

Instituto Nacional de Endocrinología

INTRODUCCIÓN DE LA DETERMINACIÓN DEL "COLESTEROL INMUNE" EN LA PRÁCTICA INVESTIGATIVA DE LA ATROSCLEROSIS CORONARIA

Lic. Giovanna Pereira Roca, Lic. Arturo Reyes Durán, Lic. Alina Rodríguez Riverón, Dr. Daniel Sánchez Serrano y Dra. Emma Domínguez Alonso

RESUMEN

El objetivo de este trabajo consistió en el montaje y la estandarización de un método para la evaluación de la lipoproteína de baja densidad oxidada contenida en los inmunocomplejos, mediante la cuantificación del colesterol total presente en el precipitado de polietilenglicol denominado "colesterol inmune". El valor de "colesterol inmune" fue comparado con los demás parámetros lipídicos en un grupo de sujetos normales de banco de sangre, y 103 pacientes escogidos consecutivamente al azar entre los asistentes como "casos patológicos" a la consulta de cardiopatía isquémica en el Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, a los cuales se les realizó la angiografía coronaria como parte de su estudio. Como resultado de este trabajo se obtuvo que sólo el "colesterol inmune" se correlacionó significativamente con la severidad de la aterosclerosis coronaria. La sensibilidad y especificidad del método fue de 80 %, los valores predictivos positivo y negativo fueron 84 y 76 % respectivamente. La concentración del "colesterol inmune" fue menor en sujetos normales que en pacientes con aterosclerosis coronaria. Se concluyó que el "colesterol inmune" puede ser empleado como un nuevo marcador diagnóstico en estadios tempranos de la aterosclerosis coronaria.

Descriptores DeCS: ATROSCLEROSIS CORONARIA/diagnostico; LIPOPROTEINAS DEL COLESTEROL LDL/análisis; FACTORES DE RIESGO; ATROSCLEROSIS CORONARIA/ enzimología.

El desarrollo actual de las investigaciones en el campo de la aterosclerosis permite acumular muchas evidencias acerca del importante papel que desempeña la modificación oxidativa de las lipoproteínas aterogénicas en la presencia y progresión de esta. La concentración elevada de la lipoproteína de baja densidad (LDL) constituye uno de los mayores factores de riesgo para la aterosclerosis, estudios clínicos,

epidemiológicos y genéticos, han demostrado convincentemente que la LDL promueve la formación de la placa de ateroma.¹

La LDL oxidada (LDL-ox) aparentemente es más inmunogénica que la LDL nativa, lo que sugiere que el nivel de autoanticuerpos contra esta 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 causa de la protección que sobre ella tienen los agentes antioxidantes presentes en la circulación general, es por ello que el descubrimiento de los autoanticuerpos contra las LDL oxidadas en suero humano y la formación del complejo inmune estimula la acumulación de ésteres de colesterol en macrófagos y da lugar a la formación de las células espumosas.^{2,3}

El objetivo de este trabajo es el montaje y la estandarización de la determinación del colesterol contenido en el inmunocomplejo circulante (autoanticuerpo-LDLox) en suero, con una elevada calidad, y factible de ser empleado por los laboratorios clínicos de la red cubana de salud, así como relacionar los niveles de colesterol en el inmunocomplejo circulante (autoanticuerpo-LDLox) con la severidad de la enfermedad arterial coronaria y demás parámetros lipídicos.

MÉTODOS

El complejo inmune circulante fue precipitado del suero combinando volúmenes iguales de suero con polietilenglicol de 6 000 (PEG) 5 %. La mezcla fue incubada en un baño termostataado 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 2,5 %. El colesterol contenido en el complejo inmune precipitado fue determinado mediante un kit enzimático-colorimétrico comercial para la determinación de colesterol total de la Boehringer Mannheim.^{4,5}

EVALUACIÓN ANALÍTICA DEL MÉTODO

Se realizó la validación analítica para el método desarrollado, mediante los estudios de calibración, repetibilidad, reproducibilidad, recuperación, límite de

detección. Se determinó la sensibilidad, especificidad diagnóstica, así como los valores predictivos positivo y negativo a partir del procesamiento de 50 muestras de suero tomadas de banco de sangre al azar (casos normales), y 65 muestras de pacientes con cardiopatía isquémica.

