

ESTUDIO DE UN NUEVO MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN
DIRECTA DEL COLESTEROL SÉRICO TOTAL

— **Lab. Gabriel Sulbarán Solís.**

Encargado de la Sección de Bioquímica
del Instituto de Investigación Clínica.

Numerosos y variados métodos han sido desarrollados para la determinación del colesterol sanguíneo, la mayoría de los cuales no han satisfecho las exigencias actuales de sencillez, rapidez y precisión, que la práctica diaria impone a esta prueba, de gran valor en el diagnóstico y pronóstico de muchas circunstancias clínicas, en relación con las cuales numerosos estudios han hecho resaltar su importancia, haciendo que su uso se extienda día a día.

Hasta ahora, la mayor parte de las técnicas consumen tiempo y para un laboratorio corriente presentan dificultades que afectan, en mayor o menor grado, la sensibilidad y reproducibilidad y hacen difícilmente comparables entre sí los resultados que con ellas se obtienen.

Por esta razón, últimamente han alcanzado extensa aplicación los métodos que tienden a simplificar, sin menoscabo de la exactitud.

En este trabajo proponemos una modificación a las técnicas derivadas del método de Ferro y Ham (1) para la determinación directa del colesterol sérico total, que reúne sencillez, rapidez, bajo costo y un buen grado de seguridad.

MATERIAL Y METODOS

Reactivos:

1. Mezcla acética:
anhídrido acético 9 vol.
ácido acético al 50% 1 vol.
2. Ácido sulfúrico Q. P.
3. Standard de 100 y 200 mgrs. %
Se prepara disolviendo 100 y 200 mgrs. de colesterol Q. P. respectivamente en 100 cc. de ácido acético glacial.

Procedimiento:

En frasco de Erlenmeyer de 50 cc. colocar 5 cc. de la mezcla acética y agregar 1 cc. de ácido sulfúrico Q.P. Se produce una ligera reacción exotérmica. Esperar que la mezcla vuelva a temperatura ambiente (5 minutos regularmente) y agregar 0.1 cc. del suero problema, agitando inmediatamente.

Esperar 15 minutos y leer en colorímetro en longitud de onda de 540 μ (filtro verde) usando agua como blanco y calcular el resultado comparando contra el standard más aproximado.

Los standards se preparan en igual forma, sustituyendo el suero por 0.1 cc. de cada uno de ellos.

La mezcla acética puede usarse inmediatamente después de preparada y dura de 4 a 6 semanas a temperatura ambiente.

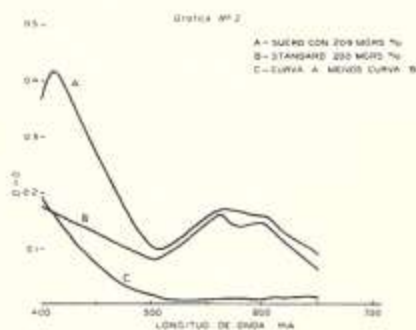
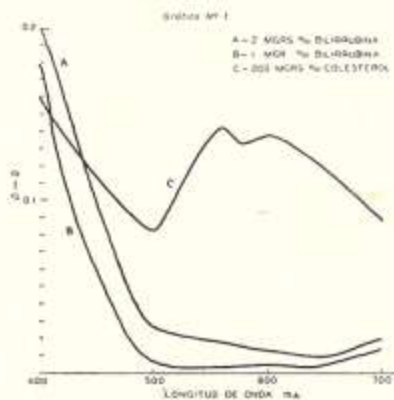
El material de vidrio usado debe estar escrupulosamente limpio y seco.

EXPERIMENTAL

En un método directo como el aquí propuesto, sin extracciones y purificaciones previas, es preciso considerar los posibles efectos de sustancias interferentes, entre las cuales la bilirrubina, las proteínas séricas y la hemoglobina, tal vez sean las más comúnmente responsables de alteraciones en el desarrollo del color y por tanto, probable causa de error.

