

NOTA TÉCNICA

Evaluación de un método electroforético para el subfraccionamiento de las partículas plasmáticas de lipoproteínas de baja densidad

Juan Gabriel Calle Luna^{a,*}, Miguel Boronat García^a, María Dolores Albaladejo Otón^a, Esteban Granero Fernández^b, Antonio Miguel Hernández Martínez^b y Soledad Parra Pallarés^a

^aServicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, El Palmar, Murcia, España

^bServicio de Endocrinología, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, El Palmar, Murcia, España

Recibido el 20 de abril de 2009; aceptado el 23 de julio de 2009

Disponible en Internet el 9 de octubre de 2009

PALABRAS CLAVE

Partícula de lipoproteínas de baja densidad pequeña y densa; Subfracciones lipoproteínas de baja densidad; Enfermedad cardiovascular

Resumen

Desde que el NCEP ATP III (National Cholesterol Education Program. Adult Treatment Panel III) aceptó el predominio de partículas LDL (*low density lipoproteins* 'lipoproteínas de baja densidad') pequeñas y densas como factor de riesgo emergente de desarrollo de enfermedad cardiovascular, el interés por los métodos para fraccionar las LDL ha aumentado. Por eso, el presente trabajo pretende valorar la utilidad de un sistema de electroforesis en gel de poliacrilamida (Lipoprint®) para separar LDL en nuestra población. Se recogieron 194 muestras de sangre de personas de entre 15 y 94 años (el 49%, hombres) y se calculó la imprecisión del ensayo, así como los valores de referencia por sexo. Además, se realizaron correlaciones entre los distintos parámetros lipídicos.

Se obtuvieron resultados aceptables para el estudio de imprecisión mediante el sistema Lipoprint®. Al correlacionar el diámetro medio de las partículas LDL con otros marcadores del metabolismo lipídico, destacamos una asociación inversamente proporcional con la concentración de triglicéridos y apolipoproteína (apo) B100 y directamente proporcional con la de colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (cHDL). Encontramos diferencias entre sexos en los niveles de triglicéridos y colesterol ligado a LDL (mayores en hombres), y cHDL y diámetro medio de las partículas LDL (mayores en mujeres).

Al comparar el diámetro medio de las partículas LDL con los parámetros lipídicos encontramos que está asociado inversamente con la concentración de triglicéridos y apo B100, y directamente con la de cHDL, lo que se asocia a un mayor riesgo cardiovascular. El sistema Lipoprint® es útil para la medida de la concentración y diámetro medio de las partículas LDL debido a su sencillez y rapidez de resultados. Aún así faltan estudios que

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: juangabrielcalle@yahoo.es (J.G. Calle Luna).

KEYWORDS

Small and dense low density lipoproteins particles;
Low density lipoproteins subfractions;
Cardiovascular disease

relacionen los resultados obtenidos con los parámetros clínicos que se emplean en la valoración del riesgo cardiovascular.

© 2009 AEBM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Evaluation of an electrophoresis method to obtain plasma low density lipoproteins subfractions**Abstract**

Since NCEP ATP III accepted the small and dense LDL particle as an emergent risk factor of cardiovascular disease, the methods to calculate LDL subfractions have increased. The present report attempts to evaluate the usefulness of a polyacrylamide gel electrophoresis system (Lipoprint™) to separate LDL in our population.

194 blood samples were collected from subjects between 15–94 years old (49% men). Imprecision and lipid parameter study population ranges by sex, and the correlations between them were calculated.

Imprecision study results were acceptable. When correlating the average diameter of particle LDL with other lipid markers, we observed an inverse association with triglyceride concentration and Apo B100, and a direct association with HDL-cholesterol. We found differences between sex in triglyceride and LDL-cholesterol levels (greater in men) and HDL-cholesterol and average diameter of LDL particles (greater in women).

When comparing the average LDL particle diameter with the lipid parameters, we found that it is inversely associated with the triglyceride and Apo B100 concentration, and directly with HDL-cholesterol, which is associated with a greater cardiovascular risk.

We believe that Lipoprint™ system is useful for the measurement of the concentration and average diameter of LDL particles, due to its simplicity and speed of results. Nevertheless, studies are needed that can associate the results obtained to the clinical parameters that are used in the evaluation of cardiovascular risk.

