

Evaluación de los métodos directo, precipitado y Friedewald para la cuantificación de colesterol LDL y HDL en pollos de engorde

José Henry Osorio¹ / Jancy Darly Flórez² / Jorge Enrique Pérez³

Resumen

El objetivo fue evaluar los métodos directo y precipitado para el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad y los métodos directo, precipitado y Friedewald para el colesterol de las lipoproteínas de baja densidad en pollos de engorde. Se obtuvo suero de 30 pollos de engorde de 36 días de edad, en ayunas, de la línea Cobb 500, se determinaron los niveles de triglicéridos y colesterol total usando un kit enzimático-colorimétrico. El colesterol, tanto de las lipoproteínas de alta densidad como de las de baja densidad, se midió por el método de precipitación y el método directo, y la estimación del colesterol de la lipoproteína de baja densidad se determinó usando la fórmula de Friedewald. Las medias \pm desviación estándar para los niveles de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad, por los métodos directo y precipitado, en mg/dl, fueron de: $92,8 \pm 16,7$; $92,2 \pm 16,3$, respectivamente. El valor P del test F es mayor a 0,05, por lo cual no hay diferencia estadísticamente significativa, con un índice de confianza de 95 % entre métodos, y para los niveles de colesterol de la lipoproteína de baja densidad por los métodos directo, precipitado y Friedewald, en mg/dl, fueron: $51,8 \pm 9,4$; $21,9 \pm 12,6$ y $26,1 \pm 12,9$, respectivamente. El valor P del test F es inferior a 0,05 evidenciando diferencia estadísticamente significativa, con un índice de confianza de 95 % entre métodos. Se concluye que en los pollos de engorde se puede cuantificar el colesterol de la lipoproteína de alta densidad con los dos métodos evaluados (directo y precipitado), sin embargo, para calcular el colesterol de la lipoproteína de baja densidad solo se recomienda utilizar el método directo ya que los métodos de precipitado y de Friedewald dieron resultados mucho menores en dicha especie.

Palabras clave: colesterol, C-HDL, C-LDL, métodos de análisis, pollos, triglicéridos.

Assessment of the Direct, Precipitated and Friedewald Methods for Quantifying LDL and HDL Cholesterol in Broilers

Abstract

The objective was to evaluate the direct and precipitated methods for cholesterol from high-density lipoprotein, and the direct, precipitated and Friedewald methods for cholesterol from low-density lipoprotein in broilers. Serum was obtained from thirty 36-day old fasting broilers from the Cobb 500 line; triglyceride and total cholesterol levels were determined using an enzymatic-colorimetric kit. Cholesterol, both of high and low density lipoprotein, was measured by the precipitation method and the direct method, and the estimation of the low density lipoprotein cholesterol was determined using the Friedewald formula. The mean \pm standard deviation for cholesterol levels of high density lipoprotein by the direct

1 Laboratorio de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

✉ jose.osorio_o@ucaldas.edu.co

2 Estudiante de Maestría en Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

✉ jancydarly@yahoo.com.ar

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

✉ labmicro@ucaldas.edu.co

and precipitated methods in mg/dl, were: 92.8 ± 16.7 , 92.2 ± 16.3 , respectively. The f-test p-value is higher than 0.05, and therefore there is no statistically significant difference, with a confidence index of 95 % between methods, and for the cholesterol levels of low density lipoprotein by the direct, precipitated and Friedewald methods, in mg/dl, they were: 51.8 ± 9.4 ; 21.9 ± 12.6 and 26.1 ± 12.9 respectively. The f-test p-value is less than 0.05, demonstrating a statistically significant difference, with a confidence index of 95 % between methods. It is concluded that, in broilers, high-density lipoprotein cholesterol can be quantified by means of both of the evaluated methods (direct and precipitated); however, only the direct method is recommended to calculate low density lipoprotein cholesterol, as the precipitated and Friedewald methods gave much lower results in that species.

Keywords: Cholesterol, HDL-C, LDL-C, methods of analysis, chickens, triglycerides.

