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

J. H. Osorio¹
J. Vinasco²
J. E. Pérez³

RESUMEN

Objetivo: Comparar dos métodos para la determinación del colesterol HDL en bovinos *Bos taurus*. **Materiales y Métodos:** Fueron tomadas 100 muestras de sangre de hembras bovinas de raza lechera en estado de ayuno sin discriminación de edad. Se realizó la extracción de suero para determinar los niveles de colesterol HDL mediante el método directo y posteriormente fueron determinados estos mismos valores mediante el método de precipitación, los resultados se obtuvieron mediante un análisis estadístico de ANOVA simple. **Resultados:** El método directo reportó valores expresados en mg/dl para el promedio, desviación estándar, mínimo y máximo de 97,217; 66,200; 31,023 y 295,251 respectivamente, y el método de precipitación reportó valores expresados en mg/dl para el promedio, mínimo, máximo y desviación estándar de 101,292; 33,588; 27,767 y 193,189 respectivamente. El valor de P en el test F, >0,05, indica que no existe diferencia estadísticamente significativa con un nivel de confiabilidad del 95%. **Conclusión:** Puede ser utilizado cualquiera de los dos métodos analizados para la determinación del colesterol HDL, en bovinos.

Palabras clave: Lípidos, bovinos, colesterol HDL.

COMPARISON OF TWO METHODS FOR THE MEASUREMENT OF HDL CHOLESTEROL LEVELS IN CATTLE

ABSTRACT

Objective: To compare two methods for the measurement determining of HDL cholesterol in *Bos taurus* cattle. **Materials and Methods:** Blood samples from 100 female cattle bovine of dairy breeds in the fasting state without discrimination of age were obtained. Serum extraction was obtained carried out to determine levels of HDL cholesterol by using the direct method and subsequently those same values HDL-cholesterol was determined were determined through by the precipitation method. Statistical analysis was performed using ANOVA single ANOVA. statistics analysis. **Results:** The direct method showed values in of 97.217, 66.200, 31.023 and 295.251 mg/dl for media, standard deviation, minimum and maximum were 97.217, 66.200, 31.023 and 295.251 respectively, and for the precipitation method reported values in mg/dl for media, standard deviation, minimum and maximum were of 101.292, 33.588, 27.767 and 193.189 mg/dl for average, minimum, maximum and standard deviation respectively. The P value in test F >0.05, indicates that there

¹ Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Laboratorio de Investigación en Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Universidad de Caldas. Manizales, Colombia; Universidad de Manizales, carrera 9 No. 19-03. Manizales Colombia. Autor para correspondencia: jose.osorio_o@ucaldas.edu.co

² Departamento de Salud Animal, Universidad de Caldas. Manizales, Colombia.

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

is no statistically significant difference with a confidence level of 95%. **Conclusion:** Either one of the two methods analyzed for determining It is recommended to use any of the two analytical

methods for determining HDL-cholesterol in cattle can be used.

Key words: lipids, cattle, HDL-cholesterol.

INTRODUCCIÓN

Los rumiantes presentan una fisiología especial, principalmente el ganado lechero ya que aproximadamente un 90% de la glucosa es producida por el hígado, siendo este órgano quien realiza una de las funciones elementales del organismo cubriendo las demandas energéticas para el mantenimiento y la producción, pues la existencia de un déficit energético en la ración puede ser compensada movilizand las reservas energéticas almacenadas en el tejido lipídico, además de ello, luego del parto de un rumiante con alto potencial genético lechero, el rápido desequilibrio entre la energía disponible de origen alimentario y la energía exigible para la producción de leche, obliga a la movilización de las reservas lipídicas periféricas (lipomovilización) siendo esta una medida proteccionista impuesta por factores genéticos, ligados al carácter lechero (1).

