

7 00381



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS**

**CONTRIBUCIÓN DEL FENOTIPO DE
APOLIPOPROTEÍNA (a) A LA CONCENTRACIÓN DE
LIPOPROTEÍNA (a) EN NIÑOS Y ADOLESCENTES CON
DIABETES MELLITUS TIPO 1**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A :

GUILLERMO CELESTINO CARDOSO SALDAÑA

Director de tesis: Dr. EDMUNDO CHÁVEZ COSIO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MÉXICO, D.F.

Mayo, 2002.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Presidente	Dr. Edmundo Chávez Cosío.
Primer Vocal	Dr. Luis Felipe Montaña Estrada.
Segundo Vocal	Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza.
Tercer Vocal	Dra. Martha Franco Guevara.
Secretario	Dr. Oscar Armando Pérez Méndez.
Suplente	Dr. Arturo Edgar Centeno Galindo.
Suplente	Dr. Ricardo Lascurain Ledesma.

Sitio donde se realizó la tesis:

Departamento de Endocrinología
Instituto Nacional de Cardiología
Ignacio Chávez.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a:

Los pacientes con diabetes mellitus tipo 1, a sus hermanos y a sus padres, por su entusiasta participación.

El personal del Departamento de Endocrinología Pediátrica del centro Médico Nacional La Raza, por su valiosa colaboración.

El personal del Departamento de Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez por compartir conmigo esta experiencia.

El Dr. Carlos Posadas Romero, Jefe del Depto. de Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez por sus valiosos consejos, enseñanzas y constante apoyo.

A mis padres Ma. De la Luz y Celestino :

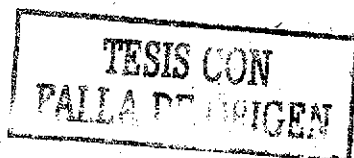
*Por darme la vida, por el amor,
el sacrificio y el esfuerzo que
cada uno ha realizado para hacer
de mi un hombre integro.*

A mis hermanos Juan Manuel y Gustavo :

*Por compartir conmigo su cariño y amistad,
siempre y en cualquier lugar, no importa
lo lejos que puedan estar.*

A mi esposa Rafaela y a mis hijos Guillermo y Lucia :

*Por darme, sin condición alguna, todo el tiempo y el espacio necesarios
para realizar mi labor, pero sobre todo, por el amor que han depositado
cada día para que pudiera lograr esta meta.*



ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
I LÍPIDOS Y LIPOPROTEÍNAS	2
II DIABETES MELLITUS Y ATROSCLEROSIS.	13
III LIPOPROTEÍNA(a) Y FENOTIPOS DE APO(a).	18
IV LIPOPROTEÍNA(a) Y ATROSCLEROSIS.	22
V LIPOPROTEÍNA(a) Y DIABETES MELLITUS	24
VI PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
VII OBJETIVOS	28
VIII MATERIAL Y MÉTODOS	29
IX RESULTADOS	35
X DISCUSIÓN	45
XI REFERENCIAS	52

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

RESUMEN.

En este trabajo, dos aspectos relacionados con la Lp(a) fueron abordados: 1) La identificación de los fenotipos de apo(a) y 2) su asociación con las concentraciones de Lp(a) en la diabetes mellitus tipo 1.

Las isoformas de la apolipoproteína(a) se identificaron en plasma usando como referencia 5 fenotipos recombinantes de apo(a) de 10 a 34 kringles IV y mediante electroforesis en gel discontinuo de acrilamida 3.75% / 6%. seguida de una inmunotransferencia a papel de nitrocelulosa de alta afinidad y su análisis por densitometría. Los resultados indican que el uso del método descrito tiene una resolución de 1 a 2 kringles IV, no se requiere de tratamiento previo de la muestra, el tiempo para obtener los resultados se reduce en 50%. En 90% de las muestras fue posible identificar al menos una isoforma. Con este método se estudiaron 25 pacientes con DM1, de 1 a 17 años de edad, a un hermano sin diabetes y a ambos padres. Se determinaron las concentraciones de: glucosa, microalbuminuria, hemoglobina glucosilada, lípidos, lipoproteínas, apoproteínas A y B, Lp(a) e isoformas de apo(a).

