



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**  
***DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS***

*Tesis de Maestría en Ciencias del*

*Laboratorio Clínico*

***Colesterol HDL: Uso de material de referencia para la estandarización de su determinación en laboratorios clínicos y evaluación de métodos comerciales.***

Raúl H. Girardi

*Directora:*

Dra. Nilda E. Fink

Co-director:

Dr. Daniel Mazziotta<sup>†</sup>

Año 2020

## **Dedicatoria**

**A Jorgelina, Juan Ignacio. Camila. Joaquín y Mateo, mi familia, con quienes no hay destino posible ni con sentido si no estuvieran a mi lado**

## **Agradecimientos**

- A la Dra. Nilda. E. Fink directora de la tesis y al Dr. Daniel Mazziotta, codirector sobre quien lamento no pudo ver este trabajo terminado. A ambos por su denodada paciencia y empeño.
- A la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP por darme esta oportunidad
- A la Fundación Bioquímica Argentina por brindarme la infraestructura, los fondos y el tiempo necesario para desarrollar esta tarea paralela a mis obligaciones.
- A BD. Pamela De Francesco, del SCAT de la Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires por su inestimable colaboración en la confección del listado bibliográfico.
- A los laboratorios participantes por su enorme voluntarismo.

## Resumen

La necesidad de la evaluación médica de los niveles plasmáticos de colesterol asociados a la lipoproteína High Density Lipoprotein (HDL-Col) radica en que valores disminuidos aumentan el riesgo de Enfermedad Cardiovascular (ECV) inversamente a lo que ocurre con el colesterol asociado a la lipoproteína Low Density Lipoprotein (LDL-Col). Una disminución en 1% de los niveles de HDL-Col conllevan a un aumento del 2 al 3% en el riesgo de ECV. Es considerado un factor de riesgo independiente después de la corrección hecha sobre estudios multivariados de otros factores de riesgo.

El 50% de la variabilidad en los niveles plasmáticos de HDL-Col de la población son atribuibles a factores genéticos y el otro 50% a causas como obesidad y el sobrepeso que comúnmente están asociadas con la hipertrigliceridemia, el sedentarismo y tabaquismo.

Las guías internacionales para el manejo del paciente dislipémico, con el objeto de fijar los puntos de decisión clínica, se hicieron sobre la base de trabajos donde se obtuvieron datos estandarizados. Esto implica que la estandarización de los laboratorios clínicos que hacen las medidas de lípidos con aquellos mismos sistemas de referencia, aseguraría que el diagnóstico, el seguimiento y, en caso de corresponder, el tratamiento del paciente, sea consistente con las recomendaciones internacionales.

Para que un proceso de estandarización sea exitoso debe cumplir con tres requisitos previos.

1. El mensurando de interés debería poder ser definido sin ambigüedades en términos de la homogeneidad de sus propiedades fisicoquímicas. Las lipoproteínas, a diferencia del colesterol total (CT) y los triglicéridos (TG), no pueden caracterizarse homogéneamente ya que son colecciones polidispersas de partículas con un rango de propiedades fisicoquímicas muchas veces superpuestas. La estandarización de la medida de HDL-Col no puede hacerse hasta el Sistema Internacional de Unidades (SIU)

2. En segundo término, se necesita un sistema de referencia con diferentes jerarquías analíticas y materiales de referencia validados. La más alta jerarquía analítica en química clínica son los Reference Measurement Procedure (RMP) primarios o absolutos y el SIU. Los RMP primarios son altamente exactos, precisos, con baja incertidumbre y con características de desempeño perfectamente definidas. Los RMP secundarios como el Designated Comparison Method para HDL-Col, son razonablemente estables, confiables y, sobre todo, relativamente fáciles de transferir a otros laboratorios de referencia. Están, la mayoría de las veces, relacionados directamente a los primarios mediante procedimientos de validación, de modo de tener una jerarquía de métodos más accesible, menos demandante de trabajo y menos costosa. Para HDL-Col no es posible establecer un método primario en cuyo caso se establece como método de máxima jerarquía al secundario.
3. En tercer término, se necesita un medio para transferir la exactitud de los métodos de jerarquía superior a los laboratorios clínicos, lo que equivale a establecer una cadena de trazabilidad usando materiales conmutables, es decir que tengan un comportamiento analítico lo más parecido a las muestras de pacientes.

Definimos a un sistema analítico como aquel sistema de medida compuesto por:

1. El instrumento de medida
2. El método analítico:
  - a. reactivo (composición, fundamento de la reacción, principio activo),
  - b. calibrador y sistema de calibración (matriz, valor asignado, trazabilidad metrológica, conmutabilidad),
  - c. sistema de control interno y externo,
  - d. características metrológicas (temperatura y longitud de onda de medida, condiciones medioambientales, largo de corrida

analítica, interferencias, linealidad, límite del blando, de detección y cuantificación, etc.)

### 3. El operador

Los sistemas analíticos comerciales que dispone el laboratorio clínico suelen ser abiertos o heterogéneos o bien cerrados u homogéneos según este compuesto de partes de diferentes proveedores o de uno mismo respectivamente. En los primeros pueden ocurrir fenómenos de falta de conmutabilidad de los calibradores y controles, la validación de los componentes no siempre es aplicable al sistema en su conjunto. Los sistemas cerrados u homogéneos son previamente validados por el fabricante en todos sus componentes, aunque no necesariamente siempre se puede acceder a la información sobre la trazabilidad de los valores asignados al calibrador o la certificación de los métodos.

El trabajo tiene por objetivos la evaluación y estandarización de los métodos comerciales con material de referencia certificado.

Se estudiaron 32 sistemas analíticos de la región de La Plata, Berisso y Ensenada de la Provincia de Buenos Aires.

Se los proveyó de 13 crioviales conteniendo 1.2 ml de suero humano congelado cada uno con valor de referencia asignado para HDL-Col por el DCM/HDL-Col en 4 niveles de concentración producidos y evaluados en el laboratorio de Referencia y Estandarización en Bioquímica Clínica (LARESBIC).

Los laboratorios procesaron los sueros durante 3 días por triplicado tomando un vial de cada uno de los niveles de concentración. El vial numero 13 corresponde a un calibrador para HDL-Col con las mismas características que el resto de las muestras.

Con los datos informados se les pidió información de las características metrológicas del sistema analítico usado:

- Método según sea con separación de sobrenadante o en una única fase:
  - Precipitación previa (PP) y precipitante de uso, o

- Homogéneo (H) en una única fase.
- Calibrador:
  - Matriz no proteica (NP).
  - Matriz proteica (P).
- Equipamiento de medición:
  - Espectrofotometría manual (EM).
  - Espectrofotometría con autoanalizador automático (AA).

Se halló diferencias analíticas de resultados en la medida entre los métodos de PP y los H que se manifiestan en un marcado error de tipo mixto, combinación de error sistemático proporcional y contante. La causa probable de estos en referencia a errores sistemáticos es la deficiencia en la calibración de las mediciones, hecho que se ve fundamentalmente cuando los primeros se los calibra con calibradores NP (falta de conmutabilidad, falta de trazabilidad al valor asignado, valor asignado correcto, pero no aplicable). El error constante es básicamente producto de las inespecificidades que pueden ser atribuibles a problemas instrumentales o a la falta de conmutabilidad de los calibradores P de los cuales es difícil obtener información de los fabricantes o a propias de los principios activos de las reacciones. Cuando se enfrentan estos sistemas con material de referencia como el suero humano congelado libre de interferentes es cuando se hacen notorias estas diferencias.

El error mixto para todos los sistemas analíticos se presentó más marcado en los métodos con PP que en los H lo que influye en el ES % con valores significativamente menores para H que para PP

Respecto al CV no hay diferencias significativas entre los diferentes métodos.

Por diferentes razones la implementación del calibrador para estandarizar no pudo ser aplicable a los laboratorios. Por ese motivo, se analizaron los datos de modo de evaluar distintas alternativas que mediante un reajuste de datos permitieran emplear una estrategia diferente para lograr el objetivo de mejorar la estandarización. Dicha estandarización se llevó a cabo usando las

mismas muestras tomando como puntos de referencia para la recalibración los valores de corte de HDL-Col para el diagnóstico de dislipémia, De ese modo se estableció una relación lineal para cada sistema analítico, se corrigieron los datos y se evaluó cambios en el error sistemático del procedimiento.

Se notó cambios significativos en la mayoría de los sistemas a los que se les aplicó la corrección mejorando parámetros de inespecificidad, calibración y error sistemático

Prospectivamente se ve a nivel nacional que hay un lento proceso de cambio de tecnología en los laboratorios a favor del reemplazo de los métodos de PP por los H de mejor y fácil desempeño.

Se recomienda a los laboratorios clínicos:

1. Ir a favor de la tendencia de cambiar los procedimientos analíticos con separación mediante precipitación previa por los métodos homogéneos que son totalmente automatizables, en una única fase.
2. Usar calibradores en base sérica con valor asignado trazable a la mayor jerarquía analítica de la cadena de trazabilidad metrológica disponible.
3. Tener un sistema de evaluación externa de la calidad y de un control de calidad interno con características adecuadas para el laboratorio.
4. Validar o verificar los resultados emitidos de acuerdo con los criterios de aceptabilidad consensuados internacionalmente cuando los sistemas de control indiquen que se requiera hacerlo

## Índice de abreviaturas

ABCA1: ATP-Binding Cassette tipo A1.	CEL: Carboxil ester lipasa.
ABCG1: ATP-Binding Cassette tipo G1.	CETP: Cholesteryl ester transfer protein.
ABCG5/8: ATP-Binding Cassette tipo G5/8.	CL: Colesterol libre.
ACS: American Chemical Society	CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute.
AGL: ácido graso libre.	CRMLN: Cholesterol Reference Method Laboratory Network.
apoA: apolipoproteína A.	DCM/HDL-Col: Designated Comparison Method for HDL-Colesterol.
apoA1: apolipoproteína A tipo 1.	ECV: Enfermedad cardiovascular.
apoAII: polipoproteína A tipo 2.	EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.
apoB: apolipoproteína B.	FBA: Fundación Bioquímica Argentina.
apoB100: apolipoproteína B 100% de su expresión.	FXR: receptor farnesoide X.
apoB48: apolipoproteína B 48% de su expresión.	HDL: High density lipoprotein.
apoC: apolipoproteína C.	IDL: Intermediate density lipoprotein.
apoCII: apolipoproteína C tipo2.	LARESBI: Laboratorio de Referencia y Estandarización en Bioquímica Clínica.
ApoD: apolipoproteína D.	LCAT: Lecitin Colesterol acil transferasa.
apoE: apolipoproteína E.	LDL: Low density lipoprotein.
ATP: Adult Treatment Panel.	
CDC: Center for Disease Control and Prevention	
CE: colesterol esterificado.	

LDLr: receptor para LDL.

LIPC: Lipasa hepática.

LIPG: Lipasa endotelial.

LP: Lipasa pancreática.

LPL: Lipoproteín lipasa.

LRP1: Proteína-1- relacionada a Lipoproteína de baja densidad.

MTP: microsomal transfer protein.

NCEP: National Cholesterol Education Program.

NIST: National Institute of Standards and Technologies

NPC1L1: Niemann-Pick C1-Like1.

PEEC: Programa de Evaluación Externa de la Calidad.

PEG: Polietilenglicol.

PLTP: Phospholipid transfer protein.

Qm: Quilomicrones.

Qmr: Quilomicrones remanentes.

RMP: Reference Measurement Procedure.

SIU: Sistema Internacional de Unidades.

SNP: Single Nucleotide Polymorphism.

SR-B1: Scavenger receptor tipo B1.

SRM911b: Standard Reference Material 911b.

TRC: transporte reverso del colesterol

VIM: Vocabulario Internacional de Medidas

VLDL: Very low density lipoprotein.

VLDLr: receptor para VLDL.

VR: Valor de referencia.

VO: Valor obtenido

PP: precipitación previa

H: homogéneo

P: proteico

NP: no proteico

CCI: Control de calidad interno

CCE: Control de calidad externo

## **Lista de figuras, tablas y gráficos**

### **Figuras**

Figura 1: Estructura general de las lipoproteínas

Figura 2: Movimiento de lípidos: vías exógena y endógena

Figura 3: Transporte reverso de colesterol

Figura 4: Apolipoproteína A1(apoa1). Estructura cuaternaria

Figura 5: Reacción catalizada por la enzima Lecitin colesterol acil transferasa (LCAT)

Figura 6: Síntesis de sales biliares

Figura 7: Cadena de trazabilidad completa hasta la más alta jerarquía analítica según ISO 17511:2003: In vitro diagnostic medical devices — Measurement of quantities in biological samples — Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials

### **Tablas**

Tabla I: Principales lipoproteínas plasmáticas en humanos

Tabla II: Composición de las HDLs más frecuentes en plasma humano

Tabla III: Niveles séricos de colesterol y lipoproteínas después de 12 Hs de ayuno

Tabla IV: Criterios de desempeño analítico para lípidos y lipoproteínas en laboratorios clínicos según NCEP

Tabla V: Sistemas de trazabilidad para los lípidos y lipoproteínas establecidos por el NCEP

Tabla VI: Procedimientos analíticos homogéneos de tercera generación disponibles en Argentina para HDL-Col

Tabla VII: Descripción del material de referencia distribuido

Tabla VIII: Descripción de los Sistemas analíticos estudiados

Tabla IX: Criterios de aceptabilidad para el mensurando HDL-Col según NCEP

Tabla. X: Coeficientes de regresión lineal para VO vs. VR (todos los métodos)

Tabla. XI: Análisis de Varianza para VO vs. VR (todos los métodos)

Tabla XII: Coeficientes de regresión lineal para VO\_PP vs. VR\_PP

Tabla XIII: Análisis de Varianza para VO\_PP vs. VR\_PP

Tabla XIV: Coeficientes de regresión lineal para VO\_H vs. VR\_H

Tabla XV: Análisis de Varianza para VO\_H vs. VR\_H

Tabla XVI: Análisis de Regresión Múltiple para métodos PP y H

Tabla XVII: Coeficientes para comparación de regresión múltiple para métodos PP y H

Tabla XVIII: Análisis de Varianza para comparación de regresión múltiple para métodos PP y H

Tabla XIX: ANOVA Adicional para Variables Según el Orden de Introducción para comparación de regresión lineal para métodos PP y H

Tabla XX: Estadísticos de grupo: Test de Student para los parámetros de desempeño según los diferentes métodos:

Tabla XXI: Prueba de muestras independientes para los parámetros de desempeño según los diferentes métodos:

Tabla XXII: Análisis de Regresión Múltiple para calibrador NP y P

Tabla XXIII: Coeficientes para calibrador NP y P

Tabla XXIV: Análisis de Varianza para calibrador NP y P

Tabla XXV: ANOVA Adicional para Variables Según el Orden de Introducción para calibrador NP y P

Tabla XXVI: Estadísticos de grupo: Test de Student para los parámetros de desempeño según los diferentes calibradores NP y P

Tabla XXVII: Test de muestras independientes para los parámetros de desempeño según los diferentes calibradores NP y P

Tabla XXVIII: Frecuencias para Calibradores por Métodos:

Tabla XXIX: Análisis de Regresión Múltiple para procedimiento PP/NP vs. H/P

Tabla XXX: Coeficientes para procedimiento PP/NP vs. H/P

Tabla XXXI: Análisis de Varianza para procedimiento PP/NP vs. H/P

Tabla XXXII: ANOVA Adicional para Variables Según el Orden de Introducción para procedimiento PP/NP vs. H/P

Tabla XXXIII: Análisis de Regresión Múltiple para procedimiento PP/NP vs. PP/P

Tabla XXXIV: Coeficientes para procedimiento PP/NP vs. PP/P

Tabla XXXV: Análisis de Varianza para procedimiento PP/NP vs. PP/P

Tabla XXXVI: ANOVA Adicional para Variables Según el Orden de Introducción para procedimiento PP/NP vs. PP/P

Tabla XXXVII: Análisis de Regresión Múltiple para procedimiento PP/P vs. PP/H

Tabla XXXVIII: Coeficientes para procedimiento PP/P vs. PP/H

Tabla XXXIX: Análisis de Varianza para procedimiento PP/P vs. PP/H

Tabla XL: ANOVA Adicional para Variables Según el Orden de Introducción para procedimiento PP/P vs. PP/H

Tabla XLI: Análisis de comparación de regresión múltiple para PP/P vs. H/P , PP/NP vs. PP/P y PP/P vs. H/P

Tabla XLII: Test de Student prueba para una muestra para diferencia de los valores de consenso vs. VR: 37.5 mg/dl

Tabla XLIII: Test de Student prueba para una muestra para diferencia de los valores de consenso vs. VR: 50.6 mg/dl

Tabla XLIV: Test de Student prueba para una muestra para diferencia de los valores de consenso vs. VR: 61.5 mg/dl

Tabla XLV: Test de Student prueba para una muestra para diferencia de los valores de consenso vs. VR: 72.8 mg/dl

Tabla XLVI: Resumen Estadístico para CV\_prom

Tabla XLVII: ANOVA para CV\_prom por Met PP vs. H

**Gráficos:**

Gráfico 1: Regresión lineal VR [mg/dl] vs. VO [mg/dl] (todos los métodos)

Gráfico 2: Residuos estudentizados para VO vs. VR (todos los métodos)

Gráfico 3: Regresión lineal para VO\_PP [mg/dl] vs. VR\_PP [mg/dl]

Gráfico 4: Residuos estudentizados para VO\_PP vs. VR\_PP

Gráfico 5: Regresión lineal para VO\_H [mg/dl] vs. VR\_H [mg/dl]

Gráfico 6: Residuos estudentizados para VO\_H vs. VR\_H

Gráfico 7: regresión lineal múltiple ajustado para VO [ mg/dl] vs. VR [ mg/dl] para los métodos PP (precipitación previa) y H (homogéneo)

Gráfico 8: Gráfico de Caja y Bigotes para el ES (%) para los métodos PP y H

Gráfico 9: Regresión lineal múltiple para VO [mg/dl] vs. VR [mg/dl] para calibrador P (proteico) y NP (no proteico)

Gráfico 10: Diagrama de barras para calibrador según método

Gráfico 11: Gráfico de mosaico para calibrador según método

Gráfico 12: Regresión Lineal Múltiple Ajustado VO[mg/dl] vs, VR[mg/dl] para: Met: PP y Cal: NP,/Met:: H y Cal: P

Gráfico 13: Regresión Lineal Múltiple Ajustado VO[mg/dl] vs, VR[mg/dl] para: Met: PP y Cal: NP,/ Met:PP y Cal: P

Gráfico 14: Regresión Lineal Múltiple Ajustado VO[mg] vs, VR[mg%]para: Met: PP y Cal: P,/Met:H y Cal: P

Gráfico 15: Gráfico de Youden para nivel 37.5 (mg/dl) vs. 50.6 (mg/dl)

Gráfico 16: Gráfico de Youden para nivel 37.5 (mg/dl) vs. 61.5 (mg/dl)

Gráfico 17: Gráfico de Youden para nivel 61.5 (mg/dl) vs. 72.8 (mg/dl)

Gráfico 18: Gráfico de Youden para nivel 50.6 (mg/dl) vs. 61.5 (mg/dl)

Gráfico 19: Gráfico de Youden para nivel 50.6 (mg/dl) vs. 72.8 (mg/dl)

Gráfico 20: Diagrama de cajas y bigotes para la distribución del CV

Gráfico 21: Dispersión por método según PP y H

Gráfico 22: Distribución de sistemas analíticos entre los laboratorios (todo el país)

Gráfico 23: Variación en el número de métodos en los últimos 40 meses (todo el país)

Gráfico 24: Distribución de métodos en los últimos 4 años (todo el país)

## Contenido

<b>Dedicatoria</b>	I
<b>Agradecimientos</b>	II
<b>Resumen</b>	III
<b>Índice de abreviaturas</b>	VII
<b>Lista de figuras, tablas y gráficos</b>	IX
<b>1) Introducción</b>	1
<b>a) Fisiología: Movimiento y transporte de lípidos</b>	
Movimiento de lípidos: vías exógena y endógena	5
Transporte reverso de colesterol (TRC):	10
Eflujo de colesterol	12
Por difusión acuosa	13
Mediado por transportadores ABCA1	14
Mediado por el transportador ABCG1	15
Mediado por el receptor Scavenger Receptor class B type I (SR-BI):	15
Producción endógena de apoE:	15
Maduración y remodelación de las HDL	16

Toma hepática y eliminación de colesterol	17
<b>b) Importancia de la medida de lípidos y lipoproteínas</b>	
	19
Consideraciones analíticas	22
Métodos de determinación analítica de HDL	27
Ultracentrifugación	27
Designated Comparison Method for HDL	27
Electroforesis	29
Métodos de primera generación: Precipitación química	29
Métodos de segunda generación	30
Métodos de tercera generación. Los ensayos homogéneos	30
Efecto matriz y conmutabilidad de las muestras y materiales de referencia	32
<b>2. Objetivos</b>	34
<b>3. Materiales y métodos</b>	36
<b>4. Resultados</b>	45
<b>5. Discusión y conclusiones</b>	79
<b>6. Bibliografía</b>	86

## **1. Introducción**

Los lípidos son un grupo heterogéneo de biomoléculas desde el punto de vista de su composición química como también de su función en el hombre, teniendo como única particularidad entre ellos la propiedad química de ser pobremente solubles en medio acuoso.

Puede encontrárselos tanto en medios intra como extracelular lo que los hace un grupo muy particular de estudio ya que ambos medios son extremadamente acuosos. Es un desafío para la evolución el manejo de este tipo de compuesto bien sea para su metabolismo como para su transporte intracelular, extracelular y entre órganos de organismo tan complejos como en el hombre.

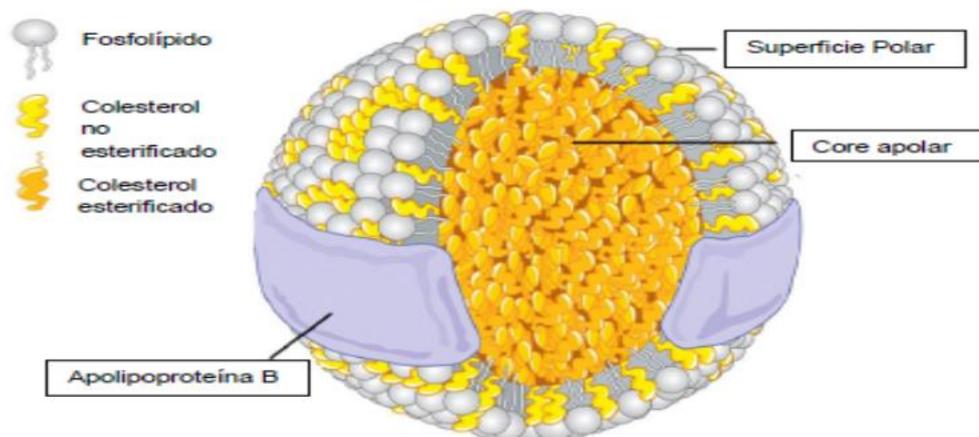
Las células usan los lípidos para el almacenamiento y obtención de energía, siendo particularmente importante para este fin los ácidos grasos oxidados en las mitocondrias. Su forma de almacenamiento y transporte son los triglicéridos. Los ácidos grasos son, además, precursores de los fosfolípidos que junto al colesterol (otro lípido derivado del ciclopentanoperhidrofenantreno) son parte fundamental en la constitución de las membranas celulares. El colesterol es precursor de hormonas esteroideas (estradiol, testosterona) de la vitamina D, de los ácidos biliares y las proteínas modificadas como las *hedgehog*. Los precursores del colesterol son a la vez precursores de vitaminas liposolubles (A, E, K), del grupo HEM de la hemoglobina, mioglobina, clorofila y citocromos, también precursoras de los lípidos anclados a proteínas como los complejos Ras membranares.

Salvo células especializadas, el mayor contenido de lípidos de las células se encuentra en las membranas. En los organismos pluricelulares, particularmente en mamíferos, los lípidos de la célula tienen dos orígenes, la síntesis en la misma célula o la toma de lípidos de otros órganos ya sean de depósito o provenientes de la dieta. En el primer caso, se requiere poner en marcha la maquinaria metabólica y un intrincado sistema de transporte para mover lípidos en un medio acuoso como el citosol hacia la membrana o los sitios donde serán usado metabólicamente; estos procesos son, en general, consumidores de energía. En el segundo caso, son tomados de la circulación, se requiere el movimiento de lípidos entre órganos, usando como vía de transporte un medio altamente hidrofílico como el plasma sanguíneo. En este

proceso el consumo de energía es siempre menor que aquel que emplearía la célula si tuviera que sintetizarlo.

