

DOSIFICACION DEL COLESTEROL Y SUS ESTERES
EN LA SANGRE DE LOS PACIENTES
HEPATICOS, HIPERTENSOS
Y CANCEROSOS.

QUÍMICO



UNIVERSIDAD NAC. DE MEXICO
ESCUELA NAC. DE C. QUIMIGAS
TESIS PROFESIONAL
MAGRE. MONROY. M.

2166



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi esposo el
Sr. Ing.
Rafael Morales G.
con gratitud y cariño

A mi hijo

A mis padres.

A mis hermanos.

A mis respetados y queridos maestros
con eterna gratitud.

A la Escuela Nacional de Ciencias Químicas
y a la
Universidad Nacional Autónoma de México

Al H. Jirado

CAPITULOS

- I.—GENERALIDADES SOBRE COLESTEROL Y ESTERES DEL COLESTEROL.
- II.—METODOS DE DOSIFICACION.—METODO EMPLEADO.
- III.—CASOS CLINICOS OBSERVADOS.
- IV.—RESULTADOS Y CONCLUSIONES.
- V.—BIBLIOGRAFIA.

CAPITULO I

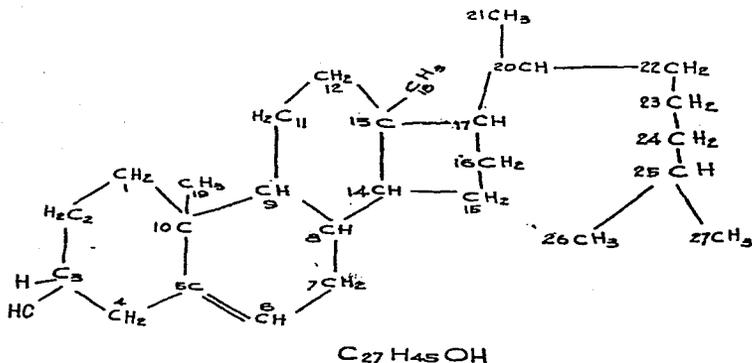
GENERALIDADES DEL COLESTEROL Y ESTERES DEL COLESTEROL

CONSTITUCION QUIMICA DEL COLESTEROL.—Los análisis microanalíticos más modernos llevados a cabo con los procedimientos exactos de Pregl, han fijado definitivamente la fórmula sumaria del "Colesterol" en $C_{27} H_{46} O$. Este nombre moderno de colesterol, está en relación con el hecho de que el único átomo de oxígeno de la molécula está formando parte de un grupo oxidrilo ($C_{27} H_{45} OH$) y en consecuencia se trata de un alcohol.

En la fórmula del colesterol, tal como se acepta en la actualidad, se puede ver el núcleo pentano fenantreno con sus tres anillos hexagonales y uno pentagonal. Se han numerado los átomos de carbono de 1 a 17; los carbonos 18 y 19 corresponden a los grupos metílicos en posición 10 y 13. Los carbonos más allá de 20 (20 al 27) corresponden a la cadena lateral.

El único átomo de oxígeno está ubicado en posición 3 y forma parte de un grupo hidroxilo que le da el carácter de alcohol secundario del colesterol.

Nótese que entre los carbonos 5 y 6 existe un doble enlace. Así pues, el colesterol es un alcohol superior monovalente, secundario, no saturado, tetracíclico, con un grupo hidroxilo en el carbono 3, con un doble enlace en los carbonos 5 y 6 y que puede dar un gran número de derivados.



En la sangre el colesterol se encuentra en su forma libre y combinada con ácidos grasos superiores, es decir en forma de Colesterín-Esteres.

En los glóbulos se encuentra casi la totalidad del colesterol en forma libre; pero en el plasma predominan los ésteres sobre la Colesterina libre.

En la práctica clínica al hablar de Colesterolemia nos referimos, salvo indicación en contrario, al Colesterol del Plasma o del suero (Colesterol más colesterol-ésteres).

La Colesterina fué encontrada por primera vez por Conradi en 1775, en los cálculos biliares y Chevreul en 1815 al encontrarla en la bilis le da el nombre de coleslerina.

PROPIEDADES FISICAS.—El Colesterol, cuerpo sólido se presenta en placas rómbicas, pequeñas o grandes, sin sabor ni olor, de aspecto brillante en el vértice desprendido y la fractura semeja la forma de una escalera. Su densidad es de 1.067, punto de fusión 148.5°, se sublima hacia los 350°C. descomponiéndose en parte. Es insoluble en el agua; soluble en los disolventes orgánicos: éter, cloroformo, sulfuro de carbono, alcohol hirviente, aceites grasos, ácidos grasos (oleico) y en ciertos lipoides.

No obstante que la coleslerina es insoluble en el agua, en el seno de ésta forma suspensiones coloidales, cuyas micelas electronegativas hacen del líquido un coloide anódico. Como coloide el colesterol se conduce como hidrófugo, siendo sus suspensiones precipitables por soluciones lacalinas.

Las disoluciones clorofórmicas del colesterol al 2% tienen poder rotatorio levógiro de 37.1.

PROPIEDADES QUIMICAS.—En 1891, Overton forma un grupo químico con el colesterol, las lecitinas, el protargol y la cerebrina que cataloga entre los lipoides. Estos compuestos encierran radicales de ácidos contenidos en los lípidos cuando éstos no estén unidos a otros compuestos por ligadura éster.

El colesterol presenta diversas reacciones de coloración que lo caracterizan, entre las cuales se cuentan las siguientes:

1.—Reacción de Salkowsky.—Consiste en la formación de un color rojo sangre que se desarrolla en solución clorofórmica de colesterol, cuando se agita con igual volumen de ácido sulfúrico concentrado. El ácido sulfúrico muestra al mismo tiempo una florescencia verde.

2.—Reacción de Windaus.—Disuelta una pequeña cantidad de colesterol en alcohol caliente, se trata la solución por digitonina al 1% en alcohol de 90° con lo que aparece un precipitado blanquecino insoluble.

3.—Reacción Microquímica.—El ácido ósmico es reducido incompletamente por el colesterol y sus ésteres, tomando un tinte café obscuro que pasa al negro por acción del colesterol.

4.—El sudán III y la ancusa en solución alcohólica (Alcohol a 70°) dá color anaranjado a los ésteres del colesterol.