ESTUDIO CLÍNICO

Se realizó un estudio descriptivo transversal para determinar el valor diagnóstico del “colesterol inmune” en la enfermedad arterial coronaria determinada por angiografía, donde se incluyeron un total de 102 pacientes, estos fueron atendidos en la consulta de cardiopatía isquémica del Instituto Nacional de Cardiología y Cirugía Cardiovascular, por ser supuestos portadores de la enfermedad. Los pacientes concurren durante el período de 1 año (sin elección alguna), y se les realizó la angiografía coronaria como parte de su estudio. En cada paciente se precisó la edad en años, el sexo, el índice de masa corporal (kg/m^2) y el grado de estenosis. Después de un ayuno de 12 h se le extrajo a cada paciente 10 mL/ de sangre por punción venosa, para realizar las determinaciones analíticas del “colesterol inmune” y los demás parámetros lipídicos.

Se calcularon los estadígrafos descriptivos (media, mediana, desviación estándar y valores máximo y mínimo) de las variables cuantitativas, y la distribución de frecuencia de las variables cualitativas. Se determinó el “valor de corte” utilizando el método de máximo chi cuadrado. Se obtuvieron las correlaciones de Spearman entre el “colesterol inmune” y las variables lipídicas. Se comparó este con las variables cualitativas empleando el *test* no paramétrico de Kruskal-Wallis. Se realizó un análisis multivariado usando la regre-

sión logística, en la que la variable de respuesta fue la presencia de cardiopatía isquémica, y los posibles predictores, las variables lipídicas. Se consideró significación estadística cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

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. El rango de concentración de la curva fue de 5 a 40 $\mu\text{g/mL}$. El límite de detección del método fue de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, concentración que se encontró 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, la repetibilidad del método evaluada a través de 3 muestras de suero rindió un coeficiente de variación promedio de 3,7 %. Se calcularon, además, los coeficientes de variación total para cada muestra que fueron 7,14; 5,13 y 4,38 %.

El porcentaje de recuperación promedio de las 3 muestras estudiadas fue de 96,3 %. La sensibilidad y especificidad del método fueron de 80 %, y los valores predictivos positivo y negativo fueron 84 y 76 % respectivamente.

La edad promedio de los pacientes fue 53,24 años, en los hombres 69 (67,6 %) y en las mujeres 33 (32,4 %). El valor de corte calculado para el “colesterol inmune” por el método de máximo chi cuadrado fue 17 $\mu\text{g/mL}$, determinado en el grupo que tenía grado 0 de estenosis (sin estenosis apreciable de las arterias coronarias), por lo tanto, un valor de “colesterol inmune” menor o igual que 17 $\mu\text{g/mL}$ es considerado normal, y un valor superior patológico.

El valor de “colesterol inmune” en el grupo con grado 0 de estenosis fue 11,6

$\mu\text{g/mL}$ y es 2 veces más bajo que el valor obtenido para los pacientes con grado 1, 2 y 3 de estenosis. En todos los casos con grado de estenosis los valores de “colesterol inmune” fueron considerablemente más altos (18,67; 24,71 y 20,38 $\mu\text{g/mL}$ (respectivamente) que en aquellos sin estenosis. Al comparar los valores entre las 4 categorías, mediante el *test* no paramétrico de Kruskal-Wallis, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$).

En cuanto a las demás variables lipídicas, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grados de estenosis para el colesterol total y el colesterol de las LDL (col-LDL).

El valor del “colesterol inmune” fue correlacionado con el resto de los parámetros lipídicos estudiados, no se encontró correlación significativa entre estos.

Los resultados del análisis multivariado reflejan que las variables Apo A1, col-LDL, Lp(a) y el “colesterol inmune” fueron las mejores predictoras de la cardiopatía isquémica, y entre ellas el “colesterol inmune” es el que ejerce mayor influencia sobre la enfermedad, pues el valor del exponencial β fue 3,27; esto quiere decir, que cuando el “colesterol inmune” aumenta 3 unidades, la probabilidad de tener cardiopatía isquémica aumenta 3 veces, para el col-LDL y la LP(a), cuando aumentan en una unidad la probabilidad de tener la cardiopatía isquémica aumenta en 19 % y en 1 % respectivamente. El comportamiento de la variable Apo A1 fue contrario a las anteriores, porque cuando esta aumenta en una unidad la probabilidad de tener cardiopatía disminuye en 2 %, y ejerce un efecto protector. Cuando se dicotomizan los valores de “colesterol inmune” en normal y patológico, de acuerdo con el valor de corte de 17 $\mu\text{g/mL}$, en los

pacientes con estenosis el riesgo de presentar aterosclerosis coronaria se incrementó desde 1,3 hasta 8 veces.

