

Comparación de los métodos Directo y de Friedewald para la determinación de los niveles de colesterol LDL en el equino

Comparison of direct versus Friedewald methods for determining LDL cholesterol levels in the horse

José Osório O,^{1*} Ph.D, Luis Uribe-Velázquez,² Ph.D.

¹Universidad de Caldas, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Laboratorio de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. ²Universidad de Caldas, Departamento de Salud Animal. *Correspondencia: jose.osorio_o@ucaldas.edu.co.

Recibido: Febrero de 2010; Aceptado: Enero de 2011.

RESUMEN

Objetivo. Comparar el método Directo con el método de precipitación de Friedewald para la determinación de colesterol LDL en una especie con patrón metabólico HDL. **Materiales y métodos.** Fueron tomadas en estado de ayuno, muestras de sangre de 200 equinos de diferente edad, raza y sexo. Luego de extraer el suero, fueron determinados los niveles de colesterol LDL mediante el método directo, posteriormente fueron determinados los niveles de colesterol LDL utilizando el método de Friedewald. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de una vía. **Resultados.** El método directo reportó valores (mg/dl) de promedio, mínimo, máximo, rango y desviación estándar de 27.9; 14; 51; 37; 6.4 respectivamente, mediante el método de Friedewald se obtuvieron valores (mg/dl) de promedio, mínimo, máximo, rango y desviación estándar de 29; 11.2; 54.2; 43; 7.0 respectivamente. El valor de P en el test F fue mayor o igual a 0.05, por lo cual no se evidenció diferencia significativa a un nivel de confianza del 95% entre los valores obtenidos por los dos métodos. **Conclusiones.** Pueden ser utilizados cualquiera de los dos métodos analizados para la determinación del colesterol LDL en especies con patrón HDL.

Palabras clave: Colesterol LDL, equinos, lipoproteínas HDL, patrones metabólicos. (Fuente: CAB, DeCS).

ABSTRACT

Objective. To compare the Direct Method vs the Precipitation Friedewald Method for determining LDL cholesterol levels in the horse, specie with HDL pattern. **Materials and methods.** Blood Samples of 200 overnight fasted horses of different ages, breed and sex were obtained. Blood levels of LDL cholesterol were determined first by the Direct method and then by the precipitation Friedewald method. The results were analyzed using (one way ANOVA) and compared (F test <0.05). **Results.** There were no differences for determining LDL cholesterol levels between the Direct Method vs Friedewald Method (mean: 27.9 vs 29 mg/dl, minimal: 14 vs 11.2 mg/dl, maximal: 51 vs 54.2 mg/dl, range: 37 vs 43 mg/dl, and standard deviation: 6.4 vs 7.0 mg/dl respectively) **Conclusion.** According to these results both methods are recommended for determining LDL cholesterol levels in species with HDL pattern.

Key words: Equines, LDL cholesterol, lipids, HDL lipoproteins, metabolic pathways. (Source: CAB, DeCS).

INTRODUCCIÓN

Los métodos utilizados de manera rutinaria para la determinación del perfil lipídico en humanos una especie con patrón LDL, en la cual, un aumento de grasa y colesterol en la dieta se ven rápidamente reflejados en un aumento de las LDL (1), pueden ser inadecuados para la determinación del perfil lipídico en especies con patrón HDL, las que muestran aumentos de las HDL como respuestas al aumento de las grasas y colesterol en la dieta (2), debido a que su metabolismo lipídico es diferente. Teniendo en cuenta que en el mercado se encuentran normalmente varios métodos disponibles para determinar el colesterol LDL por mediciones de bioquímica clínica, el método de Friedewald o de fórmula utilizado de manera rutinaria para la determinación del perfil lipídico en humanos, una especie con patrón metabólico LDL, debe validarse para la determinación del perfil lipídico en especies con patrón HDL. El presente trabajo tuvo como objetivo, comparar el método directo con el método de Friedewald, para la determinación del colesterol LDL en una especie con patrón metabólico HDL.

MATERIALES Y METODOS

Animales. Fueron tomadas en estado de ayuno, muestras de sangre de 200 equinos de diferentes edades sin discriminación de raza, edad o sexo.

Determinación de los niveles de colesterol. Luego de extraer el suero, fueron determinados los niveles de colesterol LDL.

Método directo (3). Su fundamento es el siguiente: un detergente específico solubiliza el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), las de muy baja densidad (VLDL) y los quilomicrones. Los ésteres de colesterol son hidrolizados por la colesterol esterasa y la colesterol oxidasa mediante una reacción no formadora de color. Un segundo detergente, solubiliza el colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) de la muestra y el colesterol LDL se cuantifica espectrofotométricamente. Se determinaron los niveles de colesterol LDL utilizando el método de Friedewald.

