

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



**Valores referenciales de Colesterol, HDL, LDL, VLDL y
Triglicéridos en caninos mestizos (*Canis lupus familiaris*)
de 7 años a más, sin tomar en cuenta sexo y raza
en la ciudad de Cajamarca – 2022**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

Presentada por
Lucinda Magaly Silva Mego Vásquez

Asesor
M.Sc. Fernando Alberto Oblitas Guayán

CAJAMARCA – PERÚ

2023

COPYRIGHT © 2023 por
LUCINDA MAGALY SILVA MEGO VÁSQUEZ
Todos los derechos reservados



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
NORTE DE LA UNIVERSIDAD PERUANA
Licenciada el 13 de julio del 2018, Resolución N° 080-2018-SUNEDU/CD
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN
Av. Atahualpa 1050 – Ciudad Universitaria Edificio 2F – 205



CERTIFICADO DE ORIGINALIDAD

**EL QUE SUSCRIBE DIRECTOR DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA.**

CERTIFICA:

Expido el presente certificado a fin de informar que la tesis titulada: **“Valores referenciales de colesterol, HDL, LDL, VLDL y Triglicéridos en caninos mestizos (*Canis lupus familiaris*) de 7 años a más, sin tomar en cuenta sexo y raza; en la ciudadde Cajamarca-2022”**, corresponde a la Autoría Original a la Bachiller Lucinda Magaly Silva Mego Vásquez, como como puede corroborarse con el reporte de originalidad presentada por el asesor M.Sc. Fernando A. Oblitas Guayán, luego de haber sido analizado por el Software antiplagio URKUND, bajo el código D149090171, el cual arroja 17% de coincidencias, por lo de acuerdo a la normativa vigente de la Universidad Nacional de Cajamarca, procede a la sustentación respectiva. Se adjunta al presente el Reporte de Originalidad.

Atentamente

Cajamarca, 09 de noviembre del 2022

 Universidad Nacional de Cajamarca
Facultad de Ciencias Veterinarias

Dr. Miguel Enrique Chávez Farro
Director de la Unidad de Investigación



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
NORTE DE LA UNIVERSIDAD PERUANA
Fundada Por Ley N°14015 Del 13 De Febrero De 1962
UNIVERSIDAD LICENCIADA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
DECANATO

Av. Atahualpa 1050 - Ciudad Universitaria Edificio 2F - 205 Fono 076 365852



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Cajamarca, siendo las nueve horas del día nueve de noviembre del dos mil veintidós, se reunieron en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias “César Bazán Vásquez” de la Universidad Nacional de Cajamarca los integrantes del jurado calificador, designados por el Consejo de Facultad, con el objeto de evaluar la sustentación de Tesis titulada: **“VALORES REFERENCIALES DE COLESTEROL, HDL, LDL, VLDL Y TRIGLICÉRIDOS EN CANINOS MESTIZOS (*Canis lupus familiaris*) DE 7 AÑOS A MÁS, SIN TOMAR EN CUENTA SEXO Y RAZA, EN LA CIUDAD DE CAJAMARCA - 2022”** asesorada por el docente M.Sc. Fernando Alberto Oblitas Guayán y presentada por la Bachiller en Medicina Veterinaria: **LUCINDA MAGALY SILVA MEGO VÁSQUEZ.**


Acto seguido el presidente del jurado procedió a dar por iniciada la sustentación y para los efectos del caso se invitó al sustentante a exponer su trabajo.

Concluida la exposición de la Tesis, los miembros del jurado calificador formularon las preguntas que consideraron convenientes relacionadas con el trabajo presentado; asimismo, el presidente invitó al público asistente a formular preguntas concernientes al tema.

Después de realizar la calificación de acuerdo a las pautas de evaluación señaladas en el Reglamento de Tesis, el jurado calificador acordó: **APROBAR** la sustentación de Tesis para optar el Título Profesional de **MÉDICO VETERINARIO**, con el calificativo final obtenido de **QUINCE (15)**.

Siendo las once horas del mismo día, el presidente del jurado calificador dio por concluido el proceso de sustentación.


Dr. JORGE EDUARDO BURGA LEÓN
PRESIDENTE


Dr. RODOLFO GUSTAVO GAMARRA RAMÍREZ
SECRETARIO


Dr. GIUSEPPE MARTÍN REYNA COTRINA
VOCAL


M.Sc. FERNANDO ALBERTO OBLITAS GUAYÁN
ASESOR

DEDICATORIA

El presente trabajo está dedicado con mucho amor a la persona más importante de mi vida, Irina, mi hija, razón de mi vida y motivo de mi esfuerzo.

A mis padres Antonio y Vilma a quienes con su paciencia, esfuerzo y amor me han permitido cumplir un sueño más. Gracias por sembrar en mí semillitas de esfuerzo y valentía, de no temer las adversidades porque Dios está conmigo siempre.

A mis hermanos Adela, Isabel, Juan, Ángel, Lolita, que son mi apoyo incondicional.

Magaly

AGRADECIMIENTO

A Dios quien ha sido mi faro y mi fortaleza, y a su mano de misericordia y amor que está siempre conmigo todos los días de mi vida.

A mis padres por su apoyo incondicional y haberme hecho un ser humano de bien con principios, reglas y libertades.

A mis profesores por sus sabias enseñanzas.

A mi asesor M.Sc. Fernando Alberto Oblitas Guayán, por su comprensión, decidido apoyo, sus acertadas observaciones y por el valioso tiempo que dedicó al desarrollo y ejecución de mi tesis.

La Autora

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
MARCO TEÓRICO.....	3
1.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	3
1.2. BASES TEÓRICAS.....	7
1.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS	25
CAPÍTULO II.....	27
MARCO METODOLÓGICO	27
2.1. Ubicación geográfica	27
2.2. Diseño de la investigación.....	27
2.3. Método de investigación	29
2.4. Población, muestra y unidad de análisis	29
2.5. Técnicas e instrucciones de recopilación de la información	30
2.6. Técnicas para el procesamiento y análisis de la investigación.....	32
2.7. Equipos y materiales	33
CAPÍTULO III.....	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
3.1. Representación de resultados.....	35
CAPÍTULO IV.....	41
CONCLUSIONES.....	41
CAPÍTULO V.....	42
SUGERENCIAS.....	42
REFERENCIAS.....	43
ANEXOS.....	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Evaluación del perfil lipídico en caninos adultos alimentados con comida casera.	5
Tabla 2: Valores de referencia para caninos geriátricos Cajamarca bajo dietas diferentes: a) comercial, b) mixta (compuesta por la mezcla de dieta comercial y casera) y c) casera. Cajamarca, 2015.	6
Tabla 3.1. Promedios y coeficiente de variación (C.V.) de Colesterol Total, HDL, LDL, VLDL y triglicéridos en caninos mayores de 7 años de edad sin tener en cuenta el sexo ni raza.	35
Tabla 4: Valores de referencia de colesterol total, HDL (cuartiles 25 y 75 %), LDL, VLDL y triglicéridos ($X \pm 2DE$) de caninos mayores de 7 años sin tener en cuenta sexo ni raza.	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura de una Lipoproteína (27).....	15
Figura 2: Metabolismo de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad (LDL). Apo B-100, Apo C-II y Apo E son apolipoproteínas que constituyen componentes específicos de las lipoproteínas plasmáticas. C, colesterol; EC, ésteres de colesteril, lipoproteína de densidad intermedia; HDL, lipoproteína de alta densidad; TAG, triacilglicerol (30).	18
Figura 3: Metabolismo de las partículas de lipoproteínas de alta densidad (HDL). ABCA1, proteína transportadora; Apo, apolipoproteína; C, colesterol; EC, ésteres de colesterilo; IDL, lipoproteínas de densidad intermedia; LCAT, lecitina:colesterol aciltransferasa (30).....	19
Figura 4: La estructura básica de un triacilglicerol (también llamado triglicérido o una grasa neutra). El resto glicerol, indicado en naranja, está unido por tres enlaces éster a los grupos carboxilo de tres ácidos grasos cuyas colas están indicadas en verde (30).....	22

Lista de abreviaturas

LP:	Lipoproteínas
HDL:	Lipoproteínas de alta densidad
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad
VLDL:	Lipoproteínas de muy baja densidad
TG:	Triglicéridos
Q:	Quilomicrones
LPL:	Lipoproteína lipasa
IDL:	Lipoproteína de densidad intermedia
GK:	Glicerol kinasa
HMG-CoA:	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
FFA:	Ácidos grasos libres
REL:	Retículo endoplasmático liso
RER:	Retículo endoplasmático rugoso

RESUMEN

Este trabajo tuvo como finalidad establecer valores referenciales de Colesterol, HDL, LDL, VLDL y Triglicéridos. Se obtuvieron muestras de sangre de 42 caninos en estado de ayuno, mayores de 7 años, sin tomar en cuenta, sexo, raza. Se realizaron los exámenes de laboratorio para determinar colesterol total, HDL, LDL, y triglicéridos, mediante métodos enzimáticos y con colorimetría. Para las fracciones HDL y LDL se usó previamente, reactivo precipitante. Para el cálculo del VLDL se utilizó la fórmula de FRIEDWALD. Donde el Colesterol VLDL está representado por: $Col - VLDL = Colesterol\ Total - (HDLcol + LDLcol)$. Se usó el método de Shapiro – Wilk para conocer si los valores eran paramétricos o no. El resultado arrojó que las LDL, VLDL y triglicéridos siguieron una distribución normal, mientras que colesterol total y HDL tenían una distribución no paramétrica. Para determinar los valores de referencia para colesterol y HDL, se sometieron al método de los percentiles, cuartiles de 25 y el 75% respectivamente, y para los de distribución normal se usó el método de los promedios ($X \pm 2DE$). Se obtuvo como valores referenciales para las diferentes variables lo siguiente en mg/dL: colesterol 161,9 – 197,7, HDL 85,0 – 98,7, LDL 43,2 – 62,8, VLDL 22,8 – 30 y triglicéridos 113,7 – 150,4 mg/dL. Los valores referenciales son similares a los reportados por otros autores.

Palabras claves: Perfil lipídico, lípidos, colesterol, HDL, LDL, VLDL, triglicéridos.

ABSTRACT

The purpose of this work was to establish reference values for Cholesterol, HDL, LDL, VLDL and Triglycerides. Blood samples were obtained from 42 canines in a fasting state, older than 7 years, regardless of gender or breed. Laboratory tests were performed to determine total cholesterol, HDL, LDL, and triglycerides, using enzymatic methods and calorimetry. For the HDL and LDL fractions, precipitating reagent was previously used. For the calculation of VLDL, the FRIEDWALD formula was used. Where VLDL Cholesterol is represented by: $Col-VLDL = Total\ Cholesterol - (HDLcol + LDLcol)$. The Shapiro-Wilk method was used to find out if the values were parametric or not. The result showed that LDL, VLDL and triglycerides followed a normal distribution, while total cholesterol and HDL had a non-parametric distribution. To determine the reference values, the non-parametric distributions of total cholesterol and HDL were subjected to the method of percentiles, 25% and 75% quartiles, respectively, and for those with normal distribution, the method of means ($X \pm 2SD$) was used. The following values were obtained as reference values for the different variables: total cholesterol, high, low and very low density lipoprotein cholesterol and triglycerides were 161.9–197.7; 85.0–98.7; 43.3–62.7; 11.3–51.2; 113.7-150.4mg/dL. The reference values are similar to those reported by other authors.

Keywords: Lipid profile, lipids, cholesterol, HDL, LDL, VLDL, triglycerides.

INTRODUCCIÓN

Las grasas aportan calorías y ácidos grasos esenciales, facilitan la absorción de las vitaminas solubles (1). El aumento en el porcentaje de grasa corporal que ocurre con el envejecimiento del animal es, en parte, el resultado de un aumento de la incapacidad del cuerpo para metabolizar los lípidos. Una ligera disminución de la cantidad de grasa en la dieta puede beneficiar a los caninos y gatos gerontes, siempre que la grasa que permanezca en la dieta sea de alta digestibilidad y rica en ácidos grasos esenciales (2) .

Los perfiles bioquímicos, en este caso el perfil lipídico se ha utilizado en Medicina Veterinaria para la evaluación clínica de los pacientes que llegan a los establecimientos veterinarios con el objetivo de determinar sus concentraciones en el cuerpo del animal y valorar el estado metabólico de lípidos.

Los valores de referencia sirven para interpretar los resultados de las pruebas en paciente, por eso se recomienda que cada laboratorio clínico debe producir sus propios valores de referencia, y cada médico clínico debe interpretar los datos procedentes de un laboratorio clínico determinado según los intervalos de referencia establecidos por ese laboratorio. Pero la realidad es tozuda y, en este caso, las recomendaciones se han seguido muy poco, probablemente debido a las dificultades económicas y prácticas que conlleva la producción de valores de referencia (3).

Existen factores de riesgo que predisponen a contraer trastornos metabólicos de las grasas, tales como: edad, sexo, obesidad, sedentarismo, consumo excesivo de carbohidratos, grasas, enfermedades cardiovasculares, etc. (4)

Los objetivos específicos de esta investigación fueron: a) determinar las concentraciones séricas de colesterol en suero sanguíneo, b) determinar las concentraciones séricas de HDL en suero sanguíneo, c) determinar las concentraciones séricas de LDL en suero sanguíneo, d) determinar las concentraciones séricas de VLDL en suero sanguíneo, e) determinar las concentraciones séricas de triglicéridos en suero sanguíneo.

La investigación pretende establecer valores de referencia para colesterol total, HDL, LDL, VLDL y triglicéridos en caninos mayores de 7 años.

