

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE COLESTEROL LDL COMPARANDO EL MÉTODO PRECIPITADO VS LA FÓRMULA DE FRIEDEWALD EN CANINOS

J. H. Osorio^{1*}, J. Vinasco²

Artículo recibido: 30 de enero de 2014. Aprobado: 16 de enero de 2015

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue comparar el método de precipitación con el método de fórmula de Friedewald para la determinación de colesterol LDL en caninos. Para ello, se tomaron muestras de sangre de 185 caninos adultos en estado de ayuno de diferente raza y sexo. Se determinaron los niveles de colesterol LDL mediante el método precipitado y posteriormente con el método de Friedewald. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de una vía. El método precipitado reportó valores en mg/dl de: 52,40 promedio; 2,66 mínimo; 132,67 máximo; 130,01 rango y 24,29 de desviación estándar. Por su parte, los valores del método de Friedewald en mg/dl fueron: 65,19 promedio; 4,55 mínimo; 184,20 máximo; 179,65 rango y 31,51 de desviación estándar. El valor de p en el test F fue menor a 0.05, indicando diferencia estadísticamente significativa entre los dos métodos analizados con un nivel de confianza del 95,0%. En conclusión se recomienda utilizar el método precipitado para la determinación de los niveles de colesterol LDL en caninos.

Palabras clave: caninos, colesterol LDL, método precipitado, fórmula de Friedewald.

DETERMINATION OF LDL CHOLESTEROL LEVELS OF COMPARING THE PRECIPITATE METHOD VS THE FRIEDEWALD FORMULA CANINE

ABSTRACT

The objective of this study was to compare the precipitation method with the method of Friedewald formula for the determination of LDL cholesterol in dogs. For that, blood samples of 185 overnight fasted adult dogs of different breed and sex were obtained. Blood levels of LDL cholesterol were determined by the precipitation method and later by the Friedewald method. The results were analyzed using one way ANOVA. The precipitate method reported values in mg/dl of: 52.40 average, 2.66 minimum, 132.67 maximum, 130.01 range and 24.29 of standard deviation. For its part, the Friedewald equation values in mg/dl were: 65.19 average, 4.55 minimum, 184.20 maximum, 179.65 range and 31.51 of standard deviation. The p-value in the F test was less than 0.05, indicating statistically significant difference between the two methods analyzed with a confidence level of 95.0%. In conclusion it can be used the precipitated method for determining LDL cholesterol levels in dogs.

Key words: Dogs, LDL cholesterol, precipitate method, friedewald method.

¹ Laboratorio de Investigación en Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Universidad de Caldas. Calle 65 No. 26-10, Manizales (Colombia).

² Grupo de investigación Biosalud, Universidad de Caldas. Calle 65 No. 26-10, Manizales (Colombia).

* Autor para correspondencia: jose.osorio_o@ucaldas.edu.co

INTRODUCCIÓN

En los caninos el metabolismo lipídico se divide en dos vías básicas: exógena y endógena, la primera se asocia con el metabolismo de los lípidos dietéticos, y la segunda con el metabolismo de los lípidos producidos en el hígado, exhibiendo algunas características únicas en comparación con otras especies (Bauer 2004; Remaley *et al.* 2011; Xenoulis y Steiner 2010).

