

VALIDACIÓN DE LA FÓRMULA DE FRIEDEWALD PARA LA DETERMINACIÓN DEL PERFIL LIPÍDICO EN BOVINOS

José Henry Osorio¹
Yirly Johanna Suárez¹
Jorge Enrique Pérez²

RESUMEN

Objetivo: Validar la fórmula de Friedewald para la determinación de los valores de colesterol LDL en bovinos, una especie con patrón metabólico HDL. **Materiales y Métodos:** Fueron tomadas 100 muestras de sangre de bovinos de diferente edad, raza y sexo. Luego de extraer el suero, fueron determinados los niveles de colesterol LDL mediante el método directo, posteriormente se determinaron los mismos valores utilizando la fórmula de Friedewald. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de una vía. **Resultados:** El método directo reportó valores (mg/dl) de promedio, mínimo, máximo, y desviación estándar de 40,769; 2,438; 126,751; 29,814, respectivamente, y el método de Friedewald mostró resultados en promedio, mínimo, máximo y desviación estándar de 34,659; 1,349; 145,31; 29,108, correspondientemente. El valor de P en el test F en la comparación del método Directo vs. Friedewald fue mayor o igual a 0,05 (0,154), por lo cual no se evidenció diferencia significativa a un nivel de confianza del 95% entre los valores obtenidos por los dos métodos. **Conclusión:** Puede ser utilizada la fórmula de Friedewald para la determinación del colesterol LDL en especies con patrón HDL.

Palabras clave: colesterol LDL, bovinos, lipoproteínas HDL, patrones metabólicos.

VALIDATION OF FRIEDEWALD'S FORMULA FOR DETERMINING CATTLE LIPID PROFILE

ABSTRACT

Objective: To validate Friedewald's formula for determining LDL cholesterol levels in cattle, species with HDL metabolic pattern. **Materials and Methods:** One hundred (100) blood samples from different age, race and gender cattle were taken. After removing the serum, the LDL cholesterol levels were determined using the direct method and later the same values were determined using Friedewald's formula. Results were statistically analyzed using one-way ANOVA. **Results:** The direct method reported values (mg/dl) of average, minimum range, maximum range, and standard deviation of 40.769, 2.438, 126.751, 29.814, respectively, and Friedewald method results showed minimum, maximum and standard deviation averages of 34.659, 1.349, 145.31, 29.108, respectively. The value of P in the F test Direct in the comparison of the direct method and Friedewald's method was greater than or equal to 0.05 (0.154), reason why no significant difference was evident at a level of confidence of 95% between the values obtained through the two methods. **Conclusion:** Friedewald's formula can be used for determining LDL cholesterol in species with HDL pattern.

Key words: LDL cholesterol, cattle, HDL lipoproteins, metabolic patterns.

¹ Laboratorio de investigación en Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Universidad de Caldas. Correo electrónico: jose.osorio_o@ucaldas.edu.co

² Laboratorio de Microbiología, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Universidad de Caldas.

INTRODUCCIÓN

Las lipoproteínas (LP) son partículas esféricas que poseen un núcleo de lípidos neutro, compuestos por triglicéridos y ésteres de colesterol, y una superficie donde las proteínas específicas denominadas apoproteínas se asocian con colesterol y fosfolípidos, son las encargadas tanto del transporte de los lípidos como de su liberación en los tejidos (1). Las principales clases de lipoproteínas cuando son separadas en base a la densidad de ultracentrifugación, se denominan por sus densidades relativas en: quilomicrones (Q), LP de muy baja densidad (VLDL), LP de baja densidad (LDL), LP de densidad intermedia (IDL) y LP de alta densidad (HDL), y cuando son aisladas por electroforesis han sido denominadas mediante un sistema análogo al utilizado para otras proteínas plasmáticas en: alfa (HDL), beta (LDL) y pre-beta lipoproteínas (IDL y VLDL), esta última es muy escasa en rumiantes adultos (2-4). Las LDL son lipoproteínas pequeñas ricas en colesterol y representan alrededor del 70% del colesterol plasmático. Son el resultado de la lipólisis de las VLDL en el compartimiento vascular, su degradación se da tanto en el hígado como en los tejidos extrahepáticos (5) y están involucradas en el transporte directo del colesterol, siendo distribuido y depositado en los tejidos incluyendo las paredes vasculares para la reposición de los componentes de las células y la formación de hormonas esteroidales como de las sales biliares (5-7). El colesterol se halla principalmente formando las LDL junto a la apoproteína B-100 y la HDL con las proteínas Apo-A (I y II), Apo-C, Apo-D y Apo-E. Ambas lipoproteínas están involucradas en el transporte de lípidos endógenos (8), este transporte es dado en su mayoría en los bovinos por las HDL ya que son "patrón HDL" que es caracterizado por el predominio de alfa lipoproteína en el plasma. Cuando estos animales son alimentados con dietas grasas, el colesterol es captado por HDL (en lugar de LDL), y por lo tanto no se evidencian cambios en el LDL, como sí ocurre en especies con patrón LDL como por ejemplo los humanos.