© 2009 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

Las LDL (*low density lipoproteins* 'lipoproteínas de baja densidad') son un grupo heterogéneo de partículas con distintas propiedades físicas, que presentan una gran variedad de tamaño, densidad y composición química.

El interés por los métodos para fraccionar las LDL ha aumentado desde que el NCEP ATP III (*National Cholesterol Education Program. Adult Treatment Panel III*) aceptó el predominio de partículas LDL pequeñas y densas como factor de riesgo emergente de desarrollo de enfermedad cardiovascular¹ y sugirió que la medida del número, tamaño y contenido de colesterol de las moléculas de LDL pequeñas y densas aporta información adicional sobre el riesgo cardiovascular².

Sin embargo, no existe un método de referencia aceptado. La ultracentrifugación analítica se ha considerado tradicionalmente el método de elección para determinar las subfracciones lipoproteicas³. Se han utilizado otras técnicas, como la electroforesis en gradiente de gel no desnaturizante, la ultracentrifugación en gradiente de densidad y la resonancia magnética nuclear. Todas ellas son técnicamente laboriosas, consumen mucho tiempo y recursos, y además son caras⁴.

El sistema Lipoprint® es un método de electroforesis en gel de poliacrilamida que permite separar las partículas LDL en 7 subfracciones. No mide el tamaño de las partículas directamente, pero lo calcula al comparar la movilidad electroforética de la partícula con las movilidades electroforéticas de partículas de tamaños conocidos. El método es

técnicamente sencillo, requiere bajo volumen de muestra y ofrece resultados rápidos.

El objetivo del presente trabajo ha sido valorar la utilidad de este método mediante la evaluación técnica del ensayo y el cálculo de valores en nuestra población.

Material y métodos

Muestras

Se procesaron 194 muestras de sangre obtenidas en ayunas en un centro de salud del Área Sanitaria I de la región de Murcia. Las muestras se centrifugaron a 3.500 rpm durante 15 min y se mantuvieron refrigeradas a 2–8 °C hasta su análisis, en un período de tiempo inferior a 24 h.

La edad de los sujetos osciló entre 15 y 94 años (media de 57,5 años; desviación estándar [DE] de 17,3 años) con un 49% de hombres. Como criterio de exclusión se aplicó el presentar enfermedad terminal, hepática o renal.

Como material de control se utilizaron controles liofilizados Liposure® (Quantimetrix Corporation) y se incorporó uno en cada proceso electroforético junto a las muestras.

Métodos

Sistema Lipoprint LDL® Quantimetrix

El sistema Lipoprint LDL® (Quantimetrix Corporation) separa las distintas subfracciones de lipoproteínas según su diferente tamaño y carga eléctrica mediante electroforesis