La mediana de Lp(a) en el DM1, en los hermanos, padres y madres, fueron de 8.3, 8.2, 4.2 y 9.3 mg/dL respectivamente (p NS). La prevalencia de Lp(a) mayor de 30 mg/dL, fue igual en el DM1 y su hermano, pero 3 y 1.5 veces mayor a la de sus progenitores. La Lp(a) de cada progenitor correlacionó positivamente con la Lp(a) de su hijo sin diabetes ($p < 0.03$) pero no con la del DM1. En el DM1 y sus familiares, la distribución de apo(a) fue bimodal (p NS). En el no DM y en las madres la Lp(a) fue significativamente más alta para aquellos sujetos con una y dos isoformas, respectivamente. La apo(a) del DM1 y de las madres correlacionaron inversamente con la Lp(a). La apo(a) de los progenitores correlacionó significativamente con la de sus dos hijos. No hay diferencias en la concentración de Lp(a), ni en la distribución de las isoformas de apo(a) entre el DM1 y sus familiares. El riesgo de aterosclerosis en la DM1 no se asocia con la concentración de Lp(a) ni con las isoformas de apo(a).

I LÍPIDOS Y LIPOPROTEÍNAS.

El colesterol, los triacilglicérols, los fosfolípidos y los ácidos grasos, son elementos estructurales de las membranas celulares, son fuente de energía y precursores de hormonas y vitaminas. Se combinan con algunas proteínas, conocidas como apoproteínas o apos, para formar las lipoproteínas. El centro de estas macromoléculas está compuesto por lípidos hidrofóbicos, triacilglicérols, ésteres de colesterol y colesterol no esterificado, rodeados por una capa de fosfolípidos con las cadenas de ácidos grasos hidrofóbicos dirigidos hacia el centro y los extremos polares hidrofílicos dirigidos hacia la parte externa de la lipoproteína (Figura 1).

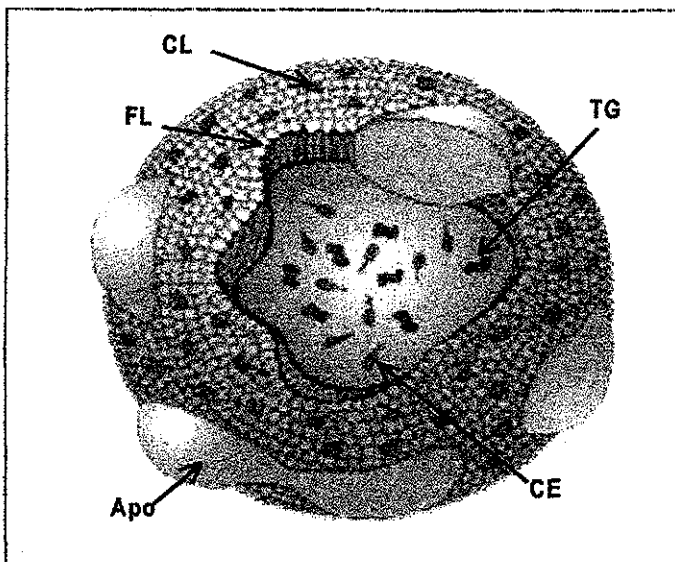


Figura 1. Estructura de las lipoproteínas. CL: colesterol libre, FL: fosfolípidos, Apo: apolipoproteína, TG: triacilglicérol, CE: colesterol esterificado.

Se han empleado diversos criterios para la clasificación de las lipoproteínas: composición química (cantidad y naturaleza de los lípidos y de las proteínas), actividad frente a polianiones y lectinas (reacciones de precipitación), actividad inmunológica (anticuerpos anti-apoproteínas), por su origen, metabolismo y por sus propiedades físicas (dimensiones, movilidad electroforética, densidad). Actualmente, las propiedades fisicoquímicas son las más usadas, de ellas deriva el nombre que cada una recibe (Tabla I).

Tabla I

Clasificación de las lipoproteínas en función de su densidad de hidratación (1,2).

Lipoproteína	Tamaño Ø (nm)	Densidad [g/mL]	Movilidad electroforética	Porcentaje			
				TG	Col.	FL	Prot.
Qu	> 70	0.94	Origen	86	5	7	2
VLDL	30-90	0.930-1.006	Pre-β	55	19	18	8
IDL	20-30	1.006-1.019	β-lenta	23	38	19	19
LDL	18-25	1.019-1.063	β	6	50	22	22
Lp(a)	26.9	1.050-1.120	β-hundida	19	45	5	27
HDL ₂	10	1.063-1.125	α-1	5	22	33	40
HDL ₃	7	1.125-1.210	α-2	3	17	25	55

Qu: Quilomacrón, VLDL: lipoproteína de muy baja densidad, IDL: lipoproteína de densidad intermedia, LDL: lipoproteína de baja densidad, Lp(a): lipoproteína(a), HDL: lipoproteína de alta densidad, Ø: diámetro, Prot.: proteína, TG: triacilgliceroles, Col.: colesterol total, FL: fosfolípidos.