El colesterol puede estar libre o esterificado en parte o con ácidos grasos de numeración elevada (Palmítico, oleico, etc...), y bajo estas dos formas los encontramos en la sangre y en el hígado.

La colessterina tomada en los alimentos es absorbida casi en su totalidad, pasando a la sangre. Esta demostración la ha hecho Laudat observando las variaciones que existen en sujetos a quienes se les han hecho pruebas en el suero sanguíneo estando en ayunas y después de una comida rica en colesterol. El aumento es de breve duración pero existe. Por otro lado, se tienen los hechos experimentales de Anitzchkow y Sokoloff; el primero dando una dieta rica en colesterol, prolongada, a conejos provoca en ellos depósitos de colessterina pura y de ésteres en células del sistema retículo-endotelial, y en las arterias, con la cual aparece una colessterinosis. Sokoloff hace notar que en los carnívoros (hombre, perro, gato) apenas si se presenta ligero aumento en la cifra del colesterol sanguíneo.

Para que la colessterina sea absorbida requiere la presencia de la bilis. Una vez que la colessterina ha sido emulsionada por la bilis, es recogida por los quillíferos intestinales y vertida en los ganglios mesentéricos que la llevan a la cisterna de Pasquet, pasando luego al canal torácico que la vierte a la circulación sanguínea al desembocar en la vena subclavia izquierda; la cual lleva la colessterina a la vena cava superior y ésta al corazón, de donde lo toma la aorta para llevarlo a los tejidos.

Se tendrá en cuenta que no toda la colessterina, libre y esterificada, es absorbida. Según Thannhauser es condición indispensable para la absorción del colesterol que éste esté disuelto en alguna grasa.

Pasando a la sangre el colesterol se encuentra exclusivamente según Wacker Husck, al estado libre, no así en el plasma donde se halla en combinación estérea y accesoriamente en forma de com-

plejos próteo-colestéricos. Los glóbulos rojos del hombre contienen, según Grigaut, 1.45 de colesterol por mil.

Se puede decir que la colessterina se encuentra presente en casi todos los tejidos y líquidos del organismo. El origen de esta colessterina, que como ya vimos, es exógeno y endógeno, debe referirse casi exclusivamente al sintetizado.

Varias opiniones se han dado a cerca de las materias primas A PARTIR DE LAS CUALES EL ORGANISMO PUEDE SINTETIZAR EL COLESTEROL:

Primera.—Oxidando el ácido oleico puro en solución acética por permanganato de potasio, dice Liftchutz, se obtiene una pequeña cantidad de substancia insaponificable capaz de dar la reacción de Liebermann-Burchardi, separada dicha substancia y sometidos los ácidos grasos restantes a nueva oxidación, se obtienen otras pequeñas cantidades de substancia que hacen positiva la reacción.

Segunda.—Además del ácido oleico se ha pensado que hidrocarburo no saturados como el Escyaleno ($C_{30} H_{50}$) podrían ser los predecesores del colesterol, pues este último ha sido encontrado en pequeñas cantidades en el hígado de buey, camero, caballo, cerdo y aún en el hombre y su función fisiológica es hasta hoy desconocida.

Tercera.—Existe una hipótesis en la que se hace derivar de glúcidos, a los esteroides, glúcidos con tres carbonos como el aldehído glicérico o la dioxiacetona, esta hipótesis es de Reichstein.

El organismo también tiene la propiedad de destruir colesterol, según lo demuestran los experimentos hechos por Schoenheimer y Brenck, en ratones; Page y Menechick en gatos y conejos a los que se hace ingerir grandes cantidades de colesterol.

El papel fisiológico que se le atribuye al colesterol es el de elemento plástico universal regulador del intercambio celular, antitóxico, antimicrobiano, antihemolítico, materia prima a partir de la cual el organismo elabora las hormonas sexuales, córtico-suprarrenales, los ácidos biliares, etc...

La transformación más simple que sufre el colesterol es la esterificación. Se efectúa en todos los tejidos pero principalmente en el hígado y los riñones y se lleva a cabo mediante una encima, la colessterol-esterasa y sales biliares que actúan como coencimas. (La colessterol-esterasa o colessterinasa, es una lipasa de la sangre que regula el equilibrio: Colesterol-éster colestérico. Es fermento, hidrolasa y esterasa).

El colesterol libre existe en la sangre en cantidad que varía entre los 40 y 50 mg. por 100 c.c. y como colesterol esterificado en cantidad que varía entre los 190 y 200 mg. por 100 c.c. también de plasma.

La cantidad de Colesterol en los hematíes es ligeramente menor; el total normal para el plasma varía entre los 130 y 250 mg. por 100 c.c.

En el hombre es tan poco influenciado por la alimentación que en clínica ésta no debe ser tenida en cuenta. La edad por el contrario tiene una gran influencia; la colesterolemia aparece extremadamente baja al tiempo de nacer, pero aumenta rápidamente hasta alcanzar en pocos días cifras inferiores en 20 ó 25 mg. a las del adulto normal.

Algunos investigadores han observado cifras elevadas inmediatamente antes del período menstrual y disminuídas durante él, en clínica hay que tenerlo presente cuando se hacen determinaciones del colesterol hemático en la mujer. También se halla aumentado durante el embarazo normal, este aumento alcanza su máximo al rededor de la trigésima semana, a partir de la cual disminuye la cantidad de colesterol libre pero aumenta la de ésteres hasta el momento del parto; la cantidad total de colesterol, sin embargo, sigue por encima de la normal hasta unas ocho semanas aproximadamente después del parto.

El colesterol es en parte de origen exógeno y en parte endógeno; la primera procede sobre todo de los huevós, mantequilla, carnes y algunos vegetales. Las variaciones de la esterolemia en el curso de diversos estados patológicos han sido objeto de estudios sistemáticos por parte de algunos investigadores.

ENFERMEDADES INFECCIOSAS AGUDAS.—En la primera semana se produce una hipocolesterolemia progresiva; las curvas se mantienen bajas en el período de estado, pero durante la convalecencia el colesterol sanguíneo vuelve a los valores normales y aún se desarrolla una hipercolesterolemia que después desaparece lentamente. Es decir, la curva del colesterol sanguíneo sigue una marcha diversa con respecto a la curva de la temperatura. En la primera semana las curvas se separan; en el período de estado guardan cierto paralelismo correspondiendo la colesterolemia más baja a la temperatura más alta; en la defervescencia las curvas se cruzan. Esto sucede en la Fiebre Tifoidea.