Para facilitar la transferencia de lípidos entre células, los animales han desarrollado un sistema eficiente de transportadores que consiste en macromoléculas complejas formadas básicamente por lípidos (colesterol libre y conjugado, triglicéridos, fosfolípidos), compuestos liposolubles como la vitamina E o carotenos y una o varias proteínas denominadas apolipoproteína. El complejo macromolecular de lípidos y proteínas se las denominada **lipoproteínas** que permite moverlos entre órganos y células a través de un medio fuertemente hidrofílico como el plasma sanguíneo y el espacio extracelular. Todas las lipoproteínas tienen estructura similar (Fig.1), constituida por una coraza donde se encuentran las apolipoproteínas, el colesterol libre y los fosfolípidos formando una monocapa hidrofílica y un centro o *core* donde se agrupan los compuestos lipofílicos dándole a la macromolécula un aspecto característico de esfera.

Figura 1: Estructura general de las lipoproteínas



**Modelo de Lipoproteína:** En este caso se muestra a modo de ejemplo la LDL-Col, todas las demás tienen la misma estructura general. Una coraza anfipática dando una superficie polar compuesta por una monocapa de fosfolípidos colesterol y proteínas y un core apolar compuesto en su mayoría por colesterol esterificado o triglicéridos o ambos también puede haber cantidades mínimas de lípidos neutros (ej. vitaminas liposolubles). Este modelo de LDL-Col está basado en microscopía electrónica y otros métodos biofísicos de baja resolución. La Ldl-Col es la única lipoproteína que contiene una única copia de apolipoproteína, en este caso apoB que parece abrazar a la lipoproteína en su parte exterior. Adaptado de M. Krieger, 1995, en E Haber, ed. *Molecular Cardiovascular Medicine, Scientific American Medicine*, pp. 31-47

Las lipoproteínas se pueden clasificar por su capacidad de ser separadas entre sí por diferencia de densidad de flotación cuando se las somete a ultracentrifugación en gradiente salino debido a su contenido relativo entre proteínas y lípidos en cuatro grupos o familias. Valiéndose de esta propiedad tres de ellas se las conoce como **high density lipoprotein (HDL)**, **low density lipoprotein (LDL)** y **very low density lipoprotein (VLDL)** a medida que la relación proteína/masa de lípidos disminuye. El cuarto grupo corresponde a los **quilomicrones (Qm)** que es el menos denso. Cada lipoproteína tiene apolipoproteínas, composición de lípidos, tamaño y función distintivos (Tabla: I)

En líneas generales, las VLDL y los quilomicrones transportan fundamentalmente triglicéridos y son mucho más grandes que las HDL y LDL que transportan colesterol esterificado y de menor tamaño. Entre las VLDL y las LDL puede describirse una familia de lipoproteínas conocida como IDL de características intermedias entre ambas.

<b>Tabla: I. Principales lipoproteínas plasmáticas en humanos</b>				
Propiedad	Quilomicrón	VLDL	LDL	HDL
Masa aprox. (KDa)	50-1000 x 10 <sup>3</sup>	10-80 x 10 <sup>3</sup>	2.3 x 10 <sup>3</sup>	0.175-0.360 x 10 <sup>3</sup>
Diámetro (nm)	75-1200	30-80	18-25	5-12
TG (%de los lípidos del core)	97	75	12	11
CE (%de los lípidos del core)	3	25	88	89
Relación: Proteína/masa de lípido	1:100	9:100	25:100	90/100
Apolipoproteínas principal.	A,B-48, C, E	B-100, C, E	B-100	A, C
TG: triglicéridos, CE: colesterol esterificado, KDa: Kilodaltons, nm: nanómetros				

Las apolipoproteínas organizan la estructura de la partícula lipoproteica y determinan su interacción con una variedad de enzimas y receptores cuyo

resultado final es el transporte de los lípidos en el plasma y su transferencia hacia o desde las células. La forma en que esto se produce se puede separar, con fines prácticos, en 2 procesos:

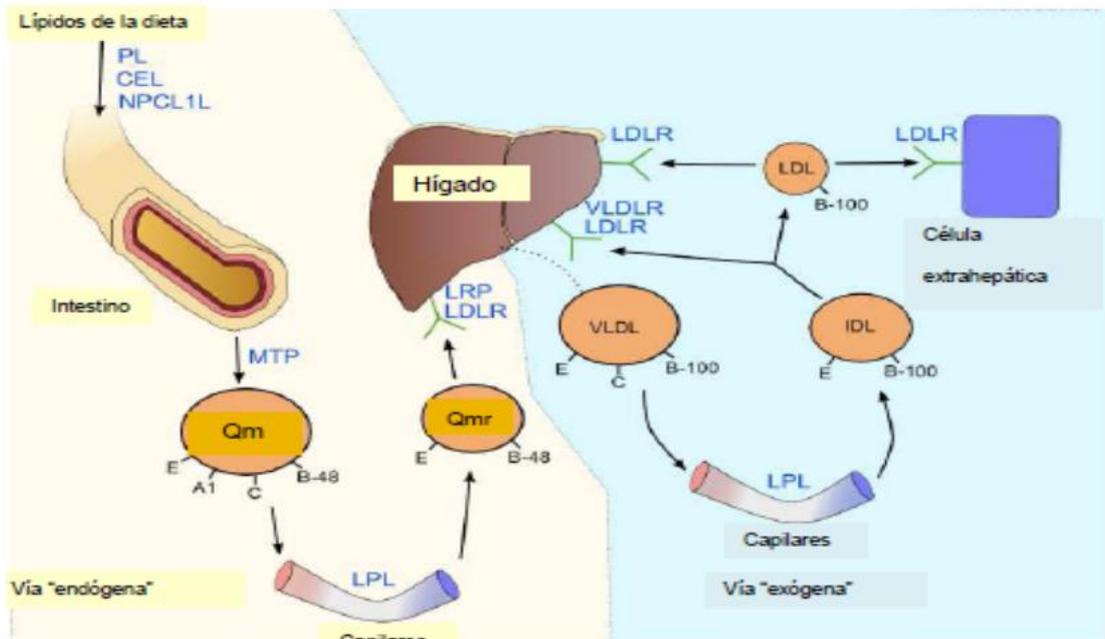
- Movimiento de lípidos exógenos y endógenos.
- Transporte reverso de colesterol.

### **Movimiento de lípidos: vías exógena y endógena**

Ambos procesos (Fig.2) se desarrollan simultáneamente prevaleciendo uno u otro de acuerdo al estado metabólico, nutricional y los requerimientos del individuo.

Con “movimiento de lípidos exógenos” nos referimos a aquellos lípidos provenientes de la dieta que son absorbidos en el intestino. La digestión temprana desde la cavidad oral hasta el duodeno produce, en término de lípidos, una emulsión cruda de colesterol libre (no esterificado), triglicéridos, ácidos grasos libres y fosfolípidos. En el intestino esta emulsión se mezcla con los ácidos biliares sintetizados en el hígado y secretadas por la vesícula biliar para dar micelas<sup>1</sup>. Los triglicéridos y el colesterol esterificado son hidrolizados por la Lipasa pancreática (LP) <sup>2</sup> y la Carboxilester lipasa (CEL) respectivamente. Modelos *in vivo* con ratones *knockout* confirman la necesidad de ambas enzimas para la absorción normal de colesterol y la posterior formación de quilomicrones<sup>3</sup>.

**Figura 2: Movimiento de lípidos: vías exógena y endógena**



PL: Fosfolípidos, CEL: Colesterol Libre, MTP: microsomal triglyceride transfer protein, LPL: Lipoproteínas lipasa, LRP: Lipoproteína relacionada. VLDLr: Receptor para VLDL. LDLr: Receptor para LDL. Qmr: Quílomicron remanente.

El pasaje de colesterol en la luz intestinal desde el borde en cepillo del yeyuno al enterocito es el mecanismo principal de la entrada de colesterol de la dieta y de la bilis desde la luz intestinal al organismo.

El proceso de absorción comprende tres pasos<sup>4,5</sup>. La primera es una fase intraluminal que deriva en la formación de micelas conteniendo esteroides y otros lípidos y su contacto con el borde en cepillo del yeyuno. La segunda fase comprende la participación de la proteína Niemann-Pick C1-Like1 (NPC1L1)<sup>6</sup> distribuida en el borde en cepillo del yeyuno siguiendo, en general, un patrón que corre paralelo con el patrón de absorción máximo de colesterol<sup>7</sup>. La proteína NPC1L1 es el blanco de acción de la droga *ezetimibe* que inhibe la absorción de esteroides sin afectar la absorción de otras moléculas ni la síntesis *de novo* del colesterol. Mutaciones espontáneas en el gen de la proteína NPC1L1 de humanos llevan a una menor absorción de colesterol intestinal y una reducción en los niveles de LDL circulantes<sup>8</sup>.

La proteína transportadora ATP binding cassette G5 a G8 (ABCG5/8) es un regulador negativo en el transporte al interior del enterocito ATP-binding cassette (ABC) G5 (ABCG5) y G8 (ABCG8) forman un heterodímero obligado que limitan la absorción intestinal y facilitan la secreción biliar de colesterol y fitoesteroles. De acuerdo a su función, ABCG5 y ABCG8 se localizan en la membrana apical del enterocito y hepatocito. El receptor hepático X es el regulador de expresión positiva más importante de ABCG5 y ABCG8. Mutaciones en cualquiera de los dos genes derivan en sitosterolemia, una condición en la cual el colesterol y los esteroides de origen vegetal (campesterol, estigmasterol, etc.) son absorbidos e incrementan sus niveles séricos con aterosclerosis prematura<sup>9, 10</sup>. El mecanismo propuesto es que el receptor ABCG5/8 expulsa colesterol hacia el espacio luminal, caso contrario se acumulan en circulación llevando al ECV prematura. La sobreexpresión de ABCG5 y ABCG8 en ratones retarda la aterosclerosis inducida por dieta por reducción del colesterol circulante y hepático devolviéndolo al lumen intestinal junto con los fitoesteroides en personas normales<sup>11</sup>.

El tercer paso en la absorción es la fase intracelular que comprende múltiples eventos como la reesterificación y la incorporación junto con otros lípidos y las apoB48 para dar Qm nacientes<sup>12,13,14</sup>. El colesterol es reesterificado en un proceso catalizado por la Colesterol transferasa citoplasmática<sup>15</sup>, los triglicéridos son formados por la esterificación de los ácidos grasos libres sobre los mono y diglicéridos catalizado por la Mono y Diacilglicerol aciltransferasa<sup>16</sup>. En el retículo endoplasmático, el CE, los TG y los fosfolípidos (FL) son ensamblados con la apolipoproteína apoB48 análogo de la apolipoproteína apoB100 hepática y constituyente fundamental de la VLDL. Durante la síntesis de quilomicrones en el enterocito el RNAm de apoB es modificado enzimáticamente en el nucleótido número 6666 transformándolo en un codón de terminación UAA dando una apoB truncada que es el 48% de la apoB total que se puede encontrar en el hígado denominada apoB100<sup>17</sup>.

El ensamble de la apoB48 el CE y los TG es mediado por la proteína microsomal transferidora de triglicéridos (MTP: microsomal triglyceride transfer protein)<sup>18</sup>, los quilomicrones así nacientes maduran en el Golgi donde se le

agregan TG y son transportados a la membrana mediante vesículas para ser expulsados por un sistema de clatrininas/coated pit<sup>19</sup>.

Los Qm terminan de madurar en el pasaje desde el conducto torácico a la circulación cuando suman a su estructura las apoCII y apoE que les son cedidas por las HDL en circulación. Particularmente importante para la modificación de los Qm en circulación, es la apoCII que es el principal activador de la Lipoproteína lipasa (LPL) anclada al endotelio vascular de los capilares del tejido adiposo y muscular donde se expresa diferencialmente de acuerdo al estado de ayuno del individuo<sup>20</sup>. La LPL cataliza la hidrólisis de los TG liberando AGL al plasma para ser tomados por los tejidos que los requieren. Los Qm de esta manera son transformados hasta que la pérdida de su estructura hace ceder la apoCII y la posibilidad de seguir catalizando la reacción, a partir de este momento los Qm pasan a ser quilomicrones remanentes (Qmr). La deficiencia familiar de LPL provoca una acumulación masiva de TG plasmáticos y un descenso de HDL y LDL<sup>21</sup>

Los Qmr están enriquecidos en apoE principal ligando del receptor en el hígado para la internalización de los mismos en el hepatocito. La interacción es compleja e intervienen moléculas de heparán sulfato/proteoglicanos relacionados a la enzima análoga de la LPL en el hígado conocida como Lipasa hepática (LIPC). A esto le sigue la endocitosis mediada por el receptor para las LDL (LDLr) más una proteína-1-relacionada a lipoproteínas de baja densidad (LRP1)<sup>22</sup>. El contenido de colesterol de los Qmr influiría en la capacidad del hepatocito de tomarlo de circulación, cuanto menos colesterol tenga la macromolécula menor sería la eficiencia de la toma hepática, asumiéndose que el colesterol es importante para mantener la conformación estructural necesaria para que la apoE interaccione. Los TG y el CE son hidrolizados en el citoplasma del hepatocito para una eventual formación de VLDL.

Con el término “movimiento endógeno de lípidos” se entiende básicamente al movimiento de los lípidos formados en el hígado que son ensamblados en el mismo en las lipoproteínas correspondientes para ser distribuidos a los órganos que los necesitan o almacenan.

Las VLDL son ensambladas en el retículo endoplasmático rugoso del hepatocito con la traslación de las apoB100 desde los ribosomas al citoplasma, donde la MTP le acopla pequeñas cantidades de TG, FL y CE necesaria como para formar un *core* hidrofóbico que por enriquecimiento en TG lleva a la formación de la macromolécula precursora de las VLDL conocida como VLDL2 que termina su maduración en el Golgi por el agregado sucesivo de más lípidos, fundamentalmente TG, momentáneamente almacenados como gotas en el citoplasma del hepatocito. Se sugiere, que la cantidad de TG sea el limitante para la velocidad de formación de las VLDL.

Tal como ocurre con los Qm, las VLDL captan en circulación las apoCII y apoE cedidas por las HDL y comienzan el proceso de transformación cediendo AGL a los tejidos mediante la acción de la LPL activada por la apoCII. Cuando la extracción de TG es de suficiente magnitud como para desestabilizar la macromolécula esta pierde apoCII y la capacidad de seguir siendo modificada. En este punto pasa a formar parte de otra familia de lipoproteínas conocidas como IDL estas tienen 2 vías de transformación, o son tomadas por el hígado o bien siguen siendo modificadas por lipasas hepáticas para dar LDL. La toma hepática de las IDL incluye una serie de receptores como LDLr, LRP1 y también VLDLr (receptor para VLDL)<sup>23</sup>. El contenido de TG de las IDL define el curso que siguen estas macromoléculas, de forma tal que las, más enriquecidas serían retomadas por el hígado en tanto que las empobrecidas seguirían la vía de formación de LDL<sup>24</sup>

Ya se describió la función y el efecto de la apoCII en las diferentes lipoproteínas. Respecto a apoE en humanos, tienen 2 SNPs muy comunes en los aminoácidos de posición 112 y 158 dando 3 genotipos apoE2, apoE3 y apoE4. La composición genotípica del individuo determina cual es la relación entre la cantidad de VLDL, IDL, LDL y HDL. La apoE4 está relacionada con una disminución en HDL y un aumento de LDL mientras que para la apoE2 es a la inversa<sup>25,26</sup>. En el modelo de ratón *knockout* para apoE, se llegan a tener valores de colesterol plasmático de hasta 500% mayores respecto al wild type<sup>27</sup>. La posible explicación de esto es la pérdida total de la capacidad de los Qm y las LDL de ser depuradas del plasma al no poder interactuar con los receptores<sup>28</sup>.

## **Transporte reverso de colesterol (TRC):**

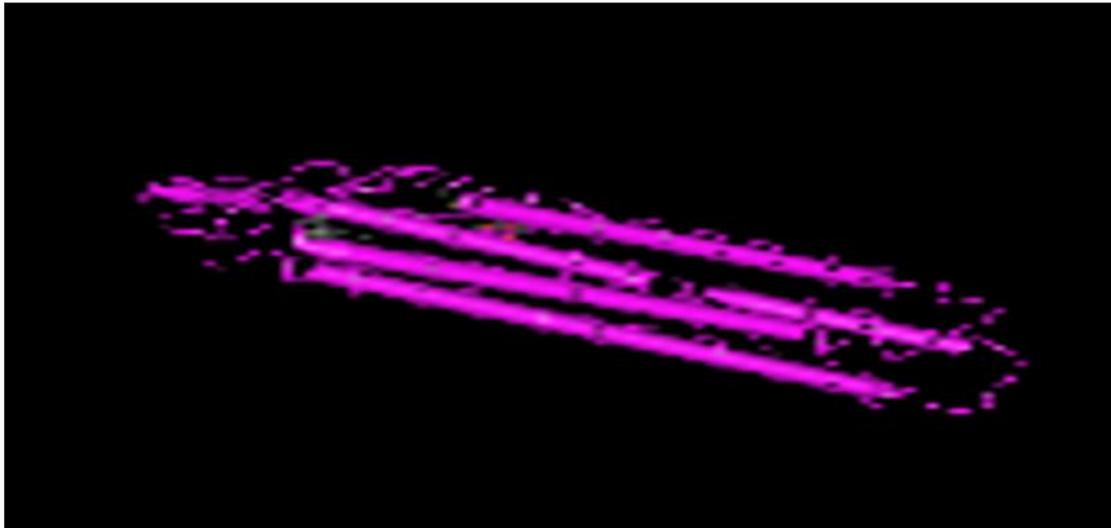
A los fines del presente trabajo, esta fase del movimiento plasmático de lípidos tiene particular interés ya que comprende la participación directa de las HDL.

En líneas generales las HDL transportan el exceso de colesterol de los tejidos (Fig.3) al hígado donde es eliminado en forma de sales biliares. Por esta capacidad se le ha atribuido a las HDL su carácter antiaterogénico. Otras propiedades atribuibles a su composición y/o función son las de ser antioxidantes, antiinflamatorias, promotoras de actividad de Óxido nítrico y tener la habilidad de transportar proteínas con actividad biológica intrínseca propia<sup>29</sup>

El principal componente proteico de las HDL es la apoAI (Fig: 4),. La estructura secundaria de apoAI posee 10  $\alpha$ -hélices anfipáticas. Se observó tres péptidos apoAI envuelven a la partícula formando una estructura tipo caja tridimensional (trefoil) en sentido antiparalelo como un doble anillo (double-belt)<sup>30, 31</sup>. Funcionalmente; la apoAI forma la estructura inicial de las HDL que se conoce como HDL "discoidal" por su forma característica, que difiere de la forma esférica típica de las HDL maduras y de las demás lipoproteínas. Es, además, reconocida por varias enzimas que tienen su acción catalítica sobre los componentes de las HDL, fundamentalmente la Lecitin colesterol acil transferasa



**Figura 4: apolipoproteína A1(apoa1). Estructura cuaternaria**



Como al resto de las lipoproteínas, a las HDL no se la considera únicas desde el punto de vista de su estructura, debido a la gran variedad en la cantidad de lípidos lo que genera su alto grado de heterogeneidad y polidispersidad. La Tabla II resume las principales HDLs plasmáticas en humanos y su nomenclatura según Rosenson RS & Col<sup>36</sup>.

<b>Tabla II: Composición de las HDLs más frecuentes en plasma humano</b>							
					HDL-VS		
	HDL-VL (HDL <sub>2b</sub> ) *	HDL-L (HDL <sub>2a</sub> ) *	HDL-M (HDL <sub>3a</sub> ) *	HDL-S (HDL <sub>3b</sub> ) *	HDL <sub>3c</sub> *	pre- β- HD L	apoA I libre
Densidad, g/ml	1063- 1090	1090- 1120	1120- 1150	1150- 1180	1180- 1210	x	x
Composición %							
TG	4	4	3	2	1	0	0
CL	4	3	2	1	0,1	0,1	0
CE	29	27	25	23	17	0	0
FL	30	33	29	24	16	16	0
Proteínas	33	34	41	50	66	84	100
Apolipoproteínas							
apoA1 mol/mol HDL	3,6	4,1	4,4	3,7	3	1	1
apoAII mol/mol HDL	0,8	1,1	1,4	1	0,4	0	0
Otras	apoC, apoD, apoE		apoC, apoD			x	apoE
HDL-VL: very large HDL, HDL-L: large HDL, HDL-M: medium HDL, HDL-S: small HDL, TG: triglicéridos, CL: colesterol libre, CE: colesterol esterificado, FL: fosfolípidos							

Una pequeña porción de esfingosina 1- fosfato es transportada particularmente en las HDL-S y guarda una relación inversa respecto al contenido de apoE lo que estaría relacionado con el eflujo de colesterol asociado a la apoE. A medida que aumenta la relación entre esfingomielina y fosfatidilcolina disminuye la capacidad de activación de la LCAT demostrado en HDL reconstituidas<sup>37, 38, 39</sup>.

- El TRC comprende 3 pasos:
- Eflujo de colesterol libre (CL) de las células.
  - Maduración y remodelación de las HDL.
  - Toma hepática y eliminación de colesterol.

### **Eflujo de colesterol**

Se conoce como eflujo de colesterol a la salida de CL desde las células potencialmente aterogénicas de los tejidos periféricos hacia las HDL discoideas<sup>40</sup>, particularmente importante es cuando se extrae CL de los macrófagos endoteliales evitando la formación de células espumosas precursoras de aterogénesis<sup>41</sup>. Es el paso limitante en el TRC.

Se han descrito varias vías por la cual el exceso de colesterol es extraído de la célula espumosa<sup>42</sup>:

- Por difusión acuosa.
- Mediado por ABCA1.
- Mediado por ABCG1.
- Mediado por SR-BI.
- Producción endógena de apoE.

La contribución relativa de estos procesos al eflujo de colesterol de los macrófagos está determinada por el modelo usado. En el modelo de macrófagos peritoneales de ratón normal, el proceso de difusión acuosa es el predominante mientras que en el modelo de macrófagos humanos sobrecargados con colesterol, el mecanismo predominante es el de los transportadores ABC<sup>43</sup>

### **Por difusión acuosa**

El CL es extraído directamente de la membrana plasmática de la célula para quedar, transitoriamente, en el medio acuoso circundante. El paso limitante en este proceso es la desorción del CL. La velocidad de este proceso depende de la composición de fosfolípidos circundante en la membrana; esta aumentada cuantos más FL insaturados tenga y esta disminuida cuanto más esfingomielina tenga<sup>44</sup>. La toma del CL en el medio acuoso por las HDL se produce por colisión directa de ambas moléculas. En los seres humanos cualquier clase de HDL

(*large, médium o small*) es capaz de hacer este proceso ya que no es dependiente del tamaño<sup>45</sup>.

### **Mediado por transportadores ABCA1:**

En rigor de verdad el proceso no solo afecta al CL sino que incluye a los FL también. El eflujo es catalizado por el transportador de membrana ABCA1, la velocidad del proceso depende del número de transportadores que haya en la membrana (Fig: 3).

El aceptor de FL y CL son las pre- $\beta$ 1-HDL, según su movilidad electroforética en geles bidimensionales o bien HDL-VS, son complejos de apoA1 y FL<sup>46, 47</sup> con muy poca cantidad de colesterol según su composición. El complejo formado es internalizado en una vesícula endocítica<sup>48</sup>, la unión de ambas evita la degradación en la vesícula e incrementa la cantidad de ABCA1 en la membrana. Aparentemente, una combinación entre ABCA1 y la proteína Niemann-Pick C1 provocan la transferencia de los lípidos del citoplasma a la vesícula endocítica<sup>49</sup>. Una vez cargadas las HDL retornan a la membrana plasmática para ser expulsadas y disociadas de ABCA1. En plasma estas HDL cargadas de FL y sobre todo CL y se las conoce como pre- $\beta$ 2-HDL.

La importancia de la relación entre HDL y ABCA1 radica en que en el hombre con mutaciones para el transportador deriva en la rara enfermedad de Tangier, caracterizada por el aumento de tamaño de las amígdalas que toman un color anaranjado por la acumulación de esteres de colesterol. En general, la acumulación abarca varios tejidos y se manifiesta por neuropatía periférica y una tendencia aumentada a generar enfermedad coronaria; la causa es la pérdida de la capacidad de formar HDL<sup>50, 51</sup>. La enfermedad de Tangier no es la única mutación en ABCA1 que genera disminución en la cantidad de HDL circulante, ya que se ha encontrado que estas mutaciones son las responsables del 10% de los casos de pérdida de HDL en la población general<sup>52, 53</sup>.

En el apoA1 Milano Infusion Study<sup>54</sup> se logró una regresión de 10 mm en las placas ateromatosas de 36 pacientes a los que se les inyectó pre- $\beta$ -HDLs, si bien el número de población es muy reducido los resultados fueron confirmados por el Effect of rHDL on Atherosclerosis-Safety Trial and Efficacy (ERASE)<sup>55</sup> y el Selective Delipidation Trial<sup>56</sup>.

