

6. PRÁCTICA. PERFIL LIPÍDICO

ESQUEMA

- Introducción
- Fundamento teórico: Los triacilgliceroles, el colesterol y las lipoproteínas plasmáticas
El perfil lipídico
Determinación colorimétrica de TAG y CHO
- Procedimiento práctico: Materiales y reactivos
Procedimiento experimental y resultados esperables
- Análisis y discusión de los resultados obtenidos, comentarios y conclusiones
- Análisis general del metabolismo energético

I. INTRODUCCIÓN

En esta práctica se van a realizar las determinaciones de colesterol (CHO) y de triacilgliceroles (TAG) mediante métodos colorimétricos y la comparación con un patrón de concentración conocida. La formación de un sustrato coloreado permite medir su absorbancia, que es directamente proporcional a la concentración de reactivo. Finalmente se discutirá la importancia de dichas determinaciones en la Bioquímica Clínica y su relación con el metabolismo glucídico, ya que muchas enfermedades metabólicas como el hipercolesterolemia y la diabetes cursan con alteraciones en los niveles plasmáticos de TAG y/o CHO.

II. FUNDAMENTO TEÓRICO

Ila. Los triacilgliceroles, el colesterol y las lipoproteínas plasmáticas

Los triacilgliceroles (TAG) constituyen la primera reserva energética del organismo; se almacenan en grandes vacuolas en los adipocitos del tejido adiposo. La degradación metabólica

de 1 g de TAG produce 9 kcal, mientras que 1 g de Glc sólo suministra 4 kcal; además el depósito de TAG no está hidratado (a diferencia del glucógeno) y no ejerce presión osmótica. Esta reserva energética se puede emplear para generar energía química en forma de ATP, o bien para generar calor, como es el caso del tejido adiposo pardo. Por otra parte, el tejido adiposo también tiene una función de aislante térmico y de protección mecánica, como sucede en los riñones.

A su vez, el colesterol desempeña muchas funciones biológicas, como dar fluidez a las membranas biológicas y ser el precursor de ácidos biliares, hormonas esteroideas y de la vitamina D. El metabolismo del colesterol está relacionado con enfermedades cardiovasculares (CHD – Coronary Heart Disease) y con la aparición de cálculos biliares.

Debido al carácter hidrofóbico de estos compuestos, no se encuentran libres en plasma sanguíneo, sino que son transportados por las proteínas. Existen diversas clases de lipoproteínas, en base a su densidad, el lípido que transportan y las apoproteínas que conforman su estructura. En función de su densidad las lipoproteínas se clasifican en:

Lipoproteína	ρ (g/L)	Lípido	Apoproteínas	Función
Quilomicrones	< 0.95	TAG	B48 (A, C, E)	Transporte de TAG desde el intestino a tejidos periféricos
VLDL	0.95 – 1.006	TAG	B100 (A, C, E)	Transporte de TAG desde el hígado a tejidos periféricos
IDL	1.006 – 1.019	TAG & CHO	B100, E	Aparecen cuando las VLDL pierden TAG, y o bien se transforman en LDL o bien son captadas por el hígado
LDL	1.019 – 1.063	CHO	B100	Transporte de CHO en plasma (desde el hígado a tejidos periféricos)
HDL	1.063 – 1.210	CHO	AI, AII (C, E)	Transporte del exceso de CHO desde los tejidos periféricos al hígado

IIb. El perfil lipídico

El estudio clínico del perfil lipídico es un procedimiento analítico básico en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedades metabólicas. Generalmente se solicita el análisis del

los niveles de TAG, CHO total y CHO-HDL. Los niveles de CHO-LDL se calculan mediante la Fórmula de Friedewald. Los valores de referencia son los siguientes:

