

Detección y caracterización de la lipoproteína X en una paciente con colestasis

E. Zapico-Muñiz^a, E. Llanguès^b, R. Bonet-Marqués^a, O. Jorba-Castany^a, J. Julve-Gil^{a,c},
J.L. Sánchez-Quesada^{a,c}, F. Blanco-Vaca^{a,c} y J. Ordoñez-Llanos^{a,d}

^aServei de Bioquímica. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. España.

^bServei de Medicina. Hospital General de Granollers. Granollers. Barcelona. España.

^cInstitut de Recerca. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. España.

^dDepartament de Bioquímica i Biología Molecular. Universitat Autònoma de Barcelona. Mollet del Vallès. Barcelona. España.

La lipoproteína X (Lp-X) es una lipoproteína anómala presente en el suero de pacientes con colestasis, deficiencia de lecitina:colesterol aciltransferasa o disfunción hepática y que puede dificultar el diagnóstico del tipo de hipercolesterolemia que presentan estos pacientes. Se presenta un caso de una paciente hipercolesterolemica (8,59 mmol/l) con obstrucción de vías biliares en las que se ha detectado y aislado Lp-X mediante la utilización de ultracentrifugación secuencial, cromatografía de filtración en gel y electroforesis en geles de poliacrilamida. La contribución del colesterol asociado a esta lipoproteína se ha cuantificado en 1,14 mmol/l haciendo uso de la diferente reactividad de diferentes métodos existentes para la determinación de colesterol de LDL y HDL y que reconocen o no a la Lp-X. Se concluye que la paciente presenta hipercolesterolemia debido fundamentalmente a aumento de LDL.

Palabras clave:
Lp-X. Colestasis.

LIPOPROTEIN-X DETECTION AND CHARACTERIZATION IN A PATIENT WITH CHOLESTASIS

Lp-X is a special lipoprotein present in the serum of patients with cholestasis, lecithin cholesterol acyltransferase deficiency and hepatic damage. Presence of Lp-X can make difficult the diagnosis

of the type of hypercholesterolemia presented by these patients. We describe a patient with primary biliary cirrhosis and hypercholesterolemia (8.59 mmol/L) in which Lp-X has been isolated and characterised by the use of sequential ultracentrifugation, gel-filtration chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis. Lp-X associated cholesterol has been quantified in 1.14 mmol/L by using the different reactivity of different methods used to measured LDL and HDL cholesterol. It is concluded that the patient presents hypercholesterolemia mainly due to increased LDL.

Key words:
Lp-X. Cholestasis.

Introducción

La Lp-X es una lipoproteína de baja densidad¹ (densidad de flotación 1,006-1,063 g/ml) con unas características fisicoquímicas bien definidas. Se encuentra en pacientes con colestasis extra o intrahepática², deficiencia familiar de lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT)³ y en recién nacidos con función hepática inmadura⁴. La Lp-X presenta un diámetro entre 30 y 70 nm y su composición se caracteriza por un alto contenido en fosfolípidos (66% en peso) y colesterol no esterificado (22%) y bajo contenido en proteínas (6%), triglicéridos (3%) y colesterol esterificado (3%)⁵. El principal componente proteico es la albúmina (60% del total de proteína), localizada principalmente en el núcleo, mientras que en su superficie presenta pequeñas cantidades de apolipoproteínas C, AI y E. No contiene apoB, por lo tanto no interacciona con el receptor de LDL (B, E)⁶.

Correspondencia: Dr. F. Blanco-Vaca.
Servei de Bioquímica.
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
Sant Antoni Maria Claret, 167. 08025 Barcelona. España.
Correo electrónico: fblancova@hsp.santpau.es

No son bien conocidos los mecanismos patogénicos que permiten la presencia en el suero de Lp-X en pacientes con colestasis. En individuos sanos, el hígado secreta complejos lipoproteicos a la circulación biliar. Estos complejos se componen principalmente de fosfolípidos y colesterol libre en proporciones similares a las de la Lp-X. Cuando estos complejos se incuban *in vitro* con albúmina, se producen partículas tipo Lp-X⁷. Estos hechos sugieren que el reflujo del contenido biliar al plasma causaría la formación de Lp-X en la colestasis. Por otro lado, la Lp-X presente en pacientes con deficiencia familiar de LCAT es idéntica a la encontrada en pacientes con colestasis. Por ello, se ha propuesto que la actividad reducida de LCAT, hecho muy común en pacientes con enfermedad hepatocelular, *per se*⁸ o junto con otros factores, sea causa de aparición de Lp-X durante la colestasis⁹.

