



Comparación de un nuevo método directo para cuantificar el colesterol LDL, HDL, VLDL y lipoproteína (a) con los métodos tradicionales.

Dra. Liliana E. Maggi (Bioquímica)⁽¹⁾, Dr. Gustavo A. Giunta (Médico Cardiólogo), Dra. María Inés Torres (Bioquímica), Soledad Infante (Técnica de Laboratorio) Instituto de Cirugía Cardiovascular, Fundación Favaloro.

⁽¹⁾Jefa Química Clínica. Laboratorio Fundación Favaloro. Asesora Científica Bioars S.A. (info@bioars.com.ar)

Introducción

La asociación entre colesterol total (1) y riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular ha sido bien establecida por estudios como el Framingham Heart Study. La mayor parte del colesterol en circulación es transportado por las lipoproteínas LDL, las cuales son las principales responsables para la asociación con riesgo de enfermedad cardiovascular, como se ha demostrado concluyentemente por muchos estudios prospectivos.(2,3)

La reciente guía diagnóstica y terapéutica para Adultos del Programa Nacional de Colesterol (NCEP-ATP III) de los Estados Unidos, la cual provee una amplia revisión de evidencia clínica, mantiene el foco del diagnóstico y tratamiento en el colesterol total y LDL, con más atención a la prevención primaria en personas con síntomas de enfermedad aterosclerótica, diabetes y múltiples factores de riesgo, especialmente asociados con el síndrome metabólico.(2) Asimismo, reconoce otros factores de riesgo emergentes de enfermedad cardiovascular, de aterotrombosis periférica y de accidente vascular cerebral como la lipoproteína Lp(a).

El ATP III recomienda realizar un perfil lipídico completo, incluyendo triglicéridos, colesterol total, LDL, HDL y Lp(a), en poblaciones sanas de 20 años de edad o mayores, cada 5 años.

El ATP III también imparte instrucciones en cuanto a los métodos de medida de todas las magnitudes empleadas por estas recomendaciones. La aproximación más común para determinar LDL en el laboratorio clínico es el cálculo de Friedewald, el cual estima en forma indirecta LDL a partir del colesterol total, triglicéridos y HDL. Éste cálculo, adoptado ampliamente sobre todo por razones económicas sufre severas limitaciones, bien conocidas, por lo cual el panel de expertos recomienda realizar métodos directos para medir LDL(4,5,6,7,8), tales como los nuevos métodos electroforéticos cuantitativos.

El ATP III sugiere la medida de Lp(a) en individuos con historia familiar de enfermedad cardiovascular o en aquellos con hipercolesterolemia de origen genético, con la finalidad de ser más exigentes con el objetivo terapéutico para disminuir LDL, en caso de existir también aumento de Lp(a).(2)

En las partículas Lp(a), una molécula de Apoproteína(a) se une covalentemente por un puente disulfuro a una molécula de Apo B100. La presencia de Apo(a) imparte características fisicoquímicas únicas y propiedades metabólicas a la Lp(a), distinguiéndola de las LDL y otras partículas lipoproteicas. Además de su alto contenido en carbohidratos, otra peculiaridad distintiva de la Apo(a) es su considerable heterogeneidad en el tamaño, lo cual está determinado genéticamente.(9, 10)

Los métodos de medición de Lp(a) están muy influenciados por las numerosas formas polimórficas de la Apo(a), lo que dificulta obtener concentraciones plasmáticas exactas de este marcador.(9) Ante la aparición de numerosos métodos en el mercado para la cuantificación de la Lp(a), el grupo de trabajo en Lp(a) de la International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) ha recomendado evaluaciones exhaustivas de los mismos para demostrar su dependencia o independencia de la isoforma de la Apo(a).(11)

El método electroforético combinado con tinción enzimática se independiza de la heterogeneidad en el tamaño de Apo(a), a diferencia de los métodos inmunoquímicos utilizados para medir Lp(a).