En la neumonía, durante el período febril, se produce una hipocolesterolemia. Según Steiner y Turner, este descenso de colesterol sanguíneo se haría especialmente a costa de la fracción de los colesteroles-ésteres.

En la convalecencia la colesterolemia vuelve a lo normal y después se establece una hipercolesterolemia precedida de un corto período de inestabilidad en el nivel del colesterol sanguíneo.

HIPERTENSION ARTERIAL.—Carriere y Huriez han estudiado particularmente este caso de hipertensión permanente y llaman la atención a la falta de hipocolesterolemia en estos casos, a la rareza de la colesterolemia normal y a la gran frecuencia con que se presenta la hipercolesterolemia total.

En el grupo de los hipertensos con complicaciones oculares es donde se encuentran las cifras más elevadas.

LITIASIS BILIAR.—En la coleditiásis se presenta con frecuencia un aumento de colesterol en la sangre. El colesterol se presenta en la bilis en su mayor parte en forma libre, al revés de lo que sucede en la sangre. Esto se debe probablemente a que los colesteroles-ésteres de la bilis son disociados por acciones encimáticas en colesterol libre y los ácidos grasos correspondientes.

TUBERCULOSIS.—En los tuberculosos evolutivos se presenta en general una hipocolesterolemia que llega de un gramo a 0.90 g. por mil y aún a cifras menores. Cuando la mejoría tiende a establecerse, la colesterolemia vuelve poco a poco a las cifras normales y aún las puede sobrepasar.

HIPOTIROIDISMO.—Se presenta un aumento del colesterol sanguíneo. Hurxstahl considera la hipercolesterolemia como índice diagnóstico de hipotiroidismo, mejor que el que proporciona el metabolismo basal, estando en general el grado de hipercolesterolemia en relación inversa con el hipometabolismo.

HEPATITIS.—En los enfermos hepáticos se presenta una hipercolesterolemia.

La Hipercolesterolemia se presenta principalmente en los siguientes casos:

1.—En la diabetes grave progresiva de los adultos y en particular durante el coma; pero por lo general en la diabetes simple de la infancia. En ocasiones se observan valores sub-normales en la diabetes sacarina avanzada y ello tiene gran importancia pronóstica. En esta enfermedad acostumbran a estar avanzadas ambas fraccio-

nes; la libre y la esterificada, el hecho se debe probablemente a las demandas intensas de lipoides debido a la imposibilidad en que se halla el organismo de utilizar otro material combustible; el mecanismo de producción sería pues semejante al de la hiperlipemia de la inanición.

La acidosis diabética se acompaña de un aumento de las proteínas céricas debido a la deshidratación. La hemoconcentración constituye también un factor importante en la producción de hipercolesterolemia.

Es bien sabido, que existe una última relación entre el metabolismo de los hidratos de carbono y el colesterol plasmático y si bien la absorción y oxidación de las grasas no se hallan perturbados en la diabetes sacarina, la lipemia y la colesterolemia parecen indicar un aumento de la demanda grasa debido a la imposibilidad en que se halla el organismo de disponer de glucósidos; la grasa neutra, los ácidos grasos y el colesterol no hacen más que traducir la gran cantidad de lípidos que son acarreados de una a otra parte de la economía.

En la diabetes por lo menos no existe paralelismo definido entre la colesterolemia y la glusemia, la glucosuria, la cetonuria o la acidosis.

De todas formas la cantidad de colesterol en la sangre puede servir como medida valiosa de la necesidad de una terapéutica insulínica cuando la glusemia ha alcanzado ya cifras normales.

Existe también en el plasma, un aumento de colesterol en:

- 1.—Después de la anestesia etérea .
 - 2.—En la glomérulo nefritis crónica con edema (tipo nefrótico).
 - 3.—En la nefrosis lipoides o amiboides, de las cuales no se conoce exactamente la etiología.
 - 4.—En la obstrucción no complicada del colédoco.
 - 5.—En la fístula biliar.
 - 6.—En algunos casos de ictericia hepato-celular debido a la ausencia de la bilis o de algunos de sus componentes en el intestino.
 - 7.—En el Hipotiroidismo (mixedema) especialmente en los niños.
 - 8.—En la xantomatosis múltiple primitiva o esencial.
 - 9.—Después de hemorragias agudas graves.
- Posiblemente en:
- 10.—La avitaminosis A.

- 11.—La arterioesclerosis.
- 12.—La osteoartritis hipertrófica.
- 13.—La catarata senil.
- 14.—El psoriasis.
- 15.—En la enfermedad celíaca de los niños.

A veces en las enfermedades de Gaucher, de Niemann-Pick y de Von Gierke.

La hipocolesterolemia se presenta generalmente en:

- 1.—La anemia perniciosa.
- 2.—La anemia hipertrófica grave.
- 3.—La anemia hemolítica con ictericia (debido a drogas, neumonía, fiebre amarilla y otras infecciones incluyendo la ictericia catarral).
- 4.—Los últimos estados de la cirrosis porta, debido según parece, a la mala absorción por el intestino, a esterificación defectuosa del hígado y a un almacenamiento defectuoso de ésteres en este órgano. Se observa generalmente una discrepancia marcada entre el grado de bilirrubinemia y el de colesterolemia, en caso de lesiones hepatocelulares del hígado, en el sentido de que cuanto más grave es la lesión más intensa es la hipocolesterolemia, debido particularmente a disminución de ésteres colestéricos, que tiene valor diagnóstico diferencial, ya que en la ictericia extrahepática u obstructiva acostumbra haber hipercolesterolemia.
- 5.—En el curso de las enfermedades infecciosas agudas y en la tuberculosis pulmonar.
- 6.—En el hipertiroidismo.
- 7.—La desnutrición con caquexias y consunción.
- 8.—La glomérulo nefritis crónica en sus últimos estados.
- 9.—La obstrucción de las vías urinarias.
- 10.—El Síndrome nefrótico.
- 11.—La Arterio esclerosis.
- 12.—La descompensación cardíaca con edema.
- 13.—La trombosis coronaria.
- 14.—La obstrucción intestinal aguda alta.
- 15.—La pancreatitis aguda.
- 16.—La enfermedad celíaca de los niños.
- 17.—La diabetes.
- 18.—La polineuritis con hiponutrición.
- 19.—La esquizofrenia.

