

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES

# LÍPIDOS Y LIPOPROTEÍNAS

Guía de trabajos prácticos  
Cátedra de Análisis Clínicos Ic.

Graciela Bonneau  
María Susana Castillo Rascon  
Augusto Ramón Sánchez

Colaboradores:  
Ana Lía Albrekt  
Williams Pedrozo  
Laura Von Steiger

Año 2007



EDITORIAL UNIVERSITARIA DE MISIONES

**San Luis 1870**

Posadas - Misiones – Tel-Fax: (03752) 428601

Correos electrónicos:

edunam-admini@arnet.com.ar

edunam-direccion@arnet.com.ar

edunam-produccion@arnet.com.ar

edunam-ventas@arnet.com.ar

**Colección:** Cuadernos de Cátedra

**Coordinación de la edición:** Claudio Oscar Zalazar

**Armado de interiores:** Amelia E. Morgenstern

**Corrección:** Amelia E. Morgenstern

ISBN 978-950-579-070-8

Impreso en Argentina

©Editorial Universitaria

Bonneau, Graciela Alicia y otros  
Lípidos y lipoproteínas - 1a ed. - Posadas: EDUNaM - Editorial Universitaria de  
la Univ. Nacional de Misiones, 2007.  
52 p.; 21x30 cm.  
ISBN 978-950-579-070-8  
1. Lípidos. 2. Lipoproteínas. I. Título  
CDD 572.68

Fecha de catalogación: 15/06/2007.

## **LOS AUTORES**

### **BONNEAU, GRACIELA ALICIA**

Bioquímica. Especialista en Química Clínica. Jefe de Trabajos Prácticos de la cátedra Práctica Hospitalaria y Deontología, Carrera Bioquímica –UNaM.

Profesional de planta del Hospital Dr. Ramón Madariaga.

Directora del proyecto de Investigación: “Insulina-resistencia en Adolescentes” (16Q/327).

Co-Directora del proyecto de investigación: “Factores de Riesgo Aterogénico en Empleados de la Administración Pública” (16Q/207).

Miembro fundador del GEIFRAM (Grupo de Estudio Interdisciplinario de factores de Riesgo Aterogénico en Misiones).

### **CASTILO RASCÓN, MARÍA SUSANA**

Bioquímica. Magíster en Salud Pública. Prof. Adjunto cátedra Práctica Hospitalaria y Deontología, Carrera Bioquímica –UNaM.

Profesional de planta del Hospital Dr. Ramón Madariaga.

Director del proyecto de investigación: “Factores de Riesgo Aterogénico en Empleados de la Administración Pública” (16Q/207).

Co-Directora del proyecto de Investigación: “Insulina-resistencia en Adolescentes” (16Q/327).

Miembro fundador del GEIFRAM (Grupo de Estudio Interdisciplinario de factores de Riesgo Aterogénico en Misiones).

### **SÁNCHEZ, RAMÓN AUGUSTO**

Bioquímico. Auxiliar docente de primera cátedra Práctica Hospitalaria y Deontología, Carrera Bioquímica –UNaM.

Profesional de planta del Hospital de pediatría Dr. Fernando Barreiro.

Integrante del proyecto de investigación: “Factores de Riesgo Aterogénico en Empleados de la Administración Pública” (16Q/207).

Miembro fundador del GEIFRAM (Grupo de Estudio Interdisciplinario de factores de Riesgo Aterogénico en Misiones).

### **PEDROZO, WILLIAMS**

Bioquímico. Jefe de residentes de la residencia en Bioquímica Clínica. Ministerio de Salud Pública y UNaM.

Profesional del Banco de Sangre Central de la Provincia de Misiones Hospital Dr. Ramón Madariaga.

Integrante de los proyectos de investigación: “Insulina-resistencia en Adolescentes” (16Q/327) y “Factores de Riesgo Aterogénico en Empleados de la Administración Pública” (16Q/207).

Miembro fundador del GEIFRAM (Grupo de Estudio Interdisciplinario de factores de Riesgo Aterogénico en Misiones).

### **ALBREKT, ANA LIA**

Bioquímica. Auxiliar docente de primera cátedra Química I, Carrera Bioquímica –UNaM.

Profesional de planta del Hospital Dr. Ramón Madariaga.

Integrante del proyecto de investigación: “Factores de Riesgo Aterogénico en Empleados de la Administración Pública” (16Q/207).

Miembro del GEIFRAM (Grupo de Estudio Interdisciplinario de factores de Riesgo Aterogénico en Misiones).

### **VON STEIGER, LAURA**

Bioquímica. Residente en Bioquímica Clínica. Ministerio de Salud Pública y UNaM.



## **TOMA DE MUESTRA**

### **PREPARACIÓN DEL PACIENTE**

La preparación correcta del paciente contribuye a asegurar la interpretación adecuada de los resultados.

Las determinaciones de los lípidos del suero se realizan normalmente en muestras extraídas de pacientes con ayuno previo de 12 horas.

La determinación precisa de lípidos séricos depende del control de factores analíticos y preanalíticos. Las variaciones preanalíticas en los sujetos están sujetas a las diferencias en los estilos de vida, alteraciones en el metabolismo lipídico debido a enfermedades, la fuente de la muestra y las condiciones de la extracción de la muestra. Las variaciones pueden surgir de factores biológicos, de comportamiento y clínicos, así como de la variabilidad en la recolección y manejo de la muestra. Este Capítulo discute los factores que contribuyen a las variaciones preanalíticas y señala la importancia de la estandarización de la preparación del paciente para la determinación de lípidos.

Los componentes de las variaciones pre analíticas son:

### **VARIACIONES BIOLÓGICAS**

#### **Variaciones intraindividuales**

Como muchas de las determinaciones de laboratorio, las variaciones intraindividuales en los valores de lípidos son generalmente menores que las variaciones de persona a persona o interindividuales. Una valoración del componente biológico de la variación total de colesterol (CT), Colesterol de Lipoproteína de Alta densidad (C-HDL) y apolipoproteínas AI y B mostraron un índice de individualidad mucho menor que 0,6. (El índice de individualidades se calcula dividiendo el coeficiente de variación intraindividual ( $CV_B$ ) por el coeficiente de Variación interindividual ( $CV_P$ )). Los hallazgos indican que el uso de intervalos de referencia convencionales, basados en la población, en una interpretación es de escaso valor y pueden ser engañosos. Los rangos de referencia basados en la población no son útiles, a menos que el índice de individualidad sea mayor a 1,4. Sin embargo, los puntos de corte fundamentados en estados de salud en los estudios de grandes poblaciones, fueron deducidos por expertos para la clasificación de hiperlipoproteinemia.

Con los recientes progresos en la ejecución de los ensayos de lípidos, se volvió más fácil definir las variaciones diarias de las concentraciones de lípidos. El conocimiento de tales variaciones es importante ya que proveen, tanto a los laboratoristas como a los clínicos, de un marco de referencia a fin de comparar resultados para evaluar la eficacia de la terapia. Con el mejoramiento en los métodos, la fracción primordial de variación en la medición de los lípidos se debe más a la variabilidad biológica que a la variabilidad analítica. Un estudio reciente atribuyó del 69% (para C-LDL) al 96% (para C-VLDL y TG) del total de la varianza, a la diversificación biológica. La variación biológica es similar en adultos y niños.

La variación intraindividual ( $CV_I$ ) se debe a la combinación de variaciones biológicas ( $CV_B$ ), las cuales incluyen variables en la toma de muestra discutidas más adelante, variaciones diurnas, y otros cambios inherentes a la persona, tanto como una imprecisión analítica ( $CV_A$ ), la cual depende del método y del instrumento usado. La variabilidad total puede ser expresada matemáticamente como:

$$CV_I = [CV_A^2 / (NR) \cdot (NS) + CV_B^2 / (NS)]^{1/2}$$

Donde NS es el número de muestras y NR es el número de repeticiones de las determinaciones de laboratorio por muestra. Cooper y otros han propuesto que la variación intraindividual total para el CT debería ser menor al 5% para una clasificación fiable del riesgo de enfermedades coronarias (CHD). Si la variación total es más que el 5%, entonces será necesario obtener más de una muestra para reducir la variación a un nivel aceptable del 5%. Se debe reducir la variación analítica y la biológica para permitir estimar el riesgo de aterosclerosis con el menor número de muestras posible.

Las nuevas pautas del NCEP usan un punto de corte de 100 mg/dl (2,6 mmol/l) para tomar decisiones clínicas en sujetos con enfermedad coronaria. Una sola determinación para este valor más bajo de C-LDL podría no ser muy creíble. Por lo tanto, seguirán siendo necesarias dos muestras para C-LDL, excepto para pacientes con resultados elevados. Cuando el  $CV_A$  es menor al 2%, virtualmente no hay efecto en la variación total al repetir el análisis en la misma muestra.

Un método simple para estimar el nivel de variabilidad biológica en un individuo es usar el rango relativo (RR), definido como:

$$\text{Rango relativo} = \frac{\text{diferencia entre valores mayor y menor}}{\text{Resultado promedio}}$$

Cooper y otros han sugerido que el  $CV_I$  para un individuo debería estar por debajo del  $CV_B$  promedio de la población, y han calculado valores de RR que satisfacen esta meta. La variación individual máxima puede estar en el rango de 10 – 15% para CT, C-LDL, C-HDL, apo-AI y apo-B, pero por encima de 50% para LP(a) y de 75% para TG. Los datos longitudinales del estudio de Framingham sugieren que pacientes con un  $CV_B$  aumentado tiene un riesgo de enfermedad cardiovascular aumentado. Si los RR son inferiores a los valores de puntos de corte, el colesterol promedio puede usarse para estimar el riesgo de enfermedad coronaria. Si el RR es superior al valor del punto de corte, se deberían analizar muestras adicionales antes de tomar una decisión acerca del riesgo.

El tiempo mínimo necesario entre la repetición de medidas para determinar la máxima variabilidad no ha sido determinado en forma concluyente. Mientras que el NCEP recomienda al menos una semana entre mediciones en serie, estudios recientes han sugerido que un período de dos semanas provee una medida más confiable de la variabilidad.

El CT sérico es el analito lipídico más estable; el promedio de la variación de un día a otro alcanza un 6,1%, aunque algunos individuos pueden variar por encima del 11%. El momento del día tiene un pequeño efecto en la concentración de CT, ya que la variación intradía es generalmente menor que el 3%. El CT tiende a ser mayor en invierno que en verano en un promedio del 2,5%. En las mujeres, las concentraciones de CT pueden fluctuar durante el ciclo menstrual, en promedio de 10 a 20%, menor en la fase lútea tardía y en la fase menstrual. Para la mujer promedio, las concentraciones de CT aumentan alrededor de 14 mg/dl alrededor de la ovulación y caen al nadir durante la menstruación.

Las concentraciones de TG muestran una marcada variación intraindividual. Aún excluyendo la marcada fluctuación posprandial, las concentraciones de TG difieren en promedio un 23%, en uno o más meses, y en algunas personas puede fluctuar tanto como un 40% alrededor del valor principal. Durante el día, las concentraciones de TG típicamente aumentan desde el nadir alas 3: 00' AM hasta alcanzar valores picos a la media tarde, para caer progresivamente a lo largo

del anochecer; la variación diurna promedio es aproximadamente del 30%. A causa de esta marcada variación randomizada, es difícil establecer variaciones rítmicas de los TG por estación, período menstrual o por otras causas.

Las concentraciones de Col-HDL muestran una variación intraindividual promedio del 7% en un mes a un año, pero rara vez difieren más del 12%. Las variaciones estacionales de C-HDL son significativamente mayores, pero despreciables frente a las de CT y C-LDL.

Ya sea que la concentración de C-LDL se mida directamente o que se calcule con las mediciones de CT, C-HDL y TG, la variabilidad biológica es similar, en un promedio del 9.5%. Como sucede con el CT, las concentraciones del C-LDL son un 2.5% mayores en invierno que en verano y en mujeres, más bajas en la fase lútea y durante la menstruación.

Un estudio reciente ha demostrado que el  $CV_B$  del CT, TG, C-HDL y C-LDL calculado es el mismo en muestras obtenidas por sangre periférica (pulpejo del dedo) o por venipuntura.

Los datos provenientes de la medición de apolipoproteínas muestran variabilidad similar. La variación biológica de la apoAI promedia en 7-8%; aparentemente no hay cambios durante la menstruación. La variación intraindividual tanto para HDL-C como para apo AI es más grande en fumadores que en no fumadores. La concentración de apo AI tiende a ser más alta al anochecer y cae hasta el nadir a las 06:00' AM. No está claro si las variaciones se deben al ciclo de sueño-vigilia o por el ciclo noche-día.

La ApoB tiene una variación biológica en la medición intradía de 6.5%, con una variación de 8 a 10% de un día a otro. La Lipoproteína a (Lp(a)) muestra una variación biológica en la medición de 8.6%. No hay variación diurna significativa en las concentraciones de apo B o Lp(a). La Lp(a) aumenta durante la fase lútea en una minoría de mujeres; mayormente no está afectada por el ciclo menstrual.

- *Variabilidad de los valores lipídicos*: El error total en la determinación de un parámetro bioquímico depende de la variabilidad biológica propia de cada individuo y de la variabilidad analítica de la medición. Esta última comprende la imprecisión, relacionada con la reproducibilidad, y el *bias*, relacionado con la exactitud. En la tabla se informa la variabilidad biológica y los valores de imprecisión, *bias* y error total deseables de no ser superados. Con la finalidad de minimizar el error total, se recomienda realizar dos determinaciones con un intervalo de 14 días, preferentemente en el mismo laboratorio.

#### VARIABILIDAD BIOLÓGICA Y ANALÍTICA DE LOS PARÁMETROS LI-PÍDICOS Y LIPOPROTEICOS. National Cholesterol Education Program (NCEP)

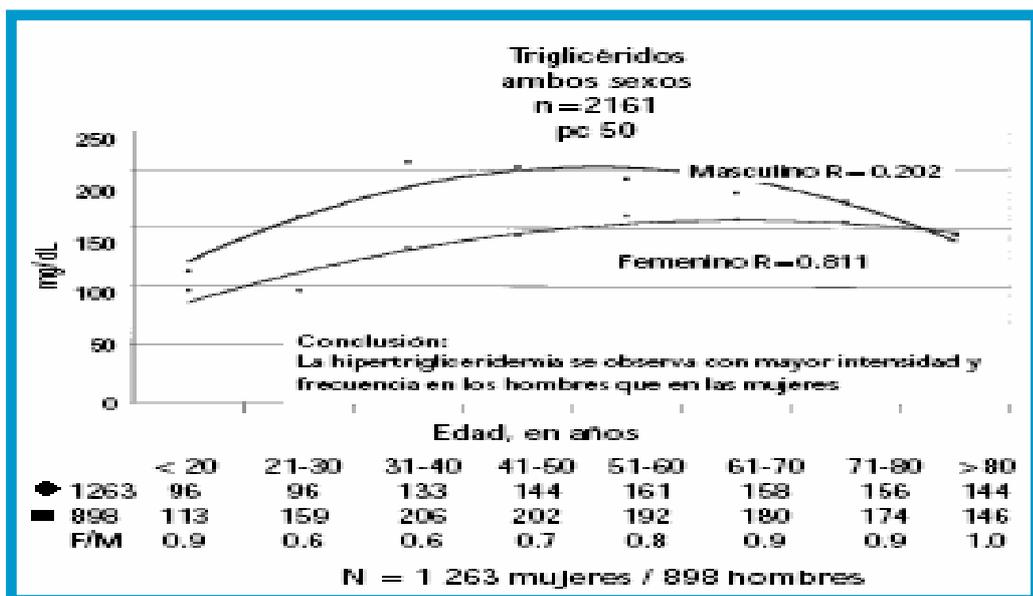
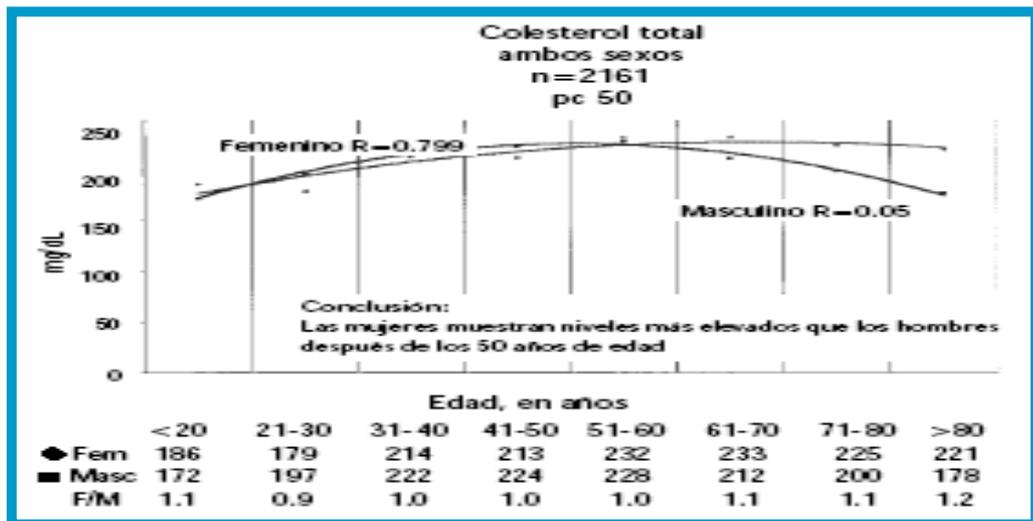
	Variabilidad Biológica	Especificaciones deseables		
	C.V. (%)	Imprecisión (%)	<i>Bias</i> (%)	Error total (%)
Triglicéridos	20.9	10.5	10.7	27.9
Colesterol Total	6.0	3.0	4.0	9.0
Colesterol-LDL	8.3	4.2	6.8	13.6
Colesterol-HDL	7.1	3.6	5.2	11.1