### **Mediado por el transportador ABCG1:**

El mecanismo de este transportador pasa por aumentar y reorganizar la cantidad de CL en la membrana plasmática para ser desorbido de forma más inmediata por las HDL al ser liberado al medio. Las HDL<sub>2</sub> más grandes (HDL-VL y HDL-L) son tan efectivas como las HDL<sub>3</sub> más chicas (HDL-M, HDL-S y HDL-VS) como aceptoras pero, a diferencia de ABCA1, no requiere la unión directa de la HDL al transportador<sup>57, 58, 59</sup>.

### **Mediado por el receptor Scavenger Receptor class B type I (SR-BI):**

SR-BI es una proteína integral de membrana de 82 KDa que medía el flujo de CE, CL y fosfolípidos en forma bidireccional desde el interior hidrofóbico de las HDL hacia el interior de la célula sin internalización de la lipoproteína. La internalización no es exclusiva para CE, vitaminas liposolubles como la E y carotenoides también tienen un mecanismo bidireccional de eflujo facilitado por el receptor<sup>60, 61</sup>

Si bien la deficiencia del transportador en médula ósea, particularmente en plaquetas, deriva en una rápida aterosclerosis es controversial su rol fisiológico en macrófagos endoteliales e inclusive *in vitro*. En cuanto a la función en hígado, esta es indirecta respecto a la aterosclerosis ya que modula cambios en la composición y en la estructura de las HDL<sup>62, 63,64,65,66,67,68,69,70</sup>.

Las HDL cargadas de colesterol interactúan con los SR-BI hepáticos a través de las apoA1, la internalización del colesterol se produce por el intercambio bidireccional a través de la membrana donde están anclados los transportadores, mecanismo que difiere de la endocitosis clásica, el producto final genera HDL deplecionadas en colesterol que retornan a la circulación (Fig.3)

### **Producción endógena de apoE:**

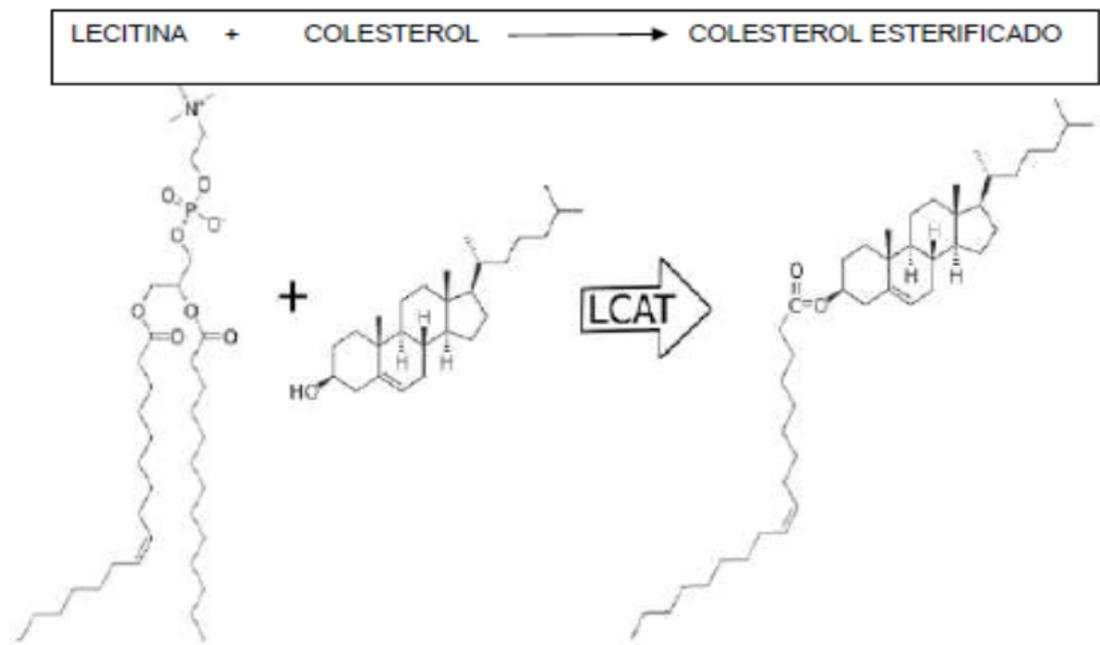
Las apoE son sintetizadas mayormente en macrófagos y en hepatocitos, y son excretadas de la célula como complejos empobrecidos de lipido-apoE. El eflujo de CL se hace por interacción con ABCA1 o bien con ABCG1. La LCAT es parte conformacional de las apoE-HDL ya que esterifica el CL para generar un *core* de lípidos estabilizado por la estructura de las apoE. De esta forma la macromolécula puede depositar el CE en hígado por la interacción de la apoE con el LDLr o el SR-BI<sup>71, 72</sup>

## Maduración y remodelación de las HDL.

Es un proceso catalizado por una serie de enzimas donde intervienen la enzima plasmática Lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT), la proteína transportadora de fosfolípidos (PLTP, de sus siglas en inglés: Phospholipid transfer protein) y una proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP de sus siglas en inglés: cholesteryl ester transfer protein).

La LCAT se sintetiza en hígado y cataliza en plasma un proceso en 2 pasos que consiste en clivar un ácido graso de la posición 2 de un FL para ser transferido al grupo 3- $\beta$ -hidroxilo del anillo A del colesterol para formar CE (Fig.5).

**Figura 5: Reacción catalizada por la enzima Lecitina colesterol acil transferasa**



El principal activador de la LCAT es la apoA1 y el principal sustrato son las HDL-VS y HDL-S transformándolas en las HDL con movilidad  $\alpha$  ( $\alpha$ HDL) esféricas y más grandes (HDL-M, HDL-L y HDL-VL) derivando en HDL más maduras. Existe la posibilidad que la transferencia puede hacerse a las LDL, la

presencia de apoA1 hace que el intercambio predomine en HDL<sup>73</sup>. El CE es hidrofóbico y se acumula en el centro de la lipoproteína dándole el aspecto de esfera característico de este tipo de macromolécula. Se estima que el paso es crucial para el eflujo de colesterol manteniendo un gradiente de colesterol para que queden libres pre- $\beta$ -HDL y puedan seguir extrayendo CL de las células (Fig. 3)

Para la remodelación de las HDL intervienen la CETP y la PLTP. La CETP es una glicoproteína plasmática que cataliza la transferencia de CE de las HDL a LDL y VLDL (Fig.3). Se sintetiza en hígado, se secreta a plasma y ejerce su acción unida a HDL<sup>74, 75</sup>.

La PLTP regula tanto el tamaño como la composición de HDL, se sintetiza en el hepatocito y en el adipocito y transfiere FL desde las apoBlipoproteínas a las HDL. El efecto es doble así mantiene un nivel aceptable de HDL maduras y promueve el eflujo de CL a pre- $\beta$ -HDL (Fig.3). También cataliza la fusión de 2 HDL3 para dar una HDL2 más grande y enriquecida en lípidos que provienen de deplecionar a las HDL2 que aumentan el pool circulante de pre- $\beta$ -HDL principal que es receptor de CL<sup>76</sup>

La Lipasa endotelial (LIPG) que pertenece a la familia de genes de la Lipoprotein lipasa, <sup>77</sup>es una fosfolipasa sintetizada principalmente por células del endotelio vascular y, en menor grado, por macrófagos y células de musculo liso. Hidroliza FL en las HDL en la posición 1 en un proceso de remodelación. En humanos, el contenido en masa de LIPG esta inversamente correlacionado con los niveles de HDL y directamente correlacionado con la probabilidad de aterosclerosis y de síndrome metabólico.

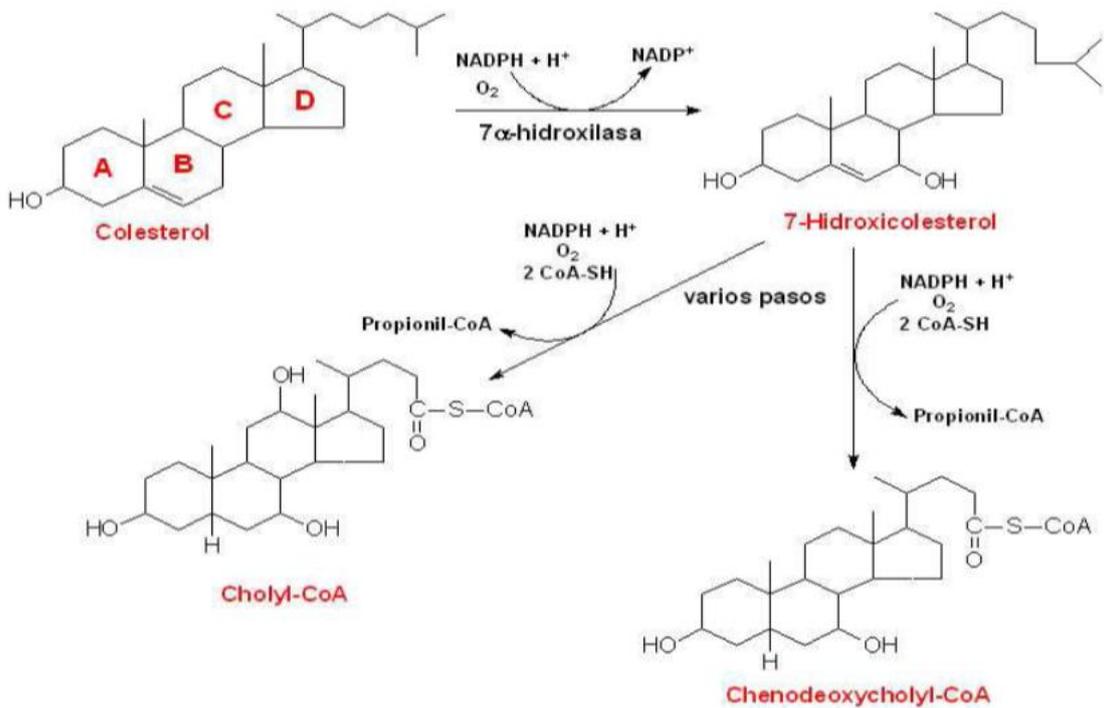
La Lipasa hepática o LIPC es sintetizada en hígado donde se une a la membrana de los sinusoides hepáticos por proteoglicanos. Tiene como efecto principal la conversión de las VLDL a LDL (Fig.2 y 3) y la conversión de las HDL de mayor tamaño ( $\alpha$ -HDL) a menor tamaño inclusive a pre- $\beta$ -HDL.

### **Toma hepática y eliminación de colesterol.**

La principal vía de ingreso de colesterol al hígado es por la entrada de apoB lipoproteínas mediada por los receptores VLDLr y LDLr habiendo hecho previamente una transformación de contenido y forma con las HDL, catalizado por la enzima CETP. La otra vía de entrada es mediada por el intercambio dual de los receptores SR-BI hepáticos.

Cualquiera sea el mecanismo de toma de lípidos su exceso es eliminado mediante la formación de sales biliares proceso que se inicia con la formación de 7- $\alpha$ -hidroxicolesterol por la 7- $\alpha$ -hidroxilasa (CYP7A1) (Fig.6).

**Figura 6: Síntesis de sales biliares**



Los pasos siguientes en la conversión de Cholil-CoA y Quenodeoxicolil CoA a sales biliares conjugadas como ácido taurocólico o glicocólico incluyen 16 enzimas. Las sales biliares así formadas pasan al ciclo enterohepático circulando varias veces al día entre el hígado, la vesícula biliar y el duodeno vía la vena porta cumpliendo su principal función en la digestión de lípidos. El paso regulador del proceso es la enzima CYP7A1 a través del receptor farnesoide X (FXR) que funciona como un sensor del nivel de ácidos biliares suprimiendo la actividad

enzimática cuando los niveles son altos. De esta forma este paso se vuelve crítico en la homeostasis del colesterol.

### **Importancia de la medida de lípidos y lipoproteínas**

Los estudios epidemiológicos e innumerables casos clínicos publicados demuestran la relación directa existente entre los valores elevados de colesterol total (CT) y/o la Lipoproteína de baja densidad (LDL-Col) como factores de riesgo para la enfermedad cardiovascular (ECV)<sup>78, 79, 80, 81, 82</sup>. Desde la década del 90 ha habido una fuerte intervención terapéutica tendiente a reducir el LDL-Col lo que ha llevado a reducir el riesgo de ECV<sup>83,84,85,86,87</sup>.

Desde el punto de vista de este trabajo es de capital importancia la evidencia epidemiológica que documenta la disminución del colesterol plasmático transportado por las HDL (HDL-Col) como predictor de riesgo para ECV<sup>88,89,90</sup>. Valores plasmáticos elevados de HDL-Col reducen el riesgo inversamente a lo que ocurre con LDL-Col. Una disminución en 1% de los niveles de HDL-Col conllevan a un aumento del 2 al 3% en el riesgo de ECV<sup>91</sup>. Es considerado un factor de riesgo independiente después de la corrección hecha sobre estudios multivariados de otros factores de riesgo, de hecho se probó en estudios prospectivos que es el factor de riesgo relacionado con lípidos que mejor correlaciona con el riesgo de ECV<sup>92,93</sup>. De acuerdo a los mecanismos explicados previamente, el fundamento de esta reacción se basa en varias teorías. A saber: La participación directa de las HDL en el proceso aterogénico, la estimulación del eflujo de colesterol de los macrófagos y su característica antioxidante. Paralelamente, la explicación del efecto de la disminución de las HDL y el riesgo no es simple ya que frecuentemente su disminución se relaciona con la existencia de algún otro factor aterogénico como la hipertrigliceridemia, el aumento de lipoproteínas remanentes (Qmr, VLDVr) y la presencia de LDLs modificadas (LDL pequeña y densa) producido por el metabolismo alterado, sobre todo en individuos con Diabetes *Mellitus* tipo II<sup>94, 95, 96, 97</sup> y la insulinoresistencia en el Síndrome Metabólico. Las principales causas de disminución plasmática de HDL-Col se pueden resumir en la siguiente lista:

- Hipertrigliceridemia.
- Sobrepeso y obesidad.

- Sedentarismo.
- Tabaquismo.
- Ingestas altas de hidratos de carbono (más del 60% de las calorías totales ingeridas).
- Dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados.
- Diabetes *Mellitus* Tipo II.
- Fármacos ( $\beta$ -bloqueantes, esteroides anabólicos, agentes progestágenos, probucol , fenitoína).
- Factores genéticos:
  - Enfermedad de Tangier.
  - Déficit congénito de LCAT.
  - Déficit familiar de apoA1.
  - Hipoalfalipoproteinemia familiar.

El 50% de la variabilidad en los niveles plasmáticos de HDL-Col de la población son atribuibles a factores genéticos y el otro 50% a las causas anteriores listadas. En orden de importancia le siguen la obesidad y el sobrepeso que comúnmente están asociadas con la hipertrigliceridemia.

Existen guías para el diagnóstico y tratamiento de las dislipémias como las tres escritas por el National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel (ATP) conocidas como ATP I del año 1998, ATP II del año 1993 y la ATP III <sup>98</sup> . En Europa existen guías similares como la emitida por The European Atherosclerosis Society (EAS) de 1998<sup>99</sup>. La guía vigente de la ACC/AHA/NHLBI del 2013<sup>100</sup>, son la actualización en el manejo del riesgo cardiovascular, en esta no se consideran metas específicas para el LDL-Col, no se recomienda el uso de fármaco y se los deja para pocas excepciones y le da importancia al cambio de estilo de vida

Los puntos de decisión clínica descritos en el ATP III (Tabla III) están basados en la distribución poblacional y el riesgo relacionado a través de los estudios epidemiológicos.

<b>Tabla III: Niveles séricos de colesterol y lipoproteínas después de 12 h de ayuno</b>	
<b>LDL-Col [mg/dl]</b>	
<100	Optimo
100-129	Cercano al optimo/debajo del optimo
129-159	Limitante al alto
160-189	Alto
≥190	Muy alto
<b>Colesterol Total [mg/dl]</b>	
<200	Deseable
200-239	Limitante al alto
<b>HDL-Col [mg/dl]</b>	
<40	Bajo
≥60	Alto

La relación inversa entre el nivel plasmático de HDL-Col y el riesgo es una variable continua y no se ha podido establecer un umbral de concentración propiamente dicho, por lo tanto los valores de corte son arbitrarios. En el ATP II fue definido como < 35,0 mg/dl valor establecido influenciado por el concepto que valores bajos de HDL-Col son causa directa de aterosclerosis.

El ATP III recategorizó este valor a <40,0 mg/dl tanto para hombres como para mujeres asumiendo que típicamente las mujeres tienen valores de HDL-Col más elevados que los hombres y, llevando el valor de corte a este nivel, se identificarían más hombres que mujeres con déficit de HDL.

Según el ATP III, el metabolito blanco a tener en cuenta a la hora de tratar una dislipemia es el LDL-Col, tomando como valores de corte 130 mg/dl y 100 mg/dl según se trate de prevención primaria o secundaria respectivamente; acto seguido se deben tener en cuenta el nivel de HDL-Col.

La Guía ATP IV del año 2012 estatifica los valores deseables de LDL-Col y la terapia a seguir de acuerdo al riesgo de tener un evento cardiovascular en los próximos 10 años. Así para riesgo entre 0 y 1 el valor plasmático aceptable es

de < 160 mg/dl y se toman medidas precautorias apartir de este valor y posibilidad de tratamiento farmacológico a partir de los 190 mg/dl. Consideraciones equivalentes de toman cuando el riesgo es mayor que 2 teniendo como valor crítico plasmático 130 mg/dl. Para pacientes con ECV se toma valor de decisión clínica de 100 mg/dl y para riesgo equivalente > 20% a 10 años el valor plasmático de decisión clínica es de 70 mg/dl.

Hasta la guía ATPIII no se contempla la diferenciación de valores plasmáticos de HDL-Col para hombre y mujeres considerando que la definición de valores de corte de HDL-Col diferente para las mujeres hubiera implicado descartar de un posible tratamiento a aquellas mujeres que por definición estarían en condiciones de entrar en tratamiento para LDL-Col.

De igual manera, poner un valor de corte más alto, por ejemplo, de 50 mg/dl sería un valor muy marginal que demandaría muchas y más intensas terapias como ejercicio, cambio de vida, dieta, etc.

Por otro lado, en contraposición a la relación entre los niveles bajos de HDL-Col y la probabilidad de ECV, los valores elevados de HDL siempre fueron considerados un factor de riesgo negativo ya desde el ATPII. Numéricamente era lo mismo que decir que en el cálculo del riesgo cuando se usan las tablas de Framingham, tener valores por encima de 60 mg/dl, quita un punto en el cálculo final del riesgo. Recientes estudios de randomización mendeliana publicados en 2012 ponen en duda esta hipótesis así como también la mayoría de los *trials* farmacológicos, que han fallado en reducir el riesgo de ECV aumentado el HDL-Col, lo que cuestiona el concepto que el aumento de HDL-Col reducen el riesgo de infarto de miocardio en una relación uniforme. Estos hallazgos enfatizaron la limitación potencial del HDL-Col como medida sustituta para el riesgo de infarto de miocardio en ensayos de intervención.

Hoy en día el potencial del dato de medida de HDL-Col radica en el cálculo de colesterol no HDL como marcador alternativo del riesgo relativo de ECV ya que tiene buena correlación con la medida de apoB e incluye los remanentes lipoproteícos de demostrada capacidad aterogénica y de difícil medida. La Guía ATPIV del año 2012 recomienda valores plasmáticos óptimos mayores a 40,0 mg/dl y 50 mg/dl para hombre y mujer respectivamente e incluye el valor de

colesterol noHDL con valores plasmáticos <130 mg/dL; 30 mg/dL por encima del objetivo de tratamiento con LDL-C.

Ya desde el ATPII, las HDL-Col son blanco de la terapia, en principio modificando los factores con tendencia a bajarlas como el sobrepeso y la obesidad, la inactividad física y el hábito de fumar. Más aún se incluye el uso de drogas modificadas como ácido nicotínico, fibratos y, más actualmente diferentes tipos de estatinas.

**Consideraciones analíticas:**

El panel de expertos del NCEP estableció objetivos de desempeño analítico (Tabla IV) para la medida de lípidos y lipoproteínas en los laboratorios clínicos<sup>101,102,103,104</sup>.

<b>Tabla IV: Criterios de desempeño analítico para lípidos y lipoproteínas en laboratorios clínicos según NCEP</b>			
Mensurando	Inexactitud	Imprecisión	Error total (ET) <sup>c</sup>
Colesterol total (CT)	$\leq 3 \%VR^a$	$CV^b \leq 3 \%$	$\leq 8,9$
HDL-Col	$\leq 5 \%VR$	DE <sup>d</sup> $\leq 1,7$ a ( $< 42$ mg/dl) CV $\leq 4\%$ a ( $\geq 42$ mg/dl)	$\leq 13 \%$
LDL-Col	$\leq 4 \%VR$	CV $\leq 4\%$	$\leq 12\%$
Triglicéridos (TG)	$\leq 5 \%VR$	CV $\leq 5\%$	$\leq 15 \%$
<sup>a</sup> VR: valor de referencia obtenido por métodos de referencia. <sup>b</sup> CV: Coeficiente de variación. <sup>c</sup> Error Total (ET): Inexactitud+1,96 X imprecisión (para el 95% de confianza). <sup>d</sup> DE: Desviación estándar.			

Las recomendaciones de las guías con el objeto de fijar los puntos de decisión clínica se hicieron sobre la base de trabajos donde se obtuvieron datos estandarizados. Esto implica que la estandarización de los laboratorios clínicos que hacen las medidas de lípidos con aquellos mismos sistemas de referencia, aseguraría que el diagnóstico, el seguimiento y, en caso de corresponder, el tratamiento del paciente, sea consistente con las recomendaciones del NCEP.

Para que un proceso de estandarización sea exitoso debe cumplir con tres requisitos previos<sup>105</sup>. El primero es que el mensurando de interés debería poder ser definido sin ambigüedades en términos de la homogeneidad de sus propiedades fisicoquímicas. En este punto hay que aclarar que las lipoproteínas, a diferencia del CT y los TG, no pueden caracterizarse homogéneamente ya que son colecciones polidispersas de partículas con un rango de propiedades fisicoquímicas muchas veces superpuestas.

En segundo término, se necesita un sistema de referencia con diferentes jerarquías analíticas y materiales de referencia validados. La más alta jerarquía analítica en química clínica son los Reference Measurement Procedure (RMP)<sup>106</sup> primarios o absolutos, trazables al Sistema Internacional de Unidades (SIU), altamente exactos, precisos, con baja incertidumbre metrológica y con características de desempeño perfectamente definidas. Los RMP secundarios, son razonablemente estables, confiables y, sobre todo, relativamente fáciles de transferir a otros laboratorios de referencia. Están la mayoría de las veces relacionados directamente a los primarios ya que son validados por estos, de modo de tener una jerarquía de métodos más accesible, menos demandante de trabajo y menos costosa. Para algunos mensurandos de química clínica no es posible establecer un método primario en cuyo caso se establece como método de máxima jerarquía al secundario.

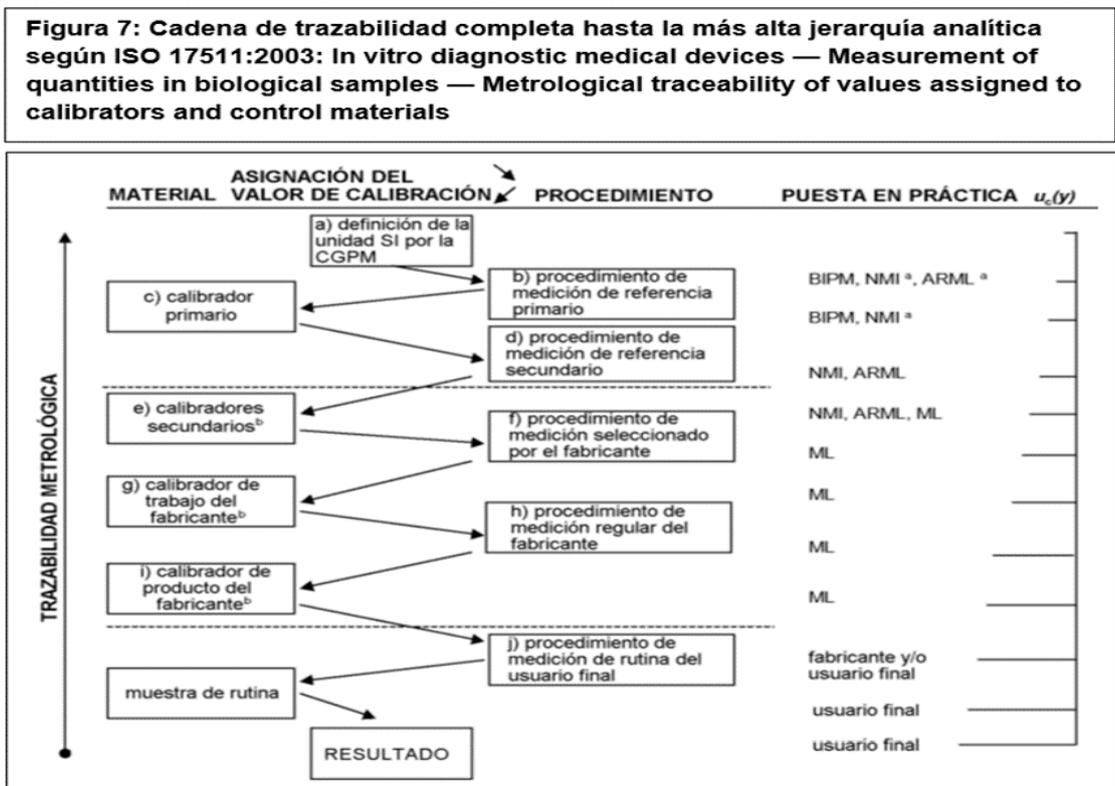
En tercer término se necesita un medio para transferir la exactitud de los métodos de jerarquía superior a los laboratorios clínicos, lo que equivale a establecer una cadena de trazabilidad usando materiales conmutables, es decir que tengan un comportamiento analítico lo más parecido a las muestras de pacientes.

