

CARACTERISTICAS DE LAS DISLIPOPROTEINEMIAS MAS FRECUENTES EN VENEZUELA ESTUDIADAS MEDIANTE UN ANALISIS DE ULTRACENTRIFUGACION PREPARATIVA

Virgilio Bosch-Román, Marta de Rodríguez y Noel Geron

Sección de Lipidología. Instituto de Medicina Experimental. Universidad Central de Venezuela. Laboratorio de Cardiología. Ministerio de Sanidad y Asistencia Social. Caracas. Venezuela.

RESUMEN

Presentamos los resultados de la determinación de las lipoproteínas del plasma en 400 sujetos de la zona central de Venezuela, analizados mediante el análisis de fracciones lipoproteicas separadas por ultracentrifugación preparativa. Se dan los detalles del método de fraccionamiento que ha permitido una buena recuperación, precisión y una baja variabilidad metodológicas. En los hiperlipoproteínémicos, tanto en hombres como mujeres, se observa que más de un 80% de los casos presentan una concentración elevada de VLDL. Además, la composición de la VLDL está alterada a juzgar por la relación Colesterol/Triglicéridos la cual es superior en los pacientes que en los normales. Estas hiperlipoproteinemias, por tanto, no solo se caracterizan por un aumento de la concentración de los lípidos sino también por una alteración de la distribución de la amplia gama de moléculas con densidad menor de 1,006 g/ml.

La disminución de la HDL se observó con frecuencia notoria aún en los sujetos normales (22% de los hombres

y 33% de las mujeres). En los hiperlipoproteinémicos la proporción de hipoalfalipoproteinemias es cercana o superior al 50% en los distintos grupos.

INTRODUCCION

Se ha establecido mediante numerosas investigaciones metabólicas y de estudio de poblaciones que la dieta del hombre influye sobre la concentración y composición de las lipoproteínas del plasma (1, 2, 11). Por otra parte, sabemos que los países que tienen tasas elevadas de enfermedades cardiovasculares generalmente poseen patrones de alimentación que conducen a valores de lípidos del plasma que suelen ser mayores que los de poblaciones con bajo índice de tales afecciones (10). Más recientemente se ha demostrado que el descenso de la concentración de colesterol o de las lipoproteínas LDL (lipoproteínas de baja densidad) produce una clara disminución de la aparición de infartos del miocardio y de muertes ocasionadas por enfermedad coronaria (9, 12). Estos y muchos otros hallazgos que relacionan a las lipoproteínas del plasma con la aparición de las enfermedades vasculares degenerativas, hacen que tenga gran interés conocer las características de las dislipoproteinemias en una determinada población. Ya existen publicaciones donde se muestra que los pacientes con cardiopatía isquémica en Venezuela tienen tendencia a padecer alteraciones lipoproteicas que producen alta frecuencia de hipertrigliceridemias (3, 4), lo que señala una situación distinta de lo que ocurre en los Estados Unidos de Norte América y en otros países industrializados y más parecido a lo que ocurre en Suecia (5).

Hemos querido contribuir en este campo con el presente trabajo ya que se trata de una extensa experiencia lograda con una clasificación de las dislipoproteinemias mediante el uso de la separación de las lipoproteínas por ultracentrifugación preparativa y bajo condiciones de análisis óptimas.

MATERIAL Y METODOS

1.— Sujetos estudiados:

Se hace una presentación de 400 casos consecutivos que se estudiaron en el Laboratorio de Lipidología del Instituto de Medicina Experimental de la Universidad Central de Venezuela, la mayoría residentes de Caracas y durante el período de 1978 a 1984. La muestra representa, por tanto, la frecuencia de las dislipidemias que se podría esperar en una consulta espe-

cializada en enfermedades metabólicas. Debido a la participación muy poco representativa hemos excluido de esta presentación a dos casos de hiperlipoproteinemia Tipo I, dos casos de probable hiperlipemia Tipo III, dos casos de hiperlipoproteinemia Tipo V y un caso de hiperlipoproteinemia por atresia de vías biliares que tenía una elevada concentración de la lipoproteína LP-X.