El método utilizado está conformado por una ficha clínica para obtener información de los individuos en estudio para evaluar, verificar y calificar para formar parte de la muestra de estudio. Las muestras de estudio obtenidas fueron transportadas a la clínica veterinaria donde se realizó las técnicas de MÉTODO ENZIMÁTICO y COLORIMETRÍA para colesterol, HDL, LDL y triglicéridos, para VLDL se calculó con la fórmula de FRIEDWALD, obteniendo así datos para su procesamiento estadístico con el método de los promedios y cuartiles, y así obtener valores de referencia para perfil lipídico en caninos mayores de 7 años.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

1.1.1. ESTUDIO DEL PERFIL LIPÍDICO EN CANINOS POR EDAD Y SEXO

En Colombia en la Universidad de Caldas, Laboratorio de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, se realizó un estudio de comparación de perfil lipídico en 6 grupos de caninos, diferenciados por edad y sexo. Los valores obtenidos ($X \pm DE$), expresados en mg/dL, para todos los grupos fue de: colesterol total $214,91 \pm 75,3$; triglicéridos $50,01 \pm 42,5$; col-HDL $133,73 \pm 40,11$; col-VLDL $10,00 \pm 8,51$; col-LDL $71,17 \pm 57,12$. De acuerdo con los valores obtenidos por los grupos descritos anteriormente se encontró que, en los machos jóvenes y los machos adultos, la variable colesterol total presenta diferencia estadística significativa con un nivel de confianza del 95%. Para las variables triglicéridos, colesterol VLDL y colesterol LDL no se encontró diferencia estadística significativa para ninguno de los 6 grupos. Para la variable HDL se encontró diferencia estadística significativa con un valor de 0,0377 en valor p del test F ($p < 0,05$) en el grupo jóvenes y adultos con un nivel de confianza del 95% siendo más alto en caninos jóvenes (5).

1.1.2. COLESTEROL TOTAL Y HDL EN EL ENVEJECIMIENTO DE CANINOS

Se analizaron 138 muestras de adultos sanos de raza criolla o sus cruces (74 machos y 64 hembras) mediante el método enzimático colorimétrico, para

establecer los valores de referencia para algunos lípidos sanguíneos. Una diferencia estadísticamente significativa no fue encontrada al comparar los valores obtenidos para los machos y las hembras. El usar la prueba t para comparar los diversos grupos de edades, los datos de 35 animales mayores de 7 años, muestran una diferencia significativa ($X \pm DE$) ($p < 0,05$) para el colesterol total $163,6 \pm 22,5$ mg/dL y el HDL 47 ± 19 mg/dL. Al comparar el grupo de los menores de 7 años valores medios (intervalo de confianza del 95%) de $201,3 \pm 11$ mg/dL colesterol total y $71,9 \pm 6,3$ mg/dL HDL (6).

1.1.3. PERFIL LIPÍDICO EN CANINOS ADULTOS BAJO TRES DIETAS

En el trabajo de investigación, denominado “Evaluación del perfil lipídico en caninos adultos bajo tres dietas, realizado en Arequipa 2018” se evaluó el perfil lipídico de caninos bajo 3 tratamientos: alimentados con comida casera, comida balanceada 1 y comida balanceada 2. Se evaluaron niveles de triglicéridos, colesterol, HDL, VLDL y LDL. No encontrándose diferencias significativas entre los 3 tratamientos para ninguna de las variables evaluadas. En el caso de los resultados del tratamiento 1 se tomaron 5 caninos y sus resultados se expresa en la **Tabla 1** (7):

Tabla 1: Evaluación del perfil lipídico en caninos adultos alimentados con comida casera.

N°	Nombre	Triglicéridos	Col. Total	Col HDL	Col. VLDL	Col. LDL
		mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL
1	Campanito	33,8	233,6	166,6	6,76	60,24
2	Linda	66,1	165	127,9	13,22	23,88
3	Lola	47,9	173,8	131,1	9,58	33,12
4	Martin	36,8	190,1	101,8	7,36	80,94
5	Martina	47,7	130,7	112,1	9,54	9,06

Carrillo, 2018

1.1.4. PERFIL LÍPIDOS EN CANINOS MAYORES DE 7 AÑOS

En el trabajo de investigación realizado en la ciudad de Cajamarca “Perfil lipídico en caninos (*Canis lupus familiaris*) Mayores de 7 años bajo dieta diferentes en la ciudad de Cajamarca”, se reporta valores de referencia (Tabla 2) para caninos geriátricos bajo tres dietas diferentes: a) dieta comercial, b) dieta mixta (compuesta por la mezcla de dieta comercial y dieta casera) y c) dieta casera. De este trabajo se obtuvo los resultados para los caninos mayores de 7 años, con una condición corporal aparentemente normal, alimentados con dieta casera y clasificados y distribuidos por sexo (8).

Tabla 2: Valores de referencia para caninos geriátricos Cajamarca bajo dietas diferentes: a) comercial, b) mixta (compuesta por la mezcla de dieta comercial y casera) y c) casera. Cajamarca, 2015.

Perfil Lipídico	Machos			Hembras		
	$\bar{X} \pm DE$	Rango	C.V. %	$X \pm DE$	Rango	C.V. %
Col. total	173,9 \pm 5,8	162,2-185,6	3,4	174,5 \pm 6,8	160,9-188,1	3,9
Triglicéridos	131,1 \pm 4,3	122,4-139,7	3,3	128,1 \pm 5,9	116,3-140	4,6
HDL	88,8 \pm 3,1	82,7-95	3,4	90,2 \pm 2,4	85,4-95	2,7
LDL	51,2 \pm 4,8	41,5-60,9	9,4	52,0 \pm 2,2	47,6-56,4	4,2
VLDL	26,2 \pm 0,9	24,5-0,9	3,3	25,6 \pm 1,2	23,3-28	4,6

Seminario y Oblitas (2015).

Leyenda: \bar{x} : Promedio, DE: desviación estándar,
C.V: coeficiente de variación, %: porcentaje.

1.2. BASES TEÓRICAS

1.2.1. GERIATRÍA CANINA

El inicio geriátrico, se da a partir de las tres cuartas partes de la vida esperada de acuerdo a la raza. Los caninos más pequeños tienen mayor esperanza de vida, alcanzando el rango a partir de los 11,5 años. Los caninos más grandes, por otro lado, alcanzan antes, variando el tiempo según su peso corporal (a partir de 7,5 a 10.9 años). Solamente el envejecimiento no es una enfermedad. Esto es si un proceso fisiológico de reducción progresiva de funciones biológicas (9).

La fisiología de la vejez ha sido poco estudiada y aun hoy se generan muchas dudas en cuanto a los mecanismos. El proceso de envejecimiento está bajo la influencia de factores genéticos, nutricionales y ambientales, además, la edad cronológica puede no reflejar con exactitud la edad fisiológica del animal (10).

Se considera que una mascota está entrando a la tercera edad por varios factores, entre ellos la genética de la raza, el tamaño, los hábitos de ejercicio, enfermedades previas, la alimentación, etc. (11).

La dieta es una parte primordial para mantener a un perro en buenas condiciones de salud, disminuyendo en su dieta el consumo de proteínas y grasas principalmente de mala calidad, ofreciendo alimentos de mejor calidad en proteína y grasa, debido a que los caninos geriatras tienen una

baja en su metabolismo y una actividad física limitada, es muy posible que la falta de ejercicio haga que tienden a acumular grasa y por lo tanto a un cuadro de obesidad (12).

La obesidad se define cualitativamente como un exceso de grasa corporal suficiente para producir enfermedad. También ha sido definida como una condición de balance energético positivo y una excesiva formación de tejido adiposo con efectos adversos en la morbilidad y mortalidad (13).

La salud y la longevidad se ven afectados por los depósitos excesivos de grasa en el cuerpo. Las enfermedades asociadas con la obesidad o que la obesidad exagera, incluyen desórdenes ortopédicos traumáticos o degenerativos, enfermedad cardiovascular que se manifiesta con insuficiencia cardíaca congestiva, intolerancia al ejercicio y al calor, predisposición a la diabetes *mellitus*, hipertensión, hiperlipidemias, carcinoma de células transicionales en vejiga y compromiso de la función inmune. Por otra parte, la obesidad y el sobrepeso aumentan el riesgo de sufrir tumores mamarios, y esto relacionado no solo con la obesidad sino con el consumo de comida casera y de carnes rojas.(13).

1.2.2. LÍPIDOS

Son compuestos apolares hidrófobos polimórficos, son parte esencial de los organismos vivos y pueden originarse completamente o en forma parcial de condensaciones de tioésteres o unidades de Isopreno (14).

Los lípidos en el plasma se encuentran en su totalidad asociados con proteínas formando complejos lipoproteicos llamados lipoproteínas (LP) que aseguran su transporte. Existen diferentes tipos de LP que difieren entre sí por su composición, tanto en sus componentes lipídicos como proteicos, clasificándose según su densidad en cinco grupos: quilomicrones (Q), LP de muy baja densidad (VLDL), de baja densidad (LDL), LP de densidad intermedia (IDL) y LP de alta densidad (HDL) (15).

1.2.3. PERFIL LIPÍDICO

Un perfil lipídico, también denominado lipidograma y perfil de riesgo coronario, es un grupo de pruebas o exámenes diagnósticos de laboratorio clínico, solicitadas generalmente de manera conjunta, para determinar el estado del metabolismo de los lípidos corporales, comúnmente en suero sanguíneo (16).

1.2.4. COLESTEROL

El colesterol es un componente de vital importancia para la estructura y la función de la membrana celular de los vertebrados. Es esencial para el crecimiento tisular y la síntesis de hormonas esteroideas. Los metabolitos del colesterol, tales como las sales biliares, las hormonas esteroideas y los oxisteroles realizan funciones biológicas importantes. Es evidente que la regulación adecuada de la homeostasis del colesterol es esencial (17).

El colesterol puede ser sintetizado prácticamente por todas las células, aunque los niveles de síntesis más elevados tienen lugar en el hígado y el intestino (18). El organismo sintetiza aproximadamente 1 g de colesterol al día a partir del acetil-CoA (19).

1.2.4.1. ESTRUCTURA DEL COLESTEROL:

Está compuesto por una molécula de ciclopentanoperhidrofenantreno, una cadena lateral formada por 8 átomos de carbono, dos grupos metilo, un grupo hidroxilo y también contiene un doble enlace (20).

El colesterol es un componente esencial de las membranas de las células de los mamíferos. También es el precursor de componentes importantes, como los ácidos biliares, las hormonas esteroideas y la vitamina D (21). Se encuentran en sus mayores concentraciones en las membranas plasmáticas (hasta un 25% del contenido lipídico). Las membranas son estructuras fluidas ricas en fosfolípidos y esfingolípidos, en las que las moléculas de lípidos y proteínas se mueven y experimentan cambios conformacionales (22). Cuanto más fluida es la bicapa fosfolipídica, más permeable será la membrana. A la temperatura corporal, las largas cadenas hidrocarbonadas de la capa lipídica disponen de un grado considerable de movilidad. El colesterol se coloca entre estas cadenas hidrocarbonadas, formando uniones laxas y, de ese modo,

reduciendo la fluidez. Esta relativa rigidez se ve incrementada aun si el colesterol se encuentra adyacente a ácidos grasos saturados. El colesterol se acumula en regiones en el interior de la bicapa lipídica (23).

1.2.4.2. SÍNTESIS DEL COLESTEROL:

El colesterol es un compuesto de 27 carbonos que consta de cuatro anillos y una cadena lateral (24). Se sintetiza a partir de acetil-CoA mediante una vía larga que puede dividirse en cinco pasos (21, 24).

- Primer paso: Biosíntesis de mevalonato: la HMG-CoA (3-hidroxi- 3-metilglutaril CoA) se forma por las reacciones que se usan en las mitocondrias para sintetizar cuerpos cetónicos. Empero, dado que la síntesis de colesterol es extramitocondrial, las dos vías son diferentes. Al principio, dos moléculas de acetil-CoA se condensan para formar acetoacetil-CoA, lo cual es catalizado por la tiolasa citosólica. La acetoacetil-CoA se condensa con otra molécula de acetil-CoA, paso catalizado por la HMG-CoA sintasa, para formar HMG-CoA, a la cual el NADPH reduce a mevalonato, reacción catalizada por la HMG-CoA reductasa. Éste es el principal paso regulador en la vía de la síntesis de colesterol, y es el sitio de acción de la clase más eficaz de fármacos que disminuyen el colesterol, las

estatinas, que son inhibidores de la HMG-CoA reductasa. (21, 24).

- Segundo paso: Formación de unidades isoprenoides: el ATP fosforila de modo secuencial el mevalonato mediante tres cinasas y, luego de descarboxilación, se forma la unidad isoprenoide activa, el isopentenil difosfato (21, 24).
- Tercer paso: Seis unidades isoprenoides forman escualeno: el isopentenil difosfato es isomerizado por medio de un desplazamiento del doble enlace para formar dimetilalil difosfato, que después se condensa con otra molécula de isopentenil difosfato para formar el intermediario de 10 carbonos geranil difosfato. Una condensación adicional con isopentenil difosfato forma farnesil difosfato. Dos moléculas de este último se condensan en el extremo difosfato para formar el escualeno. En un inicio se elimina el pirofosfato inorgánico, lo cual forma prescualeno difosfato, que luego se reduce mediante NADPH con eliminación de una molécula de pirofosfato inorgánico adicional (21, 24).
- Cuarto paso: Formación de lanosterol, el escualeno puede plegarse hacia una estructura que semeja de manera estrecha el núcleo esteroide. Antes de que se cierre el anillo, una oxidasa de función mixta en el retículo endoplásmico, la escualeno

epoxidasa, convierte al escualeno en escualeno 2,3-epóxido. El grupo metilo en el C14 se transfiere hacia C13 y el grupo metilo en C8 se transfiere a C14 conforme sucede ciclización, lo cual es catalizado por la oxidoescualeno:lanosterol ciclasa (21, 24).