Avaliação dos métodos direto, precipitado e Friedewald para a quantificação de colesterol LDL e HDL em frangos de engorde

Resumo

O objetivo foi avaliar os métodos direto e precipitado para o colesterol das lipoproteínas de alta densidade e os métodos direto, precipitado e Friedewald para o colesterol das lipoproteínas de baixa densidade em frangos de engorde. Obteve-se soro de 30 frangos de engorde de 36 dias de idade, em jejum, da linha Cobb 500, determinaram-se os níveis de triglicérides e colesterol total usando um kit enzimático-colorimétrico. O colesterol, tanto das lipoproteínas de alta densidade como das de baixa densidade, foi medido pelo método de precipitação e o método direto, e a estimativa do colesterol da lipoproteína de baixa densidade determinou-se usando a fórmula de Friedewald. As médias \pm desvio padrão para os níveis de colesterol das lipoproteínas de alta densidade, pelos métodos direto e precipitado, em mg/dl, foram de: $92,8 \pm 16,7$; $92,2 \pm 16,3$, respectivamente. O valor P do teste F é maior a 0,05, pelo qual não há diferença estadisticamente significativa, com um índice de confiança de 95 % entre métodos, e para os níveis de colesterol das lipoproteínas de baixa densidade pelos métodos direto, precipitado e Friedewald, em mg/dl, foram: $51,8 \pm 9,4$; $21,9 \pm 12,6$ e $26,1 \pm 12,9$, respectivamente. O valor P do teste F é inferior a 0,05 evidenciando diferença estatisticamente significativa, com um índice de confiança de 95 % entre métodos. Conclui-se que nos frangos de engorde se pode quantificar o colesterol da lipoproteína de alta densidade com os dois métodos avaliados (direto e precipitado), porém, para calcular o colesterol da lipoproteína de baixa densidade só se recomenda utilizar o método direto já que os métodos de precipitado e de Friedewald deram resultados muito menores nessa espécie.

Palavras chave: colesterol, C-HDL, C-LDL, métodos de análise, frangos, triglicérides.

INTRODUCCIÓN

En las aves comerciales el estudio sobre el metabolismo de lípidos es extensamente estudiado, no solo analizando el efecto de la dieta en la grasa del pollo (1), sino la relación que hay entre la concentración

de los lípidos sanguíneos con la grasa abdominal (2,3). Diversos estudios han mostrado la correlación existente entre los niveles elevados de colesterol unido a lipoproteínas (4), sin embargo, en la mayoría de ellos el método de referencia para la determinación de las lipoproteínas requiere ultracentrifugación (5) la cual es de difícil adquisición,

requiere mucho tiempo y de personal entrenado. Por tanto, en recientes estudios se ha empezado a observar la utilización de la fórmula de Friedewald, la cual se basa en las concentraciones de colesterol total (CT), colesterol de la lipoproteína de alta densidad (C-HDL) y triglicéridos en suero (6). No obstante, esta fórmula carga con los errores analíticos de cada medición llegando a tener un error mayor al calcular el colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (C-LDL).

Por otra parte, existen otros métodos para calcular no solo el C-LDL sino el C-HDL también de manera indirecta, pues se basa en un previo precipitado de lipoproteínas, que en el caso de las aves puede variar los resultados por ser una especie tan diferente a los mamíferos, especialmente a los humanos.

El presente trabajo se realizó para evaluar los métodos directo, precipitado y de Friedewald a fin de calcular el C-LDL y el C-HDL y así recomendar el método o los métodos más adecuados para los diversos estudios que se basan en diversos tipos de dietas con el fin de disminuir la grasa abdominal del pollo de engorde.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se adquirieron pollos de engorde de la línea Cobb 500 en una granja ubicada en el municipio de Chinchiná (Caldas) perteneciente a la empresa Zarpollo, a los 21 días de edad; se mantuvieron a una temperatura promedio de 25 °C, con 12 horas de luz y 12 de oscuridad, en un cuarto de ambiente controlado. Fueron alimentados durante 15 días

con una dieta conocida para pollo de engorde (tabla 1). El peso promedio al momento de la toma de muestras (día 36) fue de 1735 g. El número de aves para el estudio fue de 30, se les realizó un ayuno de 19 h, se tomaron 20 cm de sangre directamente de la yugular. La sangre se centrifugó a 3000 rpm por 15 min, y el suero se congeló a -30 °C. Las muestras se llevaron a una temperatura de 37 °C por 10 min.