También se excluyeron los casos a los que no se les pudo hacer todas las determinaciones de lípidos en las distintas fracciones y aquellos en los cuales el análisis resultó insatisfactorio por diversas razones: muestra hemolizada, tubos fracturados durante la centrifugación o muestra insuficiente.

2.— Separación de las fracciones lipoproteicas por ultracentrifugación preparativa:

Por tratarse de una modificación muy significativa de la metodología de Havel y col (8), la describimos en detalle.

En un tubo de ultracentrifugación se colocan cerca de 3 ml de plasma obtenido de una muestra de sangre venosa anticoagulada con EDTA, se le añade la cantidad necesaria de una solución de Cloruro de Sodio de densidad 1,006 g/ml hasta completar a un volumen de 8 ml (usualmente 3 ml de plasma más 5 ml de solución salina), y lo llamaremos Tubo A. En otro tubo de centrifuga, Tubo B, se hace la misma mezcla más 0,6676 g de KBr sólido para subir la densidad a 1,063 g/ml. Los tubos se tapan, se invierten varias veces y se centrifugan en un rotor 50Ti en una ultracentrífuga Spinco Beckman a 40.000 r.p.m. por no menos de 21 horas. Después de extraer los tubos del rotor se separan las lipoproteínas sobrenadantes, de tal modo que las proteínas sedimentadas en el fondo de los tubos queden bajo una capa de líquido incoloro y prácticamente libre de proteínas. Luego cuidadosamente se resuspende el sedimento agitando con una delgada varilla de vidrio y se enrasa a 3 ml. Es necesario asegurarse que en la resuspensión se logre una solución homogénea del material sedimentado. Procediendo de esta manera tendremos en la solución proveniente del Tubo A a las lipoproteínas LDL (lipoproteínas de baja densidad) más las lipoproteínas HDL (lipoproteínas de alta densidad), y en la solución proveniente del Tubo B, tendremos solamente a las lipoproteínas de alta densidad. El sobrenadante del Tubo A, que contiene la fracción de lipoproteínas de muy baja densidad o VLDL, se conserva para hacer estudios especiales si fueran necesarios (movilidad electroforética y análisis de la composición química). El sobrenadante del Tubo B se descarta.

3.- Análisis cuantitativo del colesterol y de los triglicéridos de las fracciones:

Se toman 0,2 ml de cada una de las preparaciones descritas provenientes de los tubos A y B y se hace la determinación cuantitativa del colesterol y glicéridos en un extracto isopropílico, en todo de acuerdo al método propuesto para el Programa de las Lipid Research Clinics (13) en un Autoanalyzer A-II, Technicon, Tarrytown U.S.A. Después de hacerse las correcciones debidas a las diluciones del plasma original, se expresan las concentraciones del colesterol y triglicéridos en mg/dl de plasma y se calculan las respectivas fracciones lipoproteicas de acuerdo a:

- 1.- Colesterol de VLDL = Colesterol Total del Plasma - Colesterol de la preparación del Tubo A.
- 2.- Colesterol de LDL = Colesterol Tubo A - Colesterol Tubo B.
- 3.- Colesterol de HDL = Colesterol de la preparación del Tubo B.

De la misma manera se procede con los triglicéridos.

Seguimos la clasificación de Fredrickson tomando como valores de referencia los que se ven en la Tabla I. Consideramos anormalmente ele-

TABLA I

VALORES DE REFERENCIA PARA LA CLASIFICACION
DE DISLIPOPROTEINEMIAS
SERIE SECCION DE LIPIDOLOGIA I.M.E. - U.C.V. 1985

	VLDL	LDL	HDL
Hombres	20 - 30 años	40*	160
	> 30 años	50	170
Mujeres	20 - 30 años	25	150
	> 30 años	30	170

* Los valores representan la concentración del colesterol en mg/dl de plasma

vadas los valores de VLDL y LDL que excedan esos límites y anormalmente bajas los de HDL que estén por debajo de los mismos. Estos límites son

ciertamente arbitrarios y provisionales debido a la falta de datos extensos sobre nuestra población normal analizados por ultracentrifugación. Sin embargo estos límites no pueden estar muy alejados del percentile 95 para las LDL y VLDL y del percentil 5 para las HDL a juzgar por los datos que tenemos de colesterol y triglicéridos del suero en donantes voluntarios de sangre de Caracas (2) y a nuestra experiencia con unos 200 casos de personas normales con análisis de lipoproteínas del plasma separadas por la técnica clásica de Havel y col. ya citada (8).