INTERPRETACION CLINICA DE LAS VARIACIONES DE COLESTEROL EN LA SANGRE

HIPERCOLESTEROLEMIA

Antes de la menstruación.
En el embarazo normal.
Diabetes sacarina grave.
Necrosis etérea.
Glomérulo nefritis crónica (tipo
nefrótico).
Nefrosis lipóidea o amiboides.
Obstrucción del colédoco.
Fístula biliar.
En algunos casos de ictericia he-
pato celular.
Mixedema (sobre todo en los ni-
ños).
Xantomatosis múltiple primaria.
Después de la hemorragia agu-
da intensa.
Posiblemente en la Arterioescle-
rosis.
Osteoartritis hipertrófica.
Catarata Senil.
Psoriasis.
Enfermedad celiaca de los niños.
Enfermedad de Gaucher.
Enfermedad de Niemann-Pick.
Enfermedad de Von Gierke.

HIPOCOLESTEROLEMIA

Al tiempo de nacer.
Durante la menstruación.
Anemia perniciosa.
Anemia hemolítica, con ictericia.
Ictericia hepato celular.
Cirrosis porta (últimos estados).
Tuberculosis pulmonar avanza-
da.
Infecciones agudas.
Hipertiroidismo.
Desnutrició y caquexia.
Ultimos estados de la glomérulo-
nefritis crónica (tipo nefrótico).
Obstrucción de las vías urina-
rias.
Arterioesclerosis.
Descompensación cardíaca con
edema.
Trombosis coronaria.
Obstrucción intestinal alta.
Pancreatitis aguda.
Enfermedad celiaca de los niños.
Algunos casos de diabetes saca-
rina.
Polineuritis con desnutrición.
Esquizofrenia.

CAPITULO II

MÉTODOS DE DOSIFICACION. METODO EMPLEADO

Son varios los métodos empleados para la dosificación del colesterol y sus ésteres, por lo que aquí pondré únicamente tres de los principales y el seguido por mí para dicha determinación.

Para la determinación cuantitativa del colesterol en la sangre, cuatro son los procedimientos generales conocidos, a saber:

- 1.—Método colorimétrico.
- 2.—Método gravimétrico.
- 3.—Método nefelométrico.
- 4.—Método titrimétrico.

Cuando en clínica nos referimos a la colesterolemia, se subentendiendo que se trata del colesterol total, es decir, del colesterol libre y de los colesterín ésteres considerados en conjunto.

El método tritrimétrico, consiste en precipitar la colesteroína con solución de digitonina en cantidad exactamente conocida, en separar el precipitado de colesterín-digitónido, en tratar el exceso de digitonina con ácido sulfúrico en caliente a fin de liberar las cuatro moléculas de exosas que contiene y en determinar por último, después de neutralización y por un método apropiado las exosas puestas en libertad.

Este procedimiento es largo y engorroso y tiene un margen de error de 10 a 20%.

El método tiene interés científico, pero no se presta en absoluto para determinaciones en la sangre.

El método nefelométrico, ha sido muy bien estudiado en todos sus detalles y adaptado a determinaciones en la sangre por Mühlbock, Kaufmann y Wolff. Según estos investigadores, es posible determinar por nefelometría tanto el colesterol libre, como los colesterín-ésteres, con una precisión demás satisfactoria tanto para trabajos clínicos como de investigación siempre que se disponga de un buen nefelómetro.

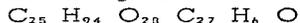
El procedimiento consiste en tratar el líquido que contiene el colesterol con solución de digitonina y en hacer comparaciones nefelo-

métricas del enturbiamiento producido.

El método gravimétrico de determinación cuantitativa del colesterol, que debemos a Windans, es el procedimiento exacto por excelencia.

Este procedimiento está basado en que el colesterol en solución alcohólica forma con la digitonita (un glucósido de la digital) un compuesto de adición molécula, que es prácticamente insoluble y que puede separarse por filtraciones, lavarse y pesarse.

La fórmula del colesterín-digitónido es la siguiente



El peso molecular de este compuesto es 1589.

En consecuencia, basta multiplicar el peso encontrado por el examen por el factor 0.2431 para obtener el peso del colesterol.

El reactivo debe prepararse con la digitonina cristalizada de Merck que deberá de secarse a 100° C. durante dos horas. La solución se hará al 1% de alcohol de 96° en caliente en el baño de maría y se filtrará después de enfriar a fin de separar los grumos que puedan quedar sin disolverse.

Los métodos colorimétricos de determinación cuantitativa del colesterol en el plasma o suero sanguíneo se utilizan en la práctica en gran escala y casi la totalidad de las informaciones que tenemos sobre química-fisiológica y química-clínica del colesterol se basan en exámenes hechos con estos procedimientos.

Si se extrae el colesterol del suero sanguíneo con un disolvente apropiado y se agrega anhídrido acético y ácido sulfúrico, se obtiene un intenso color verde que puede compararse con el que produce una solución exactamente conocida de colesterol.

DETERMINACION DE LA COLESTERINA POR EL METODO DE MYERS Y WARDELL

FUNDAMENTO.—La colessterina se retira de una mezcla seca de sangre y yeso o arena lavada, extrayendo continuamente por el cloroformo. El color verde producido en este extracto clorofórmico por el anhídrido acético y el ácido sulfúrico se compara con la coloración semejante producida en el patrón de colessterina.

MATERIALES.—APARATOS.

Aparato de extracción de Soxhlet, preferiblemente el tipo de si-

fón dedal.

Mortero y mano de almirez de vidrio de tres pulgadas.
Horno de desecación.

REACTIVOS.

Cloroformo, CHCl_3

Yeso, $2 \text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ó arena de mar lavada.

Colesterina, $\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{OH}$

Anhidrido acético $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$

Acido sulfúrico, H_2SO_4

1.—Solución patrón de coleslerina.—En un matraz volumétrico de 100 c.c. se disuelve 0.16 g. de coleslerina en cloroformo y se diluye con éste hasta la señal.

2.—Solución standard de coleslerina.—Se traspasan 5 c.c. de la solución patrón a un frasco volumétrico de 100 c.c. y se diluye con cloroformo hasta la marca.

10 c.c. = 0.8 mg. de coleslerina.