El propósito de este trabajo fue: (a) correlacionar los valores directos de LDL, obtenidos por electroforesis, con los obtenidos por la fórmula de Friedwald, (b) observar la concordancia en la cuantificación de HDL, obtenida por electroforesis y ensayo homogéneo automatizado y (c) establecer qué porcentaje de pacientes presentan Lp(a) elevada.

1. Materiales y métodos

Se procedió a la extracción de sangre en pacientes (n=650) que concurren a un control cardiovascular como prevención primaria, esto es sin haber sufrido un evento cardiovascular previamente, luego de 12 hs. de ayuno, en el período comprendido entre enero del 2007 y junio del 2007.

Los sueros fueron separados inmediatamente por centrifugación (1000 x g, 15 min) y conservados a -70 °C durante no más de 30 días.

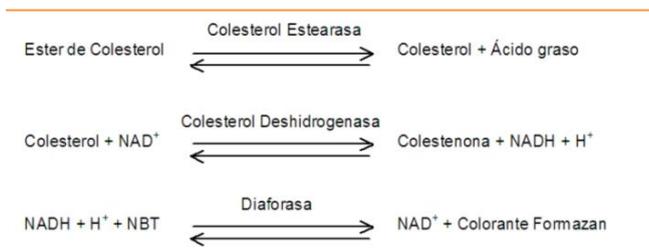


Los valores de colesterol total en la población estudiada no excedieron los 400 mg/dL. No se encontraron interferencias significativas por hemólisis hasta 3,85 g/L de hemoglobina.

1.2. Descripción del Método Electroforético

La electroforesis de lipoproteínas en gel de agarosa permite la cuantificación directa del colesterol en cada fracción lipoproteica dentro del gel.

Se utilizó un sistema automatizado compuesto por un reactivo enzimático (colesterol estearasa) para la tinción de las distintas bandas lipoproteicas y su contenido en colesterol es cuantificado por escaneo densitométrico. De este modo, la electroforesis provee no sólo una cuantificación confiable de las principales lipoproteínas, sino que además la visualización es útil para observar las diferentes variantes de lipoproteínas.



En este sistema se encuentran automatizados los siguientes pasos: aplicación de la muestra, migración electroforética, reacción enzimática y coloración, lavado, secado de los geles. Este nuevo gel agarosa contiene un buffer con cationes divalentes y urea, lo cual permite la separación de VLDL y Lp(a). Dicho gel también contiene barbital sódico con EDTA, guanidina-HCl, albúmina bovina y cloruro de magnesio. La electroforesis se realiza a 400 volts en 20 minutos.

En cada corrida electroforética se procesaron 100 muestras, incluyendo un control comercial para valorar la precisión del ensayo.

La linealidad según el fabricante es de 400 mg/dL para el colesterol total. Las cuantificaciones de las muestras de los pacientes que excedan la linealidad del sistema, deben diluirse con agua destilada

1.3. Métodos químicos tradicionales

Se utilizaron tres métodos enzimáticos para las siguientes determinaciones:

- Colesterol Total
- Colesterol-HDL
- Triglicéridos

Se efectuaron diariamente controles internos estadísticos (normal, patológico y lipídico) y cada 15 días control externo.

Dichos ensayos cumplen con las recomendaciones del NCEP sobre la calidad analítica de los métodos de laboratorio.

1.4. Ecuación de Friedewald

Para calcular el valor de LDL se aplicó la ecuación de Friedewald:¹²

$$\text{LDL} = \text{Colesterol total} - (\text{Triglicéridos}/5 + \text{HDL})$$

Donde triglicéridos / 5 es el valor asumido para el VLDL.

El valor de LDL en presencia de niveles elevados de Triglicéridos rápidamente pierde trazabilidad. La ecuación supone que todas las Lipoproteínas Ricas en Triglicéridos son VLDL, es decir no hay presencia de quilomicrones. Además supone constante la proporción de colesterol en las VLDL (20%). Con el aumento del nivel de Triglicéridos, la relación entre el valor calculado y el de referencia se pierde rápidamente por encima de 250 mg/dL de Triglicéridos, tal como se observa en la siguiente tabla.

