue de 3.4 1.1 y de 0.9% del total cromatografiado. (Fig. 2) y en nuestros experimentos se han obtenido valores del 13% de proteína para las fracciones T-3 y T-4. Correspondiendo para la lipoproteína pura (P-1) un valor de 0.56% o sea cercano al 0.2% o 35 mgs/100 ml. si se toma el contenido en suero total. Este valor de concentración es bajo, al compararlo con los obtenidos en otros laboratorios¹ y es probable que esto se deba a una degradación de las lipoproteínas en la columna. No existiendo datos de fracciones comparables en la literatura, la comparación estricta es difícil.

La zona cromatográfica P-2 contiene una segunda lipoproteína que se desnaturaliza irreversiblemente (por lo menos una parte) cuando es concentrada contra P. V. P.²⁰ Como se observa en la Tabla 2 el análisis inmunoelectroforético de esta fracción, demuestra una lipoproteína alfa 2 contaminada con trazas de albúmina, otro componente con movilidad de globulina beta y uno más todavía, parecido a las globulinas gama. Cuando P-1 y P-2 son analizados en placas simples de agar con sueros

COMPONENTES INMUNOELECTROFORÉTICOS

FRACCIÓN DE
ULTRACENTRÍFUGA

	pre-alb.	alb.	glob.	Al glob. A2	Beta 1*	Beta 2*	Gama
Top	+	+	—	—	+	+	—
T-3	—	+	+	+	++	+	—
T-4	—	+	—	+	+	+	—
T-3-1	—	+	+	+	++	+	—
T-4-1-1	—	+	—	+	+	+	—
T-4-4-3	—	+	—	+	+	+	—
T-5-3-3	+	+	+	+	+	+	?
Suero total	+	+	+(*)	++	+++	+	+(+)?

Tabla 1 Análisis Inmunolectroforético, usando antisueros de caballo y de conejo de los componentes del suero humano obtenidos en fracciones de ultracentrifugaciones. Cada + indica la presencia de un componente con esa movilidad eléctrica. (*) indica componentes positivos a colorantes de lípidos. El signo —, se refiere a la ausencia de ese componente en la fracción.

COMPONENTES INMUNOELECTROFORÉTICOS

FRACCIÓN DE LA CO-
LUMNA CROMATOGRÁ-
FICA.

	Pre-alb.	alb.	glob. A 1	A 2	Beta 1*	Beta 2*	gama
P-1	—	—	—	—	+	—	—
P-2	—	+	—	—	+	+	—
P-2 (recromat.)	—	—	—	—	+	+	—
P-2 (pp)	—	+	—	—	+	+	+(?)
P-1 con P-2	—	+	—	—	+	+	+
Suero total	+	+	+(*)	++	+++	+	+

Tabla 2 Análisis Inmunolectroforético, usando antisueros de caballo y de conejo de los antígenos de suero humano obtenidos cromatográficamente (ver texto). Cada signo +, corresponde a la presencia de un componente con esa movilidad. El signo (*), indica componentes teñibles con colorantes de lípidos. La marca —, corresponde a la ausencia de ese antígeno en particular.

antisueros humanos, se obtienen reacciones de identidad en las bandas de las lipoproteínas de ambas fracciones y también con los componentes con lípidos en el suero humano normal y en las fracciones T-3 y T-4. Cuando se mezcla la fracción P-2 con suero humano normal, suero de conejo normal o globulinas gama humanas comerciales y se desarrolla esta mezcla contra sueros anti-humanos se obtienen bandas de precipitación iguales que si P-2 se hubiese analizado aislado, como antígeno nativo. La identidad antigénica de las lipoproteínas en P-1 y P-2 es completa, ya que el análisis inmunolectroforético de la combinación de P-1 y P-2, da el mismo resultado que analizar cada fracción aisladamente.

La separación de lipoproteínas, en grupos más o menos bien diferenciados, se basa también en trabajos de análisis de los aminoácidos terminales^{21, 22, 23}. Nosotros no hemos hecho este tipo de investigaciones por lo que no podemos determinar con certeza si éstas bandas de precipitación, que señalan una separación de los antígenos, se deben realmente a diferentes lipoproteínas o únicamente son distintas formas de degradación de las mismas moléculas.

Resultados de la electroforesis en gel de almidón.