El colesterol proviene de los lípidos alimentarios, pero también existe una activa biosíntesis, principalmente hepática y su eliminación se efectúa por excreción tanto biliar como láctea (2). En el torrente sanguíneo, el colesterol total (CT) existe en forma libre o esterificado con ácidos grasos y son transportados en el plasma en forma de partículas esféricas llamadas lipoproteínas (LP) que lo solubilizan en el agua intravascular (3). Las LP se clasifican en quilomicrones (Q), LP de muy baja densidad (VLDL), LP de baja densidad (LDL), LP de densidad intermedia (IDL) y LP de alta densidad (HDL) (4). Las HDL se forman en el intestino delgado y el hígado, son las más pequeñas y más densas, relativamente pobres en lípidos; la heterogeneidad de las HDL resulta de la velocidad de síntesis, del

catabolismo de las partículas y de la acción tanto de enzimas como de proteínas de transporte que las remodelan continuamente (5), se caracterizan por estar compuestas de colesterol libre, algunos fosfolípidos y apoproteínas, estas últimas son las que participan en la unión de alta afinidad de las LP a distintos receptores celulares y así facilitar el transporte de los lípidos, además ayudan a la activación enzimática (4). El hígado sintetiza estas LP como proteínas vacías y, tras recoger el colesterol, incrementan su tamaño al circular a través del torrente sanguíneo. Dado que los bovinos son una especie con patrón HDL (6), se afirma que aunque exista un aumento del consumo de grasa y colesterol en la dieta no se evidencian cambios en el LDL, como sí ocurre en otras especies con patrón LDL, por ejemplo los humanos (7, 8). La mayor parte del colesterol es transportado por las HDL y su característica más importante es que son naturalmente resistentes a la aterosclerosis (7), ya que su rol es el transporte y reversa del colesterol desde los tejidos hacia la bilis, por ello las HDL juegan un papel importante en la eliminación del colesterol arterial disminuyendo el riesgo aterogénico (9-11). Básicamente en el transporte reverso del colesterol el flujo del colesterol libre que se encuentra en las células periféricas es tomado por receptores primarios como pre- β HDL o HDL discoidales (HDL nacientes) activados por apolipoproteínas; cuando el colesterol libre es captado por las HDL, es esterificado por la enzima lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) para formar ésteres de colesterol y transferido por la proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP) a las LP a través de la cascada de las VLDL (4, 12). Otro mecanismo de catabolismo de las HDL es la captación celular selectiva del colesterol HDL, sin internalización

ni degradación de la partícula lipoproteica. Este proceso explica del 20 al 30% de la degradación plasmática total del colesterol HDL en animales que expresan CETP (13). Como se mencionó anteriormente, este proceso ocurre en el hígado y es mediado por el receptor SR-BI (scavenger receptor class B type I) (14); se ha demostrado en varios estudios *in vitro* y en modelos animales la importancia del SR-BI en el metabolismo del HDL y que la expresión de este receptor en el hígado controla los niveles plasmáticos de dicha LP (15-17).

Los bovinos como especie poligástrica, difieren de los monogástricos en su metabolismo lipídico, por lo tanto, se tienen dudas de que los métodos usados en humanos (especie monogástrica) para determinar los niveles de colesterol HDL funcionen de igual manera en bovinos, y tomando como referencia los dos métodos (métodos directo y método de precipitación) que actualmente se encuentran disponibles en el mercado, se compararon estos para la determinación del colesterol HDL en bovinos.

Q es hidrolizado por la colesterol oxidasa mediante una reacción enzimática acelerada no formadora de color. Posteriormente, se solubiliza el colesterol de las LP HDL de la muestra en presencia de un detergente, para ser cuantificado espectrofotométricamente. Posteriormente, fueron determinados los valores de colesterol HDL mediante el método de precipitación (19), teniendo como fundamento que: las LP LDL presentes en la muestra precipitan en presencia de fosfotungstato e iones magnesio, el sobrenadante contiene las LP HDL, cuyo colesterol se cuantifica espectrofotométricamente.