## Efectos del sexo, edad, raza en el perfil lipídico

Numerosos factores demográficos dentro de una población se correlacionan con diferencias de concentraciones de lípidos y lipoproteínas. En recién nacidos, CT, TG y la concentración de la mayoría de las lipoproteínas y apolipoproteínas aumentan rápidamente desde valores bajos en sangre de cordón al 80% de los valores de adultos a los cuatro días de edad. La Lp(a) aumenta más lentamente y continúa su incremento gradual a lo largo de al menos 6 meses de vida. En los niños las concentraciones de lípidos en niñas y niños permanecen estables hasta la pubertad, cuando ocurre un transitorio descenso de CT, TG, C-HDL, C-LDL. En la pubertad los valores de lípidos comienzan a divergir, en los niños CT decrece levemente debido a una caída brusca del C-HDL (y apoAI). Después de la pubertad el C-HDL y la apoAI continúan disminuyendo hasta alrededor de los veinte años, entonces permanece estable hasta al menos los 55 años. En las niñas el C-HDL y la apoAI aumentan gradualmente desde la menarca hasta el climaterio. La Lp(a) es similar en hombres y mujeres de todas las edades, aunque es ligeramente más alta en mujeres jóvenes y adolescentes.

En niños negros las concentraciones de C-HDL, apoAI, Lp(a), y C-VLDL son notoriamente mayores que las de niños blancos, hasta alrededor de los 9 años, mientras que las concentraciones de C-LDL y ApoB son menores. En la adultez estas diferencias relativas relacionadas con la edad y la raza persisten. Existen pocos datos acerca de otros grupos raciales minoritarios en la población. En dos estudios no se encontraron diferencias en la mayoría de los lípidos entre blancos hispanicos y no hispanicos. En contraste, la Lp(a) es significativamente menor en hispanicos blancos, intermedia en asiáticos y blancos no hispanicos y más altos en negros. Se observaron cambios similares en concentraciones plasmáticas de CT y TG con respecto al sexo en un estudio de prevalencia de clínicas de Investigación de lípidos de 60502 pacientes en un estudio de 11 poblaciones de Norteamérica separadas y bien definidas.

En todos los individuos, la concentración de CT aumenta gradualmente con la edad, aunque la magnitud del aumento no es tan grande en estudios recientes como hace 20 o más años. En la segunda encuesta nacional de salud y nutrición, el CT promedio aumentó desde aproximadamente 186 mg/dl a los 20 años hasta aproximadamente 230 mg/dl en hombres y 250 mg/dl en mujeres de 65 años. Este aumento se debe principalmente al aumento de la concentración de C-LDL, y se acompaña de un incremento de los valores de ApoB. Resultados del estudio de Framingham demuestran que el CT aumenta bianualmente un 3.7% en hombres y 6.6% en mujeres. En las mujeres hay un aumento del 14% en CT y un 19% de aumento en C-LDL en los cinco años alrededor de la menopausia; los TG y C-HDL no están afectados. La concentración de TG también aumenta con la edad, y aumenta, en promedio, un 25% en mujeres después de la menopausia.



Terres.Rev. Med. Pat. Clin. Dic.2001

## ***VARIACIONES POR HÁBITOS O COMPORTAMIENTO***

El principal factor de comportamiento que afecta a las concentraciones séricas de lípidos, lipoproteínas y apolipoproteínas son la dieta, la obesidad, tabaquismo, consumo de alcohol y cafeína, ejercicio y estrés. Dado que estas conductas son controlables es imperativo que el sujeto mantenga su rutina habitual por varios días antes de la toma de muestra de sangre para una determinación de lípidos.

### **Dieta**

Los efectos de la dieta en las concentraciones de lípidos y lipoproteínas están bien establecidos. El alcance de este efecto, sin embargo, varía entre individuos. Se ha demostrado que un aumento en la ingesta de colesterol puede causar un aumento de la concentración sérica de colesterol en solo el 30% de la población estudiada. Varios ácidos grasos libres parecen tener diferentes efectos sobre el perfil lipídico y el riesgo de enfermedad coronaria. En general, dietas ricas en ácidos grasos mono y polinsaturados causan disminuciones en CT, C-LDL Apo B y TG, mientras que dietas ricas en grasas saturadas, principalmente ácido palmítico, provocan aumento de TG y CT. Sin embargo, el ácido esteárico, que también es un ácido graso saturado, no parece aumentar la concentración de C-LDL. La progresión del riesgo de enfermedad coronaria medida durante 39 meses por angiografía, estaba fuertemente relacionada con la ingesta de ácidos grasos saturados de cadena larga, especialmente 18:0, y de ácidos grasos insaturados trans, tales como el 18:1, aparentemente de forma independiente a la concentración plasmática de CT.

Los ácidos grasos Omega-3, provenientes de la grasa de pescado, han demostrado una disminución consistente de TG y C-VLDL, en sujetos normales y en hipertrigliceridémicos, posiblemente por la inhibición de la síntesis hepática de ApoB-VLDL y TG-VLDL. En cambio, los efectos documentados de la grasa de pescado sobre CT, C-LDL y C-HDL han sido inconsistentes.

El efecto de la ingesta en la dieta de fibras sobre los lípidos séricos es aún controversial; sin embargo, las fibras hidrosolubles demostraron reducir el CT.

Se sabe que los vegetarianos tienen un perfil lipídico más saludable que los no vegetarianos. Un estudio ha demostrado que el C-LDL es 37%, menor y C-HDL es 12% mayor en vegetarianos estrictos que en no vegetarianos.

Cambios en los hábitos alimentarios demostraron alterar significativamente los perfiles lipídicos y lipoproteicos en períodos relativamente cortos de tiempo. Cuando la dieta baja en grasas y alta en fibras de un grupo de indígenas Tarahumara se sustituyó por una dieta de alto valor calórico, por un período de 5 semanas, aumentó el CT y C-LDL (más de 39%) y las concentraciones de TG (19%), así como también se vio aumento del peso corporal (7%).

Puesto que la dieta puede modificar la concentración de lípidos, los sujetos deberían mantener su ingesta dietaria y hábitos de alimentación antes de la toma de muestra de sangre para estudio de lípidos y lipoproteínas.

Cuando los sujetos han cambiado sus hábitos dietéticos significativamente, el Programa Nacional de Educación para el Colesterol (PNEC) sugiere esperar un periodo de 3 a 6 meses antes de realizar cualquier estudio de lípidos.

## **Obesidad**

La obesidad ha demostrado estar asociada a un aumento del riesgo de enfermedad coronaria. Además, los individuos obesos tienen niveles más altos de TG, CT, y C-LDL y más bajos de C-HDL, comparado con controles no obesos. Después de perder peso, un individuo obeso experimenta un descenso de TG alrededor del 40%, un descenso de CT y C-LDL del 10% y un aumento de C-HDL alrededor del 10%. En un estudio de gemelos idénticos la obesidad estaba independientemente asociada con CT, TG, C-LDL, C-HDL, así como con la presión sanguínea sistólica y diastólica, y la tolerancia a la glucosa.

La evidencia actual sugiere que la distribución de grasa corporal tiene una asociación más fuerte con varias morbilidades, tales como hiperlipidemia, hipertensión, diabetes y enfermedad cardiovascular, que solo el peso corporal. La acumulación de grasa intra-abdominal (relación cintura/cadera) en mujeres obesas, se relacionó con niveles más altos de TG y C-LDL, y menores de C-HDL, independientemente de la obesidad total. La grasa abdominal visceral, medida por tomografía computada, es el factor de obesidad más relevante para CT, TG y contenido de apolipoproteína ApoB, y negativo para C-HDL.

Las ganancias y pérdidas de peso repetidas en individuos obesos podrían precipitar una variación significativa en los lípidos y lipoproteínas séricas. Por lo tanto, los sujetos deberían evitar cualquier alteración en el estilo de vida que cause cambios de peso al momento de la toma de muestra de sangre.

## **Tabaquismo**

El tabaquismo es un factor de riesgo independiente establecido de enfermedad coronaria. Cambios fisiológicos asociados al tabaquismo que probablemente contribuyen al alto riesgo de enfermedad cardiovascular incluyen aumento de factores de coagulación y concentraciones de carboxihemoglobina, aumento de la viscosidad de la sangre y un perfil de lipoproteínas alterado. La fuerte asociación del tabaquismo con el recuento de leucocitos, hematocrito, y frecuencia cardíaca, sugiere que el riesgo inducido por el tabaquismo está más asociado con trombosis que con aterosclerosis. Además, la LDL oxidada producida por exposición al humo del cigarrillo se demostró que causa acumulación de ésteres de colesterol en los macrófagos *in vitro*. Por lo tanto, el LDL oxidado podría también contribuir a la formación de células esponjosas y aterosclerosis en fumadores.

Comparados con no fumadores, los fumadores tienen mayores niveles séricos de TG, C-VLDL y C-LDL, y menores de apoAI y C-HDL (principalmente de la fracción C-HDL<sub>3</sub>).

Más aún, la relación entre fumar y C-HDL demostró ser dosis dependiente en hombres y en mujeres; por lo tanto, la cantidad de cigarrillos afectará el grado de alteración del perfil lipoproteico. Los fumadores pasivos, por medio de múltiples componentes secundarios del humo, afectan la actividad plaquetaria, aceleran las lesiones ateroscleróticas, aumentan el daño isquémico de tejidos, y disminuyen el C-HDL.

Los sujetos no deberían cambiar su patrón de tabaquismo al momento de la toma de muestra de sangre.

## **Ingesta alcohólica**

Varios estudios epidemiológicos han demostrado una relación entre el consumo de alcohol, cambios en el perfil lipoproteico, y mortalidad cardiovascular. Las alteraciones inducidas por el alcohol en el patrón lipoproteico dependen de la cantidad de alcohol consumido, susceptibilidad individual, variables genéti-

cas y factores dietarios. Es más, estos cambios difieren entre bebedores moderados y grandes bebedores. Los bebedores de alcohol moderados (1,2 oz/día, 34 g/día), tienen concentraciones de C-HDL Apo AI y Apo AII aumentadas comparadas con las de no bebedores. Otro estudio ha mostrado que la ingesta moderada del alcohol aumenta el C-HDL total, C-HDL<sub>2</sub> y C-HDL<sub>3</sub>, aumenta el CT, C-LDL y C-VLDL, y disminuye el riesgo de IAM. En mujeres premenopáusicas, la ingesta moderada de alcohol dio como resultado el aumento del 10% de C-HDL, un 8% de disminución del C-LDL, y no variaron los niveles de Lp(a). Sin embargo, el consumo moderado de alcohol en pacientes con hipertrigliceridemia primaria, habitualmente genera un aumento importante de los triglicéridos. Con el aumento en la ingesta de alcohol, el C-LDL y C-HDL<sub>2</sub> se reducen y aumentan los TG. En hombres alcohólicos crónicos, con estructura y funcionamiento hepático normal, los TG generalmente están en un rango normal, el C-HDL aumentado, y el C-LDL disminuido.

La concentración de Lp(a) parece estar influenciada por el alcohol de una manera diferente que otros lípidos. Las concentraciones de Lp(a) disminuyen alrededor del 33% inicialmente y luego retornan a la línea de base después de 6 semanas de ingesta alcohólica. Los sujetos deberían mantener su patrón usual de consumo de alcohol antes de la toma de muestra de sangre.

### **Ingesta de cafeína**

Varios estudios epidemiológicos han investigado la relación entre el consumo de café, morbilidad cardiovascular y alteración de las concentraciones de lípidos. Estas correlaciones son inconsistentes. La ingesta de café en Noruega ha sido asociada con una dieta aterogénica y un estilo de vida no saludable. Recientemente, se sugirió que la inconsistencia en estos hallazgos puede ser resultado de los métodos usados en la preparación del café. La evidencia más fuerte para una asociación directa entre el consumo de café y valores aumentados de CT y C-LDL proviene de Escandinavia donde el café, normalmente, se prepara por hervido. Se informó que el consumo de café filtrado tiene efectos sustancialmente menores en los valores del colesterol que el consumo de café preparado por hervido. Las concentraciones séricas de Apo A I, Apo A II, Apo B, C-HDL y C-VLDL, parecen no estar afectadas por el consumo de café, aún cuando esté preparado por hervido. Los diterpenos y la cafeína presentes en el café pueden ser responsables del aumento de CT y TG.

Reemplazando el café normal por el café descafeinado no se alteran los TG, CT o CHDL en hombres y mujeres saludables. El café consumido por mujeres norteamericanas aparentemente no aumenta el riesgo de ECV. Sin embargo, un estudio clínico randomizado encontró que el consumo de café normal filtrado lleva a un aumento estadísticamente significativo de la concentración en plasma de CT, debida al aumento de C-LDL y C-HDL.

Los sujetos deberían mantener su ingesta diaria usual de cafeína durante los días anteriores al test de lípidos pero abstenerse de beber café y crema 12 horas antes de la toma de muestra de sangre.

### **Ejercicio**

Varias investigaciones epidemiológicas han informado una asociación entre el estilo de vida sedentario y el riesgo aumentado de desarrollar manifestaciones clínicas de ECV.

Un menor nivel de actividad física se asocia con concentraciones séricas mayores de C-LDL y TG. Y mayor riesgo de morir por enfermedad cardiovascu-

lar. El ejercicio tiene un efecto preventivo sobre la progresión de la aterosclerosis coronaria probablemente por alteración del perfil lipoproteico. En sujetos hiperlipidémicos se observó una alteración adicional favorable en el perfil lipoproteico cuando el ejercicio físico acompañó el tratamiento dietario

El ejercicio energético causa disminución en los TG, C-LDL y Apo B, y aumento en C-HDL (principalmente la fracción C-HDL 2) y Apo A I. Más aún, la extensión de estos cambios puede ser dependiente de la intensidad y tipo de programa y entrenamiento físico. El ejercicio intenso causa un significativo aumento el C-HDL el cual se debe a un aumento en el C-HDL 3. El ejercicio físico moderado y regular también parece tener efecto favorable en los lípidos séricos. Los adultos que caminan 2,5 a 4 hrs. por semana tienen CT más bajo y C-HDL mayores que quienes no caminan regularmente. En mujeres previamente sedentarias que caminaron a paso rápido un promedio de 155 minutos cada semana por un período de un año, el CT disminuyó 6,5% y el C-HDL aumento 27%.

Los sujetos deberían mantener su nivel usual de ejercicio los días previos al estudio de lípidos y evitar cualquier ejercicio energético las 24 horas previas a la extracción sanguínea.

### **Stress**

Un alto nivel de stress tanto como una personalidad tipo A ha sido relacionado a riesgo aumentado de ECV. Aún más, varios estudios han demostrado un aumento en la concentración de CT durante situaciones de stress, el cual se debe, posiblemente, a cambios dietarios que acompañan al stress. Los factores estresantes incluidos en estos estudios son diversos e incluyen a ambos, crónicos y agudos. Algunas evidencias sugieren que el estrés afecta las concentraciones de lípidos en hombres y mujeres de manera diferente.