(1, 9, 10). Se debe aclarar que en los terneros se da una relación inversa, ya que en el estado embrionario y durante la lactancia temprana estos tienen patrón LDL y a medida que crecen desarrollan el patrón HDL, este mecanismo se da por los cambios que surgen desde la nutrición del cordón umbilical a la asimilación intestinal de los lípidos con la succión de la leche materna, contrario a los humanos, ya que estos nacen con patrón HDL y a medida que crecen desarrollan el patrón LDL (4, 11).

Las especies con patrón HDL como los bovinos, equinos, caninos, felinos, ratones y ratas, tienen mecanismos de eliminación de colesterol cuando este aumenta. Su velocidad y eficiencia es determinante para las concentraciones de colesterol en el plasma, así como en el establecimiento de un índice de resistencia a la aterogénesis; estos mecanismos mantienen bajos los niveles de LDL, debido a una apoproteína sintetizada en el hígado (apoproteína B-100) que permite que las LDL sean utilizadas rápidamente por el hígado y eliminadas de la circulación (5, 10).

En el ganado bovino tanto productor de leche como de carne ocurre movilización de grasa al momento del parto y durante la lactancia para compensar el balance energético negativo característico de esta etapa, sin embargo cuando se exigen altos niveles de producción se pueden presentar enfermedades metabólicas como por ejemplo la esteatosis hepática, la cetosis bovina y el síndrome de movilización de grasa (SMG), en donde el organismo intenta compensar la energía que necesitan para producir leche con la movilización de grasa de los depósitos, pero cuando la movilización excede la capacidad que tiene el hígado para metabolizarla se produce infiltración de grasa en diferentes órganos y tejidos alterando su función. La condición corporal (CC) al momento del parto es considerado un factor que predispone ya que las vacas gordas y con CC media desarrollan más fácilmente dichas enfermedades (12, 13); por lo anterior, es importante evaluar la CC

mediéndose en una escala del 1 a 5 en la que los animales extremadamente flacos se asignan en el grado 1 y los extremadamente gordos a un grado de 5, siendo ideal el grado de 3 a 4; cuando las vacas presentan un buen estado corporal al momento del parto pueden movilizar sus reservas sin que sufran problemas metabólicos y sin ver afectado su desempeño reproductivo (14, 15). Así mismo, en condiciones normales se da un proceso de reesterificación de triglicéridos (TG) en el hepatocito, que luego salen para ser utilizados como fuente de energía en otros tejidos y para la síntesis de leche; para que esto ocurra el hígado debe ser capaz de sintetizar la apo B derivada de las VLDL; pero si la cantidad de TG reesterificado en el hígado excede la capacidad de este para sintetizar las VLDL, los TG son depositados en el adipocito en forma de gotas grasa o como infiltrados de grasa en el hígado, músculos estriados, músculo cardíaco, adrenales y riñones (12).

Son pocas las investigaciones efectuadas en animales buscando estandarizar un método confiable en la determinación del perfil lipídico, es por ello que se crean dudas sobre cuál es el método más apropiado, teniendo en cuenta que actualmente son usadas las mismas técnicas que se realizan en humanos donde existen métodos de precipitación, homogéneos y la fórmula establecida por Friedewald, donde es indispensable conocer los niveles de colesterol LDL (LDL-C) ya que estos están correlacionados con enfermedades coronarias cuando se encuentran en un nivel elevado. Por esta razón, en esta área se han venido realizando estudios para determinar un método que además de seguro sea efectivo y tenga un error analítico menor al establecido por el National Cholesterol Education Program (NCEP) de USA. El método de referencia que se ha establecido para la determinación de LDL-C requiere ultracentrifugación que en ocasiones no es accesible al laboratorio de rutina debido a su alto costo, una metodología laboriosa que requiere mucho tiempo y personal entrenado. Por lo tanto, muchos laboratorios estiman el

LDL-C con la fórmula de Friedewald, basada en las concentraciones de colesterol total (CT), el colesterol unido a proteínas de alta densidad (HDL-C) y los triglicéridos (TG) (16, 17).