RESULTADOS

En la Tabla II se muestran algunas características de la lipoproteínas de un grupo de individuos los cuales sirvieron de control para este estudio en particular, discriminados según el sexo. La Tabla III contiene otras características de este mismo grupo control pero discriminadas por sexo y grupo etario.

TABLA II

ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LAS LIPOPROTEINAS DE LOS
NORMALES MAYORES DE 30 AÑOS DE ESTE ESTUDIO

HDL-C mg/dl	VLDL-C/TG Total	VLDL-C/VLDL-TG	C-Total/HDL-C
Hombres (n = 55)			
36,9 ± 8,9	0,26 ± 0,14	0,41 ± 0,29	5,2 ± 1,2
Mujeres (n = 32)			
43,5 ± 15,2	0,26 ± 0,16	0,59 ± 0,44	5,1 ± 2,3

En la Tabla IV se muestra la importancia de las alteraciones de la fracción VLDL la que tiene una concentración aumentada en algo más del 80% de los casos. Además en esta fracción no solamente se altera con frecuencia la concentración sino también la composición, como se puede observar en los resultados de la última columna de las tablas V y VI en las que la relación colesterol/triglicéridos de las VLDL es mayor que el valor normal de nuestro laboratorio que es $0,35 \pm 0,1$. Por el contrario el valor de la relación en las hiperlipemias tipo II-A, que se observa en la Tabla VII, es normal.

TABLA III

CARACTERÍSTICAS DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE PERSONAS NORMALES DE ESTE ESTUDIO

C-Total	TG-Total	VLDL-C	VLDL-TG	LDL-C	LDL-TG	HDL-C	HDL-TG	VLDL-C/VLDL-TG
(mg/dl)								
Hombres entre 20-30 años (n = 8)								
170	143	28	104	113	19	32	16	0,40
± 37	± 98	± 7	± 88	± 26	± 6	± 10	± 9	± 0,22
Mujeres entre 20-30 años (n = 12)								
175	94	25	47	114	32	36	15	0,30
± 33	± 48	± 10	± 23	± 29	± 28	± 7	± 5	± 0,15
Hombres mayores de 30 años (n = 55)								
184	115	32	100	117	27	37	18	0,41
± 34	± 63	± 11	± 54	± 28	± 13	± 9	± 11	± 0,29
Mujeres mayores de 30 años (n = 32)								
193	122	27	64	120	29	44	19	0,59
± 32	± 55	± 12	± 42	± 35	± 15	± 15	± 8	± 0,44

Los valores representan el promedio ± DE. En este cuadro se presentan los datos de las personas normales de este estudio. Los valores de la Tabla I no han sido propuestos tomando en cuenta estos datos normales solamente sino en base a una experiencia más extensa del laboratorio.

TABLA IV

**DISTRIBUCION PORCENTUAL DE LAS HIPERLIPIDEMIAS
EN LOS PACIENTES**

Tipo	N	Porcentaje	Porcentaje Hiper VLDL	Porcentaje Hiper LDL
Hombres				
IV	94	72,0	81,8	28,0
II-B	13	9,8		
II-A	24	18,2		
Mujeres				
IV	44	51,8	84,7	47,2
II-B	28	32,9		
II-A	13	15,3		

Con nuestro criterio para considerar como baja la concentración de la fracción HDL- Colesterol (menor de 30 mg/dl para los hombres y menor de 40 para las mujeres) mostramos en la Tabla VIII que la frecuencia de la disminución de esta fracción es considerable, llegando hasta el 79% de los casos de las mujeres con hiperlipemia tipo II-B. Es importante notar que hasta un 20% de las personas que resultaron con valores normales de las concentraciones de VLDL y LDL, tienen una disminución de la HDL.

