

Instituto Nacional de Endocrinología  
Hospital Provincial de Pinar del Río "Abel Santamaría"  
Instituto Nacional de Cardiología y Cirugía Cardiovascular

## MONTAJE Y ESTANDARIZACIÓN PARA DETERMINAR COLESTEROL INMUNE EN SUERO HUMANO

Lic. Giovanna Pereira Roca,<sup>1</sup> Lic. Arturo Reyes Durán,<sup>1</sup> Lic. Alina Rodríguez Riverón,<sup>1</sup>  
Dr. Daniel Sánchez Serrano<sup>2</sup> y Victoria E. Barrios Díaz<sup>3</sup>

### RESUMEN

Se realizó este trabajo para montar y estandarizar un método con el cual evaluar la lipoproteína de baja densidad oxidada (LDLox) contenida en los inmunocomplejos, mediante la cuantificación del colesterol total presente en el precipitado de polietilenglicol denominado "colesterol inmune". Se obtuvo una adecuada respuesta lineal, que se corroboró con los resultados del análisis de regresión, donde se pudo computar la recta de mejor ajuste para los puntos. Se halló un rango de concentración de la curva de 5 a 40 µg/mL, el límite de detección del método fue de 0,5 µg/mL, la repetibilidad y la reproducibilidad fueron de 3,7 y 4,5 % respectivamente. Al analizar la recuperación total del método esta fue del 96,3 %. Se obtuvo el 80 % de sensibilidad y especificidad, así como el 84 y 76 % de valor predictivo positivo y negativo, respectivamente. Los resultados obtenidos avalan la calidad analítica del método para ser utilizado en las investigaciones relacionadas con la aterosclerosis coronaria, cerebral y periférica.

*Descriptores DeCS:* LIPOPROTEÍNAS LDL; AUTOANTICUERPOS;  
ESTANDARES DE REFERENCIA; COLESTEROL.

El desarrollo actual de las investigaciones en el campo de la arterosclerosis ha permitido acumular muchas evidencias acerca de la importante función que desempeña la modificación oxidativa de las lipoproteínas aterogénicas en la presencia

y progresión de la misma. La concentración elevada de la lipoproteína de baja densidad (LDL) constituye uno de los mayores factores de riesgo para la arterosclerosis. Estudios clínicos, epidemiológicos y genéticos, han demostrado convincente-

<sup>1</sup> Licenciada en Bioquímica. Investigadora. Instituto Nacional de Endocrinología.

<sup>2</sup> Doctor en Ciencias. Especialista de II Grado en bioquímica Clínica.

<sup>3</sup> Licenciada en Biología.

mente que la LDL promueve la enfermedad, aunque el mecanismo preciso por el cual esta provoca el desarrollo de la aparición temprana de las estrías de grasa no ha sido aún dilucidado.

La LDL oxidada entra a la célula por un mecanismo no regulado, mediado por un receptor de membrana que se denomina receptor *scavenger* y que se encuentra fundamentalmente en los macrófagos y las células musculares lisas, aunque se han detectado también en las células endoteliales.<sup>1</sup> La LDL oxidada tiene un elevado potencial aterógeno, ya que al tener bloqueados residuos de lisina y arginina presenta una densidad de carga positiva menor que la LDL nativa, por lo que ya no es reconocida por el receptor Apo B100/E, mientras que sí lo es por el receptor *scavenger* de los macrófagos y las células musculares lisas de la pared vascular. Al no estar regulado, este receptor permite a las células cargarse indefinidamente de colesterol hasta transformarse en células espumosas, que se depositan en el vaso y desempeñan una función esencial en la génesis y el desarrollo de la lesión ateromatosa, además de adquirir una serie de propiedades citotóxicas y quimiotácticas para el sistema monocito-macrófago que contribuyen a su carácter aterógeno.<sup>1</sup>

Aparentemente, la LDL oxidada es más inmunogénica que la LDL nativa, lo cual sugiere que el nivel de autoanticuerpos contra ellas refleja la extensión in vivo de la oxidación de la LDL nativa. La medición directa de la LDL oxidada en suero o plasma no es factible por la protección que sobre ella tienen los agentes antioxidantes presentes en la circulación general, es por eso que el descubrimiento de los autoanticuerpos contra las LDL oxidada en suero humano y la formación del complejo inmune estimulan la acumulación de éteres de colesterol en macrófagos lo cual da lugar a la formación de las células espumosas.<sup>2-4</sup>

El objetivo de nuestro trabajo es el montaje y estandarización de la determinación del inmunocomplejo circulante (autoanticuerpo-LDL oxidada) en suero humano, enfocado y desarrollado como parte del esfuerzo dirigido a lograr métodos de elevada calidad y factibles de ser empleados por los laboratorios clínicos de nuestra red de salud en el estudio de la arterosclerosis.

