

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA.**

**Correlación entre la determinación Enzimática, el cálculo por  
la fórmula de Friedewald y el análisis de regresión en la  
Determinación de la lipoproteína de baja densidad.**

**Informe Final de Tesis**  
**Presentado por**  
**Claudia Patricia Aldana Acajabón**

**Estudiante de la carrera**  
**Química Biológica**

**Guatemala, septiembre de 2003**

## INDICE

		Página
I	Resumen.....	04
II	Introducción.....	06
II	Antecedentes.....	07
	A. Generalidades de los lípidos y lipoproteínas.....	07
	B. Metabolismo de los lípidos.....	07
	1. Lípidos exógenos .....	07
	2. Lípidos endógenos.....	08
	C. Apoproteínas.....	08
	1. Apolipoproteína A-I.....	09
	2. Apolipoproteína del grupo B.....	09
	3. Apolipoproteína C.....	10
	4. Apolipoproteína D.....	10
	5. Apolipoproteína del grupo C.....	10
	6. Apolipoproteína J.....	11
	D. Estructura General de las lipoproteínas.....	11
	E. Formación de IDL y LDL a partir de VLDL.....	13
	F. Catabolismo de la IDL y de las LDL.....	13
	G. Modelo actual de la génesis de placa de ateroma.....	15
	H. Hiperlipemias, hiperlipoproteínemias y dislipemias.....	16
	I. Programa Nacional de educación sobre el colesterol.....	17
	J. La medición de los lípidos y las lipoproteínas.....	17
	1. Colesterol Total.....	18
	2. Triglicéridos.....	19
	3. Determinación de Apolipoproteínas.....	19
	4. Determinación de Lipoproteínas.....	19
	a) Empleo de analizadores automáticos.....	20
	b) Métodos electroforéticos.....	20
	c) Métodos de precipitación polianiónica.....	21
	d) Cálculo de la Fórmula de Friedewald.....	21
	e) Métodos directos para la determinación de LDL.....	22
	i. Métodos de primera generación .....	22
	ii. Método de segunda generación.....	22

	iii.	Método de tercera generación.....	22
	iv.	Principio de prueba a utilizar .....	23
	J.	Estudios Relacionados.....	24
IV.		Justificación.....	25
V.		Objetivos.....	26
VI.		Hipótesis.....	27
VII.		Materiales y Métodos.....	28
VIII.		Resultados .....	32
IX.		Discusión de Resultados.....	37
X.		Conclusiones.....	40
XI.		Recomendaciones.....	41
XII.		Referencias .....	42
XIII.		Anexos.....	46

## I. RESUMEN

Unas de las principales moléculas involucradas en la fase temprana del desarrollo de la arteriosclerosis, son las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Estas lipoproteínas, pueden ser determinadas por diferentes métodos como ultracentrifugación, electroforesis, cromatografías, precipitación y métodos de inmunoensayos, o bien ser calculadas por medio de la fórmula de Friedewald.(4)

En el presente estudio se determinaron las concentraciones plasmáticas de colesterol total (CT), triglicéridos (TG), lipoproteína de baja densidad (LDL) y lipoproteína de alta densidad (HDL) mediante métodos enzimáticos directos, en pacientes adultos de ambos sexos, con niveles de triglicéridos dentro del rango de 200 a 400mg/dl.

Se estimaron los valores de la lipoproteína de baja densidad (LDL) por la fórmula de Friedewald a partir de las concentraciones de CT, HDL y TG. Con el fin de darle mayor precisión al cálculo se aplicó un análisis de regresión lineal múltiple tomando como variables la edad, la concentración de CT, HDL y TG.

Al realizar el análisis de regresión múltiple se encontró que el error en el cálculo es proporcional a la cantidad de colesterol total (CT) y de colesterol de la lipoproteína de alta densidad (HDL). Ambos parámetros son predictores de la precisión del cálculo con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ , por lo que su adecuada medición permite disminuir el error al estimar la concentración de LDL por medio de la fórmula de Friedewald.

Se confirmó que existe correlación entre la determinación enzimática del LDL y su cálculo por medio de la fórmula de Friedewald, y que la aplicación del análisis de regresión múltiple permite mayor precisión en el cálculo del LDL.

La fórmula de Friedewald presentó un error analítico total del 8% y con ello se confirmó que cumple con las especificaciones del Programa Americano de Educación del Colesterol (NCEP), que indican que la concentración de colesterol LDL debe ser determinada con un error analítico total que no exceda el 12%.

La ecuación de regresión y la fórmula de Friedewald no fueron estadísticamente diferentes de los obtenidos con los métodos directos, presentando así mismo ventajas como fácil aplicación y bajo costo, lo que en conjunto permite sugerir su aplicación en estudios clínicos.

## II. INTRODUCCIÓN

La asociación entre el colesterol total y el riesgo de desarrollar enfermedades coronarias se encuentra bien establecido. La mayoría del colesterol en circulación es acarreado por las Lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Los factores de riesgo que pueden intensificar la aparición de una enfermedad coronaria son: el tabaquismo, la hipertensión, historia familiar de enfermedad coronaria, ser de sexo masculino y concentraciones elevadas de LDL.

De todos los parámetros que pueden ser medidos en un laboratorio clínico, el colesterol LDL tiene mayor valor clínico para el pronóstico de la esclerosis coronaria.

Para la determinación del colesterol LDL se dispone de diferentes métodos como la ultracentrifugación, la electroforesis de lipoproteínas y la precipitación. Recientemente han surgido los métodos enzimáticos homogéneos de tercera generación, que tienen un bajo coeficiente de variación y bajo error analítico, proporcionando datos más exactos y precisos con mayor rapidez.

Normalmente el cálculo de la concentración de colesterol LDL por la fórmula de Friedewald es el método más utilizado por su bajo costo y sencillez. Sin embargo tiene varias limitaciones. Su inexactitud se incrementa al aumentar la cantidad de triglicéridos y bajo la presencia de quilomicrones, lo que conlleva a sobreestimar los valores de LDL así calculados.

El presente estudio se realizó en pacientes adultos de ambos sexos que acuden a la Liga Guatemalteca del Corazón. En él se hizo la determinación directa del LDL por un método enzimático de tercera generación y el cálculo de la concentración de LDL por la fórmula de Friedewald y se observó la correlación entre ambos métodos. Así mismo se aplicó el análisis de regresión múltiple para mejorar la precisión del cálculo de LDL por la fórmula Friedewald.

### **III. ANTECEDENTES**

#### **A. Generalidades de los lípidos y las lipoproteínas.**

Los lípidos son sustancias orgánicas, que desempeñan en el organismo funciones muy diversas. Existen distintos tipos de lípidos, pero todos poseen estructuras no polares hidrocarbonadas que los hacen insolubles en el agua, por lo que requieren de un medio de transporte proteico. Aunque existen diferentes proteínas específicas para el transporte de ciertos lípidos como es el caso de la transcortina, son las lipoproteínas las microemulsiones responsables de la movilización de la inmensa mayoría de ellos a través del torrente circulatorio. La movilización la realizan desde la absorción en el intestino delgado de los lípidos, hasta los órganos de depósito (tejido adiposo, tejido muscular, corteza suprarrenal, etc.) y desde el órgano de síntesis, el hígado, hasta los órganos periféricos donde serán utilizados (músculo cardíaco, músculo esquelético, tejido adiposo, etc.).

#### **B. Metabolismo de los lípidos**

##### **1. Lípidos exógenos**

Son los lípidos que son consumidos en la dieta. Estos son incorporados al cuerpo en tres fases: digestión, absorción y transporte. La fase de digestión se lleva a cabo en el lumen del intestino, en él las sales biliares separan las grandes masas de lípidos y las enzimas los hidrolizan hasta ácidos grasos libres. Durante la fase de absorción, las partículas de lípidos digeridos penetran en las células de la mucosa intestinal y posteriormente el sistema linfático y circulatorio. En esta etapa, la naturaleza del mecanismo de transporte de lípidos depende del tipo de molécula que se transporta. Los ácidos grasos de cadena corta e intermedia se unen a la albúmina y se transportan en la circulación portal, mientras que los ácidos grasos de cadena larga se empaquetan en quilomicrones en las células de la mucosa y son liberados al conducto torácico del sistema linfático para después penetrar al sistema circulatorio(2).

##### **2. Lípidos endógenos**

El organismo produce la mayor parte del colesterol en forma endógena. Las fuentes dietéticas aportan tan sólo de 150 a 300mg diarios mientras que el hígado sintetiza 1.5 g al día.(3)

El exceso de carbohidratos y proteínas de la dieta se utiliza para producir moléculas de acetato, que posteriormente sirven para producir colesterol y ácidos grasos. Los lípidos endógenos que genera el hígado son transportados posteriormente en forma de lipoproteínas para su uso en todo el cuerpo(3,4).

### **C. Apoproteínas**

Son los componentes proteicos de las lipoproteínas, es decir, la fracción que queda de los complejos lipoproteicos tras eliminar los lípidos. Siguiendo la nomenclatura propuesta por Aulapovic et al, se les designa por las letras A, B, C, etc. Subclasificadas a su vez en diferentes subtipos(4).

Sus funciones principales incluyen:

**1. Mantenimiento de la estructura de la lipoproteína** con fijación de los lípidos gracias a la interacción que presentan con los fosfolípidos, formando complejos estables que son capaces de solubilizar y transportar a los triglicéridos y a los ésteres de colesterol. Esta función la realizan principalmente las apoproteínas del grupo B (apoB-48 y apoB-100). Además, al aumentar la densidad de la lipoproteína, disminuyen su flotabilidad.

**2.Regulación de la actividad de los enzimas claves** que intervienen en el metabolismo de las proteínas dentro del torrente circulatorio, así la apo A-I y la apo C-I se requieren específicamente para activar el enzima lipoproteinlipasa, como se verá más adelante.

**3.Reconocimiento de superficie** que une a las lipoproteínas con determinados receptores específicos de la superficie celular.

Cabría añadir que su presencia aumenta la densidad de la estructura micelar y con ello se disminuye su índice de flotabilidad haciendo que las lipoproteínas densidad similar a la del suero en el que se desenvuelven y con ello ni decanten ni floten(4,5).

Excepto las del grupo B que no pueden pasar de un tipo de lipoproteínas a otro, debido a su alto peso molecular, el resto se encuentran en distintas proporciones en las diferentes lipoproteínas, contribuyendo a dirigir su metabolismo en el organismo(5).