La Lp-X es aclarada del plasma principalmente por el sistema retículo-endotelial del hígado y del bazo¹⁰, aunque también participan otros órganos, como el riñón¹¹.

La importancia clínica de la detección de Lp-X se debe a que es un marcador bioquímico de colestasis y a que puede ejercer un papel importante en el desarrollo de la hipercolesterolemia típica de la colestasis, ya que no inhibe la síntesis hepática *de novo* del colesterol¹⁰.

Paciente y métodos

Caso clínico

Mujer de 49 años referida a nuestro laboratorio para estudio de hipercolesterolemia. En 1990 fue diagnosticada de cirrosis biliar primaria en otro hospital de la provincia de Barcelona. No es diabética ni hipertensa. Presenta sobrepeso (índice de masa corporal = 27,8). No es fumadora ni consumidora de alcohol. No padece alergias. No padece trastorno de la función tiroidea. En octubre de 2000 presentaba la siguiente analítica: colesterol total, 8,27 mmol/l; triglicéridos, 0,76 mmol/l; colesterol HDL, 1,63 mmol/l; colesterol LDL, 6,31 mmol/l; gammaglutariltransferasa, 244 U/l (valores de referencia < 53); fosfatasa alcalina, 1.147 U/l (valores de referencia < 270); alanina transaminasa, 88 U/l (valores de referencia < 41); aspartato aminotransferasa, 76 U/l (valores de referencia < 38); bilirrubina total, 10,44 µmol/l (valores de referencia < 17); albúmina, 34 g/l (valores de referencia 34-48), y gammaglobulinas, 24,5 g/l (valores de referencia: 8,2-14). La paciente sigue tratamiento con colestipol. La historia clínica no sugiere la posibilidad de hipercolesterolemia familiar, aunque se desconocen bastantes datos de la historia familiar.

Separación de lipoproteínas

La separación de las fracciones lipoproteicas se llevó a cabo mediante ultracentrifugación secuencial del suero total a las densidades de 1,006 g/ml (flotación de VLDL), 1,063 g/ml (flotación de LDL, IDL y Lp-X) y 1,210 g/ml (flotación de HDL) según el método descrito por Havel¹².

La fracción de densidades comprendidas entre 1,006 g/ml y 1,063 g/ml se sometió a cromatografía de filtración en gel (CFG) con el objetivo de separar la LDL de la Lp-X. Para ello se utilizó una columna de Superosa 6 HR10/30 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) equilibrada con un tampón a pH = 7,4 (NaCl: 0,15 mmol, 0,01% de Na₂-EDTA y 0,02% de NaN₃), a flujo de 1 ml/min, recogiéndose fracciones de 1 ml¹³. El perfil de elución se obtuvo por medida continua de la absorbancia a 280 nm.

Determinación de magnitudes bioquímicas

El colesterol total, colesterol libre, glicerol y triglicéridos se midieron por métodos enzimocolorimétricos (Roche Diagnostics SL, Barcelona). Los fosfolípidos fueron determinados por un método enzimocolorimétrico (Wako Chemicals, Alemania). La cuantificación de proteínas totales en el suero completo se realizó según el método de biuret (Roche Diagnostics), mientras que para la medida de proteínas en las fracciones lipoproteicas se utilizó un método turbidimétrico basado en la reactividad de las proteínas con el cloruro de bencetonio (Roche Diagnostics). El colesterol asociado a la HDL se midió por dos métodos alternativos: precipitación con ácido fosfotungstico¹⁴ en presencia de iones magnesio (cHDL-p) y por un método homogéneo (cHDL-d) (Roche Diagnostics). Asimismo, se utilizaron dos métodos para la determinación del colesterol asociado a la fracción LDL. Por un lado se realizó el cálculo mediante la fórmula de Friedewald¹⁵ (cLDL-c) y por otro se midió de forma directa (cLDL-d) (Roche Diagnostics). El colesterol asociado a VLDL se calculó según la fórmula de Friedewald (cVLDL-c) y también se midió tras separación por ultracentrifugación secuencial (cVLDL-u). Todas las medidas se realizaron en un analizador automático Hitachi 911 (Roche Diagnostics).