Los lípidos son moléculas ubicuas que se encuentran en los tejidos y células del cuerpo cumpliendo importantes funciones ya que sirven como hormonas o precursores de las mismas, colaboran con la digestión y proporcionan el combustible para el metabolismo y almacenamiento energético. Basados en su estructura pueden subdividirse en cinco grupos: ácidos grasos, esteroides (principalmente de colesterol), acilglicéridos (principalmente triglicéridos), esfingosina y terpenos (Ogedegbe y Brown 2001; Remaley *et al.* 2011). El esteroide principal de los tejidos animales es el colesterol (Xenoulis y Steiner 2010), el cual participa en el metabolismo de las hormonas esteroideas (Trapani *et al.* 2012), los ácidos biliares, y la síntesis de vitamina D (Osorio *et al.* 2010); este puede ser sintetizado por el hígado y otros tejidos, aunque la principal fuente es la ingesta. En los caninos, el colesterol que se absorbe de la dieta es esterificado con un ácido graso principalmente en el yeyuno, luego, en la mucosa intestinal el colesterol es resintetizado (Osorio *et al.* 2010). Los lípidos también se caracterizan por ser insolubles en agua y solubles en disolventes no polares, por lo tanto para ser transportados en el plasma deben ser incorporados en complejos conocidos como lipoproteínas (LP) (Bauer 2004;

Coppo 2001; Hughes 2006; Johnson 2005; Xenoulis y Steiner 2010).

En los caninos, estas lipoproteínas difieren en sus características físicas y químicas como tamaño, densidad y composición; según su densidad se clasifican en cuatro clases: 1. Quilomicrones, 2. Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), 3. Lipoproteínas de baja densidad (LDL) y 4. Lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Johnson 2005; Watson y Barrie 1993; Xenoulis y Steiner 2010).

Las LDL caninas participan en el transporte de triglicéridos y de colesterol, y pueden ser captadas por el hígado y otras células a través de eventos mediados por el receptor correspondiente. Las LDL se forman a partir de la lipólisis de la VLDL, en cuyo proceso se produce una pérdida de triglicéridos, fosfolípidos y una parte de las apoproteínas que vuelven a las HDL (Osorio *et al.* 2010). Si bien la mayoría de los tejidos pueden tomar el colesterol de la circulación, este es sintetizado de novo en los mismos, lo que les permite autoabastecerse. Esto causa que la mayoría del colesterol unido a las lipoproteínas regrese al hígado (Hughes 2006; Osorio *et al.* 2010; Watson y Barrie 1993).

Las vías de eliminación del colesterol varían entre especies, lo cual explica las diferencias observadas en los perfiles lipoproteicos de diversos mamíferos, un factor determinante en las concentraciones de colesterol en el plasma es la velocidad y eficiencia de dicho proceso (Osorio *et al.* 2010). El transporte normal de lipoproteínas se asocia con bajos niveles de triglicéridos y colesterol de LDL y altos niveles de colesterol HDL (Ginsberg 1998). En los caninos este mecanismo establece la resistencia a la aterogénesis, ya que el organismo es capaz de compensar una elevada ingesta de lípidos dietéticos

limitando la producción de VLDL, utilizando las LP o sus remanentes ricos en colesterol y minimizando la acumulación de LDL. Los niveles de LDL se mantienen bajos debido a la presencia una apoproteína sintetizada en el hígado, la cual permite que las LDL sean rápidamente utilizadas por el mismo y eliminadas de la circulación (Johnson 2005; Montgomery 1998).

La determinación de los niveles de colesterol LDL puede realizarse por diferentes métodos, entre ellos el método precipitado y el método de Friedewald. El primero, mide el colesterol LDL mediante procesos de cuantificación clínica y el segundo, no utiliza mediciones de colesterol LDL, sino que se calcula mediante una fórmula, la cual estima el colesterol LDL a partir de mediciones del colesterol total, triglicéridos (TG) y colesterol HDL (Eblen-Zajjur y Eblen-Zajjur 2001).