Además, se demostró que la hospitalización voluntaria causa descenso de la concentración de Col-HDL y de Apo AI aproximadamente en un 10%.

No es aconsejable realizar determinaciones de lípidos para valoración de riesgo cardíaco en un período de estrés, tal como durante exámenes académicos u hospitalización, aún en procedimientos voluntarios.

Para minimizar los efectos del estrés agudo en la determinación de lípidos, los sujetos que se presentan en el laboratorio deben ser animados a relajarse por al menos 5 minutos previos a la toma de muestra de sangre.

## **VARIACIONES CLÍNICAS**

El perfil de lipoproteínas de un individuo está marcadamente alterado en infecciones agudas y enfermedades metabólicas. Además, la hiperlipidemia inducida por drogas se ha informado en varias poblaciones de pacientes. Para obtener la concentración de lípidos y lipoproteínas usual del paciente, las pruebas deben realizarse preferentemente en ausencia de cualquier dislipoproteinemia secundaria. Por otra parte, los desórdenes o la medicación que causan disrupción de los valores de los lípidos deberían ser resaltados en el informe analítico del paciente.

### **Alteraciones secundarias en lípidos inducidas por enfermedades**

Varias enfermedades endocrinas, metabólicas, renales, hepáticas y de depósito precipitan una hipo o hiperlipidemia secundaria. El hipotiroidismo y la diabetes mellitus son, tal vez, los desórdenes más comunes que causan hiperlipidemia secundaria. El CT y TG séricos están aumentados en el 30% de los pacientes

con hipotiroidismo por un aumento de la producción y disminución de la remoción de LDL. Se han visto grados variables de hipertrigliceridemia en pacientes con diabetes mellitas tipo I y tipo II. El estudio CARDIA encontró que concentraciones de insulina más altas estaban asociadas positivamente con valores desfavorables de CT y C-LDL, TG, Apo B, y presión sanguínea, y negativamente con C-HDL, C-HDL2, C-HDL3 y Apo AI. El tratamiento con insulina de pacientes no-insulino dependientes generalmente da como resultado un significativo cambio tendiente a la normalización de las concentraciones de TG, C-HDL y C-LDL. La Lp(a) parece aumentar en ambos tipos de pacientes diabéticos (tipo 1 y tipo 2). Las evidencias sugieren que podría existir una relación directa entre el control diabético y la concentración de Lp(a).

Se pensó que la inducción de la lipoproteinlipasa por insulina era responsable del estado hiperlipidémico de la población. Pacientes con síndrome nefrótico o fallo renal crónico que no llegan a hemodiálisis, tienen CT, C-LDL, TG, Apo B y Lp(a) significativamente altos, y concentraciones menores de Apo AI comparados con los controles. Más aún, se documentaron concentraciones elevadas de Lp(a) en pacientes con proteinurias acentuadas de varios orígenes. La naturaleza exacta de estas anomalías permanece incierta. Sin embargo, recientemente se ha sugerido que las alteraciones de los lípidos en pacientes con síndrome nefrótico son atribuibles a aumentos reversibles en la producción de VLDL. La obstrucción del tracto biliar causa la producción de la lipoproteína anormal "lipoproteína X". Dado que las partículas ricas en colesterol son pobremente removidas de la circulación, el CT en estos pacientes está marcadamente aumentado (superior a los 1000 mg/dl).

El cáncer, en general, tiende a disminuir el CT y el C-HDL. El descenso más pronunciado usualmente se nota en pacientes con enfermedades hematológicas malignas. Estos cambios pueden ser reflejo de la proliferación activa de células. Además, los pacientes con supervivencia prolongada tienen persistentemente C-HDL y apo AI bajas, a pesar de la resolución de la enfermedad subyacente.

El IAM está asociado con una disminución variable de CT, C-LDL, apo AI y apo B, y aumento de la Lp(a). La extensión del descenso generalmente es dependiente de los valores originales de lípidos. Por ejemplo, si la concentración original de CT estaba por debajo de 200 mg/dl, se podrán ver pequeños cambios. Las concentraciones de lípidos permanecen estables dentro de las 24 h después del infarto, y disminuyen gradualmente a una meseta más baja donde se mantienen por 6 – 8 semanas.

La muestra de sangre debería ser obtenida dentro de las 24 h del infarto o después de 3 meses para que refleje ajustadamente los valores usuales de lípidos del sujeto.

Las infecciones e inflamaciones causan aumento de TG y Lp(a), y disminución de CT y C-HDL, independientemente del agente infeccioso, la causa de la enfermedad y la condición clínica del paciente. Varias formas de dislipoproteinemias se producen por otros numerosos desórdenes, tales como Porfiria aguda intermitente, enfermedad por almacenamiento de glucógeno, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Tay-Sachs, artritis reumatoidea, anorexia nerviosa, y lupus eritematoso sistémico. El tratamiento del desorden primario (excepto desórdenes hereditarios) usualmente resultará en una normalización del perfil lipídico.

Las infecciones e inflamaciones causan aumento de triglicéridos y Lp(a) y disminución de colesterol total y colesterol HDL, por lo tanto el estudio de lípidos debe realizarse luego de completar la recuperación de la enfermedad.

### **Alteraciones secundarias en los lípidos inducidas por drogas**

Los medicamentos que alteran el metabolismo lipídico y sus concentraciones séricas incluyen diuréticos, algunos beta-bloqueantes, hormonas esteroideas, glucocorticoides, y ciclosporinas, entre otros. Tiazidas y clorotalidone, los diuréticos más comúnmente usados en el tratamiento de la hipertensión esencial moderada, causan un aumento de las concentraciones séricas totales del 12%, C-LDL (20%), TG (7%), y apo-B (20%), y disminución en las concentraciones de C-HDL (16%) y apo AI (6%), comparadas con los controles. Además, el propanolol, un beta-bloqueante no cardioselectivo que también se usa en el tratamiento de la hipertensión, aumenta significativamente los TG séricos y disminuye el C-HDL (principalmente la fracción C-HDL<sub>2</sub>). Más del 50% de los niños que reciben asparaginasa para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda mostraron un aumento grosero en la concentración de TG (más de 5000 mg/dl). Estos aumentos revierten después de discontinuar el tratamiento.

Varios investigadores han informado hallazgos conflictivos concernientes al efecto de los anticonceptivos orales sobre las concentraciones séricas de las lipoproteínas. La discrepancia puede atribuirse en gran medida a la variación en el contenido hormonal de la medicación usada en esos estudios, principalmente diferencias en la relación estrógeno/progesterona. Los anticonceptivos orales con altas concentraciones de progesterona causan un aumento de la concentración sérica de CT y C-LDL, y descenso de C-HDL. En mujeres que toman anticonceptivos orales con altos contenidos de estrógenos, y mujeres post-menopausicas que reciben suplemento de estrógenos, se pueden esperar cambios opuestos. El tratamiento estrogénico en mujeres y en hombres que padecen carcinoma prostático, pareciera disminuir la concentración de Lp(a) cerca del 50%.

Se informó que los agentes inmuno-supresores también alteran el metabolismo lipídico. La prednisolona aumenta el CT, C-LDL, C-HDL, C-VLDL, TG, apo AI, y apo B, posiblemente por aumento de la producción de lipoproteínas. Las ciclosporinas aumentan marcadamente el CT, C-LDL, y apo B, y disminuyen la Lp(a). Sin embargo, la hipertrigliceridemia es el cambio más profundo después de la terapia con prednisolona y azathioprine, y la hipercolesterolemia es el hallazgo más común después de la terapia con ciclosporina en pacientes transplantados. Cualquier medicación que se conozca que altera los valores de lípidos se deberían resaltar en el informe de laboratorio.

### **Embarazo**

Los sistemas fisiológicos y endocrinos están ampliamente afectados durante el embarazo, alterando la concentración de varios parámetros bioquímicos. El CT, C-LDL, TG, apo AI, apo AII, apo B, y Lp(a) aumentan significativamente durante el embarazo, principalmente en el segundo y tercer trimestre, las concentraciones de estos analitos usualmente se normalizan dentro de las diez semanas posparto, a menos que la mujer esté lactando. La movilización aumentada de lípidos probablemente refleja el aumento en la demanda metabólica materna como resultado del embarazo. Además, la evaluación del perfil lipoproteico durante el embarazo no refleja el patrón usual del sujeto.

Los estudios de lípidos deberán realizarse al menos tres meses después del parto o del cese de la lactancia.

## **RECOLECCIÓN Y MANEJO DE LA MUESTRA**

### **Estado de ayuno**

### **Hemoconcentración**

### **Sangre Capilar vs. Venosa**

### **Anticoagulantes**

### **Almacenamiento**

Es importante establecer un procedimiento estandarizado para la extracción de sangre, especialmente cuando se consideran estudios a largo plazo. Algunos de los factores que deben ser tenidos en cuenta son la postura, el estrés emocional y físico, la vena seleccionada, el empleo de torniquete, selección de tubos y tiempo de ayuno. En el caso de adultos, un método conveniente consiste en mantener al paciente sentado, sujeto a un mínimo de tensiones, mientras se extrae sangre de la vena antecubital.

La hemoconcentración por la postura u otras causas aumenta la concentración relativa de las proteínas y de las sustancias unidas a proteínas, lo cual podría producir un cambio predecible en todas las mediciones de lípidos y lipoproteínas. Un paciente que está parado por 5 minutos experimentará un aparente aumento en la concentración de lípidos del 9%, y hasta un 16% luego de 15 minutos. Esto puede minimizarse teniendo al paciente sentado por al menos 15 minutos antes de la venopuntura.

El uso de un torniquete puede también causar hemoconcentración significativa. Después de un minuto, no hay cambios significativos en la concentración del CT o de las proteínas; sin embargo, después de 2 minutos la concentración de CT aumenta un 5% y después de 5 minutos puede ocurrir un aumento del 10 al 15%. Si un torniquete permanece por 15 minutos en una flebotomía, los lípidos aumentan del 20 al 40%.

Los cambios de postura también se asocian con cambios en el plasma de las concentraciones de noradrenalina, y actividad simpática aparente, los cuales pueden indirectamente alterar también la concentración de lípidos.

Si la extracción sanguínea se realiza en forma adecuada, el plasma y el suero son igualmente adecuados para la determinación de colesterol total, triglicéridos o fosfolípidos. Si las muestras de suero o plasma permanecen demasiado tiempo a temperatura ambiente presentan un aumento de actividad de la Lecitin Colesterol Acil Transferasa (LCAT) lo que puede alterar la composición de los lípidos y lipoproteínas plasmáticas. Si se elige plasma, es aconsejable emplear como anticoagulante EDTA sólido (1 mg/ml de sangre) y separar las células tan pronto como sea posible (antes de las 2 horas). El EDTA retarda la auto oxidación de los ácidos grasos no saturados y del colesterol formando quelatos con los iones de metales pesados como el  $\text{Cu}^{++}$ ; la oxidación altera las propiedades físicas de las lipoproteínas produciendo desnaturalización y degradación. Además el EDTA reduce las modificaciones que pueda provocar la contaminación con bacterias productoras de fosfolipasa C.

Para la preparación de suero, la técnica correcta indica centrifugar la sangre dentro de un periodo de coagulación adecuado pero no excesivo, 2 horas a temperatura ambiente usualmente es suficiente.

Es conveniente realizar el análisis de los lípidos tan pronto como sea posible, para minimizar el intercambio de esteres de colesterol y triglicéridos entre las lipoproteínas de alta densidad y las otras lipoproteínas. Varios de estos procesos pueden ocurrir en forma simultánea y afectar los resultados.

Si las muestras serán analizadas en unos pocos días, es suficiente la refrigeración a 4°C, sin embargo, a esta temperatura también se produce la hidrólisis

espontánea de los triglicéridos y disminuye la nitidez de las bandas del lipidograma electroforetico. Por lo tanto, si se considera que la conservación será prolongada, las muestras de suero y plasma pueden congelarse a  $-60^{\circ}\text{C}$  o a  $-20^{\circ}\text{C}$ , excepto para el estudio de lipoproteínas por electroforesis.

Las muestras de suero o plasma conservadas deben ser mezcladas adecuadamente antes de su utilización.

Los lípidos en función de su densidad formaran capas y darán resultados diferentes según de que capa se tome la alícuota. La simple inversión del tubo no es suficiente, en particular si la muestra ha sido congelada, se deberá mezclar en un vortex durante 5 a 10 segundos. Es necesario prestar atención a las muestras con cantidades apreciables de quilomicrones “en reposo” se debe homogeneizar bien la muestra antes de procesarla para obtener resultados exactos. Si existe una quilomicronemia marcada, debe diluirse la muestra con solución fisiológica de modo que no se produzcan errores positivos debidos al exceso de macromoléculas.

## RECOMENDACIONES PARA MINIMIZAR LAS VARIACIONES PREANALÍTICAS

Las recomendaciones más destacadas de la NCEP para minimizar el efecto de los factores preanalíticos sobre las determinaciones de lípidos y lipoproteínas se presentan en el cuadro 4.2. Hay recomendaciones no específicas acerca de la determinación de apolipoproteínas. Sin embargo, se deberían seguir pasos similares para minimizar las fuentes de variación en las mediciones de apolipoproteínas.

El perfil de lípidos y lipoproteínas de un sujeto debería medirse solamente cuando el sujeto está en un estado metabólico estable.

Los sujetos deberían mantener su dieta y peso habituales por lo menos dos semanas previas a la determinación de sus lípidos y lipoproteínas.

Se deberían hacer múltiples determinaciones dentro de 2 meses, separadas al menos por una semana, antes de tomar una decisión médica sobre acciones más enérgicas.

Los sujetos no deberían hacer ejercicio físico vigoroso 24 horas antes de la prueba.

Para la determinación de colesterol total se pueden usar muestras en ayuno o no. Sin embargo, para TG y lipoproteínas se requieren muestras con 12 horas de ayuno.

Los individuos deben permanecer sentados por lo menos por 5 minutos antes de la toma de muestra.

El torniquete no debería mantenerse por más de 1 minuto durante la venopuntura.

Las concentraciones de CT, TG y C-HDL pueden determinarse en suero o en plasma. Cuando se utiliza EDTA como anticoagulante, el plasma debería enfriarse inmediatamente de  $2$  a  $4^{\circ}\text{C}$  para prevenir cambios en la composición, y los valores deberían multiplicarse por 1.03.

Para la determinación del CT, el suero debe transportarse a  $4^{\circ}\text{C}$  o congelado. El almacenamiento de la muestra a  $-20^{\circ}\text{C}$  es adecuado para la determinación de CT. Sin embargo, las muestras deben ser congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  o menos para la medición de TG, lipoproteínas y Apolipoproteínas.

Toda muestra de sangre debería considerarse como potencialmente infecciosa y manejarse como tal.

## **PERFIL LIPÍDICO**

El estudio de los lípidos sanguíneos se inicia con la determinación del perfil lipídico que incluye:

-Aspecto del suero

-Colesterol Total

-Triglicéridos

-Colesterol HDL

-Colesterol LDL

-Colesterol no HDL

-Índices de riesgo *aterogénico*:  $CT/CHDL$

$CLDL/CHDL$

$TG/CHDL$

### **ASPECTO DEL SUERO**

El aspecto del suero luego de 12 horas de ayuno puede ser: límpido, opalescente, turbio o lechoso.

En condiciones normales el aspecto del suero es límpido. Los fenómenos de turbidez son el resultado de la coexistencia de partículas de tamaño molecular, mayor de  $400 \text{ \AA}$  que logran difundir la luz reflejada. El informe de suero lechoso está hablando de la presencia de quilomicrones, mientras que los sueros turbios u opalescentes, por lo general, son la consecuencia del aumento de las VLDL. Un suero límpido no excluye la presencia de una hiperlipemia fenotipo II a.

De lo expuesto podría extrapolarse que el informe de suero opalescente, turbio o lechoso, podría ser sinónimo de aumento de triglicéridos. Generalmente lo es, pero es conveniente destacar algunas pocas ocasiones en las cuales se puede tener una discordancia en tal sentido.

La más común de ellas es la consecuencia de un mal ayuno, suero mal conservado (contaminación bacteriana), o muestra de plasma (el fibrinógeno puede producir turbidez).

La observación del aspecto del suero se realiza luego de 24 horas en la heladera y contra fondo oscuro.

