

Bioquímica Médica II

Práctica: DETERMINACIÓN DE COLESTEROL (basado en el sistema BioSystems)

GENERALIDADES

El colesterol es un esteroide de alto peso molecular que contiene una estructura Ciclopentanofenantreno. Aunque se le considera un lípido, no sirve, como fuente de energía para el metabolismo, el organismo no puede degradar el anillo de colesterol.

Las Lipoproteínas LDL transportan de 65 al 75 % del colesterol plasmático. La hipercolesterolemia esta casi siempre asociada con la elevación del colesterol LDL (tipo IIa). Es muy raro que la elevación este asociada con incremento en el colesterol HDL. Las elevaciones del colesterol LDL pueden ser el resultado de alteraciones monogénicas, alteraciones poligénicas o secundario a otras enfermedades. Ejemplos: hipercolesterolemia familiar, defecto familiar de Apo B100, hipercolesterolemia poligénica, cáncer de cabeza de páncreas, diabetes, hipotiroidismo, síndrome nefrótico, etc.

El colesterol de la dieta se absorbe parcialmente y también se sintetiza en el hígado y otros tejidos. El colesterol se excreta a la bilis como tal o tras su transformación en sales biliares primarias y secundarias.

Las concentraciones elevadas de colesterol LDL se asocian con un riesgo progresivamente creciente de aterosclerosis y enfermedad de las arterias coronarias.

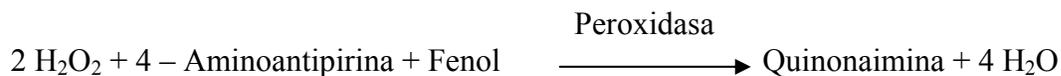
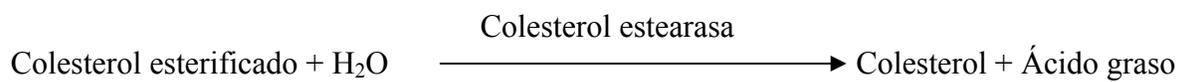
Las concentraciones séricas de colesterol disminuyen (hipocolesterolemia) en: desnutrición, esteatorrea idiopática, hepatitis, hipertiroidismo, infecciones agudas, anemia, cáncer, malabsorción y anorexia nerviosa.

El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta el resultado de un único ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

Para las pruebas de perfil lipídico el paciente debe estar en ayuno total excepto agua, durante un lapso de 12 a 24 horas antes de la prueba. No debe haber realizado ejercicio vigoroso y bajo la dieta corriente el día anterior de la prueba.

FUNDAMENTO DEL MÉTODO (COLESTEROL OXIDASA/PEROXIDASA)

Tanto el colesterol libre como el esterificado presentes en la muestra originan, según las reacciones acopladas descritas a continuación, un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría.



COMPOSICIÓN

A. Reactivo. Pipes 35 mmol/L, colato sódico 0,5 mmol/L, fenol 28 mmol/L, colesterol esterasa > 0,2 U/mL, colesterol oxidasa > 0,1 U/mL, peroxidasa > 0,8 U/mL, 4-aminoantipirina 0,5 mmol/L, pH 7,0.

S. Patrón de Colesterol. Colesterol 200 mg/dL (5,18 mmol/L). Patrón primario acuoso.

MUESTRAS

Suero o plasma recogidos mediante procedimientos estándar. El colesterol en suero o plasma es estable 7 días a 2 - 8° C. Pueden utilizarse como anticoagulantes la heparina, EDTA, oxalato o fluoruro.

PROCEDIMIENTO

1. Colocar a temperatura ambiente el reactivo.
2. Pipetear en tubos de ensayo: (Nota 1)

	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón Colesterol (S)	-	10 µL	-
Muestra	-	-	10 µL
Reactivo (A)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

3. Agitar bien e incubar los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente (16-25° C) o durante 5 minutos a 37° C.
4. Leer la absorbancia (A) del Patrón y de la Muestra a 500 nm frente al Blanco. El color es estable durante al menos 2 horas.

CÁLCULOS

La concentración de colesterol en la muestra se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$\frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{patrón}}} \times C_{\text{patrón}} = C_{\text{muestra}}$$

Si se utiliza para calibrar el Patrón de Colesterol suministrado:

$$\times 200 = \text{mg/dL colesterol}$$

$$\times 5,18 = \text{mmol/L colesterol}$$

VALORES DE REFERENCIA

Los siguientes valores discriminantes universales han sido establecidos por el US Nacional Cholesterol Education Program y también aceptados en otros países para la evaluación del riesgo de enfermedad de las arterias coronarias.

Hasta 200 mg/dL = 5,2 mmol/L	Optimo
200-239 mg/dL = 5,2-6,21 mmol/L	Moderado
> 240 mg/dL => 6,24 mmol/L	Elevado

CARACTERÍSTICAS METROLÓGICAS

- Límite de detección: 0,3 mg/dL = 0,008 mmol/L
- Límite de linealidad: 1000 mg/dL = 26 mmol/L. Cuando se obtengan valores superiores, diluir la muestra 1/2 con agua destilada y repetir la medición.
- Interferencias: La hemoglobina (>5 g/L) y la bilirrubina (>10 mg/dL) interfieren. La lipemia (triglicéridos 10 g/L) no interfiere. Otros medicamentos y sustancias pueden interferir.