Nota.—Puede usarse un patrón artificial coloreado en vez de la solución de coleslerina en cloroformo. Este patrón artificial está formado por la solución acuosa de verde naf-tol B al 0.005%, pero el color de ésta ha de ser comprobado con el standard de coleslerina verdadera. Si se le conserva bien se mantiene indefinidamente y evita la posibilidad, que ocurre con los patrones verdaderos, de que el color se intensifique debido a la evaporación del cloroformo.

TECNICA.—Con una pipeta se coloca un c.c. de sangre en un mortero de cristal con 5 g. de yeso. Se mezcla bien y se deja en el horno a 105°C . durante una hora para secar. La masa pulverizada se pasa al dedal de extracción, se lleva 20 ó 25 c.c. de cloroformo al aparato y se extrae durante noventa minutos en el reverbero eléctrico.

El extracto clorofórmico se pasa a uno de los frascos de 25 c.c., se enjuaga y se diluye con cloroformo hasta la marca. Agítese bien.

Con una pipeta se colocan en un tubo de ensayo seco, 10 c.c. de la solución standard de coleslerina y en otro tubo también seco, se ponen 10 c.c. de la solución clorofórmica.

A cada tubo se añade 2 c.c. de anhídrido acético y 0.2 c.c. de

ácido sulfúrico.

Los tubos se colocan junto al colorímetro en la dirección de la luz con la cual se va a hacer la lectura y se deja en reposo durante 15 minutos, al cabo de este tiempo se realiza la comparación en el aparato.

CALCULO.

S = Lectura del extracto standar.

R = Lectura del extracto sanguíneo.

X = Miligramos de coleslerina por 100 c.c. de sangre.

$$X = \frac{200 S}{R}$$

Si R se coloca a 10 mm. tendremos:

$20 \times S$ = Miligramos de coleslerina por 100 c.c. de sangre.

La concentración normal de coleslerina en la sangre varía de 140 a 170 mg. por 100 c.c.

DETERMINACION COLORIMETRICA DEL COLESTEROL BASADA EN LA REACCION DE COLORACION DE LIEBERMANN-BURCHARD

PROCEDIMIENTO.—Pipetear 0.4 c.c. de suero sanguíneo aproximadamente en 5 c.c. de alcohol-acetona (1:1) en un matraz volumétrico de 10 c.c. (ó 1 c.c. de suero en un matraz de 25 c.c. si la determinación se desea repetir) agitando la solución y haciéndola hervir en baño maría; enfriar el matraz y aforar a la marca con alcohol-acetona; mezclar y filtrar.

Pipetear 5 c.c. del filtrado y colocarlos en un matraz de 25 c.c. Erlenmeyer, al cual se le ponen 0.15 de solución de potasa (10 mg. en 20 c.c. de agua que ha sido añadida previamente), agitar el líquido suavemente a intervalos, hasta que el álcali se halle mezclado completamente con la acetona-alcohol.

Poner el matraz en una incubadora a 37° ó 40°C. durante 40 minutos.

Sacar, añadir una gota de solución de fenoltaleína, titular con ácido acético al 10% en alcohol absoluto (se requieren cerca de 0.6 c.c.).

La solución de ácido acético pierde lentamente su fuerza a través de la formación del Acetil-acetato.

Añadir una gota más y evaporar a sequedad en el baño maría con la ayuda de aire caliente inyectado a través de un tubo de vi-

drio encorvado para evitar las contaminaciones de la conexión de hule.

Enfriar el matraz y añadir 0.1 c.c. de alcohol al 50% rápidamente, lavando las paredes del matraz con cerca de 3 c.c. de éter de petróleo.

Agitar suavemente a intervalos, hasta que la sal se disuelva y los dos líquidos se separen. Si la sal no se disuelve completamente en 10 minutos, añadir 0.05 más de alcohol al 50%.

Decantar el éter de petróleo por un pequeño embudo en una botella seca y oscura de media o una onza, equipada con un buen tapón de vidrio, cuidando que la capa de encima pase toda. Repetir los lavados con pequeñas porciones de éter de petróleo, cinco veces o más y evaporar los extractos obtenidos a completa sequedad colocando la botella en un recipiente con agua fría, el cual es calentado a baño maría, al mismo tiempo que una corriente de aire se aplica por medio de inyección, como antes.

Si hay alguna duda de que el residuo no esté seco añádanse unas gotas de alcohol absoluto y hágase girar la botella de tal manera que las paredes se mojen y repetir el procedimiento del secado.

DESARROLLO DEL COLOR Y LECTURA.—Ajustar a 24° el agua del baño en un gabinete cerrado obscuro (un cajón equipado con puerta puede servir) y mantener la temperatura en su punto, añadiendo agua caliente o fría según sea necesario a través del procedimiento, para desarrollar el color.

Pipetear 5 c.c. de cloroformo en cada botella que contiene extracto seco de suero y 5 c.c. de la solución standar conteniendo 0.24, 0.4 y 0.6 mg. de colesterol puro en tres botellas similares.

Tapar y colocar las botellas en agua caliente, usando una cesta de alambre para que no se volteen.

Medir 20 c.c. de anhídrido acético puro en recipiente adecuado de tapa de cristal y helarlo en un baño de hielo, añadir un c.c. de ácido sulfúrico concentrado, agitando el recipiente, sin sacarlo del hielo.

A los 9 minutos quitar una de las botellas que contiene el standard del baño de 24°, limpiar la botella hasta secarla, añadir 2 c.c. del reactivo frío, agitar fuertemente la botella por diez segundos y retornarlo al baño.

Leer en el colorímetro entre los 17 y 18 minutos después de que la botella es regresada al baño, contra una solución conteniendo 14 mg. de verde naftol B por 100 c.c. La solución teñida es standardizada contra cada una de las tres soluciones de colesterol standar. Las soluciones problemas son leídas contra la solución standar de la tintura con la cual está más de acuerdo.

METODO DE BLORR PELKAN Y ALLEN PARA DETERMINAR LA COLESTERINA (MODIFICADO)

FUNDAMENTO.—En este método para determinar colesterol total y los ésteres de él en el suero o plasma, se extrae esta substancia con una mezcla de alcohol-éter y se determina por colorimetría en el filtrado, antes y después de precipitarla por la digitonina.