En el gráfico N° 1, las curvas A y B nos muestran el espectro de absorción de la bilirrubina, obtenida en un espectrofotómetro Beckman D.U., comparados con el del colesterol de la curva C. Concentraciones relativamente altas de 1.0 y 2.0 mgrs. revelan un mínimo de absorción en torno a las 550 μ de 0.22 y 0.05 respectivamente, lo que equivaldría a un porcentaje adicional muy pequeño para cualquier lectura.

En el gráfico N° 2 la curva A representa la absorción de 0.1 ml de suero conteniendo 209 mgrs. % de colesterol (media de 4 determinaciones según el método de Bloor (2), entre los 400 y 700 μ , siguiendo el método aquí descrito). La curva B es la característica desarrollada por el standard de 200 mgrs. % de colesterol puro usado en nuestro procedimiento, en la misma variante espectral. La curva C. es la expresión gráfica de la diferencia entre las curvas A y B.



Como podemos ver, las proteínas y probablemente otras sustancias generan interferencia en la resolución del color, la cual luce amplia entre las 400 y 500 μ y se reduce al mínimo en las 540. Lecturas por debajo de 500 μ nos llevarían a un error cierto, mientras que en la lectura propuesta (540 μ) la sensibilidad de interferimiento es despreciable.

Aun cuando el segundo pico hace el máximo cerca de las 600 μ , longitud en la cual también pueden hacerse las lecturas, en 540 se cumple una buena absorción y es también práctica por estar seleccionada en filtros para muchos colorímetros.

En el cuadro N° 1 tenemos una demostración de la reproducibilidad con variantes entre -0.6% y $+2.4\%$ y un promedio del total de 1.2% , que significa una excelente reproducibilidad.

Cuadro N° 1

MUESTRAS	COLESTEROL MGRS %	DESVIACION EN %
1	151	
1	159	-1.3
1	158	-1.9
1	159	-1.3
2	246	
2	240	-2.5
2	244	-0.9
2	246	0.0
3	123	
3	118	-4.1
3	124	+0.9
3	126	+2.4
4	195	
4	198	+1.6
4	195	0.0
4	195	0.0
5	172	
5	170	-1.2
5	171	-0.6
5	171	-0.6
DESVIACION PROMEDIO:		1.2 %

Se hicieron recuperaciones en 10 sueros diferentes y los resultados se exponen en el cuadro N° 2. Observamos variaciones entre 90.8 y 105.3% de recuperación, con una media de 97.0%, lo que es muy aceptable dentro de la analítica de procedimientos.

Para estudiar los efectos de la hemólisis hemos dosificado el colesterol en 8 sueros antes y después de provocar en los mismos cierto grado de hemólisis por trituración de su respectivo coágulo. Los resultados los vemos en el cuadro N° 3.

Finalmente se hizo una comparación de nuestro procedimiento con el clásico método de Bloor en 20 sueros de diferentes concentraciones. Los resultados se muestran en el cuadro N° 4 y en él podemos ver que los valores están entre 2.5% y 18.0% (promedio 9.7%) más elevados en nuestro método.

Cuadro N° 2

MUESTRAS	COLESTEROL PRESENTE MGRS %	COLESTEROL AGREGADO MGRS %	COLESTEROL RECUPERADO MGRS %	% DE RECUPERACION
1	232	100	330	99.3
2	195	100	300	101.8
3	175	100	272	98.9
4	118	100	222	101.8
5	123	100	215	96.5
6	190	100	271	93.4
7	178	100	293	105.3
8	216	100	287	90.8
9	204	100	279	91.7
10	198	100	272	91.2
			RECUPERACION PROMEDIO	97.0 %

Cuadro N° 3

MUESTRAS	COLESTEROL MGRS % ANTES	COLESTEROL MGRS % DESPUES	INCREMENTO %
1	181	182	0.55
2	195	198	1.53
3	188	190	1.08
4	219	231	5.47
5	222	230	3.80
6	344	348	1.16
7	161	168	4.34
8	213	216	1.40