Primeramente se analizaron muestras de suero humano normal para comparar con los resultados de análisis similares publicados por Smithies¹⁶. Usamos la modificación consistente en placas horizontales donde se hacía una inserción transversal para contener la muestra adsorbida en papel filtro. En la actualidad, el mismo Smithies ha mejorado grandemente el método con un dispositivo que mantiene los geles en posición vertical, suprimiendo el uso del papel filtro para la aplicación de la muestra¹⁶. De cualquier manera, aún con el método original, se obtuvieron resultados convenientes. El análisis repetido de muestras de suero humano normal demostró trece componentes que se clasificaron de acuerdo con la nomenclatura del mismo autor. Los resultados del análisis de 24 muestras de diferentes sueros están acumulados en el esquema superior de la Fig. 4. Las bandas de lipoproteína beta tienen poca movilidad y quedan cerca del origen. Esta posición electroforética y la capacidad de fijar el colorante de lípidos califica perfectamente este material. Los componentes del suero humano identificados como: globulinas gama, lipoproteínas alfa y beta, globulinas alfa 2, dos componentes F, dos post-albúminas, albúmina y dos pre-albúminas concuerdan con las detalladas por el autor mencionado. (Ver Fig. 4). A continuación se analizaron las fracciones de

ultracentrifugación denominadas T-3 y T-4 con los resultados que se encuentran también en la Tabla 3 y Fig. 4. Se analizó primeramente la fracción de quilomicrones denominada Top, que penetró poco en el gel, en una forma irregular produciendo bandas difusas, quedando después del desarrollo, lípidos en el sitio de aplicación. Las fracciones T-3 produjeron bandas, positivas a las tinciones de lípidos y proteínas, migrando en el sitio de las lipoproteínas beta. En éstas mismas fracciones se encontraron bandas correspondientes a albúminas, pre-albúminas. El lado negativo del gel no presentó banda alguna. Se trató de obtener mejor resolución de las lipoproteínas dejando mayor tiempo de desarrollo al electroferograma, pero la banda de beta lipoproteínas permaneció homogénea.

La composición cualitativa de la fracción T-4 fue similar a T-3 con excepción de la aparición de otra banda en la región del componente F. El análisis de mezclas de T-3 más T-4, dió un resultado semejante; la banda de lipoproteínas beta apareció en ambos casos en el mismo sitio. Sin embargo, un desarrollo prolongado de T-4 determinó la aparición de una doble banda de lipoproteínas beta, hallazgo que no pudo ya confirmarse con más detalle. El análisis de la fracción T-5 mostró los componentes del suero humano normal y todavía se observó una mayor concentración de la lipoproteína beta. Las purificaciones por ultracentrifugación de T-3 para obtener pequeñas cantidades de subfracciones T-3-2-, T-3-3-1, etc. determinan un aislamiento gradual de las lipoproteínas beta hasta aparecer pura, por electroforesis, en algunas ocasiones. El mismo subfraccionamiento de T-4 no permite por el contrario purificar totalmente la albúmina contaminante. Se pudo observar, en relación con las proteínas contaminantes, que existen pequeñas variaciones en cada separación por ultracentrifugación, ya que algunos lotes obtenidos de T-3 parecían puros, mientras que otros, separados exactamente igual, no lo eran.

En la Fig. 4 se detallan los resultados obtenidos por electroforesis de las fracciones obtenidas en las columnas de cromatografía. El desarrollo de la fracción P-1 confirmó los resultados ya descritos de inmuno-electroforesis comprobándose que se encontraba libre de contaminantes. Esta única banda se tiñe intensamente, tanto con los colorantes de lípidos, como con los de proteínas. La fracción llamada P-2 produjo un esquema electroforético similar, pero los contaminantes identificados por inmuno-electroforesis fueron difícilmente localizables. La lipoproteína beta se encuentra aún presente en la fracción denominada P-2 con las