En la actualidad el perfil lipídico en humanos y en otras especies es medido mediante el método directo que es considerado el método de referencia ya que, como su nombre lo indica, realiza una medición directa del colesterol LDL por medio de reactivos de laboratorio, pero este método es muy costoso y laborioso, es por eso que con este trabajo se pretendió validar la fórmula de Friedewald para determinar los valores de colesterol LDL en bovinos pues se calcula mediante una fórmula que no acarrea costos ni personal entrenado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron obtenidas mediante venopunción yugular 100 muestras de sangre de hembras bovinas clínicamente sanas, de raza lechera (Holstein, Normando y BON) del departamento de Caldas, a primeras horas del día, sin consumo de suplementos alimentarios; los predios seleccionados pertenecían a un sistema semi-intensivo, con un adecuado plan sanitario y una condición corporal de 3 a 4 (en una escala de 1 a 5). Al elegir los animales no se discriminó la edad.

Posteriormente, se centrifugaron dichas muestras a 3500 rpm durante 15 minutos en una centrífuga Thermo de serie IEC CL31 Multispeed (Thermo Electron Corporation de la casa de la UPS E.U./Canada), se obtuvieron los sueros, y se conservaron a -30°C, hasta su análisis. Para determinar los niveles de colesterol LDL se utilizaron kits de la casa comercial BioSystems® mediante el método directo (18), donde un detergente específico solubiliza el colesterol de las lipoproteínas HDL, VLDL, y Q. Los ésteres de colesterol son hidrolizados por el colesterol esterasa y el colesterol oxidasa mediante una reacción no formadora de color. Un segundo

detergente, solubiliza el colesterol de las lipoproteínas LDL de la muestra. El colesterol de LDL se cuantifica espectrofotométricamente. Posteriormente, fueron determinados los niveles de colesterol LDL utilizando el método de Friedewald cuyo fundamento es el siguiente: los niveles de colesterol total se determinan por medio del método enzimático colorimétrico, el colesterol HDL se precipita en presencia de ácido fosfotúngstico y se determina mediante el método de colesterol total enzimático-colorimétrico. 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 fórmula de Friedewald: Colesterol LDL = colesterol total - (colesterol HDL + colesterol VLDL) (19), teniendo en cuenta que este método ha sido validado en especies con patrón HDL como son los caninos, felinos, equinos y ovinos (20). Los resultados fueron obtenidos mediante un análisis estadístico de ANOVA simple, se obtuvo el cálculo del promedio, el mínimo y máximo, la varianza y la desviación estándar, para la cuantificación del colesterol LDL tanto directo como por medio de la fórmula. Se evaluaron las diferencias sobre los dos métodos por medio de un análisis de varianza utilizando el programa Statgraphics Plus 5.1 donde no se considera diferencia estadísticamente significativa cuando los resultados son mayores o iguales a 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método directo reportó valores (mg/dl) de promedio, mínimo, máximo, y desviación estándar de 40,769; 2,438; 126,751; 29,814, respectivamente, y el método de Friedewald mostró resultados en promedio, rango mínimo, rango máximo y desviación estándar de 34,659; 1,349; 145,31; 29,108, respectivamente. No se evidencia diferencia significativa con un nivel

de confianza del 95% entre los valores obtenidos por los dos métodos, ya que el valor de P fue de 0,154 ($\geq 0,05$) y por lo tanto se puede usar cualquiera de los dos para la determinación del C-LDL en bovinos. Estos resultados coinciden con lo reportado en equinos en donde se miden el C-LDL por el método directo y la fórmula de Friedewald, y en donde los valores descritos para estos métodos en los caballos son más bajitos que los reportados en el presente estudio para las vacas (20); contrario a ello, Osorio et al. (21) realizaron un estudio en pollos de engorde en donde se encontró diferencia significativa entre 3 métodos: directo, precipitado y la fórmula de Friedewald, recomendando el método directo por ser el de referencia y por lo tanto el más confiable al no determinar el C-LDL de forma indirecta. Igualmente, estudios realizados en humanos demuestran que existe diferencia entre los métodos pues se dan valores más altos mediante la fórmula de Friedewald (16, 22). Al mismo tiempo, muchos autores manifiestan que no es ideal utilizar esta fórmula ya que puede haber errores al calcularla con una imprecisión analítica elevada que acumula la suma de estas tres determinaciones, los cuales se hacen más evidentes cuando la especie que se va a analizar tiene los triglicéridos elevados en un rango mayor a 400 mg/d (situación que no ocurre normalmente en los bovinos) (16, 19). Aunque el método más confiable y exacto es el directo, este presenta el inconveniente de los altos costos que representa su ejecución.