En 1990, el Center for Disease Control and Prevention (CDC) estableció el Cholesterol Reference Method Laboratory Network (CRMLN)<sup>107,108</sup> con el objetivo de implementar los sistemas de trazabilidad para lípidos y lipoproteínas dentro de una red de laboratorios interna en los Estados Unidos y posteriormente la red se extendió a países de Europa y Asia. En el año 2000 y 2004, el Laboratorio de Referencia y Estandarización en Bioquímica Clínica de la FBA es parte de la red para CT y HDL-Col respectivamente.

Considerando puntualmente la estandarización de lípidos y lipoproteínas, en el Vocabulario Internacional de Medidas (VIM) en la 3<sup>ra</sup> edición del 2012 en el inciso, 2.41 (6.10), se define a la trazabilidad como *propiedad de un resultado de medida por la cual el resultado puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medida*

La más alta jerarquía analítica posible para un mensurado de química clínica es el SIU (Fig. 7) Por debajo de este se ubican los Métodos definitivos y los de referencia desarrollados en centros e institutos acreditados para tal fin. Por último, en la cadena se encuentran los laboratorios clínicos que aplican los métodos de rutina. Los laboratorios que desarrollan métodos definitivos y de referencia generan material de referencia primario y secundario respectivamente. Los laboratorios clínicos generan los resultados de los pacientes.

El colesterol y los triglicéridos son compuestos químicos perfectamente distinguibles por sus características químicas y físicas cumplen con esta condición y tienen una cadena de trazabilidad completa. No ocurre lo mismo con el LDL-Col y HDL-Col debido a la característica polidispersidad de sus macromoléculas. En el caso puntual del HDL-Col, la más alta jerarquía posible es el método de ultracentrifugación que es prácticamente intransferible a otros laboratorios de referencia como el LARESBI. En su reemplazo se establece el DCM/HDL-Col como método de referencia<sup>109</sup>.



La Tabla V resume los sistemas de trazabilidad para los lípidos y lipoproteínas establecidos por el NCEP

<b>Tabla V: Sistemas de referencia para lípidos y lipoproteínas según el NCEP</b>				
	Método de Referencia Primario	Material de Referencia Primario	Método de Referencia Secundario	Material de Referencia Secundario
Colesterol	DI/EM	NIST SRM 911b	Abell-Kendall (CDC)	Suero Humano Congelado de CDC NIST SRM 911b NIST SRM 1951a
HDL-C	No existe	No existe	UC/Heparina Mn <sup>+2</sup> /Abell y Kendall o DCM/HDL-Col/Abell y Kendall Recomendado NCEP	Suero Humano Congelado de CDC NIST SRM 1951a
Triglicéridos	DI/EM	NIST SRM 1595 Tripalmitina	Cloruro de Metileno Ac. Silícico-Ac. Cromotrófico (CDC) Recomendado NCEP	Suero Humano Congelado de CDC NIST SRM 1951a
LDL-C	No existe	No existe	Cuantificación Beta (CDC) Recomendado NCEP	Suero Humano Congelado de CDC NIST SRM 1951a
DI/EM: Dilución isotópica/Espectrometría de masas. NIST: National Institute of Standard and Technologies. SRM: Standard Reference Material. UC: ultracentrifugación. DCM/HDL-Col: Designated Comparison Method for HDL-Col				

### **Métodos de determinación analítica de HDL:**

Las características únicas de las lipoproteínas se han usado como fundamento para su separación y posterior cuantificación en la matriz compleja de suero humano. La presencia de lípidos en diferentes proporciones y con proteínas de diferente tamaño es la base de los métodos de ultracentrifugación, electroforesis o cromatografía. La reactividad diferencial frente a polielectrolitos y cationes divalentes es el fundamento de la precipitación selectiva. Últimamente, siguiendo la necesidad de los laboratorios clínicos de procesar más muestras en menor tiempo, han venido ganando terreno los métodos homogéneos.

### **Ultracentrifugación:**

El método se fundamenta en aprovechar las propiedades de equilibrio y velocidad de desplazamiento en un gradiente salino, sometido a fuerzas centrífugas para separar y cuantificar las fracciones de lipoproteínas. El gradiente se forma con NaBr o KBr permitiendo que las lipoproteínas floten de acuerdo a su densidad de hidratación. Las HDL flotan en un gradiente de densidad de 1.063 a 1.21 Kg/L. El colesterol medido en esta fracción es razonablemente atribuido a la fracción HDL. Si bien en el mercado hay mucha variedad de equipos y técnicas para implementarla lo hace un método de difícil transferencia entre laboratorios por tener algunos inconvenientes. es tedioso, lleva mucho tiempo y necesita mucho volumen de muestra. La alta concentración salina sumada a las altas fuerzas centrífugas puede, de algún modo, modificar a la lipoproteína. La separación de las fracciones es sumamente dependiente del operador. El equipamiento es altamente costoso. No siempre la fracción es homogénea y es posible que arrastre Lipoproteína (a).

La ultracentrifugación es el método que se ha venido usando históricamente para determinar la trazabilidad del mensurando. Si bien no cumple con las condiciones de ser un método de referencia, toda la base estadística y epidemiológica está basada en comparaciones con este método y, como tal, es aceptado como referencia y solo se usa en laboratorios de investigación y en aquellos que dan servicio de certificación.

Una versión más simplificada es la ultracentrifugación a dos gradientes, uno a  $\delta < 1.006$  kg/l para separar las VLDL y los Qm. En la fracción que queda se precipitan las apoB lipoproteínas con una combinación de heparina/ $\text{Cl}_2\text{Mn}$  quedando, de esta manera, solamente las HDL en suspensión, que se miden cuantitativamente por el método de referencia para colesterol de Abell y Kendall.

#### **Método Designado de Comparación para HDL-Col (DCM/HDL-Col):**

El DCM/HDL-Col, como el nombre lo indica es el método designado por comparación con la ultracentrifugación para aplicarse en los laboratorios de referencia en una cadena de trazabilidad.

La impracticabilidad, el alto costo del instrumental, al gran volumen de muestra, el tiempo de implementación y sobre todo la falta de transferibilidad a otros laboratorios de referencia de la ultracentrifugación demanda la aplicación de un método que cumpla con estas condiciones.

El DCM/HDL-Col es un método de precipitación previa con Dextran sulfato de 50 Kdal/ $\text{Cl}_2\text{Mg}$  y separación por centrifugación a  $4^\circ\text{C}$  y velocidad controlada. El sobrenadante contiene prácticamente colesterol asociado a HDL. La medida de este colesterol se hace por el método de referencia para colesterol total de Abell y Kendall con trazabilidad al Sistema Internacional de Unidades (SI).

Las condiciones de reacción, su simpleza y la buena correlación con la ultracentrifugación lo hacen un método que cumple condiciones para reemplazarlo

#### **Electroforesis:**

La separación de lipoproteínas basándose en la relación carga/masa ha sido ampliamente usada. Con el tiempo, se han ido usado diferentes soportes como papel, gel de agarosa, acetato de celulosa, y gel de poliacrilamida, combinados con varios buffers de pH alcalino. Las lipoproteínas se colorean con colorantes específicos para lípidos como Oil Red O, Fat Red 7B o Sudan Black. Básicamente se obtienen 3 bandas:  $\alpha$ (HDL),  $\text{pre}\beta$ (VLDL) y  $\beta$ (LDL). Algunas lipoproteínas atípicas, bajo ciertas condiciones, pueden verse como Lp(a), LpX

o banda  $\beta$ flotante. Algunas lipoproteínas normales, en ciertas condiciones fisiológicas, también pueden aparecer como Qm o IDL.

El método es considerado fundamentalmente cualitativo debido a que la unión de los colorantes con los lípidos es inespecífica y no estequiometría. Una coloración alternativa es usar la combinación de reacciones enzimáticamente catalizadas por Colesterol deshidrogenasa/ Colesterol oxidasa sobre el colesterol de cada una de las fracciones separadas y revelarlas usando el colorante Cloruro de nitroblue tetrazolium.

Al igual que para la ultracentrifugación, la electroforesis es un método engorroso para la cuantificación de lípidos en los laboratorio clínicos, pero debido a su relativa simplicidad y a su equipamiento requerido poco sofisticado, se la usa fundamentalmente para la detección cualitativa de lipoproteínas atípicas y clasificación de dislipemias.

#### **Métodos de primera generación: Precipitación química:**

Los métodos de precipitación selectiva fueron descritos por primera vez en la década del 60 por Burstein y colaboradores y fueron sistemáticamente adoptados por los laboratorios clínicos como procedimiento preparativo por su sencillez. Básicamente usan una combinación de polianiones y cationes divalentes de modo de agregar las apoB lipoproteínas y provocar su sedimentación luego de una suave centrifugación. El colesterol medido por los métodos enzimáticos de Esterasa/Colesterol oxidasa/Peroxidasa en el sobrenadante se corresponde prácticamente en su mayor parte a HDL.

Varias son las formulaciones comerciales que se pueden conseguir en el mercado. La combinación heparina/ $\text{Cl}_2\text{Mn}$  es la mejor para precipitar pero las propiedades de la heparina suelen ser inconsistentes entre lotes y el  $\text{Mn}^{++}$  es inhibidor de las enzimas de la reacción de color. Esta combinación es la que se usa en los métodos de ultracentrifugación.

Las dos formulaciones más comunes usadas por los laboratorios clínicos, incluso en nuestro país, son la de Dextrán Sulfato/ $\text{Cl}_2\text{Mg}$  y Ácido fosfotúngstico/ $\text{Cl}_2\text{Mg}$ .

Todos los métodos de precipitación química tienen como interferente los triglicéridos en altas concentraciones. Los altos niveles de TG generan agregados livianos que impiden la sedimentación de las formas insolubles, generando sobrenadantes turbios conteniendo otras lipoproteínas diferentes a las HDL.

Los métodos de precipitación se han venido usando durante los últimos 20-30 años en la bioquímica clínica en general de forma manual, mediante pipeteo de muestras y reactivos, el advenimiento de la automatización ha facilitado el último paso del procedimiento para la reacción de color, medida y obtención del resultado. La determinación de HDL-Col, junto al resto de lípidos y lipoproteínas, en los últimos años se ha hecho muy frecuente en los laboratorios generando cada vez mayor presión sobre los laboratorios en cuanto al número de muestras y al tiempo necesario para informar los resultados. Así mismo la necesidad de manejar menores volúmenes de muestra sobre todo en pediatría, la mayor tendencia a evitar el pipeteo y manipulaciones por cuestiones de bioseguridad, la interferencia de los TG muy común en la población de los pacientes dislipémicos, han venido marcando la tendencia a tratar de reemplazar estos métodos por otros que sean menos tediosos más rápidos y, sobre todo, totalmente automatizables evitando la fase preparativa de precipitación.

#### **Métodos de segunda generación:**

Estos métodos se ocuparon de evitar el paso preparativo de precipitación y variaban desde métodos con Dextrán sulfato unido a cápsulas conteniendo compuestos ferrosos que luego eran separados dentro de los mismos autoanalizadores por poderosos imanes, o bien prototipos de "point of care" usando compactos y sofisticados analizadores que trabajan con sangre entera sobre tiras reactivas cassettes impregnadas de reactivos, unificando el proceso de separación y medida de HDL-Col. Ninguno de estos métodos tuvo mayor aceptación en nuestro medio por la impracticabilidad, la necesidad de equipamiento extra y el costo.

#### **Métodos de tercera generación. Los ensayos homogéneos:**

Estos métodos tuvieron su primera aparición comercial a mediados de la década del 90. Permiten en una misma mezcla de reacción, la medida del colesterol unido a las HDL sin necesidad de separación del resto de las lipoproteínas.

Varias son las formulaciones, la mayoría usa como principio activo detergentes o polietilenglicol (PEG) o anticuerpos o combinaciones de ellos de modo de bloquear las apoB lipoproteínas dejando las HDL expuestas a la acción de las enzimas Colesterol esterasa/ Colesterol oxidasa que van a dar una reacción que se puede medir espectrofotométricamente. Las formulaciones más modernas se valen de Dextran sulfato y las enzimas “pegiladas”. Esto último refiere a la unión de PEG de diferente largo unido al Dextrán de bajo peso molecular (6000Da) y unido covalentemente a sitios estratégicos de las enzimas de modo de generar un inconveniente estérico en las apoB lipoproteínas de mayor tamaño que las HDL, haciendo de esa forma, que no puedan ser catalizadas en la reacción.

<b>Tabla VI Procedimientos analíticos homogéneos de tercera generación disponibles en Argentina para HDL-Col</b>			
Proveedor	Equipo	Reactivo	Principio activo
Wiener lab	Wiener lab series CB/CM/CMD/CT	Monofase AA plus	TOOS/ detergente
Biosystems	Serie A/BA	Colesterol HDL directo	Detergente
GT Lab		HDL Directo plus	Detergente
Siemens	ADVIA 2400	DHDL	Enzimas selectivas/detergente
WAKO	Wako	HDL-CL-Type	Inmunoinhibición
Beckman	SynchronLX20	Synchron HDL-D	Detergente/polianiones
Roche	Cobas c711	HDL-C plus 3 <sup>ra</sup> generación	DS/enzimas pegiladas
Siemens	Dimension RXL	AHDL-DF48A	Detergente
Abbott		Ultra HDL	

Bio Técnica		HDL Colesterol Directo	
TOOS: n-etil-n(2-hidroxi-3-sul-fosfopropil-3-toluidina disódica. DS: Dextran sulfato			

Varias son las ventajas del uso de estos procedimientos analíticos. En primer lugar, evitan los pasos preparativos de precipitación previa haciéndolos totalmente automatizables y disminuyendo la dispersión de resultados al eliminar pasos con alta probabilidad de cometer errores y disminuyen el tiempo de desarrollo. En los procedimientos escritos de los productos comerciales se describe que son independientes de la concentración de TG, por debajo de 1000 mg/dl aunque algunos proveedores publican que pueden ser usados hasta 2000 mg/dl. La hemoglobina no los afecta por debajo de 2,0 g/L aunque según otros autores, pueden usarse hasta los 10,0 g/L. Los valores de bilirrubina por debajo de 100 mg/L no los afectan. Se puede usar suero o bien plasma heparinizado o con EDTA.

Algunas discrepancias se encontraron cuando se procesan muestras con lipoproteínas atípicas como en el caso de pacientes con dislipemias tipo III de Fredrickson, que, si bien son casos muy aislados para un laboratorio clínico, no lo serían para aquellos que están dedicados al estudio de lípidos.

Si bien en principio la capacidad de ser totalmente automatizable es una ventaja, no lo es para laboratorios de bajo volumen de muestras, por el equipamiento extra necesario, sumado al hecho que el costo de estos reactivos es mayor que el de los métodos con precipitación previa. Esta característica es esperable se modifique con el tiempo a medida que la implementación de métodos automatizables este mas diseminada entre los laboratorios clínicos y los fabricantes optimicen los costos y precios de los reactivos para hacerlos mas accesibles.

**Efecto matriz y conmutabilidad de las muestras y materiales de referencia:**

Según la Guía CLSI: EP14-A2 Evaluation of matrix effects Clinical and Laboratory Standards Institute se define al efecto matriz como:

***La influencia de una propiedad de la muestra, diferente al analito, en la medida y, de este modo, en el valor de la cantidad medible<sup>110</sup>***

En cierto modo es/son el/los efecto/s fisicoquímico/s (por ejemplo interferencias) de la matriz sobre la habilidad del procedimiento de medida para medir un analito con exactitud.

El efecto matriz responde básicamente a 4 componentes no aislados sino que están interrelacionados, y estos son:

- Diseño de los instrumentos.
- Formulación de los reactivos.
- Principio de medida.
- Técnica de procesamiento y composición de los materiales de control y/o calibración.

Particularmente importante es el último punto porque introduce al concepto de “conmutabilidad” o bien la habilidad que tiene un material de referencia (control o calibrador) de tener propiedades comparables a las propiedades que tiene la muestra de pacientes cuando son medidas por más de un método analítico. Una definición más actual dice que es la equivalencia de las relaciones matemáticas entre los resultados de los diferentes procedimientos de medida para los materiales de referencia y las muestras de pacientes.

La primera consecuencia de esto es que la conmutabilidad es un fenómeno método-específico, es decir un material puede ser conmutable para un determinado sistema analítico pero puede que no lo sea para otro.

Respecto a lipoproteínas, la falta de conmutabilidad suele ser impredecible y altamente específica de los métodos usados. En líneas generales, se han descrito causas relacionadas con la manipulación de las muestras para preparar los materiales de referencia, como el tiempo de contacto del plasma y los glóbulos rojos o la formación de coagulo en las muestras de sangre de donantes, la reconstitución de suero a partir de plasma, los procesos industriales de diálisis, filtración, liofilización, etc.<sup>111</sup>.

La manera de disminuir la falta de conmutabilidad es usar procedimientos de preparación de los materiales de referencia de modo de minimizar los efectos de matriz, es decir hacer a los materiales lo más parecidos posibles a los sueros humanos. La guía C37-A<sup>112</sup> del CLSI y su actualización del año 2019 es un protocolo robusto que describe la manera de obtener suero humano congelado libre de interferencias, para ser usado en la estandarización de la medida de colesterol. Cobbaert et al. lo evaluó para ser usado en varias lipoproteínas y apolipoproteínas<sup>113</sup>, demostrando su buen desempeño, mediante este trabajo quedo, designado por convención, el suero humano congelado como material de referencia para lípidos y lipoproteínas.

## **2. Objetivos**

Debido al alto nivel de información sobre la intervención de las HDL en el transporte de colesterol y transformación de otras lipoproteínas, la importancia relevante en el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de los pacientes con dislipemia y su relación con el riesgo de ECV, la existencia de guías clínicas para la interpretación de los resultados que requieren medidas estandarizadas independientemente de los métodos de rutina que se usan para obtenerlos, en el presente trabajo se pretende:

1. Conocer el estado del arte de la medición y
2. Estandarizar la medida de HDL-Col en los laboratorios de la región usando material y métodos de referencia, entendiéndose por resultados estandarizados aquellos que coinciden dentro de límites clínicamente aceptables independientemente del método usado.

### **3. Materiales y Métodos**

**Materiales:****Laboratorios participantes:**

Se enviaron invitaciones para participar del proyecto a 150 laboratorios inscriptos en el Programa de Evaluación Externa de la Calidad (PEEC) de la Fundación Bioquímica Argentina (FBA) de la región comprendida por los partidos de La Plata, Berisso y Ensenada. La participación fue voluntaria y la selección de los sistemas analíticos se hizo de modo de abarcar la mayor variedad posible entre equipos, métodos, calibradores y marcas comerciales.

Respondieron afirmativamente a la convocatoria 50 laboratorios a los que se les entregó el material de referencia, planillas para resultados e instructivo de manejo, conservación y procesamiento de las muestras. Se dispuso de un plazo de 60 días para optimizar el procedimiento analítico del laboratorio participante, estudiar el protocolo, obtener y evaluar la validez de los resultados para finalmente informar. Se prorrogó el plazo de entrega de resultados 30 días más de lo previamente establecido.

De los 50 laboratorios 32 entregaron resultados antes de los 90 días propuestos como plazo final a partir de la fecha de haber sido entregado el material.

**Material suministrado y protocolo de procesamiento:**

A cada laboratorio se le entregó en mano, transportadas personalmente, en recipientes para conservación del frío y en hielo seco, un total de 13 viales conteniendo suero humano congelado a  $-75^{\circ}\text{C}$  libres de conservantes, estabilizantes, expansores de matriz, etc. que puedan interferir en la determinación de HDL-Col. El laboratorio se comprometió a conservarlas a  $-18/-21^{\circ}\text{C}$ , hasta el momento de ser procesadas. El volumen mínimo que contienen es de 1.2 ml. Las muestras fueron obtenidas de sobrante de sueros de pacientes ambulatorios procesadas acorde al protocolo CLSI: C37-A. Las muestras

enviadas tienen valor de referencia (VR) para HDL-Col determinado en el LARESBIC por Método Designado de Comparación para HDL-Col (DCM/HDL-Col). En el proceso de selección de muestras para formar la mezcla final se seleccionaron muestras libres de hemólisis, ictericia y fundamentalmente libres de turbidez para evitar la interferencia de los triglicéridos con los métodos de medida.

Las concentraciones para los niveles 1, 2, 3, 4 y HC1Cal están ubicadas dentro del rango fisiopatológico aconsejado por los protocolos de certificación para el mensurando y son desconocidos para el laboratorio hasta el momento de análisis de los resultados (Tabla. VII)

Nivel	Cantidad entregada (viales)	Volumen de muestra(ml)	Rango de concentración (mg/dl)	VR (mg/dl)
1	3	1,2	< 40,0	36,8
2	3	1,2	e/40,0 y 60,0	50,0
3	3	1,2	≅ 60,0	61,2
4	3	1,2	> 60,0	72,3
CH1Cal	1	1,2		50,7

**Método para asignación del valor de Referencia (VR) en el Laboratorio de Referencia y Estandarización en Bioquímica Clínica (LARESBIC), Características del DCM/HDL-Col:**

El DCM/HDL-Col es el método aprobado en el año 1994 revisado en 1998 y 2000, para ser usado por los laboratorios del CRMLN, que esta aun hoy vigente en reemplazo de la ultracentrifugación en los laboratorios de referencia que no pueden implementarla. Consiste en:

1. Precipitación de las apoB lipoproteínas (VLDL, IDL, LDL, Lpx y Lp(a)) con Dextrán Sulfato 50KDal 10mg/ml y Cl<sub>2</sub>Mg 0,35M. en una relación suero/precipitante 10:1 v/v.

2. Centrifugación controlada a 4°C durante 30 minutos a 2200 r.p.m.
3. Extracción del sobrenadante
4. Medición del HDL-Col usando el método de Abell y Kendall modificado que es el método de referencia aprobado por el CRMLN desde 1982 y revisado en 1994 que esta aun en vigencia. Consiste en 4 pasos:
  1. Hidrólisis del colesterol esterificado con KOH/etanol 33% a 50°C, durante 1 hora en baño seco
  2. Extracción del colesterol libre con n-hexano certificado de punto de ebullición 68-70°C
  3. Evaporación del n-hexano y obtención de residuo seco de colesterol
  4. Reacción de color con reactivo Liebermann-Burchard (anhídrido acético, ácido sulfúrico concentrado y ácido acético glacial en relación 20:1:10 v/v).
  5. Medida espectrofotométrica a 620 nm a los 30 minutos de largada la reacción

El procedimiento es calibrado mediante una recta de calibración con 6 soluciones alcohólicas de concentraciones crecientes de colesterol preparadas a partir del Standard Reference Material 911b (SRM911b) del National Institute of Standards and Technology (NIST) de  $99,8 \pm 0,1$  % de pureza, lo que completa la cadena de trazabilidad hasta el Sistema Internacional de Unidades, la más alta jerarquía analítica posible para el mensurando.

Todos los reactivos tienen aprobación de la American Chemical Society (ACS). Cada lote del SRM 911b tiene los respectivos certificados de pureza. El equipamiento volumétrico, de pesada y espectrofotométrico son controlados por el LARESBIC de acuerdo a los protocolos establecidos en el manual de procedimientos del CRMLN para el método.

El método es fácilmente transferible, no requiere demasiado equipamiento especial, es manual pero no implica demasiada habilidad técnica, tiene muy buena trazabilidad con el método de ultracentrifugación y su desempeño, en

cuanto a precisión y veracidad, pueden ser mantenidos en el tiempo. Así mismo, es fuertemente dependiente del peso molecular del Dextrán sulfato.

Los parámetros de desempeño analítico para la medida de HDL-Col en los laboratorios de referencia del son:

Error sistemático:  $\leq 1,0$  mg/dl respecto al valor de referencia.