### **1. Apolipoproteína A-I**

Constituye la principal lipoproteína de las partículas HDL. Sus concentraciones bajas se correlacionan con concentraciones bajas de HDL . Posee una enorme tendencia a ser absorbida en interfases polares y actúa como una molécula anfipática. Una de sus funciones es actuar como cofactor de la LCAT (lecitin colesterol acil transferasa), enzima responsable de la esterificación del colesterol en el plasma, además, parece que facilita la salida del colesterol de las células.(5)

### **2. Apolipoproteína del grupo B**

Conforma el grupo de mayor peso molecular que se encuentra constituido por dos formas, la ApoB<sub>-100</sub> y la ApoB<sub>48</sub>.

La B<sub>-100</sub> es de origen hepático, se encuentra en las lipoproteínas de muy baja densidad(VLDL), las de densidad intermedia (IDL) y principalmente en LDL que solo poseen una copia de esta proteína y que representan a las diferentes formas de maduración de un mismo tipo de lipoproteína(6).

La apoB<sub>48</sub> de origen intestinal, las más abundantes en los quilomicrones que pueden poseer más de una copia de esta lipoproteína. La apoB<sub>48</sub> representa aproximadamente el 48% inicial de la secuencia de aminoácidos que poseen la apoB<sub>100</sub>.(6)

Ambos tipos se encuentra fuertemente anclada por su porción hidrofóbica lo que hace que no se produzca su intercambio entre las diferentes lipoproteínas durante su

paso por el torrente circulatorio.(7)

### **3. Apolipoproteína C**

Se le ha aislado en los quilomicrones, VLDL, IDL y en las HDL. Se conocen tres tipos. Apo CI que funcionalmente, se la ha implicado en la activación del enzima LCAT (Lecitin Colesterol Acil Tranferasa), la Apo CII la cual actúa como activador de la LPL (lipoproteín lipasa) enzima que cataliza la hidrólisis de los triglicéridos plasmáticos. Y la Apo CIII que tiene un efecto opuesto al de la apoC-II, actuando como inhibidor de la LPL.(8)

### **4. Apolipoproteína D**

Sintetizada por el hígado y se la ha aislado en las partículas HDL Tiene capacidad para ligar bilirrubina. Se ha observado, que tras la albúmina, la HDL es la forma en que se transporta una mayor proporción de bilirrubina plasmática y esta afinidad se debe a su contenido en apoD(9).

### **5. Apolipoproteína del grupo E**

En el adulto se sintetiza principalmente en el hígado. Actúa como ligando para el receptor de la LDL y para la proteína relacionada con el receptor de la LDL (LRP; Lipoprotein Receptor Protein) Se encuentra en los quilomicrones, en la VLDL y en la HDL(10).

De su ausencia se deriva la acumulación de lipoproteínas de baja densidad enriquecidas en colesterol. Por la técnica de enfoque isoeléctrico, se han descrito tres isoformas (apoE2, apoE3 y apoE4) que difieren entre sí en la secuencia de los aminoácidos de las posiciones 112 y 158 con diferentes afinidades por el receptor de la LDL que se traduce en un mayor o menor aclaramiento de estas partículas(11).

Se consideran normales los patrones designados como E2 y E3. Parece ser que la apoE2 tiene un efecto antioxidante en los sujetos sin factores mayores de riesgo cardiovascular, sin embargo, este efecto desaparece cuando el sujeto es fumador o presenta una hipertrigliceridemia relacionada con la obesidad Los homocigotos para

la apoE4 tienen aumentada la afinidad de las VLDL por los receptores hepáticos de LDL, lo que se asocia a una mayor propensión a padecer fenómenos de aterosclerosis (12,13).

## 6. Apolipoproteína J

Ha sido descrita recientemente. Se transporta principalmente como parte de las HDL. Esta apolipoproteína se ha encontrado en multitud de tejidos, con especial abundancia en los testículos, ovarios, hígado y cerebro. Su función no está claramente definida y parece presentar afinidad por la proteína relacionada con el receptor de la LDL-2 (LRP-2) (13).

### D. Estructura general de las lipoproteínas:

La mayoría de las lipoproteínas tienen forma de microesferas en las que clásicamente se han definido dos zonas, la corteza formada por compuestos de naturaleza anfipática y un núcleo hidrófobo. En la corteza se encuentran: los fosfolípidos (con su cabeza hidrófila hacia el exterior y sus colas hidrófobas hacia el interior), las moléculas de colesterol libre, sin esterificar y las apoproteínas o apolipoproteínas (con sus porciones hidrófobas ancladas en el núcleo y mostrando su porción globular hacia el exterior de la micropartícula). En el ambiente hidrofóbico del núcleo viajan las moléculas hidrófobas como triglicéridos y colesterol esterificado(13).

Toda la estructura se mantiene gracias a las interacciones de naturaleza hidrofóbica que se originan por el hecho de estar viajando todas ellas en un medio acuoso como es el plasma(14).

Las diferentes lipoproteínas se han clasificado conforme a su disposición en un medio de densidad creciente entre 1,210 y 1,006 KBr y tras ser sometidas a ultracentrifugación de 144.000 veces la gravedad durante 24h en:

**Quilomicrón (Qm):** con densidad inferior a 0,96 g/ml. son las de mayor tamaño y menor densidad. Transportan los lípidos de la dieta (principalmente triglicéridos) desde el intestino al resto del organismo(14).

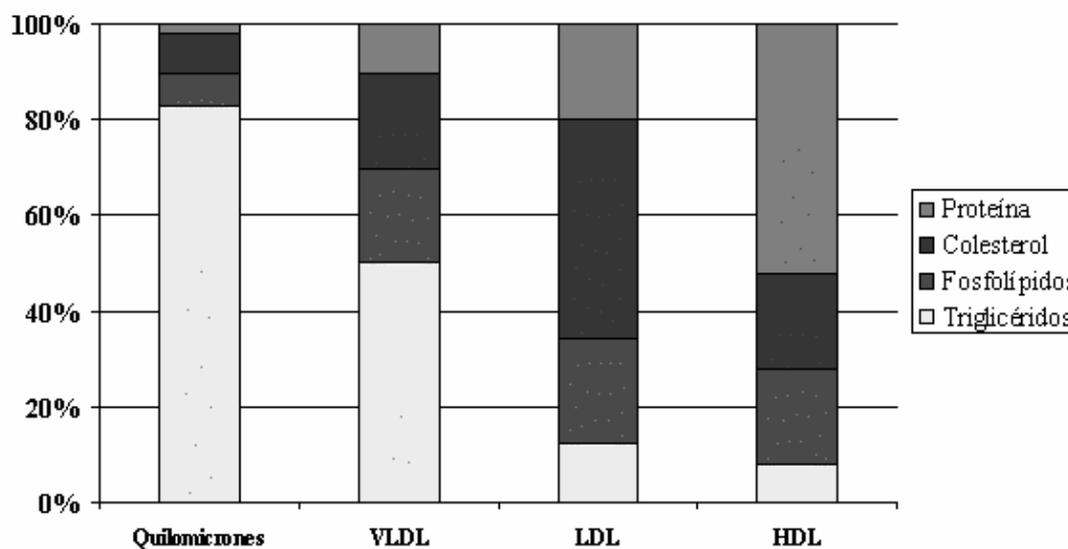
**VLDL (Very Low Density Lipoprotein, lipoproteínas de muy baja densidad),** con densidades en el rango de 0,96-1,006 g/mL. Lipoproteínas de muy

baja densidad, compuestas en un 50% por triglicéridos. Transportan los lípidos sintetizados en el hígado a otras partes del cuerpo(14).

**LDL (Low Density Lipoprotein, lipoproteínas de baja densidad)**, con densidades en el rango de 1,006-1,063 g/mL. Lipoproteínas de baja densidad, cuyo principal componente es el colesterol (50%). Circulan por todo el organismo transportando colesterol, triglicéridos y fosfolípidos y dejándolo disponible para las células.

**HDL (High Density Lipoprotein, lipoproteínas de alta densidad)**, con densidades en el rango de 1,063-1,21. Estas lipoproteínas suelen dividirse lipoproteínas de alta densidad, en cuya composición la parte más importante son las proteínas. Transportan el colesterol desde las células al hígado para ser eliminado.

### Composición de las lipoproteínas



Además, existen algunas familias minoritarias, que se encuentran en situaciones fisiológicas en muy bajas concentraciones, por lo que normalmente no son detectables, y que pueden adquirir importancia en ciertas condiciones patológicas:

**IDL (Intermediate Density Lipoprotein, lipoproteínas de densidad intermedia)**, con densidades en el rango 1,006-1,019 g/mL. Su detección está asociada con

aterosclerosis precoz. Estas contienen cantidades iguales de colesterol y triglicéridos y principalmente Apo B y E.

Lp(a), con una densidad de 1,055-1,085 g/mL. Es un complejo macromolecular que presenta en su estructura, elementos propios de las lipoproteínas con otros pertenecientes al sistema de la coagulación sanguínea. Su composición es muy similar a la LDL, sus niveles plasmáticos correlacionan con la enfermedad arterial coronaria y cerebrovascular.

### **E. Formación de IDL y LDL a partir de VLDL**

Las apoC-II activa LPL (lipoproteín lipasa) enzima que cataliza la hidrólisis de los triglicéridos, con lo que las VLDL se transforman en primer lugar en IDL y ocasionalmente en LDL sin llegar a dejar el plasma.

Estas partículas poseen una menor cantidad de triglicéridos en su núcleo pero mantienen el de ésteres de colesterol y el colesterol no esterificado de su superficie. Con ello se mantiene la apoB100 mientras que aumentan "relativamente" los ésteres de colesterol, el colesterol no esterificado y los fosfolípidos hasta llegar a las proporciones propias de las partículas que denominamos LDL.

La insulina facilita la hidrólisis de los triglicéridos por activar la migración de la LPL desde los adipocitos hasta los proteoglicanos del endotelio vascular(14,15,16).

### **F. Catabolismo de las IDL y de las LDL**

Una vez degradada parcialmente en la periferia la VLDL, no va a ser captada tan eficientemente por el hígado y solo será procesada parcialmente por la LPL del hepatocito que la transformará en LDL y regresará como tal al plasma(14).

Las partículas de LDL están conformadas por una molécula de apoB<sub>100</sub> que ha cambiado de conformación con respecto a la que se encontraba presente en la VLDL, por fosfolípidos junto con colesterol no esterificado en su superficie. Su core hidrofóbico contiene básicamente ésteres de colesterol. No olvidemos que la estructura tridimensional de la proteína está determinada por el medio en el que se

encuentra inmersa y éste, al poseer un volumen menor y una diferente composición cualitativa se ha modificado(15, 16).