- Quinto paso: Formación de colesterol, la formación de colesterol a partir de lanosterol tiene lugar en las membranas del retículo endoplásmico, e incluye cambios en el núcleo y la cadena lateral esteroides. Los grupos metilo en C14 y C4 se eliminan para formar 14-desmetil lanosterol y después zimosterol. El doble enlace en C8-C9 luego se mueve hacia C5-C6 en dos pasos, lo que forma desmosterol. Por último, el doble enlace de la cadena lateral se reduce, lo que genera colesterol (21, 24).

1.2.4.3. IMPORTANCIA BIOMÉDICA DEL COLESTEROL

Es un esteroide anfipático y, como tal, es un componente estructural esencial de la membrana celular de los animales, donde es importante para la integridad y funcionamiento de esta. Sirve para modular la rigidez y el mantenimiento de la permeabilidad y la fluidez correcta, y de la capa externa de las lipoproteínas plasmáticas el colesterol está presente en los tejidos y en el plasma, sea como colesterol libre o combinado con un ácido graso de cadena larga como éster de colesterol (almacenamiento). En el plasma,

ambas formas se transportan en lipoproteínas (24). La síntesis tiene lugar en el retículo endoplasmático de prácticamente todas las células animales a partir de la acetil-CoA, y es el precursor de todos los otros esteroides en el organismo, incluso corticosteroides, hormonas sexuales, ácidos biliares y vitamina D (24, 25).

Como un producto típico del metabolismo en animales, el colesterol se encuentra en alimentos de origen animal, como yema de huevo, carne, hígado y cerebro. La lipoproteína de baja densidad (LDL) plasmática es el vehículo que aporta colesterol y éster de colesterol hacia muchos tejidos. El colesterol libre se elimina de los tejidos por medio de la lipoproteína de alta densidad (HDL) plasmática, y se transporta hacia el hígado, donde se elimina del cuerpo, sea sin cambios o después de conversión en ácidos biliares en el proceso conocido como transporte inverso de colesterol. El colesterol es un constituyente importante de los cálculos biliares. Sin embargo, su principal participación en procesos patológicos es como un factor en la génesis de aterosclerosis de arterias vitales, lo que da por resultado enfermedad cerebrovascular, coronaria y vascular periférica (24).

1.2.5. LIPOPROTEÍNAS

Aunque el término lipoproteína puede describir a cualquier proteína que esté unida de forma covalente a grupos lipídicos, suele utilizarse para un grupo de complejos moleculares que se encuentran en el plasma sanguíneo de los mamíferos (en especial en el de los humanos). Las lipoproteínas plasmáticas transportan de un órgano a otro las moléculas lipídicas (triacilgliceroles, fosfolípidos y colesterol) a través del torrente sanguíneo (26).

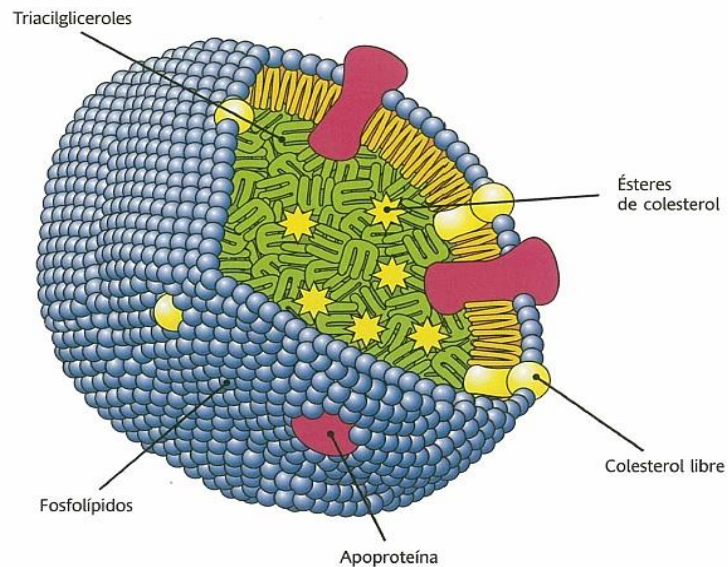


Figura 1: Estructura de una Lipoproteína (27).

1.2.5.1. CLASIFICACIÓN DE LAS LIPOPROTEÍNAS

Las lipoproteínas se clasifican según sus densidades, que se demuestran por medio de su separación centrífuga. Esa densidad va aumentando desde los quilomicrones (QM, la densidad más baja) pasando por las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las de

densidad intermedia (IDL) y las de baja densidad (LDL), a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (28).

Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL):

Se forman a partir de los triglicéridos y se sintetizan en el hígado, ya sea de novo o por reesterificación de los ácidos grasos libres. Las VLDL contienen también algo de colesterol, vienen de las HDL que hay en la circulación (28).

Lipoproteínas de baja densidad (LDL):

Son las principales transportadoras de colesterol, mayormente en forma de ésteres de colesterol. Las LDL se forman a partir de las VLDL por medio de las IDL. Las LDL pasan por las uniones entre las células del endotelio capilar y se adhieren a los receptores de LDL que hay sobre las membranas celulares que reconocen la Apo B-100. A esto sigue una internalización y una degradación lisosómica con liberación de colesterol libre (28).

Lipoproteínas de alta densidad (HDL):

Las lipoproteínas de alta densidad, o HDL, se caracterizan por su contenido en Apo A-I, teniendo también como componente principal los ésteres de colesterol. Su síntesis depende, por una parte, del catabolismo de las partículas ricas en triglicéridos

(quilomicrones y VLDL) y, por otra parte, de la síntesis de Apo A-I, en un principio no asociado a lípidos, por parte del hígado y del intestino (29).

1.2.5.2. METABOLISMO DE LIPOPROTEÍNAS

Se ensamblan en la superficie citoplásmica del retículo endoplasmático del hepatocito. Las moléculas nacientes de VLDL contienen apolipoproteína B-100, triacilgliceroles, fosfolípidos, colesterol y ésteres de colesterol. Una vez que las VLDL se secretan a la sangre, se transforman en VLDL maduras con la adquisición de apolipoproteínas C-II y E, que se transfieren desde las HDL. A continuación, las VLDL proceden a descargar los triacilgliceroles, cuando se encuentran con la LPL (activada por la apolipoproteína C-II), situada sobre todo en la superficie de las células blanco. Los ácidos grasos transportados a los adipocitos se convierten de nuevo en triacilglicerol que confluyen en gotitas de grasa. Los ácidos grasos que se transportan a las células musculares se oxidan para generar la energía necesaria para sostener la contracción muscular (26).

Una vez que se agota el contenido de triacilgliceroles de las VLDL, se denominan lipoproteínas de densidad intermedia (IDL). La eliminación de las IDL de la sangre por endocitosis está mediada

por la unión de la lipoproteína E con su receptor en la superficie de los hepatocitos. El contenido de triacilgliceroles de las IDL se reduce más por efecto de la lipasa hepática. Una vez que las IDL tienen mayor contenido de colesterol que de triacilgliceroles, las lipoproteínas se denominan LDL. Las LDL se liberan del hígado hacia la corriente sanguínea, que las lleva a los tejidos blanco (26). Después de la unión de la apolipoproteína B-100 con los receptores para LDL, éstas ingresan a las células por endocitosis y ahí liberan su contenido, principalmente de colesterol (26, 15).

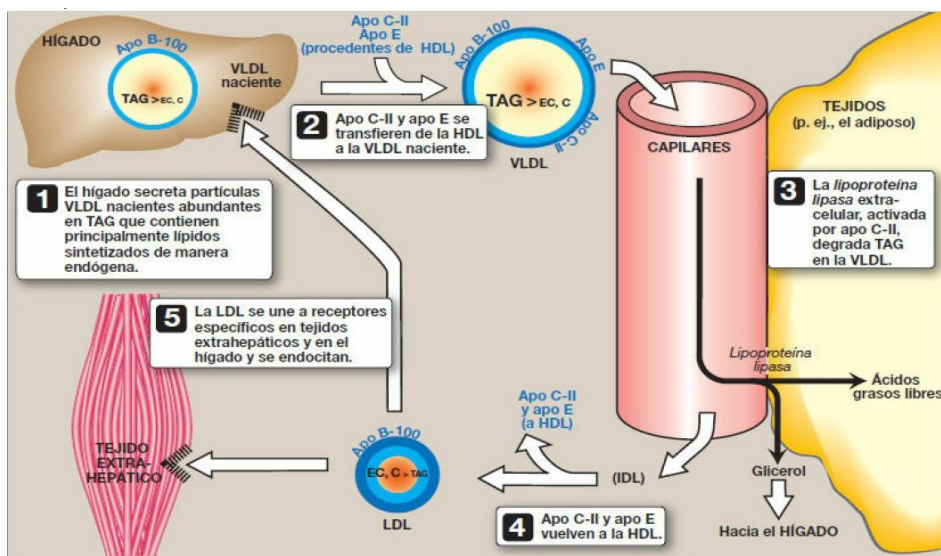


Figura 2: Metabolismo de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de baja densidad (LDL). Apo B-100, Apo C-II y Apo E son apolipoproteínas que constituyen componentes específicos de las lipoproteínas plasmáticas. C, colesterol; EC, ésteres de colesterol, lipoproteína de densidad intermedia; HDL, lipoproteína de alta densidad; TAG, triacilgliceroles (30).

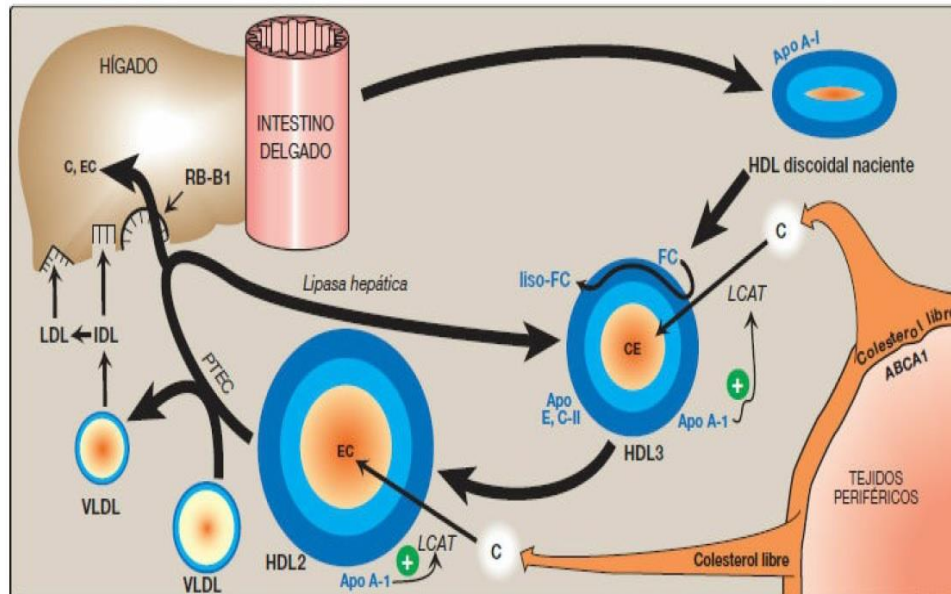


Figura 3: Metabolismo de las partículas de lipoproteínas de alta densidad (HDL). ABCA1, proteína transportadora; Apo, apolipoproteína; C, colesterol; EC, ésteres de colesterol; IDL, lipoproteínas de densidad intermedia; LCAT, lecitina: colesterol aciltransferasa (30).

1.2.5.3. IMPORTANCIA BIOMÉDICA DE LAS LIPOPROTEÍNAS

La grasa que se absorbe a partir de la dieta, y los lípidos sintetizados por el hígado y el tejido adiposo deben transportarse entre los diversos tejidos y órganos para su utilización y almacenamiento. Dado que los lípidos son insolubles en agua, el problema de cómo transportarlos en el plasma sanguíneo acuoso se resuelve al asociar los lípidos no polares (triacilglicerol y ésteres de colesterol) con lípidos (fosfolípidos y colesterol) y proteínas anfipáticas para hacer lipoproteínas miscibles en agua. Los omnívoros (como el humano) que están alimentándose ingieren calorías en exceso en la fase anabólica del ciclo de alimentación lo cual va seguido por un

periodo de balance calórico negativo cuando el organismo recurre a sus reservas de carbohidratos y grasas. Las lipoproteínas median este ciclo al transportar lípidos desde los intestinos como quilomicrones y desde el hígado como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) hacia casi todos los tejidos para oxidación y hacia el tejido adiposo para almacenamiento. El lípido se moviliza desde el tejido adiposo como ácidos grasos libres (FFA) unidos a la albúmina sérica. Las anomalías del metabolismo de lipoproteínas dan por resultado diversas hipolipoproteinemias o hiperlipoproteinemias. La más frecuente de éstas se observa en la diabetes mellitus, en la cual la deficiencia de insulina origina movilización excesiva de FFA y subutilización de quilomicrones y VLDL, lo que conduce a hipertriacilglicerolemia (hipertrigliceridemia). Casi todos los otros estados patológicos que afectan el transporte de lípidos se deben principalmente a defectos hereditarios, algunos de los cuales causan hipercolesterolemia y aterosclerosis prematura. La obesidad en especial la abdominal es un factor de riesgo para mortalidad aumentada, hipertensión, diabetes mellitus tipo 2, hiperlipidemia, hiperglucemia y diversas disfunciones endocrinas (24).

1.2.6. TRIACILGLICEROLES

También son denominados grasas o triglicéridos. Polímeros que consisten en un esqueleto de glicerol unido por enlaces éster a tres ácidos grasos, comúnmente llamados grasas (31, 32).

Los triacilgliceroles del tejido adiposo son la principal reserva de combustible del cuerpo (24).