Cuadro N° 4

MUESTRAS	BLOOR COLESTEROL MGRS %	ESTE METODO COLESTEROL MGRS %	DIFERENCIA EN MGRS %	PORCENTAJE
1	209	232	23	11.0
2	180	195	15	8.3
3	157	175	18	11.4
4	106	118	12	11.3
5	105	123	18	17.1
6	161	190	29	18.0
7	170	178	8	4.7
8	193	216	23	11.9
9	188	204	16	8.5
10	170	198	28	16.4
11	193	217	24	12.4
12	144	162	18	12.5
13	108	168	60	6.3
14	290	291	1	-1.7
15	314	322	8	2.5
16	210	235	25	8.7
17	101	206	105	7.8
18	168	176	8	4.7
19	155	180	25	16.1
20	169	182	13	7.6

PROMEDIO DE ELEVACION CON RESPECTO AL METODO DE BLOOR 9.7 %

DISCUSIÓN

La comparación con otros métodos conocidos, tanto clásicos como de colorimetría directa, comprueba una eficacia no inferior y un aspecto práctico superior a lo que, en ese sentido, ofrecen la mayoría de aquellos.

Entre los métodos clásicos, de los cuales tomamos el de Bloor como prototipo, algunos hacen la extracción del colesterol del suero, evaporan los solventes usados en dicha extracción, redisuelven en otro medio apropiado y finalmente desarrollan el color con la reacción de Liebermann-Burchard (3,4). La necesidad de eliminar los solventes de extracción, la inestabilidad del color y la rigurosa regulación de tiempos y temperaturas para obtener un trabajo reproducible, constituyen las principales desventajas de estos procedimientos. Es probable que en estos procesos de precipitación de las proteínas y extracción de los lípidos haya cierta retención de los mismos y que a ella se deban los valores ligeramente más bajos hallados en el método de Bloor.

El método de Choenheimer y Sperry (5) es engorroso y de larga duración; utiliza el cloruro férrico y el ácido sulfúrico.

Klungssyr (6) y cols. extraen el colesterol con alcohol acetato etílico y emplean en la reacción final el cloruro férrico y el ácido sulfúrico.

Zlatkis (7) y cols. cuyo método directo está hoy bastante extendido, desarrollan el color con ácido acético, cloruro férrico y ácido sulfúrico.

Zak y Epstein (8), valorando nuevos reactivos a base de sales férricas propuestas para la determinación del colesterol, estudian la solubilidad del sulfato ferroso y estabilidad del ion ferroso en los sistemas asomados y concluyen que el sulfato férrico y el ferroso son casi insolubles en ácido acético glacial. El ferroso es además inestable y fácilmente oxidable a su forma Trivalente más estable.

El primer método para dosificar colesterol sérico por colorimetría directa, desarrollando el color por la específica reacción de Liebermann-Burchard, apareció en 1953 publicado por Pearson (9) y cols. En él, un análisis directo del colesterol sérico es hecho sin extracciones previas añadiendo al suero sucesivamente, anhídrido acético, ácido paratoluensulfónico y ácido sulfúrico. Pero este método, aunque aparentemente exacto, es inapropiado para el trabajo rutinario debido al peligro de explosión por parte del ácido paratoluensulfónico, que además es costoso y se altera fácilmente.

Rappaport (10) y cols. y Wright (11) y cols. en modificaciones a la técnica de Pearson sustituyen el ácido paratoluensulfónico por el ácido sulfosalicílico, más estable y no explosivo, pero el color desarrollado no es estable, por lo cual las lecturas deben hacerse a tiempos fijos.

En 1960 Ferro y Ham publican un método directo y muy sencillo para el colesterol sérico, desarrollando el color mediante la reacción de Liebermann-Burchard. Utilizan una mezcla de ácido acético y anhídrido acético a la que posteriormente se agrega ácido sulfúrico.

El agua necesaria para catalizar la reacción es agregada al suero, sobre el cual, ya diluido, se vierte la mezcla generadora del color. Éste alcanza su máximo cerca de los 90 segundos y lo mantiene alrededor de un minuto.

El procedimiento aquí propuesto nos parece ofrecer algunas ventajas o aspectos favorables tendientes a una mayor seguridad y precisión en los resultados.

La mezcla final coloreada es de una perfecta transparencia, sin la más ligera traza de turbidez. La digestión de las proteínas séricas es completa y mayor la liberación de los lipoides. A esto concurre la proporción guardada en los reactivos y muy probablemente la inclusión en ellos del agua de catalización.