La finalidad de las LDL parece no ser otra que la de ser degradadas, puesto que todas las células del organismo pueden sintetizar su propio colesterol y tanto los quilomicrones como las VLDL o las HDL lo pueden intercambiar con sus membranas, de hecho, en los niños recién nacidos, cuando las necesidades de producción celular son las más elevadas, solo circulan de 0,5 a 1,0 mmol/l de colesterol en forma de LDL mientras que las cifras que se encuentran en adultos occidentales se mantienen en intervalos de 3 a 5 mmol/l(17,18).

El interés por su estudio se debe al indudable papel que supone en la patología aterosclerótica, cuando sus concentraciones plasmáticas están elevadas y no tanto al papel fisiológico que pudiera representar(17).

Las partículas de LDL, como ocurre con las de IDL son captadas por receptores proteicos específicos apoB/E o receptor de la LDL que se encuentran en depresiones que presentan acumulaciones de clatrina(16).

Como dichas depresiones se encuentran continuamente formando vesículas, cualquier molécula de LDL unida a sus receptores será internalizada. Una vez formada la vesícula se acidifica su medio interno, con lo que la especificidad LDL-receptor disminuye y con ello, el receptor libera la partícula. Este proceso se continúa con la digestión celular de las LDL, el reciclaje de los receptores y la correspondiente obtención de aminoácidos procedentes de la apoB pero, sobre todo, da origen a importantes cantidades de colesterol que están a disposición de la célula.

Cuando estas cantidades son excesivas para las necesidades particulares de dicha célula, ésta responde deteniendo su síntesis endógena tanto la de colesterol como la de los receptores, con lo que se mantienen los niveles homeostáticos de la célula pero a cambio, los niveles plasmáticos aumentarán.

El principal órgano responsable, que no es el único, de la degradación de las LDL es el hígado y procesa del 50 al 60% del colesterol que se encuentra en plasma en forma de LDL. Lo emplea en la síntesis de sales biliares secretando su exceso, en

condiciones fisiológicas, por la bilis, donde sufrirá circulación enterohepática. Le siguen las glándulas suprarrenales y las gónadas que lo utilizan como sillar en la síntesis de las respectivas hormonas esteroideas(19,20).

### **G. Relación de las diversas lipoproteínas en la génesis de la placa de Ateroma**

La aterosclerosis es la lesión de la pared arterial debida a la formación de placas de ateroma en sus paredes, que se pueden revertir, no solo en su fase inicial, sino también , aunque más lentamente, en ciertas formas avanzadas (21).

En su progresión se producen tres procesos celulares fundamentales:

- Una entrada de monocitos/macrófagos con proliferación de macrófagos, células de músculo liso y quizás de linfocitos
- La formación de una matriz de tejido conjuntivo fibroso debido a la acumulación de las células de músculo liso
- Un almacenamiento de lípidos intra y extracelular, especialmente como colesterol libre y esterificado en los macrófagos y en las células musculares(22).

Para que el proceso comience, se exige el paso de la lipoproteína al espacio subendotelial cruzando el endotelio vascular.

Estudios experimentales in vitro han demostrado la LDL del plasma no es capaz de inducir la formación de la placa de ateroma. Se precisa de transformaciones químicas como su oxidación y glucación que originen un cambio en su conformación que conlleve a un diferente comportamiento metabólico.

Las LDL así transformadas pasan a ser internalizadas por los macrófagos derivados de los monocitos y por las células de la musculatura lisa dando lugar, ambas estirpes celulares a las células espumosas(23,24).

Este fenómeno no se produce con la LDL normal que sigue la ruta del receptor apoB/E porque cuando la concentración en el exterior de las células es muy alta, éstas se protegen inhibiendo la síntesis del receptor, con lo que no penetran las partículas al citoplasma. Cuando se sobrepasa la capacidad de utilización de

colesterol por parte de estas células, el colesterol libre, al exceder ciertas concentraciones se hace citotóxico y el macrófago se defiende de esta situación acumulándolo en vacuolas, lo que lo transforma en el tipo de células que denominamos células espumosas debido al aspecto que adquiere al presentar dicha vacuolización. Este mecanismo defensivo tiene su límite. Una vez sobrepasado se produce su lisis con el correspondiente vertido del colesterol al exterior lo que se piensa que da origen de los centros necróticos que se observan en las placas(25-28).

## **H. Hiperlipemias, hiperlipoproteinemias y dislipemias**

1. La hiperlipemia (HLP) es la elevación plasmática de las concentraciones plasmáticas de colesterol, triglicéridos o de ambos.

2. Las hiperlipoproteinemias son trastornos del transporte de los lípidos que se producen debido a una anomalía en la síntesis o en la degradación de las lipoproteínas plasmáticas.

3. Como dislipemia se denomina a aquellas alteraciones de los lípidos plasmáticos que suponen una elevación del colesterol total y del transportado por las lipoproteínas de baja densidades (cLDL), con aumento de la trigliceridemia y el descenso del colesterol ligado a las lipoproteínas de alta densidad (CHDL).

Uno de los problemas que surgen cuando se plantea el tratamiento de esta patología es la determinación de las concentraciones que se deben de considerar fisiológicas. El criterio estadístico tiene escasa importancia en la búsqueda de la prevención de las enfermedades de origen arteriosclerótico puesto que normalidad, el valor más frecuente, no es sinónimo de saludable y los objetivos no serán los mismos en un sujeto con antecedentes de patología aterosclerótica que si estos no existen o si coexisten otros factores de riesgo (HPT, tabaquismo, diabetes, etc.) que cuando éstos están ausentes.

Siguiendo el documento "*Control de la Colesterolemia en España, 2000: Un instrumento para la Prevención Cardiovascular*" (29) publicado en dicho año, se plantea que:

En la prevención primaria y para los pacientes de riesgo alto, el objetivo terapéutico se establece en una concentración de LDL  $< 130$  mg/dL.

En prevención secundaria, el objetivo terapéutico será una concentración de LDL  $< 100$  mg/dL.

### **I. Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol(NCEP)**

En 1985 nace en los Estados Unidos el Programa Nacional de Educación sobre el colesterol, al aumentar el índice de mortalidad por infartos agudos al miocardio. El fin de dicho programa es incrementar el conocimiento de la población de la relación entre altos niveles de colesterol en sangre y el riesgo de desarrollar enfermedades coronarias. El programa está conformado por profesionales de la salud en los que se incluyen: Expertos en la detección, evaluación y tratamiento de elevados niveles de colesterol en sangre tanto en adultos como en niños, laboratorios estandarizados para la medición y reporte de los test de medición del colesterol y un grupo de investigadores que trabajan en la medición de las lipoproteínas elaborando recomendaciones y guías para mejorar la detección del LDL y HDL. Actualmente este programa contiene la información más reciente sobre lo relacionado a el colesterol en sangre, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) sugiere que todas las recomendaciones y guías que el NCEP propone deben ser tomadas como estrategias en los distintos programas de salud a nivel mundial(33).

### **J. La medición de los lípidos y las lipoproteínas**

La determinación de la masa de las lipoproteínas, a la que contribuyen tanto las proteínas como los lípidos que la componen, requiere de técnicas sofisticadas como la ultracentrifugación, que se basa en la separación de las partículas con respecto a su diferencia de densidad. Puede realizarse en suero o plasma. La primera fracción que flota son los triglicéridos, quilomicrones y VLDL y la segunda es el LDL, HDL y ILD. La adición de sales como KBr y la ultracentrifugación hace que flote las LDL. Debido a que ésta técnica es tediosa ya que se realiza en varios pasos y demanda mucho tiempo es casi imposible de emplear en las determinaciones analíticas de rutina(30).

Con los métodos que se citarán a continuación, los cuales son empleados en los laboratorios clínicos, se determinan las concentraciones del colesterol asociadas a las diferentes subpoblaciones de lipoproteínas que se correlacionan muy bien con las determinaciones de las lipoproteínas realizadas con los métodos de referencia(30).

Actualmente, se requieren cada vez más las determinaciones de apoB y de apoA-I como complemento para identificar mejor a los sujetos que tienen elevado su riesgo a padecer una patología cardiovascular(31,32).

Algunos autores recomiendan que en sujetos con predisposición a patologías asociadas al metabolismo de lípidos, que pueden llegar a presentar variaciones fisiológicas en la concentración del colesterol hasta de un 6.5%, se realicen diferentes determinaciones tomadas a lo largo de varias semanas, con el fin de encontrar la concentración habitual en el sujeto que es objeto de estudio y no una única determinación que puede dar valores "normales" en este tipo de paciente (33).

### **1. Colesterol total**

El método más empleado es el colorimétrico enzimático. Se emplea una serie de reacciones acopladas que partiendo del éster de colesterol del suero, lo transforman en colesterol libre (si se suprime este paso se obtienen los valores del colesterol no esterificado) y éste junto con el no esterificado presente en la muestra, por acción de la enzima presente en los reactivos *colesterol oxidasa* y en presencia de oxígeno de la atmósfera, da lugar a un derivado del colesterol (Coolest-4-en-3-ona) y una molécula de  $H_2O_2$ .

Esta molécula de  $H_2O_2$  junto con fenol y 4 aminoantipirina y en presencia de una peroxidasa forma un compuesto coloreado (quinoneimina) que absorbe la luz a 500 nm. La concentración de la quinoneimina es proporcional a la que existe de colesterol lo que hace que la intensidad del color sea proporcional a la concentración del lípido(34).

Midiendo el color formado con un espectrofotómetro y comparándolo con un suero de concentración conocida (suero estándar) podemos determinar la concentración del colesterol de la muestra.

La presencia en la muestra de concentraciones significativas de compuestos reductores como la bilirrubina o el ácido ascórbico consumen el  $H_2O_2$ , lo que falsea las determinaciones. Además, la bilirrubina (>5 mg/dl) absorbe luz a 500 nm lo que puede interpretarse como un falso aumento en la concentración de colesterol.

Son métodos bastante precisos, con CV que oscilan entre 1 y 2%(34).

## **2. Triglicéridos**

Los métodos empleados actualmente de modo habitual son de tipo colorimétrico con empleo de enzimas específicos.

El método es similar al anterior con la diferencia que, la última reacción acoplada produce  $NAD^+$ , que absorbe la luz en el rango de 500-600 nm.

Dependiendo del fabricante que provea de los reactivos y empleando las indicaciones que le facilita, se han obtenido CV que varían desde un 3% hasta el 10%(35).

## **3. Determinación de apolipoproteínas**

Existen ciertas evidencias que parecen demostrar como la determinación de la apoB y de la apoA-I representan mejores discriminantes del riesgo para padecer una enfermedad aterosclerótica que cuando se analizan lípidos o lipoproteínas.

