

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE COLESTEROL HDL EN CANINOS

José Henry Osorio¹
Yirly Johanna Suárez²
Jorge Enrique Pérez³

RESUMEN

Objetivo: Comparar el método directo y el método de precipitación para la medición del colesterol HDL en caninos. **Materiales y Métodos:** Se obtuvieron muestras de sangre de 156 caninos, en estado de ayuno, de las cuales se seleccionaron 30 al azar de diferentes edades, sin discriminación de sexo ni edad. Después de obtener el suero se determinaron los niveles de colesterol HDL mediante el método directo, posteriormente fueron obtenidos los niveles de colesterol HDL utilizando el método de precipitación. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de una vía. **Resultados:** El método directo reportó valores (mg/dl) de media, desviación estándar, rango mínimo y máximo de: 144,435; 33,532; 77,676; 197,594 respectivamente; mediante el método de precipitación se obtuvieron valores (mg/dl) de media, desviación estándar, rango mínimo y máximo de: 133,337; 36,727; 81,457; 242,724 respectivamente. El valor P del test F es mayor o igual a 0,05 (0,627), por lo cual, no se evidencia diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95% entre los valores obtenidos por los dos métodos. **Conclusión:** Al no existir diferencia significativa, puede ser utilizado cualquiera de los dos métodos analizados para la determinación del colesterol HDL en esta especie.

Palabras clave: lípidos, metabolismo, perros.

COMPARISON OF TWO METHODS FOR DETERMINING HDL CHOLESTEROL LEVELS IN CANINES

ABSTRACT

Objective: To compare the direct method and the precipitation method for the measurement of HDL cholesterol in canines. **Materials and Methods:** Blood samples of 156 fasting dogs were obtained from which 30 from different ages were randomly chosen without discrimination by sex or age. After serum extraction, levels of HDL cholesterol were determined by the direct method and by the precipitation method. The results were statistically analyzed using one way ANOVA. **Results:** The values obtained by the direct method in mg/dl for media, minimal and maximal range, and standard deviation were 144,435; 33,532; 77,676; 197,594 respectively. Using the precipitation method, the values for media, minimal and maximal range, and standard deviation were: 133,337; 36,727; 81,457; and 242,724 respectively. The P value for the F test was greater or equal to 0.05 (0.627) without significant statistical difference between the two analyzed methods with a confidence level of 95% between the values obtained in both methods. **Conclusion:** Since there is not a significant difference, either of the analyzed methods for determining HDL cholesterol in this species can be used.

Key words: lipids, metabolism, dogs.

¹ Laboratorio de Investigación en Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Universidad de Caldas, Manizales, Caldas, Colombia.
Autor para correspondencia: jose.osorio_o@ucaldas.edu.co

² Programa Jóvenes Investigadores de Colciencias, Universidad de Caldas, Manizales, Caldas, Colombia.

³ Laboratorio de Microbiología, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Universidad de Caldas.

INTRODUCCIÓN

Las lipoproteínas (LP) se caracterizan por ser macromoléculas que permiten transportar los lípidos en el plasma puesto que estos son insolubles en agua y no pueden ser transportados en soluciones acuosas. Las más conocidas son los quilomicrones (Q), lipoproteínas de muy baja densidad (*very low density lipoproteins*, VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (*intermediate density lipoprotein*, IDL), lipoproteínas de baja densidad (*low density lipoproteins*, LDL) y lipoproteínas de alta densidad (*high density lipoproteins*, HDL) (1-5).

Dado que ninguna especie es exactamente igual a otra en su metabolismo lipídico, se ha propuesto agruparlas en dos grandes patrones, con base a características similares. El patrón LDL-C (LDL-C > HDL-C) incluye a las especies donde la mayor parte del colesterol total (CT) es transportado por LDL-C (seres humanos adultos, cerdos, monos, conejos, cobayos, hámsters y otros de vida silvestre). El patrón HDL-C (HDL-C > LDL-C) involucra a los animales donde la mayor parte del CT es transportado por HDL-C (bovinos, equinos, caninos, felinos, ratones y ratas). El ser humano recién nacido respondería al patrón HDL-C, resistente a la aterogénesis. En años recientes, se ha logrado que ratones transgénicos cambien su patrón HDL-C por LDL-C, por lo que desarrollan aterosclerosis. Para llegar a diagnósticos de dislipidemias no es suficiente conocer la tasa de CT, sino esclarecer el tipo de lipoproteína que lo está transportando. En la actualidad es rutina medir la cantidad de colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) y de baja densidad (LDL-C) (6).