1.2.6.1. ESTRUCTURA DEL TRIACILGLICEROL

Para hablar de su conformación, empezaremos hablando de la estructura de los ácidos grasos. Los ácidos grasos son cadenas de hidrocarburos largas, no ramificadas con un único grupo carboxilo en un extremo. Debido a que los dos extremos de una molécula de ácido graso tienen una estructura muy diferente, también tienen distintas propiedades. La cadena de hidrocarburos es hidrofóbica, mientras que el grupo carboxilo (-COOH) que tiene una carga negativa a pH fisiológico, es hidrofílico. Se dice que las moléculas que tienen ambas regiones hidrofóbicas e hidrofílicas son anfipáticas, tales moléculas tienen propiedades inusuales y biológicamente importantes (32).

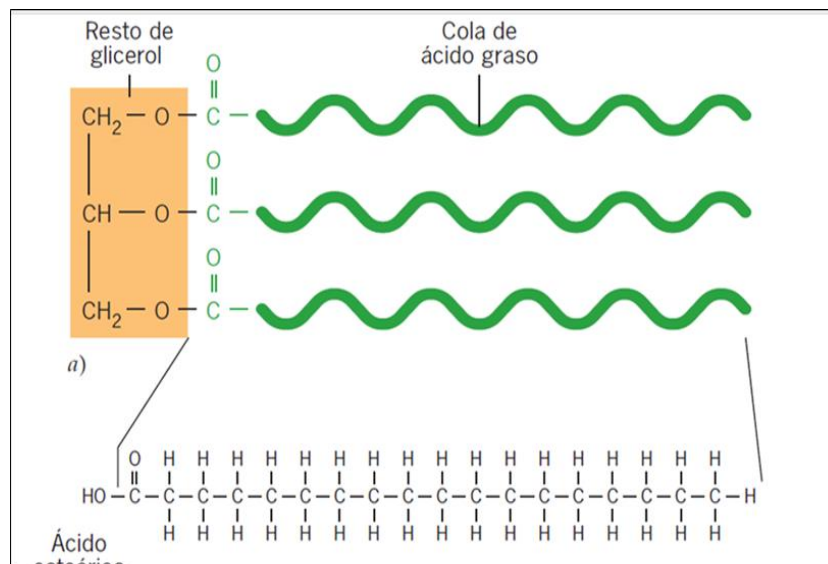


Figura 4: La estructura básica de un triacilglicerol (también llamado triglicérido o una grasa neutra). El resto glicerol, indicado en naranja, está unido por tres enlaces éster a los grupos carboxilo de tres ácidos grasos cuyas colas están indicadas en verde (30).

1.2.6.2. BIOSÍNTESIS DE TRIACILGLICEROL

La síntesis de los triacilglicéridos, que tiene lugar en el retículo endoplásmico liso (REL) de células adiposas y hepáticas, se origina mediante la esterificación secuencial de una molécula de glicerol-3-fosfato con tres moléculas de acil CoA (ácidos grasos activados). Requiere la formación previa de un fosfolípido intermediario, el ácido fosfatídico, compuesto por dos ácidos grasos, glicerol y un grupo fosfato (27).

El proceso de síntesis del ácido fosfatídico se puede dividir en diversas etapas:

- Síntesis de glicerol-3-fosfato, a partir de glicerol por la acción de la glicerol quinasa (principalmente en hígado y riñón) o mediante la reducción de la dihidroxiacetona fosfato a glicerol-3 -fosfato por catálisis de la glicerol-3-P deshidrogenasa, reacción típica de los adipocitos (27).
- Activación de los ácidos grasos, por efecto de la acil CoA sintetasa (27).
- Transferencia de los ácidos grasos activados para originar el ácido fosfatídico, gracias a la actuación de acil transferasa que transfieren los ácidos grasos de la molécula de acil CoA a la posición 1 y 2 del glicerol-3-P (27).
- El ácido fosfatídico originado no sólo sirve para la síntesis de triacilglicéridos, sino también para la síntesis de fosfoglicéridos. En la formación de un triacilglicérido, el ácido fosfatídico debe desprenderse del grupo fosfato presente en la posición 3, proceso que ocurre gracias a la acción de una fosfatasa. El ácido fosfatídico fosfatasa deja, tras su acción, un diacilglicerol. El diacilglicerol se transformará en triacilglicerol mediante la acil transferasa que transferirá un ácido graso procedente de una molécula de acil CoA a la posición 3. Finalmente, los triacilgliceroles pueden almacenarse en el citoplasma en grandes gotas, como ocurre en

los adipocitos, o incorporarse en vesículas de secreción (en lipoproteínas), en intestino e hígado, o leche en la glándula mamaria (27).

1.2.6.3. IMPORTANCIA BIOMÉDICA DEL TRIACILGLICEROL

Los lípidos son un grupo de compuestos heterogéneos, que incluye grasas, aceites, esteroides, ceras y compuestos relacionados más por sus propiedades físicas que por sus propiedades químicas. Tienen la propiedad común de ser: 1) relativamente insolubles en agua y 2) solubles en solventes no polares, como éter y cloroformo. Son constituyentes importantes de la dieta no sólo debido al alto valor energético de las grasas, sino también porque los ácidos grasos esenciales y las vitaminas liposolubles y otros micronutrientes lipofílicos están contenidos en la grasa de los alimentos naturales. Se cree que los complementos de la dieta con ácidos grasos Omega 3 de cadena larga tienen efectos beneficiosos en diversas enfermedades crónicas, entre ellas enfermedad cardiovascular, artritis reumatoide y demencia. La grasa se almacena en el tejido adiposo, donde también sirve como un aislante térmico en los tejidos subcutáneos y alrededor de ciertos órganos. Los lípidos no polares actúan como aislantes eléctricos y permiten la propagación rápida de ondas de despolarización a lo largo de nervios

mielinizados. Los lípidos son transportados en la sangre, combinados con proteínas en partículas de lipoproteína (24).

Cuando la alimentación se torna irregular, no balanceada y se altera el equilibrio de los nutrientes prevaleciendo grasas y carbohidratos se pierde el beneficio inicial de los lípidos obtenidos en el metabolismo y son responsables de la presentación de diversas enfermedades como la obesidad, diabetes e hiperlipoproteinemia. (24).

1.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

- Hiperlipidemia: Son trastornos en los lípidos en sangre caracterizados por un aumento de los niveles de colesterol y triglicéridos.
- Diabetes mellitus: Es un grupo de enfermedades caracterizadas por hiperglucemia como consecuencia de defectos en la secreción y/o acción de la insulina.
- Tioester: Son compuestos que resultan de la unión de un sulfuro con un grupo acilo con la fórmula general $R-S-CO-R'$. Son un producto de la esterificación entre un ácido carboxílico y un tiol.
- Isopreno: son lípidos no hidrolizables presentes sobre todo como aceites esenciales (terpenos, carotenos).

- Lipoproteínas (LP): Son macromoléculas cuya función es empaquetar los lípidos insolubles en el medio acuoso del plasma y transportarlos desde el intestino y el hígado a los tejidos periféricos y, desde éstos, devolver el colesterol al hígado para su eliminación del organismo en forma de ácidos biliares fundamentalmente.

CAPÍTULO II

MARCO METODOLÓGICO

2.1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA

El Laboratorio Clínico Veterinario “Huellitas” está ubicado en la ciudad de Cajamarca, capital de la región del mismo nombre, que se ubica en el valle interandino del río Mashcón, perteneciente a la vertiente occidental de los Andes del norte del Perú, a una altitud de 2750 msnm. En la ciudad de Cajamarca y alrededores el clima es seco, templado y soleado durante el día, refrigerado en la noche. Estación de lluvias intensas setiembre - abril. Las lluvias determinan durante el año dos estaciones: secos y lluvioso. Está ubicada en Latitud: 7° 9' 23" Sur, Longitud: 78° 30' 56" Oeste¹.

2.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Este presente estudio se clasificó dentro de una investigación no experimental, en otras palabras, este trabajo se realizó sin manipular deliberadamente las variables. Se basó fundamentalmente en la observación de las concentraciones de lípidos y fracciones tal y como se encuentran en su contexto natural para después cuantificarlos. Se desarrolló dentro del diseño no experimental, un diseño

¹ SENAMHI- CAJAMARCA

Transeccional de tipo descriptivo, o sea, se recolectaron datos sobre cada una de las variables y se reportaron los datos que se obtuvieron previo análisis de laboratorio.

El trabajo de investigación procesado incluyó las siguientes etapas: observación, definición del problema, investigación (planificación, evaluación de las evidencias), formulación de la hipótesis, experimentación (prueba de la hipótesis), evaluación y análisis.

Sin embargo, antes de plantear las etapas de la investigación científica se tomó en cuenta el objetivo que es establecer valores referenciales de lípidos séricos de caninos (*Canis lupus familiaris*) de 7 años a más, sin tomar en cuenta sexo, raza, dado que este determinó los objetivos específicos a seguir y los métodos que se eligieron para el logro de estos.

Al no haber contado con estudios y/o información relativos a valores referenciales de las concentraciones de colesterol, HDL, LDL, VLDL y triglicéridos, se planteó recolectar información a partir de los análisis de laboratorio de muestras sanguíneas de una población de caninos representativos, sin tomar en consideración sexo y edad.

Los criterios que se tomaron en cuenta fueron: 1) estudiar un número representativo de caninos, en concordancia con los criterios de la patología clínica, que nos permitió llevar exitosamente la investigación con ahorro de tiempo y recursos; 2) estudiar a la totalidad de los caninos con las características expuestas; 3) preservar la calidad del estudio, al disponer de materiales y equipos en óptimas condiciones, el número de observaciones y mediciones efectuadas a un número de individuos, tal

como se planteó, que pueden ser más exactas; 4) en un sentido estricto y ético no fue necesario estudiar al total de la población ya que con una proporción de animales en estudio se puede alcanzar los objetivos del estudio.

El uso de instrumentos de investigación se aplicó permanentemente durante todo el estudio.

2.3. MÉTODO DE INVESTIGACIÓN

Se empleó un método hipotético-deductivo porque se tomó como punto de partida una hipótesis o explicación inicial, para luego haber obtenido conclusiones particulares de ella, que fueron comprobadas analíticamente. Es decir, se dio un paso inicial en base a inferencias empíricas (observación) que permitieron deducir una hipótesis inicial que luego fue sometida a análisis de laboratorio.

Descriptivo: Porque permitió tener una medición de las concentraciones de los lípidos presentes en los caninos, la observación y registro de las concentraciones lipídicas individuales, además he podido comparar todos los datos obtenidos, apoyados en el análisis estadístico.

2.4. POBLACIÓN, MUESTRA Y UNIDAD DE ANÁLISIS

Población: Una aproximación de 20 mil animales abandonados y unos 3 mil caninos del perímetro urbano de Cajamarca (33).

Muestra: Se han utilizado 42 caninos mestizos con similar conformación, de 7 años a más, de ambos sexos, sin tomar en cuenta sexo y raza. Los animales en estudio fueron del perímetro de la ciudad de Cajamarca.

Unidad de análisis: Fueron 42 muestras de sangre tomadas de caninos mestizos de 7 años a más, que se encontraron en el perímetro de la ciudad de Cajamarca, a los cuales se les extrajo sangre, para el análisis correspondiente.

Tamaño muestral: Se tomó deliberadamente o por juicio, lo que implica que los investigadores seleccionaron cuidadosamente a cada individuo para que forme parte de la muestra.

2.5. TÉCNICAS E INSTRUCCIONES DE RECOPIACIÓN DE LA INFORMACIÓN

2.5.1. OBTENCIÓN DE LOS CANINOS

Fueron mascotas mayores a siete años aparentemente, sanos que se encontraban dentro del perímetro de la ciudad de Cajamarca sin tener en cuenta raza y sexo. Contando con el permiso y consentimiento de los dueños para la toma de muestra con quienes se coordinó, un día antes del muestreo, el ayuno del canino por un mínimo de 12 horas.

2.5.2. OBTENCIÓN DE MUESTRA DE SANGRE

Se tomó las muestras aproximadamente entre las 7:00 y 8:00 am. Se realizó preferentemente del miembro anterior derecho efectuando una punción de la vena cefálica, previa desinfección con alcohol de 70°, se usó el sistema al vacío y la recolección de sangre se hizo en tubos sin anticoagulante (tapa

color rojo²). Luego, se transportó al Laboratorio “Huellitas” donde se dejó coagular a las muestras para posteriormente someterlas a incubación en baño maría por 60 minutos a 37°C. Transcurrido ese tiempo se separó el coágulo de las paredes del tubo y se centrifugó a 1500 rpm por 10 minutos. Se separó el suero obtenido en 2 tubos de 1,5 mL de capacidad cada uno y se refrigeró entre 2 a 8°C hasta su análisis respectivo.

2.5.3. RECOPIACIÓN DE LOS DATOS

Los resultados de las pruebas laboratorio, información requerida, datos del canino y del dueño se registraron en una ficha expresamente elaborada para este fin.

Determinación de perfil lipídico

- ✓ Colesterol total sérico: Método enzimático para la determinación de colesterol en suero o plasma, mediante el reactivo Colestat enzimático® (anexo 2).
- ✓ Colesterol-HDL sérico: Método para la separación de lipoproteínas de alta densidad en suero o plasma, mediante el reactivo HDL colesterol – reactivo precipitante® (anexo 3).
- ✓ Colesterol-LDL sérico: Método para la separación de lipoproteínas de baja densidad en suero, mediante el reactivo LDL colesterol – reactivo precipitante® (anexo 4).

² Tubos al vacío Vacutainer®. Laboratorios BD Vacutainer

- ✓ Colesterol-VLDL en sangre: Método matemático usando la fórmula de FRIEDWALD. Donde el Colesterol de la fracción LDL está representado por: $Col - LDL = Colesterol Total - \left(HDLcol + \frac{TG}{5} \right)$, donde vendría a ser que el $Col - VLDL = \left(\frac{TG}{5} \right)$.
- ✓ Triglicéridos séricos: Método enzimático TG-color/GPO-PAP AA® (anexo 5).