La mayoría de los métodos se basan en la identificación inmunológica (RIA, ELISA, RID, etc) de las apolipoproteínas, relacionándose posteriormente la inmunoreactividad con la masa determinada por otros medios(30).

## **4. Determinación de lipoproteínas**

Existen múltiples sistemas que permiten su determinación, si bien algunos, por su extremada complejidad son de uso experimental y no clínico. El método de ultracentrifugación en gradiente de densidades se basa en el hecho de que todas las proteínas plasmáticas tienen una densidad aproximada de 1,350g/ml con excepción de las lipoproteínas que presentan densidades menores y se mantienen en suspensión por la agitación térmica, por su interacción con las moléculas de agua

del entorno y por el flujo sanguíneo(30).

Si se las somete a una ultracentrifugación de 100.000 g la fuerza centrífuga actúa como si se incrementará mucho la fuerza de la gravedad y , todas las proteínas presentes en el suero, excepto las lipoproteínas tenderán a depositarse en el fondo del tubo, mientras que dichas lipoproteínas formarán una capa superficial opalescente.

Si se deposita un volumen de plasma en el fondo de un tubo y sobre él se dispone un gradiente de concentraciones de bromuro potásico (BrK) que ocupa el rango desde 1,210g/ml hasta 1,006 g/ml, cuando se someta al conjunto a una ultracentrifugación a 140.000 g durante 24h, por el principio de Arquímedes, el contenido del plasma se colocará formando bandas estables que se corresponderán con las zonas de su misma densidad. Si existe un colorante de grasas en el medio, se aprecian una serie de bandas que se corresponden con las diferentes familias de lipoproteínas(35).

#### **a) Empleo de analizadores automáticos de sobremesa de química seca**

Emplean tiras de reactivo a las que se les impregna con 10 a 30 µl de la muestra donde se disuelven los reactivos que la contienen y posteriormente se mide la reflectancia de la mezcla de reacción(34,35).

Si bien su exactitud y precisión es menor que los sistemas automáticos tradicionales, pueden ser empleados para un despistaje, teniendo presente que cuando la muestra procede de sangre capilar, los valores obtenidos suelen ser algo más bajos que los de punción venosa que son los que se han empleado para obtener los datos epidemiológicos que se emplean en los diagnósticos(34).

#### **b) Métodos electroforéticos**

Se realiza sobre un soporte de gel de agarosa adecuadamente tamponado. Tras aplicar una corriente continua y teñir con tintura para lípidos (rojo O ó el negro Sudán), se obtienen una serie de bandas electroforéticas que tienen su correlación con los diferentes tipos de lipoproteínas.

La técnica es laboriosa y pocas veces se hace necesaria en la determinación de la

lipoproteinemia.

Presenta una serie de limitaciones como el hecho de que la VLDL se mueven en la banda electroforética correspondiente a las LDL o que la Lp(a) se mueve en electroforesis en la banda que se corresponde con la VLDL, lo que dará errores en la interpretación(34).

### **c) Métodos de precipitación polianiónica**

Las lipoproteínas precipitan en presencia de polianiones y de ciertos cationes divalentes(31).

Dicha precipitación depende del pH, de la concentración del reactivo, de la carga iónica, de la presencia de otras proteínas séricas y del tipo de anticoagulante empleado(31,34).

Se han establecido las condiciones necesarias para que vayan precipitando los diferentes tipos de lipoproteínas, analizándose el colesterol presente en el sobrenadante. Así, en condiciones en las que todas las que poseen apo B ya han precipitado, las HDL siguen siendo solubles.

La separación entre LDL y VLDL resulta más difícil por lo que actualmente solo se emplea para el primer caso(30,31).

### **d) Cálculo con fórmula de Friedewald:**

La fórmula de Friedewald y colaboradores fue introducida en 1972, la cual permite estimar el valor de la concentración de las LDL a partir de los valores plasmáticos de colesterol total(CT), triglicéridos(TG) y lipoproteína de alta densidad (HDL). Se fundamenta en que la mayoría de TG son transportados por las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), y la concentración de colesterol de las VLDL corresponde a un quinto del valor de TG(32).

La fórmula es:  $cLDL = \text{Colesterol Total} - \text{Colesterol HDL} - \frac{\text{Triglicéridos}}{5}$

Este cálculo es utilizado generalmente en los laboratorios de rutina pero tiene limitaciones bien establecidas: la precisión del cálculo disminuye considerablemente con el incremento en la concentración de triglicéridos; muestras con concentración de triglicéridos menores a 200mg/dL da un excelente grado de

correlación con métodos directos en un porcentaje de 86-92% mostrando una desviación menor al 10%. En muestras con concentración de triglicéridos de 200-300 mg/dL y de 300-400 mg/dL, la concordancia disminuye a 75% y 61% respectivamente. En muestras donde la concentración asciende a 400-500 mg/dL o mayores la concordancia disminuye a 41% y 20% respectivamente. Por tal razón la Fórmula de Friedewald no puede ser utilizada en estos casos(32-34).

### **e) Métodos directos para la Determinación de LDL**

#### **i) Métodos de primera generación**

Estos se basan en la precipitación de las partículas de LDL con reactivos químicos específicos, como: heparina a pH 5.12, polivinilsulfato, polímeros anfipáticos o dextran sulfato. Después de la centrifugación se mide el colesterol. El LDL es calculado en base a la diferencia entre el colesterol total en suero y el del sobrenadante(35).

Sin embargo este procedimiento de precipitación temprana no reemplaza el cálculo por la fórmula de Friedewald ya que la misma tiene mayores ventajas en cuanto a precisión, exactitud y especificidad si se aplica en personas cuyo nivel de triglicéridos no exceda los 400mg/dL (36-37).

#### **ii) Métodos de Segunda Generación**

Fueron introducidos desde 1994 usando como principio la inmunoseparación. El reactivo contiene anticuerpos humanos contra apo A-I y apo E y es diseñado para remover quilomicrones, HDL, VLDL y IDL, seguido de la determinación directa de LDL(38).

La precisión del método es buena en individuos con normocolesteronemia, combinado con hiperlipidemia, en contraste con la hipercolesteronemia que produce resultados erróneos. La ventaja de este método es que abolió la necesidad de centrifugar con el uso de agentes precipitantes. Pero en general el método requiere grandes volúmenes de muestra y equipo especial y si especificidad no es muy alta(39).

#### **iii) Métodos de tercera generación**

En 1998, siguiendo la introducción de métodos homogéneos para HDL, el primer método para LDL de este tipo fue reportado en Japón. El de mayor capacidad de llegar a una completa automatización, permitiendo tener mayor precisión, ya que eliminaba errores de pipeteo y adicionaba control de tiempo y temperatura de reacción.

Hasta el momento son los métodos recomendados por el Programa Nacional de Educación del Colesterol(NCEP). Estos métodos si poseen una gran ventaja con el calculo por la fórmula de Friedewald, demostrando únicamente que las ventajas de la fórmula sobre estos métodos son la economía(40).

Estos métodos contienen diferentes detergentes y otros químicos los cuales realizan un bloqueo específico o solubilizan la lipoproteína específica LDL. El colesterol contenido en las LDL es medido enzimáticamente en la misma cubeta.

La imprecisión que presentan estos métodos es  $\leq 4\%$ . Su detección límite es de 0.2mg/dL, y el método conserva su linealidad hasta rangos de 410-420mg/dL de LDL(41).

#### **iv) Principio de la prueba a utilizar**

Roche Diagnostics LDL-C plus emplea la solubilización micelar selectiva del colesterol LDL por un detergente no iónico y la interacción de un compuesto de azúcar y lipoproteínas (VLDL y quilomicrones). Se incluye un detergente en él.

Método enzimático para la determinación del colesterol(reacción de acoplamiento de colesteroles-esterasa-colesteroxidasa), las actividades relativas de colesterol en las fracciones de lipoproteínas aumentan en el siguiente orden: HDL<quilomicrones<VLDL<LDL. En presencia de magnesio  $Mg^{2+}$ , un compuesto de azúcar reduce pronunciadamente la reacción enzimática de la medición de colesterol en VLDL y quilomicrones. La combinación del compuesto de azúcar y un detergente permite la determinación selectiva del colesterol LDL en el suero.

#### **K. Estudios Relacionados**

En 1998 Rifai y cols. evaluaron el funcionamiento clínico y analítico de un

método enzimático de medición de colesterol LDL y lo compararon con el método de ultracentrifugación y con la ecuación de Friedewald. A pesar de que este método de estimación correlaciona bien con la beta cuantificación tiene algunos defectos, ya que su cálculo es inválido cuando la muestra es colectada en pacientes con varias horas de ayuno, con hiperlipoproteinemia tipo III o en presencia de triglicéridos elevados (>400 mg/L). De acuerdo con el laboratorio del Programa Americano de Educación del Colesterol (NCEP), la concentración de colesterol LDL debe ser determinada con un error analítico total que no exceda el 12%. La ecuación de Friedewald puede no cumplir este criterio ya que combina la imprecisión e inexactitud de tres mediciones independientes; colesterol total, colesterol HDL y triglicéridos(41).

Hernández y cols. valoraron la influencia que ejerce la concentración de la lipoproteína (a) [Lp(a)] en el colesterol unido a la lipoproteína de baja densidad (LDL) calculado mediante la fórmula de Friedewald. A una población se les determinó la Lp(a) para proceder a la corrección del LDL obtenido mediante la fórmula de Friedewald. En los sujetos con Lp(a) > 30mg/dL. se sobrestimó el LDL en un mínimo de 10mg/dL. La conclusión de su investigación fue que a fin de reducir el error en la estimación del LDL mediante la fórmula de Friedewald, debería tenerse en cuenta la concentración sérica del Lp(a)(42).

En Chile en 2001 Eblen-Zajjur y cols. analizaron los errores de la fórmula de Friedewald en el cálculo de la concentración de las LDL en pacientes sanos y plantearon las correcciones a la misma mediante un análisis de regresión múltiple. Los resultados indicaron un significativo error en el cálculo del LDL por la fórmula de Friedewald ya que subestima el valor real en más de un 16%. Además el estudio confirmó que el error del estimado es proporcional a la concentración de TG y que este error ocurre aún con valores normales de TG. Al aplicar el análisis de regresión múltiple se obtuvo una fórmula que calculó las concentraciones de LDL con mayor precisión que con la fórmula de Friedewald.(43)

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Las lipoproteínas de baja densidad(LDL) son las mayores transportadoras de colesterol en sangre y por ello están involucradas en las fases tempranas del proceso aterogénico, constituyendo un elevado factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades coronarias.