Método de Friedewald (4). Su fundamento es el siguiente: El colesterol HDL es precipitado en presencia de ácido fosfotungstico y determinado mediante el método enzimático-colorimétrico aplicado para la determinación del colesterol total de la muestra. Adicionalmente son determinados los niveles de triglicéridos mediante un método enzimático-colorimétrico. Luego los valores de los triglicéridos son divididos entre 5 y este valor corresponde a los niveles de

colesterol-VLDL. Los valores de colesterol LDL son calculados mediante la siguiente fórmula:

Colesterol LDL = colesterol total - colesterol HDL - colesterol VLDL.

Análisis estadístico. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de una vía, utilizando el programa Stat Graphics Centurium 15.14 (XV). Fue obtenido consentimiento informado de todos los criaderos. El trabajo contó con la aprobación del respectivo comité de ética.

RESULTADOS

El método directo reportó valores (mg/dl) de promedio, mínimo, máximo, rango y desviación estándar de 27,9; 14; 51; 37; 6,4 respectivamente. Con el método de Friedewald se obtuvieron valores (mg/dl) de 29; 11.2; 54.2; 43; 7.0 respectivamente. El valor de P en el test F fue mayor o igual a 0.05, por lo cual no se evidenció diferencia significativa a un nivel de confianza del 95% entre los valores obtenidos por los dos métodos. La figura 1 muestra la correlación positiva (Pearson), entre los dos métodos.

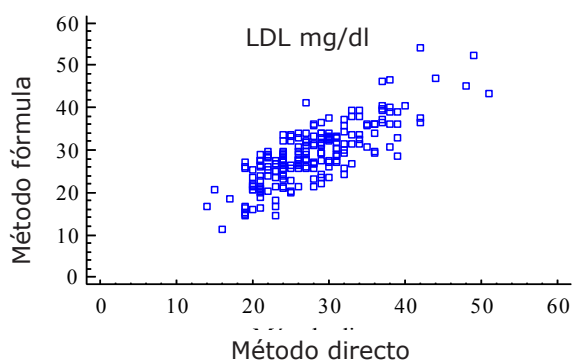


Figura 1. Comparación de los valores de colesterol-LDL en una especie con patrón HDL, determinados por el método de Directo vs el método de Friedewald. Se observa correlación positiva entre los dos métodos usados.

DISCUSIÓN

De acuerdo con el metabolismo lipídico, las diferentes especies se incluyen en dos grandes patrones, con base en el tipo de lipoproteína encargada del transporte del colesterol al interior del organismo (5). El patrón LDL (LDL > HDL) se caracteriza por altos niveles de C-LDL, por lo que exhiben mayor riesgo aterogénico y el patrón HDL (HDL > LDL) que involucra a las especies donde la mayor parte del colesterol es transportado por las lipoproteínas de alta densidad, con menor riesgo de presentar aterogénesis (6).

El perfil lipídico incluye la determinación en sangre de los niveles de colesterol total (CT), colesterol HDL (C-HDL), colesterol VLDL (C-VLDL), colesterol LDL (C-LDL) y triglicéridos en suero, el cual puede estar alterado en casos de hipotiroidismo, diabetes *mellitus*, obesidad, síndrome nefrótico, pancreatitis aguda, ictericia obstructiva, hiperadrenocorticismos, ciertas retinopatías, insuficiencia hepática, síndrome de mala absorción, errores innatos del metabolismo e hipertiroidismo entre otros (7).

El método de Friedewald (8), utilizado tradicionalmente en humanos, es usado algunas veces en medicina veterinaria, en este método, el colesterol HDL es precipitado en presencia de ácido fosfotungstico y determinado mediante el método enzimático-colorimétrico aplicado para la determinación del colesterol total de la muestra y además son determinados los niveles de triglicéridos mediante un método enzimático-colorimétrico. Luego los valores de los triglicéridos son divididos entre 5 y este valor corresponde a los niveles de colesterol-VLDL. Los valores de colesterol LDL son calculados mediante la siguiente fórmula:

Colesterol LDL = colesterol total - colesterol HDL - colesterol VLDL

Pero hace falta estudiarlo más a fondo y validarlo en especies con patrón HDL, ya que es necesario saber si existe justificación para usar este método en animales que

presentan una patrón metabólico diferente al del humano.

El método de Friedewald no utiliza mediciones del colesterol LDL, sino que lo calcula mediante fórmula, mientras que otros métodos sí lo hacen. Además está demostrado que el método de Friedewald no es adecuado, para hacer determinaciones de perfil lipídico en ciertas condiciones asociadas con hipertrigliceridemia, en hiperlipidemias tipo III y en ciertas dislipidemias secundarias, entre las cuales se incluye la uremia en humanos (9). Asimismo deben tenerse en cuenta, condiciones especiales en algunas especies con patrón HDL, por ejemplo, los caninos, una especie HDL, en la cual no se ha demostrado un papel apreciable actividad de la CETP en la circulación (10, 11) y por lo tanto, el intercambio de triglicéridos por ésteres de colesterol entre HDL y VLDL o LDL no debe ser considerado. Además, los caninos secretan VLDL que contienen apo-B48 (12), lo que explica un nivel bajo de lipoproteínas que contienen apo-B, como resultado de una mayor remoción hepática, dada el rápido reconocimiento y unión a los receptores hepáticos de estas partículas (13).