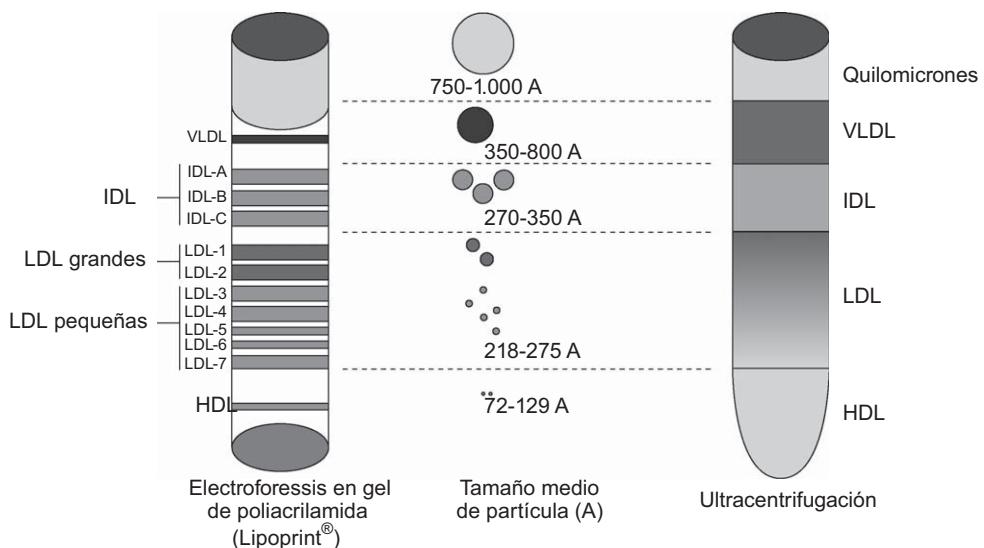


Figura 1

en gel de poliacrilamida. Permite aislar hasta 12 fracciones de lipoproteínas: 1 VLDL (*very low density lipoproteins* ‘lipoproteínas de muy baja densidad’), 3 IDL (*intermediate density lipoproteins* ‘lipoproteínas de densidad intermedia’), 7 LDL y 1 HDL (*high density lipoproteins* ‘lipoproteínas de alta densidad’) (fig. 1).

Requiere 25 µl de suero/plasma y el tiempo total de análisis es de 2,5 h. Tras ponerse en contacto el suero problema y el gel de poliacrilamida se produce la fotopolimerización del gel por exposición directa a un foco de luz fluorescente durante 30 min. Posteriormente, se aplica una carga eléctrica continua durante una hora y se consiguen distintas bandas, cada una correspondiente a una fracción concreta de lipoproteína. La identificación y cuantificación de cada banda se realiza al escanear densitométricamente el gel a 610 nm y procesar los datos mediante el software de Quantimetrix. De esta forma, cada banda queda identificada en función de un factor de retención y cuantificada según el área de la curva delimitada entre 2 bandas^{5,6}.

Además, el sistema proporciona información acerca del diámetro medio de las partículas LDL, que se estima mediante el algoritmo desarrollado por Kazumi et al⁷.

Análisis de los parámetros lipídicos

El colesterol total, el colesterol ligado a HDL (cHDL) y los triglicéridos se cuantificaron en un analizador modular P Hitachi (Roche Diagnostics[®]) mediante un test colorimétrico enzimático homogéneo con los reactivos que suministró el fabricante^a. El colesterol ligado a LDL (cLDL) se estimó mediante la fórmula descrita originalmente por Friedewald, Levy y Fredrickson¹¹. Una limitación de esta estimación es que no debe emplearse cuando la concentración de triglicéridos es superior a 200 mg/dl¹².

^aColesterol total: método Roeschlau y Allain modificado⁸; referencia reactiva 11875523. cHDL: método Betaquant⁹; referencia reactiva 3038602, 3038904. Triglicéridos: método Wahlefeld¹⁰; referencia reactiva 11876040.

Las apolipoproteínas (apo) A1 y B se midieron en un analizador BN ProSpec[®] (Siemens) mediante un ensayo inmunonefelométrico con los anticuerpos suministrados por el fabricante^b.

Evaluación del método

Precisión

La precisión intraensayo se determinó procesando el control Liposure[®] 12 veces consecutivas en la misma electroforesis; la precisión interensayo analizándolo una única vez durante 12 días diferentes a lo largo del intervalo de un mes.

Valores en nuestra población

Se seleccionaron 60 pacientes sin diabetes ni alteraciones del metabolismo lipídico sobre la base de los criterios ADA 1997¹³ y las normas del National Cholesterol Education Program. Adult Treatment Panel III(NCEP)¹, respectivamente. La edad osciló entre 17 y 81 años (el 55%, varones).

Correlación del diámetro medio de LDL con otros marcadores lipídicos

En el total de las 194 muestras analizamos la correlación entre el diámetro medio de la partícula LDL y los siguientes marcadores lipídicos: colesterol total, apo A1, apo B100, cLDL, triglicéridos, cHDL y cociente LDL/apo B100.

Análisis estadístico

Se obtuvieron la media, DE y coeficiente de variación (CV) para el cálculo de la precisión intraensayo e interensayo, y media e intervalos de confianza (IC) del 95% para la determinación de los valores de referencia. Los parámetros se compararon en función del sexo mediante la prueba U de Mann-Whitney.