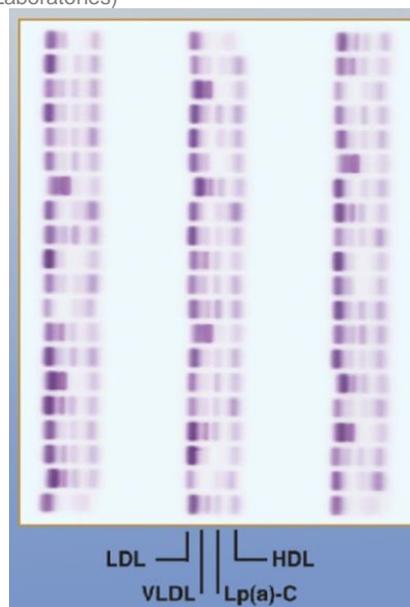
Tabla 1: Concordancia de la fórmula de Friedewald

Nivel de Triglicéridos	Concordancia con el método de referencia
≤ 200 mg/dL	90%
> 200 y ≤ 300	75%
> 300 y ≤ 400	60%
> 400 y ≤ 500	41%

2. Resultados

Cuando se realizó la electroforesis en gel de agarosa con coloración enzimática, se obtuvieron cuatro fracciones lipoproteicas con movilidad β, pre β, pre β rápida y α, como se muestra en la Figura 1.

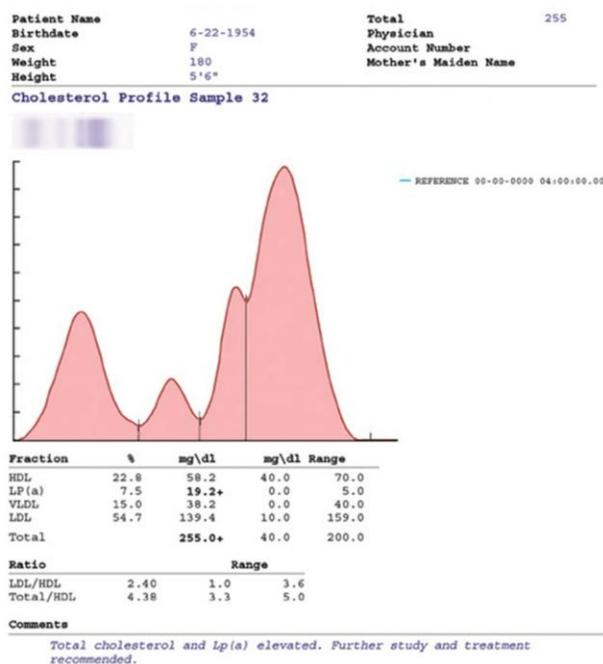
Figura1. Patrón lipoproteico obtenido mediante Spife3000 (HELENA Laboratories)



La banda alfa, que es la que más migra hacia el ánodo, corresponde a HDL. La banda siguiente, pre-beta corresponde a VLDL y la banda beta de más lento movimiento corresponde a LDL. Si aparece una banda entre alfa y pre-beta, debe ser cuantificada como Lp(a). Los quilomicrones si están presentes, permanecen en el origen. La cantidad de colorante Formazan producido es directamente proporcional a la cantidad de colesterol y ésteres de colesterol originalmente presentes en la muestra.

Una vez realizada la corrida electroforética, se procedió a escanear el gel con un sistema de lectura, obteniéndose el patrón que se observa en la figura 2. Conociendo el valor del colesterol total de la muestra, se ingresa este dato y automáticamente se imprimen los porcentajes relativos y valores absolutos de cada banda.

Figura 2. Patrón lipoproteico obtenido mediante escaneo.



2.2. Precisión

Para valorar la precisión intraensayo del método electroforético, fueron corridos 2 sueros con diferentes niveles de colesterol total, repitiendo el procedimiento 15 veces en el mismo gel, y los resultados se muestran en las tablas 2 y 3.