Las LP se caracterizan por estar formadas por triglicéridos, ésteres de colesterol, fosfolípidos, colesterol libre y proteínas (5, 7-10). Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son

producidas en el hígado y en el intestino a partir del catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos; al principio se denominan HDL discoidales y luego de ser secretadas al plasma reciben el nombre de HDL esféricas. Ambas contienen lecitina, lecitina-colesterol acil-transferasa (LCAT) y apoproteínas; estas últimas son proteínas que facilitan el transporte de los lípidos, ayudan al mantenimiento de la integridad estructural y a la activación de ciertas enzimas que desempeñan un papel clave en el metabolismo de los lípidos (3, 11, 12). Además, las HDL ayudan a eliminar el exceso de colesterol, trasladando de los tejidos extrahepáticos al hígado mediante el proceso de transporte inverso del colesterol que se considera esencial para el mantenimiento del equilibrio de los esteroides (2). El proceso del transporte inverso del colesterol se da cuando las células extra hepáticas acumulan el colesterol a través de la absorción de lipoproteínas de baja densidad (LDL), luego este colesterol libre es adquirido por HDL pobres en lípidos, que por acción de la LCAT se transforma en ésteres de colesterol, los cuales pueden ser transferidos de las HDL a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) a través de la proteína transferidora de ésteres de colesterol CETP. Estos residuos van al hígado, donde pueden ser excretados a la bilis en forma de ácidos biliares o de colesterol libre, teniendo la posibilidad de ser reabsorbidos por el intestino o excretados con las heces (2, 3, 11, 13). Por tal motivo, las HDL juegan un papel importante en los humanos al eliminar el colesterol de la pared arterial y como factor de predicción al disminuir el riesgo de aterosclerosis cuando una placa de grasa se deposita en la pared de las arterias.

En el caso de los perros, en los que predomina esta LP, se cree que estos son más resistentes a la aterosclerosis (1, 14, 15). Las HDL se pueden fraccionar en un grupo heterogéneo de partículas (HDL-1, HDL-2 y HDL-3); en caninos la HDL-1 tiene igual tamaño que la LDL y es diferente a otras LP de otros animales, la HDL-2 es la más abundante en esta especie, además es la más pequeña, densa y de migración más rápida

de otras especies como por ejemplo el gato y el ser humano, las HDL-3 son menores pero más densas (16). Las HDL nacientes son aquellas recién sintetizadas por el hígado o por el intestino delgado, también son discoidales, sirven como donantes y aceptadoras de apolipoproteínas C, apo E, y varios lípidos de otras lipoproteínas en la circulación (3, 11).

Las apoproteínas más comunes del HDL son la apoAI, apoA-II y apoC; cuando presentan niveles elevados en los humanos, son asociadas a enfermedades cardiovasculares y a la diabetes (10, 17). Debido que en el mercado se encuentran dos métodos disponibles que determinan el colesterol HDL, el método directo y el método de precipitación, el presente trabajo tuvo como objetivo comparar los dos métodos, para la determinación del colesterol HDL en caninos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron tomadas en estado de ayuno, muestras de sangre de 156 caninos criollos o sus cruces, de las cuales se seleccionaron 30 al azar, de diferentes edades sin discriminación del sexo. Luego de obtener el suero, fueron determinados los niveles de colesterol HDL mediante un método directo (18), cuyo fundamento es el siguiente: el colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las de muy baja densidad (VLDL) y los quilomicrones son hidrolizados por la colesterol oxidasa mediante una reacción enzimática acelerada no formadora de color. Posteriormente, se solubiliza el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) de la muestra en presencia de un detergente, para ser cuantificado espectrofotométricamente. Luego, fueron determinados los niveles de colesterol HDL utilizando el método de precipitación (19), cuyo fundamento es el siguiente: las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), y de baja densidad (LDL) presentes en la muestra, precipitan en presencia de fosfotungstato e iones magnesio. El sobrenadante contiene las lipoproteínas de alta densidad (HDL), cuyo colesterol se cuantifica

espectrofotométricamente. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de una vía, utilizando el programa Statgraphics Plus 5.1.

RESULTADOS

El método directo reportó valores (mg/dl) de promedio, varianza, desviación estándar, rango mínimo y máximo de 144,435; 1124,413; 33,532; 77,676; 197,594 respectivamente, con el método de precipitación se obtuvieron valores (mg/dl) de promedio, varianza, desviación estándar, rango mínimo y máximo de 133,337; 1348,863; 36,726; 81,457; 242,724 respectivamente. Al comparar los dos métodos mediante el ANOVA de una vía, el p-Valor del test F fue de 0,627 ($p > 0,05$), por lo tanto, no se evidencian diferencias estadísticamente significativa en el análisis realizado, con un nivel de confianza del 95% entre los valores obtenidos (ver Tabla 1).