En la actualidad se dispone de métodos para la determinación directa de la concentración de LDL, pero su elevado costo no permite que sea utilizado en la mayoría de laboratorios. Es por ello que en nuestro país se ha generalizado el uso clínico de la fórmula Friedewald ya que ésta permite estimar el valor de LDL a partir de los valores plasmáticos de colesterol (CT), triglicéridos (TG) y lipoproteínas de alta densidad (HDL) a un bajo costo y sencillez. Sin embargo en los últimos años, algunos autores han comunicado diferentes grados de inexactitud y limitaciones, en este cálculo se puede dar a una subestimación del valor real y algunos pacientes pueden ser catalogados como sanos sin serlo.

En el presente estudio se calculará la concentración de LDL por la fórmula de Friedewald y se aplicará el análisis de regresión múltiple lineal para mejorar la precisión del cálculo, sin aumentar el costo de la prueba. Ambos resultados serán correlacionados con el método enzimático que es hasta el momento el método más adecuado para la determinación de la LDL por su alta precisión y exactitud.

## V. OBJETIVOS

### A. General

Correlacionar el método directo enzimático, el cálculo por la Fórmula de Friedewald y el análisis de Regresión Múltiple para la determinación de la lipoproteína de baja densidad(LDL) en pacientes que asisten a la Liga del Corazón.

### B. Específicos:

1. Cuantificar los niveles séricos de lipoproteína de baja densidad(LDL) por método enzimático, en los pacientes adultos que asisten a la Liga del Corazón.
2. Determinar el error en el cálculo por la fórmula de Friedewald .
3. Evaluar la corrección del cálculo con la aplicación del análisis de regresión múltiple.
4. Promover el uso del mejor método de rutina para la determinación de la concentración de la lipoproteína de baja densidad(LDL).

## **VI. HIPÓTESIS**

La aplicación de la Regresión Múltiple al Cálculo de la Concentración de la lipoproteína de baja densidad por la Fórmula de Friedewald aumenta la precisión y permite que aumente la correlación con el método enzimático de tercera generación recomendado por el Programa Americano de Educación del Colesterol.

## **VII. MATERIALES Y METODOS**

### **A. Universo y Muestra**



USAC.

### **C. Metodología:**

#### **1. Obtención de la Muestra:**

Se extrajo 5cc de sangre a cada uno de los pacientes seleccionados para Este estudio. La sangre se colocó en tubos de ensayo sin anticoagulante. Se separaron los sueros por centrifugación a 2,500 rpm por 10 minutos. Todos los sueros se almacenaron en tubos eppendorf en condiciones de congelación a -20°C hasta su procesamiento.

#### **2. Reactivos**

- a) Tampón de ácido de 3-morfolinopropano sulfónico:20.1mmol/l, pH 6.5; 0.3g/l de ascorbato oxidasa y peroxidasa de rábano.
- b) Tampón de ácido de 3-morfolinopropano sulfónico:20.1mmol/l, pH 6.8; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 4-aminoantipirina, 0.5g/l de colesterol-estearasa; colesterol oxidasa, peroxidasa y detergente.

#### **3. Método LDL-C plus de Roche ®**

Roche Diagnostics LDL-C plus es un método de tercera generación que emplea la solubilización micelar selectiva del colesterol LDL por un detergente no iónico y la interacción de un compuesto de azúcar y lipoproteínas (VLDL y quilomicrones). Se incluye un detergente en él.

Método enzimático para la determinación del colesterol (reacción de acoplamiento de colesterolesterasa-colesteroxidasa), las actividades relativas de colesterol en las fracciones de lipoproteínas aumentan en el siguiente orden: HDL<quilomicrones<VLDL<LDL. En presencia de magnesio Mg<sup>2+</sup>, un compuesto de azúcar reduce pronunciadamente la reacción enzimática de la medición de colesterol en VLDL y quilomicrones. La combinación del compuesto de azúcar y un detergente permite la determinación selectiva del colesterol LDL en el suero.

#### **4. Controles**

- a) Control 1 Precinorm V control normal.
- b) Control 2 Precipath V control patológico
- c) Control 3 Precinorm L control normal HDL/LDL
- d) Control 4 Precipath HDL/LDL-C control patológico

#### **5. Calibradores para sistemas automatizados**

- a) C.f.a.s (Calibrator for automated systems) Universal
- b) C.f.a.s HDL/LDL-C plus (Calibrator for automated systems)

#### **6. Determinación del perfil lipídico**

- a) Introducir en el equipo automatizado para pruebas bioquímicas Roche/Hitachi 911 los parámetros de aplicación que vienen en el diskette de aplicación que proporciona la casa comercial para programar las pruebas a realizar.
- b) Calibrar el equipo automatizado para análisis de pruebas bioquímicas Roche/Hitachi 911
  - i. Presionar rutina 2 enter
  - ii. Seleccionar calibración inicio
  - iii. Seleccionar calibración 2 puntos
- c) Seleccionar controles
  - i. Ir en la pantalla a parámetros 6
  - ii. Presionar control 1 y seleccionar los test a correr.
  - iii. Presionar control 2 y seleccionar los test a correr.
- d) Llevar el reactivo temperatura ambiente, cada solución viene lista para su uso, no requieren tratamiento o dilución.
- e) Colocar muestras en equipo.
- f) Ingresar posición y los test para cada muestra.
- g) Hacer determinaciones.

#### **6. Cálculo de Resultados:**

El Roche/Hitachi 911 calculó los niveles séricos de Colesterol total(CT), CLDL, CHDL y TG. En base a estos datos se aplicó la

Fórmula de Friedewald para la concentración de LDL. La fórmula es la siguiente:

La edad promedio de los pacientes fue de 45.69 ± 10.6 años (media ± DE), 30.4 % correspondió al sexo masculino y 69.6 % al femenino. Los valores promedio obtenidos de colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidad (HDL), triglicéridos (TG), LDL enzimático y el valor promedio del LDL obtenido por medio de la fórmula de Friedewald se presentan en la tabla no. 1

Los resultados obtenidos fueron analizados por

a) Análisis de regresión lineal simple entre la concentración de TG y

**Tabla 1**

Los valores estimados LDL por fórmula.

**Valores promedios obtenidos**

Edad	CT mg/dL	TG mg/dL	HDL mg/dL	LDL Fórmula de Freidewald	LDL enzimático
45.69	209.408	268.6	43.93	110.96	114.96

**D. Diseño estadístico**

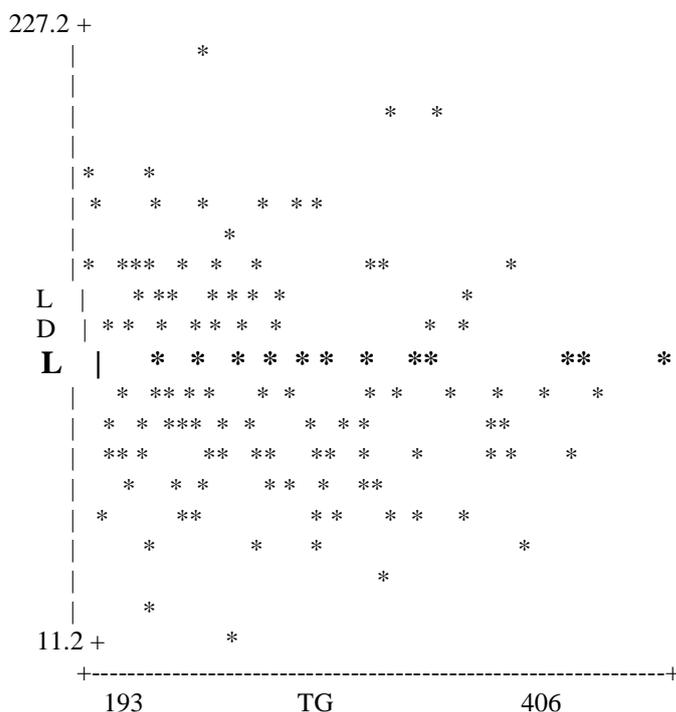
El análisis de regresión lineal entre los valores de TG y LDL calculado por la fórmula, presenta un coeficiente de regresión de 0.0126 y de determinación de 0.2144 sin significancia estadística (p > 0.000001). Esta relación no proporcional se establece en un intervalo de concentraciones de TG desde 200 mg/dL hasta 400 mg/dL, pruebas enzimáticas, en la determinación de los niveles séricos de LDL-C, CT, TG y HDL-C, incluyendo controles.

**Tabla 2**

**Análisis de regresión lineal entre LDL calculado y la concentración de triglicéridos**

LDL	Coefficiente	Error estándar	T	P >  t	[intervalo de confianza del 95%]
TG	<b>-0.07880</b>	0.063146	-1.248	0.214	<b>-0.203814 0.0461943</b>
Constante	133.2003	17.44303	7.636	0.000	98.67011 167.7306

**Gráfica 1** Muestra la relación no proporcional entre concentración de triglicéridos y la estimación de la concentración de LDL por medio de la fórmula de Friedewald.



### 3

#### Análisis multivariado de regresión múltiple lineal , LDL como variable dependiente

LDL	Coef	Error Estándar	P> t	[95% Intervalo de confianza ]
HDL	-0.9732156	0.1134472	<b>-8.579 0.000</b>	<b>-1.1978 -0.7485</b>
VLDL	0.2511159	3.086491	0.081 0.935	-5.8615 6.3637
TG	-0.2427824	0.6175075	-0.393 0.695	-1.4657 0.9802
EDAD	-0.33868	0.938255	-0.361 0.719	-0.2196 0.1519
CT	1.001703	0.0240568	<b>41.639 0.000</b>	<b>0.95405 1.0493</b>
CONSTANTE	-2.814523	6.709172	-0.420 0.676	-16.1017 10.47

El análisis de regresión múltiple de las variables edad, CT, TG y HDL, mostró una asociación significativa con los valores de LDL. La ecuación de regresión obtenida fue:  $LDL_r = -2.814523 + (Edad -0.0338) + (CT 1.001) + (HDL -0.9732) + (TG - 0.2428)$ ;  $r=0,943$ ;  $r^2=0,9458$ ;  $F(5,117)= 408.17$   $p < 0,00001$ .

Como un ejemplo particular de la aplicación de las fórmulas analizadas en el presente estudio, el cálculo de la concentración de LDL para los siguientes valores: Edad: 52 años; CT: 220 mg/dL; HDL: 39.4 mg/dL; LDL (enzimático): 120 mg/dL y TG: 249 mg/dL, tiene como resultados: LDL calculado por la fórmula =  $220 - 34.9 \cdot (249/5) = 130.8$  mg/dL.

