

25. Perfil lipídico

Isaac Túnez Fiñana¹, Aurora Galván Cejudo²

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Avda. Menéndez Pidal s/n, 14071-Córdoba, ²Campus de Rabanales, Edif. Severo Ochoa 14071-Córdoba

RESUMEN

La cuantificación de colesterol y triglicéridos en suero es un procedimiento analítico básico en el diagnóstico y seguimiento de enfermedades metabólicas, primarias o secundarias. Altos niveles de colesterol se asocian a riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. En esta práctica se realizará la determinación en suero de colesterol total, colesterol-HDL y triglicéridos.

Palabras claves: colesterol, lipoproteínas, triglicéridos

Abreviaturas: 4-AP: 4-amino fenazona, CHE: colesterol estearasa, CHOD: colesterol oxidasa, GK: Glicerol Kinasa, GPOD: Glicerolfosfato oxidasa, HDL: lipoproteínas de alta densidad, LDL: lipoproteínas de baja densidad, POD: peroxidasa, VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El perfil lipídico lo constituye la cuantificación analítica de una serie de lípidos que son transportados en la sangre por los diferentes tipos de lipoproteínas plasmáticas. La determinación de estos parámetros es un procedimiento analítico básico para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades metabólicas, primarias o secundarias. Entre estos parámetros analíticos que se pueden determinar están: el colesterol total, el colesterol transportado por las LDL, el colesterol transportado por las HDL, los triglicéridos totales, ciertas apoproteínas particulares etc.

Altos niveles de colesterol se asocian a riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, en especial aquel unido a las LDL (colesterol malo). El colesterol de las HDL (colesterol bueno), puesto que representa aquella fracción de colesterol que se transporta al hígado para su metabolización y excreción por vía biliar, no se asocia con riesgo de enfermedad.

Los objetivos de la práctica son la determinación en suero de colesterol total, HDL-Colesterol y triglicéridos, para lo que se utilizarán kits comerciales.

1.1. Determinación de colesterol total

Para la determinación de colesterol total se utilizan reactivos comerciales que incluyen las enzimas y sustratos necesarios para la cuantificación de todas las formas de colesterol presentes en el suero (*Kit comercial de LinearChemicals*). Las reacciones que tienen lugar son:



1. Una colesterol estearasa (CHE) hidroliza los ésteres de colesterol a colesterol mas ácidos grasos libre.
2. A continuación una colesterol oxidasa (CHOD) oxida todo el colesterol a colesterolona y peróxido de hidrógeno.
3. El peróxido de hidrógeno es sustrato de una peroxidasa (POD) que junto con 4-amino fenazona (4-AP) da lugar a la formación de una quinona roja.
La quinona formada es proporcional a la concentración de colesterol en la muestra.

1.2. Determinación de HDL-colesterol

Para la determinación del colesterol presente en las principales lipoproteínas que lo contienen como HDL (lipoproteínas de alta densidad) y LDL (lipoproteínas de baja densidad), es necesario:

Primero, la separación selectiva de la lipoproteína correspondiente con agentes precipitantes.

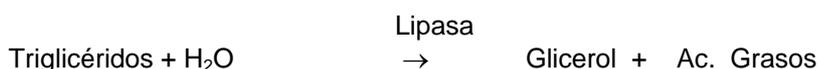
Segundo, la cuantificación del colesterol presente en dicha lipoproteína como se indicó anteriormente.

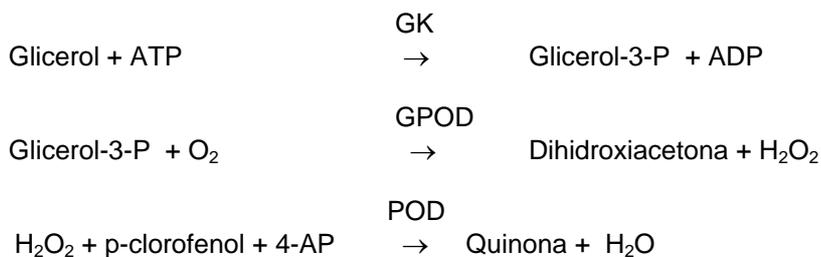
Entre estos reactivos precipitantes están el ácido fosfotungstico y magnesio que precipitan a las LDL y VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad) mientras que las HDL permanecen en solución.

1.3. Determinación de triglicéridos

Para la determinación de triglicéridos en suero se utilizan reactivos comerciales (*Kit comercial de LinearChemicals*) que incluyen las enzimas y sustratos necesarios para la cuantificación por espectrofotometría visible.

Las reacciones que tienen lugar son:





1. Una lipasa hidroliza los triglicéridos dando glicerol mas ácidos grasos libre.
2. El glicerol formado es sustrato de una glicerol quinasa que en presencia de ATP lo fosforila a glicerol 3P.
3. El glicerol 3P es oxidado a dihidroxiacetona por una glicerol fosfato oxidasa dando también peróxido de hidrógeno.
4. El peróxido de hidrógeno junto con los cromógenos p-clorofenol y 4-AP son sustrato de una peroxidasa para formar una quinona roja cuantificable a 505 nm. La quinona formada es proporcional a la concentración de triglicéridos presente en la muestra.

