

1 Título práctica de laboratorio: PERFIL LIPÍDICO

2 OBJETIVOS

Generales:

- Determinar los diferentes tipos de lípidos presentes en algunas muestras de sangre y hacer inferencias sobre el riesgo cerebro-cardio-vascular de acuerdo a valores de referencia.

Específicos:

- Determinar el colesterol total, presente en una muestra de sangre.
- Cuantificar las lipoproteínas de alta densidad (HDL) contenidas en una muestra sanguínea.
- Determinar el valor de los triglicéridos en una muestra de sangre.

3 REFERENTES CONCEPTUALES

Como referentes conceptuales los estudiantes deberán consultar los siguientes tópicos:

- Estructura y clasificación de los lípidos.
- Funciones de los triglicéridos, las lipoproteínas y los esteroides.
- Valores de referencia en el perfil lipídico.
- Relación fisiopatológica entre hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia y eventos cerebro-cardio-vasculares.

4 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Materiales y equipos

- 1. Espectrofotómetro.
- 1. Baño de María a 37°C.
- Micropipetas para medir volúmenes de 10 μL y 1000 μL .
- Puntas para micropipetas.
- 1. Centrífuga.

Reactivos

- Kit COLESTEROL OXIDASA/PEROXIDASA de laboratorio BioSystems, para medir la concentración de colesterol in-vitro.
- Muestra sanguínea (suero o plasma recogidos mediante procedimientos estándar).

Materiales que debe traer el estudiante

- 1. Marcador indeleble.
- Toallas absorbentes.

5 PROCEDIMIENTO

1. Determinación del Colesterol total.

- Sacar el reactivo para colesterol de su empaque y permitir atemperarlo a temperatura ambiente, posteriormente, tomar 3 celdas (o tubos) y rotular con los nombres: **Blanco**, **Patrón** y **muestra**. Con las micropipetas apropiadas realice las siguientes mediciones de volúmenes.

	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón de colesterol (S)	--	10 µL	--
Muestra	--	--	10 µL
Reactivo A	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

- Agitar bien e incubar los tubos o celdas durante 10 minutos a temperatura ambiente (16-25°C) o durante 5 minutos a 37°C.
- Leer la absorbancia (A) del Patrón y de la Muestra a 500 nm frente al Blanco. El color es estable durante al menos 2 horas.

Realización de los cálculos.

- La concentración de colesterol en la muestra se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de la muestra } C_m = \frac{A \text{ muestra}}{A \text{ Patrón}} \times C_{\text{patrón}}$$

Donde $C_{\text{patrón}} = 200$; el valor obtenido se encontrará en unidades mg/dL de colesterol.

2. Determinación de HDL

- En primera instancia, se debe preparar la muestra de trabajo (sobrenadante de suero o plasma), para ello, debe pipetear en un tubo de centrifuga los siguientes volúmenes:

Muestra	0,2 mL
Reactivo A	0,5 mL

- Posteriormente, agitar bien y dejar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- luego de los 10 minutos, Centrifugar durante 10 minutos a un mínimo de 4.000 r.p.m.
- Recoger con cuidado el sobrenadante.
- A continuación, se lleva a cabo la determinación colorimétrica del HDL; para ello, se atempera el reactivo B a temperatura ambiente y se realiza en 3 celdas o tubos rotulados como **Blanco**, **Patrón** y **muestra**, la siguiente medición de volúmenes:

	Blanco	Patrón	Muestra
Agua destilada	50 µL	--	--
Patrón Colesterol HDL (S)	--	50 µL	--
Sobrenadante de Muestra	--	--	50 µL
Reactivo (B)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

- Agitar bien e incubar los tubos durante 30 minutos a temperatura ambiente (16-25°C) o durante 10 minutos a 37°C.
- Leer la absorbancia (A) del Patrón y de la Muestra a 500 nm frente al Blanco. El color es estable durante al menos 30 minutos.

Realización de los cálculos.

- La concentración de colesterol HDL en la muestra se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de la muestra } C_m = \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times C_{\text{patrón}} \times F_{\text{dil}}$$

Donde $C_{\text{patrón}} = 52,5$; el valor obtenido se encontrará en unidades mg/dL de colesterol.

F_{dil} = Factor de dilución de la muestra.

2. Determinación de Triglicéridos

- Sacar el reactivo para Triglicéridos de su empaque y permitir atemperarlo a temperatura ambiente, posteriormente, tomar 3 celdas (o tubos) y rotular con los nombres: **Blanco**, **Patrón** y **muestra**. Con las micropipetas apropiadas realice las siguientes mediciones de volúmenes.

	Blanco	Patrón	Muestra
Patrón de triglicéridos (S)	--	10 µL	--
Muestra	--	--	10 µL
Reactivo A	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

- Agitar bien e incubar los tubos o celdas durante 15 minutos a temperatura ambiente (16-25°C) o durante 5 minutos a 37°C.
- Leer la absorbancia (A) del Patrón y de la Muestra a 500 nm frente al Blanco. El color es estable durante al menos 2 horas.

Realización de los cálculos.

- La concentración de triglicéridos en la muestra se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de la muestra } C_m = \frac{A_{\text{muestra}}}{A_{\text{Patrón}}} \times C_{\text{patrón}}$$

Donde $C_{\text{patrón}} = 200$; el valor obtenido se encontrará en unidades mg/dL de triglicéridos.

6 PREGUNTAS DE PROFUNDIZACIÓN

- ¿Qué valores discriminantes universales han sido establecidos por el US National cholesterol Education Program y también aceptados en otros países para la evaluación del riesgo de enfermedad de las arterias coronarias?
- ¿Cuál es el mecanismo de formación de los ateromas?
- De acuerdo a los resultados obtenidos ¿consideraría que el paciente presenta riesgo cerebro-cardio-vascular CCV?
- De considerarse riesgo CCV, ¿cuáles serían sus recomendaciones?

7-BIBLIOGRAFÍA

1. BioSystems S.A. Costa Brava, 30. 08030 Barcelona (Spain) 09/2014. Quality System certified according to EN ISO 13485 and EN ISO 9001 standards of lipids.
2. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 4th ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. WB Saunders Co, 2005.
3. National Cholesterol Education Program Expert Panel. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (ATP III). NIH Publication. Bethesda: National Heart, Lung, and Blood Institute; 2001.
4. Baynes J. Bioquímica Médica. 3a Ed. Editorial Elsevier. España; 2011.
5. Koolman J, Klaus-Heinrich Röhm K-H. Bioquímica Humana. 4 Ed. Editorial Médica Panamericana. Argentina; 2012.
6. Laguna J, Piña E. Bioquímica de Laguna. 6a Ed. Editorial Manual Moderno. México; 2007.
7. López J, Fernandez A. Fisiología del Deporte. 3a Ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires; 2006.
8. Pratt Ch. Bioquímica. 2 Ed. Editorial. Manual Moderno. México: 2008.