A diferencia de los humanos los bovinos no presentan riesgos a enfermedades coronarias, pero sí se pueden presentar alteraciones en su perfil lipídico que causan patologías que afectan su producción y su reproducción (8); por esta razón, es necesario estandarizar un método para la determinación de los niveles de LDL-C sabiendo que hay diferencias entre especies debido a su metabolismo (1, 9); **en el bovino como en las otras especies HDL se da el transporte inverso del colesterol, dando como resultado un menor riesgo de aterogénesis (4, 23, 24).**

Es importante entonces, no solo medir estas lipoproteínas sino todo el perfil lipídico ya que muchas especies, no solo los bovinos, presentan alteraciones en el metabolismo de los lípidos especialmente cuando padecen de enfermedades como: hipotiroidismo, resistencia a la insulina, obesidad, síndrome de mala absorción, errores innatos del metabolismo (25, 26). En el caso particular de los bovinos se pueden presentar alteraciones como SMG, esteatosis hepática o síndrome de la vaca gorda, cetosis bovina, modificaciones en la relación entre las lipoproteínas y la actividad ovárica, la síntesis de esteroides gonadales y enfermedades de la reproducción como metritis y retención de placenta (8, 13, 27). Investigaciones realizadas han demostrado que los animales que presentan balance energético negativo tienen elevada la concentración de lípidos en sangre y en leche, debido al SMG y al síndrome de hígado graso, lo cual se puede deber a la síntesis limitada de lipoproteínas y apoproteínas disponibles; conjuntamente todos estos eventos metabólicos están relacionados con una predisposición de padecer metritis y retención de placenta (8, 27). También se ha observado que el colesterol y los fosfolípidos afectan la estabilidad de membrana y tienden a influenciar en la capacidad fertilizante de los espermatozoides, promoviendo su capacitación y reacción acrosómica en el momento y lugar adecuado del ciclo estral para una fertilización exitosa (8).

Un estudio hecho por Galvis et al. (27), sugiere que el perfil de la lipoproteínas puede ser una

guía para predecir la capacidad de producción de leche y la capacidad del hígado para producir lipoproteínas esenciales en la utilización de los triglicéridos plasmáticos para la síntesis de grasa láctea, pues el incremento de HDL sérico debe ser un indicador de la capacidad de la glándula mamaria para la formación de grasa láctea; igualmente, en la lactación las concentraciones plasmáticas de HDL, LDL y colesterol total se incrementan conforme a una menor pérdida de peso, y por el contrario, los triglicéridos y VLDL disminuyen. Las LDL pueden aumentar en el periodo final de la gestación debido al incremento de los estrógenos que provoca un aumento en los receptores de LDL, y por ende disminuye las LDL, después del parto se da un efecto inverso aumentando la concentración plasmática de estas.

CONCLUSIÓN

Se puede concluir en este estudio que se puede utilizar la fórmula de Friedewald para la determinación del colesterol LDL en bovinos, pues no muestra diferencia significativa si se compara con el método directo. Sin embargo, debido a que existe escasa literatura en la confiabilidad de los métodos para determinar colesterol LDL en animales con patrón HDL, es necesario seguir realizando más estudios que puedan precisar el método más adecuado en dichas especies.