Caracterización de la lipoproteína X

La composición de la Lp-X se determinó tras la separación por CFG, mediante los métodos indicados en el apartado anterior. El tamaño de partícula fue determinado mediante electroforesis en gradiente de poliacrilamida (2-16%)¹⁶ y comparación con un patrón de bandas de diámetro conocido. La composición proteica de las fracciones obtenidas de la CFG se determinó mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes en un gel de poliacrilamida al 16% (SDS-PAGE)¹⁷.

Determinación de la actividad lecitina:colesterol aciltransferasa

La actividad LCAT frente a lipoproteínas endógenas marcadas radiactivamente fue medida según un método descrito previamente¹⁸.

Resultados

En la tabla 1 se muestra la composición química de las fracciones lipoproteicas obtenidas por ultracentrifugación. El perfil de elución de la CFG de la fracción de densidad 1,006-1,063 g/ml se muestra en la figura 1A. El resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes de las fracciones obtenidas por CFG y de la LDL total se muestra en la figura 1B, y se observa que la fracción 1 muestra una banda de albúmina y ausencia de apoB, apolipoproteína que sí posee la

Tabla 1. Composición de las fracciones lipoproteicas de la paciente aisladas por ultracentrifugación

	CT (mmol/l)	CL (mmol/l)	CL/CT (%)	TG* (mmol/l)	PL (mmol/l)	PT (g/l)
Suero total	8,59	2,72	31,66	0,72	5,06	84,0
Densidad < 1,006 g/ml	0,33	0,13	39,39	0,31	0,20	0,05
Densidad = 1,006-1,063 g/ml	6,85	2,32	33,80	0,33	2,56	1,32
Densidad = 1,063-1,210 g/ml	1,54	0,49	31,60	0,10	1,50	0,66

*Corregido por glicerol libre. CT: colesterol total; CL: colesterol libre; TG: triglicéridos; PL: fosfolípidos; PT: proteínas totales.

Tabla 2. Composición porcentual de las fracciones obtenidas por columna Superosa 6

	CL	CE	TG	PL	PT
Fracción 1	21,8	9,1	4,1	50,9	14,1
Fracción 2	11,2	30,9	1,7	25,3	30,9
Lp-X*	23,0	2,0	3,0	66,0	6,0
LDL**	7,6	38,0	9,1	23,5	20,9

*Datos obtenidos de Seidel D et al¹. **Datos obtenidos de Blanco-Vaca F¹⁹. CL: colesterol libre; CE: colesterol esterificado; TG: triglicéridos; PL: fosfolípidos; PT: proteínas totales.

fracción 2. La electroforesis no desnaturalizante, en gradiente de poliacrilamida, de las dos fracciones citadas anteriormente se muestra en la figura 1C. En este caso, se estimaron unos diámetros de partícula de 33,07 nm para el caso de la fracción 1 y de 27,39 nm en el caso de la fracción 2.

La actividad LCAT se expresó en forma de tasa de esterificación molar (nmol/h). Se obtuvo un resultado de 18,1 nmol/h frente a una tasa de 22,0 nmol/h en controles.

Cuando se analizó la composición de las dos fracciones separadas, se obtuvieron los resultados señalados en la tabla 2. El resultado más destacable es el porcentaje molar de colesterol libre (respecto del colesterol total) que alcanzó el 80% en el caso de la fracción 1 y el 38% en el caso de la fracción 2, que se asemejan a la composición de Lp-X y LDL, respectivamente.

En la tabla 3 se muestra una comparación de los datos obtenidos por los diferentes métodos utilizados en la medida de colesterol asociado a las diferentes fracciones lipoproteicas.

Discusión

La paciente estudiada presentaba una hipercolesterolemia marcada y un patrón clínico y bioquímico de obstrucción biliar debida a cirrosis biliar primaria. Para intentar discernir si la hipercolesterolemia era secundaria a colestasis (Lp-X) o, por el contrario, se trataba de una hipercolesterolemia debido a aumento de colesterol LDL, nos propusimos identificar, aislar y cuantificar la Lp-X en el suero de la paciente. La medida en el suero total de las magnitudes lipídicas habituales (colesterol, triglicéridos, colesterol VLDL, LDL y HDL) mostraba un patrón de hipercolesterolemia a expensas de LDL. Sin embargo, la medida de colesterol libre y el cálculo del porcentaje de colesterol libre sugirió un defecto en la esterificación del colesterol compatible con deficiencia de LCAT¹⁹, que no fue confirmada en un ensayo de actividad LCAT endógena, donde las lipoproteínas del paciente se marcan con tritio y se mide la interacción del enzima del paciente con dichas lipoproteínas.