Los quilomicrones (Qu) son las lipoproteínas más ricas en TG, se sintetizan en el intestino, normalmente se encuentran en el plasma después de la ingestión de los alimentos y su principal función es el transporte de los lípidos de origen exógeno.

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), también son ricas en triacilgliceroles, pero son sintetizadas en el hígado y transportan los lípidos de origen hepático hacia los tejidos periféricos. Los TG de las lipoproteínas son hidrolizados, principalmente, por una lipasa de lipoproteínas (LPL). Al perder parte de sus triacilgliceroles estas lipoproteínas se convierten en remanentes de quilomicroción o en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL).

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL), son lipoproteínas ricas en colesterol, se sintetizan a partir de las IDL, aunque una fracción de ellas también puede sintetizarse directamente en el hígado. Estas lipoproteínas son las principales transportadoras del colesterol, se unen a sus receptores localizados en la superficie de prácticamente todas las células, aportando colesterol a los tejidos periféricos.

Las lipoproteínas de alta densidad (HDL), además de ser partículas ricas en colesterol, son ricas en proteínas. Su principal función es transportar el colesterol de los tejidos periféricos al hígado, donde se metabolizan o se excretan por las sales biliares, este proceso se conoce como transporte reverso del colesterol.

Las apolipoproteínas tienen tres funciones básicas en una lipoproteína: son proteínas estructurales, cofactores de enzimas lipolíticas y son los ligandos de receptores específicos localizados en la membrana celular. Las principales apolipoproteínas, su peso molecular, el sitio de biosíntesis,

la lipoproteína de la que forman parte, su función y concentración en plasma, se enlistan en la Tabla II.

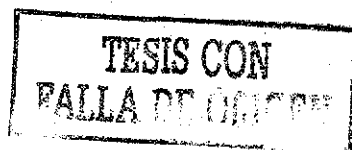
Tabla II

Características y propiedades de las principales apolipoproteínas humanas (3).

Apo	P.M. (kDa)	Localiza ción	Función	Origen	[mg/dL]
AI	28,016	HDL, Q μ	Cofactor de LCAT.	Hígado e intestino	121±24
AII	17,414	HDL	Catálisis de LH.	Hígado	37±9
AIV	46,465	HDL, Q μ	Activador de LCAT.	Hígado e intestino	...
Apo(a)	300,000 a 800,000	Lp(a)	Interfiere la fibrinólisis.	Hígado	-
B-100	512,000	VLDL, LDL	Metabolismo y ligando de receptor.	Hígado	98±20
B-48	264,000	Q μ	Estructural y secreción.	Intestino	*
CI	6,630	HDL, VLDL, Q μ	Activador de LCAT.	Hígado	7±2
CII	8,900	HDL, VLDL, Q μ	Cofactor de LPL.	Hígado	3.7±1. 8
D	22,000	HDL	Transporte reverso de colesterol.	Hígado	...
E	34,145	VLDL, HDL	Ligando de receptor.	Hígado	4±1

P.M.: peso molecular, Q μ : quilomacrón, LCAT: lecitina-colesterol aciltransferasa, LH: lipasa hepática, LPL: lipasa de lipoproteínas, (*) En el postprandio la concentración es variable y en ayuno no se encuentra en plasma.

Metabolismo de los Quilomacrónes.



Los quilomicrones se ensamblan en las células de la mucosa intestinal, a partir de los triacilgliceroles y el colesterol de la dieta y de la apoB-48 sintetizada en los enterocitos. La apoB-48 le da estabilidad al Q μ , es indispensable para que la lipoproteína sea transportada a través de la pared de los vasos linfáticos y de éstos al torrente sanguíneo. Otras apos que se agregan al Q μ en la mucosa intestinal son la apoAI y AIV(4). Los Q μ son transportados por el conducto torácico hasta el sistema porta y de ahí al hígado, donde son metabolizados. La LPL que se encuentra unida a las células endoteliales de la pared vascular se libera al torrente sanguíneo en presencia de lipoproteínas ricas en triacilgliceroles, la apoCII del Q μ es el cofactor para que la LPL se active y comience la hidrólisis de los TG(5). Después de la hidrólisis de TG, los componentes de superficie, apoAI y apoCII, se intercambian por apoE de las HDL nacientes. Los monoacilgliceróles y los ácidos grasos generados son catabolizados en las células musculares o se depositan en el tejido adiposo como TG. El Q μ al perder triacilgliceroles disminuye de tamaño, transformándose en remanente de Q μ . La apoE guía al remanente de Q μ al receptor de apoE en la membrana de los hepatocitos, donde es internalizado (6) (Figura 2).