### **COLESTEROL TOTAL**

El colesterol es un esteroide que se encuentra en todos los tejidos animales y cumple muchas funciones fisiológicas importantes, sin embargo, en los últimos años su medición se asocia con la relación que existe entre el colesterol y la aterosclerosis.

La determinación de colesterol total incluye la medición de las formas libres y esterificadas del esteroide. En el suero o en el plasma, dos tercios del colesterol total se encuentran como ester y el resto en forma libre. Esto tiene cierta importancia analítica ya que, en algunas reacciones químicas, el ester del colesterol desarrolla un color más intenso que el colesterol libre, lo cual puede provocar un sesgo positivo. En algunas reacciones enzimáticas, la hidrólisis de ester de colesterol de cadena larga es incompleta, lo que causa un sesgo negativo. Por estas razones es de suma importancia el conocimiento de la química de los diversos

métodos para colesterol y el reconocimiento de sus limitaciones en la elección del método que se empleará en el laboratorio. Con frecuencia debe encontrarse un equilibrio entre las características de simplicidad, rapidez, conveniencia, exactitud y precisión.

Los métodos para el dosaje del colesterol se clasifican en: métodos en una sola etapa, dos etapas, tres etapas y cuatro etapas.

En los métodos de una sola etapa no se requiere ninguna preparación de la muestra, se realizan con muestras de suero o plasma sin extracción previa con solventes. Son métodos sencillos y rápidos, requieren poca manipulación de la muestra y por lo tanto son fáciles de automatizar.

En los métodos en dos etapas se introduce una extracción con una fase orgánica, antes de la determinación del colesterol y de otros esteroides químicamente relacionados. Este pretratamiento elimina muchos cromógenos no específicos que pueden interferir con el ensayo, pero dado que no se incluye saponificación, persiste el efecto de la distinta respuesta de color entre el colesterol libre y el esterificado.

En los métodos en tres etapas se incluye, además de la extracción del colesterol, una saponificación que hidroliza sus ésteres, en consecuencia solo se mide colesterol libre. El método de Abell y col. pertenece a esta categoría y actualmente se lo considera método de referencia.

Los métodos en cuatro etapas incluyen otra etapa además de las anteriormente mencionadas. Los esteroides totales extraíbles son purificados mediante el agregado de la digitonina, la cual se une al hidroxilo del C3 del colesterol a través de una unión éster, precipitando el complejo. Los procedimientos en cuatro etapas serían más exactos que los anteriores, sin embargo a menos que se extremen las precauciones, las múltiples etapas también pueden significar múltiples errores.

Se han publicado cientos de métodos para análisis de colesterol, usualmente constituidos por modificaciones de las reacciones siguientes: 1) Liebermann-Buchard, 2) sal de hierro ácido, 3) ácido p-toluensulfónico y 4) enzimático de punto final. A continuación se comparan las condiciones de reacción del método de referencia y de los dos métodos más usados para la determinación del colesterol total.

Método	Clasificación	Preparación	Uso	Comentarios
1. Liebermann-Buchard (L-B)	De una, dos, tres o cuatro etapas	Extracción del colesterol que se hace reaccionar con un ácido fuerte (sulfúrico) y anhídrido acético formando ácido colestahexan-sulfónico coloreado (Amax 410 nm); el colesterol no esterificado es precipitado con digitonina y se mide el restante; el colesterol libre se calcula: Total-Esterificado=Libre	Muy común	La reacción de colesterol total sobreestima la concentración de colesterol esterificado. Color inestable
2. Abell y col.	Tres etapas	Extracción del colesterol con zeolita, hidrólisis química de los esteres (saponificación) y medición del colesterol total por la reacción de Liebermann-Burchard.	Considerado el método de referencia actualmente	Laborioso
3. Sal de hierro-ácido	Dos etapas	Condiciones de reacción similares al método 2 excepto que se agregan iones Fe <sup>+++</sup> para obtener un catión tetranílico Amax 563 nm	No muy usado	Sensibilidad siete veces mayor que la del método L-B. El colesterol libre y el esterificado dan el mismo color; no se requiere la hidrólisis de los esteres.
4. Acido p-toluensulfónico (p-TSA)	Tres etapas	Similar al método 3, p-TSA reacciona con el derivado del colesterol formando un cromóforo (Amax 550 nm)	Muy poco usado	El colesterol libre y el esterificado dan el mismo color. La bilirrubina causa un gran error positivo.
5. Enzimático de punto final	Una etapa	<p><b>a.</b> colesterol esterasa Esteres de colesterol-----colest + ac. grasos</p> <p><b>b.</b> colesterol oxidasa Colesterol + O<sub>2</sub>----- coles-4-en 3-ona + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></p> <p><b>c.</b> peroxidasa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + aminofenazona-----colorante oxidado (Amax 500 nm) + H<sub>2</sub>O</p>	Muy usado	Exacto y fácilmente automatizado. Futuro método de referencia.

## VALORES DE REFERENCIA

<b>COLESTEROL TOTAL</b>	<b>DESEABLE</b>	<b>ACEPTABLE</b>	<b>ELEVADO</b>
ADULTOS:	< 200 mg/dl	200-239 mg/dl	≥240 mg/dl
NIÑOS	<170 mg/dl	171-199 mg/dl	≥200 mg/dl

### **SIGNIFICADO CLÍNICO:**

Los estudios epidemiológicos en grandes grupos poblacionales han demostrado la importancia de la medición del colesterol total para la determinación de sujetos en riesgo. Su determinación es sencilla, relativamente económica y útil.

No presenta bimodalidad cuando se compara una población control con otra coronaria, su poder discriminador es bajo aunque el riesgo está fuertemente relacionado con el valor del colesterol total, para un determinado valor, el riesgo de infarto varía ampliamente, dependiendo de un gran número de factores.

Sin embargo, la fuerte asociación gradual y continua entre el colesterol y el riesgo de infarto de miocardio y por haberse demostrado los mecanismos fisiopatológicos de la hipercolesterolemia, se acepta actualmente como el principal factor de riesgo para la enfermedad coronaria.

## **TRIGLICÉRIDOS**

### **DISCUSIÓN METODOLÓGICA:**

La mayoría de los métodos actuales emplean procedimientos químicos o enzimáticos para determinar la concentración de glicerol proveniente de glicéridos, que luego se convierten en la concentración de masa equivalente a un triglicérido promedio (en mg/l). También se puede expresar la concentración en moles/l.

Recientemente, el análisis de triglicéridos ha sido simplificado por la introducción de métodos enzimáticos que han sido automatizados para proporcionar al laboratorio procedimientos rápidos, fáciles y directos.

#### **Corrección por la presencia de glicerol libre:**

Para obtener un nivel exacto de triglicéridos, debe restarse el glicerol libre presente en la muestra de glicerol total (el libre más el producido por la saponificación de los triglicéridos). Desde un punto de vista analítico el tener en cuenta este glicerol libre hace que los métodos sean engorrosos e inconvenientes. El análisis se debe realizar en dos partes (antes de la hidrólisis y después de ella) o separar los dos componentes del suero por extracción o posiblemente por partición con solventes.

Otra forma es corregir el valor de glicerol total mediante un cálculo simple. Según Eggstein se obtiene una corrección aceptable mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Triglicéridos (mMol/l)} = 0,088\text{mMol/l} + (0,828 \cdot \text{Glicerol total (mMol/l)})$$

Los factores de corrección que tienen en cuenta al glicerol libre son confiables en el caso de personas sanas normales.

- 1- Estrés (efecto de epinefrina).
- 2- Infusión de manitol.
- 3- Tratamiento con nitroglicerina.
- 4- Diabetes mellitas.
- 5- Tapón recubierto con glicerol en los tubos Vacutainer para flebotomía.
- 6- Ciertas enfermedades hepáticas.
- 7- Hemodiálisis por enfermedad renal.

En estos casos existe un riesgo cuando se calcula la concentración de triglicéridos libres usando factores de corrección, entonces se considera necesario el empleo de un blanco de glicerol para obtener valores reales de triglicéridos.

### **Determinación química del glicerol derivado de glicéridos:**

El **primer paso** consiste en la extracción de triglicéridos y la eliminación de sustancias interferentes. La extracción se lleva a cabo con solventes orgánicos que desnaturalizan las lipoproteínas y en consecuencia la disociación de los triglicéridos. Las sustancias interferentes se eliminan por: 1) partición con un solvente orgánico como nonato o hexano; o 2) empleo de adsorbentes como zeolita, ácido silícico o Florisil (silicato de magnesio activado). Los principales interferentes son: fosfolípidos y glucosa, junto con ciertos cromógenos y a veces glicerol libre.

En el **segundo paso** se hidrolizan los triglicéridos a glicerol y ácidos grasos y usualmente se lleva a cabo a temperaturas elevadas (saponificación):



En el **tercer paso** se oxida el glicerol a formaldehído:



En el **cuarto paso**, el formaldehído formado se mide según algunas de las siguientes reacciones:

- 1) Reacción de Eegriwe:  $\text{HCHO} + \text{ácido sulfúrico} \text{-----} \text{Cromóforo (540nm)}$

Uso: poco frecuente en laboratorios de rutina. Ampliamente usado como método comparativo.

- 2) Reacción de Schyver:  $\text{HCHO} + \text{fenihidrazina} \text{-----} \text{Cromóforo (540nm)}$   
 $\text{HCl}$   
Ferricianuro

Uso: poco frecuente.

3) Reacción de Pay:  $\text{HCHO} + 3\text{-metil-benzotiazona-2-ona} \xrightarrow{\text{Cromóforo (620nm) cloruro ferrico}}$

Uso: poco frecuente.

4) Reacción de Hantzsch: El formaldehído (HCHO) reacciona con acetato de amonio y acetilacetona y se lee por colorimetría y fluorometría. En la reacción de condensación de Hantzsch ocurre lo siguiente:

**HCHO + acetato de amonio + acetilacetona  $\xrightarrow{\text{3,5-Diacetil-1,4-dihidroludina}}$**

El producto final de color amarillo se mide por colorimetría a 412 nm o por fluorometría.

El método fluorométrico es el más usado y ha sido aplicado a procedimientos automatizados.

El método semiautomatizado para la determinación de triglicéridos ha sido estandarizado y certificado por los CDC para ser usado como método de referencia.

En resumen, en la determinación química de los triglicéridos se emplean los siguientes pasos:

- 1) Extracción de los triglicéridos, eliminación de sustancias interferentes.
- 2) Saponificación de los triglicéridos para obtener glicerol y ácidos grasos.
- 3) Oxidación del glicerol a formaldehído.
- 4) Medición del formaldehído.

### **Determinación enzimática del glicerol derivado de glicéridos:**

Los métodos enzimáticos están basados en la determinación del glicerol contenido en los triglicéridos luego de su hidrólisis (química o enzimático) para eliminar los ácidos grasos.

Actualmente se usan enzimas para catalizar la hidrólisis, esto permitió desarrollar métodos directos, rápidos y específicos. Los métodos usados frecuentemente en otros países son:

5) Consumo de NADH (se mide la disminución de absorbancia del NADH a 340 nm o bien fluorescencia disminuida a 460 nm luego de una excitación a 355 nm):

- a)  $\text{Triglicéridos} \xrightarrow{\text{lipasa}} \text{Glicerol y ácidos grasos}$   
 $\text{Proteasa}$
- b)  $\text{Glicerol} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Glicerol quinasa/Mg}^{++}} \text{Glicerol-3-fosfato} + \text{ADP}$
- c)  $\text{ADP} + \text{fosfoenolpiruvato} \xrightarrow{\text{Piruvato quinasa}} \text{ATP} + \text{piruvato}$
- d)  $\text{Piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{Lactato+NAD}^+}$

## Lactato deshidrogenasa

Este método es de uso muy frecuente en otros países.

6) Calorimétrico con formazan: se emplean los pasos a) y b) anteriores, luego los siguientes pasos:

Glicerol-3-fosfato + NAD<sup>+</sup>-----Dihidroxiacetona fosfato + NADH + H<sup>+</sup>  
Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa

diaforasa

NADH + tetrazoilo oxidado-----Tetrazoilo reducido  
(formazan coloreado que se lee a 500-590nm).

7) Fluorescente: es el método de referencia certificado por CDC). Se emplea el paso 5<sup>a</sup> y luego:

Glicerol + NAD<sup>+</sup>-----Dihidroxiacetona + NADH + H<sup>+</sup>  
glicerol fosfato deshidrogenasa

Diaforasa

NADH + H<sup>+</sup> + Rezarsurina-----Resorufina + NAD<sup>+</sup> (fluorescente). Se mide a 580nm luego de una excitación a 548nm.

8) Método GPO/PAP: (TG-color).

Uso muy frecuente en la Argentina

Se basa en la reacción del L-alfa-glicerol fosfato oxidasa sobre el glicerol-3-fosfato liberado de los pasos a y b del método 5:

Glicerol-3-fosfato + Oxígeno-----Dihidroxiacetona fosfato + peroxido de hidrógeno

En presencia de peroxidasa el peroxido de hidrogeno oxida al cromógeno que consiste en 4-aminofenazona y 4-clorofenol, formando una quinonamonoimina de color rojo. En este tipo de reacción de Trinder se lee la absorbancia a 500nm siendo proporcional a la concentración de triglicéridos y de glicerol libre en la muestra.

## MÉTODOS DE REFERENCIA Y DE ELECCIÓN

Hasta el momento no existe ningún método de referencia reconocido oficialmente para la determinación de triglicéridos. El método de Van Andel y Zilvermit y el de condensación de Hantzsch probablemente son los métodos comparativos más usados.

Un factor importante que afecta la exactitud de la determinación enzimática de los triglicéridos sericos es la hidrólisis completa de los triglicéridos por la triacilglicerol acilhidrolasa. Además no deben producirse reacciones interferentes durante la fosforilación del glicerol liberado por la glicerol quinasa y la oxidación del glicerol-3-fosfato por la L-alfa-glicerol fosfato oxidasa dihidroxiacetona fosfato con consumo equimolar de oxígeno y formación concomitante de peróxido de hidrógeno. Finalmente, es necesario determinar el contenido de glicerol libre en la sangre para obtener buena exactitud en la medición de triglicéridos.

## VALORES DE REFERENCIA

<u>Adultos:</u> valor Deseable	< 150 mg/dl
Límite	150 – 199 mg/dl
Alto	200 – 499 mg/dl
Muy alto	≥ 500 mg/dl

<u>Niños:</u> Valor Deseable:	< 110 mg/dl
Elevado	≥ 110 mg/dl

## SIGNIFICACIÓN CLÍNICA

En los triacilgliceridos (también llamados triglicéridos) cada grupo hidroxilo del alcohol glicerol está esterificado con un ácido graso. En el laboratorio clínico la medición de los triglicéridos en sangre se realiza principalmente por las razones siguientes:

- 1) Para calcular el colesterol unido a lípidos de muy baja densidad (VLDL-C) con el fin de estimar el colesterol unido a las lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) mediante la formula:

$$\text{LDL-C} = \text{colesterol total} - (\text{VLDL-C} + \text{HDL-C})$$

- 2) Como parte de una detección de lípidos o evaluación de factores de riesgo de coronariopatías.
- 3) Para determinar si los valores bajos de HDL-C se deben a una hipertrigliceridemia y definir el tratamiento en consecuencia
- 4) Para determinar el riesgo relativo de desarrollo de una pancreatitis aguda, atribuible a una hipertrigliceridemia.

- 5) Para confirmar que un xantoma eruptivo, lipemia retiniana y xantoma palmar son el resultado de una elevación de las lipoproteínas ricas en triglicéridos.
- 6) Para determinar si una hipertrigliceridemia secundaria es producida como efecto secundario cuando se emplean drogas antihipertensivas, hipocolesterolemicas (colestiramina, colestipol) y otras.
- 7) Como seguimiento para determinar la efectividad de la dieta, ejercicios o drogas para la hipertrigliceridemia (gentibrozil, clofibrato, ácido nicotínico) en el tratamiento para disminuir los niveles de triglicéridos. Es necesario regular la dosificación de las drogas según el nivel existente de triglicéridos sanguíneos.

Debe tenerse presente que existe una relación inversa entre los niveles de HDL-C y los de triglicéridos, y que el primero está asociado con el predominio de enfermedad coronaria. En consecuencia, es importante tratar la hipertrigliceridemia para normalizar el HDL-C.