^bapo A1: reactiva N Antisera to Apolipoprotein A1, n.º referencia OVED 09; apo B: reactiva N Antisera to Apolipoprotein B; reactivos suplementarios N Supplementary Reagent P (OUMU15) BN ProSpec.

Tabla 1 Coeficientes de variación intraensayo e interensayo para las subfracciones lipoproteicas medidas por el sistema Lipoprint

Precisión intraensayo							Precisión interensayo						
VLDL*	MID-C*	MID-B*	MID-A*	LDL-1*	LDL-2*	LDL-3*	LDL-4*	LDL-5*	LDL-6*	LDL-7*	Tamaño medio de partícula LDL [†]		
Media	11,75	3,75	7,25	9,92	16,67	11,17	4,83	1,33	0,00	0,00	0,00	265,43	
DE	1,66	0,45	0,87	1,08	0,89	0,94	0,83	0,78	0,00	0,00	0,00	1,51	
CV (%)	14,11	12,06	11,95	10,93	5,33	8,39	17,27	58,39	-	-	-	0,57	

VLDL*	MID-C*	MID-B*	MID-A*	LDL-1*	LDL-2*	LDL-3*	LDL-4*	LDL-5*	LDL-6*	LDL-7*	Tamaño medio de partícula LDL [†]	
Media	17,67	5,25	8,00	9,67	14,08	10,08	4,00	0,83	0,00	0,00	0,00	266,03
DE	6,54	2,73	3,28	4,68	1,98	1,73	2,00	1,19	0,00	0,00	0,00	3,43
CV (%)	37,03	52,08	40,94	48,39	14,03	17,16	50,00	143,21	-	-	-	1,29

CV: coeficiente de variación; DE: desviación estándar; LDL: *low density lipoproteins* 'lipoproteinas de baja densidad'; MID: *banda intermedia*; VLDL: *very low density lipoproteins* 'lipoproteinas de muy baja densidad'.

* Unidades: mg/dl.
† Unidades: Å.

Para analizar la correlación se empleó la ρ de Spearman y su nivel de significación (p) para un IC del 95%.

Para todos los cálculos se utilizó el software SPSS V.12.

Resultados

Los CV intraensayo e interensayo se muestran en la **tabla 1**. Los CV de las subfracciones LDL-4 a LDL-7 superan el 50%, por lo que procedimos a agruparlas para su empleo en el resto del estudio, como aconseja el fabricante.

En la **tabla 2** se muestran los valores en nuestra población, separados por sexo. Los triglicéridos, el cLDL y el colesterol de la subfracción 2 de LDL fueron superiores en hombres, mientras que las mujeres tuvieron concentraciones superiores de cHDL, así como el diámetro medio de las partículas LDL.

En la **tabla 3** se presentan las correlaciones del diámetro medio de la partícula LDL con el resto de las variables lipídicas. Encontramos significación estadística con todas las variables estudiadas, pero la mayor asociación se presentó de forma inversamente proporcional con la concentración de triglicéridos.

Discusión

Actualmente, ninguno de los métodos disponibles para determinar las subfracciones de LDL se ha establecido como método de referencia, que determine su valor potencial como factor adicional de riesgo cardiovascular⁴. El sistema electroforético Lipoprint presenta la ventaja de que la FDA (Food and Drug Administration) lo aprobó para su uso clínico, aporta controles internos para la evaluación de la imprecisión técnica y además estima el diámetro medio de las partículas LDL. El uso de controles en cada proceso electroforético garantiza la fiabilidad de los resultados y permite la estandarización del ensayo.

Los valores obtenidos para nuestra población de estudio muestran un perfil lipídico menos favorable en hombres que en mujeres. Al comparar el diámetro medio de partículas LDL con los parámetros lipídicos encontramos que está asociado inversamente con la concentración de triglicéridos y apo B100, y directamente con la de cHDL. Otros autores también describen una fuerte asociación entre el aumento de las LDL pequeñas y densas y la concentración plasmática de triglicéridos, así como con los niveles bajos de cHDL^{14,15}, parámetros asociados a un mayor riesgo cardiovascular¹⁶. Sin embargo, no podemos asegurar que las subfracciones que nosotros separamos se correspondan exactamente con las obtenidas en estos estudios.