## MÉTODOS

### REACTIVOS

- Polietilenglicol 6 000 (PEG). Merck.
- Kit enzimático colorimétrico para determinar colesterol total de la Boehringer Mannheim.<sup>5</sup>
- Calibrador comercial *Preciset cholesterol* de la Boehringer Mannheim.

### EQUIPOS

- Baño circulatorio termostático. HAAKE D1.
- Centrífuga *Eppendorf*.
- Espectrofotómetro *Ultrospec 2 000 Pharmacia Biotech*.

### MÉTODO ANALÍTICO

El complejo inmune circulante fue precipitado del suero combinando volúmenes iguales de suero con polietilenglicol de 6 000 (PEG) al 5 %. La mezcla fue incubada en un baño termostático a 18° durante 18 h. El complejo fue sedimentado por centrifugación a 6 000 rpm, durante 30 min. El precipitado fue lavado 3 veces con PEG al 2,5 %. El colesterol contenido en el complejo

inmune precipitado fue determinado utilizando un kit enzimático-colorimétrico comercial para determinar colesterol total de la *Boehringer Mannheim*.<sup>6-8</sup>

El precipitado fue resuspendido directamente en 1 mL del reactivo de colesterol e incubado 20 min a temperatura ambiente, hasta el desarrollo del color, las lecturas se realizaron a 500 nm en el espectrofotómetro, en cubetas plásticas de 1,25 mL de volumen, de 1 cm de paso de luz de la Sarsted.

## EVALUACIÓN ANALÍTICA DEL MÉTODO

Se realizó la validación analítica para el método desarrollado mediante los estudios de calibración, repetibilidad, reproducibilidad, límite de detección, sensibilidad, especificidad.<sup>9</sup>

La linealidad del método se obtuvo después de promediar 12 curvas de calibración, de 6 puntos en un rango de 5 a 40 µg/mL, con un incremento de 5 µg/mL, y por triplicado cada punto de la curva. Para el estudio de la repetibilidad y de la reproducibilidad se analizaron 3 muestras de sueros frescos, que abarcaban la zona baja, la media y la alta de la curva de calibración, para la repetibilidad fueron procesadas 12 veces en una misma corrida y para la reproducibilidad se procesaron 3 réplicas de cada muestra por corrida a lo largo de 6 corridas analíticas. El límite de detección fue calculado del estudio de reproducibilidad y se consideró valor promedio correspondiente a la media de densidad óptica más 2 desviaciones estándar (2DE) del valor de absorbancia obtenido para el calibrante cero en 6 corridas.

La recuperación del método se realizó con 3 muestras de concentración conocidas de colesterol inmune, las que fueron

suplementadas con concentraciones exógenas conocidas del analito.

Para estimar el valor diagnóstico del "colesterol inmune" en la enfermedad arterial coronaria se determinó la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo y el negativo a partir del procesamiento de 50 muestras de suero tomadas de banco de sangre al azar "casos normales", y 65 muestras de pacientes escogidos consecutivamente al azar entre los asistentes a la Consulta de Cardiopatía Isquémica en el Instituto Nacional de Cardiología y Cirugía Cardiovascular "casos patológicos". Se utilizó como valor de corte del "colesterol inmune" de normales y patológicos ( $\geq 15 \mu\text{g/mL}$ ), valor este reportado en la literatura como criterio de riesgo de aterosclerosis coronaria.<sup>8</sup>

Las fórmulas utilizadas fueron:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\# \text{ de individuos enfermos con resultado patológico}}{\# \text{ total de individuos enfermos}} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{\# \text{ de individuos sanos con resultado normal}}{\# \text{ total de individuos sanos}} \times 100$$

$$\text{Valor predictivo positivo (VPP)} = \frac{\# \text{ de individuos enfermos con resultado patológico}}{\# \text{ total de individuos con resultados patológicos}} \times 100$$

$$\text{Valor predictivo} = \frac{\# \text{ de individuo sanos con resultado normal}}{\# \text{ total de individuos con resultados normales}} \times 100$$

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se obtuvo la media, desviación estándar, mediana, máximo y mínimo de la variable

estudiada, la sensibilidad, especificidad, y valores predictivos del colesterol inmune se obtuvieron con respecto a la clasificación *a priori* de normales y patológicos citada anteriormente, todos los análisis estadísticos se hicieron empleando el paquete estadístico SPSSPC versión 3.1.