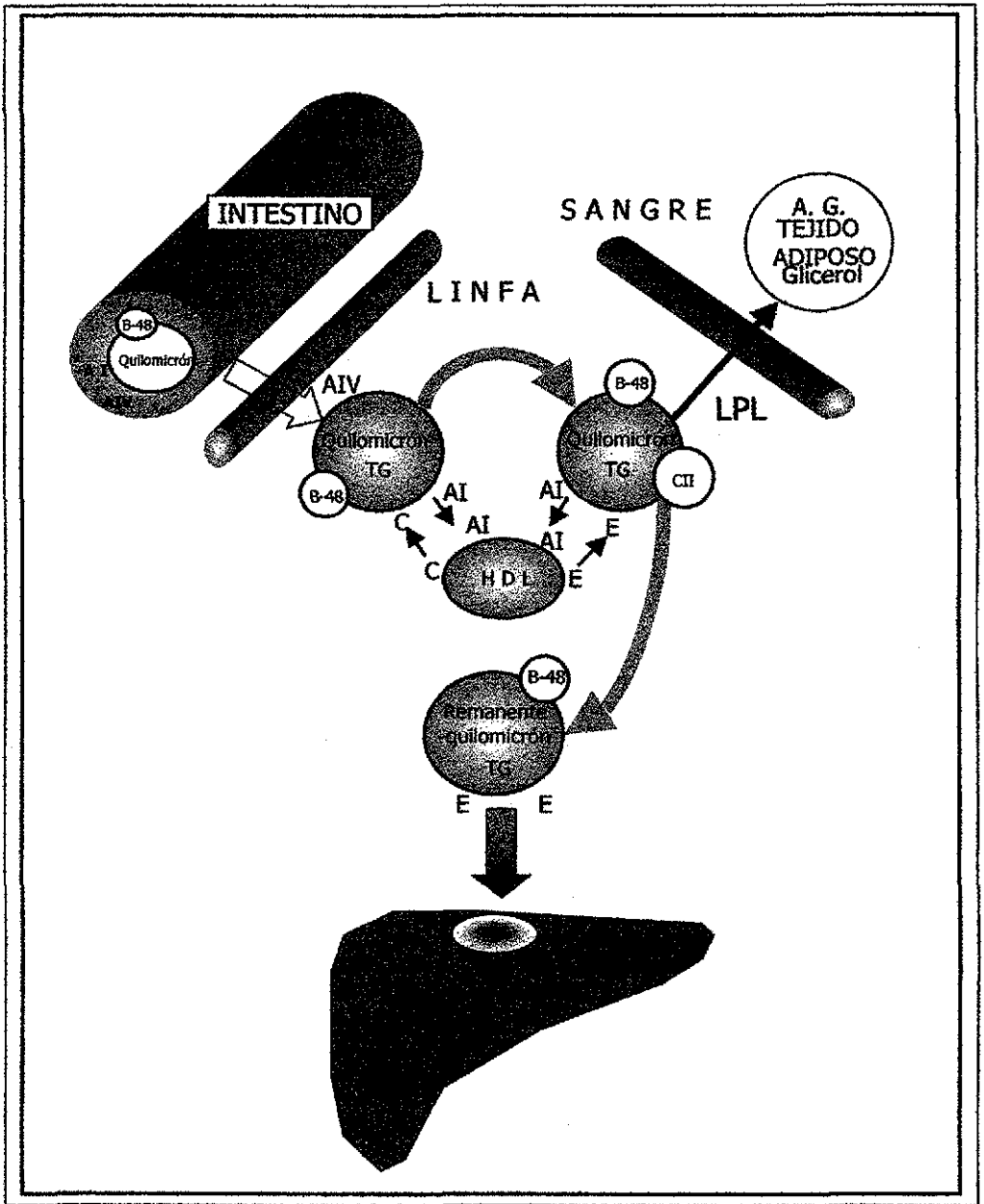


Figura 2. Metabolismo normal de los quilomicrones. AI, AIV, B48, CII, E: apolipoproteínas, TG: triacilglicerol, A.G: ácido graso, HDL: lipoproteína de alta densidad (7).