Hay pocos estudios que evidencien la utilidad de estas partículas como biomarcadores de enfermedad cardiovascular. El Quebec Cardiovascular Study describió que el aumento de las LDL pequeñas y densas es un predictor fuerte e independiente de enfermedad coronaria en los primeros 7 años y que las concentraciones elevadas de las partículas LDL grandes y ligeras se encuentran asociadas a un perfil más favorable de riesgo cardiovascular¹⁷. Recientemente, Koba et al también han demostrado que los niveles de LDL pequeñas y densas son indicadores más potentes de aterosclerosis coronaria grave que los niveles de LDL total¹⁸.

Tabla 2 Valores en nuestra población, por sexos, de las variables lipídicas analizadas

Valores en nuestra población por sexos										
	n	Hombres				Mujeres				p ^a
		Media	DE	IC del 95%	n	Media	DE	IC del 95%	p ^a	
Colesterol*	33	197,7	42,1	182,5 - 212,9	27	188,2	34,4	174,6 - 201,8	0,281	
Triglicéridos*	33	137,5	72,6	111,3 - 163,6	27	100,8	45,4	82,8 - 118,7	0,044 ^b	
cHDL*	33	54	12,8	49,4 - 58,6	27	66,7	13,9	61,2 - 72,2	<0,001 ^b	
cLDL*	33	116,1	37,7	102,5 - 129,7	27	101,7	33	88,7 - 114,7	0,89	
cVLDL*	33	25,1	14	20,1 - 30,2	27	21,7	10,5	17,6 - 25,8	0,426	
cMID C*	33	10	3,9	8,6 - 11,4	27	8,8	3,5	7,4 - 10,2	0,191	
cMID B*	33	20,5	9,7	16,9 - 24	27	20,4	11,4	15,8 - 24,9	0,65	
cMID A*	33	27	13,5	22,1 - 31,9	27	27,4	12,5	22,5 - 32,4	0,899	
cLDL 1*	33	38	14,1	27,9 - 38,1	27	28,4	11,2	23,9 - 32,8	0,214	
cLDL 2*	33	16,5	12,2	12,1 - 20,9	27	10,4	10,5	6,3 - 14,6	0,029 ^b	
cLDL 3*	33	4,3	6,4	1,9 - 6,6	27	2,2	5,3	0,1 - 4,3	0,023	
cLDL 4+5+6+7*	33	1,1	3,7	0 - 2,4	27	0,5	2,3	0 - 1,4	0,102	
Dm LDL [†]	33	270,3	5,05	268,5 - 272,2	27	272,8	4,3	271,1 - 274,5	0,014 ^b	

cHDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; cLDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; cMID: colesterol unido a banda intermedia; cVLDL: colesterol ligado a lipoproteínas de muy baja densidad; DE: desviación estándar; Dm: diámetro medio; IC: intervalo de confianza; LDL: *low density lipoproteins* 'lipoproteínas de baja densidad'.

*Unidades: mg/dl.

†Unidades: Å.

^aTras realizar comparaciones de medias entre los datos agrupados por sexo mediante el empleo de la prueba estadística U de Mann-Whitney.

^bMuestran diferencia estadísticamente significativa con una p inferior a 0,05 y con un intervalo de confianza del 95%.

Tabla 3 Correlación del tamaño medio de partículas de lipoproteínas de baja densidad con otros marcadores lipídicos

	Coeficiente de correlación de Spearman (ρ)	p
Colesterol total	-0,306	<0,0001
apo Al	0,149	0,039
apo B100	-0,423	<0,0001
cLDL	-0,213	0,003
Triglicéridos	-0,648	<0,0001
cHDL	0,403	<0,0001
LDL/ apo B100	0,237	0,002

apo: apolipoproteína; cHDL: colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad; cLDL: colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad; LDL: *low density lipoproteins* 'lipoproteínas de baja densidad'.

Sin embargo, dado que el número estimado de subfracciones de LDL depende del método empleado, la extrapolación de resultados a pacientes resulta difícil. Además, la ausencia de un método de referencia y la falta de estandarización limitan su empleo en la clínica. El sistema Lipoprint® es el único método aprobado por la FDA para su uso clínico con la incorporación de controles internos y resultados que correlacionan satisfactoriamente con las técnicas actualmente disponibles en la mayoría de los

laboratorios clínicos. Su sencillez, rapidez de resultados y bajo volumen de muestra requerida lo hacen útil para la medida de la concentración y diámetro medio de partículas LDL.