$LDL(r) = -2.8145 + (52 \times -0.03387) + (220 \times 1.001) + (39.4 \times -0.9732) + (249 \times -0.2428) = 116.99$  mg/dL.

Este caso denota la sobreestimación de la concentración de colesterol de las LDL por parte de la fórmula de Friedewald en 8% en relación al método directo enzimático en contraste al subestimación 6% de obtenido por la regresión.

El análisis de regresión múltiple indica que de todas las variables introducidas las únicas dos con significancia estadística sobre la fórmula de Friedewald son el Colesterol HDL y el colesterol total.

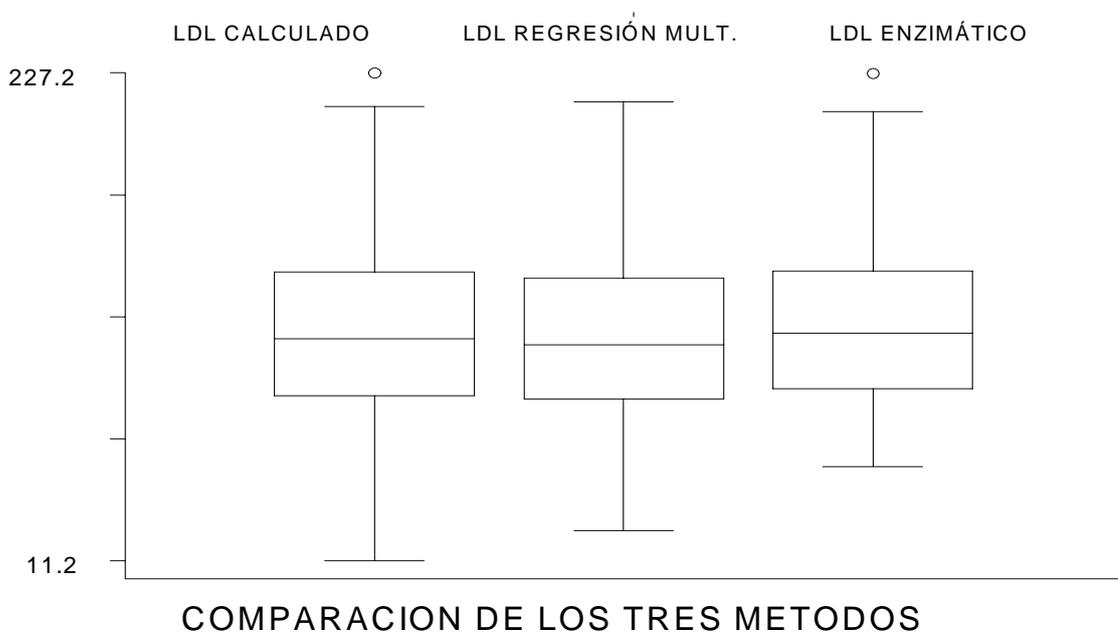
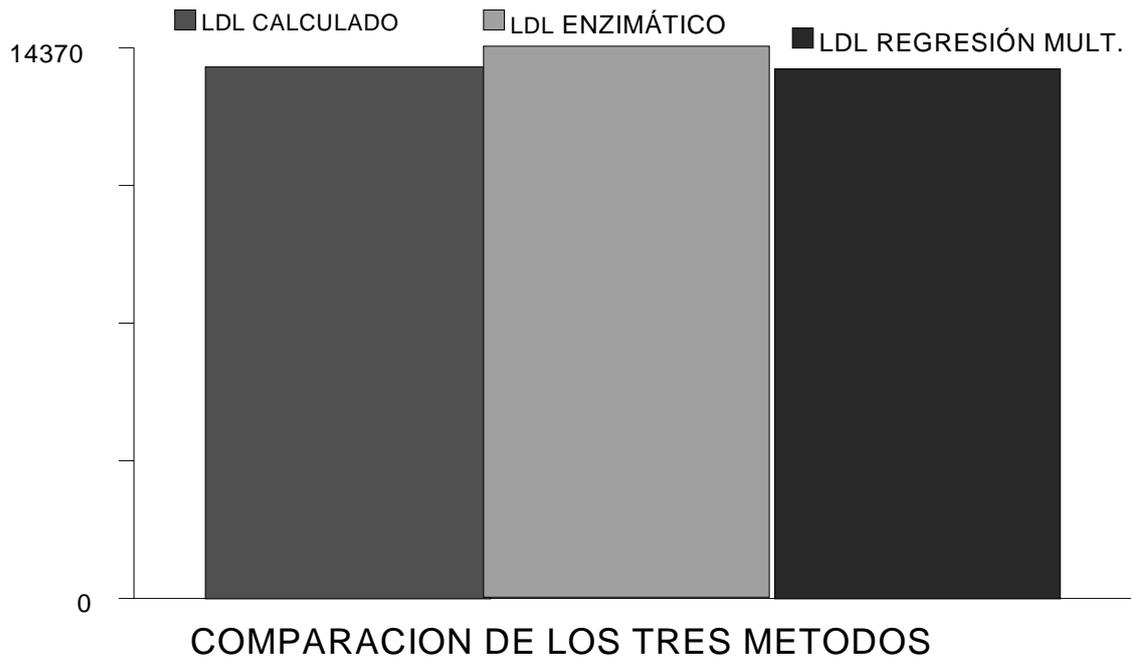
**Tabla 4**

**Comparación entre la determinación enzimática, el cálculo por la fórmula de y la regresión múltiple en la determinación de la Lipoproteína de baja densidad por t Student (n=125).**

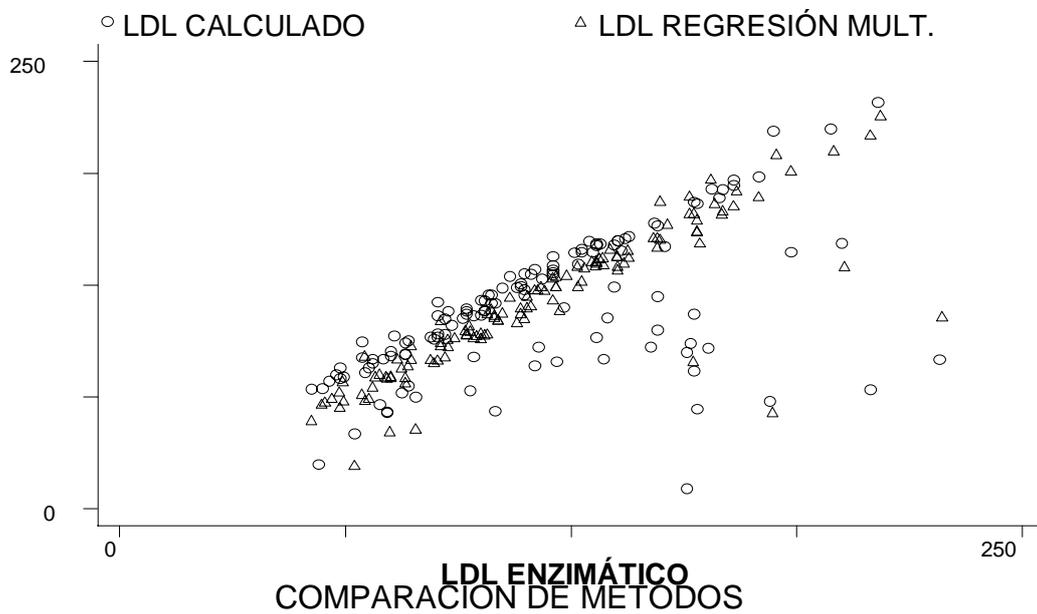
Variable	Rango de error %	Rango de sub-estimación	Media	Desviación estándar	Error estándar	Intervalo de confianza al 95%
LDL enzimático			114.9	34.114	3.0635	113.113-125.24
LDL calculado por la fórmula	32.08	8%	110.9	38.53766	3.587	105.010-118.71
LDL con Regresión Múltiple	28.93	6%	112.8	36.562	3.235	110.236-121.98

Entre los tres métodos no existe diferencia significativa con un 95% de confianza.

**Gráficas 2 y 3** Comparación de LDL plasmático obtenido por el método de determinación enzimática, por la ecuación de regresión múltiple y el cálculo por la fórmula de Friedewald. Los valores corresponden a la media aritmética  $\pm$  error estándar,  $n=125$  pacientes, las diferencias no son significativas  $p>0.05$ .



**Gráfica 4** Análisis de Regresión entre los valores de concentración de LDL plasmático determinados enzimáticamente y los valores predichos por el cálculo por la fórmula de Friedewald y la ecuación de regresión múltiple. Ajuste  $\pm 95\%$  de confianza.



## IX DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio se determinaron las concentraciones plasmáticas de CT, TG, LDL y HDL mediante métodos enzimáticos directos, en pacientes adultos. La concentración de LDL medida por métodos enzimáticos de tercera generación se utilizó en el estudio como método base, debido a que es el recomendado por el Programa Nacional de Educación del Colesterol (NCEP) de los Estados Unidos. Al realizar la comparación estadística entre los valores medidos enzimáticamente y los valores estimados por la fórmula de Friedewald a partir de las concentraciones de CT, HDL y TG se observó que no existe un error significativo en el cálculo de la concentración de LDL por dicha fórmula de Friedewald. Sin embargo al aplicar el análisis de regresión múltiple se obtuvo una fórmula alternativa que calculó las concentraciones de LDL con mayor precisión.

La mayoría de los laboratorios clínicos calculan las concentraciones de LDL usando la fórmula de Friedewald tanto en pacientes ambulatorios como en condiciones de emergencia. El requisito que convencionalmente en Guatemala se acepta para su aplicación es que la concentración de triglicéridos en el plasma sea  $< 400$  mg/dL. Por ello para el estudio se trabajó con pacientes cuyo niveles plasmáticos de triglicéridos estaban dentro del rango de 200 a 400 mg/dL, esperando que por estar en valores elevados, el error del estimado fuese proporcional a la concentración de triglicéridos, según reportes de estudios anteriores(41,43). Sin embargo los resultados determinaron que el error del estimado de la concentración de LDL por medio de la fórmula de Friedewald no es proporcional a la concentración de los triglicéridos (Gráfico 1). De acuerdo a los resultados presentados en la tabla 2, se establece que la pendiente en la regresión lineal entre el LDL y la concentración de triglicéridos es negativa, lo que significa que existe una tendencia a disminuir la concentración de LDL al aumentar la concentración de triglicéridos, indicando una subestimación, pero dicha tendencia es tan pequeña que no tuvo significancia estadística.