2. LISTADO DE MATERIAL NECESARIO

Tubos de ensayo
 Pipetas automáticas
 Espectrofotómetro
 Suero
 Estándar de colesterol (200 mg/dl)
 Reactivo de trabajo para el colesterol
 Reactivo precipitante
 Estándar de triglicéridos (200 mg/dl)
 Reactivo de trabajo para triglicéridos

3. PROTOCOLOS A REALIZAR

3.1. Determinación de colesterol total

Disponer de tubos de ensayo rotulados como blanco, estandar y muestra. La muestra se refiere al suero a valorar y se colocan tantos tubos muestras como sueros se quieran valorar.

Pipetear los componentes indicados en la Tabla I, añadiendo en último lugar el reactivo de trabajo de colesterol.

Tabla I. Protocolo para la cuantificación de colesterol total

	Blanco	Estandar	Muestra
Etandar de colesterol	-	20 µl	-
Suero	-	-	20 µl
React. de trabajo	2 ml	2 ml	2 ml

Mezclar e Incubar 5 min a 37°C (ó 10 min a temperatura ambiente).

Leer la absorbancia a 505 nm.

Calcula la concentración de colesterol total de cada una de las muestras de suero del siguiente modo:

$$\text{mg/dl} = \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{estandar}}} \times \text{Conc. estandar}$$

3.2. Determinación de HDL-colesterol

1. Mezclar 1 ml del suero con 0,1 ml del reactivo precipitante. Incubar 10 min a temperatura ambiente y centrifugar durante 20 min a 4000 rpm (ó 2 min a 12000 rpm).
2. La determinación de HDL-colesterol se realiza con 40 µl del sobrenadante como se indica en la Tabla II y utilizando el reactivo indicado en la determinación de colesterol total
3. Pipetear los componentes indicados en la Tabla II, añadiendo en último lugar el reactivo de trabajo de colesterol.

Tabla II. Protocolo para la cuantificación de colesterol de las HDL

	Blanco	Estandar	Muestra
Etandar	-	20 µl	-
Sobrenadante	-	-	40 µl
H ₂ O	40 µl	20 µl	-
React. de trabajo	2 ml	2 ml	2 ml

Mezclar e Incubar 5 min a 37°C (ó 10 min a temperatura ambiente).

Leer la absorbancia a 505 nm.

Calcula la concentración de colesterol de las HDL del siguiente modo:

$$\text{Abs. Muestra} \times 320 = \text{mg/dl HDL-colesterol (505 nm)}$$

3.2. Determinación de triglicéridos

Disponer de tubos de ensayo rotulados como blanco, estandar y muestra. La muestra se refiere al suero a valorar y se colocan tantos tubos muestras como sueros se quieran valorar.

Pipetear los componentes indicados en la Tabla III, añadiendo en último lugar el reactivo de trabajo de triglicéridos.

	Blanco	Estandar	Muestra
Etandar	-	20 µl	-
Muestra	-	-	20 µl
React. de trabajo	2 ml	2 ml	2 ml

Mezclar e Incubar a 37°C 4 min (ó 10 min a temperatura ambiente). Leer la absorbancia a 505 nm.

Cálculos

$$\text{mg/dl} = \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{estandar}}} \times \text{Conc. estandar}$$

4. RESULTADOS ESPERADOS

Los resultados esperados son aquellos que se indican a continuación y se corresponden con los valores de referencia encontrados en la población sana y que varían según sexo y edad

4.1. Colesterol total

Hasta 30 años: 120-215 mg/dl

30- 39 años: 135-240 mg/dl

40-49 años: 140-280 mg/dl

50- 59 años: 145-295 mg/dl

4.2. Colesterol-HDL

Hombre > 55 mg/dl

Mujer > 65 mg/dl

4.3. Triglicéridos

36-165 mg/dl

5. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

Además de la cuantificación de estos tres parámetros en la práctica el alumno deberá presentar un esquema de:

- Las principales lipoproteínas.

- Principales dislipemias (tipos, causas, parámetros bioquímicos y riesgos).
- Qué otras determinaciones analíticas se pueden realizar para valoración de las dislipemias.

6. BIBLIOGRAFÍA

D'Ocon Navaza C, García-Saavedra MJ, Vicente García JC (1999): Fundamentos y Técnicas de Análisis Bioquímico, Análisis de Muestras Biológicas. Editorial Paraninfo, Madrid.

González de Buitrago JM, Arilla Ferreiro E, Rodríguez-Sedade M, Sánchez Pozo A (1998): Bioquímica Clínica . Editorial McGraw-Hill.-Interamericana, Madrid.

Información detallada a cerca de los productos analíticos de Linear Chemical SL lo encontrará en [http:// www.linear.es](http://www.linear.es)

ANEXO

SOLUCIONES

Estándar de colesterol: 200 mg/dl

Reactivo de trabajo de colesterol que se prepara según las indicaciones del fabricante y que contiene: 300 U/l de colesterol estearasa, 300 U/l de colesterol oxidasa, 1250 U/l de peroxidasa, 0,4 mmol/l de 4-AP, 26 mmol/l de fenol en tampón pipes 90 mM, pH 6,9

Reactivo precipitante: 14 mmol/l ac. fosfotungstico y 2 mmol/l MgCl₂

Estándar de triglicéridos: 200 mg/dl

Reactivo de trabajo de triglicéridos que se prepara según las indicaciones del fabricante y que contiene: 150000 U/l de lipasa, 500 U/l de GK, 2500 U/l de GPO, 440 U/l de peroxidasa, 0,1 mmol/l de 4-AP, 0,126 mmol/l de fenol en t mmol/l de ATP, 2 mmol/l de p-clorofenol en tampón 50 mM pH 7,5.

MATERIAL BIOLÓGICO

Suero, estable 6 días a 2-8°C.