## **COLESTEROL UNIDO A LIPOPROTEINAS DE ALTA DENSIDAD (HDL)**

### **DISCUSIÓN METODOLÓGICA**

Existen dos **formas directas** para medir las HDL:

1) Por ultracentrifugación analítica y 2) por aislamiento de la HDL y medición de las partículas por gravimetría. El primer método es más exacto y es considerado el método de referencia para la determinación de HDL y de otras fracciones lipoproteicas. El segundo método tampoco resulta práctico ya que la gravimetría insume mucho tiempo en comparación con otros métodos disponibles.

Para evitar algunos de estos problemas, la fracción HDL aislada no se mide en su totalidad. En cambio, se determina una fracción proteica o lipídica como medida indirecta de la HDL. Estas proteínas están constituidas por 50% de apoproteínas (AI y AII). Si bien los fosfolípidos son los constituyentes mayores, dado que el colesterol es más fácil de medir, ha prevalecido el análisis del HDL-colesterol como **método indirecto** para la determinación de la concentración de HDL.

Se conocen muchas técnicas para la determinación de HDL-colesterol, todas las cuales incluyen dos etapas: 1) aislamiento de la HDL y 2) determinación del colesterol en la HDL aislada. Los diversos métodos difieren principalmente en la forma de aislamiento de la fracción de HDL. En el laboratorio clínico se emplean actualmente los siguientes procedimientos para el aislamiento de HDL:

**-Ultracentrifugación preparativa** (método de referencia del CDC): El plasma o suero se ajusta a densidad 1063 g/ml con BrK y se centrifuga en el intervalo 1063 a 1210 g/ml. Se usa en laboratorios de investigación especializados.

**-Cromatografía en columna:** las HDL son aisladas y separadas en base a la carga (intercambio iónico) o al tamaño (permeación en gel). Se usa en laboratorio de investigación especializado. Poco usado.

**-Electroforesis en gel de agarosa:** el fundamento es igual al anterior. Usado con poca frecuencia. No se usa en clínica por su baja precisión.

**-Precipitación:** se emplean polianiones (heparina, dextransulfato, fosfotungstato, polietilenglicol) en presencia de cationes bivalentes para precipitar las LP más grandes, menos densas (LDL, VLDL) determinándose las HDL en el sobrenadante como HDL-colesterol. De uso frecuente. Método actual de elección.

**-Electroforesis en gel de poliacrilamida:** el fundamento es igual al método de electroforesis en bloque de almidón. Poco usado. Probablemente subestima los niveles de HDL.

**-Métodos Homogéneos:** son métodos colorimétricos sin precipitación. Fundamento: el agregado de una solución con polianiones produce la formación de complejos estables de las partículas lipoproteicas no HDL, luego las HDL son fragmentadas selectivamente por un detergente específico y luego sometidas a cuantificación mediante reacción enzimática.

Ventajas: automatizable. Escaso volumen de muestra.

Desventaja: alto costo.

## **VALORES DE REFERENCIA**

En adultos y en niños: mayor de 40 mg%.

## **SIGNIFICACIÓN CLÍNICA**

Actualmente se sabe que existe una relación inversa entre hipertrigliceridemia y la concentración de HDL, cuanto menor es la concentración de HDL mayor es el riesgo de enfermedad coronaria. La relación entre el número elevado de partículas ricas en triglicéridos (QM, VLDL e IDL) y un mayor riesgo de enfermedad coronaria probablemente se pueda atribuir a los niveles bajos de HDL.

Una información más útil se obtiene dividiendo LDL-C/HDL-C que muestra una mejor relación estadística con respecto al riesgo de enfermedad coronaria anterior.

Existen otros marcadores que podrían reflejar mejor la concentración de HDL por ejemplo los HDL-fosfolípidos o apoproteínas. Pacientes con infarto de miocardio tienen niveles comparativamente bajos de apo A1 y HDL2 o niveles altos de apo B.

Las HDL constituyen un grupo heterogéneo de macromoléculas, así se han identificado 3 subclases: HDL1, HDL2 y HDL3, de estas la HDL2 tiene importancia clínica desde el punto de vista de su asociación con el riesgo de enfermedad coronaria. Pero las relaciones entre las subfracciones (HDL2/HDL3 y HDL2/HDL-C por ejemplo) también son de utilidad en la evaluación del riesgo.

En resumen, a medida que el laboratorio clínico disponga de nuevos marcadores analíticos, la evaluación clínica del riesgo de enfermedad coronaria será más exacta e importante. Al aumentar la especificidad y sensibilidad de estos nuevos marcadores biológicos, se estimularán nuevas investigaciones para comprender mejor el metabolismo y papel fisiopatológico de estos componentes bioquímicos en el proceso vascular patológico.

## **LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD (LDL)**

La determinación del colesterol LDL (C-LDL) requiere la separación de las partículas de LDL de otras lipoproteínas séricas, seguido de la medición del colesterol en la fracción LDL.

El C-LDL puede ser medido por:

1- **Métodos de ultracentrifugación**: las lipoproteínas pueden ser separadas de otras proteínas plasmáticas y a la vez entre si mediante el empleo de ultracentrifugación a la densidad adecuada. Luego se calcula el colesterol unido a la lipoproteína. Este método es poco accesible, costoso y consume mucho tiempo. Se lo utiliza en laboratorios de investigación.

2- **Electroforesis cuantitativa de lipoproteínas**: requiere equipos especiales.

3- **Cromatografía en columna**: presenta dificultad para controlar adecuadamente las condiciones cromatográficas.

4- **Método analítico basado en la precipitación de las LDL**: fundamento del método: las lipoproteínas de baja densidad (LDL o beta-lipoproteína) se separan del suero precipitándolas selectivamente mediante el agregado de polímeros de alto peso molecular. Luego de centrifugar, en el sobrenadante quedan las demás lipoproteínas (HDL y VLDL); el colesterol ligado a las mismas se determina empleando el sistema enzimático colesterol Oxidasa/Peroxidasa con colorimetría según Trinder (Fenol-4-AF). Por diferencia entre el colesterol total y el determinado en el sobrenadante, se obtiene el colesterol unido a las LDL.

Este método es el que se utiliza en el laboratorio clínico por su rapidez y sencillez.

5- **Ecuación de Friedewald** :

$$C-LDL = CT - (C-HDL + TG/5)$$

La proporción triglicéridos: colesterol de una VLDL normal es alrededor de 5:1; el factor TG/5 es una estimación del C-VLDL.

Limitaciones del uso de la ecuación de Friedewald: puede utilizarse si el valor de concentración de triglicéridos es < 200 mg/dl. Con triglicéridos entre 200 y 400 mg/dl, la fórmula puede dar origen a valores distorsionados. Con triglicéridos superiores a 400 mg/dl, la fórmula no debe ser utilizada, siendo imprescindible el empleo de un método analítico. La precipitación selectiva con polivinilsulfato es el método más utilizado en los laboratorios clínicos. El uso de los métodos analíticos permite calcular el colesterol-VLDL (valor deseable ≤ 30 mg/dl), de mayor utilidad cuando la calidad de las lipoproteínas se aleja de una composición nativa.

6- **Métodos Homogéneos**:

Automatizable. Futuro método de referencia.

**Otros métodos**: Resonancia Magnética Nuclear (RMN) -Electroforesis en gel de concentraciones decrecientes-Tubos con Gel de Poliacrilamida-Técnica de Ultracentrifugación Vertical.

### **Valores de referencia**

**ADULTOS**: Óptimo < 100 mg/dl

Cercano al óptimo	100 – 129 mg/dl
Límite	130 – 159 mg/dl
Alto	≥ 160 mg/dl

### **NIÑOS**

Valor Deseable	< 110 mg/dl
Límite	110 - 129 mg/dl
Elevado	≥ 130 mg/dl

### **Comparación y análisis estadístico de los valores de col-LDL hallados analíticamente y por cálculo, en pacientes normolipémicos, hipercolesterolémicos e hipertrigliceridémicos**

	r	col-LDL (analítico)	col-LDL (cálculo)	DS	Error%
Normales	0.944 (p<0.001)	136±32	130 ±30	10	7.7
Tipo II a	0.817 (p<0.01)	220 ±32	215 ±25	14	6.5
Tipo IV	0.765 (p<0.01)	132 ±39	124 ±33	21	16.9

Coniglio. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.

### **Significado clínico**

La LDL transporta en condiciones normales aproximadamente el 70% del colesterol sanguíneo.

Esta lipoproteína es aterogénica por excelencia debido a sus condiciones estructurales:

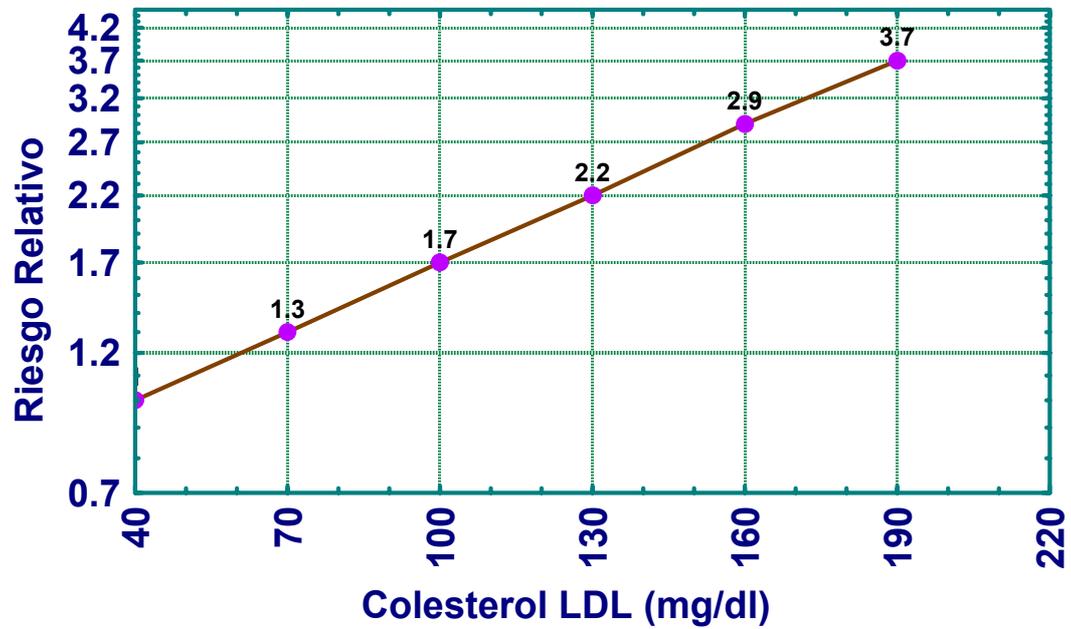
- pequeño tamaño molecular, que facilita su penetración en el endotelio arterial.
- gran contenido propio de colesterol.
- riqueza de apoB, lo que facilita su unión con el material intersticial de la pared arterial (glicosaminoglicanos y proteoglicanos).

Los estudios anatomopatológicos han demostrado fehacientemente que el colesterol de las placas ateromatosas proviene fundamentalmente del colesterol LDL.

Se ha demostrado que no solo el aumento de las LDL puede llevar a aterosclerosis sino también los desordenes del metabolismo de estas lipoproteínas, tales como el aumento de su flujo o cambios estructurales de la misma.

El C-LDL es, entonces, un factor causal y modificable para la aterosclerosis coronaria.

### Riesgo relativo de enfermedad coronaria según valores de C-LDL



Estudio HPS, Lancet 2002;360:7-22.

## **LIPIDOGRAMA:**

### **PRINCIPIOS DEL ANÁLISIS Y USO ACTUAL**

Durante la segunda mitad de la década de 1960 y toda la de 1970, la electroforesis de lipoproteínas se empleó comúnmente en el laboratorio clínico para contribuir a la clasificación de las diferentes formas de dislipoproteinemias. En los últimos años, su empleo ha disminuido y en realidad muchos laboratorios han suspendido este análisis para la caracterización de los trastornos que afectan a las lipoproteínas. Aproximadamente 80% de las hiperlipemias pueden ser categorizadas en forma exacta y con bajo costo, según las diferentes formas de dislipoproteinemias, mediante la interpretación del colesterol total y de los niveles de triglicéridos séricos junto con la observación del aspecto del suero o plasma en la prueba de refrigeración durante 16-18 horas. Si el suero o plasma refrigerados en estas condiciones presentan quilomicrones, que se visualizan por la presencia de una capa que flota sobre la superficie, el trastorno de las lipoproteínas puede clasificarse como una hiperlipoproteinemia de tipo I o V o, más raramente, del tipo III. Un suero opalescente o turbio luego de la refrigeración indica principalmente presencia de partículas de VLDL, lo que sugiere una hiperlipoproteinemia de tipo IIb, IV o V. Si se observan ambas condiciones, es decir una capa cremosa flotante sobre la superficie de un suero o plasma turbio, probablemente esta presente una hiperlipoproteinemia tipo V. Sin embargo, en alrededor del 25% de las muestras clínicas, en particular aquellas con una hiperlipemia limítrofe, resultará difícil de clasificar según este enfoque, sin un análisis bioquímico. Estas muestras requerirán una electroforesis o la determinación de LDL y HDL colesterol. En consecuencia, cuando se deben caracterizar las hiperlipemias que no pueden ser clasificadas según el esquema anterior, la electroforesis resulta muy útil. Esto es particularmente válido, por ejemplo, en los hipercolesterolémicos limítrofes en quienes se encuentran concentraciones séricas de colesterol de 250 a 275 mg/dl y HDL-C elevado (alrededor de 80-90 mg/dl). Una persona con estos niveles de colesterol aparentemente no corre riesgo de una enfermedad coronaria ya que si bien la concentración de colesterol total es elevada, la distribución de colesterol en fracción LDL puede ser considerada normal debido a que la fracción HDL contiene más colesterol que lo normal. Análogamente, si las concentraciones de colesterol y triglicéridos son elevadas y sus valores absolutos son semejantes, debe sospecharse una hiperlipoproteinemia de tipo III. En este caso, la electroforesis del suero o plasma constituye una forma rápida y conveniente de constatar la presencia de la banda beta ancha, característica de este tipo de hiperlipoproteinemias. Alrededor de 10 a 15% de las dislipoproteinemias observadas no se ajustan al sistema de clasificación de lipoproteínas de Fredrickson clásico.

La finalidad de la electroforesis es separar las fracciones principales de lipoproteínas en bandas relativamente homogéneas para poder evaluar en forma semicuantitativa y cualitativa el perfil lipoproteico completo. En la bibliografía citada puede encontrarse una revisión de la teoría y técnica de la electroforesis. En los estudios referidos a diferentes medios de soporte (papel, agarosa, agar, almidón, poliácridamida y acetato de celulosa) se aplican los mismos principios en los procedimientos

En consecuencia, para lograr una electroforesis de lipoproteínas exacta y reproducible deben controlarse los factores que afectan la migración de partículas en un campo eléctrico. Brevemente estos son:

1. *Carga neta de la molécula:* el PH debe ser controlado en forma exacta y reproducible para obtener un perfil lipoproteico adecuado con una óptima resolución de las bandas de lipoproteínas.
2. *Fuerza iónica y viscosidad.* los resultados mejores y más reproducibles requieren un buffer adecuado para el medio electroforético. Si bien los búferes con elevada fuerza iónica permiten la formación de bandas más definidas y mejores separaciones, la resolución puede ser afectada en forma adversa por un mayor calentamiento que desnaturaliza los solutos termolábiles.
3. *Intensidad del campo eléctrico.* Debe ser controlada en forma reproducible. Una intensidad de corriente demasiado elevada puede elevar la temperatura del medio de soporte causando la desnaturalización de las proteínas y una escasa migración y resolución.
4. *Tipo de medio de soporte.* este es uno de los factores más importantes en las separaciones de lipoproteínas. La carga del medio de soporte puede provocar un efecto endosmótico; en los medios donde la endósmosis es intensa, como en el gel de agar, estos efectos hacen que la lipoproteína-X de migración lenta sea arrastrada hacia el cátodo por detrás del punto de aplicación.

Dado que el elemento más crítico en la electroforesis de las lipoproteínas es el medio de soporte empleado, gran parte de la discusión siguiente se refiere a la comparación de distintos medios. Actualmente la mayoría de las electroforesis se realizan en geles preparados comercialmente y, en general, el más usado es el gel de agarosa. Si bien se presenta aquí una evaluación de otros medios de soporte, se destaca el gel de agarosa debido a su extenso uso.