Imprecisión: Desviación estándar (DE)  $\leq 1,0$  mg/dl.

El LARESBIC participa anualmente en rondas de comparación entre laboratorios de referencia para la medida de CT y HDL-Col. La evaluación consiste en rondas 2 al año mediante el procesamiento de 8 muestras de suero humano congelado enviados por el CDC, en 4 niveles de concentración durante 2 corridas, midiendo cada muestra por duplicado. Estas muestras tienen valor de referencia asignado por ultracentrifugación en el CDC y por consenso entre laboratorios de la red.

También participa en rondas de comparación entre laboratorios de referencia para la medida de CT con el External quality control for Reference Laboratories Reference Institute for Bioanalytics of the German Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (RELA-RfB) usando suero humano liofilizado.

El LARESBIC es miembro del CRMLN para la medida de Colesterol Total desde el año 2000 y para la medida del HDL-Col desde el 2002 ([https://www.cdc.gov/labstandards/pdf/crmln/CRMLN\\_Analytical\\_Services\\_List-508.pdf](https://www.cdc.gov/labstandards/pdf/crmln/CRMLN_Analytical_Services_List-508.pdf))

#### **Protocolo de procesamiento para los laboratorios clínicos:**

El análisis de HDL-Col se desarrolla en tres (3) días consecutivos, cada día se realiza una (1) corrida, midiendo cada vial por duplicado. Así se obtienen ocho (8) valores por día y un total de veinticuatro (24) valores en los 3 días de procesamiento para cada uno de los 4 niveles. El calibrador CH1Cal no se procesa hasta que el análisis de los resultados recomiende procesar una nueva tanda de sueros reenviados.

Cada laboratorio participante procesó las muestras con el sistema analítico que habitualmente usa en su laboratorio (Tabla VIII). Se considera un sistema analítico, la combinación entre 3 variables:

1. Método:
  - 1.1. principio activo
  - 1.2. características metrológicas (temperatura de incubación y/o lectura, longitud de onda de medida, tiempo de incubación, relación de volumen muestra reactivo, etc.)
2. Equipamiento: de lectura espectrofotométrica, volumétrico, de centrifugación, etc.
3. Operador: habilidad técnica, conocimiento del procedimiento analítico, capacidad de evaluación de resultados, etc. (variable excluida en la evaluación, no es objetivo de este trabajo)

Durante los tres días de procesamiento se deben evitar las recalibraciones y el reemplazo de los reactivos, salvo que sea estrictamente necesario.

**Tabla VIII: Descripción de los Sistemas analíticos estudiados**

Sistema analítico	Método	Precipitante	Met/marca	Matriz calibrador	Cal/marca	Eq/medida
1	PP	DS	Wiener lab	NP	Wiener lab	AA
2	PP	FT	Roche	NP	no informa	AA
3	PP	FT	Wiener lab	NP	Wiener lab	AA
4	PP	DS	Wiener lab	P	no informa	AA
5	H	NA	Wiener lab	P	Biosystems	AA
6	PP	FT	Biosystems	NP	Biosystems	EM
7	PP	DS	Wiener lab	NP	Wiener lab	EM
8	PP	FT	Wiener lab	NP	no informa	AA
9	H	NA	Siemens	P	Siemens	AA
10	H	NA	Roche	P	Biosystems	AA
11	H	NA	Roche	P	Biosystems	AA
12	PP	DS	Wiener lab	NP	Wiener lab	AA
13	H	NA	Biosystems	P	Biosystems	AA
14	PP	DS	Wiener lab	NP	Wiener lab	EM
15	H	NA	Roche	P	Roche	AA
16	PP	FT	Biosystems	NP	Biosystems	AA
17	PP	FT	Biosystems	NP	Biosystems	AA
18	H	NA	Biosystems	P	Biosystems	AA
19	PP	DS	Wiener lab	P	Biosystems	AA
20	PP	FT	Biosystems	NP	Biosystems	EM
21	H	NA	Siemens	P	Siemens	AA
22	H	NA	Wiener lab	P	Wiener lab	AA
23	H	NA	Wiener lab	P	Wiener lab	AA
24	H	NA	Wiener lab	P	Wiener lab	AA
25	H	NA	Roche	P	Roche	AA
26	PP	DS	Wiener lab	P	Biosystems	EM
27	H	NA	Wiener lab	P	Wiener lab	AA
28	PP	DS	Wiener lab	NP	Wiener lab	AA
29	H	NA	Biosystems	P	Biosystems	AA
30	PP	FT	Biosystems	NP	Biosystems	AA
31	PP	DS	Wiener lab	NP	Wiener lab	EM
32	H	NA	Abbott	P	Abbott	AA

PP: precipitación previa. H: homogéneo. DS: dextran sulfato. FT: fosfotúngstico. EM: espectrofotómetro manual. AA: autoanalizador automático. NP: no proteico. PP: proteico. NA: no aplica. Met/marca: método marca comercial. Cal/marca: calibrador marca comercial. Eq/medida: equipamiento y proceso de medida

Las muestras se incluyen aleatoriamente en la corrida analítica junto con las de los pacientes para el día y con los controles de calidad internos. Los resultados de las muestras se consideran aceptados o rechazados de acuerdo a los criterios de validación de la corrida según el sistema de gestión de la calidad del laboratorio en base a los resultados del control de calidad interno.

### **Cálculos y método de análisis de resultados:**

Para los cálculos y análisis de resultados se usaron los programas Microsoft Office Excel y SPSS

Se define al Error Sistemático Porcentual Absoluto como:

$$ES(\%) = \frac{(VR-VO)100}{VR}$$

Donde VR es el valor de referencia y VO, el valor obtenido por el laboratorio. Cuando el VR es 40,0 mg/dl o 60,0 mg/dl, se obtiene el Error Sistemático Porcentual Absoluto a 40,0 y 60,0 mg/dl respectivamente que son los valores de decisión crítica para evaluar el riesgo de ECV

El promedio del error Sistemático se define como:

$$\overline{ES(\%)} = \sum_{i=1}^n \frac{ESi(\%)}{n}$$

Donde  $i$ , es el  $i$ -ésimo nivel de suero y  $n$  el número de niveles

El promedio del valor absoluto del ES (%)

$$\overline{ABSES(\%)} = \sum_{i=1}^N \frac{|ESi(\%)|}{n}$$

Donde  $i$ , es el  $i$ -ésimo nivel de suero y  $n$  el número de niveles

La Desviación Estándar (DE) y la media  $X$  para cada nivel se define de la forma habitual:

$$\bar{X} = \sum_{i=1}^n \frac{X_i}{n}$$

Donde  $i$ , es el  $i$ -ésimo valor del suero y  $n$  el número total de replicados

$$DE = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2$$

Donde  $i$ , es el  $i$ -ésimo valor del suero y  $n$  el número total de replicados

De la combinación de ambas definiciones se extrae el Coeficiente de Variación (CV) como

$$CV = \frac{DE * 100}{\bar{X}}$$

El Promedio del CV global (%) se define como:

$$\overline{CV} = \sum_{i=1}^n \frac{CV_i}{n}$$

Donde  $i$ , es el  $i$ -ésimo nivel del suero y  $n$  el número de niveles.

## **4. Resultados**

Se evaluaron 32 sistemas analíticos de los que obtuvieron un total de 124 pares de datos entre el valor obtenido (VO) y el valor de referencia (VR).

De acuerdo a la metodología usada 15 (46.9%) laboratorios usan métodos homogéneos y 17 (53.1%) usan métodos con separación previa con polielectrolitos y cationes divalentes. Las combinaciones usadas fueron 9 (52.9%) Dextrán Sulfato /Cl<sub>2</sub>Mg y 8 (26.9%) Fosfotúngstico/ Cl<sub>2</sub>Mg.

De acuerdo a la tecnología usada del total 26 (81.3%) midieron la reacción final en un autoanalizador discreto y 6 (18.7%) lo hicieron en un espectrofotómetro de forma manual.

Para evaluar el desempeño de los laboratorios se usaron los criterios de aceptabilidad para el mensurando del NCEP y se agregaron criterios de linealidad y desempeño en los 2 puntos críticos del rango de concentraciones, 40,0 y 60,0 mg/dl (Tabla. IX).

<b>Tabla IX: Criterios de aceptabilidad para el mensurando HDL-Col según NCEP</b>	
Coeficiente de correlación	≥ 0,975
Error Sistemático Porcentual Absoluto (%) a 40,0 mg/dl	≤ ± 5,0%
Error Sistemático Porcentual Absoluto (%) a 60,0 mg/dl	≤ ± 5,0%
Promedio del ES (%)	≤ ± 5.0
Promedio del valor absoluto del ES (%)	≤ 5.0
Promedio del CV global (%)	≤ 4.0

El coeficiente de correlación ( $r^2$ ) se obtiene del análisis de regresión de la curva obtenida entre la variable independiente que son los datos obtenidos con el DCM/HDI-Col y la variable dependiente de los datos obtenidos por el laboratorio con su sistema analítico.

Del estudio de regresión de los datos obtenidos tomando como variable independiente el valor de referencia (VR) y la variable dependiente al valor obtenido (VO) para todos los métodos, se obtienen (Graf.1y 2)

**Tabla. X: Coeficientes de regresión lineal para VO vs. VR (todos los métodos)**

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	7,79333	2,99617	2,6011	0,0105
Pendiente	0,853911	0,0544453	15,6838	0,0000

**Tabla. XI: Análisis de Varianza para VO vs. VR (todos los métodos)**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	16264,3	1	16264,3	245,98	0,0000
Residuo	8000,46	121	66,1195		
Total (Corr.)	24264,7	122			

Coeficiente de Correlación = 0,818709

R-cuadrada = 67,0285 porciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 66,756 porciento

Error estándar del est. = 8,13139

Error absoluto medio = 6,70978

Estadístico Durbin-Watson = 1,3524 (P=0,0001)

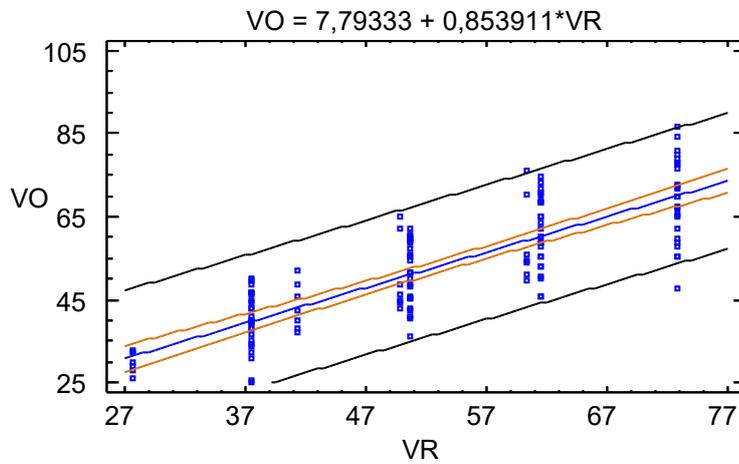
Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,319595

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo lineal para describir la relación entre VO y VR. La ecuación del modelo ajustado es

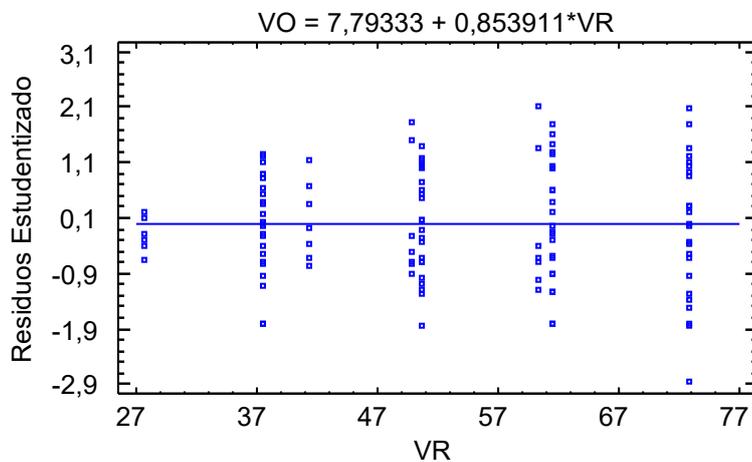
$$\mathbf{VO = 7,79333 + 0,853911*VR}$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre VO y VR con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico 1: Regresión lineal VR [mg/dl] vs. VO [mg/dl] (todos los métodos)**



**Gráfico 2: Residuos estudentizados para VO vs. VR (todos los métodos)**



Cuando se estudian por separado los dos principales métodos: VO\_PP (valor obtenido por métodos con precipitación previa) y VO\_H (valor obtenido por métodos homogéneos) respecto al valor de referencia (VR) se obtienen las siguientes relaciones (Gráficos 3, 4, 5 y 6):

Variable dependiente: VO\_PP

Variable independiente: VR\_PP

**Tabla XII: Coeficientes de regresión lineal para VO\_PP vs. VR\_PP**

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	12,3245	3,73991	3,29539	0,0016
Pendiente	0,70999	0,0706458	10,05	0,0000

**Tabla XIII: Análisis de Varianza para VO\_PP vs. VR\_PP**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	6444,67	1	6444,67	101,00	0,0000
Residuo	4211,27	66	63,8071		
Total (Corr.)	10655,9	67			

Coefficiente de Correlación = 0,777686

R-cuadrada = 60,4796 porciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 59,8808 porciento

Error estándar del est. = 7,98793

Error absoluto medio = 6,16014

Estadístico Durbin-Watson = 1,6758 (P=0,0715)

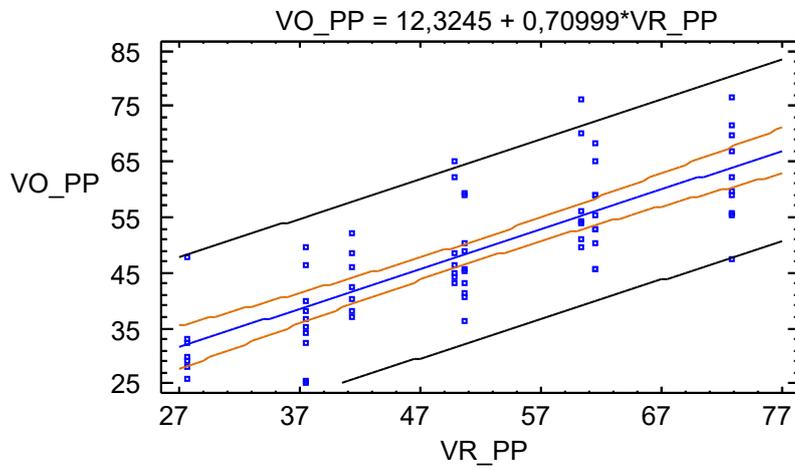
Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,15676

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo lineal para describir la relación entre VO\_PP y VR\_PP. La ecuación del modelo ajustado es

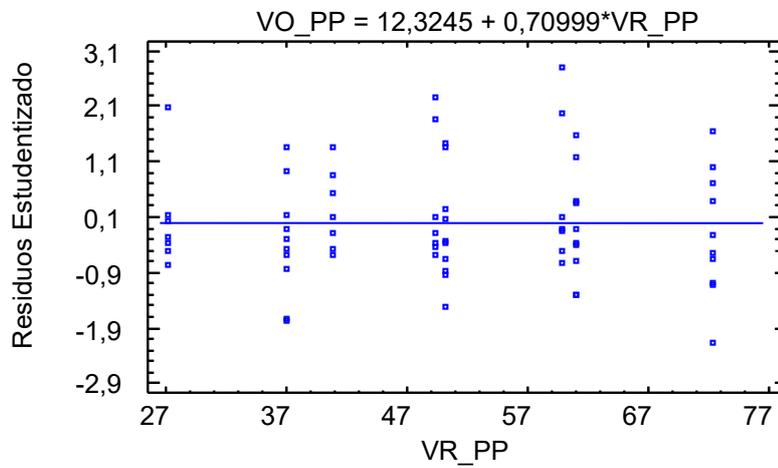
$$\mathbf{VO\_PP = 12,3245 + 0,70999*VR\_PP}$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre VO\_PP y VR\_PP con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico 3: Regresión lineal para VO\_PP [mg/dl] vs. VR\_PP [mg/dl]**



**Gráfico 4: residuos estudentizados para VO\_PP vs. VR\_PP**



Variable dependiente: VO\_H

Variable independiente: VR\_H

**Tabla XIV: Coeficientes de regresión lineal para VO\_H vs. VR\_H**

	<i>Mínimos Cuadrados</i>	<i>Estándar</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Error</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
Intercepto	7,27764	3,88502	1,87326	0,0664
Pendiente	0,927065	0,0683624	13,561	0,0000

**Tabla XV: Análisis de Varianza para VO\_H vs. VR\_H**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	8497,81	1	8497,81	183,90	0,0000
Residuo	2541,46	55	46,2085		
Total (Corr.)	11039,3	56			

Coeficiente de Correlación = 0,877371

R-cuadrada = 76,978 por ciento

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 76,5594 por ciento

Error estándar del est. = 6,79768

Error absoluto medio = 5,60219

Estadístico Durbin-Watson = 1,92218 (P=0,3327)

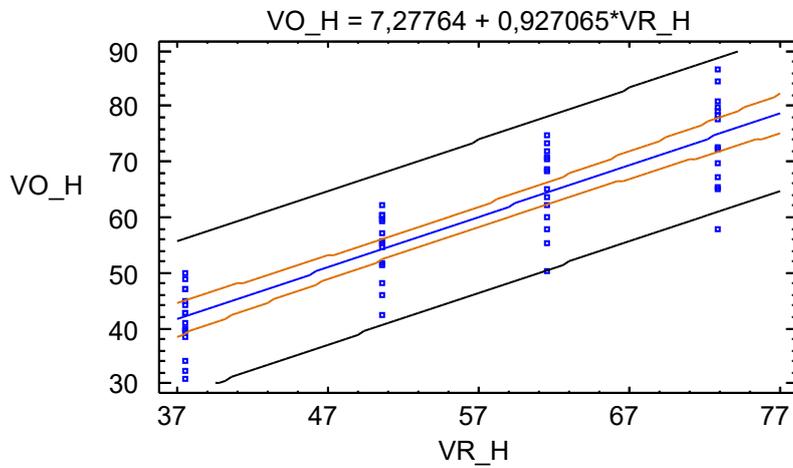
Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,00107839

La salida muestra los resultados de ajustar un modelo lineal para describir la relación entre VO\_H y VR\_H. La ecuación del modelo ajustado es

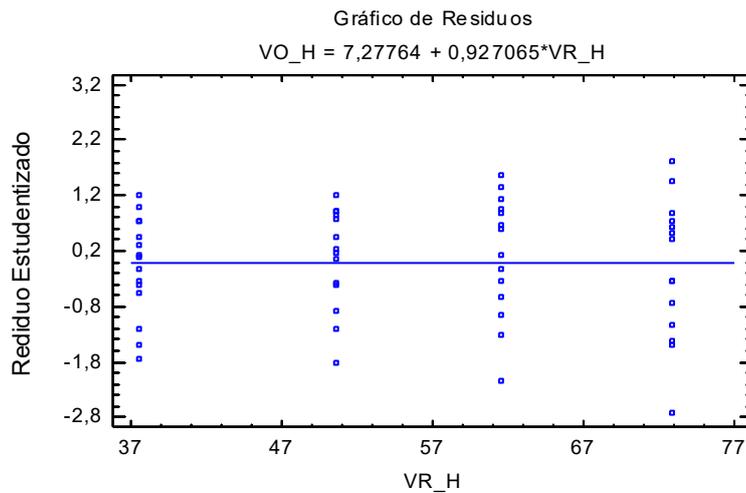
$$\mathbf{VO\_H = 7,27764 + 0,927065*VR\_H}$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre VO\_H y VR\_H con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico 5: Regresión lineal para VO\_H [mg/dl] vs. VR\_H [mg/dl]**



**Gráfico 6: Residuos estudentizados para VO\_H vs. VR\_H**



**Comparación entre las curvas de regresión para los dos métodos más representativos, precipitación previa (PP) y homogéneo (H):**

Cuando se comparan las 2 curvas de regresión en un modelo de regresión múltiple ajustado se obtiene (Gráfico. 7)

Número de casos completos: 123

Número de líneas de regresión: 2

**Tabla XVI: Análisis de Regresión Múltiple para métodos PP y H**

		<i>Error</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Estándar</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
CONSTANTE	10,5015	3,52747	2,97707	0,0035
VR	0,740824	0,0662737	11,1783	0,0000
Met=H	-2,02494	5,54539	-0,365157	0,7156
VR*Met=H	0,167806	0,100022	1,67769	0,0960

**Tabla XVII: Coeficientes para comparación de regresión múltiple para métodos PP y H**

<i>Met</i>	<i>Intercepto</i>	<i>Pendiente</i>
PP	10,5015	0,740824
H	8,47659	0,90863

**Tabla XVIII: Análisis de Varianza para comparación de regresión múltiple para métodos PP y H**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	17876,2	3	5958,74	110,99	0,0000
Residuo	6388,53	119	53,6851		
Total (Corr.)	24264,7	122			

R-Cuadrada = 73,6716 porciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 73,0078 porciento

Error estándar del est. = 7,32701

Error medio absoluto = 5,74499

Estadístico Durbin-Watson = 1,58199 (P=0,0099)

Autocorrelación residual de retardo 1 = 0,206148

Las ecuaciones del modelo ajustado son:

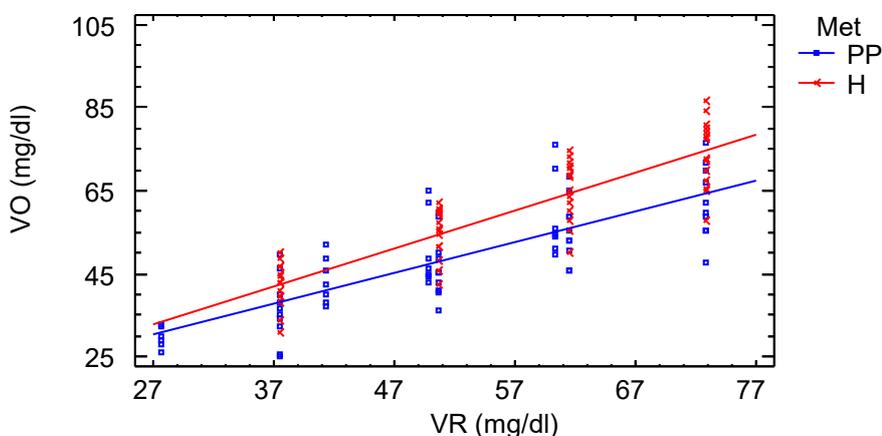
$$VO = 10,5015 + 0,740824 \cdot VR \text{ (para método PP)}$$

Cuando se analiza solamente el método de Precipitación previa (PP) y cuando se analiza solamente el método homogéneo (H) se obtiene la siguiente ecuación:

$$VO = 8,47659 + 0,90863*VR \text{ (para método H)}$$

En la Gráfica.7 se obtiene la representación conjunta de ambas curvas. Como el valor-P de la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico 7: regresión lineal múltiple ajustado para VO [ mg/dl] vs. VR [ mg/dl] para los métodos PP (precipitación previa) y H (homogéneo)**



**Tabla XIX: ANOVA Adicional para Variables Según el Orden de Introducción para comparación de regresión lineal para métodos PP y H**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
VR	16264,3	1	16264,3	302,96	0,0000
Intercepciones eje X	1460,83	1	1460,83	27,21	0,0000
Pendientes	151,104	1	151,104	2,81	0,0960
Modelo	17876,2	3			

Dado que el valor-P para las pendientes es menor que 0,1, existen diferencias estadísticas entre las pendientes para los distintos valores entre métodos con un nivel de confianza del 90%. Dado el valor-P para las intercepciones con el eje X es menor que 0,01, existen diferencias estadísticamente significativas entre las intercepciones con el eje X los diferentes valores entre métodos con un nivel de confianza del 99%.