Los resultados fueron comparados mediante un análisis estadístico de ANOVA simple, se obtuvo el cálculo del promedio, la desviación estándar y los rangos mínimo y máximo del colesterol HDL tanto directo como precipitado. Se evaluaron las diferencias sobre los dos métodos por medio de un análisis de varianza utilizando el programa Stat Graphics Plus 5.1 en el cual no se aceptan diferencias estadísticamente significativas cuando el P valor es $>$ o igual a 0,05.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron obtenidas mediante venopunción yugular 100 muestras de sangre de hembras bovinas clínicamente sanas, de raza lechera (Holstein, Normando y BON) y en estado de ayuno sin discriminación de edad, con una condición corporal de 3 a 4 (en una escala de 1 a 5). Posteriormente, se centrifugaron dichas muestras a 3500 rpm (revoluciones por minuto) durante 15 minutos, extrayendo el suero para determinar los niveles de colesterol HDL utilizando los kits de la casa comercial BioSystems® mediante el método directo (18), cuyo fundamento es el siguiente: el colesterol de las LP LDL, las de VLDL y los

RESULTADOS

Los valores obtenidos para el colesterol HDL por el método directo expresados en mg/dl fueron para la media, desviación estándar, rangos mínimos y máximos de: 97,217; 66,200; 31,023 y 295,251 respectivamente. En el mismo orden los niveles de colesterol HDL que se reportaron mediante el método de precipitación fueron de: 101,292; 33,588; 27,767 y 193,189 respectivamente. El valor de P en el test F fue de 0,5837 lo cual indica que no existe diferencia estadísticamente significativa a un nivel de confiabilidad del 95% entre los valores obtenidos por los dos métodos (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de colesterol HDL

Parámetros	Método Directo	Método Precipitado	P-valor
Promedio	97,217	101,292	
De*	66,2	33,588	0,5837
Mínimo	31,023	27,767	
Máximo	295,251	193,189	

* De: Desviación estándar.

DISCUSIÓN

Es de gran importancia evaluar el estado metabólico del ganado lechero, y para ello se hace necesaria la medición del perfil lipídico, en especial del colesterol HDL ya que el nivel en el suero de colesterol depende del contenido graso de la dieta (20). Las hembras en la primera fase de la lactancia presentan unas condiciones metabólicas adversas debido al déficit energético ocasionado por el bajo consumo de energía y la alta producción lechera (21). Un estudio realizado con vacas cebú primerizas, reportó que el postparto temprano presenta en un principio bajos valores de LDL y posteriormente de HDL, sin ningún cambio en los de VLDL, lo que puede limitar la adecuada movilización y distribución de las reservas corporales hasta el hígado y desde este a los demás órganos desprovistos en energía (22). Otro estudio indica que los bajos niveles de glucosa y colesterol HDL fueron hallados un mes postparto, sobre todo en las vacas de menor condición corporal, además de indicar una baja habilidad para la producción láctea (23), pueden también marcar un balance energético negativo peligrosamente prolongado, el cual podría comprometer el desempeño reproductivo de las hembras más delgadas, afectando parámetros como el intervalo parto primer estro y la tasa de supervivencia embrionaria (24). La disminución más drástica en los niveles de HDL hallados en los animales de baja condición corporal, es indicativo de un déficit energético no resuelto en la lactancia temprana y pueden estar relacionados con una disminución en la salida

de lípidos desde el hígado con riesgo de sufrir engrasamiento hepático (25); a medida que la vaca alcanza la lactancia tardía, los niveles de colesterol HDL van aumentando hasta alcanzar su valor máximo en dicho punto (26, 27), por lo tanto, se debe tener cuidado al momento de analizar estos valores, puesto que Kaneko (28) menciona tres posibles explicaciones para los altos niveles en el plasma de HDL de las vacas en lactación, uno es la adaptación a la lactancia incrementando el reservorio de apoproteína C, otro es la utilización incrementada de VLDL por la glándula mamaria y finalmente la síntesis y secreción de HDL naciente, incrementada por el hígado en respuesta a la lactación. Además las HDL inhiben la agregación y oxidación de las LDL, evitando así la formación de placas ateroscleróticas, descritas en especies con patrón LDL (5, 29), razón por la cual es de vital importancia la medición de estos parámetros metabólicos.