**Papel:** aun es considerado el método convencional y clásico.

Ventajas: técnica útil para el estudio de muestras clínicas no usuales o muestras de animales. El factor tiempo no es muy crítico, las tiras secas pueden ser conservadas hasta que se decida su coloración. Básicamente simple. Revela desordenes poco usuales de las lipoproteínas. Es posible aplicar macro cantidades de suero. No es necesaria una decoloración.

Desventajas: insume mucho tiempo. Bandas no bien resueltas. Arrastre apreciable de lipoproteínas de muy baja densidad y quilomicrones cuando sus concentraciones son elevadas. Es sensible a las fluctuaciones de humedad y temperatura.

**Gel de poliacrilamida:**

Ventajas: flexibilidad. Buena separación y resolución de las bandas de lipoproteínas. Pueden ser empleados para estudios densitométricos. Permite la realización de micro método.

Desventajas: insume bastante tiempo. Resolución en demasiadas bandas.

**Acetato de celulosa:**

Ventajas: aplicable a micro métodos. Comparativamente rápido.

Desventajas: elevación falsa de pre-beta lipoproteínas. Elevada tinción del fondo y necesidad de aclararlo. Difícil conservación de las películas.

**Gel de almidón:**

La desventaja principal de este sistema es el tiempo requerido para preparar el gel.

### **Agarosa:**

Quince años después que Swahn describiera el empleo del papel como medio de soporte para la electroforesis de las lipoproteínas séricas se introdujo el empleo del gel de agarosa. El agar está compuesto por dos fracciones principales, agarpectina y agarosa. La primera contiene los grupos sulfato y carboxilo y es responsable de la considerable endósmosis y del color del fondo que presenta el agar no fraccionado. La agarosa purificada es esencialmente neutra y presenta muchos menos problemas que el agar. Con la aparición de las placas de gel comerciales, el uso de este medio se extendió considerablemente. Si bien el conocimiento básico de los perfiles electroforéticos en salud y enfermedad fueron adquiridos mediante la electroforesis en papel de filtro, el método con agarosa se desarrolló con fines analíticos, de investigación y clínicos para estudiar las lipoproteínas séricas en forma cualitativa y semicuantitativa. Este sistema separa la fracción de las prebeta-lipoproteínas con mejor resolución que otros sistemas electroforéticos y además, con frecuencia puede mostrar la presencia de múltiples bandas de prebeta-lipoproteínas que generalmente no se observan con otros medios de soporte, excepto el gel de poliacrilamida. Una persona bajo estrés puede tener niveles elevados de ácidos grasos libres debido al efecto epinefrina, que primero provocará una saturación de los sitios de unión de estos ácidos en la albúmina sérica y su fijación a las lipoproteínas. Esta fijación producirá un área difusa de tinción de lípidos (complejo albúmina- ácidos grasos libres) delante de la banda de alfa-lipoproteína. Cuando aparece una banda entre la prebeta-lipoproteínas y alfa-lipoproteínas se la designa “banda postalfa-lipoproteínas”. En animales se ha identificado esta banda lipoproteica como HDL, una lipoproteína semejante a las alfa-lipoproteínas con menor movilidad y diferente composición química (elevada cantidad de apolipoproteína E y de colesterol). Si la concentración sanguínea de ácidos grasos libres esta muy elevada (como se observa en pacientes que reciben soluciones intravenosas con heparina), las lipoproteínas se convertirán en las principales transportadoras de estos ácidos grasos, luego de la saturación de los sitios de unión en la albúmina. Esto provocará un aumento marcado de la movilidad de las lipoproteínas. Los Quilomicrones pueden complicar la interpretación de los perfiles de lipoproteínas, su eliminación por centrifugación permite una mejor resolución de las lipoproteínas restantes.

### **Gel de agar**

Una de las alteraciones lipídicas asociadas con enfermedad hepática es la presencia de hipercolesterolemia y de una lipoproteína sérica anormal denominada lipoproteína-X (Lp-X) en los pacientes con colestasis. La Lp-X está caracterizada por un alto contenido de fosfolípidos y de colesterol libre y muy baja proporción de proteínas. En la mayoría de los medios de soporte migra en el área de las beta-lipoproteína, sin embargo en el gel de agar al PH usual de 8,4 a 8.6, la Lp-X se mueve en dirección opuesta (hacia el cátodo). Basándose en este comportamiento peculiar es posible identificar la Lp-X mediante la electroforesis del suero en agar al 1% y posterior visualización por precipitación con polianiones o por coloración para lípidos.

## **INMUNOELECTROFORESIS E INMUNODIFUSIÓN RADIAL EN AGAROSA**

En caso de que se planteen dudas acerca de la exactitud de la identificación de una fracción lipoproteica, se aconseja en general realizar una inmunolectroforesis e identificar la fracción en cuestión mediante los antisueros apropiados, por ejemplo antialfalipoproteína, antibetalipoproteína o antisuero total. Es posible estudiar aún más las lipoproteínas mediante una doble inmunodifusión. Estos análisis indican si se ha producido una alteración en la composición o estructura de la apoproteína, es decir si hay una línea de identidad incompleta o parcial en comparación con la línea de identidad completa obtenida con estándares conocidos de apolipoproteínas.

### **AGAROSA**

#### **Ventajas**

**Conveniencia:** Si bien el gel de agarosa puede ser preparado en el laboratorio, la existencia de geles comerciales hace que este método sea muy conveniente.

**Rápido y Simple:** Una hora después de la aplicación de la muestra a la placa con agarosa, es posible obtener el perfil electroforético. Esta técnica además de ser rápida es muy simple y tiene la ventaja de ser microcuantitativa, requiriendo menos de 2 uL de muestra.

**Exacto y preciso:** El perfil lipoproteico en gel de agarosa es el que más se aproxima al obtenido con la ultracentrifuga analítica, que es el método de referencia para los estudios cuantitativos y cualitativos de las lipoproteínas. Además, la reproducibilidad intradía e interdías es muy buena, característica que lo convierte en un método ideal para el laboratorio clínico.

**Buena separación y resolución de las bandas de las principales lipoproteínas:** Este sistema separa claramente las prebeta-lipoproteínas de las beta-lipoproteínas con una buena resolución. Además, el sistema muestra en ocasiones múltiples bandas de prebeta-lipoproteínas que rara vez se las observa en papel.

**Movilidad:** Dado que este método es muy reproducible, puede ser empleado para medir las movilidades de las diversas fracciones de lipoproteínas. En muchas ocasiones se observan fracciones de lipoproteínas cuyas movilidades difieren de las estándar o convencionales; las bandas de prebeta-lipoproteínas y beta-lipoproteínas también pueden ser más rápidas o lentas. Clínicamente, algunos investigadores han asociado la prealfa-lipoproteína (área de las alfa-globulinas) con enfermedad coronaria. También se encontró cierta asociación de las subfracciones con lipoproteínas de baja densidad y de muy baja densidad detectadas por este método con las coronariopatías. Sin embargo, debe señalarse que se requieren nuevas investigaciones en esta área para emplear con seguridad estas bandas adicionales de lipoproteínas con distinta movilidad, con fines diagnósticos o pronósticos.

**Puede ser usado para estudios densitométricos de rastreo:** debido a su fondo relativamente claro, la agarosa resulta ideal para los estudios densitométricos que proporcionan una información semicuantitativa o una distribución porcentual relativa. Esto no debe ser confundido con los valores cuantitativos obtenidos por las técnicas de ultracentrifugación analítica o de cromatografía en columna. Las mezclas congeladas de suero usadas como estándares o para control de calidad, pueden ser estandarizadas frente al método por ultracentrifugación analítica para la determinación de los niveles de lipoproteínas. Luego es posible evaluar en forma

semicuantitativa las bandas de lipoproteínas separadas por electroforesis. De este modo se puede obtener un máximo de información a partir del método en agarosa, que proporciona rápidamente datos cualitativos y semicuantitativos.

### **Desventajas**

Necesidad de decoloración: el procedimiento de decoloración no es muy conveniente debido a los errores potenciales que puede provocar. Este paso requiere especial atención.

Quilomicrones: en ocasiones es difícil establecer la presencia de Quilomicrones. Esto es especialmente válido para los sistemas que emplean agarosa con cavidades premoldeadas. Si las muestras han quedado a temperatura ambiente durante varios días se producirá la degradación de las lipoproteínas, en particular de las partículas ricas en triglicéridos. Esto puede llevar a la formación de artefactos en el punto de aplicación que es posible confundir con quilomicrones. Cuando solo se encuentran trazas de quilomicrones en el suero puede ser difícil demostrar su presencia en el gel.

Tiempo de conservación limitado: dado que los geles comerciales son susceptibles a la deshidratación, el tiempo de conservación está limitado a 3 o 4 meses. Es posible detectar los efectos de la deshidratación examinando las esquinas de las placas antes de quitar la cubierta de Mylar que cubre los geles de agarosa.

### **MUESTRA**

Para llevar a cabo una determinación cuantitativa exacta de lípidos y lipoproteínas las muestras deben cumplir con una serie de condiciones que aseguren un análisis representativo. Con demasiada frecuencia la clasificación y el diagnóstico de una hiperlipoproteinemia se basa en una sola muestra defectuosa o no representativa debido a que no se cumplieron una o más de las siguientes condiciones de muestreo.

- 1- Ayuno de por lo menos 12 hs. antes de la extracción de sangre.
- 2- Dieta habitual durante por lo menos 3 semanas. Aconsejar no modificar la ingestión calórica, alcohólica o dietética para que la muestra sea representativa del paciente.
- 3- Peso estable o por lo menos no extraer muestras durante los cambios de peso, especialmente si se trata de pérdida de peso.
- 4- Ausencia de enfermedad aguda, traumatismo o cirugía reciente.
- 5- Diferir la extracción de muestra de un paciente con infarto de miocardio por lo menos 3 meses.
- 6- Diferir la extracción de muestras en individuos tratados con drogas que afectan los niveles de lípidos y lipoproteínas (tiroxina, corticoesteroides, andrógenos, hipolipemiantes y antihipertensivos).

## **LIPIDOGRAMA ELECTROFORÉTICO EN GEL DE AGAROSA**

Electroforesis de lipoproteínas: se reserva para las muestras de sueros hipertriglicéridémicos con el objeto de detectar la presencia de quilomicrones y sus remanentes,  $\beta$ -VLDL y aumento de VLDL. Su evaluación es cualitativa y/o semicuantitativa y debe ser analizado teniendo en cuenta los datos de triglicéridos y colesterol total.

Se procede según la técnica de Noble modificado.

#### Materiales y métodos:

1. Buffer-veronal-veronal sodico ph 8,6; 0,05 M

Disolver 10,3 g de veronal sódico; 1,34 g de veronal ácido en 700 ml de agua destilada, calentando, si es necesario, hasta disolución total, completar a 1000 ml con agua destilada.

2. Solución de agarosa al 0,6%.

Disolver 0,6 g de agarosa en 100 ml de buffer calentando hasta comienzo de ebullición, fraccionar en tubos y guardar en heladera durante 20 días.

3. Solución fijadora:

Colocar 670 ml de etanol + 15 ml de metanol + 15 ml de isopropanol y 300 ml de agua destilada. Estable durante 30 días a temperatura ambiente.

4. Solución colorante:

Disolver 0,4 g de sudan black, 4 g de acetato de zinc y 120 ml de etanol en 80 ml de agua destilada, dejar reposar y filtrar, durante 20 días a temperatura ambiente.

5. Soporte: Portaobjetos de 7 cm. x 2.6 cm. bien desengrasados.

6. Trozos de agujas de 0.9 mm de diámetro cortados en los extremos logrando 18 mm aproximadamente.

#### **Procedimiento:**

Sobre un portaobjeto colocar 1,8 ml de la solución de agarosa calentada a baño María. Inmediatamente colocar a 2 cm. del borde una aguja, antes que solidifique el gel. Esperar 5 a 10 minutos y retirar dicha aguja con un imán. En la canaleta así formada sembrar 8 a 10 ul de suero con micropipeta. Es conveniente colorear una de las muestras con azul de bromofenol para indicar el frente de corrida.

Se colocan los portaobjetos en la cuba electroforética, se colocan los puentes de papel de filtro previamente embebidos en buffer, durante 60 minutos a 200 voltios. Se detiene la corrida cuando el indicador azul de bromofenol se ha desplazado 4 cm desde el punto de siembra. Sumergir los portaobjetos en la solución fijadora durante 2 horas por lo menos. Retirarlos y cubrirlos con papel de filtro humedecido con agua y colocarlos en estufa a 70° media hora. Luego se sumergen los portaobjetos en colorante durante 2 horas. Lavarlos con agua y dejarlos secar. Se realiza una evaluación cualitativa del lipidograma.

#### Uso del material para control de calidad en la electroforesis de lipoproteínas

1. El material para control de calidad debe ser sometido a la electroforesis con cada placa. El perfil debe medirse a 500 nm.

2. Si la relación entre las áreas de la banda beta y de la banda alfa de la muestra para control de calidad excede el intervalo de  $\pm 2$  desviaciones estándar, repetir la electroforesis de toda la corrida.

3. Además, repetir electroforesis de todas las muestras que presenten artefactos de aplicación, velocidades de migración no usuales o discrepancias entre los valores de los lípidos y la intensidad de color de las fracciones.

4. Informar solo después que las muestras repetidas presentan resultados satisfactorios.

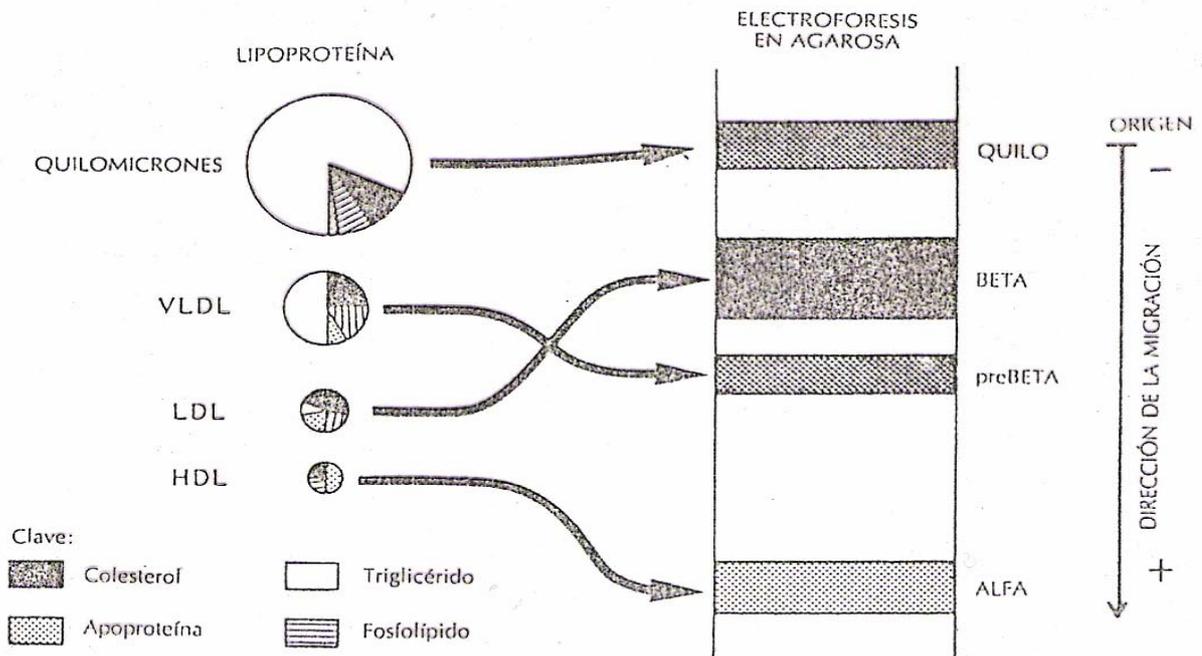


Fig. 58-10. Esquema de un patrón electroforético de lipoproteínas en un soporte de agarosa.

## INTERPRETACIÓN

Debe señalarse que en la interpretación de estos geles es necesario controlar las hiperlipoproteinemias observadas con los niveles de colesterol sérico total y triglicéridos. Cuando se emplea la clasificación de Fredrickson de hiperlipoproteinemias, la interpretación de los perfiles se basa en los siguientes criterios:

**Tipo I: hiperlipoproteinemia.** una fracción grande, que se tiñe con los colorantes para lípidos permanece en el punto de aplicación. Otras lipoproteínas se colorean con menor intensidad. Es un perfil muy poco frecuente. El suero del paciente presenta una lipemia marcada y una banda flotante de quilomicrones luego de permanecer 16-18 hs en el refrigerador. El resto del suero es transparente.