El objetivo del presente estudio fue comparar el método precipitado con el método de Friedewald para la determinación de los niveles de colesterol LDL en caninos, teniendo en cuenta que ambos métodos son utilizados de manera rutinaria en humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mediante venopunción yugular se obtuvieron 185 muestras de sangre de caninos criollos adultos de la ciudad de Manizales (Colombia) sin discriminación de raza y sexo. La toma de las muestras se realizó en horas de la mañana, los animales presentaban un ayuno de 12 horas y un plan de vacunación al día. Posteriormente, las muestras fueron rotuladas y centrifugadas a 3500 r.p.m durante 15 minutos en centrifuga Thermo Multispeed extrayendo el suero que fue conservarlo a -30°C hasta realizar su análisis. Los niveles de colesterol

LDL se determinaron utilizando los kits de la casa comercial BioSystems® mediante el método de precipitación que tiene como fundamento lo siguiente: las LDL presentes en la muestra se precipitan en presencia de polivinil sulfato, la concentración de colesterol LDL se calcula por diferencia entre los valores de colesterol en el suero y en el sobrenadante obtenido tras la precipitación, finalmente el colesterol se cuantifica mediante espectrofotometría. A continuación, se determinaron los valores de colesterol LDL mediante la fórmula establecida por Friedewald (Friedewald *et al.* 1972), cuyo fundamento es como sigue: 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 calculados los niveles de triglicéridos (TG) mediante un método enzimático-colorimétrico. La lectura de los resultados se efectuó en un analizador semiautomático de química serial marca Rayco®. Posteriormente los valores de los TG 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: $\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol total} - (\text{colesterol HDL} + \text{colesterol VLDL})$.

El análisis estadístico de los resultados se llevo a cabo mediante ANOVA simple, con la que se obtuvo el cálculo del promedio, mínimo, máximo, rango y desviación estándar, para la cuantificación del colesterol LDL en cada método (precipitado y formula de Friedewald). Las diferencias sobre los dos métodos se evaluaron por medio de un análisis de varianza utilizando el programa Statgra-

phics Plus 5.1® en donde se aceptaron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método precipitado reportó valores en mg/dl de: 52,40 promedio; 2,66 mínimo; 132,67 máximo; 130,01 rango y 24,29 de desviación estándar. Por su parte, el método de Friedewald mostró valores en mg/dl de: 65,19 promedio; 4,55 mínimo; 184,20 máximo; 179,65 rango y 31,51 de desviación estándar. El valor de p en el test F de la comparación de ambos métodos fue inferior a 0.05 (0,0023), por lo tanto existe diferencia estadísticamente significativa entre los dos métodos analizados con un nivel de confianza del 95,0%.

El análisis bioquímico es a menudo necesario para identificar trastornos lipídicos en los caninos ya que aunque dichas alteraciones son frecuentes en esta especie, no manifiestan signos clínicos evidentes, por lo tanto los datos de laboratorio permiten un diagnóstico más acertado (Johnson 2005). Estos resultados se evidencian por un cuadro de hiperlipidemia e hipercolesterolemia; la hiperlipidemia es causada por defectos en el metabolismo de una o más de las clases de lipoproteínas, puede ser hiperlipidemia primaria, cuando los defectos son de origen genético, más comúnmente en el perro y el gato, e hiperlipidemia secundaria, debida a las dietas altas en grasas, diabetes mellitus, hipotiroidismo, hiperadrenocorticismos, pancreatitis aguda, enfermedad renal y hepática (Barrie *et al.* 1993; Fujiwara *et al.* 2013; Johnson 2005; Watson y Barrie 1993). Por su parte, la hipercolesterolemia se debe a alteraciones del metabolismo de las LDL y HDL (Watson y Barrie 1993).

En humanos, el análisis de las lipoproteínas puede realizarse mediante ultracentrifugación y la electroforesis del plasma, ya que la mayoría de los analizadores químicos pueden cuantificar las lipoproteínas del plasma y los triglicéridos de forma indirecta (Johnson 2005). Estas técnicas son poco practicadas en los laboratorios veterinarios a causa de los altos costos de los reactivos y al difícil entrenamiento del personal del laboratorio, igualmente en caninos son escasos o nulos los reportes donde se comparen técnicas de laboratorio y se validen métodos para determinar el perfil lipídico canino; debido a lo anterior, el método más utilizado para la cuantificación de colesterol LDL en caninos es la fórmula de Friedewald. Sin embargo, por lo anteriormente mencionado no se tiene seguridad de que este método sea efectivo en los perros y por lo tanto se crean dudas acerca de si es esta la técnica adecuada para dicha especie, aún más cuando existe controversia en la utilización de la fórmula de Friedewald en humanos.