DISCUSIÓN

Como se comentó en la introducción, la medición directa de la LDL oxidada en suero o plasma no es factible por causa de la protección que sobre ella tienen los agentes antioxidantes presentes en la circulación general, es por ello que la determinación de los autoanticuerpos contra la LDL oxidada en suero humano ha despertado gran interés en los últimos años.^{2,3}

Poder remover el inmunocomplejo circulante del suero de pacientes con aterosclerosis coronaria reduce marcadamente el potencial aterogénico de estos sueros, que consiste en inducir la acumulación intracelular de lípidos. Se debe mencionar que la LDL, presente en el complejo circulante constituye no más de 2 % del *pool* de LDL total circulante, no obstante esa pequeña fracción de LDL, es fundamental para la aterogenicidad del suero manifestada en el nivel celular.⁶

SUMMARY

The objective of this paper was the mounting and standardization of a method for the evaluation of the low density oxidated lipoprotein contained in the immunocomplexes by the quantification of the total cholesterol present in the precipitate of polyethylenglycol denominated "immune cholesterol". The value of the "immune cholesterol" was compared with that of other lipid parameters in a group of normal subjects from the blood bank and 103 patients selected consecutively at random among those "pathological cases" attending the department of ischemic heart disease in the Institute of Cardiology and Cardiovascular Surgery. They underwent coronary angiography as part of the study. It was observed that only the "immune cholesterol" correlated significantly with the severity of coronary atherosclerosis. The sensitivity and specificity of the method was 80% and the negative and positive predictive values were 84 and 76%, respectively. The concentration of "immune cholesterol" was lower in normal individuals than in patients with coronary atherosclerosis. It was concluded that "immune cholesterol" may be used as a new diagnostic marker in early stages of coronary atherosclerosis.

Subject headings: CORONARY ATHEROSCLEROSIS/diagnosis; LIPOPROTEINS, LDL CHOLESTEROL/analysis; RISK FACTORS; CORONARY ATHEROSCLEROSIS/enzymology.

El estudio sugiere una relación muy estrecha entre la determinación cuantitativa de los niveles de "colesterol inmune" del suero y la aterosclerosis coronaria, lo considera un predictor potente de la lesión aterosclerótica en el nivel de las coronarias. Se encontró una asociación positiva entre los niveles de "colesterol inmune", colesterol total y col-LDL, en el suero de los pacientes estudiados, y el grado de severidad de la enfermedad arterial coronaria. Se demostró que niveles de "colesterol inmune" iguales o superiores a 17 µg/mL incrementan el riesgo de la aterosclerosis coronaria desde 1,3 a 8 veces.

Los resultados obtenidos en este trabajo son satisfactorios, y a juicio de sus autores el sistema analítico posee los atributos de calidad adecuados para su utilización en las investigaciones de la aterosclerosis coronaria, lo que tiene una gran importancia pues el "colesterol inmune" es mejor predictor de la severidad de la lesión coronaria que los factores de riesgo lipídicos más comúnmente conocidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jialal J, Scaccini C. Laboratory assesment of lipid, lipoproteins, and apolipoproteins. In: Rifai N, Wárnick GR, eds. Washington DC: AACC Press 1993;17:307-21.
2. Maggi E, Chiesa R, Milissano G, Castellano R, Astoru D. LDL oxidation in patient with severe carotid atherosclerosi. *Arterioscler Thromb* 1994;14:1892-9.
3. Bellomo G, Maggi E, Poli M, Agosta FG, Bollati P, Finardi G. Autoantibodies againts oxidatevely modified low density lipoproteins in NIDDM. *Diabetes* 1995;44(1):60-6.
4. Allain CC, Poon LS, Chan CSG. Enzimatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;20:470-5.
5. Orekhov AN, Kacharava AG, Tertov VV, Perova NV. Diagnostic value of immune cholesterol as a marker for atherosclerosis. *J Cardiovasc Risk* 1995;2:459-66.
6. Holvoet P, Callen D. Oxidized lipoproteins in atherosclerosis and thrombosis. *FASEB* 1994;8(15):1279-84.

Recibido: 3 de abril del 2000. Aprobado: 27 de junio del 2000.

Lic. *Giovanna Pereira Roca*. Instituto Nacional de Endocrinología. Zapata y D, El Vedado. Ciudad de La Habana, Cuba. Teléfono 327275.