ELECTROFORESIS DE LIPOPROTEINAS EN GEL DE ALMIDÓN

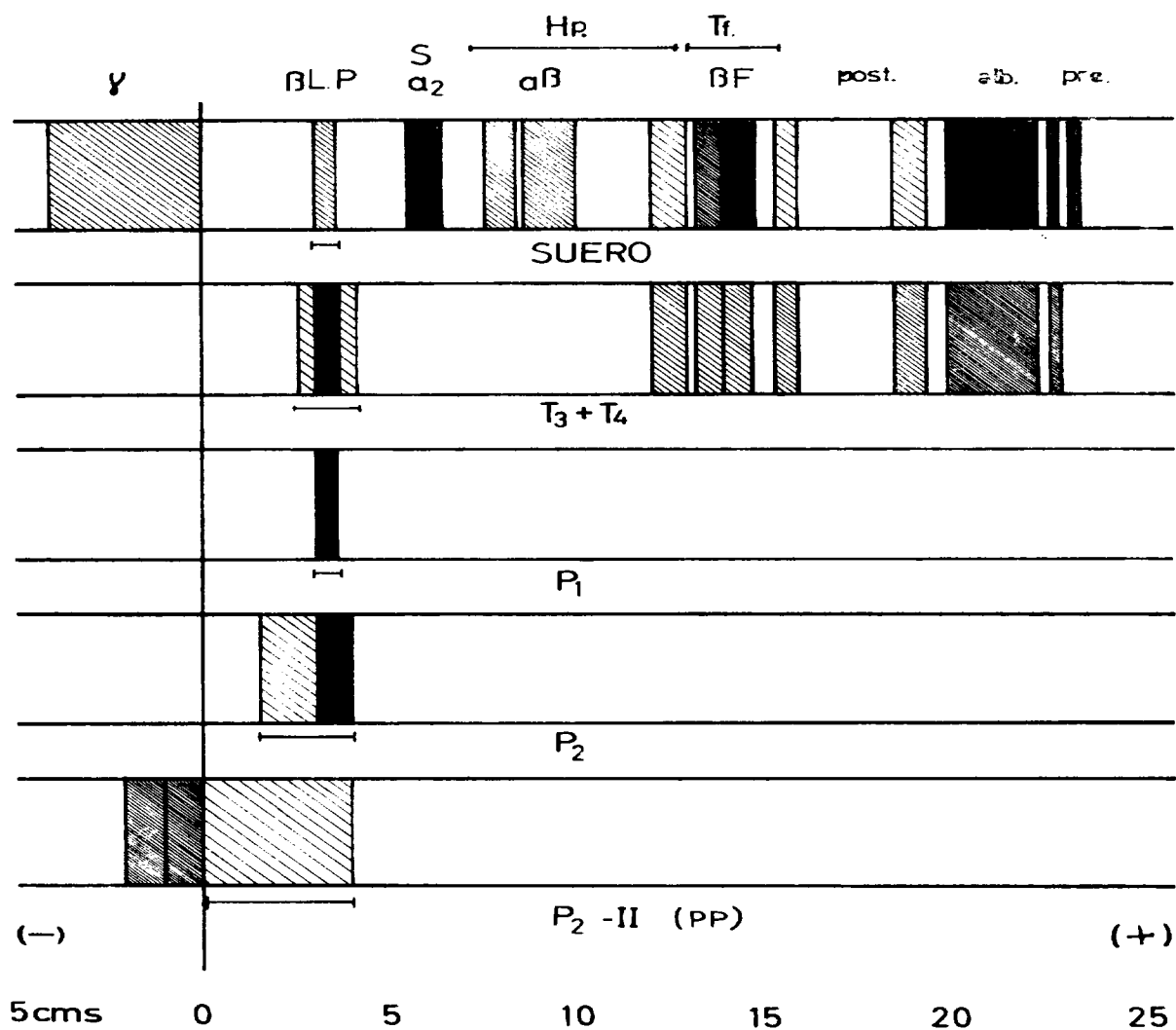


Fig. 4. Electroforesis de las lipoproteínas en gel de almidón. Cada banda corresponde a un componente electroforético, teñido con colorantes de proteínas y clasificado de acuerdo con Smithies¹⁶. Hp: Haptoglobinas, Tf: Transferrinas. Los componentes marcados con una línea horizontal — al pie de cada columna, son las lipoproteínas. T-3 + T-4 y P-1, P-2... etc., igual que en la Fig. 3. Buffer discontinuo de Poulik¹⁷.

mismas características que las anteriores. Se confirmó, por esta técnica, la aparición de una banda, ancha y dispersa en la posición electroforética de las gama globulinas que teñía con el colorante de proteínas, pero no con el de lípidos.

DISCUSIÓN Y SUMARIO

Se presentan los resultados de una serie de experimentos sobre las características y comportamiento cromatográfico, electroforético e inmunoquímico de las lipoproteínas beta del suero humano.