En los perros, las anomalías de las lipoproteínas asociadas con hiperlipidemia primaria y secundaria se han identificado usando métodos cualitativos o semicuantitativos, electroforesis en gel de agarosa y electroforesis en bloque Geon-Pevickon, mientras que en la química clínica humana estas técnicas se han sustituido por métodos que permiten la medición directa de las concentraciones de las lipoproteínas (Barrie *et al.* 1993). El método más usado como referencia para determinar el colesterol LDL en el plasma es la ultracentrifugación, pero es costoso y requiere mucho tiempo, por lo tanto, la mayoría de los laboratorios han sustituido esta técnica por la fórmula de Friedewald, no obstante, se acepta que esta fórmula no es confiable cuando las

concentraciones de triglicéridos son muy altas, además se ha determinado algunas inexactitudes (Valverde-Chavez *et al.* 1994). En humanos, se han realizado estudios que comparan los niveles de colesterol LDL mediante el método precipitado y la fórmula de Friedewald, indicando que existe diferencia entre los valores obtenidos por ambos métodos cuando los niveles de triglicéridos son elevados y reportando que los valores obtenidos con la fórmula de Friedewald son menores (Eblen-Zajjur y Eblen-Zajjur 2001). Con el presente estudio también se pretendió comparar el método precipitado y la fórmula de Friedewald debido a la duda sobre cuál de los dos debe ser el recomendado para la determinación de colesterol LDL en caninos, partiendo de que ambos son económicos y de fácil acceso; sin embargo, al hacer la comparación se encontró diferencia estadísticamente significativa, así mismo, se evidenció que los valores obtenidos con la fórmula de Friedewald fueron más altos que los valores logrados con el método precipitado contradiciendo los estudios realizados por Eblen-Zajjur y Eblen-Zajjur 2001. Igualmente, se contradice con lo reportado por Valverde-Chaves *et al.* (1994), puesto que en su investigación no encontraron diferencias significativas entre ambos métodos. Contrario a ello, los resultados coinciden con lo expuesto por Osorio *et al.* (2012) en una investigación realizada en pollos de engorde.

Actualmente, los niveles de colesterol LDL en los perros se han cuantificado a través un método usado en humanos que combina la ultracentrifugación con la precipitación, siendo adaptado y validado para la medición de las lipoproteínas caninas (Barrie *et al.* 1993; Bolton *et al.* 1990). No obstante, Nauck *et al.* (2002) afirmaron que para seleccionar el método

de referencia la principal razón es tener exactitud y mantener la coherencia en las investigaciones y los resultados expuestos.

CONCLUSIÓN

Dado que se encontraron diferencias significativas entre los dos métodos analizados, y teniendo en cuenta las imprecisiones que se generan en la utilización de la fórmula de Friedewald, se recomienda utilizar el método precipitado.