Al realizar el análisis de regresión múltiple (tabla 3), se aporta un elemento adicional. Se en el cálculo es proporcional a la cantidad de colesterol total (CT) y colesterol de la densidad (HDL), que ambos parámetros son predictores de la precisión del cálculo ( $p < 0.05$ ), por lo que su adecuada

medición permite disminuir el error al calcular la concentración de LDL por medio de la fórmula de Friedewald.

Los resultados de la tabla 4 confirman que existe una buena correlación entre la determinación del LDL enzimático y el cálculo por medio de la fórmula, contrastando con antiguos estudios en los cuales se aseguraba una subestimación del valor real de las LDL en más de 16%. En este estudio la subestimación fue de 8%, cumpliendo con las especificaciones del Programa Americano de Educación del Colesterol (NCEP), que indican que la concentración de colesterol LDL debe ser determinada con un error analítico total que no exceda el 12% (41,43).

Se han propuesto nuevos protocolos de determinación directa de las LDL que tratan de mejorar los resultados obtenidos con la fórmula de Friedewald. Sin embargo, la mayoría de los mismos representan incrementos de costos de varios órdenes de magnitud, ya sea en reactivos o en recursos tecnológicos, los cuales los aleja como posibilidad real no solo de los centros de salud de los países en vías de desarrollo, sino también de buena parte de los centros de salud de países desarrollados.

Las causas de error en el estimado de Friedewald estudiadas en detalle, incluyen a las mismas lipoproteínas, presencias de surfactantes, cationes divalentes, carbohidratos y lectinas, muchos de ellos difíciles de controlar o de eliminar. Por otro lado, la fórmula de Friedewald es un estimado del colesterol de las LDL con una variable pero pequeña cantidad de lipoproteínas de densidad intermedia o IDL, a lo que hay que añadir los errores analíticos propios de las determinaciones de CT, HDL y TG. Es por lo anteriormente descrito que otros índices como la concentración de CT y/o la concentración de HDL han sido postulados como factores potencialmente útiles de riesgo cardiovascular, sin embargo, éstos no han contado con el uso rutinario de los centros clínicos.

En el presente estudio se utilizó el método de regresión múltiple lineal, lo que permitió generar una fórmula o ecuación a partir de la edad del paciente y las concentraciones de CT, TG y HDL. Los resultados no mostraron ser diferentes a las concentraciones de LDL determinadas enzimáticamente.

Al comparar los datos del cálculo de la concentración del LDL por la fórmula de Friedewald y los datos de la regresión múltiple con el método enzimático de tercera

generación, se determina que no existe diferencia significativa entre los tres métodos, como se observa en las gráficas 2 y 3.

La aplicación del análisis de regresión múltiple permitió mayor precisión en el cálculo del LDL, que el presentado por el LDL solamente calculado por la fórmula de Friedewald, como se observa en la gráfica no. 4, donde valores del LDL calculado se encuentran más dispersos que los datos en los que se aplicó.

A pesar que el análisis de regresión propuesto posee, al igual que la fórmula de Friedewald, los errores analíticos individuales de las determinaciones de CT, HDL y TG, se demostró que ambos no se diferenciaron estadísticamente con los obtenidos por el método directo, presentando en cambio las ventajas de fácil aplicación y bajo costo, lo que en conjunto permite sugerir su aplicación en estudios clínicos.

## X. CONCLUSIONES

1. Existe una tendencia a disminuir la concentración de LDL calculado por la fórmula de Friedewald cuando se aumenta la concentración de triglicéridos, sin significancia estadística.
2. El error en el cálculo del LDL por la fórmula de Friedewald es proporcional a la cantidad de colesterol total (CT) y colesterol de la lipoproteína de alta densidad(HDL), ambos predictores de la precisión del cálculo.
3. Existe correlación entre la determinación del LDL enzimático y el cálculo por medio de la fórmula de Friedewald.
4. La aplicación del análisis de regresión múltiple permite mayor precisión en el cálculo del LDL.
5. La fórmula de Friedewald presenta un error analítico total del 8% cumpliendo con las especificaciones del Programa Americano de Educación del Colesterol (NCEP).
6. Los resultados de la aplicación de la fórmula de Friedewald y de la ecuación de regresión no se diferencian estadísticamente de los obtenidos con métodos directos, presentan ventajas de fácil aplicación y bajo costo.

## **XI RECOMENDACIONES**

1. Debido a los resultados obtenidos en el presente estudio se hace necesario evaluar cómo funciona la ecuación de regresión en valores de triglicéridos menores de 200mg/dl, para sugerir su aplicación.
2. Para facilitar la realización del análisis de regresión múltiple lineal se debe utilizar el programa STATA

## XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Tietz NW. **Fractionation of lipoproteins**; Textbook. Clinical Chemistry Philadelphia, WB Saunders. 1986. 276p. (p.89-101).
  
2. Isselbacher K, et al. **Principios de Medicina Interna**. 13ª ed. Madrid, España: Interamericana McGraw-Hill. Vols I y II 1994. 1436p. (p1096).
  
3. Interamerican Heart Foundation. **Dedicated to reducing disability and death from cardiovascular diseases in the Americas**. Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases in The Americas 1996;210:39,66.
  
4. Jauhianan M. 1997. **Clasificación, prevalencia, detección, evaluación**. USA. Consultado en septiembre de 2002.  
[Http://www.lymetel.com/formación/lclsifi/html/septiembre 2002.](http://www.lymetel.com/formación/lclsifi/html/septiembre%202002)
  
5. Philips M. **Studies of apolipoproteins at the air-water interface**. En: Segrest J, Albers J, editores. Methods in enzyme. Orlando: Academic Press, 1986. pp. 387-402.
  
6. Breslow, JL. **Apolipoprotein genetic variation and human disease**. *Physiol Rev*. 1988. N° 68. pp. 85-132
  
7. Mahley RW, et al. **Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function**. *J Lipid Res*. 1984. N° 25. Pp. 1277-1294.
  
8. Jackson, CL y Bruns, GA. **Isolation and sequence of a human apolipoprotein C-II cDNA clone and isolate and map to human chromosome 19 the gene for apolipoprotein C-II**. *Proc Natl Acad Sci*. 1984. N° 81. pp. 2.945-2.949.
  
9. Wolfram, G y Stephen D. **Role of apolipoprotein D in the transport of bilirubin in plasma**. *Am J Physiol*. 2000. N°2. Pp. 279.

10. Beisiegel, U. **The LDL receptor-related- protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein.** *Nature* 1989. N° 341. pp. 162-164
11. Sreelainen, S, et al. **Association between Apolipoprotein E Alleles and Autoantibodies against Oxidised Low-Density Lipoprotein.** *Clin Chem Lab Med* 2000. N° 38(5). pp. 477–478
12. Cyril, D, et al. **Comparison of the LDL-receptor binding of VLDL and LDL from apoE4 and apoE3 homozygotes .** *Am J Pathol.* 1999. Vol. 276, pp. E553-E557.
13. Christie, RH, et al. **Expression of the macrophage scavenger receptor, a multifunctional lipoprotein receptor, in microglia associated with senile plaques in Alzheimer's disease.** *Am J Pathol.* 1996. N° 148. pp. 399-403
- 14 Packard, C. **LDL Subfractions and atherogenicity: an hypothesis from the university of Glasgow.** *Curr Med Res Op.* 1996. N° 13. pp. 379-390.
- 15 Batal, R, et al. **Plasma kinetics of apoC-III and apoE in normolipidemic and hypertriglyceridemic subjects.** *J. Lipid Res.* 2000. N° 41. pp. 706–718.
16. Brown, MS. **A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis.** *Science.* 1986. N° 232. pp. 34-47.
17. Drake, TA, et al. **Minimally oxidized low-density lipoprotein induces tissue factor expression in cultured human endothelial cells.** 1991. *Am J Pathol.* N° 138. Pp. 601-607.
18. Febbraio, M, et al. **Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice.** *J Clin Invest.* 2000. Vol.105. N° 8. pp. 1.049-1.056.

- 19 Steimberg, D, et al. **Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity.** *N England J Med.* 1989. N°320. pp.915.
20. Brown, MS. **A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis.** *Science.* 1986. N° 232. Pp. 34-47.
- 21 Brown, BG, et al. **Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid-lowering therapy in men with high apolipoprotein B.** *N Engl J Med.* 1990. N°323. pp. 1.289.
22. ROSS, R . **The patogénesis of atherosclerosis.** *N Engl J Med.* 1976. N°420. Pp. 295:369.
- 23 ROSS R. **The patogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.** *Nature.* 1993. N°362. pp.801.
24. Vijayagopal, P. **Macrophages stimulate cholesteryl ester accumulation in colcultured smooth muscle cell incubated with lipoprotein-proteoglycan complex.** *Artheroscler Thromb Vasc Biol.* 1996. N° 16. pp. 1.112-1.121.
25. Schwenke, DC. **Initiation of atherosclerosis lesion in cholesterol fed rabbits. Selective retention of LDL versus selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries.** *Arteriosclerosis.* 1989. N° 9. pp. 908-918.
26. Smith, EB, et al. **Distribution of plasma protein across the human aortic wall: barrier functions and endothelium and internal elastic lamina.** *Atherosclerosis.* 1980. N° 37. pp. 579-590.
- 27 Lewis, B, et al. **Selective retention of VLDL, IDL and LDL in the arterial intima of genetically hiperlipidemic rabbits in vivo.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995. N° 15. pp. 534-542.

28 Simionescu, N y Lupu, F. **Prelesional events in atherogenesis.** *Am J Pathol.* 1986. N° 123. pp. 109-125.

29 VARIOS AUTORES. **“Control de la Colesterolemia en España, 2000: Un instrumento para la Prevención Cardiovascular”.** *Rev Esp Cardiol.* 2000. N° 53. Pp. 815 – 837.

30 Bernard Henry **“Diagnóstico y tratamientos clínicos por el laboratorio”.** 9ª edición. Ed. Ediciones Científicas y Técnicas. Barcelona. 1993. Pp. 200-212.

31. Siekmeier R, Marz. **Precipitation of LDL with sulfated polyanions: three methods compared.** *Clin Chim.* 1990;36:2109-13.

32. Warnick GR. Et al. **Estimation of low-density lipoprotein cholesterol by Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cutpoints.** *Clin. Chem.* 1990;36:15-19.

33. Mcnamara JR. Et al. **Calculated values for LDL in the assessment of lipid abnormalities and coronary disease risk.** *Clin. Chem.* 1990;36:36-42.

34. Nauck M. Et al. **Methods for Measurement of LDL-Cholesterol: A Critical assessment of Direct Measurement by Homogeneous Assays versus Calculation.** *Clin. Chem.* 2002; 2:236-254.