REACTIVOS:

- 1.—Cloroformo.
- 2.—Mezcla de anhídrido acético y ácido sulfúrico.
Se mezclan en una probeta seca, con tapón de vidrio, 20 c.c. de anhídrido acético con 2 c.c. de ácido sulfúrico. Se enfría en el refrigerador. Esta mezcla debe usarse dentro de la primera hora de su preparación.
- 3.—Alcohol-éter.
Se mezclan 75 c.c. de alcohol a 95% con 25 c.c. de éter.
- 4.—Solución de digitonina.—Solución al 0.5% en alcohol al 95%.
- 5.—Eter de petróleo de punto de ebullición 35° a 60°.
- 6.—Solución de colesterol (patrón).
Ícrmo. Se colocan en un matraz volumétrico de 100 c.c. y se diluye con cloroformo hasta la señal de enrase (10 c.c. = 16 mg.).
- 7.—Solución tipo de colesterol para emplear en la determinación.
Se diluye 5 c.c. de la solución patrón anterior hasta 100 c.c. con cloroformo (10 c.c. = 0.8 mg.). Ambas soluciones se conservan bien si se evita la evaporación usando trastos con tapón esmerilado y conservándolos a baja temperatura.

PROCEDIMIENTO.

Preparación del extracto.—Se colocan 20 c.c. de la mezcla alcohol-éter en un matraz volumétrico de 25 c.c. con tapón de vidrio.

Se añade espacio y haciendo girar el matraz un c.c. extracto de suero o plasma. El precipitado que se forma debe ser muy fino y no presentar grumos. Se sumerge el matraz en agua caliente (no

debe acercarse a la llama hasta que comienza a hervir el contenido).

Se enfría a la temperatura ambiente con el agua del grifo y se diluye después hasta la señal de enrase con la mezcla alcohol-éter. Se tapa el matraz, se agita con fuerza y se filtra con papel filtro en pliegue (desengrasado Whatman No. 40), cubriendo el embudo con un vidrio de reloj para reducir la evaporación.

DETERMINACION DEL COLESTEROL TOTAL.—Se ponen 10 c.c. del filtrado, con pipeta en un vaso de precipitados de 50 c.c. y se evapora a sequedad en baño maría caliente (no se debe usar la llama directa). Se añaden 3 c.c. de cloroformo, se deslíe bien con un agitador de vidrio, se hace hervir un momento, se deja posar el sedimento y se decanta con cuidado el líquido claro que sobrenada, recogiénolo en una probeta de 10 c.c. bien seca. Se repite la extracción con cloroformo dos veces más con porciones de 3 c.c. reuniendo los extractos claros en la misma probeta.

Se deja enfriar a la temperatura ambiente y se completa el volumen hasta 10 c.c. con cloroformo. Se colocan 10 c.c. de la solución diluída tipo en otra probeta de 10 c.c.; se añade a cada probeta 2 c.c. de la mezcla de anhídrido acético y ácido sulfúrico. Se tapan ambas probetas, se mezcla el contenido inclinándola a un lado y a otro y se colocan a baño maría a 30°C. durante 15 minutos. Se enfría a la temperatura ambiente 5 min. y se compara en el colorímetro.

Si la solución tipo se pone a 20 se tiene:

4000

Lectura del Problema = mg. de colesterol total por 100 c.c. de la muestra original.

ESTERES DEL COLESTEROL.—Se ponen con una pipeta 10 c.c. del filtrado de alcohol-éter en un vaso de precipitados de 50 c.c. se añade un c.c. de la solución de digitonina, se mezcla haciendo girar el vaso y se evapora a sequedad en baño maría caliente (no se debe usar fuego directo); se deja en baño maría 1 ó 2 minutos, se añaden 10 c.c. de éter de petróleo. Se sumerge el vaso en baño de maría durante el tiempo necesario para que el contenido empiece a hervir y se decanta el líquido claro en otro vaso de precipitados de 50 c.c., se repite la extracción otras 3 veces más. Se evaporan los

extractos combinados de éter de petróleo en baño maría (debe evitarse fuego directo); se extraé el residuo tres veces más con porciones de 3 c.c. de coloroformo, como para la coleslerina total. Se obtiene el color y se compara como para la coleslerina total. El cálculo es también el mismo que para el coleslerol total.

mg. de ésteres del coleslerol x 100

 = ésteres del coleslerol por 100 c.c.
 mg. de coleslerol total

EXAMEN FOTOELECTRICO.—Se usa el filtro No. 66. Se determinan los valores después de establecer el cero con una prueba en blanco conteniendo 5 c.c. de cloroformo más un c.c. de la mezcla de anhídrido acético y ácido sulfúrico.

Los cálculos son:

<u>200</u>	(factor) x Lect. del problema =	mg. de coleslerol total o de ésteres del coleslerol por 100 c.c. de la muestra original.
Lect. de la solución tipo		

Notas.—Las cifras normales de coleslerol total son de 150 a 250 mg. por 100 c.c. de suero. Las de ésteres de coleslerol son del 60 al 75 por ciento del coleslerol total.

Si las muestras que se examinan no son recientes o están deterioradas, el color que se obtiene es poco intenso; también conviene que los vasos de precipitados, pipetas, etc., estén perfectamente secos.

METODO DE SHOENHEIMER Y SPERRY

Este método es el que se empleó para la determinación del coleslerol y sus ésteres en el presente trabajo.

APARATOS.

Espectrofotómetro de Coleman Junior 625 ó Leitz con filtro 244
 Centrífuga.

Horno 100° - 110°C.

Baño de agua tapado a 250°C.

REACTIVOS.

- 1.—Mezcla acetona-alcohol (1:1).
- 2.—Mezcla acetona-éter (1:2).
- 3.—Eter.
- 4.—Solución de digitonina (Watson Philips u Hoffman). Se colocan 400 mg. de digitonina en 100 c.c. de agua, o 4 grs. por litro, se ponen a baño maría para disolverlos. La solución debe quedar clara, dejarla reposar y filtrar.
- 5.—Solución de fenoltaleína al 1%.
- 6.—Solución de potasa al 33%.
- 7.—Solución de ácido acético al 10%.
- 8.—Solución de ácido acético glacial.
- 9.—Anhídrido acético.
- 10.—Acido sulfúrico concentrado.
- 11.—Solución concentrada de colesterol en ácido acético. (100 mg. de colesterol en 100 c.c. de ácido acético glacial).
- 12.—Solución diluída de colesterol. Un c.c. = 0.1 mg. o sea 10 mg. por 100 c.c.