2.5.4. TÉCNICAS PARA EL PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INVESTIGACIÓN

Los procedimientos desarrollados fueron los siguientes:

- El procesamiento estadístico de los datos se hizo en Microsoft® Excel® para Microsoft 365 MSO (versión 2204 compilación 16.0.15128.20158) de 64 bits. real Statistics Resource pack for Excel.
- Por medio de tablas y gráficos estadísticos se representa los resultados, los cuales se elaboraron teniendo como origen los datos obtenidos en los análisis respectivos. Se hallaron, también, medias, desviación estándar, mediana y rango intercuartílico. Para determinar la normalidad de los resultados obtenidos se utilizó el diseño estadístico de Shapiro - Wilk ($n < 50$) donde se encontró que los resultados de Colesterol Total y HDL no son paramétricos y el resto de las variables provienen de una distribución normal. De acuerdo a este resultado, para encontrar los valores referenciales, en el caso de colesterol total y HDL se empleó el Método de los Percentiles, en el cual se consideraron los valores

mínimos cuartil 25% y los valores máximos cuartil 75% (valores de referencia no paramétricos) y en los de distribución normal el Método de los Promedios, que es un método tradicional que se calcula en base al valor matemático del promedio, más menos el doble de la desviación estándar ($X \pm 2DE$), el cual es considerado un proceso de cálculo paramétrico.

2.6. EQUIPOS Y MATERIALES

2.6.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Cuarenta y dos caninos mestizos de 7 años a más, indistintamente del sexo y raza, del perímetro de la ciudad de Cajamarca.

2.6.2. MATERIALES PARA LA TOMA DE MUESTRA

- ✓ Guantes
- ✓ Torundas de algodón
- ✓ Alcohol etílico al 70 % (v/v)
- ✓ Agujas hipodérmicas # 21
- ✓ Ligadura
- ✓ Bolsas para residuos biológicos
- ✓ Tubos de vacío Vacutainer³ sin anticoagulante
- ✓ Gradilla para tubos
- ✓ Lápiz

³ Tubos al vacío Vacutainer. Becton, Dickinson and Company

- ✓ Libreta con datos del paciente
- ✓ Ficha clínica
- ✓ Chaqueta blanca

2.63. MATERIALES DE LABORATORIO

- ✓ Espectrofotómetro UV-VIS, marca Mettler-Toledo, modelo Excellence
- ✓ Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados
- ✓ Tubos de ensayo de 10mm x 10mm, marca Kimax®
- ✓ Cubetas Standard®, marca Mettler – Toledo
- ✓ Baño maría 37°C
- ✓ Reloj de laboratorio
- ✓ Agua oxigenada

2.6.4. REACTIVOS

Prueba colestat enzimático (ver anexo 2).

Prueba HDL Colesterol Reactivo Precipitante ((ver anexo 3).

Prueba LDL Colesterol Reactivo Precipitante (ver anexo 4).

Prueba TG color (ver anexo).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

3.1.1. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL TOTAL, HDL, LDL, VLDL Y TRIGLICÉRIDOS

Tabla 3: Promedios y coeficiente de variación (C.V.) de Colesterol Total, HDL, LDL, VLDL y triglicéridos en caninos mayores de 7 años de edad sin tener en cuenta el sexo ni raza.

Variable	Promedio (mg/dL)	C.V. (%)
Colesterol	176,8	9,7
HDL	92,6	9,9
LDL	53,0	9,1
VLDL	26,4	7,0
TG	132,1	7,0

Luego de determinar las características de la población para ver si estaba distribuida normalmente o no, mediante el método de Shapiro – Wilk ($n < 50$) la cual arrojó como resultado que solo las LDL, VLDL y triglicéridos siguieron una distribución normal y colesterol total y HDL tenían una distribución no paramétrica. En la elaboración de valores de

referencia, para los de distribución normal; se usó el método de los promedios y de los cuartiles 25 y 75 % para los no paramétricos.

De acuerdo con estas premisas se obtuvo los resultados mostrados en la Tabla 4.

Tabla 4: Valores de referencia de colesterol total, HDL (cuartiles 25 y 75 %), LDL, VLDL y triglicéridos ($X \pm 2DE$) de caninos mayores de 7 años sin tener en cuenta sexo ni raza.

Variables	Promedio \pm DE (mg/dL)	Valores Referenciales (mg/dL)
Colesterol Total	176,8 \pm 17,2	161,9 – 197,7
HDL	92,6 \pm 9,2	85,0 – 98,7
LDL	53,0 \pm 4,9	43,2 – 62,8
VLDL	26,4 \pm 1,8	22,8– 30
Triglicéridos	132,1 \pm 9,2	113,7- 150,5

En la tabla 4 se puede observar los valores de referencia (mg/dL) de colesterol total, HDL, LDL, VLDL y Triglicéridos, son: 161,9 – 197,7; 85,0 – 98,7; 43,2 – 62,8; 22,8 – 30,0; 113,7 – 150,5, respectivamente. En la misma tabla se observa que el VLDL y triglicéridos se presentaron con valores elevados, esto se debería al tipo de comida casera que los animales consumen, la cual en su mayor parte está constituida por carbohidratos y restos de grasa animal.

3.1.2. COLESTEROL TOTAL

El promedio para colesterol total en caninos mayores de 7 años ($X \pm DE$) es de $176,8 \pm 17,2$ mg/dL. Estudios realizados por Osorio (5) en la Universidad de Caldas, Manizales, Colombia, donde se evaluó el perfil lipídico de 156 caninos en estado de ayuno, diferenciados por sexo y edad (32 machos y 34 hembras menores de un año, y 42 machos adultos y 48 hembras mayores de un año), mediante el método colorimétrico para colesterol total, triglicéridos y HDL, y para LDL y VLDL con el método de Friedewald, determinando una media para colesterol de $214,91 \pm 75,3$. Muñoz, y Morgaz *et al* (34), reportan valores de referencia en caninos, indicando para colesterol total un rango de 100-300 mg/dL. Del mismo modo, Nelson y Couto (35) informan valores de referencia para colesterol de 125 – 300 mg/dL. Como se advierte, los valores obtenidos en este estudio son menores que los encontrados en las otras investigaciones. Esta diferencia puede deberse a las características dadas en el manejo, sanidad y salud de estos animales; también a la edad (>7 años) donde se aprecia un metabolismo más lento, factores ambientales adversos, enfermedades asintomáticas y a una deficiente nutrición.

3.1.3. COLESTEROL HDL

La concentración promedio de Colesterol HDL en este estudio es de $92,6 \pm 9,2$ mg/dL con valores referenciales de 85,0 – 98,7 mg/dL. Según un estudio realizado por Coppo *et al* (36), donde se evaluaron 59 caninos

normocolesterolémicos de distinta raza, sexo, edad y tipo de alimentación, se obtuvieron valores referenciales de 89 – 149 mg/dL. Los valores encontrados en el presente estudio son diferentes a los reportados por Coppo *et al* (36) que resultan ser más altos, situación que se debería a una mayor dispersión de datos obtenidos en el trabajo argentino debido a que no se tomaron en cuenta los factores etarios, sexo, raza y tipo de alimentación, ocasionando mayor variabilidad.

3.1.3. COLESTEROL LDL

El promedio para colesterol LDL en caninos mayores de 7 años ($X \pm DE$) es de $53,0 \pm 4,9$ mg/dL, con valores de referencia de 43,2 – 62,8 mg/dL. Es así que, según un estudio realizado por Coppo *et al* (36), donde se tomaron muestras a 59 caninos clínicamente sanos (33 hembras y 26 machos) de distintos barrios de las ciudades de Corrientes y Resistencia, pertenecientes a casas de familia y a un criadero privado; fueron agrupados de acuerdo al sexo, edad (1 a 12 años), raza (varias) y alimentación (balanceada o restos de comida). Tomando 10 caninos del grupo etario de 7 a 12 años, obtuvieron ($X \pm DE$) de 40 ± 17 mg/dL, este valor está por debajo del promedio de nuestro estudio. Esta diferencia podría deberse a un mayor contenido de grasas en la comida casera de los animales de este estudio o podría ser a algunas enfermedades como es la pancreatitis y colestasis (19), en el caso de Coppo *et al* a la variedad de razas en estudio, sexo, variables fisiológicas, dietas ricas en grasa (36).

3.1.4. COLESTEROL VLDL

El promedio obtenido para VLDL en caninos mayores de 7 años ($X \pm DE$) es de $26,4 \pm 1,8$ mg/dL, con valores de referencia de 22,8 – 30 mg/dL. Estudios realizados por Osorio (5) en la Universidad de Caldas, Manizales, Colombia, donde se evaluó el perfil lipídico de 156 caninos en estado de ayuno, diferenciados por sexo y edad (32 machos y 34 hembras menores de un año, y 42 machos adultos y 48 hembras mayores de un año) mediante el método de Friedewald, obteniendo una media para VLDL de $10,0 \pm 8,51$. Como se advierte, los valores obtenidos en este estudio son diferentes y/o más elevados que los encontrados en esa investigación. Esta diferencia se debería a las características dadas en el manejo, sanidad, fisiología de los animales de este estudio, factores ambientales (36) o a la presencia de enfermedades como son: caquexia, síndrome nefrótico, hiperadrenocorticismismo (37).

3.1.5. TRIGLICÉRIDOS

El promedio obtenido para triglicéridos en caninos mayores de 7 años ($X \pm DE$) es de $132,1 \pm 9,2$ mg/dL, con valores de referencia de 113,7-150,5 mg/dL. Estudios realizados por Osorio (2), donde se evaluó el perfil lipídico de 156 caninos en estado de ayuno, diferenciados por sexo y edad (32 machos y 34 hembras menores de un año, y 42 machos adultos y 48 hembras mayores de un año) mediante el método de Friedewald. La media para triglicéridos es $50,01 \pm 42,5$. Como se ve los valores obtenidos en este

estudio, cuyos animales muestreados son alimentados a base de residuos de cocina (comida casera) y en la que predominan los componentes grasos y de carbohidratos, son más elevados que los encontrados en esa investigación. Probablemente esta diferencia se deba a factores nutricionales, fisiológicos y enfermedades coronarias que son poco conocidas en esta especie (5). El consumo de alimentos muy ricos en grasa puede provocar una hiperlipidemia y una elevación moderada de las concentraciones séricas de triglicéridos y de colesterol (19).

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

- 5.1. Los valores de referencia de colesterol, HDL, LDL, VLDL y triglicéridos séricos son, respectivamente: 161,9 – 197,7; 85,0 – 98,7; 43,2 – 62,8; 22,8– 30; 113,7-150,5, están dentro de los parámetros normales comparados con otros autores.

- 5.2. Los resultados en colesterol total y HDL mostrados en este trabajo y comparados con la bibliografía demuestran que éstos son más bajos con respecto a los de animales menores de 7 años de edad.

CAPÍTULO V

SUGERENCIAS

Se recomienda realizar otros estudios en poblaciones caninas tomando en cuenta factores que alteren el perfil lipídico, como es el caso de la obesidad, las enfermedades (diabetes mellitus, hipotiroidismo, pancreatitis, colestasis, caquexia, síndrome nefrótico, hiperadrenocorticismos), las razas especialmente las que presentan riesgo (*Collie* y el *Border collie*), las dietas ricas en grasa, el estado físico del animal o el sedentarismo.

REFERENCIAS

1. FAO. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana Consulta de expertos. Estudio FAO alimentación y nutrición. Ginebra; 2008. 1-204 p.
2. Case L., Daristotle L., Hayek M., Raasch M. Nutrición en caninos y felinos- A Resource for Companion Animal Professionals. 3.^a ed. Argentina: Elsevier; 2012. 618 p.
3. Fuentes X. Valores de referencia biológicos, acreditación y armonización. Rev del Lab Clínico [Internet]. 1 de abril de 2012 [citado 16 de mayo de 2022];5(2):55-6. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-del-laboratorio-clinico-282-articulo-valores-referencia-biologicos-acreditacion-armonizacion-S1888400811001140>
4. Morales C. Obesidad en caninos : epidemiología, fisiopatología y evaluación clínica [tesis de grado]. [Lima]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
5. Osorio J., Suárez Y., Pérez J. Estudio del perfil lipídico canino por edad y sexo. Rev Med Vet (Bogotá). 2012;(23):65.
6. Osorio J. Total Cholesterol and Hdl-Cholesterol in Aging Dogs. Biosalud [Internet]. 4 de mayo de 2006;5(January):19-24. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/265744383>
7. Carrillo S. Evaluación del perfil lipídico en perros adultos raza mediana bajo tres dietas, Arequipa 2018 [Internet] [Escuela Profesional de Medicina Veterinaria y Zootecnia «evaluación»]. Universidad Católica de Santa María Facultad; 2018. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/198123641.pdf>
8. Seminario G., Oblitas F. Perfil lipidico en caninos (*Canis lupus familiaris*) mayores de 7 años bajo dieta diferentes en la ciudad de Cajamarca. Universidad Nacional de Cajamarca; 2015.