Se determinaron, en suero, los niveles de triglicéridos, colesterol total, C-HDL y C-LDL por el método de Friedewald, cuyo fundamento es el siguiente: el C-HDL es precipitado en presencia de ácido fosfotúngstico e iones de magnesio y determinado mediante el método enzimático-colorimétrico aplicado a su vez para la determinación de los niveles de colesterol total y los niveles de triglicéridos de la muestra. Luego, los valores de los triglicéridos se dividieron entre 5, y este valor correspondió a los niveles de colesterol-VLDL. Los valores de colesterol LDL se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$\text{colesterol LDL} = \text{colesterol total} - \text{colesterol HDL} - \text{colesterol VLDL}$$

Posteriormente se determinaron los niveles del C-HDL mediante el método directo, su fundamento es el siguiente: el colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), las de muy baja densidad (VLDL) y los quilomicrones son hidrolizados por la colesterol-oxidasa mediante una reacción enzimática acelerada no formadora de color. Posteriormente se solubiliza el C-HDL de la muestra en presencia de un detergente para ser cuantificado espectrofotométricamente.

Tabla 1. Composición de la dieta para pollos de engorde

Materia seca (%)	Nitrógeno total (%)	Proteína bruta (%)	Grasa total (%)	Fibra bruta (%)	Cenizas (%)	Fósforo (%)	Calcio (%)
93,48	3,02	18,88	2,1	4,09	6,41	0,45	0,7

Luego se determinaron los niveles de C-LDL mediante el método directo, su fundamento es el siguiente: un detergente específico solubiliza el C-HDL, las VLDL y los quilomicrones. Los ésteres de colesterol son hidrolizados por la colesterol-esterasa y la colesterol-oxidasa mediante una reacción no formadora de color. Un segundo detergente solubiliza el C-LDL de la muestra y el colesterol LDL se cuantifica espectrofotométricamente. Posteriormente se determinaron los niveles de colesterol LDL utilizando el método de precipitación cuyo fundamento es el siguiente: las LDL presentes en la muestra precipitan en presencia de polivinil sulfato. La concentración de colesterol LDL se calculó por diferencia entre los valores de colesterol en el suero y en el sobrenadante obtenido tras la precipitación. El colesterol se cuantificó espectrofotométricamente. Todos los análisis fueron realizados en un equipo Kayto RT-1904C, analizador semiautomático de química.

Los datos fueron analizados usando Anova simple. Para el análisis estadístico se utilizó Statgraphics Plus 5.1. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron con el P valor < 0,05 del test F.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de media, desviación estándar, mínimo, máximo y rango para el colesterol HDL y LDL, por los métodos de directo, precipitación y Friedewald se presentan en la tabla 2. El C-HDL con el método directo fue de 92,8 mg/dl, y con el método de precipitación fue de 92,2 mg/dl. El P valor del test F mayor a 0,05 evidencia que no hay diferencias estadísticamente significativas entre métodos para dichos valores, con índice de confianza (IC) del 95 %. Estos resultados coinciden con los encontrados en trabajos anteriores donde miden el C-HDL por el método de precipitación (3) con la técnica de Bayer Advia Reagent Packs (4), pero difieren en los resultados donde usan también el método de precipitación del C-HDL (7).

El colesterol LDL reportó valores en mg/dl de 51,8 por el método directo, de 21,9 por el método de precipitado, y de 26,1 por el método de Friedewald. Entre los valores del método de precipitado y Friedewald, el P valor del test F mayor a 0,05 evidencia que no hay diferencias estadísticamente significativas entre métodos para dichos valores, con un IC

Tabla 2. Concentración de CT, TG, C-VLDL, C-HDL precipitado, C-HDL directo, C-LDL Friedewald, C-LDL precipitado, C-LDL directo

	CT	TG	C-VLDL (TG/5)	C-HDL Precipitado	C-HDL Directo	C-LDL Friedewald	C-LDL Precipitado	C-LDL Directo
Media	123,7	22,0	4,4	92,2	92,8	26,1 ^b	21,9 ^b	51,8 ^a
Desviación estándar	23,8	8,3	1,6	16,3	16,7	12,9	12,6	9,4
Mínimo	74,4	10,4	2,1	54,6	50,2	1,5	1,7	34,9
Máximo	166,6	46,4	9,3	128,9	134,1	51,6	47,0	65,9
Rango	92,1	36,0	7,2	74,3	83,9	50,1	45,3	31,0
P valor				0,892		0,241		
P valor						0,000		

CT: colesterol total, TG: triglicéridos, C-VLDL: colesterol de lipoproteína de muy baja densidad, C-HDL: colesterol de lipoproteína de alta densidad, C-LDL: colesterol de lipoproteína de baja densidad, P: precipitado, D: directo, F: Friedewald.

del 95 %; sin embargo, el método directo tiene un P valor del test F inferior a 0,05, indicando diferencia estadísticamente significativa entre el método directo con los métodos de precipitado y de Friedewald, con un IC del 95 % (tabla 2).