Tabla 2: Variación intraensayo en la determinación electroforética. Paciente A (n = 15)

Paciente A - Colesterol total: 168 mg/dl				
	HDL	Lpa	VLDL	LDL
	α		pre β	β
Media	65.69	18.10	14.34	69.93
SD	1.22	0.79	0.98	1.36
CV %	1.86	4.34	6.86	1.94

Tabla 3: Variación intraensayo en la determinación electroforética. Paciente B (n = 15)

Paciente B - Colesterol total: 217 mg/dl				
	HDL	Lpa	VLDL	LDL
	α		pre β	β
Media	50.76	22.9	26.4	237.12
SD	0.71	0.74	1.31	9.57
CV %	1.40	3.23	4.96	4.04

Para valorar la precisión interensayo del método electroforético se corrió el control comercial 15 veces en 8 geles distintos, los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Variación interensayo en la determinación electroforética.

	HDL	LDL
	α	β
Media	44.24	101.34
SD	1.10	2.11
CV %	2.49	2.08
ET %	6.028	5.32

Siendo:

- CV (%): Imprecisión.
- SD: Desvío estándar.
- VV: Valor real del control.
- ET: Error total (%).

Como puede observarse estos datos cumplen con los requerimientos del NCEP, que se muestran en la tabla 5, sobre calidad analítica de los métodos de laboratorio clínico empleados en el diagnóstico y control del tratamiento de las dislipemias.

Tabla 5: Requerimientos de calidad analítica según NCEP.

	CV a (%)	ET (%)
Colesterol Total	3.0	9.0
Triglicéridos	5.0	15.0
LDL	4.0	12.0
HDL	4.0	13.0

Siendo:

- CVa: coeficiente de variación analítico.
- ET: Error total permitido.

2.3. Correlación

En la tabla 6 se presentan los resultados de los coeficientes de correlación obtenidos.

Tabla 6: Correlaciones obtenidas en comparación con métodos tradicionales

	R2	R	p
HDL	0,8534	0,92	p < 0,001
LDL	0,8013	0,90	p < 0,001
VLDL	0,4078	0,64	p < 0,001

Se puede observar una excelente correlación entre ambos métodos para HDL y aceptable, para LDL. Teniendo en cuenta que el 81.5% de los pacientes estudiados tuvieron triglicéridos menores a 200 mg/dL era



esperable una buena correlación del LDL con la fórmula de Friedewald que para este rango de triglicéridos tiene una buena concordancia.

Mientras que para VLDL la correlación no es tan buena, debido a que se aparta, en un gran porcentaje de la población estudiada, respecto del valor Triglicéridos / 5 asumido en la fórmula de Friedewald.

Se muestran a continuación los gráficos de correlación para las distintas lipoproteínas.

Figura 3. Correlación entre HDL por electroforesis y por método tradicional.

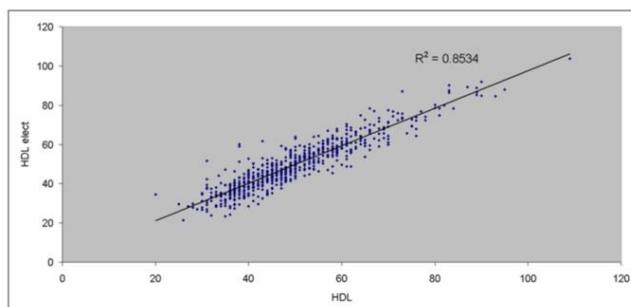


Figura 4. Correlación entre LDL por electroforesis y por método tradicional.