35. Nauck, M, et al. **Measurement of LDL and VLDL cholesterol with precipitation techniques.** A comparison with the ultracentrifugation method. *Clin. Lab.* 1994;40:167-76.

36. Rifai, N. et al. **Measurement of low density lipoprotein cholesterol in serum.** *Clin. Chem.* 1992;38:150-60.

37. Nauck, M, et al. **A simple precipitation-based method for screening of type III hyperlipoproteinemia.** *Clin. Chem* 1999;45:909-11.

38. Pisani, T. **Accurate direct determination of LDL using an immunoseparation reagent and enzymatic cholesterol assay.** Arch. Pathol Lab. Med. 1995;119:1127.
39. Small, DM. **Progression and regression of atherosclerosis lesions: insights from lipids physical biochemistry.** *Atherosclerosis*. 1988. N° 8. pp. 103-129.
40. Duerschmidt, N, et al. **Angiotensin II Induces LOX-1, the Human Endothelial Receptor for Oxidized Low-Density Lipoprotein Circulation.** 1999. N° 100. Pp. 899-902.
41. Rifai N, et al. **Analytical and clinical performance of a homogeneous enzymatic LDL-cholesterol assay compared with the ultracentrifugation dextran sulfate- Mg 2+ method.** Clin Chem 1998; 44/2: 1242-1250.
42. Hernández C, et al. **Lipoproteína(a) y estimación del colesterol LDL mediante la fórmula de Friedewald, un nuevo problema para la vieja ecuación.** Medicina Clínica 2002; 113/8: 2301-06.
43. Eblen-Zajjur A. et al. **Cálculo de la concentración de la lipoproteína de baja densidad: análisis de regresión versus fórmula de Friedewald.** Rev. Med 2001; 129,1263-1270.

**Boleta de selección del paciente****LIGA GUATEMALTECA DEL CORAZÓN****DETERMINACIÓN DE LA LIPOPROTEÍNA DE BAJA DENSIDAD LDL**

Yo \_\_\_\_\_ estoy de acuerdo en participar en el estudio. Se que no estaré expuesto(a) a ningún riesgo y que mi participación es completamente voluntaria y confidencial.

Fecha \_\_\_\_\_ No. de muestra \_\_\_\_\_ No. de encuesta \_\_\_\_\_

Paciente \_\_\_\_\_

Edad \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_

Dirección \_\_\_\_\_ Departamento \_\_\_\_\_

Favor marcar con una X lo que se le pregunta a continuación:

1. Esta bajo tratamiento farmacológico para disminuir el colesterol Si  No
2. Realizó un ayuno estricto de 12 horas Si  No

**Resultados del perfil lipídico**

Colesterol total _____ mg/dl	Triglicéridos _____ mg/dl
HDL _____ mg/dl	LDL calculado _____ mg/dl
LDL enzimático _____ mg/dl	

**Resultados de las concentraciones séricas del Perfil de Lípidos y las  
estimaciones del LDL por fórmula de Friedewald  
y aplicación de la regresión múltiple**

<b>COLES. TOTAL</b>	<b>HDL</b>	<b>VLDL</b>	<b>TG</b>	<b>Edad</b>	<b>LDL CALCULADO</b>	<b>LDL ENZIMÁTICO</b>	<b>LDL REGRESIÓN MULT.</b>
mg/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl	Años	mg/dl	mg/dl	mg/dl
220	39.4	49.8	249	52	130.8	120	116.997
216	42.7		238	49	125.7	111	112.551
221	46.5	40.6	203	43	133.9	115	122.563
241	56.6	43.2	216	49	141.2	120	129.408
182	44.6	49.4	247	51	88	75	74.3912
259	43	70.6	353	48	145.4	128	127.444
185	50.3	62	310	44	72.7	61	56.79
219	35.1	59.4	297	26	124.5	111	109.406
191	48	45.4	227	43	97.6	90	85.225
214	46.7	47.8	239	39	119.5	112	106.75073
181	39	47.2	236	35	94.8	87	82.0521
191	27.9	78.4	392	57	84.7	67	64.2497
182	47.3	67.8	339	47	66.9	53	49.562
252	39.7	62.2	311	51	150.1	138	133.739
173	37.9	59	295	40	76.1	68	60.6146
163	33.8	42.8	214	55	86.4	79	73.74639
208	50.4	47.2	236	50	110.4	101	97.495
263	42.4	39.6	198	49	181	170	169.635
200	35.5	52.6	263	39	111.9	96	97.799
203	44.3	48.2	241	36	110.5	96	97.684
177	34.5	46.4	232	33	96.1	88	83.464
250	48.5	51.6	258	53	149.9	138	135.973
181	33.9	60.4	302	43	86.7	79	70.719
135	24.6	68.4	342	25	42	65	24.589
165	36.3	43.2	216	29	85.5	75	73.711
227	40.2	70	350	59	116.8	100	98.471
164	26.6	41.2	206	55	96.2	86	83.6975
242	41.7	76.6	383	47	123.7	110	104.432
203	49.2	45.8	229	29	108	98	96.066
236	54.2	45	225	50	136.8	127	124.51576
175	40.9	71.6	358	28	62.5	82	44.808
168	45.6	48.8	244	39	73.6	62	60.529
245	49.8	42.8	214	39	152.4	141	140.856
243	43.5	41.4	207	44	158.1	149	146.5145
169	34.4	80.4	402	55	54.2	74	73.526
201	48.2	44.6	223	60	108.2	100	95.442
281	56.9	38.6	193	50	185.5	177	174.734
157	50.6	48	240	40	58.4	72	75.582
176	34.6	62.6	313	55	78.8	69	61.953

173	48.7	59.4	297	58	64.9	78	79.009
229	58.5	40.6	203	60	129.9	108	118.322
193	41.1	56.2	281	51	95.7	132	138.5609
238	50.8	76.8	384	60	110.4	91	90.884
190	54	52.4	262	46	83.6	134	136.784
160	33.1	60.8	304	54	66.1	97	99.604
187	56.1	49.4	247	49	81.5	70	68.276
235	47.7	39.2	196	25	148.1	132	137.728
240	42.1	66.8	334	49	131.1	114	113.867
211	34.8	52.8	264	31	123.4	106	109.5276
286	57	58.4	292	53	170.6	160	155.506
244	47.2	53.2	266	60	143.6	186	189.048
182	61.9	43.2	216	47	76.9	159	165.217
292	68.5	45	225	52	178.5	167	166.626
167	35.1	65.4	327	56	66.5	208	209.017
246	52.1	50.8	254	31	143.1	126	130.178
203	44.2	71.4	357	45	87.4	157	169.311
239	48.9	70.4	352	53	119.7	103	101.741
196	47.1	49	245	49	99.9	149	166.53
245	63.7	68.8	344	54	112.5	123	125.257
135	34.7	44.6	223	42	55.7	160	143.078
170	44.6	46.6	233	53	78.8	61	65.702
208	36.1	43.4	217	34	128.5	117	116.567
223	44.8	46.2	231	59	132	120	118.88
196	34.5	54.8	274	56	106.7	135	139.519
208	37.3	55.8	279	34	114.9	104	100.346
251	38.2	63.2	316	53	149.6	130	132.916
213	42	62.4	312	46	108.6	159	149.362
249	47.8	69.8	349	53	131.4	112	113.5575
204	42.8	50	250	48	11.2	157	159.553
203	33.5	49.8	249	39	119.7	102	106.151
202	54.5	65.2	326	54	82.3	121	105.507
273	44.3	57.2	286	55	171.5	159	156.233
146	32.1	60.2	301	38	53.7	74	37.824
240	43.8	49.4	247	36	146.8	151	153.776
197	42.9	60.2	301	48	93.9	80	78.062
177	45.2	41.2	206	49	90.6	116	118.821
188	43.5	42	210	57	102.5	92	90.252
181	40.4	57	285	48	83.6	73	68.352
145	44.7	40.2	201	52	60.1	180	48.366
291	68	74.6	373	60	148.4	200	129.906
272	44.5	48.8	244	50	178.7	164	165.404
200	48.1	59.2	296	60	92.7	158	76.814
229	40.7	44	220	42	144.3	139	132.127
246	49.9	48	240	54	148.1	133	134.94
157	39	49.2	246	32	68.8	80	85.685

153	43.2	55.2	276	34	54.6	104	100.238
173	41.6	41.4	207	31	90	163	178.685
264	66.8	49.8	249	51	147.4	132	134.439
191	38.4	72.6	363	60	80	115	116.97
231	47.6	72.6	363	52	110.8	101	92.356
199	30.2	72	360	41	96.8	76	78.337
160	33.5	55.2	276	42	71.3	58	56.419
175	41.1	49	245	48	84.9	98	91.373
208	54.4	45	225	30	108.6	96	96.951
192	48.9	52.6	263	52	90.5	147	146.138
254	41.4	53	265	25	159.6	148	146.138
227	41.2	52.4	262	58	133.4	120	118.897
253	61.3	48.2	241	56	143.5	131	130.547
189	44.4	54.2	256	40	93.4	67	79.785
284	55.7	44.4	222	38	183.9	170	172.272
121	51.5	44.6	223	28	24.9	55	53.179
196	47.3	42.4	212	48	106.3	95	94.387
222	34.6	44.8	224	60	143.6	0	129.471
184	42.5	57.8	289	48	83.7	70	68.342
203	42	44.6	223	55	116.4	101	103.649
216	50	73.2	366	39	92.8	79	74.707
205	30.3	59.2	296	38	115.5	88	99.891
198	40.8	42.4	212	47	114.8	103	102.75
329	44.5	73.2	366	52	211.3	181	192.812
165	39.9	41.6	208	34	83.5	227	101.981
354	76.8	50	250	55	227.2	210	214.483
177	46.2	56	280	49	74.8	60	59.88
236	46.8	81.2	406	53	108	88	87.669
214	43.5	64.4	322	49	106.1	90	89.373
205	34.5	51.6	258	27	118.9	149	145.402
241	44.5	45.4	227	33	151.1	140	139.054
232	41.9	42.4	212	54	147.7	137	135.5
225	49.6	39.6	198	46	135.8	120	124.664
232	50.5	59	295	55	122.5	112	106.944
175	33.6	43.6	218	29	97.8	88	85.871
226	31	71	355	41	124	137	135.817
267	38.8	54.4	272	46	173.8	166	159.279
326	44.6	69	345	58	212.4	197	194.604
155	40	47.8	239	38	67.2	56	54.204
209.408	43.9296	53.3632	268.6	45.69			