Las partículas lipoproteicas pueden ser fraccionadas y separadas entre ellas por varios métodos según sus propiedades. Los diversos métodos disponibles en el mercado para la separación de las HDL se basan en el principio analítico utilizado; según Palacios et al. (30), los métodos más usados en el laboratorio clínico para la separación y cuantificación del colesterol HDL son los métodos electroforéticos, de precipitación química, de ultracentrifugación, combinados y directos. Siendo el método de precipitación y el método directo los más utilizados para la determinación habitual

del colesterol HDL, ello se debe a la relativa simplicidad y tiempo de realización. En los últimos años, la mayoría de los laboratorios clínicos han realizado las determinaciones de los niveles de colesterol HDL mediante los métodos de precipitación, aunque es muy sensible a interferencias externas y requiere condiciones muy controladas de pipeteado, homogenización de la mezcla reactiva, temperatura y tiempo de incubación, es más económico comparado con el método directo. Se debe evaluar cuidadosamente la efectividad del método escogido ya que la presencia de Q, y concentraciones elevadas de VLDL, pueden causar una sobreestimación errónea del HDL. Dado que el método directo es considerado como el procedimiento más confiable, es poco usado por su alto costo, y este puede ser utilizado para la validación de otros métodos, siendo considerado como método de referencia (30). Muchos estudios indican la necesidad de mejorar las formas para realizar las mediciones de los niveles de colesterol HDL que se han venido ejecutando en los laboratorios clínicos, con el fin de aprobar que los resultados obtenidos tengan la calidad suficiente para

ser útiles en la práctica clínica (31). Es por ello que en el presente trabajo se analizó la eficacia de los dos métodos utilizados de manera rutinaria para la medición del colesterol HDL en los bovinos, evidenciando finalmente que el método de precipitación es válido para la determinación del mismo, sin embargo, se contradice con lo reportado por Álvarez et al. (32) en un estudio comparativo para el colesterol LDL, donde indican que el método precipitado no se correlaciona con el directo, por lo tanto, no se recomienda su uso. Finalmente, con el objetivo de tener más conocimiento sobre estas variaciones, se deben realizar más estudios de comparación con dichos métodos ya que son pocas las exposiciones relacionadas con los mismos y la literatura de referencia es escasa.