La ultracentrifugación secuencial del suero nos permitió caracterizar independientemente cada una de las fracciones lipoproteicas clásicas. En todas ellas, destacó el elevado porcentaje de colesterol libre. Cuando la fracción de densidades 1,006-1,063 g/ml se cromatógrafió en columna de Superosa 6, se obtuvieron dos fracciones la primera de las cuales presentaba una composición muy similar a la de la Lp-X descrita por otros autores⁵, mientras que la segunda presentó una composición similar a la de la LDL de individuos normocolesterolémicos²⁰. Estos datos parecen indicar que la fracción 1 aislada por CFG es Lp-X. Otro dato que avala esta afirmación

Tabla 3. Comparación de medida de colesterol

	cVLDL-u (mmol/l)		cVLDL-c (mmol/l)	cLDL-c (mmol/l)		cLDL-d (mmol/l)	cHDL-p (mmol/l)		cHDL-d (mmol/l)
Resultados	0,33		0,39	6,72		5,64	2,68		1,54
Diferencias	0,06				1,08			1,14	

cVLDL-u: colesterol de VLDL determinado tras aislamiento de VLDL mediante ultracentrifugación; cVLDL-c: colesterol de VLDL calculado según la fórmula de Friedewald; cLDL-c: colesterol de LDL calculado según la fórmula de Friedewald; c-LDL-d: colesterol de LDL determinado con un método directo; cHDL-p: colesterol de HDL determinado tras precipitación de las lipoproteínas con apoB y/o apoE con fosfotungstico; cHDL-d: colesterol de HDL determinado con un método directo.