Se inició el estudio a partir de fracciones de sueros humanos concentradas por ultracentrifugación preparadora con el fin de separar la mayor parte de las proteínas simples. Estas fracciones denominadas Top, (quilomicrones) T-3 y T-4 (lipoproteínas beta) fueron cromatografiadas en columnas de celulosa DEAE obteniéndose, en el caso de las lipoproteínas beta, un fraccionamiento en varias zonas de concentración enriquecidas con lípidos. Se dan amplios detalles de la metodología usada y de la reproducibilidad de los fraccionamientos, así como de las técnicas inmunoquímicas propiamente dichas.

El componente cromatográfico llamado P-1, al ser analizado por difusión en placas de agar contra anticuerpos específicos de conejo, mono y caballo se comporta como un sólo antígeno y tiene afinidad tanto para colorantes de proteínas como de lípidos. El comportamiento electroforético e inmunolectroforético también corresponde al de una beta lipoproteína pura.

La cromatografía rindió un segundo complejo lípido-proteína denominado P-2 que presenta características analíticas similares al componente aislado en P-1, y es antigénicamente indistinguible de éste. Esta fracción necesitó cromatografía para liberarla de la albúmina contaminante, y aún así, presentó todavía una impureza protéica. La fracción cromatográfica P-2 (pp), recuperada parcialmente en forma de precipitado, aún contenía un componente lipoprotéico de movilidad beta, aunque la cantidad del mismo, ya agregado irreversiblemente fue grande. Las características inmunológicas también en este caso son similares a las de las dos primeras fracciones aisladas, aunque esta zona presenta además tres contaminantes. La aparición en esta fracción, comprobada por los tres métodos analíticos usados, de una proteína con las definiciones de las globulinas gama humanas y negativa a la tinción de lípidos, no está aún muy clara. (La interpretación tentativa de este hecho se dá adelante).

Es sabido que las lipoproteínas beta son materiales comparativamente muy inestables a los procedimientos de aislamiento y purificación comunes para proteínas². Quizá la ultracentrifugación ejerciendo al mínimo las manipulaciones y tratamientos, sea el método de elección. Sin embargo, la cromatografía en las condiciones descritas, (que indudablemente pueden mejorarse) es capaz de separar una cantidad razonable de lipoproteína beta muy estable y que por su gran pureza se presta bien a análisis finos.

Desde el punto de vista inmunoquímico, las lipoproteínas aisladas tanto en P-1, P-2 como en P-2 (pp) son el mismo antígeno y la comprobación de la misma movilidad electroforética solamente es una confirmación adicional.

El hecho de que las "mismas" lipoproteínas beta aparezcan en diferentes zonas de concentración cromatográfica se puede explicar con varios razonamientos. Siempre el más atractivo y prudente es el de que existe un efecto desnaturalizante del intercambiador iónico en las moléculas, de tal manera, que se producen compuestos con composición variable de lípidos y con diferentes afinidades por las soluciones de fosfatos usadas. El hecho de que la antigenicidad esté preservada indica que estos efectos no son muy radicales sin implicar rompimientos de las cadenas de polipéptidos. Quizá el empleo de métodos inmunoquímicos cuantitativos clarifique certeramente las posibles diferencias entre P-1, P-2 y P-2 (pp). La aparición de mayor cantidad de material lípido insoluble en P-2 (pp) es una razón adicional para pensar en una degradación progresiva, hasta cierto punto controlable y aún ventajosa desde el punto de vista estructural²⁴. Es posible que P-1 contenga únicamente los lípidos propiamente pertenecientes a la estructura real de la lipoproteína, digamos, con enlaces iónicos estables y que P-2, por ejemplo, tenga una mayor cantidad de lípidos no "esenciales" que se "despegan" selectivamente en la cromatografía iónica. Desde luego que el análisis químico de P-1 y de P-2 será muy valioso asimismo como estudios espectrofotométricos²⁶, para aclarar este punto. La medida del tamaño de la partícula por ejemplo, con determinaciones de coeficientes de difusión, es otro método que pueda ayudar en este problema de la heterogeneidad y nosotros hemos efectuado algunas de estas determinaciones que será objeto de una publicación futura.