TAG	CHO TOTAL	CHO-HDL	CHO-LDL
< 150 mg/dL (1.7 mM) Concentración deseable	< 200 mg/dL (5.2 mM) Concentración deseable Bajo riesgo	< 40 mg/dL (1 mM) Niveles bajos Alto riesgo de CHD	< 100 mg/dL (2.6 mM) Niveles óptimos
150–200 mg/dL (1.7–2.29 mM) Riesgo promedio (requiere tratamiento)	200–240 (5.2–6.2 mM) Niveles ligeramente elevados Riesgo moderado	40-60 mg/dL (1-1.6 mM) Riesgo promedio	100–160 mg/dL (2.6–4.1 mM) Niveles ligeramente elevados
> 200 mg/dL (2.29 mM) Niveles elevados > 875 mg/dL (10 mM) Riesgo de pancreatitis	> 240 mg/dL (6.2 mM) Niveles elevados Alto riesgo de CHD	> 60mg/dL (1.6 mM) Niveles altos Riesgo bajo Factor protector contra CHD	> 160 mg/dL (4.1 mM) Niveles altos Elevado riesgo de CHD

Los niveles de CHO total < 100 mg/dL (2.6 mM) se relacionan con estados patológicos, como la malnutrición, una enfermedad hepática ó cáncer.

Al determinar el CHO total y el CHO-HDL se puede hallar el valor de su cociente, que también se relaciona con el riesgo a de desarrollar una enfermedad cardiovascular:

- si $CHO_T / CHO-HDL \approx 3.5 \rightarrow$ cociente óptimo
- si $CHO_T / CHO-HDL < 5 \rightarrow$ cociente deseable
- si $CHO_T / CHO-HDL > 5 \rightarrow$ alto riesgo de CHD

Dentro de los niveles de CHO-LDL se pueden fijar unos valores deseables en base a la propensión a desarrollar CHD:

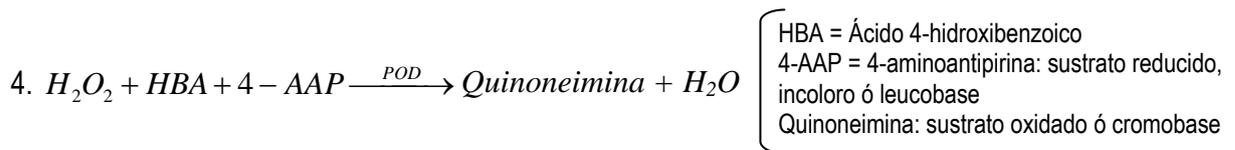
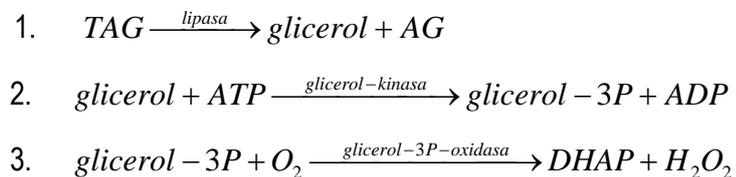
- < 100 mg/dL (1.14 mM) si se padece enfermedad cardiaca ó diabetes.
- < 130 mg/dL (1.5 mM) si existen 2 factores de riesgo
- < 160 mg/dL (1.8 mM) si existe 1 factor de riesgo

Los factores de riesgo son los siguientes: edad, hipertensión, bajos niveles de CHO-HDL, ser fumador y tener antecedentes de enfermedad cardiaca.

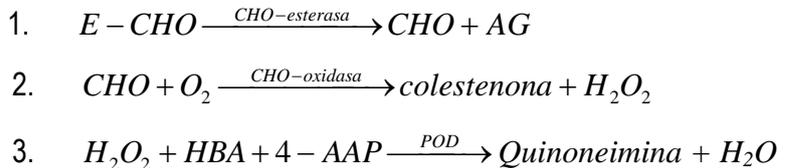
IIC. Determinación colorimétrica de TAG y CHO

Se utilizan métodos enzimáticos específicos y sensibles, que se basan en la formación de peróxido de hidrógeno. Esta reacción se acopla con una reacción redox catalizada por una peroxidasa, de modo que se produce un sustrato coloreado. El sustrato coloreado presenta un máximo de absorbancia a $\lambda = 500 \text{ nm}$. Aplicando la ley de Beer-Lambert, y teniendo en cuenta que la concentración de la cromobase es directamente proporcional a la concentración de sustrato inicial, es posible determinar la concentración inicial de TAG o de CHO en la muestra. Para ello es necesario determinar la absorbancia de una solución patrón (ó estandar), o bien realizar una recta patrón con diferentes concentraciones.