Existen dos condiciones que dan un perfil tipo I falso. La primera es una disglobulinemia. En este caso una gran parte de los lípidos está fijada a inmunoglobulinas (IgM). Debe realizarse la electroforesis de proteínas séricas en gel de agarosa para confirmar o excluir el diagnóstico de disglobulinemia. Si el resultado es positivo, se puede determinar el tipo de lipoproteína o lipoproteínas implicadas por inmunoelectroforesis. La segunda condición que puede dar un perfil falso es la delipidación de lipoproteínas. Algunas drogas actúan como agentes de delipidación lo que da lugar a perfiles que dan confusión. Es imperativo confirmar que la muestra ha sido extraída con el paciente en ayunas (durante 12 hs.) antes de clasificar el perfil electroforético ya que la hiperquilomicronemia también es inducida por la ingestión de alimentos. La prueba definitiva que puede ser empleada para confirmar una hiperlipoproteinemia tipo I es la determinación de la actividad lipa-

sa post-heparina (PHLA). En contraste con la hiperlipoproteinemia tipo V, la PHLA es nula o muy reducida en la verdadera hiperlipoproteinemia tipo I.

**Tipo IIa. Hipercolesterolemia.** En esta condición existe una concentración elevada de beta-lipoproteína y normal de prebeta-lipoproteínas. La concentración de alfa-lipoproteínas es normal o, en ocasiones, levemente reducida. El valor calculado para LDL-colesterol debe ser mayor que el 75 percentilo. Este trastorno es relativamente común.

**Tipo IIb: Hipercolesterolemia con triglicéridos elevados.** Este tipo de hiperlipoproteinemia es común. Además de una concentración elevada de beta-lipoproteínas, también está aumentada la de prebeta-lipoproteínas. No se encuentran quilomicrones y la banda de las alfa-lipoproteínas es normal o está levemente disminuida. En las muestras no extraídas en ayunas, no puede diferenciarse entre los perfiles del tipo IIa y IIb.

**Tipo III: hipercolesterolemia con hipertrigliceridemia.** Los niveles de colesterol total y triglicéridos se encuentran en la relación 1:1. Usualmente no se observan quilomicrones. Las beta-lipoproteínas, presentes en concentración elevada forman una banda ancha que posee una mayor movilidad que las beta-lipoproteínas comunes. La separación entre las bandas de beta-lipoproteínas y de prebeta-lipoproteínas no es buena debido al aumento de la concentración de lipoproteínas anormales de densidad intermedia (que carecen de apolipoproteína E). Estas lipoproteínas anormales migran entre las bandas de beta y prebeta-lipoproteínas. Antes de un diagnóstico final de hiperlipoproteinemia tipo III deben realizarse otras pruebas confirmatorias.

**Ultracentrifugación preparativa.** El plasma o suero debe ser separado por ultracentrifugación preparativa a una densidad de 1,006 g/mL. Las fracciones superior (VLDL e IDL anormal) e inferior (LDL y HDL) deben ser sometidas nuevamente a una electroforesis para detectar la presencia de “lipoproteína beta flotante” o de VLDL “beta – migrante” que es la IDL anormal. Deben determinarse los valores de colesterol y triglicéridos de ambas fracciones y calcular su relación. Esta relación es anormal si:

Col VLDL/TG= menor a 0,3.

Col VLDL/Tg VLDL = menor a 0,35.

Si estas relaciones son anormales y la fracción lipoproteica superior (densidad 1,006g/mL) presenta una banda de VLDL beta-migrante el perfil se designa hiperlipoproteinemia tipo III.

**Ultracentrifugación analítica.** El suero se prepara a una densidad de 1.21g/mL y el sobrenadante se estudia en la ultracentrifugación analítica. Si el perfil de flotación muestra una concentración elevada de la fracción Sf 40-70 es muy posible que se trate de un perfil tipo III. Esta fracción anormal de lipoproteínas (IDL) tiene una concentración de colesterol desproporcionadamente alta.

El verdadero perfil tipo III presenta un nivel elevado de VLDL-colesterol, relaciones anormales y VLDL beta migrante.

**Tipo IV: hipertrigliceridemia.** Se encuentran prebeta-lipoproteínas elevadas junto con una fracción normal o baja de beta-lipoproteínas. En ocasiones la movilidad de las beta lipoproteínas es mayor que la normal. Usualmente las alfa-lipoproteínas están disminuidas. No se encuentran quilomicrones. Si la concentración de triglicéridos séricos llega a 200 o 300 mg/dl puede designarse como tipo

IV leve. El paciente debe encontrarse en completo ayuno (durante 12 hs.), de lo contrario los perfiles tipo IV y V son difíciles de diferenciar.

**Tipo V: Hiperlipidemia con Quilomicronemia.** Usualmente están elevados los quilomicrones, beta-lipoproteínas y prebeta-lipoproteínas. En algunos casos los niveles de triglicéridos pueden ser mayores de 10.000 mg/dl. La concentración de colesterol total también puede estar elevada. La presencia de una banda flotante en el suero conservado a 4°C constituye una identificación positiva de la existencia de quilomicrones. El aspecto del resto del suero varía desde muy opalescente a turbio, debido a la presencia de prebeta-lipoproteínas. Dada la existencia de una banda de quilomicrones, la electroforesis de las proteínas séricas en gel de agarosa permitirá la detección de complejos anormales globulina-lipoproteína.

### **RESUMEN**

Los perfiles de los tipos mencionados pueden encontrarse en forma aislada o en diversas combinaciones. Muchas veces el perfil resulta limítrofe entre dos clasificaciones siendo difícil incluirlo en uno de los tipos. Este problema se presenta en 10% de las muestras.

Fenotipo	Electroforesis	Carácter de la elevación de la lipoproteína	Colesterol total en el plasma	Triglicéridos totales en el plasma	Aspecto del plasma en el plasma	
I		Quilomicrones	Normal a moderadamente elevado	Muy elevados	Capa cremosa por encima de un infranadante claro o ligeramente turbio	
IIb		LDL	Elevado	Normales	Claro, puede presentar un mayor tinte amarillo anaranjado	
IIb		LDL VLDL	Elevado	Moderadamente elevados	Entre ligera y moderadamente turbio	
III		$\beta$ VLDL, LPI de composición anormal	Elevado	Entre moderada e intensamente elevados	Capa cremosa turbia a francamente opaca por encima de un infranadante turbio ocasionalmente presente	
IV		VLDL	Normal a ligeramente elevado	Moderada a intensamente elevados	Turbio o francamente opaco	
V		Quilomicrones VLDL	Moderadamente elevado	Muy elevado	Capa cremosa sobre infranadante turbio a opaco	

## **LIPOPROTEÍNA DE DENSIDAD INTERMEDIA (IDL)**

La IDL es una partícula transitoria, usualmente presente en concentraciones muy bajas en el plasma de personas en ayuno. Es una lipoproteína derivada del catabolismo de las VLDL. Las IDL sufren una hidrólisis posterior en la cual la mayoría de los triglicéridos remanentes son removidos y todas las apoproteínas, excepto la Apo B, se pierden.

La partícula resultante, que contiene casi exclusivamente ésteres de colesterol en el núcleo y Apo B en la superficie, es la LDL.

### **Técnica cuantitativa**

#### **Materiales:**

- 1- Solución Buffer Veronal-Veronal sodico pH 8,6: en un matraz disolver 10,3 g de Veronal sodico, 1,34 g de Veronal ácido con 500 ml de agua destilada, colocar en el baño a 37°C hasta su disolución, luego enrasar a 1000 ml.
- 2- Solución de agarosa al 1%: en un matraz aforado de 100 ml, colocar 1 g de agarosa y enrasar con el Buffer, calentar a baño Maria hasta su disolución completa. Fraccionar en tubos, tapar y conservar en heladera a 4°C.
- 3- Solución precipitante: disolver heparina (250.000 UI), 2,0 g de MgCl<sub>2</sub> y 1g de NaCl en 100 ml de agua destilada. Se prepara en el momento de utilizar.

#### **Procedimiento:**

Sobre un portaobjeto desengrasado y seco, se coloca una gota de solución de agarosa al 1% disuelta, esparcirla por toda la superficie con el dedo y dejar secar. Con 3,5 ml de la solución de agarosa se cubre un portaobjetos, a 1 cm. del borde se realiza una canaleta rectangular colocando un cilindro de 9 mm de largo por 3 mm de diámetro. Luego que la agarosa se solidifica se retira el cilindro y se colocan 50 ul de suero, previamente mezclado con azul de bromofenol. Se realizan 3 placas por paciente.

Se realiza la corrida electroforetica utilizando puentes de papel de filtro sumergidos previamente en el Buffer.

Condiciones de la corrida: 5 mA por portaobjetos durante 150 minutos.

Finalizada la corrida sumergir los portaobjetos en la solución precipitante hasta el día siguiente.

Se visualiza la presencia de un precipitado en la zona beta, que corresponde a las lipoproteínas de densidad menor a 1019 gr/ml (IDL o beta-VLDL, en caso de que estén presentes), se mide la banda de precipitación.

Se lavan los tres portaobjetos con el Buffer, dos veces durante 10 minutos y una tercera vez durante 6 horas como mínimo. A continuación, se realiza la segunda corrida electroforética en las mismas condiciones que la primera, con lo que se logra separar las IDL (que permanecen precipitadas en la zona beta) de las LDL que migran hacia el ánodo.

Para la cuantificación del colesterol IDL se cortan las bandas precipitadas en los tres portaobjetos y se sumergen en un tubo de ensayo con 2 ml de agua destilada. Se calienta a baño Maria hasta disolución, luego se enfría a 50°C y se agregan 2 ml de FeCl<sub>6</sub>.H<sub>2</sub>O (en una concentración de 250 mg/lit en ácido acético gla-

cial) y 2 ml de ácido sulfúrico concentrado por las paredes del tubo, homogeneizar por inversión y se deja en reposo 30 minutos. Se mide la absorbancia a 540 nm.

Blanco de reactivo: 1 ml de butanol, 2 ml FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O y 2 ml de ácido sulfúrico concentrado.

### Cálculos:

Absorbancia estándar \_\_\_\_\_ 0,051  
Absorbancia muestra \_\_\_\_\_ X

0,075 ml \_\_\_\_\_ X  
100 ml \_\_\_\_\_ concentración C-IDL mg/dl

### **Valores de referencia:**

En adultos mayores de 20 años:

Hasta 10 mg/dl (en Posadas).

Hasta 12 mg/dl (en Buenos Aires).

### **Significado clínico**

La IDL se depura normalmente dentro de las 6 horas de la ingesta y habitualmente no se encuentra en sangre luego de un ayuno de 12- 14 horas.

Las IDL y/o beta-VLDL son lipoproteínas ricas en colesterol, que se asocian a arterosclerosis humana y experimental.

Esta técnica nos permite evaluar las concentraciones de estas lipoproteínas aterogénicas en controles normolipémicos, en pacientes con distintos fenotipos de dislipemia y en mujeres posmenopáusicas y diabéticos, en los cuales el riesgo de padecer patología cardiovascular está incrementado.

En la fenotipificación de las dislipemias, la IDL no participa como criterio diferencial, salvo en la hiperlipemia de tipo III, donde su elevación constituye unas de las marcas patognomónicas (con valores mayores a 100 mg/dl).

En mujeres posmenopáusicas (normolipémicas o dislipémicas) la elevación de C-IDL, se puede asociar a la mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares.

Tatami y colaboradores hallaron una frecuencia de cardiopatía mayor en las mujeres que presentaban una concentración plasmática de IDL mayor a 17 mg/dl, aun cuando el C-LDL fuera menor de 120 mg/dl.

En el paciente diabético, aún tratado, el tiempo de residencia en el plasma de la IDL y su nivel plasmático podrían aumentar por diferentes razones:

En diabéticos tipo I: por disminución de su catabolismo.

LH  
IDL \_\_\_\_\_ LDL (La LH es regulada por la insulina)

En diabéticos tipo II: la IDL puede aumentar por dos razones:

1- Aumento de síntesis de VLDL, saturando la vía metabólica.

2- La IDL conserva ApoC, lo que impide el reconocimiento celular y su catabolismo (por impedimento estérico).

#### **¿A QUIÉNES SE LES ESTUDIA IDL?**

Pacientes con diferentes fenotipos de dislipidemia, fundamentalmente en la Hiperlipemia fenotipo III, en mujeres posmenopáusicas y en diabéticos tipo 1 y 2.

#### **DISTRIBUCIÓN DE LOS VALORES DE C-IDL EN NORMOLIPEMICOS Y EN DISTINTOS FENOTIPOS DE DISLIPEMIA**

Schreier, L. Acta. Bioq. Cli. Lat. 27 (1) 1993

<b>Fenotipo</b>	<b>n</b>	<b>Col-IDL (mg/dl)</b>	<b>DS</b>
<b>NL</b>	<b>99</b>	<b>8.8</b>	<b>6.5</b>
<b>II a</b>	<b>40</b>	<b>12.3</b>	<b>8.3</b>
<b>II b</b>	<b>20</b>	<b>16.4</b>	<b>7.9</b>
<b>III</b>	<b>10</b>	<b>64.6</b>	<b>28.6</b>
<b>IV</b>	<b>10</b>	<b>22.6</b>	<b>11.6</b>
<b>V</b>	<b>2</b>	<b>19.2</b>	<b>3.2</b>

#### **APOLIPOPROTEINAS A Y B**

##### **Principios de la determinación y uso actual**

Es necesario contar en el laboratorio con indicadores de riesgo de aterosclerosis coronaria que sean fácilmente determinables con tecnologías sencillas, con buen poder predictivo, con capacidad discriminante a nivel individual y que tenga correlación con la presencia y severidad de la afección.

- Apolipoproteína B: junto con otros parámetros es fundamental para la identificación de la hiperapobetalipoproteinemia y de la hiperlipemia familiar combinada. Posee un elevado valor pronóstico que en ciertos grupos etáreos supera al colesterol-LDL. Los métodos recomendados son la Inmunoturbidimetría y la nefelometría automatizadas. El valor de referencia es 70 – 130 mg/dl.

- Apolipoproteína A-I: su medida no supera la utilidad diagnóstica del colesterol-HDL. Los métodos recomendados son la Inmunoturbidimetría y la nefelometría automatizadas. El valor de referencia es > 120 mg/dl.

### Determinación cuantitativa: Aspectos Metodológicos

No es estricto el ayuno de 12 horas.

Principalmente se dosa Apo B100.

Es automatizable.

Se conocen los valores de corte.

Tiene patrón de referencia internacional (IFCC) aceptado por la OMS.

Estabilidad de la ApoB en suero: hasta 60 días a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Se ha empleado **radioinmunoanálisis** en ensayos de fijación competitiva, la apolipoproteína purificada y marcada con I compete por la unión con un anticuerpo específico. En estos ensayos para separar el antígeno fijado del libre se emplea precipitación con dos anticuerpos, precipitación con polietilenglicol (PEG) y técnica en fase sólida. El IRA es la técnica más usada para medir las apolipoproteínas en forma individual.

La técnica de **electroinmunoanálisis** también es muy usada. En ella se coloca una muestra tratada en una placa de agarosa que contiene anticuerpos dirigidos contra las apolipoproteína que se desea determinar. La placa se coloca en un campo eléctrico que hace migrar a las apolipoproteínas en la agarosa, las cuales reaccionan con el anticuerpo dando una banda de precipitación (“coquete”) cuya altura es directamente proporcional a la concentración de la apolipoproteína.

En la **inmunodifusión radial** se realizan reacciones de punto final que pueden tardar 2 a 4 días. El cuadrado del diámetro del anillo de precipitinas formado es directamente proporcional a la concentración de apolipoproteínas.

En los **ensayos Nefelométricos** las muestras diluidas se mezclan con el antisuero específico formando inmunocomplejos que causan un aumento de la dispersión de la luz y que se miden mediante el nefelómetro.

### Comparación de métodos:

El IRA puede ser considerado como posible método de referencia debido a su alta sensibilidad y a la ausencia de interferencias del suero, pero el tiempo, el trabajo requerido y la infraestructura necesaria lo hacen poco adecuado para el uso de rutina y epidemiológico.