9. Moreira L., Kinappe L., Duhart D., De Souza Da Motta A. A geriatría canina e o manejo das doenças neoplásicas: Revisão Canine geriatrics and management of neoplastic diseases: Review. Pubvet [Internet]. abril de 2018 [citado 27 de marzo de 2021];1-7. Disponible en: <https://doi.org/10.22256/pubvet.v12n4a79.1-7>
10. Arcila V. Aspectos generales del paciente felino geriátrico. Spei Domus. 31 de mayo de 2005;1(1):13.
11. Sánchez E., Mira J., Gaviria M. Manual para la tenencia responsable de mascotas. Vol. 53, Journal of Chemical Information and Modeling. Colombia; 2019. 1690-1745 p.
12. Escobar C. Como cuidar a su mascota anciana [Internet]. 2015 [citado 27 de marzo de 2021]. Disponible en:
https://issuu.com/carlaescobaro/docs/medvet_revista_carla_escobar_ortiz
13. González M., Bernal L. Diagnóstico y manejo de la obesidad en perros: una revisión. CES Med Vet y Zootec. 28 de septiembre de 2011;6(2):91-102.
14. Hoyos M., Rosales V. Revista de Actualización Clínica Investiga - Lípidos: Características principales y su metabolismo. Revistas Bolivianas [Internet]. marzo de 2014 [citado 27 de marzo de 2021];41. Disponible en:
http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-37682014000200004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
15. Attie A. Lipoprotein/Cholesterol Metabolism. En: Physical Science and technology - Biochemistry. 3.^a ed. Elsevier Science; 2004. p. 643-60.
16. Universidad Complutense. Cuaderno de prácticas - Bioquímica Humana [Internet]. Madrid; 2018 [citado 26 de octubre de 2022]. Disponible en:
<https://www.ucm.es/data/cont/docs/261-2018-11-21-CUADERNO> DE PRÁCTICAS DE BIOQUÍMICA HUMANA-2018-19 (1).pdf

17. Cofan M. Mecanismos básicos. Absorción y excreción de colesterol y otros esteroides. Clin e Investig en Arterioscler [Internet]. enero de 2014 [citado 28 de marzo de 2021];26(1):41-7. Disponible en:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0214916813001277>
18. Meléndez E. Síntesis de colesterol — IMC | Instituto del Metabolismo Celular [Internet]. 2011 [citado 29 de marzo de 2021]. Disponible en:
<https://www.metabolismo.biz/web/4-sintesis-de-colesterol-2/>
19. Pibot P., Biourge V., Elliot D. Enciclopedia de la nutrición clínica canina [Internet]. Enciclopedia de la nutrición clínica canina. Paris: Aniwa SAS; 2012. 236-262 p. Disponible en: <http://campusveterinariarc.com/enciclopedia-de-nutricion-canina.php>
20. Cajamarca E., Cajamarca H. Perfil lipídico en deportistas pertenecientes a la federación deportiva del Azuay, Cuenca 2017. 2017;1-14.
21. Dominiczak M., Baynes J. Bioquímica Médica. 4.^a ed. Barcelona; 2014. 653 p.
22. Baynes J., Distinguished C. Bioquímica médica Quinta Edición [Internet]. Vol. 5. Carolina del Sur, EE. UU.: Elsevier; 2019. 183-184 p. Disponible en:
<https://www.elsevier.com/books/bioquimica-medica/baynes/978-84-9113-406-0>
23. Baynes J., Dominiczak M. Bioquímica Médica [Internet]. 33.^a ed. Barcelona: Elsevier Castellano; 2011 [citado 30 de marzo de 2021]. 1-712 p. Disponible en:
<https://www.edicionesjournal.com/Papel/9788480867306/Bioquímica+Médica>.
24. Rodwell V., Bender D., Botham K., Kennelly P., Weil A. Bioquímica ilustrada Harper. 30.^a ed. Education M-HG, editor. Santa Fe; 2016.
25. Argüeso R., Díaz J., Díaz J., Rodríguez A., Castro M., Diz-Lois F. Lípidos , colesterol y lipoproteínas Lipids , cholesterol and lipoproteins. 2011;72.
26. Mckee T., Mckee Ja. Bioquímica (las bases moleculares de la vida). Vol. 53, Journal of Chemical Information and Modeling. 2013.

27. Feduchi E., Blasco I., Roemo C., Yanez E. Bioquímica conceptos esenciales. En: Editorial Panamericana. 1.^a ed. 2011. p. 131-53.
28. Marshall W., Bangert S., Lapsley M. Bioquímica Clínica. 7.^a ed. Barcelona, España: Elsevier; 2012. 379 p.
29. Errico T.L., Chen X., Martin Campos J.M., Julve J., Escolà-Gil J.C., Blanco-Vaca F. Mecanismos básicos: Estructura, función y metabolismo de las lipoproteínas plasm. Clin e Investig en Arterioscler [Internet]. abril de 2013 [citado 4 de abril de 2021];25(2):98-103. Disponible en:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0214916813000314>
30. Ferrier D. Bioquímica. 6.^a ed. Harvey R, editor. Barcelona - España: Wolters Kluwer; 2011. 528 p.
31. Lieberman M., Peet A. Bioquímica médica básica. 5.^a ed. Estrada K, editor. Barcelona: Wolters Kluwer; 2018. 1014 p.
32. Iwasa J., Marshall W. Karp. Biología Celular y Molecular. 8.^a ed. McGraw-Hill Interamericana de España; 2019.
33. Floríndez A. Aseguran que en Cajamarca hay más de 20 mil perros callejeros | RPP Noticias [Internet]. 2015 [citado 4 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://rpp.pe/peru/actualidad/aseguran-que-en-cajamarca-hay-mas-de-20-mil-perros-callejeros-noticia-824230>
34. Muñoz P., Morgaz J., Galán A. Manual clínico del perro y el gato [Internet]. Second Editorial Elsevier, editor. Vol. 1, Elsevier. Barcelona - España: Elsevier; 2015. 1-448 p. Disponible en:
<https://drive.google.com/file/d/1rN6N4cbxqvLJ5vBAgO4qDYOYQfVbDXNE/view>
35. Nelson R., Couto G. Medicina Interna: de pequeños animales. 4.^a ed. España: Elsevier; 2010. 1-3690 p.

36. Coppo N., Coppo J., Lazarte M. Intervalos de confianza para colesterol ligado a lipoproteínas de alta y baja densidad en suero de bovinos, equinos, porcinos y caninos. *Rev Vet* [Internet]. 2016;14(1):3-10. Disponible en:
https://revistas.unne.edu.ar/index.php/vet/article/view/677#.YT_ehM8aNZY.mendeleey
37. Pibot P., Biourge V., Elliott D. Enciclopedia de la nutrición clínica canina. *R Canin*. 2006;509.

ANEXOS

ANEXO 1. Ficha Clínica

Historia clínica		Ficha N°	
Datos del propietario			
Nombre		Teléfono	
Dirección		Fecha	
Datos del paciente			
Nombre		Peso	
Raza		Edad	
Sexo		Especie	
Valoración clínica			
Constantes fisiológicas			
Resultados			
T°		FR	
FC		Pulso	
Estilo de vida			
Antecedentes médicos:			

Medicamentos administrados:	
Esterilización	
Si <input type="radio"/>	No <input type="radio"/>

ANEXO 2. REACTIVO EMPLEADO PARA LA DETERMINACIÓN DE COLESTEROL



Colestat

enzimático

Método enzimático para la determinación de colesterol en suero o plasma

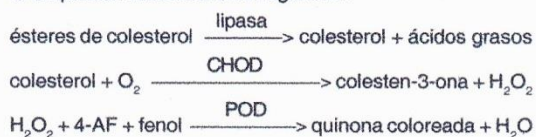
SIGNIFICACION CLINICA

La determinación de colesterol en forma aislada tiene utilidad diagnóstica limitada. Se ha visto que el colesterol es uno de los factores contribuyentes a la formación de ateromas dado que las complicaciones arterioscleróticas prevalecen en individuos hipercolesterolémicos.

Estudios epidemiológicos demuestran que el riesgo de contraer enfermedad cardíaca coronaria para individuos de más de 40 años con colesterolemia menor a 2,10 g/l es 3 veces menor que entre individuos con más de 2,30 g/l y 6 veces menor que entre individuos con más de 2,60 g/l.

FUNDAMENTOS DEL METODO

El esquema reaccional es el siguiente:



REACTIVOS PROVISTOS

A. Reactivo A: solución de 4-aminofenazona 25 mmol/l.

B. Reactivo B: solución de fenol 55 mmol/l.

C. Reactivo C: suspensión conteniendo lipasa fungal 300 U/ml, colesterol oxidasa (CHOD) 3 U/ml y peroxidasa (POD) 20 U/ml.

S. Standard: solución de colesterol 2 g/l.

Concentraciones finales

Lipasa	≥ 6000 U/l
CHOD	≥ 60 U/l
POD	≥ 400 U/l
4-AF	1,25 mmol/l
Fenol	2,75 mmol/l
pH	7,4 ± 0,1 (a t° amb.)

REACTIVOS NO PROVISTOS

Agua destilada. Ver LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Standard: mezclar por inversión antes de usar.

Reactivo A: listo para usar.

Reactivo B: listo para usar. Ver PRECAUCIONES.

Reactivo C: homogeneizar por inversión antes de usar, evitando la formación de espuma.

Reactivo de Trabajo: según el volumen de trabajo colocar en una probeta 50 partes de agua destilada, 5 partes de Reactivo A, 5 partes de Reactivo B y llevar a 100 partes con agua destilada. Agregar 2 partes de Reactivo C previamente homo-

geneizadas. Mezclar por inversión, sin agitar. Rotular y fechar.

Pueden prepararse distintas cantidades respetando las proporciones establecidas. Es importante además, respetar el orden de agregado de los reactivos y asegurar una perfecta homogeneización de los mismos, a fin de que el Reactivo B no deteriore el Reactivo de Trabajo.

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

El Reactivo B (fenol) es tóxico e irritante. R36/38: irrita los ojos y la piel. R25: tóxico por ingestión. S24/25: evítese el contacto con los ojos y la piel. S37/39: usar guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivos Provistos: son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No mantener a temperaturas elevadas durante lapsos prolongados.

Reactivo de Trabajo: en refrigerador y en frasco de vidrio color caramelo es estable 1 mes a partir del momento de su preparación.

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Durante el uso, el Reactivo de Trabajo puede desarrollar un ligero color rosado que no afecta los resultados siempre que se procese un Blanco con cada lote de determinaciones y un Standard periódicamente. Desechar cuando las lecturas del Blanco sean superiores a 0,160 D.O. o las lecturas del Standard sean anormalmente bajas.

MUESTRA

Suero o plasma

a) Recolección: se debe obtener suero o plasma de la manera usual.

b) Aditivos: en caso de que la muestra a emplear sea plasma, se recomienda únicamente el uso de heparina como anticoagulante para su obtención.

c) Sustancias interferentes conocidas:

- Excepto la heparina, los anticoagulantes comunes interfieren en la determinación.

- Los sueros con hemólisis visible o intensa producen valores

- falsamente aumentados por lo que no deben ser usados.
- En sueros fuertemente hiperlipémicos puede observarse turbiedad: en tal caso, diluir el volumen final de reacción a 1/2 ó 1/3 con Blanco de reactivos, repetir la lectura y multiplicar el resultado por el factor de dilución.
 - No interfieren: bilirubina hasta 200 mg/l, ácido ascórbico hasta 75 mg/l, ácido úrico hasta 200 mg/l, ni hemólisis ligera. Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.
- d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento:** el colesterol en suero es estable 1 semana en refrigerador (2-10°C) y 2 meses congelado, sin agregado de conservadores.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Micropipetas, pipetas y material volumétrico adecuados.
- Frasco de vidrio color caramelo.
- Tubos o cubetas espectrofotométricas de caras paralelas.
- Baño de agua a 37°C (opcional).
- Reloj o timer.

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 505 nm en espectrofotómetro o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm).
 - Temperatura de reacción: 37°C
 - Tiempo de reacción: 15 minutos
 - Volumen de muestra: 20 ul
 - Volumen de Reactivo de Trabajo: 2 ml
 - Volumen final de reacción: 2,02 ml
- Los volúmenes de Muestra y Reactivo pueden aumentarse o disminuirse proporcionalmente (Ej.: 10 ul de Muestra + 1 ml de Reactivo de Trabajo o 50 ul + 5 ml).

PROCEDIMIENTO

En tres tubos de fotocolorímetro o cubetas espectrofotométricas marcadas B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido), colocar:

	B	S	D
Standard	-	20 ul	-
Muestra	-	-	20 ul
Reactivo de Trabajo	2 ml	2 ml	2 ml

Incubar 15 minutos en baño de agua a 37°C o 30 minutos a temperatura ambiente (25°C). Leer en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm) o en espectrofotómetro a 505 nm, llevando el aparato a cero con el Blanco.

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de reacción final es estable dos horas, por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de este lapso.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

$$\text{colesterol (g/l)} = D \times f \quad \text{donde } f = \frac{2,00 \text{ g/l}}{S}$$

CONVERSION DE UNIDADES

$$\begin{aligned} \text{colesterol (g/l)} &= \text{colesterol (mg/dl)} \times 0,01 \\ \text{colesterol (mmol/l)} &= \text{colesterol (g/l)} \times 2,59 \\ \text{colesterol (g/l)} &= \text{colesterol (mmol/l)} \times 0,39 \end{aligned}$$

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Procesar 2 niveles de un material de control de calidad (**Standatrol S-E 2 niveles**) con concentraciones conocidas de colesterol, con cada determinación.

VALORES DE REFERENCIA

El panel de expertos del National Cholesterol Education Program (NCEP) provee los siguientes valores de colesterol:

Deseable: < 2,00 g/l
Moderadamente alto: 2,00 - 2,39 g/l
Elevado: ≥ 2,40 g/l

No obstante, se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos o valores de referencia.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

Otras causas de resultados erróneos son:

- Los reductores disminuyen la respuesta de color mientras que los oxidantes colorean el Reactivo aumentando los Blancos. Dichos agentes son frecuentemente encontrados en el agua destilada empleada para preparar el Reactivo de Trabajo, por lo que se recomienda controlar la calidad de la misma.
- Los detergentes, metales pesados y cianuros son inhibidores enzimáticos.
- Incubación incorrecta. El nivel del agua en el baño no debe ser inferior al de los reactivos en los tubos.
- Uso del Standard de un equipo con los reactivos de otro. Los reactivos y el Standard de cada equipo forman un conjunto perfectamente controlado y estandarizado.