En la Tabla IX, donde se presentan los coeficientes de correlación entre algunos de los pares de las variables estudiadas, se nota que todos resultaron estadísticamente significativos.

En la Tabla X se muestra que el grado de acuerdo entre el método de análisis por diferencia para la VLDL que estamos proponiendo, y el obtenido por análisis directo de la VLDL aislada por flotación, es adecuado cuando se trata de hiperlipoproteinemias que afectan a la VLDL. En la Tabla XI vemos que el acuerdo entre los dos procedimientos no es tan satisfactorio cuando se incluyen los valores de los casos con VLDL normal o baja.

TABLA V
ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LAS HIPERLIPOPROTEINEMIAS II - B

C-Total	TG-Total	VLDL-C	VLDL-TG	LDL-C	LDL-TG	HDL-C	HDL-TG	VLDL-C	VLDL-TG
		mg/dl de Plasma							
300*	246	75	183	198	43	37	28	0,80	
± 48	± 169	± 22	± 161	± 42	± 22	± 9	± 19	± 0,81	
		Hombres mayores de 30 años (n=11)							
322	214	72	156	209	43	36	15	0,67	
+ 88	± 118	± 39	± 111	± 75	± 19	± 10	± 7	± 0,48	
		Mujeres mayores de 30 años (n=26)							

* Los valores son el promedio ± la desviación estándar.

TABLA VI

ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LAS HIPERLIPOPROTEINEMIAS TIPO IV

C-Total	TG-Total	VLDL-C	VLDL-TG	LDL-C	LDL-TG	HDL-TG	HDL-TG	VLDL-C	VLDL-TG
			mg/dl Plasma						
195*	175	61	Hombres de 20 - 30 años (n=38)						
± 25	± 64	± 17	137	91	23	43	15	0,53	
			± 55	± 20	± 12	± 12	± 6	± 0,28	
234	322	94	Hombres mayores de 30 años (n=90)						
± 61	± 250	± 65	270	106	39	31	24	0,56	
			± 226	± 38	± 19	± 9	± 13	± 0,56	
190	206	50	Mujeres entre 20 - 30 años (n=6)						
± 30	± 78	± 13	146	106	36	35	24	0,44	
			± 57	± 35	± 19	± 14	± 12	± 0,34	
256	205	104	Mujeres mayores de 30 años (n=38)						
± 138	± 127	± 150	180	111	39	39	20	0,75	
			± 221	± 31	± 30	± 13	± 11	± 0,50	

* Los valores son el promedio ± la desviación estándar.

TABLA VII

ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LAS HIPERLIPOPROTEINEMIAS TIPO II - A

C-Total	TG-Total	VLDL-C	VLDL-TG	LDL-C	LDL-TG	HDL-C	HDL-TG	VLDL-C VLDL-TG
		mg/dl de Plasma						
273*	157	32	103	218	40	30	20	0,37
± 67	± 69	± 14	± 56	± 56	± 18	± 15	± 8	± 0,16
Hombres mayores de 30 años (n=20)								
278	131	28	67	209	52	42	27	0,40
± 43	± 33	± 9	± 29	± 40	± 39	± 14	± 11	± 0,15
Mujeres mayores de 30 años (n=11)								

* Los valores representan el promedio ± la desviación estándar.

TABLA VIII

EL PROBLEMA DE LA HIPOALFALIPOPROTEINEMIA PLASMÁTICA*

	N con hipo alfa	N Total	Porcentaje
Normales			
Hombres	14	63	22
Mujeres	15	45	33
Tipo IV			
Hombres	40	90	44
Mujeres	26	44	59
Tipo II-B			
Hombres	3	16	19
Mujeres	22	28	79

* Hipo alfa: Hombres: menos de 30 mg/dl de HDL-C
Mujeres: menos de 40 mg/dl de HDL-C

TABLA IX

COEFICIENTES DE CORRELACION ENTRE ALGUNOS DE LOS PARES DE VARIABLES ESTUDIADAS

Variables	Coef. Correl.	Variables	Coef. Correl.
1. TG-Total, VLDL-TG	0,82	4. VLDL-C, VLDL-TG	0,63
2. TG-Total, VLDL-C	0,69	5. VLDL-TG, HDL-TG	0,48
3. C-Total, VLDL-TG	0,62	6. VLDL-TG, HDL-C	-0,22*