Los recientes estudios para la cuantificación del colesterol LDL en pollos han utilizado la fórmula de Friedewald debido a que es mucho más sencillo y económico que determinar las lipoproteínas directamente por ultracentrifugación. Pese a esto, el método de Friedewald puede presentar errores en los resultados debido a los tres procesos de análisis de las muestras, los cuales se hacen más evidentes cuando la especie que se va a analizar tiene los triglicéridos elevados en un rango mayor a 400 mg/dl (6), situación que ocurre en las gallinas ponedoras (8); no obstante, este no es el caso de los pollos de engorde pues los resultados de los triglicéridos fueron de 22 mg/dl lo cual coincide con otros trabajos donde se reportan valores similares del total de triglicéridos en sangre (3,4,9). En el presente trabajo dicho método y el de precipitado presentaron diferencias significativas con el método directo (tabla 2), lo que indica la posibilidad de errores en los resultados de los diversos trabajos realizados a nivel mundial que están utilizando el método de Friedewald o precipitado para determinar valores de C-LDL.

CONCLUSIONES

La cuantificación del colesterol de la lipoproteína de alta densidad en pollos de engorde se puede realizar con los métodos directo y precipitado, sin ningún problema; no obstante, para calcular el colesterol de la lipoproteína de baja densidad se recomienda el método directo pues los métodos de precipitado y de Friedewald dieron resultados muchos menores, ya sea por particularidad de la especie en el proceso de precipitación o por imprecisiones

analíticas acumuladas por las tres determinaciones requeridas en la utilización de la fórmula de Friedewald. Se recomienda siempre que se desee estudiar el colesterol LDL hacer pruebas con el método directo del laboratorio que tengan a disposición y comparar los resultados con el método de Friedewald o precipitado antes de dar resultados de las respectivas investigaciones.

AGRADECIMIENTOS

A Carlos Ramírez de Zarpollo por su colaboración en la provisión de los pollos de engorde, a William Narváez Solarte por permitirnos usar las instalaciones de ambiente controlado de la Universidad de Caldas, a Luis Fernando Uribe por su colaboración con la adquisición del alimento para los pollos, y a Juan Manuel Pérez por su colaboración en el trabajo de campo.

REFERENCIAS

1. Aletor VA, Eder K, Becker K, Paulicks BR, Roth FX, Roth-Maier DA. The effects of conjugated linoleic acids or an α -glucosidase inhibitor on tissue lipid concentrations and fatty acid composition of broiler chicks fed a low-protein diet. *Poult Sci* 2003;82 (5):796-804.
2. Wang KH, Musa HH. The impact of obesity on serum biochemical components. *The Journal of Cellular Animal Biology* 2007;1(5):87-91.
3. Musa HH, Chen GH, Cheng JH, Yousif GM. Relation between abdominal fat and serum cholesterol, triglycerides, and lipoprotein concentration in chicken breeds. *Turk. J. Vet. Anim. Sci* 2007;31(6):375-379.
4. Velasco S, Ortiz LT, Alzueta C, Rebole A, Trevino J, Rodriguez ML. Effect of inulin supplementation and dietary fat source on performance, blood serum metabolites, liver lipids, abdominal fat deposition, and tissue fatty acid composition in broiler chickens. *Poult Sci* 2010;89(8):1651-1662.

5. Chen KL, Chi WT, Chiou PWS. Caponization and testosterone implantation effects on blood lipid and lipoprotein profile in male chickens. *Poult Sci* 2005;84(4):547-552.
6. Friedewald W, Levy R, Fredrickson D. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 1972;18(6):499-502.
7. Musa HH, Chen GH, Wang KH, Li BC, Mekki DM, Shu JT, Ju HP. Relation between serum cholesterol level, lipoprotein concentration and carcass characteristics in genetically lean and fat chicken breeds. *J Biol Science* 2006;6(3):616-620.
8. Salma U, Miah AG, Tareq KMA, Maki T, Tsujii H. Effect of dietary rhodobacter capsulatus on egg-yolk cholesterol and laying hen performance. *Poult Sci* 2007;86(4):714-719.
9. Hermier D, Chapman J, Leclercq B. Plasma lipoprotein in fasted and refed chickens of two strains selected for high or low adiposity. *J Nutr* 1984;114(6):1112-1121.