PERFORMANCE

a) Reproducibilidad: procesando replicados de las mismas muestras en 10 días diferentes, se obtuvo:

Nivel	D.S.	C.V.
1,57 g/l	± 0,033 g/l	2,32 %
2,90 g/l	± 0,065 g/l	2,23 %
4,71 g/l	± 0,102 g/l	2,13 %

b) Recuperación: agregando cantidades conocidas de colesterol a distintos sueros, se obtuvo una recuperación entre 98 y 101%, para todo nivel de colesterol entre 1,90 y 4,79 g/l.

c) Límite de detección: depende del fotómetro empleado y de la longitud de onda. De acuerdo con la sensibilidad requerida, el cambio mínimo de concentración detectable para 0,001 D.O. será aproximadamente de 0,007 g/l.

d) Linealidad: la reacción es lineal hasta 5 g/l. Para valores superiores, diluir 1/2 con el Blanco y repetir la lectura multiplicando el resultado final por 2.

PRESENTACION

- 250 ml (Cód. 1220101)
- 1000 ml (Cód. 1220102)


Empleando los reactivos de **Colestat *enzimático*** junto con **HDL-Colesterol Reactivo Precipitante** o **HDL-Colesterol FT** y **LDL-Colesterol Reactivo Precipitante** (provistos separadamente por Wiener lab.) es posible determinar el colesterol ligado a las lipoproteínas de alta densidad (HDL-colesterol) y a las lipoproteínas de baja densidad (LDL-colesterol).

BIBLIOGRAFIA

- Allain, C.C. et al. - Clin. Chem. 20:470 (1974).
- American Health Foundation - Position statement on diet and coronary heart disease - pág. 255 (1972).
- Castelli, W.P. - Current Prescribing 6/77:39 (1977).
- Flegg, A.S. - Ann. Clin. Biochem. 10:79 (1973).
- I.F.C.C. - Clin. Chim. Acta 87/3:459 F (1978).
- Trinder, P. - Ann. Clin. Biochem. 6/24 (1969).
- Coniglio R.I. - Acta Bioq. Clin. Latinoam. XXIII/2:201, 1989.
- Expert Panel of National Cholesterol Education Program - JAMA 285/19:2486 (2001).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.

SIMBOLOS


Los siguientes símbolos se utilizan en todos los kits de reactivos para diagnóstico de Wiener lab.

 Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"


 Representante autorizado en la Comunidad Europea

 Uso diagnóstico "in vitro"


 Contenido suficiente para <n> ensayos

 Fecha de caducidad

 Límite de temperatura (conservar a)

 No congelar

 Riesgo biológico

 Volumen después de la reconstitución

 Contenido


 Número de lote

 Elaborado por:

 Nocivo

 Corrosivo / Caústico

 Irritante


 Consultar instrucciones de uso

 Calibrador

 Control

 Control Positivo

 Control Negativo

 Número de catálogo

 Wiener Laboratorios S.A.I.C.
Riobamba 2944
2000 - Rosario - Argentina
<http://www.wiener-lab.com.ar>
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola
Bioquímica
Producto Autorizado A.N.M.A.T.
Disp. Nº: 5983/83-5680/99



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina

ANEXO 3. REACTIVO EMPLEADO PARA LA DETERMINACIÓN DE HDL



C

HDL Colesterol

Reactivo Precipitante

Para la separación de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) en suero o plasma

SIGNIFICACION CLINICA

Las lipoproteínas plasmáticas son partículas esféricas que contienen cantidades variables de colesterol, triglicéridos, fosfolípidos y proteínas. Estas partículas solubilizan y transportan el colesterol en el torrente sanguíneo.

La proporción relativa de proteína y lípido determina la densidad de estas lipoproteínas.

La función principal de las lipoproteínas de alta densidad o HDL (high density lipoprotein) en el metabolismo lipídico es la captación y transporte de colesterol desde los tejidos periféricos al hígado en un proceso conocido como transporte reverso de colesterol (mecanismo cardioprotectivo).

El HDL colesterol bajo, está asociado con un alto riesgo de enfermedad cardíaca. Por este motivo la determinación de HDL colesterol es una herramienta útil en la identificación de individuos de alto riesgo.

FUNDAMENTOS DEL METODO

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL) se separan precipitando selectivamente las lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL y VLDL) mediante el agregado de sulfato de dextrán de PM 50.000 en presencia de iones Mg⁺⁺.

En el sobrenadante separado por centrifugación, quedan las HDL y se realiza la determinación del colesterol ligado a las mismas, empleando el sistema enzimático Colesterol oxidasa/ Peroxidasa con colorimetría según Trinder (Fenol/4-Aminofenazona).

REACTIVOS PROVISTOS

A. Reactivo A: solución de sulfato de dextrán (PM 50.000) 0,032 mmol/l.

B. Reactivo B: solución de cloruro de magnesio 1,5 M.

REACTIVOS NO PROVISTOS

Colestat enzimático, Colestat enzimático AA o Colestat enzimático AA líquida de Wiener lab.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Reactivo Precipitante (A+B); preparación: en el frasco provisto, medir 2,5 ml de Reactivo A y 2,5 ml de Reactivo B. Mezclar por inversión y colocar fecha de preparación. Pueden prepararse cantidades menores de acuerdo a las necesidades, respetando la proporción 1 + 1 para ambos reactivos.

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro". Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de química clínica.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivos Provistos: son estables a temperatura ambiente hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

Reactivo Precipitante: es estable 6 meses a temperatura ambiente o 1 año en refrigerador (2-10°C) a partir de la fecha de preparación.

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Cualquier indicio de contaminación bacteriana puede ser signo de deterioro de los reactivos.

MUESTRA

Suero o plasma

a) Recolección: obtener la muestra de la manera habitual.

b) Aditivos: en caso de utilizar plasma, recogerlo únicamente con heparina.

c) Sustancias interferentes conocidas: anticoagulantes distintos de la heparina y bilirrubinemia mayor de 50 mg/l son causas de interferencia.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: separar el suero dentro de la hora de la extracción. Las Lipid Research Clinics recomiendan refrigerar la muestra hasta la realización del ensayo. El almacenamiento o conservación de las muestras a temperatura ambiente altera la composición lipoproteica de las muestras aún antes de las 24 horas. Algunos autores mencionan estabilidad de 3 días a 4°C que se prolongan al congelar, pero existe mucha variabilidad entre muestras diferentes, por lo que se recomienda mantener la muestra refrigerada y procesar dentro de las 24 horas.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Micropipetas y pipetas.
- Tubos de Kahn.
- Tubos o cubetas espectrofotométricas.
- Baño de agua a 37°C.
- Reloj o timer.

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 505 nm en espectrofotómetro o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm).

- Temperatura de reacción: 37°C
- Tiempo de reacción: 45 minutos
- Volumen de muestra: 500 ul
- Volumen de Reactivo Precipitante: 50 ul
- Volumen de Sobrenadante: 100 ul
- Volumen de Reactivo de Trabajo de **Colestat enzimático**
Colestat enzimático AA/líquida: 2 ml
- Volumen final de reacción: 2,1 ml

PROCEDIMIENTO

En un tubo de Kahn medir 0,5 ml (500 ul) de muestra, y agregar 50 ul de Reactivo Precipitante. Homogeneizar agitando (sin invertir) durante 20 segundos y dejar 30-40 minutos en refrigerador (2-10°C) o 15 minutos en baño de agua a la misma temperatura. No colocar en congelador. Centrifugar 15 minutos a 3000 r.p.m. Usar el sobrenadante límpido como muestra.

En 3 tubos marcados B, S y D colocar:

	B	S	D
Sobrenadante	-	-	100 ul
Standard	-	20 ul	-
Reactivo de Trabajo	2 ml	2 ml	2 ml

Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C si se usa el Reactivo de Trabajo de **Colestat enzimático AA/líquida** o 15 minutos a 37°C cuando se usa el de **Colestat enzimático**. Retirar del baño y enfriar. Leer a 505 nm en espectrofotómetro o en colorímetro con filtro verde (490-530 nm), llevando a cero con el Blanco.

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de reacción es estable 2 horas por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de ese lapso.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

$$\text{HDL Colesterol (g/l)} = D \times f \quad f = \frac{0,457}{S}$$

$$0,457 = 2 \text{ (g/l)} \times \frac{V_{F_E}}{V_M} \times \frac{V_{R_E}}{V_{R_S}} \times \frac{V_S}{V_E} \quad \text{donde:}$$

V_{F_E} = volumen final de extracto = 0,55 ml

V_M = volumen de muestra procesada = 0,5 ml

V_{R_E} = volumen de reacción con extracto = 2,1 ml

V_{R_S} = volumen de reacción con Standard = 2,02 ml

V_S = volumen de Standard en la reacción = 0,020 ml

V_E = volumen de extracto en la reacción = 0,1 ml

Si se emplean volúmenes de Reactivo diferentes de 2 ml el factor 0,457 varía y debe ser calculado nuevamente, reemplazando en la fórmula V_{R_E} y V_{R_S} .

VALORES DE REFERENCIA

El panel de expertos del National Cholesterol Education Program (NCEP) provee los siguientes valores de HDL colesterol: 0,40 - 0,60 g/l

Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia. No obstante, valores mayores de 0,40 g/l se consideran recomendables y los que se encuentren por encima de 0,60 g/l se han considerado como protectivos. Por el contrario, valores de HDL colesterol por debajo de 0,40 g/l se consideran como índice significativo de riesgo de enfermedad cardíaca coronaria.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA

La exactitud y precisión de la determinación dependen fundamentalmente de la observación de las condiciones de precipitación, por lo que los tiempos y temperaturas establecidos, si bien no requieren un control riguroso, deben ser respetados.

Cuando el HDL colesterol no puede separarse por completo en una centrifuga común debido a niveles elevados de triglicéridos puede efectuarse la determinación de la siguiente manera: seguir las instrucciones indicadas en PROCEDIMIENTO hasta la incubación a 4-10°C y luego de la misma, colocar la mezcla de reacción en tubos capilares y centrifugar en centrifugas de microhematocrito a 10.000 r.p.m. durante 5 minutos. Cortar el capilar desechando el precipitado y utilizar el sobrenadante límpido para la prueba.

PERFORMANCE

a) **Reproducibilidad:** procesando replicados de una misma muestra en el día se obtienen los siguientes valores:

Nivel	D.S.	C.V.
0,29 g/l	± 0,011 g/l	3,8 %
0,63 g/l	± 0,023 g/l	3,7 %

b) **Linealidad:** la reacción es lineal hasta 5 g/l.

c) **Límite de detección:** en espectrofotómetro, para una variación de absorbancia de 0,001 D.O., el cambio mínimo de concentración detectable será de 0,0063 g/l de colesterol.

PRESENTACION

Equipo para procesar 100 muestras (Cód. 1220103).

BIBLIOGRAFIA

- Castelli, W. P.; Levitas I. M. - Current Prescribing 6/77:39 (1977).
- Cooper, C. et al. - National Heart and Lung Institute, (USA) (1974).
- Gordon, T. - Am. J. Med. 62:707 (1977).
- Kostner, G.M. et al. - Clin. Chem. 25/6:939 (1979).
- Stanbury, J. B.; Wyngaarden, J. B.; Fredrickson, D. S. - "The Metabolic Basis of Inherited Disease", Mc Graw - Hill Book Co., 2ª ed., 1966.
- Coniglio, R. I. - Acta Bioq. Clin. Latinoam. XXIII/2:201, 1989.
- Expert Panel of National Cholesterol Education Program - JAMA 285/19:2486 (2001).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4ª ed., 2001.

ANEXO 4. REACTIVO EMPLEADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LDL



LDL Colesterol

Reactivo Precipitante

Para la separación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en suero

SIGNIFICACION CLINICA

El contenido aproximado de colesterol en cada familia de lipoproteínas es (en % por unidad de peso): 1% en los quilomicrones, 18% en las VLDL, 50% en las LDL y 23% en las HDL. Dado que cada familia posee distinta actividad biológica, el significado clínico de un aumento de colesterol depende de la o las lipoproteínas que se encuentran en exceso.

Por otra parte, los mecanismos reguladores de los niveles plasmáticos de lipoproteínas son muy complejos y pueden ser afectados por múltiples factores (genéticos, ambientales, fisiológicos o patológicos), siendo posible encontrar valores de colesterol total cercanos al rango normal acompañados de alteraciones en las fracciones lipoproteicas.

Las HDL y las LDL han sido las más estudiadas por su importante actividad biológica:

- las LDL, producto del metabolismo de las VLDL en plasma, son las encargadas del transporte del colesterol exógeno (y en mucho menos proporción, endógeno) hacia el interior de las células;
- las HDL, sintetizadas en el hígado, remueven el colesterol no utilizado por las células (dentro de ciertos límites de concentración), transportándolo hacia el hígado para su degradación.

Diversos estudios epidemiológicos han confirmado que el exceso de colesterol de LDL con respecto a un valor crítico (1,9 g/l) debe ser considerado como factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad cardíaca coronaria, considerando que el efecto protector de las HDL sólo parece tener relevancia dentro de cierto rango de concentraciones de colesterol circulante. Tales hallazgos permiten deducir que los valores aislados de colesterol de HDL o de LDL no pueden tomarse como índices predictivos de riesgo, sino que es necesario conformar un perfil lipídico con los valores de colesterol total, colesterol de HDL y colesterol de LDL.

FUNDAMENTOS DEL METODO

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL o β -lipoproteínas) se separan del suero precipitándolas selectivamente mediante el agregado de polímeros de alto peso molecular. Luego de centrifugar, en el sobrenadante quedan las demás lipoproteínas (HDL y VLDL); el colesterol ligado a las mismas se determina empleando el sistema enzimático Colesterol oxidasa/Peroxidasa con colorimetría según Trinder (Fenol/4-AF). Por diferencia entre el colesterol total y el determinado en el sobrenadante, se obtiene el colesterol unido a las LDL.

REACTIVOS PROVISTOS

A. Reactivo A (Reactivo Precipitante): solución 1 g/l de sulfato

de polivinilo disuelto en polietilenglicol (PM: 600) al 25%, pH 6,7.

REACTIVOS NO PROVISTOS

Colestat enzimático, Colestat enzimático AA o Colestat enzimático AA líquida, de Wiener lab.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Reactivo A: listo para usar.