## RESULTADOS

La figura 1 muestra la curva dosis-respuesta de la determinación del colesterol en el precipitado inmune con PEC, la curva obtenida es el resultado de promediar 12 corridas, se obtuvo una adecuada respuesta lineal, que se corrobora con los resultados del análisis de la regresión, donde se pudo computar la recta de mejor ajuste para los puntos. Se observó un desplazamiento proporcional de la densidad óptica a las diferentes concentraciones de colesterol del precipitado del inmunocomplejo autoanticuerpo-LDLox. El rango de concentración de la curva patrón fue de 5 a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

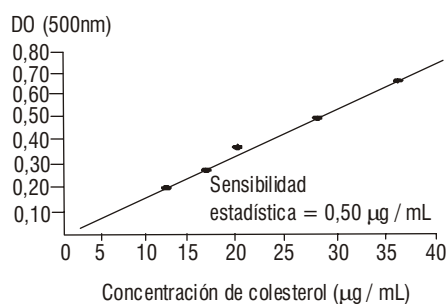


FIG. 1. Gráfico del comportamiento de la curva patrón ( $n=12$ ).

El límite de detección del método fue de 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , concentración que no hemos

encontrado en las muestras de suero utilizadas en el estudio de montaje y estandarización del método.

En la realización del estudio de precisión, los resultados fueron satisfactorios, como se muestra en la tabla 1. La repetibilidad del método evaluada a través de 3 muestras de suero rindió un coeficiente de variación promedio de 3,7 %, el cual consideramos adecuado para este tipo de determinación, de forma similar los resultados obtenidos en el estudio de reproducibilidad aportó un coeficiente de variación promedio de 4,5 %, superior a los del estudio de repetibilidad como era de esperar. Se calculó el coeficiente de variación total para cada muestra los cuales fueron 7,14; 5,13 y 4,38 %.

Los resultados del estudio de recuperación se muestran en la tabla 2, el porcentaje de recuperación promedio de las 3 muestras estudiadas fue del 96,3 %. Cuando ploteamos los datos esperados (teóricos) en el eje de las abscisas vs. los datos observados (reales) de las 3 muestras suplementadas (fig. 2) en 3 zonas diferentes de la curva patrón obtuvimos una recta de regresión de pendiente 0,94 e intercepto 0,37, y  $r=1,000$ .

Tomando en consideración los resultados obtenidos respecto a la clasificación *a priori* de normales y patológicos en la tabla 3, se arrojaron los siguientes resultados:

Para un valor de corte de 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .<sup>7,8</sup>

Criterio: riesgo si el colesterol inmune es  $\geq 15 \mu\text{g}/\text{mL}$

- 80 % sensibilidad, lo que significa que hay un 20 % de individuos enfermos que no son detectados, o sea de cada 100 muestras patológicas se reportan como normales 20 por el colesterol inmune.

TABLA 1. Estudio de precisión del método

	Repetibilidad			Reproducibilidad		
	Punto alto	Punto medio	Punto bajo	Punto alto	Punto medio	Punto bajo
Media ( $\mu\text{g/mL}$ )	15,20	8,41	5,56	14,98	7,39	5,49
DE	0,47	0,26	0,27	0,48	0,30	0,29
CV %	3,00	3,15	4,9	3,20	4,05	5,20

TABLA 2. Estudio de recuperación del método

Muestras	Esperada (colesterol inmune)	Observada (colesterol inmune)	Porcentaje de recuperación
M1 Zona baja	12,13	11,85	97,70
M2 Zona media	19,80	18,90	95,45
M3 Zona alta	35,60	33,90	95,50
Total			96,3

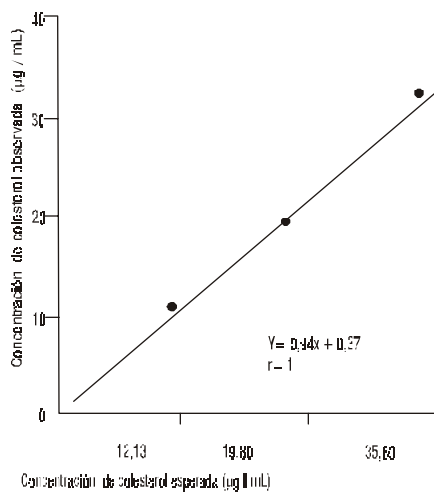


FIG. 2. Relación entre los valores de concentración observados y esperados del estudio de recuperación.