La estabilidad del color da un buen margen de seguridad. El desarrollo máximo aparece a los 5 minutos y es estable por más de 1 hora.

El análisis del estudio anteriormente expuesto nos parece lo suficientemente convincente en la valoración del procedimiento para su aplicabilidad en la práctica corriente.

RESUMEN

Se describe una modificación a los métodos directos derivados del Ferro y Ham para la dosificación del colesterol sérico total, que reúne sencillez, rapidez, bajo costo y un buen grado de seguridad. Se utiliza la reacción específica de Liebermann-Burchard en el desarrollo del color y 0.1 ml. de suero. Se demuestra experimentalmente su precisión y reproducibilidad, se comparan los resultados con los obtenidos por el método de Bloor y finalmente sus posibilidades de aplicabilidad son revisadas y discutidas al comparárlas con las de otros métodos conocidos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferro, P.V. and Ham, A.B. "A Rapid Method for Determination of Total and Free Cholesterol". *Am. J. Clin. Path.* 33:545. (1960).
2. Bloor, W.R. "The Determination of Cholesterol in Blood", *J. Biol. Chem.* 24:227. (1916).
3. Liebermann, C. "Ueber das Oxychinoterpen". *Ber.* 18:1803. (1885).
4. Burchard, H. "Beitrage Zur Kenntnis des Cholesterins". *Chem. Zentr.* 61. (1): 25. (1890). (Citado por Bloor).
5. Schoenheimer, R. and Sperry, W. M. "A Micromethod for the Determination of Free and Combined Cholesterol". *J. Biol. Chem.* 106: 745. (1934).
6. Klungsoyr, L.; Hankenes, E.; and Cloos, K. "A New Method for Determination of Serum Cholesterol". *Chim. Acta.* 3:6. (1958).
7. Zlatkis, A.; Zak, B. and Boyle, A.J. "A New Method for the Direct Determination of Serum Cholesterol". *J. Lab. Clin. Med.* 41:486 (1953).
8. Zak, B. and Epstein, E. "New Cholesterol Reagent". *Clin. Chem.* 7:268. (1961).

9. Pearson, S.; Stern, S. and McGavack, T. "A Rapid Accurate Method for the Determination of Total Cholesterol in Serum". *Anal. Chem.* 25:813. (1953).
 10. Rappaport, F.G. and Eichhorn, F. "Sulfasalicylic Acid as a Substitute for Paratoluene Sulfonic Acid". *Clin. Chem. Acta.* 5:161. (1960).
 11. Wright, L.A.; Tonks, D.B. and Allen, R.H. "Determination of Cholesterol with Special Reference to the Use of Paratoluene Sulfonic Acid". *Clin. Chem.* 6:243. (1960).
-

Eduardo C. Kendall.

Estudió en la Universidad de Columbia. Se doctoró en Química. Aisló la hormona tiroidea. La obtuvo en estado de pureza en 1914 y le dio el nombre de tiroxina.

En 1926 logró extraer glutatión de las levaduras.

Inició en Rochester investigaciones sobre naturaleza, composición y acción, fisiológica de las hormonas de la corteza suprarrenal. Estudios que hacía al mismo tiempo Reichstein en Suiza y Winchestereiner en Nueva York.

La primera substancia cristalina dotada de actividad biológica, fue obtenida por Kendall en 1934. De los compuestos identificados por Kendall, cuatro (A, B, E, y F) demostraron poseer actividad fisiológica de importancia. Posteriormente, junto con Larett y colaboradores, logró perfeccionar los procedimientos de obtención del factor E (que él había denominado cortisona) y se hizo posible su experimentación clínica. De los resultados obtenidos, Hench y Kendall dijeron: "la cortisona es el bombero que apaga el fuego; no el carpintero que rehace el edificio".

Los resultados del tratamiento con cortisona, señalaron en medicina una fecha tan importante como el descubrimiento de la insulina, la aplicación del hígado en anemia perniciosa, o el advenimiento de los antibióticos. Su aplicación clínica significa el nacimiento de un nuevo concepto patológico y terapéutico. Por sus trabajos en suprarrenales, Kendall (junto con Hench y Reichstein) recibió en 1950, el premio Nóbel.