PRECAUCIONES

El reactivo es para uso diagnóstico "in vitro".

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de química clínica.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivo A: estable en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

Todo cambio en la coloración u otro aspecto físico del reactivo, puede ser indicio de deterioro del mismo.

MUESTRA

Suero

a) Recolección: el paciente debe estar en ayunas (de 12 a 16 horas). Obtener suero de la manera usual y separar del coágulo dentro de la hora de la extracción.

b) Aditivos: no se requieren.

c) Sustancias interferentes conocidas: los sueros hipertriglicéridémicos (con quilomicronemia) producen sobrenadantes turbios; la bilirrubina interfiere en niveles mayores de 50 mg/l.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: el suero debe ser preferentemente fresco. En caso de no procesarse en el momento, puede conservarse en el refrigerador (2-10°C) durante no más de 24 horas contadas a partir del momento de la extracción. No congelar.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Centrifuga.

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.

- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Tubos de Kahn.
- Cubetas espectrofotométricas de caras paralelas.
- Baño de agua a 37°C.
- Reloj o timer.

PROCEDIMIENTO

En un tubo de Kahn, colocar:

Muestra	200 ul
Reactivo A	100 ul

Homogeneizar agitando (sin invertir) durante 20 segundos y dejar 15 minutos en un baño de agua a 20-25°C. Centrifugar 15 minutos a 3000 r.p.m. Separar inmediatamente el sobrenadante. Ver LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO.

Usar el sobrenadante como Muestra para el ensayo colorimétrico.

En tres tubos marcados B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido), colocar:

	B	S	D
Sobrenadante	-	-	100 ul
Standard	-	20 ul	-
Reactivo de Trabajo	2 ml	2 ml	2 ml

Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C si se usa el Reactivo de Trabajo de **Colestat enzimático AA/líquida** o 15 minutos a 37°C si se usa el de **Colestat enzimático**. Retirar del baño y enfriar. Leer en espectrofotómetro a 505 nm o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm), llevando el aparato a cero de absorbancia con el Blanco.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

LDL colesterol (g/l) = Colesterol total (*) - (D x f)

$$f = \frac{0,624}{S}$$

(*) Valor obtenido con **Colestat enzimático** o **Colestat enzimático AA/líquida**.

El valor 0,624 surge de:

$$0,624 = 2 \text{ (g/l)} \times \frac{VF_E}{V_M} \times \frac{VR_E}{VR_S} \times \frac{V_S}{V_E}$$

donde:

VF_E = volumen final del extracto = 0,3 ml

V_M = volumen de muestra procesada = 0,2 ml (200 ul)

VR_E = volumen de reacción con el extracto = 2,1 ml

VR_S = volumen de reacción con el Standard = 2,02 ml

V_S = volumen de Standard en la reacción = 0,02 ml (20 ul)

V_E = volumen de extracto en la reacción = 0,1 ml (100 ul)

Si se emplean volúmenes diferentes el factor 0,624 varía y debe ser calculado nuevamente.

VALORES DE REFERENCIA

El panel de expertos del National Cholesterol Education Program (NCEP) provee los siguientes valores de LDL colesterol en relación al riesgo de contraer enfermedad cardíaca coronaria (ECC):

- **Riesgo bajo o nulo** (sujetos normales): valores de LDL colesterol menores de 1,29 g/l.
- **Riesgo moderado a elevado** (individuos con probabilidad de contraer ECC): valores entre 1,30 y 1,89 g/l.
- **Riesgo muy elevado** (individuos sospechosos de padecer ECC): valores de LDL colesterol \geq 1,90 g/l.

No obstante, es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

Cuando se procesen muestras ictericas, deberán diluirse los sueros 1/2 ó 1/3 con solución fisiológica y emplearse el procedimiento habitual, teniendo en cuenta el factor de dilución para los cálculos.

Cuando el LDL colesterol no puede separarse por completo en una centrifuga común debido a niveles elevados de triglicéridos, puede efectuarse la determinación de la siguiente manera:

Seguir las instrucciones indicadas en PROCEDIMIENTO hasta la incubación en baño de agua a 20-25°C, 15 minutos, luego colocar la mezcla de reacción en capilares y centrifugar en centrifugas de microhematocrito, a 10.000 r.p.m. durante 5 minutos. Cortar el capilar desechando el precipitado y utilizar el sobrenadante límpido para la prueba.

En todos los casos en que los valores de colesterol unido a HDL y VLDL ($D \times f$, según los cálculos) sean superiores a 1 g/l, se debe repetir la determinación con los mismos sueros empleando 100 ul de muestra y 200 ul de Reactivo A. Continuar con la técnica descrita, tomando 100 ul de sobrenadante y utilizando el factor 1,248 para los cálculos en lugar del anterior. No dejar el precipitado en contacto con el sobrenadante, debido a que puede haber redisolución provocando valores de lecturas elevados con la consiguiente disminución de los valores de LDL colesterol.

PERFORMANCE

a) **Reproducibilidad:** procesando replicados de una misma muestra en el día, se obtienen los siguientes valores:

Nivel	D.S.	C.V.
1,14 g/l	\pm 0,03 g/l	2,6 %
2,03 g/l	\pm 0,04 g/l	2,0 %

b) **Linealidad:** la reacción es lineal hasta 5 g/l.

c) **Límite de detección:** en espectrofotómetro, para una variación de absorbancia de 0,001 D.O., el cambio mínimo de concentración detectable será de 0,0063 g/l de colesterol.

PRESENTACION

Para procesar 100 muestras (Cód. 1220104).

BIBLIOGRAFIA

- Seidel, D. - Ann. Clin. Biochem. 19:278 (1982).
- Levy, R.I. - Clin. Chem. 27/5:653 (1981).

ANEXO 5: REACTIVO EMPLEADO PARA LA DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS



C

TG Color

GPO/PAP AA

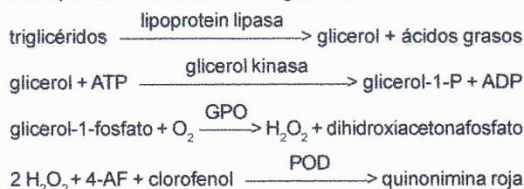
Método enzimático para la determinación de triglicéridos en suero o plasma

SIGNIFICACION CLINICA

Los triglicéridos son lípidos absorbidos en la dieta y también producidos en forma endógena a partir de los carbohidratos. Su medición es importante en el diagnóstico y manejo de las hiperlipidemias. Estas enfermedades pueden tener origen genético o ser secundarias a otras tales como nefrosis, diabetes mellitus y disfunciones endocrinas. El aumento de triglicéridos se ha identificado como un factor de riesgo en enfermedades ateroscleróticas.

FUNDAMENTOS DEL METODO

El esquema de reacción es el siguiente:



REACTIVOS PROVISTOS

A. Reactivo A: viales conteniendo lipoprotein lipasa, glicerol kinasa (GK), glicerol fosfato oxidasa (GPO), peroxidasa (POD), adenosina trifosfato (ATP) y 4-aminofenazona (4-AF).

B. Reactivo B: solución de buffer Good conteniendo clorofenol, pH 7,5.

S. Standard: solución de glicerol 2,26 mmol/l (equivalente a 2 g/l de trioleína).

Concentraciones finales

Good	50 mmol/l; pH 7,5
clorofenol	2 mmol/l
lipoprotein lipasa	≥ 800 U/l
GK	≥ 500 U/l
GPO	≥ 1500 U/l
POD	≥ 900 U/l
ATP	2 mmol/l
4-AF	0,4 mmol/l

REACTIVOS NO PROVISTOS

Calibrador A plus de Wiener lab. cuando se emplea la técnica automática.

INSTRUCCIONES PARA SU USO

Standard: listo para usar.

Reactivo de Trabajo:

- 5/10 x 20 ml: agregar 20 ml de Reactivo B a un vial de Reactivo A. Mezclar hasta disolución completa. Homogeneizar y fechar.

- 4 x 50 ml: reconstituir el contenido de un vial de Reactivo A con una porción de Reactivo B y luego transferir al frasco de Reactivo B enjuagando varias veces. Homogeneizar y fechar.

PRECAUCIONES

Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".

Utilizar los reactivos guardando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio de análisis clínicos.

Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO

Reactivos Provistos: son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No mantener a temperaturas elevadas durante lapsos prolongados.

Reactivo de Trabajo: es estable 30 días en refrigerador (2-10°C).

INDICIOS DE INESTABILIDAD O DETERIORO DE LOS REACTIVOS

El Reactivo de Trabajo puede presentar una coloración rosada que no afecta su funcionamiento.

Lecturas del Blanco superiores a 0,160 D.O. o lecturas del Standard anormalmente bajas, son indicios de deterioro del Reactivo. En tal caso, desechar.

MUESTRA

Suero o plasma

a) Recolección: previo ayuno de 12 a 14 horas, obtener suero o plasma. Separar de los glóbulos rojos dentro de las 2 horas de extracción.

b) Aditivos: en caso de emplear plasma, se recomienda el uso de Anticoagulante W o heparina para su obtención.

c) Sustancias interferentes conocidas: los sueros con hemólisis intensa o marcadamente ictericos producen resultados erróneos, por lo que no deben ser usados.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: los triglicéridos en suero son estables 3 días en refrigerador (2-10°C). No congelar.

MATERIAL REQUERIDO (no provisto)

- Espectrofotómetro o fotocolorímetro.
- Micropipetas y pipetas para medir los volúmenes indicados.
- Tubos o cubetas espectrofotométricas.
- Baño de agua a 37°C.
- Reloj o timer.

CONDICIONES DE REACCION

- Longitud de onda: 505 nm en espectrofotómetro o 490-530 nm en fotocolorímetro con filtro verde.
- Temperatura de reacción: 37°C
- Tiempo de reacción: 5 minutos
- Volumen de muestra: 10 ul
- Volumen de reactivo: 1 ml
- Volumen final de reacción: 1,01 ml

PROCEDIMIENTO

Homogeneizar la muestra antes de usar, especialmente frente a sueros lechosos.

En tres tubos o cubetas espectrofotométricas marcadas B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido) colocar:

	B	S	D
Muestra	-	-	10 ul
Standard	-	10 ul	-
Reactivo de Trabajo	1 ml	1 ml	1 ml

Mezclar, incubar 5 minutos a 37°C o 20 minutos a temperatura ambiente (18-25°C). Enfriar y leer en espectrofotómetro a 505 nm o en fotocolorímetro con filtro verde (490-530 nm) llevando el aparato a cero con agua destilada.

ESTABILIDAD DE LA MEZCLA DE REACCION FINAL

El color de reacción final es estable 60 minutos, por lo que la absorbancia debe ser leída dentro de este lapso.

CALCULO DE LOS RESULTADOS

Corregir las lecturas con el Blanco de reactivos y usar las lecturas corregidas para los cálculos.

$$TG \text{ g/l} = D \times \text{factor} \quad \text{factor} = \frac{2 \text{ g/l}}{S}$$

CONVERSION DE UNIDADES

Triglicéridos (g/l) = 0,01 x Triglicéridos (mg/dl)

Triglicéridos (mg/dl) x 0,0113 = Triglicéridos (mmol/l)

METODO DE CONTROL DE CALIDAD

Procesar 2 niveles de un material de control de calidad (**Standardrol S-E 2 niveles**) con concentraciones conocidas de triglicéridos, con cada determinación.

VALORES DE REFERENCIA

El panel de expertos del National Cholesterol Education Program (NCEP) provee los siguientes valores de Triglicéridos:

Deseable: < 1,50 g/l

Moderadamente elevado a elevado: 1,50 - 1,99 g/l

Elevado: 2,00 - 4,99 g/l

Muy elevado: ≥ 5,00 g/l

No obstante, se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos o valores de referencia.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Ver Sustancias interferentes conocidas en MUESTRA.

Los reductores disminuyen la respuesta de color, mientras que los oxidantes colorean el Reactivo aumentando los Blancos. Las contaminaciones con glicerol producen resultados falsamente aumentados.

PERFORMANCE

a) Reproducibilidad: procesando simultáneamente replicados de las mismas muestras en 10 días diferentes, se obtuvieron los siguientes datos:

Nivel	D.S.	C.V.
1,14 g/l	± 0,021 g/l	1,82 %
7,41 g/l	± 0,074 g/l	2,11 %

b) Recuperación: agregando cantidades conocidas de trioleína a distintos sueros, se obtuvo una recuperación entre 99,2 y 100,7% para todo el rango de linealidad del método.

c) Linealidad: la reacción es lineal hasta 10 g/l de triglicéridos. Para valores superiores, repetir la determinación con muestra diluida 1:2 con solución fisiológica. Multiplicar el resultado obtenido por la dilución efectuada.

d) Limite de detección: depende del fotómetro empleado. En espectrofotómetros, el cambio mínimo de concentración detectable en las condiciones de reacción descriptas, para una variación de absorbancia de 0,001 D.O. será aproximadamente de 0,008 g/l.

PARAMETROS PARA ANALIZADORES AUTOMATICOS

Para las instrucciones de programación debe consultarse el Manual del Usuario del Analizador en uso.

Para la calibración debe emplearse **Calibrador A plus** de Wiener lab., de acuerdo a los requerimientos del analizador.

PRESENTACION

- 5 x 20 ml (Cód. 1780107).

- 10 x 20 ml (Cód. 1780101).

- 4 x 50 ml (Cód. 1780105).

BIBLIOGRAFIA

- Fossati, P - Clin. Chem. 28/10:2077 (1982).

- McGowan, M.W.; et al - Clin. Chem. 29/3: 538 (1983).

- Tietz, N.W. - Fundamentals of Clin. Chem. - W.B., Saunders Co. - Philadelphia, Pa. (1970), pág. 329.

- Expert Panel of National Cholesterol Education Program - JAMA 285/19:2486 (2001).

- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.