**Tabla XX: Estadísticos de grupo: Test de Student para los parámetros de desempeño según los diferentes métodos:**

Met:1PP y H			N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
ES	PP	PP	67	4,034	16,0886	1,9655
		H	55	-7,311	12,6760	1,7092
AbsES	dimension1	PP	67	13,807	9,0461	1,1052
		H	55	12,358	7,7180	1,0407
ES_prom	dimension1	PP	15	4,007	15,2213	3,9301
		H	17	2,929	16,4426	3,9879
AbsES_prom	dimension1	PP	15	13,300	8,0454	2,0773
		H	17	14,229	8,9079	2,1605

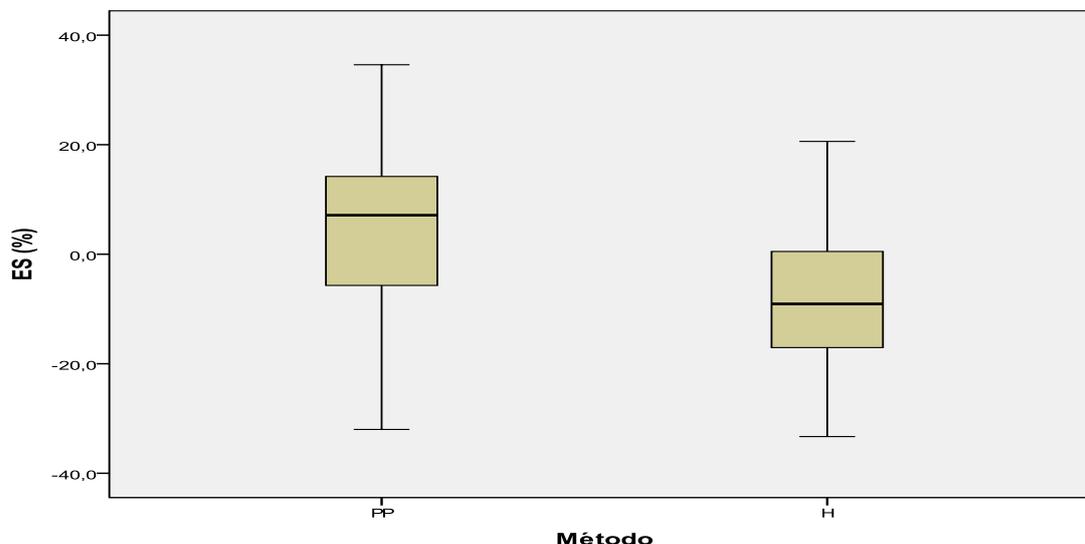
Según la Prueba de Levene se asume varianzas iguales

**Tabla XXI: Prueba de muestras independientes para los parámetros de desempeño según los diferentes métodos:**

	Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
								Inferior	Superior
ES	2,520	,115	4,256	120	,000	11,3452	2,6659	6,0669	16,6236
AbsES	1,620	,206	,940	120	,349	1,4493	1,5419	-1,6036	4,5022
ES_prom	,009	,927	,191	30	,849	1,0773	5,6270	-10,4145	12,5691
AbsES_prom	,020	,890	-,308	30	,760	-,9294	3,0169	-7,0907	5,2318

El Gráfico 8, es una expresión visual de la diferencia en el ES %

**Gráfico 8: Gráfico de Caja y Bigotes para el ES (%) para los métodos PP y H**



**Comparación entre las curvas de regresión para los dos calibradores más representativos, no proteicos (NP) y proteicos (P):**

Atento a que la determinación de HDL-Col puede ser afectada por el efecto matriz sobre los calibradores se puede ver el efecto cuando se usan calibradores no proteicos (NP) o calibradores en base sérica proteica (P) (Gráfico 9):

Número de casos completos: 123

Número de líneas de regresión: 2

**Tabla XXII: Análisis de Regresión Múltiple para calibrador NP y P**

		<i>Error</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Estándar</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
CONSTANTE	6,89483	5,14241	1,34078	0,1825
VR	0,844368	0,0978081	8,6329	0,0000
Cal=P	1,94255	6,35102	0,305865	0,7602
VR*Cal=P	0,00130025	0,118269	0,010994	0,9912

**Tabla XXIII: Coeficientes para calibrador NP y P**

<i>Cal</i>	<i>Intercepto</i>	<i>Pendiente</i>
NP	6,89483	0,844368
P	8,83738	0,845668

**Tabla XXIV: Análisis de Varianza para calibrador NP y P**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	16367,1	3	5455,71	82,21	0,0000
Residuo	7897,6	119	66,3664		
Total (Corr.)	24264,7	122			

R-Cuadrada = 67,4524 porciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 66,6318 porciento

Error estándar del est. = 8,14656

Error medio absoluto = 6,58197

Estadístico Durbin-Watson = 1,35919 (P=0,0001)

Autocorrelación residual de retardo 1 = 0,316996

Las ecuaciones del modelo ajustado son.

Cuando el calibrador es solamente NP:

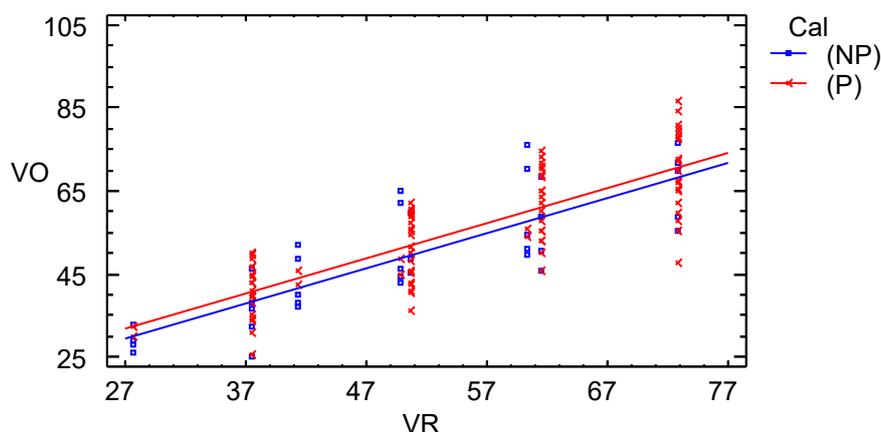
$$\mathbf{VO\_NP = 6,89483 + 0,844368*VR}$$

Cuando el Calibrador es P, el modelo se reduce a

$$\mathbf{VO\_P = 8,83738 + 0,845668*VR}$$

En el Gráfico.9 se obtiene una representación de ambas curvas. Como el valor-P de la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico 9: Regresión lineal múltiple para VO [mg/dl vs. VR [mg/del para calibrador P (proteico) y NP (no proteico)**



**Tabla XXV: ANOVA Adicional para Variables Según el Orden de Introducción para calibrador NP y P**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
VR	16264,3	1	16264,3	245,07	0,0000
Interceptos	102,855	1	102,855	1,55	0,2156
Pendientes	0,0080216	1	0,0080216	0,00	0,9912
Modelo	16367,1	3			

Esta tabla permite evaluar la significancia estadística de los términos en el modelo. Dado que el valor-P para las pendientes es mayor que 0,1, no existen diferencias estadísticas entre las pendientes para los distintos valores de Cal con un nivel de confianza del 90% o mayor. Dado el valor-P para los interceptos es mayor que 0,1, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los

interceptos para los diferentes valores de Cal con un nivel de confianza del 90% o mayor.

**Tabla XXVI: Estadísticos de grupo: Test de Student para los parámetros de desempeño según los diferentes calibradores NP y P:**

Cal: NP y P	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
ES P	37	1,032	16,2421	2,6702
NP	85	-2,000	15,3972	1,6701
AbsES P	37	13,324	9,0792	1,4926
NP	85	13,080	8,2461	,8944
ES_prom P	7	-,457	15,9705	6,0363
NP	25	4,524	15,6958	3,1392
AbsES_prom P	7	13,371	8,1034	3,0628
NP	25	13,912	8,6292	1,7258

Según la prueba de Levene se asume varianzas iguales:

**Tabla XXVII: Test de muestras independientes para los parámetros de desempeño según los diferentes calibradores NP y P:**

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
								95% Confidence Interval of the Difference	
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
ES	,016	,898	,983	120	,327	3,0324	3,0834	-3,0726	9,1374
AbsES	1,273	,261	,146	120	,884	,2443	1,6750	-3,0721	3,5608
ES_prom	,002	,968	-,740	30	,465	-4,9811	6,7355	-18,7368	8,7745
AbsES_prom	,164	,688	-,148	30	,883	-,5406	3,6461	-7,9870	6,9058

Las combinaciones más comúnmente usada por los laboratorios entre método y calibrador pueden verse a partir del resultado de la tabulación cruzada (Gráfico. 10, frecuencias) y (Gráfico. 11, mosaico)

Variable para Filas:

Calibrador no proteico (NP)

Calibrador proteico (P)

Variable para Columnas:

Método con precipitación previa (PP)

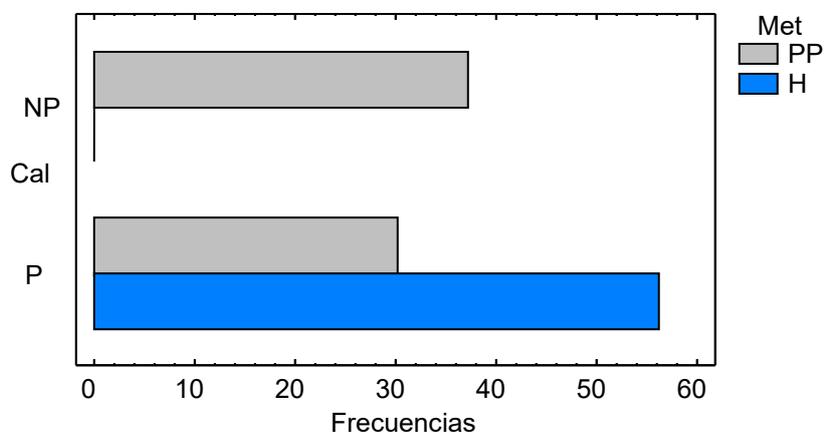
Método homogéneo (H)

Número de Observaciones: 123

Número de filas: 2

Número de columnas: 2

**Gráfico 10: Diagrama de barras para calibrador según método**



**Tabla XXVIII: Frecuencias para Calibradores por Métodos:**

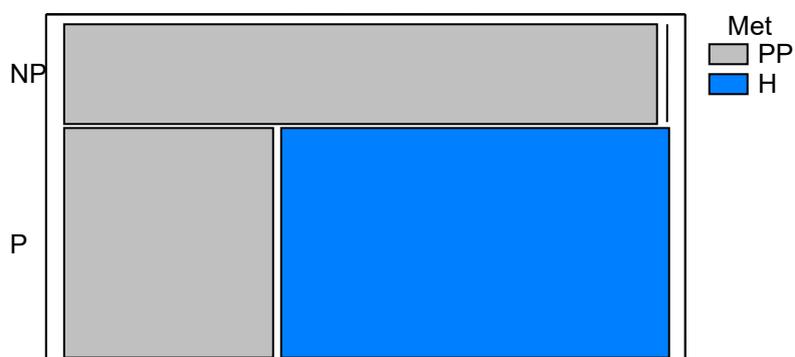
	PP	H	Total por Fila
NP (n)	37	0	37
(%)	30,08%	0,00%	30,08%
P (n)	30	56	86
(%)	24,39%	45,53%	69,92%
Total por Columna (n)	67	56	123
(%)	54,47%	45,53%	100,00%

Contenido de las celdas:

Frecuencia Observada

Porcentaje de la Tabla

**Gráfico 11: Gráfico de mosaico para calibrador según método**



Ya que las combinaciones más usadas son las que corresponden a el método de precipitación previa (PP) calibrado con calibrador no proteico (NP) o el proteico (P) y el método homogéneo (H) calibrado con calibrador proteico (P) se puede ver cómo se comportan estos sistemas. El más extremo es ver el comportamiento de los métodos con PP calibrados con calibradores NP frente a los métodos H calibrados con calibradores P (Gráfico. 12).

**Comparación entre las curvas de regresión para las combinaciones entre métodos y calibradores más comunes:**

**Método con precipitación previa (PP) & Calibrador no proteico (NP)**

**Método homogéneo (H) & Calibrador proteico (P).**

Número de casos completos: 123

Número de líneas de regresión: 2

**Tabla XXIX: Análisis de Regresión Múltiple para procedimiento PP/NP vs. H/P**

		<i>Error</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Estándar</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
CONSTANTE	10,5015	3,52747	2,97707	0,0035
VR	0,740824	0,0662737	11,1783	0,0000
Met=1&Cal=1 Met=2&Cal=2=1	-2,02494	5,54539	-0,365157	0,7156
VR*Met=1&Cal=1 Met=2&Cal=2=1	0,167806	0,100022	1,67769	0,0960

**Tabla XXX: Coeficientes para procedimiento PP/NP vs. H/P**

<i>Met=1&amp;Cal=1 Met=2&amp;Cal=2</i>	<i>Intercepto</i>	<i>Pendiente</i>
0	10,5015	0,740824
1	8,47659	0,90863

**Tabla XXXI: Análisis de Varianza para procedimiento PP/NP vs. H/P**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	17876,2	3	5958,74	110,99	0,0000
Residuo	6388,53	119	53,6851		
Total (Corr.)	24264,7	122			

R-Cuadrada = 73,6716 por ciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 73,0078 por ciento

Error estándar del est. = 7,32701

Error medio absoluto = 5,74499

Estadístico Durbin-Watson = 1,58199 (P=0,0099)

Autocorrelación residual de retardo 1 = 0,206148

Cuando Met=PP&Cal=NP el modelo se reduce a

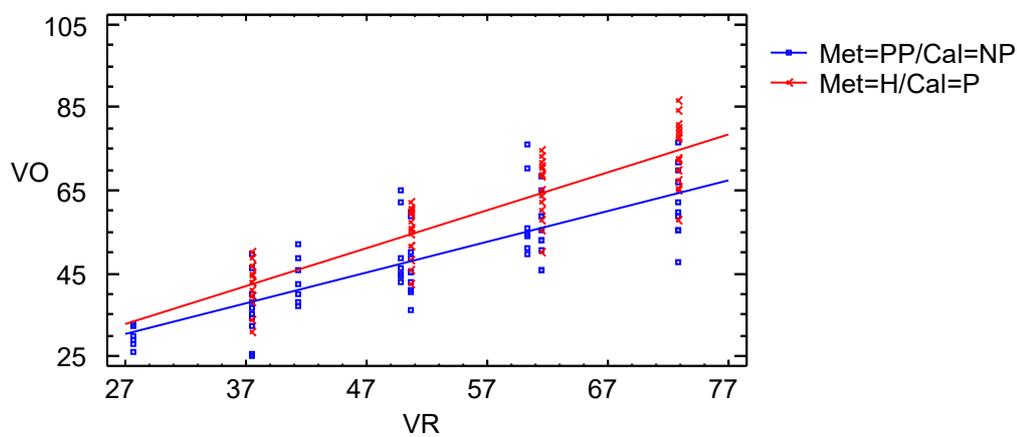
$$\mathbf{VO\_PP/NP = 10,5015 + 0,740824*VR}$$

Cuando Met=H&Cal=P el modelo se reduce a

$$VO_{H/P} = 8,47659 + 0,90863*VR$$

Como el valor-P de la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfica 12: Regresión Lineal Múltiple Ajustado VO[mg%] vs, VR[mg%] para: Met: PP y Cal: NP,/Met:: H y Cal: P**



**Tabla XXXII: ANOVA Adicional para Variables Según el Orden de Introducción para procedimiento PP/NP vs. H/P**

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
VR	16264,3	1	16264,3	302,96	0,0000
Interceptos	1460,83	1	1460,83	27,21	0,0000
Pendientes	151,104	1	151,104	2,81	0,0960
Modelo	17876,2	3			

Dado que el valor-P para las pendientes es menor que 0,1, existen diferencias estadísticas entre las pendientes para los distintos valores de Met=1&Cal=1|Met=2&Cal=2 con un nivel de confianza del 90%. Dado el valor-P para los interceptos es menor que 0,01, existen diferencias estadísticamente

significativas entre los interceptos para los diferentes valores de  $Met=1\&Cal=1|Met=2\&Cal=2$  con un nivel de confianza del 99%.

**Método con precipitación previa (PP) & Calibrador no proteico (NP)**

**Método con precipitación previa (PP) & Calibrador proteico (P).**

**Número de casos completos: 123**

**Número de líneas de regresión: 2**

**Tabla XXXIII: Análisis de Regresión Múltiple para procedimiento PP/NP vs. PP/P**

		<i>Error</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Estándar</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
CONSTANTE	6,30896	3,15156	2,00185	0,0476
VR	0,913111	0,0569344	16,0379	0,0000
$Met=1\&Cal=1 Met=1\&Cal=2=1$	8,35231	6,37545	1,31007	0,1927
$VR*Met=1\&Cal=1 Met=1\&Cal=2=1$	-0,290554	0,117338	-2,4762	0,0147

**Tabla XXXIV: Coeficientes para procedimiento PP/NP vs. PP/P**

$Met=1\&Cal=1 Met=1\&Cal=2$	<i>Intercepto</i>	<i>Pendiente</i>
0	6,30896	0,913111
1	14,6613	0,622557

**Tabla XXXV: Análisis de Varianza para procedimiento PP/NP vs. PP/P**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	17697,7	3	5899,22	106,90	0,0000
Residuo	6567,07	119	55,1855		
Total (Corr.)	24264,7	122			

R-Cuadrada = 72,9358 porciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 72,2535 porciento

Error estándar del est. = 7,42869

Error medio absoluto = 6,0388

Estadístico Durbin-Watson = 1,59489 (P=0,0120)

Autocorrelación residual de retardo 1 = 0,196276

Cuando Met=PP&Cal=NP el modelo se reduce a

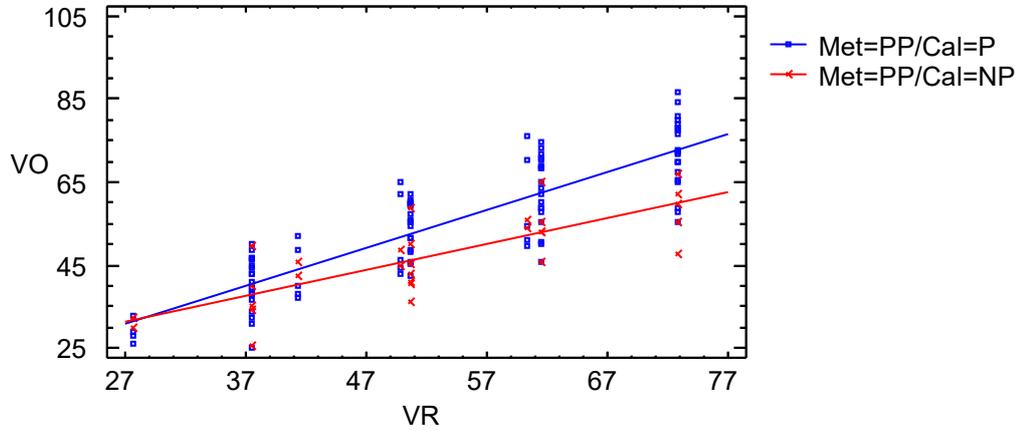
$$\mathbf{VO\_PP/P = 6,30896 + 0,913111*VR}$$

Cuando Met=PP&Cal=NP el modelo se reduce a

$$\mathbf{VO\_PP/NP = 14,6613 + 0,622557*VR}$$

Como el valor-P de la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfica: 13, Regresión Lineal Múltiple Ajustado VO[mg/dl] vs, VR[mg/dl] para: Met: PP y Cal: NP, / Met:PP y Cal: P**



**Tabla XXXVI: ANOVA Adicional para Variables Según el Orden de Introducción para procedimiento PP/NP vs. PP/P**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
VR	16264,3	1	16264,3	294,72	0,0000
Interceptos	1095,02	1	1095,02	19,84	0,0000
Pendientes	338,374	1	338,374	6,13	0,0147
Modelo	17697,7	3			

Dado que el valor-P para las pendientes es menor que 0,05, existen diferencias estadísticas entre las pendientes para los distintos valores de Met=PP&Cal=NP|Met=PP&Cal=P con un nivel de confianza del 95%. Dado el valor-P para los interceptos es menor que 0,01, existen diferencias estadísticamente significativas entre los interceptos para los diferentes valores de Met=PP&Cal=NP|Met=PP&Cal=P con un nivel de confianza del 99%.

**Método con precipitación previa (PP) & Calibrador no proteico (P)**

**Método con precipitación previa (H) & Calibrador proteico (P).**

Número de casos completos: 123

Número de líneas de regresión: 2

**Tabla XXXVII: Análisis de Regresión Múltiple para procedimiento PP/P vs. PP/H**

		<i>Error</i>	<i>Estadístico</i>	
<i>Parámetro</i>	<i>Estimado</i>	<i>Estándar</i>	<i>T</i>	<i>Valor-P</i>
CONSTANTE	6,89483	5,14241	1,34078	0,1825
VR	0,844368	0,0978081	8,6329	0,0000
Met=1&Cal=2 Met=2&Cal=2=1	1,94255	6,35102	0,305865	0,7602
VR*Met=1&Cal=2 Met=2&Cal=2=1	0,00130025	0,118269	0,010994	0,9912

**Tabla XXXVIII: Coeficientes para procedimiento PP/P vs. PP/H**

<i>Met=1&amp;Cal=2 Met=2&amp;Cal=2</i>	<i>Intercepto</i>	<i>Pendiente</i>
0	6,89483	0,844368
1	8,83738	0,845668

**Tabla XXXIX: Análisis de Varianza para procedimiento PP/P vs. PP/H**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	16367,1	3	5455,71	82,21	0,0000
Residuo	7897,6	119	66,3664		
Total (Corr.)	24264,7	122			

R-Cuadrada = 67,4524 porciento

R-Cuadrada (ajustada por g.l.) = 66,6318 porciento

Error estándar del est. = 8,14656

Error medio absoluto = 6,58197

Estadístico Durbin-Watson = 1,35919 (P=0,0001)

Autocorrelación residual de retardo 1 = 0,316996

Cuando Met=PP&Cal=P el modelo se reduce a

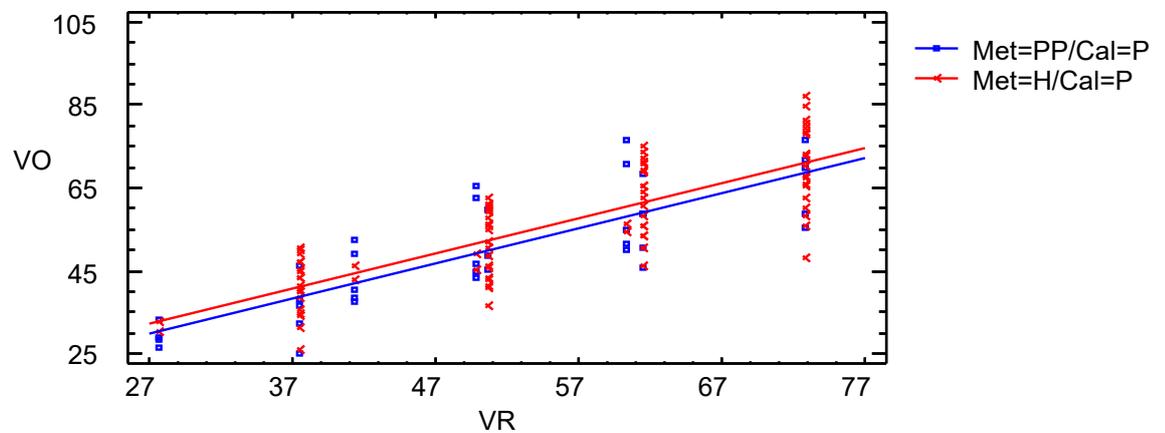
$$VO_{P/P} = 6,89483 + 0,844368*VR$$

Cuando Met=H&Cal=P, el modelo se reduce a

$$VO_{H/P} = 8,83738 + 0,845668*VR$$

Como el valor-P de la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95,0%.

**Gráfico 14: Regresión Lineal Múltiple Ajustado VO[mg] vs, VR[mg%] para: Met: PP y Cal: P, /Met:H y Cal: P**



**Tabla XL: ANOVA Adicional para Variables Según el Orden de Introducción para procedimiento PP/P vs. PP/H**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
VR	16264,3	1	16264,3	245,07	0,0000
Interceptos	102,855	1	102,855	1,55	0,2156
Pendientes	0,0080216	1	0,0080216	0,00	0,9912

Modelo	16367,1	3			
--------	---------	---	--	--	--

Dado que el valor-P para las pendientes es mayor que 0,1, no existen diferencias estadísticas entre las pendientes para los distintos valores de  $Met=PP\&Cal=P|Met=H\&Cal=P$  con un nivel de confianza del 90% o mayor. Dado el valor-P para los interceptos es mayor que 0,1, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los interceptos para los diferentes valores de  $Met=PP\&Cal=P|Met=H\&Cal=P$  con un nivel de confianza del 90% o mayor.

**Tabla XLI: Análisis de comparación de regresión múltiple para PP/P vs. H/P , PP/NP vs. PP/P y PP/P vs. H/P**

Sistema	Método	Calibrador	R <sup>2</sup>	pendiente	intersección	p-valor pendiente	p-valor intersección
1	PP	NP	0,736716	0,74	10,5	0,0960(<0,1)	0,0000(<0,01)
	H	P		0,91	8,47		
2	PP	NP	0,729358	0,91	6,30	0.0147(<0,1)	0.0000(<0,01)
	PP	P		0,62	14,7		
3	PP	P	0,654524	0,84	6,89	0,9912(<0,1)	0,2156(<0,1)
	H	P		0,84	8,83		

El efecto directo de los resultados de cada laboratorio sobre el ES puede verse en los gráficos tipo Youden (Gráficos. 15 a 19) para cada una de las posibles combinaciones de los 4 niveles de concentración.