* Todos los coeficientes resultaron con p menor o igual a 0,01, excepto 6 en el cual fué menor de 0,05

TABLA X

COMPARACION DE LA RELACION COLESTEROL/TRIGLICERIDOS DE LAS VLDL DETERMINADAS DIRECTAMENTE EN LA FRACCION AISLADA Y POR EL METODO DE DIFERENCIAS PROPUESTO EXCLUYENDO LAS FRACCIONES CON VALORES DE COLESTEROL MENOR DE 30 mg/dl.

	Promedio	DE	Coef. Correl.	R ²	N
Análisis directo	0,316	± 0,15	0,832	69	16
Análisis por diferencia	0,394	± 0,20			

TABLA XI

COMPARACION DE LA RELACION COLESTEROL/TRIGLICERIDOS DE LAS VLDL DETERMINADAS DIRECTAMENTE EN LA FRACCION AISLADA Y MEDIANTE LA RELACION OBTENIDA POR DIFERENCIA, EN TODA LA MUESTRA ESTUDIADA.

	Promedio	DE	Coef. Correl.	R ²	N
Análisis directo	0,29	± 0,14			
			0,639	41	38
Análisis por diferencia	0,43	± 0,18			

DISCUSION

De nuevo se evidencia en este trabajo la importancia de las hiperlipidemias que se acompañan de un aumento de las VLDL, lo que se ha presentado en cerca del 80% de los casos de nuestro laboratorio. Esto guarda una relación muy estrecha con nuestros hallazgos en pacientes con cardiopatía isquémica, así como con los reportados por Carnejo y colaboradores (3, 4), en los cuales se destaca la alteración de los triglicéridos

como un acompañante muy frecuente en la enfermedad coronaria en Venezuela.

Si se observan los datos de la Tabla VIII se puede concluir que un porcentaje muy importante de nuestros pacientes presentan fundamentalmente una disminución de la HDL como trastorno único. En relación con este punto tiene interés el que la influencia de la disminución de las HDL como factor aislado de riesgo en las cardiopatías isquémicas ha sido reiteradamente comprobado por varios autores (6, 7).

En cuanto a los aspectos metodológicos, debemos señalar que en nuestro laboratorio hemos hecho por mucho tiempo análisis de lipoproteínas mediante la ultracentrifugación secuencial propuesta por Havel y colaboradores (8). Este método, tiene el inconveniente que es necesario hacer determinaciones cuantitativas en fracciones que flotan hacia el tope del tubo de ultracentrifugación. Ahora bien, las condiciones para recuperar cuantitativamente estas fracciones han mostrado ser muy exigentes en cuanto a los detalles metodológicos y, en general, conducen a pérdidas del orden del 30% del material que se pretende colectar. En esta modificación obtenemos, para fines cuantitativos, el material que se va al fondo del tubo lo cual permite una recuperación más fácil y eficiente. El procedimiento implica restar dos valores para obtener las concentraciones de VLDL y LDL. En cuanto a esta última, se puede observar que el sustrayendo es bastante menor que el minuendo de tal forma que el error es limitado. Por el contrario la resta que da origen al valor de VLDL es más problemática, sobre todo si se trata de casos normales con valores muy bajos de colesterol. No lo es así cuando estamos en presencia de casos anormales, como se deduce del estudio de las tablas X y XI donde se observa una correlación muy alta entre la relación colesterol/triglicéridos en la fracción analizada directamente (sobrenadante Tubo A) y la relación obtenida después de determinar las concentraciones de colesterol y triglicéridos de VLDL de acuerdo al procedimiento que hemos descrito aquí. En cuanto al aumento de la concentración de VLDL se observa que con frecuencia se acompaña de una relación colesterol/triglicéridos mayor que lo normal. Es posible que esto se deba a un incremento de subfracciones de VLDL con densidad intermedia las cuales han mostrado ser muy aterogénicas y que suelen tener una mayor proporción de colesterol (14). Este trabajo plantea la necesidad de que se hagan estudios más detallados sobre la composición de las VLDL en estas hiperlipemias tan frecuentes en nuestro país.