Metabolismo de las VLDL.

El metabolismo de las VLDL es similar al de los Q μ . Las VLDL son sintetizadas en el hígado y su principal componente protéico es la apoB-100. La apoB-100 es indispensable para el transporte a través de la membrana de los hepatocitos. Al entrar en la circulación, la VLDL adquiere la apoCII de las HDL, cofactor de la LPL que modula su actividad. Por un mecanismo similar al del remanente de Q μ , las VLDL se transforman en remanentes de VLDL o IDL, enriquecidas en colesterol y con dos componentes protéicos básicos, la apoB-100 y la apoE obtenida por intercambio con las HDL(8). Las IDL se unen a los receptores hepáticos apoB-E, son internalizadas y catabolizadas en el hepatocito. Algunas IDL permanecen más tiempo en circulación y al pasar por el hígado la lipasa hepática de triacilglicerol hidroliza los TG restantes en la molécula para convertirla en LDL (Figura 3).

Metabolismo de las LDL.

El colesterol y los triacilglicerol de origen hepático son ensamblados en las VLDL. La hidrólisis de los triacilglicerol de esta lipoproteína la transforma en LDL(7), el principal transportador de colesterol en la circulación sanguínea. A través de la apoB-100, las LDL circulantes se unen con alta afinidad a su receptor apoB/E, que se encuentra prácticamente en todas las células.