Los gráficos de Youden dan una imagen descriptiva del tipo de error que se comete y del grado de desviación de los valores de consenso respecto a los de referencia: El punto verde indica el cruce de los valores de referencia y el recuadro verde indica el intervalo de  $\pm 5,0\%$ . El punto rojo indica el cruce de los valores de consenso obtenidos por los laboratorios.

Gráfico 15: Gráfico de Youden para nivel 37.5 (mg/dl) vs. 50.6 (mg/dl)

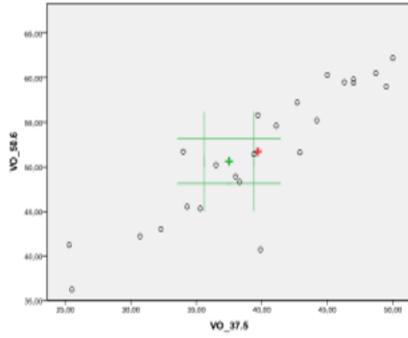


Gráfico 16: Gráfico de Youden para nivel 37.5 (mg/dl) vs. 61.5 (mg/dl)

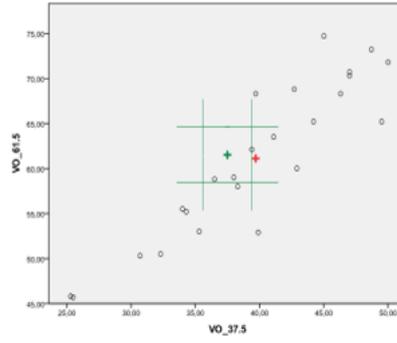


Gráfico 17: Gráfico de Youden para nivel 61.5 (mg/dl) vs. 72.8 (mg/dl)

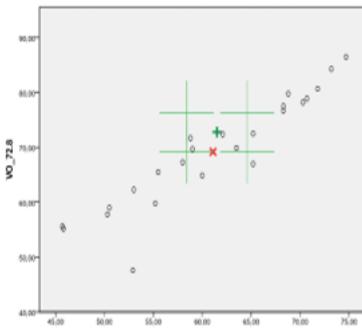


Gráfico 18: Gráfico de Youden para nivel 50.6 (mg/dl) vs. 61.5 (mg/dl)

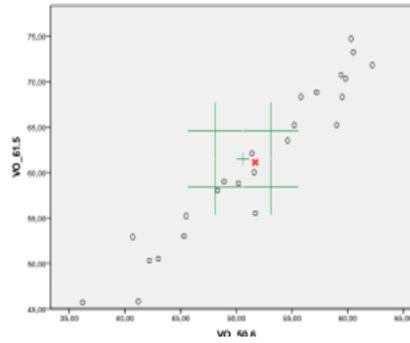
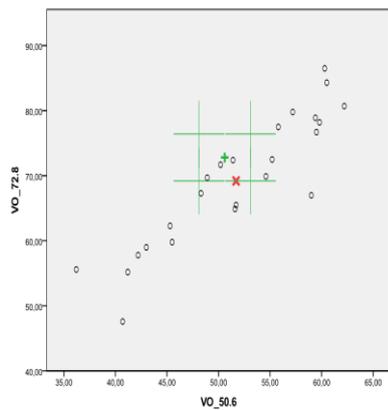


Gráfico 19: Gráfico de Youden para nivel 50.6 (mg/dl) vs. 72.8 (mg/dl)



Desde el punto de vista estadístico el Test de Student para las diferencias de los valores de consenso y los respectivos valores de referencia da:

**Tabla XLII: Test de Student prueba para una muestra para diferencia de los valores de consenso vs. VR: 37.5 mg/dl**

	Valor de prueba = 37.5					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
VO_37.5	1,552	23	,134	2,23333	-,7444	5,2111

**Tabla XLIII: Test de Student prueba para una muestra para diferencia de los valores de consenso vs. VR: 50.6 mg/dl**

	Valor de prueba = 50.6					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
VO_50.6	,685	23	,500	1,05417	-2,1289	4,2372

**Tabla XLIV: Test de Student prueba para una muestra para diferencia de los valores de consenso vs. VR: 61.5 mg/dl**

	Valor de prueba = 61.5					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
VO_61.5	-,216	23	,831	-,38333	-4,0622	3,2955

**Tabla XLV: Test de Student prueba para una muestra para diferencia de los valores de consenso vs. VR: 72.8 mg/dl**

	Valor de prueba = 72.8					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
VO_72.8	-1,742	23	,095	-3,60000	-7,8759	,6759

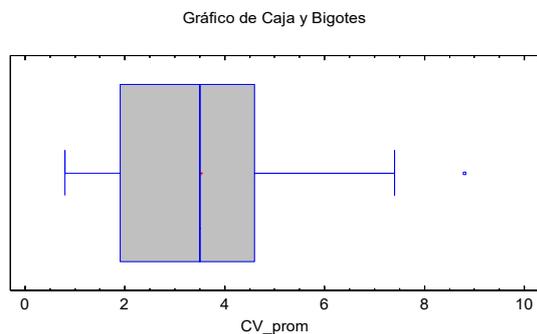
No obteniéndose diferencia significativa para cada uno de ellos.

Una medida del error aleatorio es el CV de los 32 sistemas analíticos estudiados se obtiene que:

**Tabla XLVI: Resumen Estadístico para CV\_prom**

Promedio	3,525
Desviación Estándar	1,92773
Coefficiente de Variación	54,6873%
Mínimo	0,8
Máximo	8,8
Rango	8,0

## Gráfico 20: Diagrama de cajas y bigotes para la distribución del CV



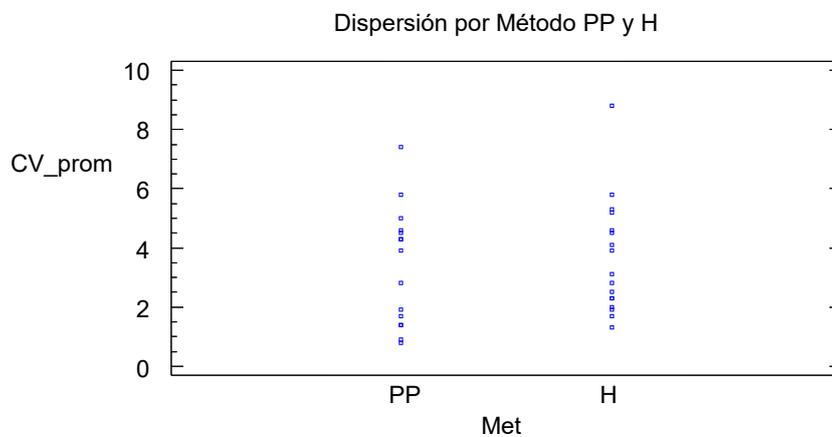
Para ver cuál es el comportamiento del CV con los métodos se hace un ANOVA:

**Tabla XLVII: ANOVA para CV\_prom por Met PP vs. H**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,593647	1	0,593647	0,16	0,6962
Intra grupos	114,606	30	3,82021		
Total (Corr.)	115,2	31			

Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de CV\_prom entre un nivel de Met y otro, con un nivel del 95,0% de confianza.

**Gráfico 21: Dispersión por método según PP y H**



## **5. Discusión y Conclusiones**

## **Evaluación del estado del arte:**

Los laboratorios en general tienen dos estrategias de trabajo de acuerdo a los materiales y métodos que se encuentran en el mercado. Una es usar los métodos de precipitación previa, eliminando de esta manera las apoB lipoproteínas enriquecidas en TG y midiendo en el sobrenadante el colesterol asociado a las HDL. Estos procedimientos son en general más laboriosos, engorrosos, llevan mayor volumen de muestra y la reacción de color puede hacerse espectrofotométricamente usando en general el calibrador no proteico comercial de los equipos para determinación de colesterol total que es una solución alcohólica de colesterol en concentraciones del orden de los 200 mg/dl. Otra posibilidad es medir la reacción de color en analizadores automáticos usando calibrador con base proteica de características más conmutables con las muestras humanas y que según el fabricante tiene valores asignados para HDL-Col en concentraciones que están en el orden de las que se encuentran en las muestras biológicas.

Otra posibilidad metodológica es el uso de los métodos homogéneos en donde el proceso de separación de las lipoproteínas y la reacción de color se hacen en una misma fase sin necesidad de separación previa. Estos métodos, de última generación son más rápidos, llevan menos muestras y están sometidos a menos errores de origen volumétricos, de operador, etc. Una ventaja adicional es que son totalmente automatizables y son calibrados con calibradores en base sérica provistos por los fabricantes de reactivos.

Una comparación global que no discrimina ni en métodos ni en el tipo de calibrador arroja que hay una marcada tendencia al error mixto en los laboratorios, esto es a una combinación de errores sistemáticos proporcional y constante (Graf. 1 y 2) ( $VO = 7,8 + 0,85 \cdot VR$ ).

En busca de explicar los motivos de estos resultados se encuentra que no es el mismo desempeño de los métodos cuando se los evalúa en un sistema de regresión múltiple encontrándose diferencias significativas tanto para las pendientes como para las ordenadas al origen cuando se tratan métodos con

precipitación previa enfrentados a los homogéneos (Graf. 3, 4, 5 y 6) encontrándose una mayor tendencia al error mixto en los métodos con precipitación previa que en los homogéneos. De los parámetros de evaluación propuestos por el CRMLN solo el ES(%) marca una diferencia significativa para las medias entre los métodos (Tabla XXI y Graf. 8) lo que indica una marcada tendencia en el error de cada método coincidiendo con la tendencia de la regresión lineal ya que se obtienen valores significativamente menores para los métodos homogéneos (-7,3%) respecto a los de precipitación previa (4,0%). El parámetro del ES\_prom que resulta de promediar cada uno de los ES para cada suero manteniendo su valor no es reflejo de la diferencia de desempeño entre los métodos porque laboratorios con ES de diferentes signos para los diferentes sueros se anulan entre sí, pero es característico que para los métodos con precipitación previa el valor del ES\_prom es muy similar al del ES (%) (4,0) a diferencia del valor obtenido para los métodos homogéneos que pasa de ES -7,7 a 2,93 lo que indica que en los métodos de precipitación previa hay mayor tendencia a obtener diferencias en un mismo sentido hacia valores mayores a los de referencia y en los métodos homogéneos los laboratorios obtienen valores de ES en ambos sentidos positivos y negativos.

Si se considera como posible variación de los resultados solo la influencia del tipo de calibrador entre no proteico (NP) y proteico (P) no hay diferencias significativas entre ambos cuando se comparan indiscriminadamente los resultados (Graf.8) lo que demostraría que puede haber una relación entre método y tipo de calibrador. Las combinaciones más comunes de sistemas analíticos son (Graf.9 y 10) aquellas que incluyen métodos con precipitación previa (PP) con el calibrador NP o P y los métodos homogéneos (H) con calibrador P.

La única combinación que presenta diferencias significativas es aquella en el que el calibrador es NP para ambos métodos (Tabla XLI). Siempre que se compara sistemas analíticos entre NP y P se encuentran diferencias significativas, una muestra del efecto matriz del calibrador para un mensurando tan complejo como una lipoproteína que se presenta en las muestras biológicas a concentraciones menores a la que los calibradores NP se usan.

De los datos estadísticos entre los valores de referencia y los valores obtenidos de los laboratorios no se encuentran diferencias significativas para ninguno de los niveles pero en las gráficas de Youden (Graf. 15 a 19) puede verse la marcada tendencia al error sistemático en la medida. Las combinaciones del Graf, 15 y 16 muestran valores promedios por fuera de los criterios de aceptabilidad del NCEP lo que marca una diferencia en la evaluación de los resultados, es probable que la interpretación estadística mejore respecto a la clínica habiendo tenido más sistemas analíticos para evaluar

Respecto al CV no hay diferencias significativas entre los diferentes métodos.

Si nos acotamos a los criterios de aceptabilidad del CRMLN (Tabla IX) para la certificación del mensurando solo un sistema de los 32 estudiados cumple con todas las condiciones. Los sistemas analíticos 9, 15, 21 y 32 pueden ser cerrados debido a que no se tiene de ninguno de ellos datos de trazabilidad del calibrador y/o del equipamiento usado, y/o del sistema de CCI. El resto de los sistemas analíticos son abiertos. Es decir que tanto los reactivos, los calibradores, el sistema de control no son de un mismo fabricante y por lo tanto no se tiene información fehaciente sobre la trazabilidad del valor asignado del calibrador, la incertidumbre y las características de conmutabilidad para el sistema analítico estudiado.

En conclusión, hay diferencias analíticas de resultados en la medida entre los métodos de PP y los H que se manifiestan en un marcado error de tipo mixto, es decir en la combinación de error sistemático proporcional y constante. La causa probable a estos es la falta de calibración en las mediciones, hecho que se ve fundamentalmente cuando los primeros se los calibra con calibradores NP (falta de conmutabilidad, falta de trazabilidad al valor asignado, valor asignado correcto pero no aplicable) El error constante es básicamente producto de las inespecificidades que pueden ser atribuibles a problemas instrumentales o a la falta de conmutabilidad de los calibradores P de los cuales es difícil obtener información de los fabricantes o a propias de los principios activos de las reacciones. Cuando se enfrentan estos sistemas con material de referencia

como el suero humano congelado libre de interferentes es cuando se hacen notorias estas diferencias.

### **Estandarización de la medida de HDL-Col:**

Lamentablemente hubo poca adherencia de los participantes al uso del calibrador provisto HC1Cal. Las causas a este fenómeno residen en:

- Poca claridad del instructivo sobre manejo, procesamiento y utilidad del mismo
  - Haberlo procesado como una muestra
  - Incumplimiento de la cadena de frío, etc.
- Poca adherencia a volver a hacer la prueba con el envío de un nuevo juego de muestras.
- No informar los resultados a tiempo para poder calibrar y reevaluar el remanente de muestras enviadas.

Ante la imposibilidad de poder corregir los sistemas se decidió hacer una recalibración usando 2 de las muestras coincidiendo con aquellas con niveles de concentración que están próximos a los puntos críticos para el diagnóstico y seguimiento de las dislipémia relacionadas con el HDL-Col, de acuerdo a esto se tomaron las muestras con valores cercanos a 40.0 mg/dL y 60.0 mg/dL.

Con los valores informados para esos niveles y los de referencia se trazó el polinomio de primer grado que mejor ajustaba y se obtuvieron los parámetros de pendiente y ordenada al origen con los que se recalcularon todos los valores informados.

Para la evaluación se hizo una comparación de las curvas de regresión lineal antes y después del recalcu con la nueva recta de corrección

Del análisis surge que: Hay datos aquí que son resultados

- 24 de los 32 sistemas analíticos tienen cambios significativos para la pendiente ( $p_v \leq 0.01$ ) y/o para la intersección con el eje de VR ( $p_v \leq 0.001$ ).

- 18 de los 32 sistemas analíticos lo tienen en ambos lo que genera una corrección en el error de tipo sistemático mixto.
- 6 de los 32 sistemas analíticos solo corrigen el error sistemático constante manifestado en la ordenada al origen.
- 3 de los 32 sistemas analíticos corrigen en la pendiente, signo de modificación en el error sistemático proporcional.
- 21 de los 32 sistemas analíticos tenían antes de la recalibración error total por encima de lo requerido por el CRMLN de 5.0%, para ambos puntos de decisión clínica de 40.0 mg/dl y 60.0 mg/dl respectivamente, 19 de ellos llevaron su nivel de error a menos del 5.0 % después de la corrección de los datos.

Se les suministro a cada laboratorio la recta de corrección y se les sugirió:

1. Corregir todos los datos de los pacientes en base a la recta de corrección.
2. Corregir el valor del calibrador comercial con la recta de corrección. Y evaluar este nuevo desempeño con el sistema de CCI y el servicio de CCE
3. Evaluar la posibilidad de corrección de los resultados de los pacientes a criterio del profesional responsable ante la demanda del cuadro o situación clínica.
4. Se sugiere un procedimiento de validación o verificación según corresponda

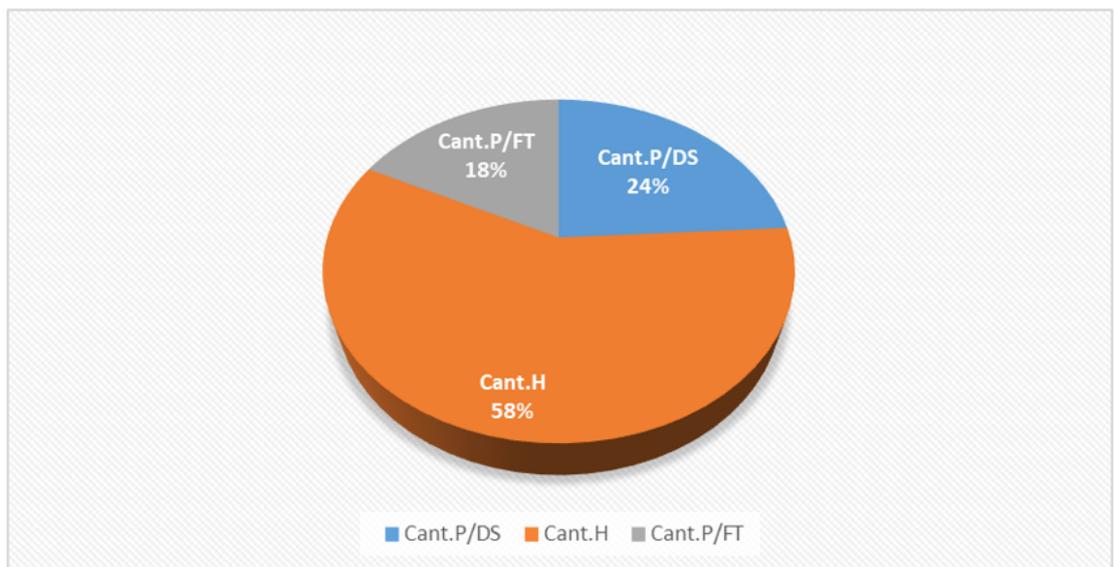
Ningún laboratorio reportó cual fue la pauta que siguió

Sería importante que se disponga de este tipo de calibrador, que sea más accesible a los laboratorios. Una manera de armonizar los datos de laboratorios es tener acceso a los métodos de jerarquía superior de modo de independizarse de las posibles variaciones en las combinaciones de sistemas heterogéneos ya que no se dispone en el mercado de accesibilidad a los procedimientos homogéneos ni certificados de fábrica.

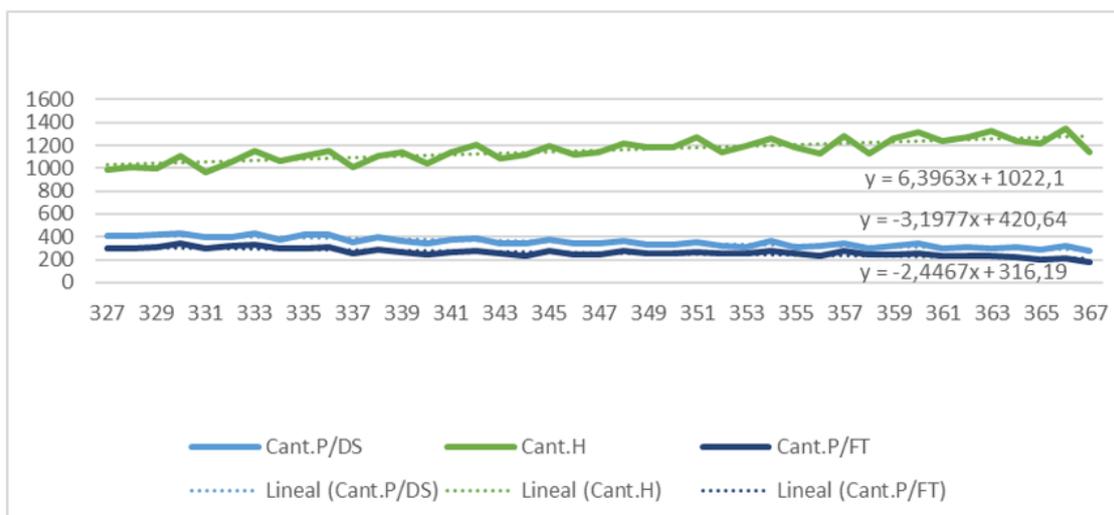
A modo de comparación en el Gráfico 22 se muestra una distribución más ampliada sobre un total de 2027 sistemas analíticos distribuidos en todo el país,

Las proporciones de métodos son similares a las evaluadas en la región, pero se encuentra una notable proyección hasta la actualidad donde se ha venido viendo un cambio en el estado del arte de la determinación según se muestra Gráfico 23 y 24

**Gráfico 22: Distribución de sistemas analíticos entre los laboratorios (todo el país)**

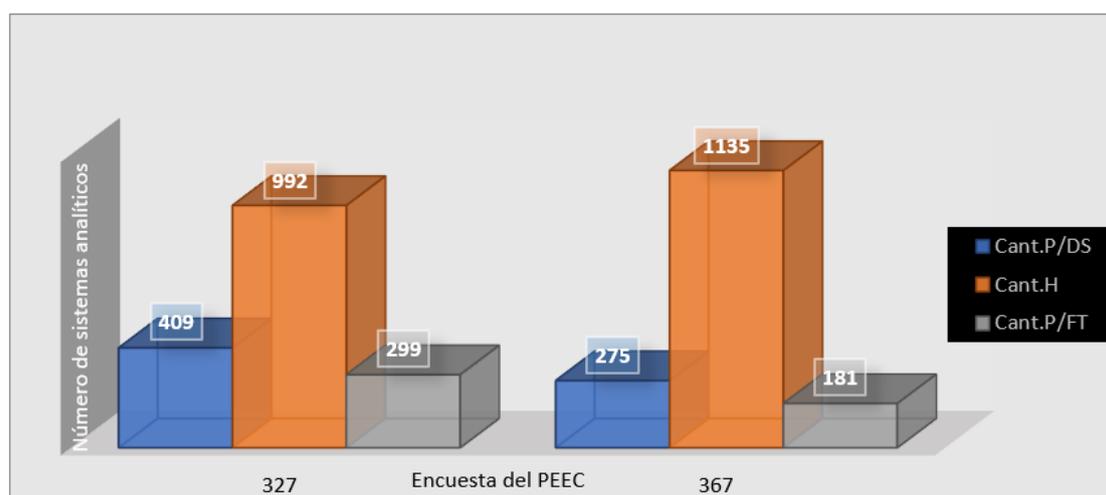


**Gráfico 23: Variación en el número de métodos en los últimos 40 meses (todo el país)**



Si bien no hay diferencias significativas entre los números de sistema analíticos se ve una tendencia positiva en estos últimos años al traspaso de tecnología de los métodos de precipitación previa a los métodos homogéneos. Esto se debe a varios factores.

**Gráfico 24: Distribución de métodos en los últimos 4 años (todo el país)**



- Mayor presencia en el mercado de sistemas automatizados. Los equipos automatizados junto con los sistemas informáticos de laboratorio han venido instalándose con mayor asiduidad en los laboratorios clínicos.
- Mayor demanda del mensurando. Desde la descripción del mensurando, de su importancia en el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de la ECV ha venido siendo junto con el LDL-Col un parámetro incluyente en la demanda médica.
- Necesidad de mejora continua del desempeño de los laboratorios. Habida cuenta los resultados de las encuestas de evaluación externa.
- Mayor oferta comercial de procedimientos homogéneos.
- Costos más accesibles.

Para optimizar el desempeño de los laboratorios clínicos en la medida del HDL-Col y proveer un servicio de información de calidad al equipo médico garantizando la seguridad del paciente es recomendable que los resultados emitidos sean comparables y validos entre laboratorios y dentro de un mismo

laboratorio en el tiempo. Para lograr esto se necesita la estandarización de los procedimientos de medida y la trazabilidad de los resultados. Es recomendable y es responsabilidad de los laboratorios clínicos el uso de calibradores séricos con valor asignado trazable a la mayor jerarquía analítica posible proveídos por la industria, el uso de procedimientos analíticos con menor dependencia de variables analíticas como los procedimientos homogéneos y tener un sistema de control de la calidad externa e interna sistemáticamente instalado para el mesurando. Ante la presencia de variaciones en el desempeño analítico es necesario la validación de los nuevos resultados frente a materiales y métodos adecuados como son los materiales de referencia certificados con valor asignado por métodos de referencia consensuados internacionalmente.