Agradecimiento

Este trabajo fué hecho con fondos del CONICIT. Proyecto SI-0689.

ABSTRACT

Characteristics of dyslipoproteinemias in central Venezuela as determined by preparative ultracentrifugation. Bosch Román, V., (Sección Lipidología. Instituto de Medicina Experimental. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela), de Rodríguez M., Geron N. *Invest Clín* 28(1): 5-19. 1987.— The plasma lipoproteins of 400 consecutive cases were studied by a new ultracentrifugal procedure with good recovery, precision and low variability. More than 80% of the hyperlipidemic patients presented elevation of VLDL (very low density lipoprotein), whereas only 28% men and 48% women showed augmented LDL (low density lipoprotein). Frequently, the VLDL composition of the subjects with hyper-VLDL was altered by an increment in their cholesterol/triglyceride ratio, when compared to normolipidemic subjects. A low content of HDL (high density lipoproteins) was found in 22% of the men and 33% of the women. The frequency of the low HDL was higher in hyperlipidemics than in normolipidemics

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- AHRENS E.H. Jr., HIRSH J., INSULL W. Jr., TSALTAS T.T., BLOMSTRAND R., PETERSON M.L.: The influence of dietary fats on serum-lipid levels in man. *Lancet* I: 943-953, 1957.
- 2- BOSCH V.: Lípidos del suero en personas aparentemente normales de Caracas. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Biblioteca "Humberto García Arocha". IME Caracas, 1979.
- 3- BOSCH V., SANTANA C., PIETERS G.: Lípidos y lipoproteínas séricas en personas normales y pacientes con cardiopatía isquémica en Venezuela. *Acta Cient Venez* 21(3): 94-97, 1970.
- 4- CAMEJO G., ACQUATELLA H., LALAGUNA F., HIRSCHAUT E., GUINAND BALDO A., BURGER B., PEREZ ROJAS M., APARICIO J.M., SUAREZ J.A., PADRON J.P.: Las dislipoproteinemias como factor de riesgo en las enfermedades cardiovasculares: un estudio en pacientes con cardiopatía isquémica crónica. *Acta Cient Venez* 28(1): 77-81, 1977.
- 5- CARLSON L.A., BERGT P.: Metabolic risk factors in ischemic cardiovascular disease. Raven Press, New York, pp 1-5, 1982.
- 6- FRAMINGHAM STUDY. An epidemiological investigation of car-

diovascular disease. Section 27. US Department HEW, Washington, 1971.

- 7-- GORDON T., CASTELLI W.P., HJORTLAND M.C., KANNEL W.B., DAWBER T.R.: High density lipoprotein as a protective factor against coronary hearth disease. *Am J Med* 62: 707-714, 1977.
 - 8-- HAVEL R.J., EDEHA, BRAGDON J.H.: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins and chylomicrons. *J Clin Invest* 34: 1345-53, 1955.
 - 9-- HJERMANN I., HOLME I.: Effect of diet and smoking intervention on the incidence of coronary heart disease. *Lancet* II: 1303-1310, 1981.
 - 10-- KEYS A.: Coronary heart disease in seven countries. *Circulation* 41 (Suppl 1): 11-1211, 1970.
 - 11-- KEYS A., ANDERSON J.T., GRANDE F.: Serum cholesterol response to changes in the diet. I. Iodine value of dietary fat versus 2S-P. *Metabolism* 14: 747-758, 1965.
 - 12-- Lipid Research Clinics Program. The lipid research clinics coronary disease primary prevention trial results: II. The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering. *JAMA* 251(3): 365-74, 1984.
 - 13-- Manual of Laboratory Operations. Lipid research clinics programs: I. Lipid and lipoproteins analysis: Dept of Health Educations and Welfare publication (NIH) National Institute of Health 75-628, 1974.
 - 14-- TATAMI R.: Intermediate density lipoprotein and cholesterol-rich very low density lipoprotein in angiographically determined coronary artery disease. *Circulation* 64(6): 1174-1184, 1981.
-