METODO. EXTRACCION.

En un matraz aforado de 25 c.c. poner de 7 a 10 c.c. de mezcla acetona-alcohol y poner un c.c. de suero dejándolo resbalar por las paredes; cuando ha caído todo, agitar para obtener un precipitado fino. Calentar a baño maría hasta que la mezcla empiece a hervir, enfriar a chorro de agua y aforar a volumen. Filtrar y poner en dos tubos de centrífuga como sigue:

(Tubo graduado) Colesterol total	3 c.c. del filtrado
(Tubo sin graduar) Colesterol libre	7 c.c. del filtrado

PRECIPITACION DEL COLESTEROL LIBRE.—A los 7 c.c. del filtrado agregar dos gotas de ácido acético al 10% y 3.5 c.c. de digitonina y agitar cuidadosamente, déjese el agitador y póngase en un frasco de conserva (bien tapado y déjese reposar en sitio fresco y obscuro toda la noche).

PRECIPITACION DEL COLESTEROL TOTAL.—Al tubo que contiene 3 c.c. añadir de 5 a 6 gotas de potasio, mover cuidadosamente hasta que desaparezcan las pequeñas gotitas de potasa, póngase en incubadora a 37° ó 40° durante una hora. Sáquese de la estufa, enfríese y llévese a un volumen de 6 c.c. con mezcla acetona-alcohol, añádase una gota de fenoltaleína y neutralice con el ácido acético

al 10% añadir dos gotas más de ácido y poner 3.5 de solución de digitonina, agítese de igual modo que como se hizo con el libre y póngase a reposar en un frasco de conserva bien tapado.

Después del reposo se centrifugan los tubos de tal manera que el precipitado se conglomere en el fondo (15 a 20 minutos a 2000 revoluciones) y pueda descartarse fácilmente el líquido, se lava dos veces con mezcla de acetona-éter y por fin una vez con éter (en cada lavado se ocupa al rededor de 4 c.c. y se deja de 10 a 15 minutos a 2000 revoluciones en la centrifuga). Vuélvanse a colocar los agitadores correspondientes en cada tubo y llévase a 100° - 110°C. durante 30 min. añadir todavía en la estufa, a cada tubo dos c.c. de ácido acético glacial (siguiendo el mismo orden que se usó para hacer la precipitación y trasvásese cuidadosamente a celdillas del colorimetro) y llévase a baño maría a 250°C. durante 10 minutos. Al final de este tiempo añadir 4 c.c. de anhídrido acético (para cada 20 c.c. de anhídrido acético, un c.c. de ácido sulfúrico concentrado, recientemente preparado) llévase a baño maría durante 30 minutos y poner con cada serie de determinaciones un "blank" de reactivos (2 c.c. de ácido acético más cuatro c.c. del reactivo).

Leer en el colorímetro con celdilla 6-302 ó 6-304 y con filtro 625; léanse en el mismo orden en que se puso los reactivos, para que sea igual el tiempo transcurrido en hacer la lectura en todos los tubos.

CALCULOS.

$$\text{Colesterol total} = \frac{166.7 \text{ Du}}{\text{Ds}} = \text{mg. por 100 c.c.}$$

$$\text{Colesterol libre} = \frac{71.4 \text{ Du}}{\text{Ds}} = \text{mg. por 100 c.c.}$$

$$\text{Mg. de colesterol esterificado} = \text{CT} - \text{CL} = \text{CE.}$$

$$\% \text{ de colesterol esterificado} = \frac{\text{CE} \times 100}{\text{CT}}$$

Du = Densidad óptica del problema.

Ds = Densidad óptica del standard.

Datos normales:

Colesterol total 180 a 220 mg. por 100 c.c.

Colesterol esterificado 60 a 76% del total.

CAPITULO III

**CASOS CLINICOS OBSERVADOS
CASOS NORMALES OBSERVADOS**

CASO No.	SEXO	EDAD AÑOS	COLESTEROL TOTAL	COLESTEROL LIBRE	COLESTEROL ESTERIFICADO
1	M	47	193	61.9	133.1
2	M	58	231	78.4	152.6
3	F	26	187	65.4	121.6
4	F	35	158	39.6	118.4
5	F	32	179	75.2	103.8
6	M	29	178	60.5	117.5
7	F	46	181	47.1	133.9
8	M	39	196	75.5	120.5
9	F	47	180	50.8	129.2
10	F	55	211	64.1	146.9
11	M	36	196	53.9	142.1
12	F	40	185	41.6	143.4
13	F	53	214	33.8	180.2
14	F	42	223	57.9	165.1
15	M	61	228	70.7	157.3
16	M	33	184	55.2	128.8
17	F	40	189	40.6	130.4
18	M	41	217	69.5	147.5
19	F	48	270	55.4	114.6
20	M	38	192	38.4	153.6
21	F	27	178	65.6	112.4
22	M	65	204	77.2	126.8
23	M	54	201	54.9	146.1
24	M	34	183	39.5	144.5
25	M	36	185	49.6	135.4

Los resultados están dados en mg. por 100 c.c.

PACIENTES HEPATICOS

CASO No.	SEXO	EDAD AÑOS	COLESTEROL TOTAL	COLESTEROL LIBRE	COLESTEROL ESTERIFICADO
1	F	70	318	79.2	228.8
2	F	33	227	54.5	172.5
3	F	45	382	111.8	270.2
4	F	57	374	90.1	303.9
5	M	29	269	72.6	196.4
6	F	47	326	72.9	253.1
7	M	63	402	104.5	297.5
8	M	49	332	83	249
9	M	56	302	63.4	238.6
10	M	58	322	99.8	222.2
11	F	28	287	97.6	189.4
12	M	42	325	97.5	227.5
13	M	30	284	92.9	191.1
14	F	40	312	72.4	249.6
15	F	37	286	46.4	188.9
16	M	56	382	113.6	268.4
17	F	38	278	76.7	201.3
18	F	34	286	93.8	192.2
19	F	45	319	94.4	224.6
20	M	46	364	89.8	274.2
21	M	39	306	57.4	248.6
22	F	48	356	109.1	246.9
23	M	52	308	86.4	221.6
24	M	39	291	89.6	201.4
25	F	31	267	82.7	184.3

Los resultados están dados en mg. por 100 c.c.