BIBLIOGRAFÍA

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):1-8.
2. Pasquini A, Luchetti E, Cardini G. Plasma lipoprotein concentration in the dog: the effects of gender, age, breed and diet. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2008; 92(6):718-722.
3. Xenouli PG, Steiner JM. Lipid metabolism and hyperlipidemia in dogs. *Vet J* 2010; 183(1):12-20.
4. Coppo JA, Mussart de Coppo NB. Bagazo de citrus como suplemento invernal en vacas de descarte [Internet]. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/suplementacion/78-bagazo_citrus.pdf Consultado Febrero 24 de 2013.
5. King, M.W. Lipoproteins. The Medical Biochemistry Page Org [Internet]. Disponible en: <http://themedicalbiochemistrypage.org/es/lipoproteins-sp.php> Consultado Febrero 24 de 2013.
6. González-Gallegos N, Jiménez-Ruiz C, Milke ME. Evidencias sobre las grasas en la dieta y enfermedad coronaria. *Revista Salud Pública y Nutrición* 2009; 10(1) [Internet]. Disponible en: http://www.resdyn.uanl.mx/x/1/ensayos/ensayo_enfermedad_cardiovascular.htm# Consultado Febrero 24 de 2013.
7. Masanobu H, Hideto T. Fat utilization in healthy subjects consuming diacylglycerol oil diet: dietary and whole body fat oxidation. *Lipids* 2008; 43(6):517-525.
8. Aranda MV, Brave N, Casagrande R. Colesterol en bovinos. Sitio Argentino de Producción Animal [Internet]. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/carne_y_subproductos/26-colesterol_en_bovinos.pdf Consultado Septiembre de 2012.
9. Maldonado EN, Casanave EB, Aveldaño MI. Major plasma lipids and fatty acids in four HDL mammals. *Comp. Biochem. Physiol. - Part A: Mol. Integr. Physiol* 2002; 132(2):297-303.
10. Díaz C, Plaza C, Chimoy P. Niveles séricos de triglicéridos y colesterol en caballos peruanos de paso bajo dos sistemas de crianza. *Rev. investig. vet. Perú* 2008; 19(2):134-139.
11. Bauchart D. Lipid Absorption and Transport in Ruminants. *J Dairy Sci* 1993; 76(12):3864-3881.
12. Contreras PA. Síndrome de movilización grasa en vacas lecheras al inicio de la lactancia y sus efectos en salud y producción de los rebaños. *Arch. med. vet.* 1998; 30(2):17-27.
13. Fidalgo Álvarez LE, Rejas López J, Ruiz de Gopegui R, Ramos Antón JJ. Patología Médica Veterinaria: Libro de Texto para la Docencia de la Asignatura. León: Universidad Santiago de Compostela, Zaragoza; 2003.
14. Giraldo-Salazar LF, Loaiza AM, Botero S, Uribe-Velásquez LF. Parámetros metabólicos séricos y condición corporal durante el pre y posparto en vacas Brahman. *vet. zootec* 2008; 2(2):40-47.
15. Villa NA, Osorio JM, Escobar M, Ceballos A. Indicadores bioquímicos del balance energético en el periparto de vacas Brahman en pastoreo en el trópico colombiano. *Revista Científica, FCV-Luz* 2011; 21(4):353-359.
16. Mendes de Cordova C, Scheider CR, Juttel ID. Medición directa de LDL colesterol vs. Fórmula de Friedewald. *M-Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2004; 83(6):1-3.
17. García GD, Aguilar R, Alfaro M, Navarro A, Cabrera L, Quintana JA, Aguilar D. Evaluación de un método directo para la cuantificación de colesterol de LDL. *Química Clínica* 2006; 25(2):58-63.
18. Wu A. *Tietz clinical guide to laboratory tests*. 4th edition. New York: Saunders/Elsevier; 2006. p. 1798.
19. Friedewald W, Levy R, Fredrickson D. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 1972; 18:499-502.
20. Osorio JH, Uribe-Velázquez LF. Comparison of direct versus Friedewald methods for determining LDL cholesterol levels in the horse. *Revista MVZ Córdoba* 2011; 16(2):2549-2553.

21. Osorio JH, Flórez JD, Pérez JE. Evaluación de los métodos directo, precipitado y Friedewald para la cuantificación de colesterol LDL y HDL en pollos de engorde. *Rev. Med. Vet.* 2012; 24:85-90.
22. Querales M, Cruces ME, Sánchez C, et al. Medida del colesterol de lipoproteínas de baja densidad utilizando tres metodologías. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 2012; 46(1):31-37.
23. Osorio JH, Loango-Chamorro N, Landazuri P. El proceso aterosclerótico desde el periodo fetal a la edad adulta basado en el transporte del colesterol endógeno. *Rev Asoc Col Cienc Biol* 2008; 20:173-191.
24. Bailhache E, Briand F, Nguyen P. Metabolism of cholesterol ester of apolipoprotein B10- containing lipoproteins in dog: evidence for disregarding cholesterol ester transfer. *Eur J Clin Invest* 2004; 34:527-534.
25. 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.
26. Hess RS, Kass PH, Winkle TV. Association between Diabetes Mellitus, Hypothyroidism or Hyperadrenocorticism, and Atherosclerosis in Dogs. *J Vet Intern Med* 2003; 17(4):489-494.
27. Galvis RD, Agudelo D, Saffon A. Condición corporal, perfil de lipoproteínas y actividad ovárica en vacas Holstein en lactancia temprana. *Rev Col Cienc Pec* 2007; 20(1):16-29.