TABLA 3. Estudio de especificidad, sensibilidad y valores predictivos, positivos y negativos

V E R D A D	Criterio	Colesterol inmune		Total
		Normal	Patológico	
D	Normal	40	10	50
	Patológico	13	52	65
Total		53	62	115

80 % sensibilidad; 76 % especificidad; 84 % VPP y 76 % VPN.

- 80 % especificidad, lo cual significa que hay un 20 % de individuos sanos que no se determinan como tal, o sea, de cada 100 muestras normales, se reportan como patológicos por el colesterol inmune 20 que verdaderamente no lo son.
- 84 % como valor predictivo positivo (VPP), o sea, de cada 100 casos clasificados como patológicos por el colesterol inmune, 16 de ellos realmente no lo son.
- 76 % como valor predictivo negativo (VPN), esto implica que de cada 100 casos reportados como normales por el colesterol inmune, 24 de ellos son realmente patológicos.

## DISCUSIÓN

Resulta notable el incremento experimentado en los años recientes en el número de investigaciones básicas, clínicas y epidemiológicas en el campo de las lipoproteínas, particularmente en relación con la LDL. La oxidación de la LDL ocurre en las paredes arteriales, las moléculas oxidadas son secuestradas por diferentes antioxidantes. Las paredes de las arterias

ateroscleróticas contienen niveles de iones metálicos redox activos, por lo que las LDL de los pacientes con enfermedades cardiovasculares, a consecuencia de la arterosclerosis, son más susceptibles a la oxidación, posiblemente como resultado de la reducción de antioxidantes endógenos como la vitamina E.<sup>10</sup>

La peroxidación de los lípidos de las LDL y la subsecuente generación de aldehídos reactivos, producen cambios en la apo B 100, que modifican marcadamente las propiedades de las LDL. Este proceso estimula la formación de autoanticuerpo (IgG, IgM), los que reconocen a estas apo B100 modificadas.<sup>4</sup>

Como se comentó en la introducción, la medición directa de la LDL oxidada en suero o plasma no es factible por la protección que sobre ella tienen los agentes antioxidantes presentes en la circulación general, es por ello que la determinación de los autoanticuerpos contra las LDL oxidadas en suero humano ha despertado gran interés en los últimos años.

Los resultados que presentamos avalan la calidad analítica del método desarrollado para cuantificar el colesterol presente en el inmunocomplejo autoanticuerpo-LDLox.

En la curva patrón se observó que hay un desplazamiento proporcional de la densidad óptica a las diferentes concentraciones y el límite de detección concuerda perfectamente con los encontrados por *Alexander N Orekhov* y otros en 1995.<sup>8</sup>

Los coeficientes de variación de la repetibilidad y la reproducibilidad son menores del 10 %, para la 3 muestras analizadas en el estudio, por tanto consideramos que nuestros resultados son adecuados según las características del método desarrollado. Estos resultados nos permiten afirmar que una primera

evaluación de las muestras con concentraciones desconocidas garantizó una buena precisión para concentraciones de colesterol entre 5 y 40 µg/mL. Este rango incluye el valor de concentración de significación clínica que es 15 µg/mL, pues se ha visto que valores de "colesterol inmune" de esta magnitud o superiores están asociados generalmente con un alto riesgo de padecer trastornos ateroscleróticos.

La recuperación del método estuvo dentro de los valores permisibles para tipo de sistema, considerado satisfactorio en este tipo de método donde el valor aceptado es de 90-100 %. Estos resultados demuestran que la exactitud del método en términos de recuperación es satisfactoria, lo cual garantizó que más del 95 % del colesterol presente en el inmunocomplejo precipitó con el PEC y pudo ser cuantificado.