## **6. Bibliografia**

- 
- <sup>1</sup> Yao L, Heubi JE, Buckley DD, Fierra H, Setchell KDR, Granholm NA, et al. Separation of micelles and vesicles within luminal aspirates from healthy humans: solubilization of cholesterol after a meal. *J Lipid Res.* 2002;43:654-660.
- <sup>2</sup> Lowe ME. Pancreatic triglyceride lipase and colipase: insights into dietary fat digestion. *Gastroenterology.* 1994;107 (5):1524-1536.
- <sup>3</sup> Howles PN, Carter CP, Hui DY. Dietary free and esterified cholesterol absorption in cholesterol esterase (bile salt stimulated lipase) genotargeted mice. *J Biol Chem.* 1996;271 (12):7196-7202.
- <sup>4</sup> Stange, EF.; Dietschy, JM. Cholesterol Absorption and Metabolism by the Intestinal Epithelium. In: Danielsson, H.; Sjövall, J., editors. *Sterols and Bile Acids.* New York: Elsevier Science Publishers; 1985.
- <sup>5</sup> Turley SD, Dietschy JM. Sterol absorption by the small intestine. *Curr Opin Lipidol* 2003;14 (3):233–240.
- <sup>6</sup> Garcia-Calvo M, Lisnock J, Bull HG, Hawes BE, Burnett DA, Braun MP et al. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102 (23):8132-8137.
- <sup>7</sup> Altmann SW, Davis HR, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, et al. Niemann-Pick C1 like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science.* 2004;303(5661):1201-1214
- <sup>8</sup> Cohen JC, Pertsemlidis A, Fahmi S, Esmail S, Vega GL, Grundy SM, et al. Multiple rare variants in NPC1L1 associated with reduced sterol absorption and plasma low-density lipoprotein levels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103 (6):1810-1815.

---

<sup>9</sup> Berge KE, Tian H, Grad GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, et al. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science*. 2000;290 (5497): 1771-1775.

<sup>10</sup> Yu XH, Qian K, Jiang N, Zheng XL, Cayabyab FS, Tang CK. ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2014;428:82-88.

<sup>11</sup> Hui DY, Howles PN. Molecular mechanisms of cholesterol absorption and transport in the intestine. *Semin Cell Dev Biol*. 2005;16 (2):183-192.

<sup>12</sup> Turley SD. The role of Niemann-Pick C1 - Like 1 (NPC1L1) in intestinal sterol absorption. *J Clin Lipidol*. 2008;2(2):S20-S28.

<sup>13</sup> Pirillo A, Catapano AL, Norata GD. Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) Inhibition and Cardiovascular Diseases. *Curr Med Chem*. 2016;23(10):983-99.

<sup>14</sup> Davis HR Jr, Altmann SW. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) an intestinal sterol transporter. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1791(7):679-83.

<sup>15</sup> Purdy BH, Field FJ. Regulation of acylcoenzyme A. Cholesterol acyltransferase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity by lipoproteins in the intestine of parabiont rats. *J Clin Invest*. 1984;74 (2):351-357.

<sup>16</sup> Hui DY, Howles PN. Molecular mechanisms of cholesterol absorption and transport in the intestine. *Semin Cell Dev Biol*. 2005;16 (2):183-192.

<sup>17</sup> Tennyson GE, Sabatos CA, Higuchi K, Meglin N, Brewer HB Jr. Expression of apolipoprotein B mRNAs encoding higher- and lower-molecular weight isoproteins in rat liver and intestine.. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86 (2):500-504.

<sup>18</sup> Sabesin SM, Frase S. Electron microscopic studies of the assembly, intracellular transport, and secretion of chylomicrons by rat intestine. *J lipid res*. 1977;18(4):456-511.

---

<sup>19</sup> Tennyson GE, Sabatos CA, Higuchi K, Meglin N, Brewer HB Jr. Expression of apolipoprotein B mRNAs encoding higher- and lower-molecular weight isoforms in rat liver and intestine.. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86 (2):500-504.

<sup>20</sup>. Basu D, Goldberg IJ. Regulation of lipoprotein lipase-mediated lipolysis of triglycerides. *Curr Opin Lipidol*. 2020 Jun;31(3):154-160. doi: 10.1097/MOL.0000000000000676. PMID: 32332431; PMCID: PMC7478854.

<sup>21</sup> Takagi A, Ikeda Y, Takeda E, Yamamoto A. A newly identified lipoprotein lipase (LPL) gene mutation (F270L) in a Japanese patient with familial LPL deficiency. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1502 (3):433-446.

<sup>22</sup> Herz J, Qiu SQ, Oesterle A, DeSilva HV, Shafi S, Havel RJ. Initial hepatic removal of chylomicron remnants is unaffected but endocytosis is delayed in mice lacking the low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92 (10):4611-4615.

<sup>23</sup> Kobayashi K, Oka K, Forte T, Ishida B, Teng B, Ishimura-Oka K, et al. Reversal of Hypercholesterolemia in Low Density Lipoprotein Receptor Knockout Mice by Adenovirus-mediated Gene Transfer of the Very Low Density Lipoprotein Receptor. *J Biol Chem*. 1996;271 (12):6852-6860.

<sup>24</sup> Ginsberg HN. Lipoprotein metabolism and its relationship to atherosclerosis. *Med Clin North Am*. 1994;78 (1):1-20.

<sup>25</sup> Mahley RW, Rall SC Jr. Apolipoprotein E: far more than a lipid transport protein. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2000;1:507–537.

<sup>26</sup> Wu K, Bowman R, Welch AA, Luben RN, Wareham N, Khaw KT, et al. Apolipoprotein E polymorphisms, dietary fat and fibre, and serum lipids: the EPIC Norfolk study. *Eur Heart J*. 2007;28 (23):2930-2936

---

<sup>27</sup>Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. 1992;258 (5081):468-471.

<sup>28</sup> Mahley, RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 1988;240 (4852):622-630.

<sup>29</sup> Rosenson RS, Brewer HB, Chapman J, Fazio S, Hussain M, Kontush A, et al. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clin Chem*. 2011;57 (3):392–410.

<sup>30</sup> Wu Z, Wagner MA, Lemire Z, Parks JS, Shy JM 3rd, Smith JD, et al. The refined structure of nascent HDL reveals a key functional domain for particle maturation and dysfunction. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14 (9):861-868.

<sup>31</sup> Silva RA, Huang R, Morris J, Fang J, Gracheva EO, Ren G, et al. Structure of apolipoprotein A-I in spherical high density lipoproteins of different sizes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105 (34):12176–12181.

<sup>32</sup> Fielding CJ, Shore VG, Fielding PE. A protein cofactor of lecithin: cholesterol acyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1972;46 (4):1493-1498.

.

<sup>33</sup> Wang N, Silver DL, Costet P, Tall AR. Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1.. *J Biol Chem*. 2000;275 (42):33053-33058

<sup>34</sup> Rosenson RS, Brewer HB, Davidson WS, Fayad ZA, Fuster V, Goldstein J, et al. Cholesterol Efflux and Atheroprotection. Advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation*. 2012;125 (15):1905-1919.

<sup>35</sup> Rigotti A, Trigatti B, Babitt J, Penman M, Xu S, Krieger M. Scavenger receptor BI – a cell surface receptor for high density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol*. 1997;8 (3):181–188.

---

Rosenson RS, Brewer HB Jr, Davidson WS, Fayad ZA, Fuster V, Goldstein J, Hellerstein M, Jiang XC, Phillips MC, Rader DJ, Remaley AT, Rothblat GH, Tall AR, Yvan-Charvet L. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation*. 2012 Apr 17;125(15):1905-19. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.066589. PMID: 22508840; PMCID: PMC4159082.

<sup>37</sup> Morita SY, Okuhira K, Tsuchimoto N, Vertut-Doi A, Saito H, Nakano M, et al. Effects of sphingomyelin on apolipoprotein E- and lipoprotein lipasemediated cell uptake of lipid particles. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1631 (2):169–176.

<sup>38</sup> Bolin DJ, Jonas A. Sphingomyelin inhibits the lecithin-cholesterol acyltransferase reaction with reconstituted high density lipoproteins by decreasing enzyme binding. *J Biol Chem*. 1996;271 (32):19152–19158

<sup>39</sup> Subbaiah PV, Liu M. Role of sphingomyelin in the regulation of cholesterol esterification in the plasma lipoproteins: inhibition of lecithin-cholesterol acyltransferase reaction. *J Biol Chem*. 1993;268 (27): 20156–20163.

<sup>40</sup> Wang N, Silver DL, Costet P, Tall AR. Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1.. *J Biol Chem*. 2000;275 (42):33053-33058

<sup>41</sup> Schmitz G, Assmann G, Robenek H, Brennhausen B. Tangiers disease: A disorder of intracellular membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82 (18):6305-6309.

<sup>42</sup> Rothblat GH, Phillips MC. High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol*. 2010;21 (3): 229–238.

<sup>43</sup> Adorni MP, Zimetti F, Billheimer JT, Wang N, Rader DJ, Phillips MC, et al. The roles of different pathways in the release of cholesterol from macrophages. *J Lipid Res*. 2007;48 (11):2453–2462.

---

<sup>44</sup> Phillips MC, Johnson WJ, Rothblat GH. Mechanisms and consequences of cellular cholesterol exchange and transfer. *Biochim Biophys Acta*. 1987;906 (2):223–276

<sup>45</sup> Davidson WS, Rodriguez WV, Lund-Katz S, Johnson WJ, Rothblat GH, Phillips MC. Effects of acceptor particle size on the efflux of cellular free cholesterol. *J Biol Chem*. 1995;270 (29):17106–17113.

<sup>46</sup> Duong PT, Collins HL, Nickel M, Lund-Katz S, Rothblat GH, Phillips MC. Characterization of nascent HDL particles and microparticles formed by ABCA1-mediated efflux of cellular lipids to apoA-I. *J Lipid Res*. 2006;47 (4):832–843.

<sup>47</sup> Mulya A, Lee J-Y, Gebre AK, Thomas MJ, Colvin PL, Parks JS. Minimal lipidation of pre-beta HDL by ABCA1 results in reduced ability to interact with ABCA1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27 (8): 1828–1836.

<sup>48</sup> Schmitz G, Robenek H, Lohmann U, Assmann G. Interaction of high density lipoproteins with cholesteryl ester-laden macrophages: biochemical and morphological characterization of cell surface receptor binding, endocytosis and resecretion of high density lipoproteins by macrophages. *EMBO J*. 1985;4 (3):613–622

<sup>49</sup> Choi HY, Karten B, Chan T, Vance JE, Greer WL, Heidenreich RA, et al. Impaired ABCA1-dependent lipid efflux and hypoalphalipoproteinemia in human Niemann-Pick type C disease. *J Biol Chem*. 2003;278 (35):32569-32577.

<sup>50</sup> Schmitz G, Assmann G, Robenek H, Brennhausen B. Tangiers disease: A disorder of intracellular membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82:6305-6309. .

<sup>51</sup> Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Böttcher A, Diederich W, et al. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat genet*. 1999;22 (4):347-351

---

<sup>52</sup> Cohen JC, Kiss RC, Pertsemlidis A, Marcel YL, McPherson R, Hobbs HH. Multiple rare alleles contribute to low levels of plasma HDL cholesterol. *Science*. 2004;305 (5685):869-872.

<sup>53</sup> Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Jensen GB, Tybjaerg-Hansen A. Genetic variation in ABC transporter A1 contributes to HDL cholesterol in the general population. *J Clin Invest*. 2004;114 (9):1343-1353.

<sup>54</sup> Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CJ, Yasin M, et al. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2003;290 (17):2292–2300..

<sup>55</sup> Tardif JC, Grégoire J, L'Allier PL, Ibrahim R, Lespe'rance J, Heinonen TM, et al. Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2007; 297 (15):1675–1682.

<sup>56</sup> Sacks FM, Rudel LL, Conner A, Akeefe H, Kostner G, Baki T, et al. Selective delipidation of plasma HDL enhances reverse cholesterol transport in vivo. *J Lipid Res*. 2009;50 (5): 894–907.

<sup>57</sup> Vaughan J, Oram JF. ABCG1 redistributes cell cholesterol to domains removable by high density lipoprotein but not by lipid-depleted apolipoproteins. *J Biol Chem*. 2005;280 (34):30150–30157.

<sup>58</sup> Sankaranarayanan S, Oram JF, Asztalos BF, Vaughan AM, Lund-Katz S, Adorni MP, et al. Effects of acceptor composition and mechanism of ABCG1-mediated cellular free cholesterol efflux. *J Lipid Res*. 2009;50 (2):275–284.

<sup>59</sup> Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101 (26):9774–9779

---

<sup>60</sup> During A, Dawson HD, Harrison EH. Carotenoid transport is decreased and expression of the lipid transporters SR-BI, NPC1L1, and ABCA1 is downregulated in Caco-2 cells treated with ezetimibe. *J Nutr.* 2005 ;135(10):2305-12.

<sup>61</sup> Reboul E, Klein A, Bietrix F, Gleize B, Malezet-Desmoulins C, Schneider M, et al. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte. *J Biol Chem.* 2006;281(8):4739-45

<sup>62</sup> Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, de la Llera Moya M, Phillips MC, et al. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem.* 1997;272 (34): 20982–20985.

<sup>63</sup> Jian B, de la Llera-Moya M, Ji Y, Wang N, Phillips MC, Swaney JB, et al. Scavenger receptor class B type I as a mediator of cellular cholesterol efflux to lipoproteins and phospholipid acceptors. *J Biol Chem.* 1998;273 (10):5599–5606.

<sup>64</sup> Zhang Y, Zanotti I, Reilly MP, Glick JM, Rothblat GH, Rader DJ. Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. *Circulation.* 2003;108 (6): 661–663.

<sup>65</sup> Covey SD, Krieger M, Wang W, Penman M, Trigatti BL. Scavenger receptor class B type I-mediated protection against atherosclerosis in LDL receptor-negative mice involves its expression in bone marrow-derived cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23 (9):1589–1594.

<sup>66</sup> Van Eck M, Bos IS, Hildebrand RB, Van Rij BT, Van Berkel TJ. Dual role for scavenger receptor class B, type I on bone marrow-derived cells in atherosclerotic lesion development. *Am J Pathol.* 2004;165 (3):785–794.

<sup>67</sup> Brundert M, Heeren J, Bahar-Bayansar M, Ewert A, Moore KJ, Rinninger F. Selective uptake of HDL cholesteryl esters and cholesterol efflux from mouse peritoneal macrophages independent of SR-BI. *J Lipid Res.* 2006;47 (11):2408–2421.

---

<sup>68</sup> Yvan-Charvet L, Pagler TA, Wang N, Senokuchi T, Brundert M, Li H, et al. SR-BI inhibits ABCG1-stimulated net cholesterol efflux from cells to plasma HDL. *J Lipid Res.* 2008;49 (1):107–114.

<sup>69</sup> Wang X, Collins HL, Ranalletta M, Fuki IV, Rothblat GH, Tall AR, et al. Macrophage ABCA1 and ABCG1, but not SR-BI, promote macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest.* 2007;117 (8): 2216–2224.

<sup>70</sup> Ma Y, Ashraf MZ, Podrez EA. Scavenger receptor BI modulates platelet reactivity and thrombosis in dyslipidemia. *Blood.* 2010;116 (11):1932–1941.

<sup>71</sup> Matsuura F, Wang N, Chen W, Jiang X, Tall AR. HDL from CETP-deficient subjects shows enhanced ability to promote cholesterol efflux from macrophages in an apoE- and ABCG1-dependent pathway. *J Clin Invest.* 2006;116 (5):1435–1442.

<sup>72</sup> Mahley RW, Huang Y, Weisgraber KH. Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport. *J Clin Invest.* 2006;116 (5): 1226–1229.

<sup>73</sup> Frikke-Schmidt R, Nordestgaard BG, Jensen GB, Tybjaerg-Hansen A. Genetic variation in ABC transporter A1 contributes to HDL cholesterol in the general population. *J Clin Invest.* 2004;114 (9):1343-1353.

<sup>74</sup> Pattnaik NM, Montes A, Hughes LB, Zilversmit DB. Cholesteryl ester exchange protein in human plasma isolation and characterization. *Biochem Biophys Acta.* 1978;530:428-483

<sup>75</sup> Quinet E, Tall A, Ramakrishnan R, Rudel L. Plasma lipid transfer protein as a determinant of the atherogenicity of monkey plasma lipoproteins. *J Clin Invest.* 1991;87 (5):1559–1566.

---

<sup>76</sup> . Jauhiainen M, Metso J, Pahlman R, Blomqvist S, van Tol A, Ehnholm C. Human plasma phospholipid transfer protein causes high density lipoprotein conversion. *J Biol Chem.* 1993;268 (6):4032–4036

<sup>77</sup>Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, Marchadier D, Maugeais C, Doan K, et. al. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat Genet.* 1999;21 (4):424–428.

<sup>78</sup> Gordon T, Kannel WB, Castelli WP, Dawber TR. Lipoproteins, cardiovascular disease, and death: The Framingham study. *Arch Intern Med.* 1981;141(9): 1128–1131.

<sup>79</sup> The Lipid Research Clinics Program: The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial Results.I. Reduction in incidence of coronary heart disease. *JAMA.* 1984; 251 (3): 351–364.

<sup>80</sup> Stamler J, Wentworth D, and Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA.* 1986;256(20):2823–2828

<sup>81</sup> The Kyushu Lipid Intervention Study Group. A coronary primary intervention study of Japanese men: study design, implementation and baseline data. *JAtheroscler Thromb,*1996;3(2): 95–104.

<sup>82</sup> Yamamoto A, Richie G, Nakamura H, Hosoda S, Nobuyoshi M, Matsuzaki M, et. al. Risk factors for coronary heart disease in the Japanese-Comparison of the background of patients with acute coronary syndrome in the ASPAC study with data obtained from the general population. *JAtheroscler Thromb,*2002;9(4): 191–199

<sup>83</sup> Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the

---

Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*, 1994;344 (8934): 1383–1389.

<sup>84</sup> Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hipercolesterolemia West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med*. 1995; 333 (20): 1301–1307

<sup>85</sup> The Kyushu Lipid Intervention Study Group. Pravastatin use and risk of coronary events and cerebral infarction in Japanese men with moderate hipercolesterolemia: the Kyushu Lipid Intervention Study. *J Atheroscler Thromb*. 2000; 7 (2): 110–121.

<sup>86</sup> Ito H, Ouchi Y, Ohashi Y, Saito Y, Ishikawa T, Nakamura H, et al. A comparison of low versus standard dose pravastatin therapy for the prevention of cardiovascular events in the elderly: the Pravastatin Anti-atherosclerosis Trial in the elderly (PATE). *J Atheroscler Thromb*. 2001; 8 (2): 33–44.

<sup>87</sup> Saito Y, Shirai K, Sasaki N, Shinomiya M, Yoshida S, Committee of the Chiba Lipid Intervention Program Study. Prognosis of hypercholesterolemic patients taking ravastatin for five years: the Chiba Lipid Intervention Program (CLIP) Study. *J Atheroscler Thromb*. 2002; 9 (2): 99–108.

<sup>88</sup> Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies.. *N Engl J Med*. 1989; 321 (19): 1311–1316.

<sup>89</sup> Rapaport E, Bilheimer DW, Chobanian AV, Hajjar DP, Hawkins M, Hutchins GM, et al. Triglyceride, High-Density Lipoprotein, and Coronary Heart Disease. *JAMA*. 1993;269(4):505-10

<sup>90</sup> Kitamura A, Iso H, Naito Y, Iida M, Konishi M, Folsom AR, et al. High-density lipoprotein cholesterol and premature coronary heart disease in urban Japanese men. *Circulation*. 1994; 89 (6): 2533–2539.

---

<sup>91</sup> Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four prospective American studies. *Circulation*. 1989; 79 (1):8-15.

<sup>92</sup> Wilson PW, Garrison RJ, Castelli WP, Feinleib M, McNamara PM, Kannel WB. Prevalence of coronary heart disease in the Framingham Offspring Study: role of lipoprotein cholesterols. *Am J Cardiol*. 1980; 46 (4):649-54.

<sup>93</sup> Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, Huang Y. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* .1996; 124(suppl):S11-S20.

<sup>94</sup> Austin MA, King MC, Vranizan KM, Krauss RM. Atherogenic lipoprotein phenotype: a proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation* 1990;82 (2):495-506.

<sup>95</sup> Luc G, Bard JM, Poulain P, Arveiler D, Evans AE, Cambien F, et al. Relationship between low-density lipoprotein size and apolipoprotein A-I-containing particles: the ECTIM study. *Eur J Clin Invest* 1997;27 (3):242-7.

<sup>96</sup> Rainwater DL. Lipoprotein correlates of LDL particle size. *Atherosclerosis* 2000;148 (1):151-8.

<sup>97</sup> Austin MA, Rodriguez BL, McKnight B, McNeely MJ, Edwards KL, Curb JD, et al. Low-density lipoprotein particle size, triglycerides, and high-density lipoprotein cholesterol as risk factors for coronary heart disease in older Japanese-American men. *Am J Cardiol* 2000;86(4):412-6.

<sup>98</sup> Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. 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 (19): 2486–2497.

---

<sup>99</sup> Prevention of coronary heart disease in clinical practice. Recommendations of the Second Joint Task Force of European and other Societies on coronary prevention.. *Eur Heart J.* 1998;19 (10): 1434–1503,

<sup>100</sup> Alcocer L. *Drugs in Context. Las nuevas guías ACC/AHA/NHLBI 2013 (ATP-IV): un cambio radical en el manejo del riesgo cardiovascular. The Journal of intervention in Clinical Practice. J y C Ediciones Médicas. Marzo 2014.*

<sup>101</sup> Current status of blood cholesterol measurement in clinical laboratories in the United States: a report from the Laboratory Standardization Panel of the National Cholesterol Education Program. *Clin Chem.* 1988;34 (1):193–201.

<sup>102</sup> Bachorik PS, Ross JW. National Cholesterol Education Program Recommendations for Measurement of Low-Density Lipoprotein Cholesterol: Executive Summary. *Clin Chem.* 1995;41 (10):1414–1420.

<sup>103</sup> Stein EA, Myers GL. National Cholesterol Education Program Recommendations for triglyceride measurement: Executive summary. *Clin Chem.* 1995;41 (10):1421–1426.

<sup>104</sup> Warnick GR, Wood PD. National Cholesterol Education Program Recommendations for measurement of high-density lipoprotein cholesterol: Executive summary. *Clin Chem.* 1995;41 (10):1427–1433

<sup>105</sup> Warnick GR, Kimberly MM, Waymack PP, Leary ET, Myers GL. Standardization of Measurements for Cholesterol, Triglycerides, and Major Lipoproteins. *LabMedicine.* 2008;39(8):481-490.

<sup>106</sup> Myers GL, Cooper GR, Greenberg N, Kimberly MM, Waymack PP, Hassemer DJ. Standardization of lipid and lipoprotein measurements. En: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH, eds. *Handbook of Lipoprotein Testing.* 2º ed. Washington, DC: AACC Press; 2000: 717–748.

---

<sup>107</sup> McNamara JR, Leary ET, Ceriotti F, Cobbaert CM, Cole TG, Hassemer DJ, et al. Point: status of lipid and lipoprotein standardization.. Clin Chem. 1997; 43 (8 Pt 1): 1306–1310.

<sup>108</sup> Myers GL, Kimberly MM, Waymack PP, Smith SJ, Cooper GR, Sampson EJ. A reference method laboratory network for cholesterol: a model for standardization and improvement of clinical laboratory measurements.. Clin Chem. 2000; 46 (11): 1762–1772.

<sup>109</sup> Kimberly MM, Leary ET, Cole TG, Waymack PP. Selection, validation, standardization, and performance of a designated comparison method for HDL-cholesterol for use in the cholesterol reference method laboratory network. Clinical Chemistry 1999; 45 (10):1803-1812.

<sup>110</sup> DIN. In vitro diagnostic medical devices. Measurement of quantities in samples of biological origin. Description of reference materials. Berlin: Deutsches Institut für Normung e.v.; 1999. Norma ISO 12287:1999.

<sup>111</sup> Miller WG. Matrix effects in the measurement and standardization of lipids and lipoproteins. En: Rifai N, Warnick GR, Domiczak MH, eds. Handbook of lipoproteins testing. 2<sup>o</sup> ed. Washington, DC USA: AACCC Press; 2000: 695-716

<sup>112</sup> NCCLS. Preparation and Validation of Commutable frozen human serum pools as secondary reference material for cholesterol measurement procedures, Approved guideline. Wayne, PA USA: NCCLS; 1999. Documento C37A. Danilenko U, Vesper HW, Myers GL, Clapshaw PA, Camara JE, Miller WG. An updated protocol based on CLSI document C37 for preparation of off-the-clot serum from individual units for use alone or to prepare commutable pooled serum reference materials. Clin Chem Lab Med. 2020 Feb 25;58(3):368-374. doi: 10.1515/cclm-2019-0732. PMID: 31665109; PMCID: PMC7153737.

<sup>113</sup> Cobbaert C, Weykamp C, Baadenhijsen H, Kuypers A, Lindemans J, Jansen R. Selection, preparation and characterization of commutable frozen human serum pools as potential secondary reference material for lipid and lipoprotein

---

measurement: study within the framework of the Dutch project "Calibration 2000".  
Clin Chem. 2002; 48 (9):1526-38.