BIBLIOGRAFÍA

- Barrie J, Watson TDG, Stear MJ, Nash AS. 1993. Plasma cholesterol and lipoprotein concentrations in the dog: The effects of age, breed, gender, and endocrine disease. *J Small Anim Pract.* 34(10): 507-512. Doi: 10.1111/j.1748-5827.1993.tb03523.x.
- Bauer JE. 2004. Lipoprotein-mediated transport of dietary and synthesized lipids and lipid abnormalities of dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc.* 224(5): 668-675. Doi: 10.2460/javma.2004.224.668.
- Bolton CH, Downs LG, Crispin S. 1990. Plasma lipoproteins of normal Golden Retrievers. *Biochem Soc Trans.* 18(5): 1004-1005. Doi: 10.1042/bst0181004.
- Coppo JA. 2001. Fisiología comparada del medio interno. Buenos Aires. Ed. Dunken.
- Eblen-Zajjur A, Eblen-Zajjur M. 2001. Cálculo de la concentración de colesterol de la lipoproteína de baja densidad: análisis de regresión *versus* fórmula de Friedewald. *Rev Méd Chile.* 129(11): 1263-1270. Doi: 10.4067/S0034-98872001001100005.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 18(6): 499-502.
- Fujiwara M, Sato T, Tazaki H, Yamamoto I, Kawasumi K, Arai T. 2013. Changes in plasma fatty acid composition in hyperlipidemia dogs. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances.* 8(4): 639-646. Doi: 10.3923/ajava.2013.639.646.

- Ginsberg HN. 1998. Lipoprotein physiology. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 27(3): 503–519. Doi: 10.1016/S0889-8529(05)70023-2.
- Hughes TA. 2006. Lipoprotein pathophysiology. En: *Index of /endocrinology/documents.* p. 1-24. [Internet]. [Citado: 2014 enero 13]. Disponible en: http://www.uthsc.edu/endocrinology/documents/LIPIDSYM_001.pdf.
- Johnson MC. 2005. Hyperlipidemia disorders in dogs. *Compendium.* 27: 361–370.
- Montgomery R. 1998. *Bioquímica: casos y texto.* 6° ed. Madrid. Harcourt/Brace.
- Nauck M, Warnick R, Rifai N. 2002. Methods for measurement of LDL-Cholesterol: A critical assessment of direct measurement by homogeneous assays versus calculation. *Clin Chem.* 48(2): 236–254.
- Ogedegbe HO, Brown DW. 2001. Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins and their disease associations. *Choles laboratory medicine.* 32(7): 384-389.
- Osorio JH, Flórez JD, Pérez JE. 2012. Evaluación de los métodos directo, precipitado y Friedewald para la cuantificación de colesterol LDL y HDL en pollos de engorde. *Rev Med Vet.* 24: 85-90.
- Osorio JH, Suarez YJ, Uribe-Velasquez LF. 2010. Metabolismo de los lípidos en caninos en el contexto de salud-enfermedad. *Vet Zootec.* 4(1): 83-97.
- Remaley AT, Rifai N, Warnick R. 2011. Lipids, lipoproteins, apolipoproteins, and other cardiovascular risk factors. En: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, editores. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and molecular diagnostics.* 5° ed. Philadelphia (PN): WB Saunders. p. 809–861.
- Trapani L, Segatto M, Pallottini V. 2012. Regulation and deregulation of cholesterol homeostasis: The liver as a metabolic “power station”. *World J Hepatol.* 4(6): 184-190. Doi: 10.4254/wjh.v4.i6.184.
- Valverde-Chaves G, Hidalgo-Quesada C, Echandi-Cruz L. 1994. Aplicabilidad de la fórmula de friedewald y de un método de precipitación en la determinación del LDL colesterol. *Rev Costarric Cienc Med.* 15(3-4): 43-50.
- Watson TDG, Barrie J. 1993. Lipoprotein metabolism and hyperlipemia in the dog and cat: A review. *J Small Anim Pract.* 34(10): 479–487.
- Xenoulis PG, Steiner JM. 2010. Lipid metabolism and hyperlipidemia in dogs. *Vet J.* 183(1): 12–21. Doi: 10.1016/j.tvjl.2008.10.011.

Article citation:

Osorio JH, Vinasco J. 2015. Determinación de los niveles de colesterol LDL comparando el método precipitado vs la fórmula de Friedewald en caninos [Determination of LDL cholesterol levels of comparing the precipitate method vs the Friedewald formula canine]. *Rev Med Vet Zoot.* 62(2): 10-15. Doi: 10.15446/rfmvz.v62n2.51986.