Para concluir, faltan estudios que comparan la exactitud diagnóstica entre los diferentes métodos y que relacionen los resultados obtenidos con los parámetros clínicos que se emplean en la valoración del riesgo cardiovascular.

Bibliografía

1. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001;285:2486-97.
2. Gazi IF, Tsimihodimos V, Tselepis AD, Elisaf M, Mikhailidis DP. Clinical importance and therapeutic modulation of small dense low-density lipoprotein particles. *Expert Opin Biol Ther*. 2007;7:53-72.
3. Krauss RM, Blanche PJ. Detection and quantitation of LDL subfractions. *Curr Opin Lipidol*. 1992;3:377-83.
4. Chung M, Lichtenstein AH, Ip S, Lau J, Balk EM. Comparability of methods for LDL subfraction determination: A systematic review. *Atherosclerosis*. 2009;205:342-8.
5. Hoefner DM, Hodel SD, O'Brien JF, Branum EL, Sun D, Meissner I, et al. Development of a rapid, quantitative method for LDL subfractionation with use of the Quantimetrix Lipoprint LDL System. *Clin Chem*. 2001;47:266-74.
6. Hirany SV, Othman Y, Kutscher P, Rainwater DL, Jialal I, Devaraj S. Comparison of low-density lipoprotein size by polyacrylamide tube gel electrophoresis and polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Am J Clin Pathol*. 2003;119:439-45.

7. Kazumi T, Kawaguchi A, Hozumi T, Nagao M, Iwahashi M, Hayakawa M, et al. Low density lipoprotein particle diameter in young, nonobese, normolipidemic Japanese men. *Atherosclerosis*. 1999;142:113–19.
8. Wiebe DA, Bernert Jr. JT. Influence of incomplete cholesterol ester hydrolysis on enzymic measurements of cholesterol. *Clin Chem*. 1984;30:352–6.
9. Pisani T, Gebski CP, Leary ET, Warnick GR, Ollington JF. Accurate direct determination of low-density lipoprotein cholesterol using an immunoseparation reagent and enzymatic cholesterol assay. *Arch Pathol Lab Med*. 1995;119:1127–35.
10. Nagele U, Hagele EO, Sauer G, Wiedemann E, Lehmann P, Wahlefeld AW, et al. Reagent for the enzymatic determination of serum total triglycerides with improved lipolytic efficiency. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1984;22:165–74.
11. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972;18:499–502.
12. Rijks LG. Friedewald formula. *Clin Chem*. 1995;41:761.
13. Gabir MM, Hanson RL, Dabelea D, Imperatore G, Roumain J, Bennett PH, et al. The 1997 American Diabetes Association and 1999 World Health Organization criteria for hyperglycemia in the diagnosis and prediction of diabetes. *Diabetes Care*. 2000;23:1108–12.
14. Ensign W, Hill N, Heward CB. Disparate LDL phenotypic classification among 4 different methods assessing LDL particle characteristics. *Clin Chem*. 2006;52:1722–7.
15. Albaladejo Otón MD, Calle Luna JG, Granero Fernández E, Hernández Martínez AM, Parra Pallarés S, Martínez Hernández P. Concentración y tamaño de las partículas de LDL tras el tratamiento con rosiglitazona en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Med Clin (Barc)*. 2009;132:98–101.
16. Krauss RM, Siri PW. Metabolic abnormalities: Triglyceride and low-density lipoprotein. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2004;33:405–15.
17. St-Pierre AC, Cantin B, Dagenais GR, Mauriege P, Bernard PM, Despres JP, et al. Low-density lipoprotein subfractions and the long-term risk of ischemic heart disease in men: 13-year follow-up data from the Quebec Cardiovascular Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:553–9.
18. Koba S, Yokota Y, Hirano T, Ito Y, Ban Y, Tsunoda F. Small LDL-cholesterol is superior to LDL-cholesterol for determining severe coronary atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2008;15:250–60.