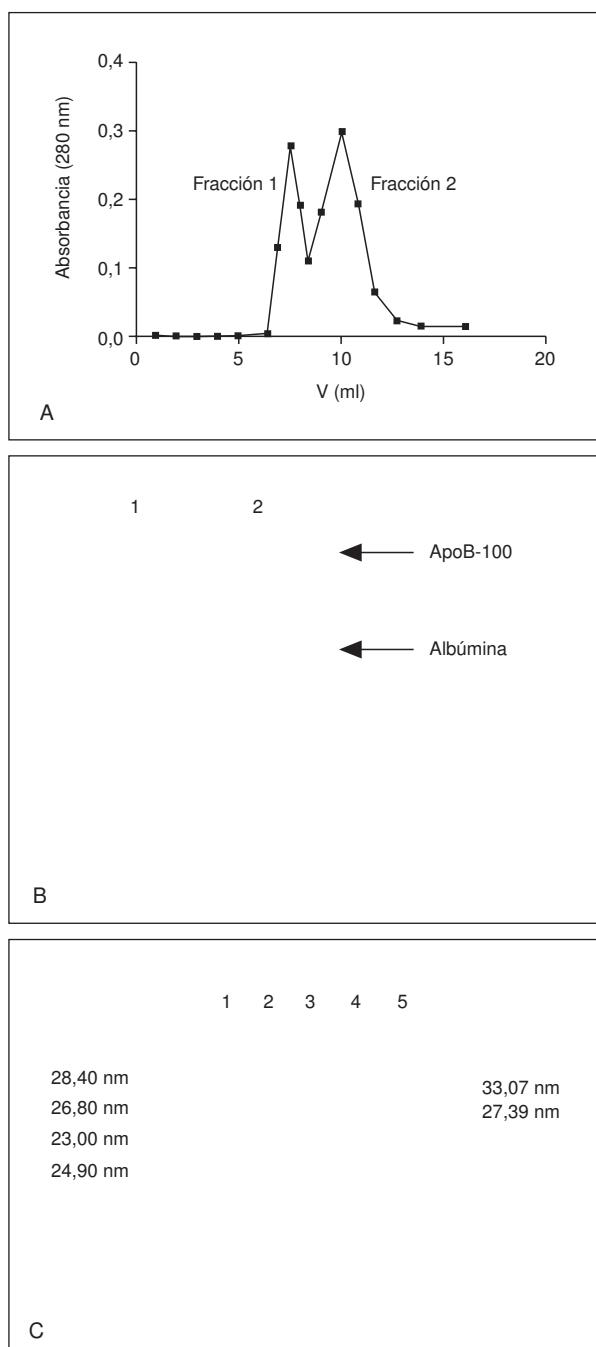


Figura 1. Separación y caracterización de Lp-X. A) Cromatografía de filtración en gel de la fracción de densidad 1,006-1,019 g/ml. B) Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes de las fracciones obtenidas por cromatografía de filtración en gel: carril 1 (fracción 1 de la cromatografía de filtración en gel) y carril 2 (fracción 2 de la cromatografía de filtración en gel). C) Electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente del 2 al 16% en condiciones nativas: carril 1 (marcadores de tamaño), carriles 2 y 3 (muestras de suero total de pacientes control), carril 4 (fracción 1 de la cromatografía de filtración en gel) y carril 5 (fracción 2 de la cromatografía de filtración en gel). V: volumen.

ción es la composición proteica determinada por SDS-PAGE, que muestra una ausencia de apoB junto con presencia de una banda mayoritaria de migración relativa similar a la que correspondería a albúmina. Por su lado, la fracción 2 presentó un patrón de bandas característico de las apolipoproteínas de LDL, observándose también productos de fragmentación de la apoB-100²¹. Por último, el diámetro de lipoproteína (33,07 nm) determinado corresponde al rango descrito para Lp-X⁵.

La cuantificación del colesterol asociado a la Lp-X se realizó de forma indirecta a partir de la determinación de colesterol asociado al resto de lipoproteínas. Para el cálculo colesterol de LDL mediante la fórmula de Friedewald necesitamos medir el colesterol de HDL. Cuando se utiliza un método directo de cuantificación de colesterol HDL el valor obtenido es de 1,54 mmol/l, mientras que si el método de separación previa utilizado es la precipitación con ácido fosfotúngstico, se obtiene una concentración colesterol de HDL de 2,68 mmol/l. Dado que el ácido fosfotúngstico en presencia de Mg²⁺ precipita selectivamente aquellas lipoproteínas que poseen apoB²², se puede inferir que con este método se está midiendo el colesterol de la Lp-X además del asociado a HDL. Por otro lado, el método directo de colesterol HDL se basa en la reactividad selectiva del colesterol asociado a HDL frente a enzimas modificadas con polietilenenglicol. Estas enzimas reconocen partículas con un determinado tamaño y polaridad²³, por lo que debido a las diferencias tanto de carga como de tamaño de la Lp-X respecto a la HDL parece lógico pensar que esta lipoproteína anómala no sea medida en esta determinación. Por tanto, la diferencia entre ambas medidas puede darnos una estimación del colesterol asociado a Lp-X y que es de 1,14 mmol/l. Si ahora aplicamos la fórmula de Friedewald utilizando el valor de colesterol HDL obtenido con el método directo, obtenemos un valor de cLDL de 6,72 mmol/l. En realidad este colesterol asociado a LDL corresponde al de todas aquellas partículas que no sean ni HDL ni VLDL, es decir, IDL, Lp(a) y Lp-X. Si restamos la contribución estimada de Lp-X (1,14 mmol/l) obtenemos un c-LDL de 5,58 mmol/l. Este valor de LDL es similar al medido por un método directo (5,64 mmol/l) para el que se ha descrito la no interferencia de Lp-X²⁴.

Conclusión

La paciente presenta en su suero partículas tipo Lp-X, presumiblemente debidas a la cirrosis biliar primaria que padece, para las que se ha determinado una concentración de colesterol de en 1,14 mmol/l (aproximadamente un 13% del colesterol

total). Por ello, la hipercolesterolemia que presenta no puede ser explicada totalmente por la Lp-X, sino que, por el contrario, es debida a aumento de colesterol de LDL.