Determinación de TAG:



Determinación de CHO total:



Determinación de HDL-CHO

Se utiliza el ácido fosfotúngstico y $MgCl_2$ para precipitar las LDL y las VLDL, de manera que las HDL son las únicas lipoproteínas que permanecen en solución. Posteriormente, se determinan los niveles de CHO en el sobrenadante tal y como se ha indicado anteriormente.

Determinación de LDL-CHO:

Se utiliza la Fórmula de Friedewald:

$$LDL - CHO(mg / dL) = CHO_T - \left[HDL - CHO + \frac{[TAG]}{5} \right]$$

$$LDL - CHO(mM) = CHO_T - \left[HDL - CHO + \frac{[TAG]}{2.22} \right]$$

Esta fórmula sólo es válida si $[TAG] < 400 \text{ mg/dL}$ (4.66 mM)

III. PROCEDIMIENTO PRACTICO

Para realizar esta práctica las determinaciones se realizarán con kits comerciales. Asimismo se empleará un suero con valores normales y un suero alterado, donde los valores de TAG y CHO son patológicos. Debido a que las micropipetas de las que disponemos son de volumen fijo, hemos ajustado los volúmenes para que puedan ser tomados con el material que disponemos. Por ello, el suero está diluido un factor de 1:5 (10 μL , que es la cantidad mínima para determinar los niveles de CHO y TAG, en 50 μL de volumen por reacción).

IIIa. Materiales y reactivos

- | | |
|--|--------------------------------|
| - tubos de ensayo | - micropipetas y puntas |
| - pipetas de vidrio y pipeteador manual | - tubos de espectrofotómetro |
| - espectrofotómetro | - suero normal y alterado |
| - patrón de CHO (CHO-STD) de $c = 200 \text{ mg/dL}$ (5.2 mM) | - reactivo de trabajo para CHO |
| - patrón de TAG (TAG-STD) de $c = 200 \text{ mg/dL}$ (2.29 mM) | - reactivo de trabajo para TAG |

IIIb. Procedimiento experimental y resultados esperables

Rotular unos tubos como “blanco”, “patrón” ó “muestra” y pipetear los siguientes componentes tal y como se indica a continuación

Determinación de TAG

- Blanco: 50 μL ddH₂O + 2 mL reactivo de TAG
- Patrón: 50 μL TAG-STD + 2 mL reactivo de TAG
- Muestra: 50 μL suero (1:5) + 2 mL reactivo de TAG

Tapar con un parafilm, mezclar por inversión e incubar 10 min a R.T. (ó 5 min a 37 C). Leer la absorbancia a $\lambda = 500 \text{ nM}$ dentro de los 30 min siguientes.

Abs. patrón	Abs. muestra	<p style="text-align: center;">[TAG total] en la muestra</p> <p><i>Indicar los cálculos y expresar el resultado en mg/dL y en mM</i> <i>Determinar en qué rango de valores se sitúa el nivel de TAG hallado</i></p>
--------------------	---------------------	---

Determinación de CHO total

- Blanco: 50 μ L ddH₂O + 2 mL reactivo de CHO
- Patrón: 50 μ L CHO-STD + 2 mL reactivo de CHO
- Muestra: 50 μ L suero (1:5) + 2 mL reactivo de CHO

Tapar con un parafilm, mezclar por inversión e incubar 10 min a R.T. (ó 5 min a 37 C). Leer la absorbancia a $\lambda = 500$ nM dentro de los 30 min siguientes.