CONCLUSIÓN

Se puede utilizar cualquiera de los dos métodos descritos anteriormente para determinar los niveles de colesterol HDL en los bovinos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aranda MV, Brave N, Casagrande R. Colesterol en bovinos. Sitio Argentino de Producción Animal. [Internet]. 2002. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/carne_y_subproductos/26-colesterol_en_bovinos.pdf [Consultado Enero 27 de 2013].
2. Coppo JA. Fisiología comparada del medio interno. Buenos Aires: Ed. Dunken; 2001. p. 212-216.
3. Cirio A, Tebot I. Fisiología metabólica de los rumiantes. Montevideo: Ed. CSIC; 2000. 146 p.
4. Montgomery R. Bioquímica: Casos y Texto. 6th ed. Madrid: Ed. Harcourt Brace; 1998. 904 p.
5. Pérez O. Lipoproteínas de alta densidad (HDL). ¿Un objetivo terapéutico en la prevención de la aterosclerosis? Arch Cardiol Méx 2004; 74(1):53-67.
6. Bauer JE. Metabolismo comparado de lípidos y lipoproteínas. Pet's Ciencia 1997; 13:362-376.
7. Coppo NB, Coppo JA, Lazarte MA. Intervalos de confianza para colesterol ligado a lipoproteínas de alta y baja densidad en suero de bovinos, equinos, porcinos y caninos. Rev Vet 2003; 14(1):1-8.
8. Maldonado EN, Romero JR, Ochoa B, Aveldaño MI. Lipid and Fatty Acid Composition of Canine Lipoproteins. Rev Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 2001; 128(4):719-729.
9. Frank N, Sojka JE, Latour MA. Effect of withholding feed on concentration and composition of plasma very low density lipoprotein and serum nonesterified fatty acids in horses. Am J Vet Res 2002; 63:1018-1021.
10. Gaziano M, Manson JE, Ridker PM, et al. Primary and secondary prevention of coronary heart disease. In: Libby P, Bonow RO, Mann DL, Braunwald E, Zipes DP, eds. Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine; 2007; 8:45.
11. Vitic J, Stevanovic J. Comparative studies of the serum lipoproteins and lipids in some domestic, laboratory and wild animals. Comp Biochem Physiol B 1993; 106B:223-229.
12. Espondaburu OR. Hipertrigliceridemia: influencia sobre parámetros que estiman el transporte reverso de colesterol. Acta bioquím. clín. latinoam. 2006; 40(2):165-172.
13. Goldberg DI, Beltz WF, Pittman RC. Evaluation of pathways for the cellular uptake of high density lipoprotein cholesterol esters in rabbits. J Clin Invest 1991; 87:331-346.
14. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. Sci 1996; 271:518-520.
15. Rigotti A, Krieger M. Getting a handle on "good" cholesterol with the high-density lipoprotein receptor. N Engl J Med 1999; 341:2011-2013.
16. Rigotti A, Miettinen HE, Krieger M. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in the lipid metabolism of endocrine and other tissues. Endocr Rev 2003; 24:357-387.
17. Trigatti BL, Krieger M, Rigotti A. Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23:1732-1738.
18. Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests. 2nd ed. New York: Saunders Co; 1991. 420 p.
19. Grove TH. Effect of reagent pH on determination of high-density lipoprotein cholesterol by precipitation with sodium phosphotungstate-magnesium. Clin Chem 1979; 25:560-564.
20. López AA, Márquez YC, Mendoza CA, Ferraro SM, Márquez AA. Perfil lipídico en becerras mestizas Carora durante el primer año de vida, en época de lluvias y de sequía, en Venezuela. Rev Vet 2008; 19(1):2-7.
21. Galvis R, Correa H. Interacciones entre el metabolismo y la reproducción en la vaca lechera. ¿Es la actividad gluconeogénica el eslabón perdido? Rev Colomb Cienc Pecu 2002; 15:36-50.
22. Henao G, Galvis RD, Cardona LM, Castro NM. Relación entre Pérdida de Peso, Perfil Lipídico y Concentraciones Plasmáticas de Leptina en Vacas Cebú Primerizas. Rev.Fac.Nal.Agr. 2010; 63(2):5595-5605.

23. Ingraham R, Kapel R. Metabolic profile testing. *Veterinary Clinic North America, Food Animal Practitioners* 1988; 4:391-410.
24. Diskin MG, Mackey DR, Roche JF, et al. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci* 2003; 78:345-370.
25. Ceballos A, Gómez PM, Vélez MI, Villa NA, López LF. Variación de los indicadores bioquímicos del balance de energía según el estado productivo en bovinos lecheros de Manizales, Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2002; 15:13-25.
26. Basoglu A, Sevinc M, Gokcen M. Peri and postparturient concentrations of lipid lipoprotein, insulin and glucose in normal dairy cows. *Tr. J. of Veterinary and Animal Science* 1998; 22:141-144.
27. Bauchart D. Lipid absorption and transport in ruminants. *J Dairy Sci* 1993; 76(12):3864-3881.
28. Kaneko JJ. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Department of Clinical Pathology, School of Veterinary Medicine, University of California; 1989. p. 930.
29. Barter PJ, Brewer HB, Chapman MJ, et al. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2003; 23:160-167.
30. Palacios M, Esteban M, Aguilar JA, Ortolá JB. Recomendaciones para la determinación de la concentración en suero del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad. *Quím Clín* 1999; 18(1):33-40.
31. Schectman G, Sasse E. Variability of lipid measurements: relevance for the clinician. *Clin Chem* 1993; 39:1495-1503.
32. Álvarez ME, Suárez YJ, Cañas ES. Comparación entre el método directo y el método de precipitación para la determinación de los niveles de colesterol LDL en equinos. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2009; 22(3):402.