Podría decirse que el método directo, en el cual un detergente específico solubiliza el colesterol de las lipoproteínas HDL, VLDL y quilomicrones y después un segundo detergente específico, solubiliza el colesterol de las lipoproteínas LDL de la muestra, para posteriormente cuantificar el colesterol de LDL espectrofotométricamente (3) es el más confiable aunque, este método presenta el inconveniente de los altos costos que representa su ejecución.

En un estudio que buscaba evaluar el colesterol ligado a lipoproteínas de alta y baja densidad (C-HDL y C-LDL) en varias especies de animales domésticos,

se precipitaron las LDL con sulfato de polivinilo disuelto en polie-tilenglicol a pH 6,7, tras lo cual se procedió a determinar el colesterol en el sobrenadante (13). Este último, así como el colesterol total (incorporado para asegurar el estado de normocolesterolemia), fueron determinados mediante técnica enzimática de oxidasa-peroxidada. Los valores en ese trabajo un valor promedio total para colesterol LDL en mg/dl de 30 ± 16 , lo que corresponde a valores superiores a los aportados por los dos métodos (Directo 27.9 ± 6.4 y Friedewald 29 ± 7).

Por otro lado, estudios recientes mostraron que existe diferencia significativa entre el método directo y el método de precipitación, sí como entre el método de Friedewald y el de precipitación para determinar valores de colesterol LDL en equinos, por lo que no se recomienda el método de precipitación para tal fin (14, 15). En la literatura consultada no se encontraron referencias relacionadas con la determinación del perfil lipídico completo en especies con patrón HDL.

En conclusión se encontró que los dos métodos utilizados dieron valores significativamente similares, por lo cual se recomienda la utilización de cualquiera de los dos métodos de precipitación, para la determinación de los valores de colesterol LDL en especies con patrón HDL.

Agradecimientos

A M.E. Álvarez de la Universidad de Caldas por su colaboración en la determinación de los perfiles lipídicos.

REFERENCIAS

1. Coppo NB, Coppo JA, Lazarte MA. Intervalos de confianza para colesterol ligado a lipoproteínas de alta y baja densidad en suero de bovinos, equinos, porcinos y caninos. *Rev Vet* 2003; 14:1-10.
2. Bauer JE. Metabolismo comparado de lípidos y lipoproteínas. *Pet's Sci* 1997; 13:362-376.
3. Tietz NW. *Clinical guide to laboratory tests*, 2nd ed. New York: Saunders Co; 1991.
4. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; 18:499-502.
5. Osorio JH, Giraldo CE. Perfil lipídico en caninos adultos obesos versus perfil lipídico en caninos adultos normales. *Rev Vet Zoot* 1999; 11:22-27.
6. Osorio JH, Loango-Chamorro N, Landazuri P. El proceso aterosclerótico desde el periodo fetal a la edad adulta basado en el transporte del colesterol endogeno. *Rev Asoc Col Cienc Biol* 2008; 20:173-191;
7. National Cholesterol Education Program Expert Panel. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (ATP III). NIH Publication. Bethesda: National Heart, Lung, and Blood Institute; 2001.
8. Young DS. *Effects of drugs on clinical laboratory tests*, 4th ed. AACC Press, 1995.
9. Baigent C, Burbury K, Wheeler D. Premature cardiovascular disease in chronic renal failure. *Lancet* 2000; 356:147-152.
10. McTigue K, Larson JC, Valoski A, Burke G, Kotchen J, Lewis CE, Stefanick ML, Van Horn L, Kuller L. Mortality and cardiac and vascular outcomes in extremely obese women. *JAMA* 2006; 296:79-86.
11. Watson, T.D.; Butterwick, R.F.; McConnell, M.; Markwell, P.J. Development of methods for analyzing plasma lipoprotein concentrations and associated enzyme activities and their use to measure the effects off pregnancy and lactation in cats. *Am J Vet Res* 1995; 56:289-296.
12. Osorio JH. Total cholesterol and HDL-cholesterol in aging dogs. *Biosalud* 2006;5:19-24.
13. Coppo NB, Coppo JA, Lazarte MA. Intervalos de confianza para colesterol ligado a lipoproteínas de alta y baja densidad en suero de bovinos, equinos, porcinos y caninos. *Rev Vet* 2003;14:1-10.
14. Osorio JH, Giraldo SL, Alvarez ME. Análisis comparativo de dos métodos para la determinación de los niveles de colesterol LDL en una especie con patrón HDL. *Biosalud* 2010. En impresión
15. Osorio JH, Carmona-Sepulveda J, Barrera-Ocampo LM. Comparación entre el método directo y el método de precipitación para la determinación de los niveles de colesterol HDL en equinos. *Rev Colom Cienc Pecu* 2009; 22:3.