Tabla 1. Comparación del método directo y el método de precipitación para la determinación del colesterol HDL en *Canis lupus familiaris*

	COLESTEROL HDL		P-valor
	Método directo	Método de precipitación	
Media	144,435	133,337	0,627
Desv	33,532	36,727	
Mínimo	77,67628	81,457	
Máximo	197,594	242,724	

Desv: desviación estándar.

DISCUSIÓN

Hoy en día es importante la determinación del colesterol HDL en las diferentes especies, sean patrón LDL (humanos) o patrón HDL (caninos) ya que esta LP es beneficiosa no solo porque regula el metabolismo lipídico, sino debido a que disminuye el riesgo cardiovascular, atribuido principalmente al "transporte reverso

del colesterol" (2, 20). En el caso de los perros, existe un caso particular ya que estos carecen de la enzima transferidora de ésteres de colesterol (*Cholesteryl ester transfer protein*, CETP) que está presente en los seres humanos y por ende la molécula de HDL2 adquiere continuamente los ésteres de colesterol dando como resultado la formación de HDL1; estas junto con los ésteres de colesterol, son transportadas al hígado para su almacenamiento o reutilización, en vez de usar las LP LDL o las VLDL que se usan en humanos (5). Por esta razón es importante establecer no solo el colesterol HDL sino hacer una medición de todo el perfil lipídico (CT, C-VLDL, C-LDL y triglicéridos en suero) pues alteraciones en dichas lipoproteínas y en especial en el metabolismo de los lípidos pueden predisponer a enfermedades como hiperlipidemia, obesidad, diabetes mellitus, hipotiroidismo, pancreatitis, hiperadrenocorticismos; no solo en humanos sino también en caninos (1, 21). En esta última alteración y en la administración de corticoides exógenos puede presentarse la hiperlipemia, debido a la aparición de insulinoresistencia periférica inducida por los corticoides, lo que redundará en un aumento de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (quilomicrones y VLDL) (11). Si se tiene en cuenta todo lo anterior, es de gran importancia precisar si existe alguna diferencia entre los métodos usados en humanos para determinar el colesterol HDL y si estos mismos métodos funcionan en los caninos que presentan diferentes metabolismo lipídico.

En humanos se determina no solo el colesterol HDL sino también el colesterol LDL mediante el método de precipitación, ya que es el más confiable a pesar de ser un método con ensayos laboriosos y tediosos que requerían un paso de separación manual con reactivos precipitantes, seguido del análisis del contenido en colesterol mediante analizadores automatizados, además de requerir de un personal entrenado (22-24). Por esta razón se crea la necesidad de buscar más métodos para hacer preciso el análisis y así surgen los métodos homogéneos que emplean

reactivos específicos para medir directamente el colesterol HDL en el suero o en el plasma de la muestra (23, 25). Debido a esto, se han realizado estudios en humanos comparando el método utilizado por *National Cholesterol Education Program* (NCEP) de USA que es el método de precipitación y los métodos actuales llamados métodos homogéneos, entre los cuales se encuentra el directo, hallando que no existe diferencia entre ellos y que pueden ser utilizados ambos para determinar colesterol HDL y colesterol LDL en humanos (22, 23). Sin embargo, se debe tener en cuenta que en ocasiones se puede presentar diferencias debidas a la manipulación, a los instrumentos usados y a los diferentes kits comerciales que existen en el mercado (23). En esta investigación, al comparar el método directo y el método de precipitación usados comúnmente en humanos, no se encontró diferencia significativa entre ellos al determinar el colesterol HDL en caninos, siendo igual a lo reportado en humanos. Además, es más favorable el uso del método de precipitación usado comúnmente en humanos, ya que es 15 veces más costoso el método directo con respecto al precipitado.

CONCLUSIÓN

Debido a que existen pocas referencias relacionadas con la determinación del perfil lipídico completo en especies con patrón HDL, al comparar en este estudio el método directo y el método de precipitación, se encontró que al no existir diferencia significativa entre ellos, puede ser utilizado cualquiera de los dos métodos analizados para la determinación del colesterol HDL en caninos. Además, se recomienda realizar más estudios con otras especies que tengan el mismo patrón de los caninos para poder obtener más referencias, ya que existe actualmente poca literatura de la realización y la comparación de los métodos para determinar colesterol HDL en animales.