En adición de las razones alegadas arriba para afirmar la creencia de la degradación selectiva de las lipoproteínas beta, tenemos el hecho adicional de la aparición en P-2 y en P-2 (pp) de una "nueva" proteína no presente en la mezcla usada para montar la columna. Creemos que se

puede deshechar completamente la posibilidad de contaminación con las globulinas gama nativas del suero usado ya que nuestros métodos son muy sensibles y no detectan traza alguna de estas proteínas en las mezclas iniciales de cromatografía. Es más, suponiendo que en nuestras muestras existieran globulinas gama, deberían aparecer en la cromatografía acompañando a la fracción P-1¹³ ya que esta es la posición descrita para ellas con estos solventes. Efectivamente, análisis cromatográficos con sueros enteros nos han permitido detectar anticuerpos siempre en esa posición. Esto no ha sido así, este nuevo componente aparece consistentemente con P-2 (pp), bastante alejado de P-1 y precisamente en el sitio donde la degradación de las lipoproteínas es más ostensible. La posibilidad de que esta "nueva" globulina gama forme parte de la estructura y sea producto de la degradación de estas moléculas es de tomarse seriamente en cuenta. Existe información que sugiere que son precisamente proteínas de esta clase las que estructuran estos complejos. La comprobación de esta idea sin embargo, debe estar respaldada por futuro trabajo experimental.

REFERENCIAS

1. J. L. Oncley.: *In The Lipoproteins: Methods and Clinical Significance*, Ed. by F. Homburger and P. Bernfeld, Karger (1958).
2. Frank, R. N. Gurd.: *In Lipide Chemistry* by D. J. Hanahan., Ed. by John Wiley & Sons, Inc. N. Y. (1960).
3. Eder, H. A.: *Am. J. Med.*, 23, 263 (1957).
4. Levine, L. D., Kauffman and R. K. Brown.: *J. Exp. Med.*, 102, 105 (1955).
5. Korngold, L. and Lipari, R.: *Science*, 121, 170 (1955).
6. Aladjem, F. and D. H. Campbell.: *Nature*, 179 (1957).
7. Scanu, A., Lewis, L. A., and Page, I. H., *J. Exp. Med.* 108 - 185. (1958).
8. Aladjem, F., Jaross, N. W. H. Golware., M. L. Randolph, C. C. Sprague and W. G. Umglaub., *J. Clin. Invest.*, 30, 1071 (1951).
10. DeLalla, O. F., and J. W. Gofman, in.: *Methods of Biochemical Analysis*. Vol. 1, ed. D. Glick, p. 459, Interscience (1954).
11. Freund, J. and Mc. Dermott K.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 49, 548 (1942).
12. Ouchterlony, O.: *Progr. Allergy*, 5, 1, (1958).
13. Peterson, B. A. and H. A.: Sober., *J. Am. Chem. Soc.* 78, 751 (1956).
14. Koch, F. C. and Hanke, M. E.: *Practical Methods in Biochemistry*. p. 195, Ed. Williams & Wilkins Co., (1953).
15. P. V. P.: *Preparation, Properties and Applications in the Blood Field and Other Branches of Medicine*, General Aniline and Film Corp., N. Y. (1951).
16. Smithies, O.: *Biochem. J.* 61, 629 (1955).
- 16a. Smithies, O.: *Biochem. J.* 71, 585 (1959).
17. Poulik, M. D.: *Nature*, 180, 1477 (1957).

18. Grabar, P., and C. A. Williams.: *Biochim et biophys. Acta.* 10, 193 (1953).
19. Uriel, J., et J. J. Scheidegger.: *Bull. Soc. Chim. Biol.* 37, (1955).
20. Burstein, M.: *Compt. rend.*, 224, 3189 (1957).
21. Avigan, J. R., Redfield, R. and Steinberg, D.: *Biochim. biophys. acta*, 20, 557 (1956).
22. Shore, B.: *Arch. Biochem. and Biophys.* 71, 1 (1957).
23. Roabell, M.: *Science*, 127, 701 (1958).
24. Scanu, A., and Oriente, P.: *J. Exp. Med.* 113, 735 (1961).
25. Macheboeuf, M. A. and F. Tayeau.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 23, 31 (1941).
26. Gurd, F. R. N.: *Studies on Human Serum Beta-Lipoproteins*. Ph. D. Thesis, Harvard University (1948).
27. Oncley, J. L., F. R. N. Gurd, and M. Melin.: *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 458 (1950).