PACIENTES HIPERTENSOS

CASO No.	SEXO	EDAD AÑOS	COLESTEROL TOTAL	COLESTEROL LIBRE	COLESTEROL ESTERIFICADO
1	M	62	231	53.1	177.9
2	M	46	208	62.4	145.6
3	M	62	319	121.2	197.8
4	F	58	266	66.5	199.5
5	F	60	278	72.3	205.7
6	M	53	198	45.4	143.6
7	F	66	304	83.1	221.9
8	F	59	201	44.3	156.7
9	F	61	365	104.7	251.3
10	M	54	318	89.1	228.9
11	F	56	243	51.1	191.9
12	F	48	228	54.7	173.3
13	F	53	380	76.0	304.0
14	M	55	240	50.4	189.6
15	F	47	285	82.6	202.4
16	M	39	225	67.5	157.5
17	F	58	296	88.8	207.2
18	M	63	270	72.9	197.1
19	F	57	217	56.4	160.6
20	M	59	252	60.5	191.5
21	F	36	275	74.2	200.8
22	F	29	223	49.1	173.9
23	M	58	267	69.4	197.6
24	M	42	296	59.2	236.8
25	F	34	255	94.3	160.7

Los resultados están dados en mg. por 100 c.c.

PACIENTES CANCEROSOS

CASO No.	SEXO	EDAD AÑOS	COLESTEROL TOTAL	COLESTEROL LIBRE	COLESTEROL ESTERIFICADO
1	F	69	270	72.3	197.7
2	F	56	228	64.9	164.1
3	F	72	285	76.1	208.9
4	F	45	304	72.9	231.1
5	F	49	286	92.2	193.8
6	F	59	275	82.5	192.5
7	F	66	306	73.5	232.5
8	F	38	298	80.5	217.5
9	F	48	274	76.3	197.7
10	F	54	261	81.0	180.0
11	F	39	304	76.0	228.0
12	F	49	229	66.4	162.6
13	F	77	308	95.5	212.5
14	F	68	304	82.1	221.9
15	F	34	216	86.4	129.6
16	F	58	224	54.6	167.4
17	F	46	280	93.1	286.9
18	F	62	318	76.6	241.4
19	F	47	364	96.7	267.3
20	F	75	216	79.6	136.4
21	F	60	329	76.3	252.7
22	F	36	272	65.3	206.7
23	F	74	266	71.9	194.1
24	F	76	242	65.8	176.2
25	F	52	271	81.7	181.5

Los resultados están dados en mg. por 100 c.c.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Al determinar los valores de colesterol y sus ésteres en la sangre he tenido en cuenta:

- a).—Sexo.
- b).—La edad de las personas.
- c).—Las determinaciones las hice siempre con la sangre extraída a los pacientes estando éstos en ayunas.
- d).—Para los trabajos usé siempre material perfectamente lavado y desengrasado.
- e).—Para evitar variaciones en la observación del color usé el colorímetro fotoeléctrico de Kett-Summerson.
- f).—Todas las lecturas colorimétricas, las hice en los siguientes 15 minutos después de agregar el anhídrido acético y llevar al baño de maría.
- g).—Las determinaciones acusan en casos normales:

Colesterol	Esteres del Colesterol.
Máx. 231 mg. % por 100 c.c.	180.2 mg. por 100 c.c.
Mín. 158 mg. % por 100 c.c.	112.4 mg. por 100 c.c.
Prom. 281 mg. por 100 c.c.	203 mg. por 100 c.c.

h).—En la sangre de los pacientes hepáticos encontré:

Colesterol	Esteres del Colesterol.
Máx. 402 mg. por 100 c.c.	297.5 mg. por 100 c.c.
Mín. 227 mg. por 100 c.c.	172.5 mg. por 100 c.c.
Prom. 317 mg. por 100 c.c.	230.4 mg. por 100 c.c.

i).—En la sangre de los pacientes hipertensos los resultados fueron:

Colesterol	Esteres del Colesterol.
Máx. 380 mg. por 100 c.c.	304 mg. por 100 c.c.
Mín. 189 mg. por 100 c.c.	143.6 mg. por 100 c.c.
Prom. 241 mg. por 100 c.c.	195.1 mg. por 100 c.c.

j).—En la sangre de los pacientes cancerosos, los resultados fueron los siguientes:

Colesterol	Esteres del Colesterol.
Máx. 380 mg. por 100 c.c.	129.6 mg. por 100 c.c.
Mín. 216 mg. por 100 c.c.	286 mg. por 100 c.c.
Prom. 281 mg. por 100 c.c.	203 mg. por 100 c.c.

CAPITULO V

BIBLIOGRAFIA

- Stephan Miall.—Diccionario de química.—267, 1945.
- Dr. Leonidas Corona.—Química normal y patológica de la sangre.—807, 813, 1942.
- Jour. Biol. Chem.—(Técnica original) Bloor, W. R.—29, 437, 1917.
- Jour. Biol. Chem.—(Técnica original) Schoenheimer, R. and Sperry W. M.—106 : 745, 1934.
- Jour. Biol. Chem.—Warren M. Sperry and Florence C. Brand.—“The colorimetric determination of cholesterol”.—150 : 315, 1943.
- Jour. Biol. Chem.—Sabel, Albert E. and Mayer Margot A.—Improvements in the Schoenheimer-Sperry. Method for the determination of free cholesterol.—151 : 255, 1945.
- Jour. Biol. Chem.—103: 439, 1933.
- Am. Jour. Clin. Path.—8. Tech. Suppl, 2 : 91. 1938.
- I. G. Masy.—“Nutrition and chemical Growth in Childhood”.—1 : 331, 1942.
- Apuntes de Bioquímica en la E.N.C.Q. México.
- Cita anual Review of Biochemistry.—IV: 217, 1935.
- Kolmer y Koerner.—Métodos de laboratorio clínico. 789, 1943.
- Ulacia E. Ramón.—Contribución al estudio del diagnóstico oportuno del cáncer por dosificación del colesterol.—Tesis.—22, 1947.
- Ramírez P. Ma. Dolores.—Contribución al estudio de una intradermo-reacción con colesterol, en el diagnóstico de las enfermedades con hipercolesterinemia.—Tesis.—9, 1940.