Abs. patrón	Abs. muestra	<p style="text-align: center;">[CHO total] en la muestra</p> <p><i>Indicar los cálculos y expresar el resultado en mg/dL y en mM</i> <i>Determinar en qué rango de valores se sitúa el nivel de CHO hallado</i></p>
Abs. blanco	Abs. blanco	

Determinación de CHO-HDL

Para ello es necesario tener en cuenta que para precipitar las VLDL y las LDL se han mezclado 500 μ L de suero con 100 μ L de reactivo de precipitación, es decir, la muestra se ha diluido; por ello, en los cálculos hay que tener en cuenta el factor de dilución utilizado.

Realicen el cálculo basándose en los siguientes valores de absorbancia a $\lambda = 500$ nM.

Abs. patrón 0.583	Abs. muestra 0.175 (suero normal)	[CHO-HDL] en la muestra <i>Indicar los cálculos y expresar el resultado en mg/dL y en mM</i> <i>Determinar en qué rango de valores se sitúa el nivel de CHO hallado</i>
Abs. blanco 0.023	0.128 (suero alterado) Abs. blanco 0.023	

Determinación de CHO-LDL

Para ello es necesario aplicar la fórmula de Friedewald, utilizando los valores anteriormente calculados.

[CHO total]	[CHO-HDL]	[TAG]	[CHO-LDL] en la muestra <i>Indicar los cálculos y expresar el resultado en mg/dL y en mM</i> <i>Determinar en qué rango de valores se sitúa el nivel de CHO hallado</i>
mg/dL	mg/dL	mg/dL	
mM	mM	mM	

IV. ANÁLISIS Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS, COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

Además de realizar las determinaciones y los cálculos anteriormente descritos, es necesario analizar de una manera crítica los resultados obtenidos y situarlos en un posible contexto clínico. Un esquema a seguir sería:

1. Analizar los resultados obtenidos por el grupo y compararlos con los de otros grupos.
2. Discutir las diferencias encontradas entre el suero normal y el alterado. Mostrar dichas diferencias en una representación gráfica donde se indiquen los valores hallados para todos los parámetros y el rango de valores donde se sitúan.
3. Respecto a los valores hallados en el suero patológico, indicar qué mecanismo bioquímico puede ser el responsable de la aparición de valores alterados y qué situaciones fisiológicas y metabólicas están relacionadas con dichas alteraciones.
4. Comentarios y conclusiones.

V. ANALISIS GENERAL DEL METABOLISMO ENERGETICO

Una vez realizadas las prácticas de “*Cuantificación del glucógeno hepático*” (tema 4) y la práctica del “*estudio del perfil lipídico*” (tema 6), se puede realizar un análisis de diversas situaciones metabólicas. La Glc y los TAG desempeñan un papel clave en el metabolismo energético, ya que constituyen las principales fuentes de energía. Las principales rutas implicadas en el metabolismo energético son: la glucólisis, el ciclo de Krebs, la gluconeogénesis, el metabolismo del glucógeno, la cetogénesis y el metabolismo de ácidos grasos (síntesis y degradación). Los órganos más destacados son el hígado, el tejido muscular y el tejido adiposo, si bien el riñón contribuye a la gluconeogénesis y el cerebro es el principal consumidor de reservas energéticas. Estos tejidos están relacionados entre sí, principalmente a través del transporte de ácidos grasos, el ciclo del lactato y el ciclo de la Glc – Ala (ciclo de Cori). Además, el metabolismo energético está sometido a control hormonal, fundamentalmente por la insulina, el glucagón y la adrenalina.

Podemos destacar tres situaciones metabólicas distintas: el metabolismo postprandial, el metabolismo en ayuno (existiendo diferencias entre el ayuno nocturno y el prolongado), y la diabetes, como situación fisiopatológica.

Cuestión: Realizar las comparaciones pertinentes entre estos diversos estados metabólicos.