Bibliografía

1. Seidel D, Alaupovic P, Furman RH, McConathy WJ. A lipoprotein characterizing obstructive jaundice II. Isolation and particle characterization of the protein moieties of low density lipoproteins. *J Clin Invest* 1971;49:2396-407.
2. Seidel D. Lipoproteins in liver disease. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:541-51.
3. Ritland S, Blomhoff JP, Ghone E. Lecithin:cholesterol acyl-transferase and lipoprotein-X in liver disease. *Clin Chim Acta* 1973;49: 251-9.
4. Witt J, Ober M. Lp-X in newborns: incidence of positive tests without cholestasis. *J Clin Chem Biochem* 1976;14:197-202.
5. Seidel D, Alaupovic P, Furman RH. A lipoprotein characterizing obstructive jaundice. I. Method for quantitative separation and identification of lipoproteins in jaundiced subjects. *J Clin Invest* 1969;48:1211-23.
6. Wally AK, Seidel D. Role of lipoprotein-X in the pathogenesis of cholestatic hypercholesterolemia. Uptake of lipoprotein-X and its effect on 3-methylglutaryl coenzyme A reductase and chylomicron remnant removal in human fibroblasts, lymphocytes and in the rat. *J Clin Invest* 1984;74:867-79.
7. Manzato E, Fellin R, Baggio G, Walch S, Neubeck W, Seidel D. Formation of lipoprotein-X. Its relationship to bile compounds. *J Clin Invest* 1976;57:1248-60.
8. Glickman RM, Sabesin SM. Lipoprotein metabolism. En: Arias IM, Jakoby WB, Popper H, Schachter D, Shafritz DA, eds. *The liver: Biology and Pathobiology*. 2nd.ed.: New York: Raven, 1988; p. 331-54.
9. O K, Frohlich J. Role of lecithin: cholesterol acyltransferase and apolipoprotein A-I in cholesterol esterification in lipoprotein-X in vitro. *J Lipid Res* 1995;36:2344-54.
10. Walli AK, Seidel D. Role of lipoprotein-X in the pathogenesis of cholestatic hypercholesterolemia. Uptake of lipoprotein-X and its effect on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and chylomicron remnant removal in human fibroblasts, lymphocytes and in the rat. *J Clin Invest* 1984;74:867-79.
11. Lymn EG, Choy PC, Magil A, O K. Uptake and metabolism of lipoprotein-X in mesangial cells. *Mol Cell Biochem* 1997;175:187-94.
12. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955;34:1345-53.
13. Franceschini G, Busnach G, Chiesa G, Sirtori CR. Management of lipoprotein-X accumulation in severe cholestasis by semi-selective LDL apheresis. *Am J Med* 1991;90:633-8.
14. Lopes-Virella MF, Stone P, Ellis S, Colwell JA. Cholesterol determinations in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clin Chem* 1977;23:882.
15. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of the preparativecentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
16. Nichols AV, Krauss RM, Musliner TA. Non-denaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 1986;128: 417-31.
17. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-3.
18. Marzal-Casacuberta À, Blanco-Vaca F, Ishida Y, Julve-Gil J, Shen S, Calvet-Márquez S, et al. Functional lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency and high density lipoprotein deficiency in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein A-II. *J Biol Chem* 1996;271:6720-8.
19. Blanco-Vaca F, Qu SJ, Fiol C, Fan HZ, Pao Q, Marzal-Casacuberta A, et al. Molecular basis of fish-eye disease in a patient from Spain: Characterization of a novel mutation in the LCAT gene and lipid analysis of the cornea. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17: 1382-91.
20. Franceschini G, Sirtori CR, Bosisio E, Gualandri V, Orsiai GB, Mogavero AM, et al. Relationship of the phenotypic expresión of the AI_{Milano} apoprotein with plasma lipid and lipoprotein patterns. *Atherosclerosis* 1985;58:159-74.
21. Pentikainen MO, Lehtonen EM, Kovanen PT. Aggregation and fusion of modified low density lipoproteins. *J Lipid Res* 1996;37: 2638-49.
22. Burnstein M, Scholnick HR, Morfix R. Rapid method for the isolation oflipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *J Lipid Res* 1970;11:583-95.
23. Sugiuchi H, Uji Y, Okabe H, Itir Y, Uekama K, Kayahara N, Miyauchi K. Direct measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum with polyethylene glicol-modified enzymes and sulfated α -cyclodextrin. *Clin Chem* 1995;41:717-23.
24. Fei H, Maeda S, Kirii H, Fujigaki S, Mewkawa N, Fuji H, et al. Evaluation of two different homogeneous assays for LDL-cholesterol in lipoprotein-X-positive serum. *Clin Chem* 2000;46:1351-6.