Los ensayos inmunonefelométricos pueden ser considerados métodos de elección para la determinación de apolipoproteínas. Grandes cantidades de quilomicrosomas o VLDL pueden causar una señal de fondo elevada y dar resultados incongruentes. El coeficiente de variación es del 7%.

La IDR es simple, requiere una inversión mínima de capital, un factor limitante para esta técnica es la capacidad reducida de las grandes moléculas para difundir en el gel de agar. El coeficiente de variación es del 5 al 10% en el rango normal.

La inmunoelectroforesis es relativamente simple, requiere cantidades grandes de antisueros con títulos relativamente elevados y no puede ser automatizada. El coeficiente de variación es bajo pero no tiene reproducibilidad. Debe realizarse una curva de calibración con por lo menos tres puntos por placa.

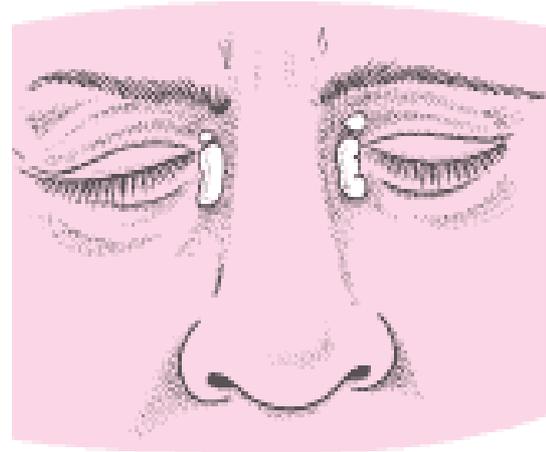
El ELISA es de gran sensibilidad, solo hay para Apo AI y Lpa, es fácil de hacer. Se puede automatizar si se trabaja con marcadores como Peroxidasa, Fosfatasa Alcalina y finalmente una reacción calorimétrica.

En nefelometría y turbidimetría se observan los coeficientes de variación más bajos. Pueden ser automatizados siendo un inconveniente la presencia de turbidez en las muestras.

Las muestras para Apo AI son estables durante 1 año a  $-50^{\circ}\text{C}$ .

Para medir apolipoproteínas se utilizan métodos inmunológicos. Los componentes apoproteicos de cada uno de las LP en los distintos individuos, tienen distintas posibilidades de reaccionar con los anticuerpos en una misma muestra. Por otro lado, el inconveniente es buscar un estándar que realmente tenga la misma actividad del plasma que se dose. Los estándares son soluciones de Apoproteinas puras. El único estándar que utiliza la Lipoproteína entera es la LDL para medir Apo B ya que la misma no es soluble en medio acuoso. Otro factor a tener en cuenta es la calidad del Anticuerpo que se utiliza, que depende del método de aislamiento y su purificación

¿A quié- nes dosar Apo B?	Normolipémicos con antecedentes personales
	Familiares de pacientes con Enfermedad Cardíaca Coronaria.
	Pacientes con Hipertrigliceridemia.
	Personas con Xantelasmas.



Ventajas para la detección de sujetos en riesgo

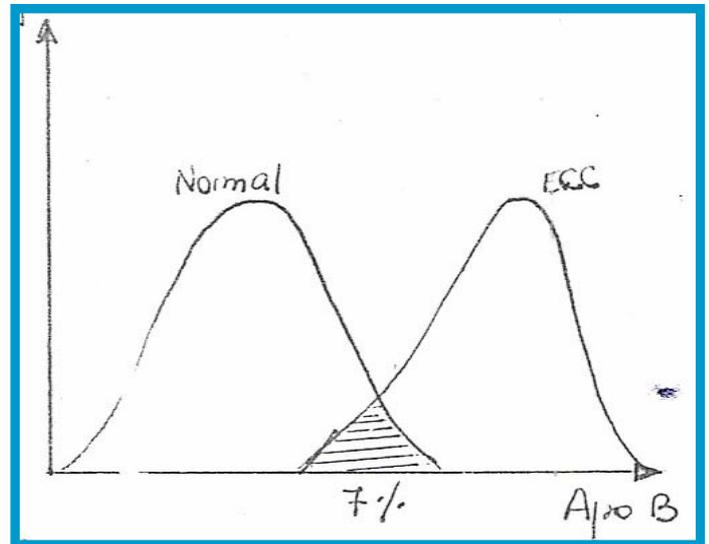
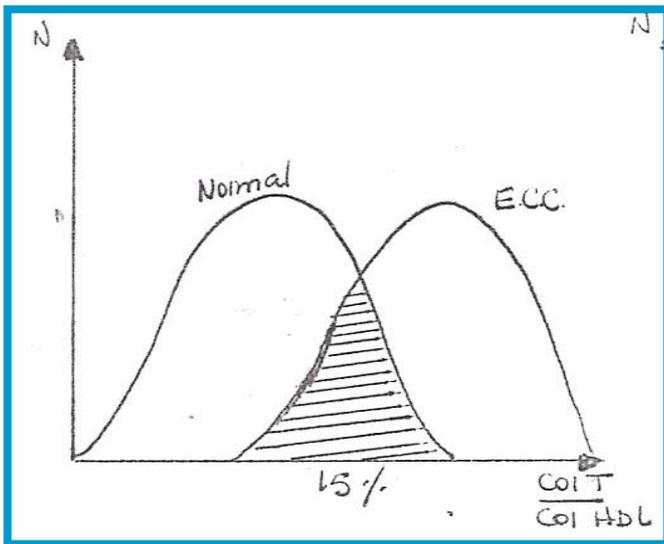
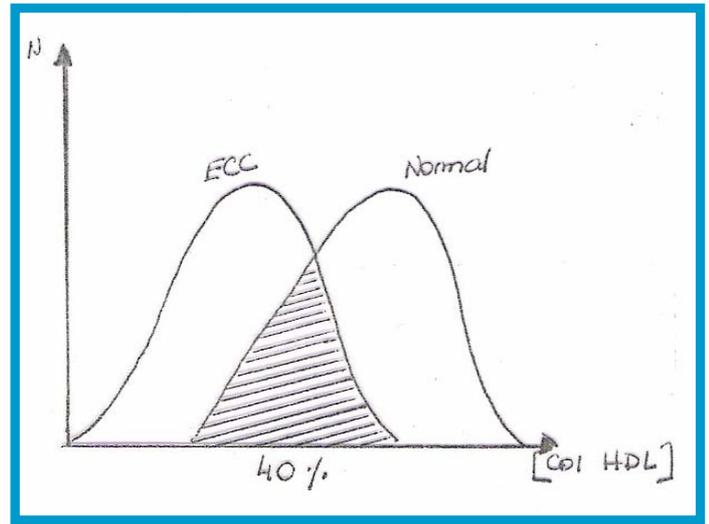
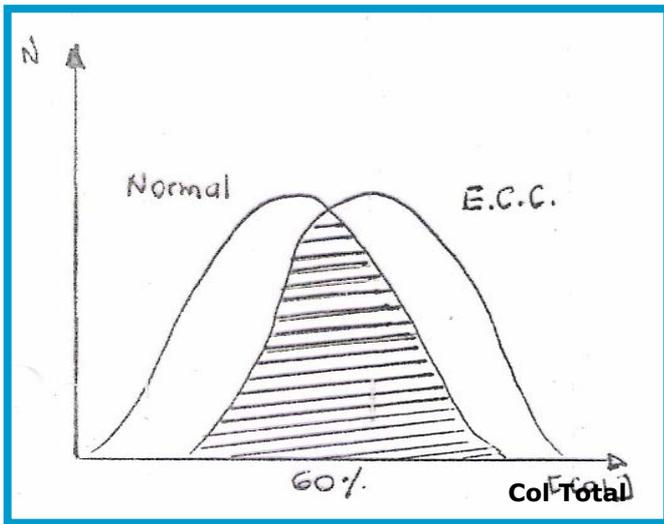
Es un marcador de lipoproteínas aterogénicas (VLDL, IDL, LDL). Aumenta en presencia de LDL pequeñas.

Las Hipertrigliceridemias con ApoB aumentada son muy aterogénicas.

Está codificada genéticamente.

Aumenta en hijos de padres con IAM.

Mejor poder discriminante que los lípidos.



### Determinaciones lipídicas y lipoproteicas complementarias

#### Colesterol-no HDL:

Representa el colesterol de las lipoproteínas que contienen apolipoproteína B (VLDL, IDL, LDL y Lp(a)), las cuales son consideradas aterogénicas. Es un parámetro secundario para la decisión del tratamiento de pacientes con triglicéridos  $\geq 200$  mg/dl. La determinación del colesterol-no HDL no requiere imprescindiblemente ayuno de 12 horas. Se calcula a partir de la diferencia entre el colesterol total y el colesterol-HDL. El valor de referencia depende de la categoría de riesgo definida en base al colesterol-LDL (colesterol-LDL + 30 mg/dl).

$$\text{Col no HDL} = \text{Col Total} - \text{Col HDL}$$

## **BIOMARCADORES EMERGENTES PARA LA ATEROSCLEROSIS**

### **Lp (a)**

La Lp (a) es una lipoproteína similar a la LDL a la cual se le une la apoproteína (a) que es estructuralmente similar al plasminógeno. La apoproteína (a) es una proteína glicada que se une a la apoproteína B de la LDL por puentes disulfuro. Se sintetiza en el hígado y se internaliza a partir de Rc B-E, este mecanismo depende de la Apo(a) (proteína grande y glicosilada) que permanece más tiempo en circulación y puede internalizar por mecanismos no deseados. Si se produce una injuria en el endotelio tiene la posibilidad de atravesar y formar complejos con la matriz de la intima, con proteínas como glicosamino glicanos, proteoglicanos, malondialdehído. La Lp(a) es una lipoproteína que une los dos territorios: aterogénico y trombótico. Se le atribuye poder trombótico por la similitud del kringle 4 al plasminógeno. La estructura primaria de estos kringles se conoce perfectamente y el 80% se homologa al plasminógeno. La secuencia terminal es una serina proteasa. De acuerdo al número de kringles va a ser su tamaño, a mayor número de kringles mayor heterogeneidad de tamaño (400-800 kda).

Esta lipoproteína fue descubierta hace 40 años por But y cobró importancia al poder ser cuantificada y utilizada como marcador de riesgo aterogénico. Si bien existe en todos los individuos, las concentraciones están determinadas genéticamente, el 80% de la concentración que se mide es información genética que puede variar por diferentes situaciones ambientales, fisiológicas o patológicas, por ejemplo, un diabético con complicaciones tiene una Lp(a) más alta que un diabético sin complicaciones y que los normales.

La concentración va de 0-150 mg/dl. La bibliografía considera como punto de corte como factor de riesgo independiente una concentración mayor a 30 mg/dl.

La elevación concentraciones mayores de 30 mg/dl en la concentración plasmática de Lp (a) ha sido reconocido como un factor de riesgo independiente asociado con enfermedad coronaria prematura. Se ha postulado que la Lp (a), además de participar en la aterogénesis, pues ha sido identificada en lesiones ateroscleróticas, parece que también interfiere con la fibrinólisis, por su similitud estructural con el plasminógeno. En pacientes con hipercolesterolemia familiar, cuya anomalía consiste en un catabolismo defectuoso de las LDL, la concentración de Lp (a) podría estar aumentada, debido a su parecido con la LDL, se podría pensar que comparten los mismos mecanismos catabólicos.

#### Resumiendo:

Se la considera como un factor de riesgo independiente para la aterosclerosis; tiene un poder predictivo similar a la Historia Familiar.

Es aterogénica y pro-trombótica.

Existen problemas metodológicos para estandarizar el método debido a la gran heterogeneidad de la apolipoproteína (a), lo cual genera inexactitud en la medición.

La concentración en el plasma de Lp(a) depende de la medida de la isoforma de apo (a); cuanto más pequeña sea apo (a), mayor será la concentración plasmática de Lp(a).

### MÉTODOS DE MEDICIÓN DE Lp(a):

**Inmunoensayo Enzimático:** con Ac policlonales, fue el primero.

**ELISA monoclonal:** inconvenientes: el estándar no cubre todas las isoformas, tiene error sobre todo en los lavados.

**RIA:** es sensible pero hay que tener el laboratorio adaptado.

**Inmunodifusión Radial:** (IDR): tiene mucho error por las diferencias de tamaño de la Lp(a). Cuando el paciente tiene isoformas de gran tamaño la concentración está subestimada y cuando tiene formas pequeñas se sobreestima ya que estas atraviesan más el gel y se miden en mayor concentración.

**Electroforesis para lipoproteínas:** (Hidrogel) no es útil para fenotipificar lipoproteínas pero sí para observar Lp(a). Por densitometría se podría medir la concentración.

**Turbidimetría (Inmunoturbidimetría):** coeficiente bajo. Sueros opalescentes pueden interferir.

**Electroinmunodifusión:** el más usado.

En un gel de Agarosa la Lp(a) aparece entre las bandas alfa y pre beta, existe un 89% de posibilidades que cuando la banda aparece en el Lipidograma el paciente tiene aumentada la Lp(a) (mayor a 30 mg/dl) por lo tanto el Lipidograma posee valor predictivo positivo del 89%.

Cuando la concentración es < de 20 mg/dl no se observa la banda.

### ***¿A quiénes se recomienda la medición de Lp(a)?***

Pacientes con aterosclerosis prematura.

Pacientes con historia familiar fuerte de Enfermedad Coronaria prematura.

Pacientes con col-LDL elevado y con 2 o más factores de Riesgo.

Pacientes que han tenido una angioplastia coronaria, en los cuales el exceso de Lp(a) puede aumentar el riesgo de restenosis.

Pacientes que han tenido cirugía bypass o puente arterial coronario con injerto, en los cuales el exceso de Lp(a) puede estar asociado a una estenosis del injerto.

### **VALORES DE REFERENCIA:**

Nivel deseable: < 20 mg/dl.

Riesgo elevado limítrofe: 20-30 mg/dl.

Riesgo elevado: 31-50 mg/dl.

Riesgo muy elevado: > 50 mg/dl.

Niveles por encima de 30 mg/dl incrementan en dos veces el riesgo relativo para desarrollar Enfermedad Aterosclerótica.

## **BIBLIOGRAFÍA**

ATPIII. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 2001; 285:2486-97.

Carmena R. Alteraciones del metabolismo lipídico. En: Farreras-Rozman Medicina Interna. Ediciones Doyma. 1992. Barcelona, España.

Civeira F. International Panel on Management of Familial Hypercholesterolemia. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. Atherosclerosis 2004; 173:55-68.

Coniglio Raul. Determinación de apolipoproteína B por electroinmuno difusión en pacientes normo e hipercolesterolemicos. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 1983; vol XVII, 3,401-408.

Coniglio Raul. Aterosclerosis coronaria: criterios para la determinación de individuos de alto riesgo. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 1994. Vol XXVIII, 4, 519-527.

Friedewald W, Levy R, Fredrickson D. Estimation of Low-Density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem 1972;18:499-502.

Final Report. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Circulation 2002;106:3143-3421.

Guillum RF, Mussolino ME, Ingram DD. Physical activity and stroke incidence in women and men. The NHANES I epidemiologic follow-up study. Am J Epidemiol 1996; 143: 860-9.

ILIB. International Lipid Information Bureau. The ILIB Lipid Handbook for Clinical Practice. Dyslipidemia and Coronary Heart Disease. 2003.

Pesce-Kaplan. Química Clínica. Métodos. Editorial Panamericana. 1990.

Rifai N, Dufour R, Cooper GR. Preanalytical variation in lipid, lipoprotein and apolipoprotein testing. In: Handbook of lipoprotein testing. Ed: Rifai Nm, Warnick GR, Dominiczak M. 1997; 4:75-97.

Schreier L, Berg G, Brites F, Lopez G, Sanguinetti S, Aisemberg L, Gonzalez AI, Paglione AM, Wikinski R. Diagnóstico Bioquímico de las dislipemias en el adulto. Acta Bioq Clin Latinoam 2001; 35(2):225-236.

Scheirer, L, Berg G, Rosental S. Colesterol de IDL y /o Colesterol de beta VLDL: un Nuevo parámetro en diferentes fenotipos lipoproteicos. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 1993; 27:65-74.

Summary of the second report of the national cholesterol education program (NCEP) JAMA June 1993; Vol 269 (23): 3015-3023.

Wikinsfi, R Schreier, Rosental S. New method for isolatin, and quantifying intermediate and beta very low density lipoprotein cholesterol. Clin Chem 1991; vol. 37.