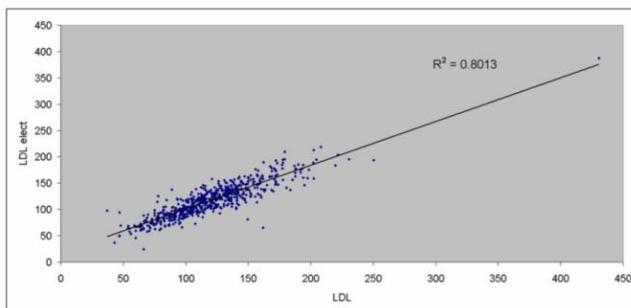
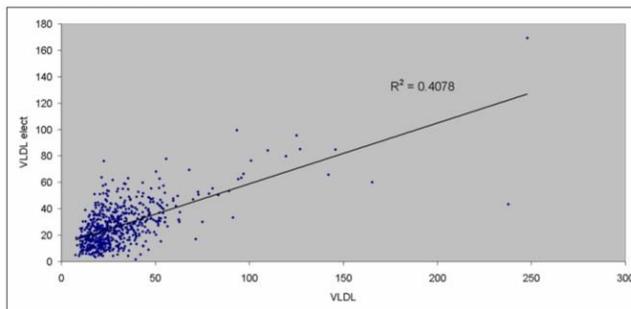


Figura 5. Correlación entre VLDL por electroforesis y por método tradicional.



3. Conclusiones

Para clasificar a los pacientes en cuanto a riesgo de evento cardiovascular o para evaluar la eficacia de tratamientos de reducción de lípidos se requiere una cuantificación exacta y precisa de las lipoproteínas. El

método electroforético aquí comparado reúne estas características de exactitud y precisión.

Además, este método permite cuantificar directamente el colesterol LDL y VLDL reemplazando el cálculo mediante la fórmula de Friedewald, cuyo mayor error reside en asumir que la relación Triglicéridos / Colesterol en las VLDL es igual a 5, cuando en realidad este valor es variable pudiendo ser muy diferente de 5 en casos patológicos.

Por otro lado, este método electroforético permite distinguir claramente el colesterol contenido en la Lp(a) del contenido en la VLDL, permitiendo una cuantificación precisa de la Lp(a), la cual es considerada un factor de riesgo independiente de ateroclerosis. Se debe resaltar que un 23,2% de la población analizada presentaba Lp(a) elevada, a pesar de que sus niveles de colesterol y triglicéridos estaban en su rango normal.

REFERENCIAS

1. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, et al. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 335, 1001–9, 1996.
2. 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* 285, 2486–97, 2001.
3. Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein levels: the Framingham study. *JAMA* 256, 2835–8, 1986.
4. Bachorik PS, Ross JW. National Cholesterol Education Program recommendations for measurements of low-density lipoprotein cholesterol: executive summary. National Cholesterol Education Program Working Group on Lipoprotein Measurements. *Clin Chem* 41, 1414–20, 1995.
5. Myers GL, Cooper GR, Henderson LO, Hassamer DJ, Kimberly MM. Standardization of lipid and lipoprotein measurement. In: Rifai N, Warnick GR, Domoniczak MH, eds. *Handbook of lipoprotein testing*. Washington: AACC Press, 717–48, 2000.
6. Cooper GR, Smith SJ, Duncan IW, Mather A, Fellows WD, Foley T, et al. Interlaboratory testing of the transferability of a candidate reference method for total cholesterol in serum. *Clin Chem* 32, 921–9, 1986.
7. Myers GL, Kimberly MM, Waymack PP, Smith SJ, Cooper GR, Sampson EJ. A reference method laboratory network for cholesterol: a model for standardization and improvement of clinical

- laboratory measurements. Clin Chem 46, 1762–72, 2000.
8. Matthias Nauck, G.Russell Warnick, and Nader Rifai. Methods for Measurement of LDL-Cholesterol: A Critical Assessment of Direct Measurement by Homogeneous Assays versus Calculation. Clin. Chem. 48(2), 236-254, 2002.
 9. Marcovina S.M., et al. Effect of the number of apolipoprotein(a) kringle 4 domains on immunochemical measurements of lipoprotein(a). Clin. Chem. 41, 246-55, 1995.
 10. Marcovina S.M., et al. Use of a reference material proposed by the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine to evaluate analytical methods for the determination of plasma lipoprotein(a). Clin. Chem. 46 (12), 1956-67, 2000.
 11. Tate J.R., et al. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) Standardization Project series of a proposed secondary reference material for lipoprotein(a). Clin. Chem. Lab. Med., 37, 949-58, 1999.
 12. Friedewald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin. Chem. 18, 499-502, 1972.