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; 4(1):1-8.
2. Maldonado EN, Romero JR, Ochoa B, Aveldaño MI. Lipid and Fatty Acid Composition of Canine Lipoproteins. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2001; 128(4):719-729.
3. Montgomery R. Bioquímica: casos y texto. 6ª Ed. Madrid, España: Harcourt Brace; 1998.
4. 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; 2(6):718-722.
5. Xenouli PG, Steiner JM. Lipid metabolism and hyperlipidemia in dogs. *Vet J* 2010; 183(1):12-14.
6. Díaz C, Plaza E, 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):134-138.
7. Attie AD. Lipoprotein/Cholesterol Metabolism. En: Meyers RA. *Encyclopedia of Physical Science and Technology*. 3ª Ed. Ed. Madison, Wisconsin, U.S.A: Academic Press; 2004. p. 643-660.
8. King MW. Lipoproteins. The Medical Biochemistry Page Org. 2011 [Internet]. Disponible en: <http://themedicalbiochemistrypage.org/lipoproteins.html>. Consultado Julio de 2011.
9. Osorio JH. Total cholesterol and HDL-cholesterol in aging dogs. *Biosalud* 2006; 5:19-24.
10. Puppione DL, Bassilian S, Souda P, Macdonald MH, Hagland F, et al. Mass spectral analysis of the apolipoproteins on dog (*Canis lupus familiaris*) high density lipoproteins. Detection of apolipoprotein A-II. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 2008; 3(4):290-296.
11. Breininger E, Pintos L. Transporte de lípidos y patologías asociadas al metabolismo lipídico. Laboratorio de Lípidos y Proteínas. Área Química Biológica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires (UBA) 2007 [Internet]. Disponible en: http://www.portaldog.com.ar/textos/Metabolismo_de_lipido_en_caninos.htm. Consultado Mayo de 2013.
12. Xenoulis PG, Suchodolski JA, Levinski MD, Steiner JM. Investigation of Hypertriglyceridemia in Healthy Miniature Schnauzers. *J Vet Intern Med* 2007; 21(6):1224-1230.
13. 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.
14. Maldonado EN, Casanave EB, Aveldaño MI. Major plasma lipids and fatty acids in four HDL mammals. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2002; 132(2):297-303.
15. Rigotti A, Krieger M. Getting a handle on "good" cholesterol with the high-density lipoprotein receptor. *N Engl J Med* 1999; 341(26):2011-2013.
16. Laboratorio veterinario de referencia (VET LAB SL). Lipidograma. 2012 [Internet]. Disponible en: <http://www.vetlabsl.com/pdfs/LIPIDO1.PDF>. Consultado Marzo de 2012.
17. Martínez-González J. La apoproteína humana A-II determina los niveles de triglicéridos plasmáticos a través de la regulación de la actividad lipoproteína lipasa y del proteoma de las HDL. *Clin Investig Arterioscler* 2010; 22(4):176-177.
18. Warnick GR, Nauck M, Rifai N. Evolution of methods for measurement of HDL-cholesterol: from ultracentrifugation to homogeneous assays. *Clin Chem* 2001; 47:1579-1596.
19. Grove TH. Effect of reagent pH on determination of high-density lipoprotein cholesterol by precipitation with sodium phosphotungstate-magnesium. *Clin Chem* 1979; 25:560-564.
20. Julve J, Escolá-Gil JC, Rotllan N, Fiévet C, Vallez E, De la Torre C. Human apolipoprotein A-II determines plasma triglycerides by regulating lipoprotein lipase activity and high-density lipoprotein proteome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30:232-270.

21. Jeusette IC, Lhoest ET, Istasse LP. Influence of obesity on plasma lipid and lipoprotein concentrations in dogs. *Am J Vet Res* 2005; 66(1):81-87.
22. García GD, Martín R, Navarro M, Cabrera A, Quintana L, et al. Evaluación de un método directo para la cuantificación de colesterol de LDL. *Química clínica* 2006; 25(2): 58-63.
23. Gómez-Gerique JA, Martín-Ballesteros B, García R, Esteban M, Fabiani F, et al. Evaluación multicéntrica de distintos métodos para la determinación de colesterol HDL directo con respecto al colesterol HDL de precipitación. *Revista del laboratorio clínico* 2012; 5(1):18-27.
24. Kimberly MM, Leary ET, Col TG, Waymack PP. Selection, Validation, Standardization, and Performance of a Designated Comparison Method for HDL-Cholesterol for Use in the Cholesterol Reference Method Laboratory Network. *Clin Chem* 1999; 45(10):1803-1812.
25. Dong J, Guo H, Yang R, LI H, Wang S, et al. Serum LDL- and HDL - cholesterol determined by ultracentrifugation and HPLC. *J Lipid Res* 2011; 52(2):383-388.