Para estimar el valor diagnóstico del "colesterol inmune" en la aterosclerosis de cualquier grado de estenosis se determinó la sensibilidad, la especificidad, y los valores predictivos positivos y negativos del mismo. Para realizar el análisis de estos resultados es necesario tener en cuenta que en el grupo de sujetos "supuestamente normales", sacados de banco de sangre, como indica la palabra, no se sabe con certeza cuántos son realmente sanos, pues para ello sería necesario realizarles la coronariografía, prueba invasiva y costosa, que no procede en este tipo de estudio en sujetos sin signos ni síntomas de enfermedad coronaria. La sensibilidad y la especificidad diagnósticas del colesterol inmune obtenidas en nuestro trabajo es similar a la obtenida por *Alexander N Orekhov* y otros.<sup>8</sup> Ellos en su estudio calcularon el valor de otros parámetros lipídicos para el diagnóstico de laboratorio y concluyeron que el colesterol inmune era el mejor marcador diagnóstico entre los parámetros lipídicos analizados.

Los resultados obtenidos en este trabajo son satisfactorios y, a nuestro juicio, el sistema analítico posee los atributos de calidad adecuados para su utilización, en las investigaciones de la

aterosclerosis coronaria, cerebral y periférica, donde el "colesterol inmune" puede ser evaluado como marcador de aterosclerosis en poblaciones con un estadio temprano de la misma.

## SUMMARY

This paper was made to mount and standardize a method to evaluate the oxidized low density lipoprotein (LDLox) contained in the immunocomplexes by the quantification of total cholesterol present in the precipitate of polyethylene glycol denominated "immune cholesterol". It was obtained an adequate lineal response that was corroborated with the results of the regression analysis, where it was possible to compute the straight line of best adjustment for the points. A range of concentration of the curve from 5 to 40 µg/mL was found. The limit of detection of the method was 0.5 µg/mL. The repeatability and reproducibility were 3.7 and 4.5 %, respectively. On analyzing the total recovery of the method, it was 96.3 %. 80 % of sensitivity and specificity and 84 and 76 % of positive and negative predictive value, respectively, were obtained. The results showed the analytical quality of the method to be used in the investigations related to coronary, cerebral and peripheral atherosclerosis.

*Subject headings:* LDL LIPOPROTEINS; AUTOANTIBODIES; REFERENCE STANDARDS; CHOLESTEROL.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brow MS, Goldstein J. Lipoprotein metabolism in the macropahge. *Ann Rev Biochem* 1983;52:223-61.
2. Jialal J, Scacini C. Laboratory assessment of lipid, lipoproteins, and apolipoproteins. En: Rifai N, Warnick GR, eds. *Recent advances in lipid and lipoprotein analysis*. Washington, DC: AACC Press, 1993;17:307-21.
3. Maggi E, Chiesa R, Milissano G, Castellano R, Astoru D, et al. LDL oxidation in patient with severe carotid atherosclerosis. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1892-9.
4. Bellomo G, Maggi E, Poli M, Agosta FG, Bollati P, Finardi G. Autoantibodies against oxidatively modified low density lipoproteins in NIDDM, *Diabetes* 1995;44(1):60-6.
5. Allain CC, Poon LS, Chan CSG. Enzimatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;20:470-5.
6. Tertov W, Orekhov AN, Kacharava AG, Sobenin I, Perova NV, Smirnov VN. Low density lipoprotein-containing circulating immune complexes and coronary atherosclerosis. *Exp Mol Pathol* 1990;52:300-8.
7. Tertov W, Orekhov AN, Sayadyan KHS, Serebrennikov SG, Kacharava AG, Lyakishev AA, et al. Correlation between cholesterol content in circulating immune complexes and atherogenic properties of CHD patient's serum manifested in cell culture. *Atherosclerosis* 1990;81:183-9.
8. Orekhov AN, Kacharava AG, Tertov W, Perova NV. Diagnostic value of immune cholesterol as a marker for atherosclerosis. *J Cardiovasc Risk* 1995;2:459-66.
9. Thielman K. *Principios de metodologías en bioquímica clínica*. La Habana: Instituto Cubano del Libro, 1973:303-8
10. Holvoet P, Callen D. Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. *FASEB* 1994;8(15):1279-84.

Recibido: 18 de mayo de 2000. Aprobado: 1 de junio de 2000.

Lic. *Giovanna Pereira Roca*. Instituto Nacional de Endocrinología. Zapata y D, El Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba. CP 10400.