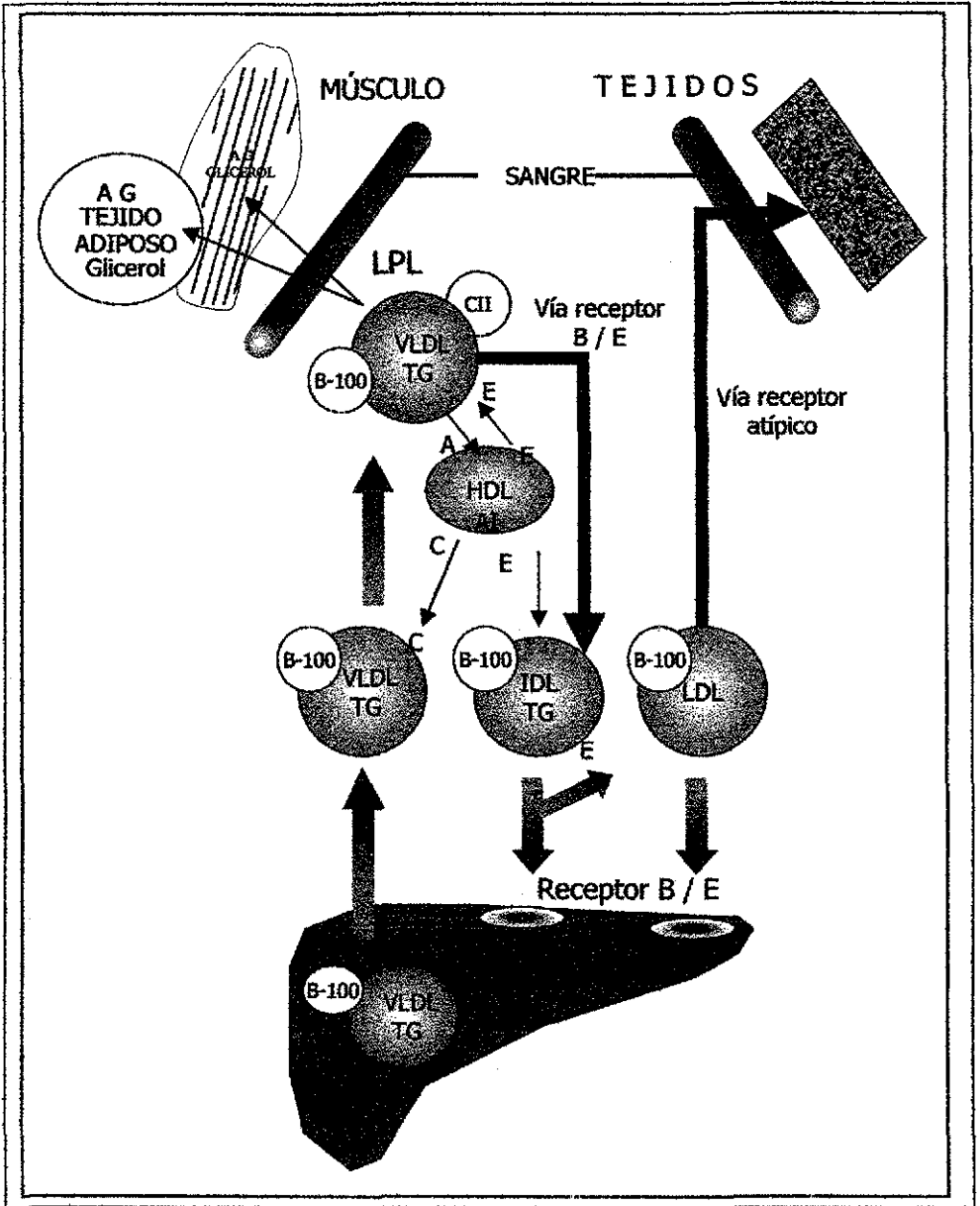


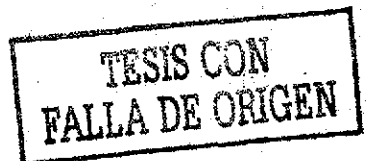
Figura 3. Metabolismo de lipoproteinas de muy baja densidad, VLDL. AG: ácido graso; B-100, CII, A, E: apolipoproteinas, VLDL, LDL, IDL, HDL: lipoproteinas de muy baja, baja, intermedia y alta densidad, respectivamente; TG: triacilglicerol; C: colesterol; LPL: lipasa de lipoproteinas (7).

La LDL y el receptor son internalizados a las células por endocitosis(7). Las vesículas de endocitosis fusionan su membrana con la de los lisosomas, cuyo contenido de enzimas estererasas transforma el colesterol esterificado en colesterol libre(9). El receptor puede ser reciclado a la superficie celular para unir otra LDL o puede ser catabolizado por proteasas. El colesterol libre que ha salido del lisosoma viaja a las cisternas del retículo endoplásmico rugoso donde tiene tres efectos importantes: a) disminuye la actividad de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa, que cataliza el primer paso en la biosíntesis *de novo* de colesterol; b) aumenta la actividad de la enzima Acil-CoA: Colesterol Acil Transferasa (ACAT), que esterifica el colesterol libre y c) disminuye el número de receptores para apoB-100 expuestos en la superficie celular. Este último evento evita la acumulación de colesterol en el interior de las células(10).

Cuando la concentración de LDL en plasma es alta, el número de partículas que migran al espacio subendotelial es mayor y permanecen más tiempo en él. Las células del endotelio, los monocitos y las células de músculo liso secretan citocinas (interleucina-1, factor de necrosis tumoral alpha), quimiocinas (factor quimioatrayente de macrófagos monocitos e interleucina 8) que oxidan las LDL haciéndolas afines por los monocitos, que se transforman en macrófagos y finalmente, debido al cúmulo de colesterol, en células espumosas(11).

Metabolismo de las HDL.

Las HDL nacientes se ensamblan en el intestino y en el hígado a partir de fosfolípidos, apo-AI y componentes de superficie del Qu. Estas partículas, de forma elíptica, incorporan el colesterol libre de las membranas celulares de los tejidos periféricos y probablemente, también de las placas aterosclerosas. La enzima lecitina:colesterol O-aciltransferasa (LCAT), adherida a la superficie de la HDL naciente y activada por la apoAI, esterifica el colesterol libre, que migra al interior hidrofóbico de la lipoproteína; ésta, se transforma en una partícula esférica, la HDL₃. Este proceso hace la HDL₃ más grande y ligera, transformándola en HDL₂, figura 4(12). El colesterol esterificado es removido de las HDL por dos mecanismos: 1.- mediante la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) que intercambia el colesterol esterificado de las HDL₃ por TG de las lipoproteínas que contienen apoB (Qu, VLDL, IDL y LDL), estas lipoproteínas lo llevan de regreso al hígado donde se metaboliza, y 2.- mediante la acción de la lipasa hepática, localizada en el endotelio hepático, esta enzima no solo hidroliza triacilgliceroles, sino que además, por sus actividad de fosfolipasa, hidroliza fosfolípidos de las HDL. La pérdida de ésteres de colesterol y de fosfolípidos convierte la HDL₂, de nuevo, en HDL₃ (Figura 4) (13,14). Las HDL pueden permanecer en circulación durante varios días antes de ser catabolizadas por el hígado, riñón y otros tejidos.



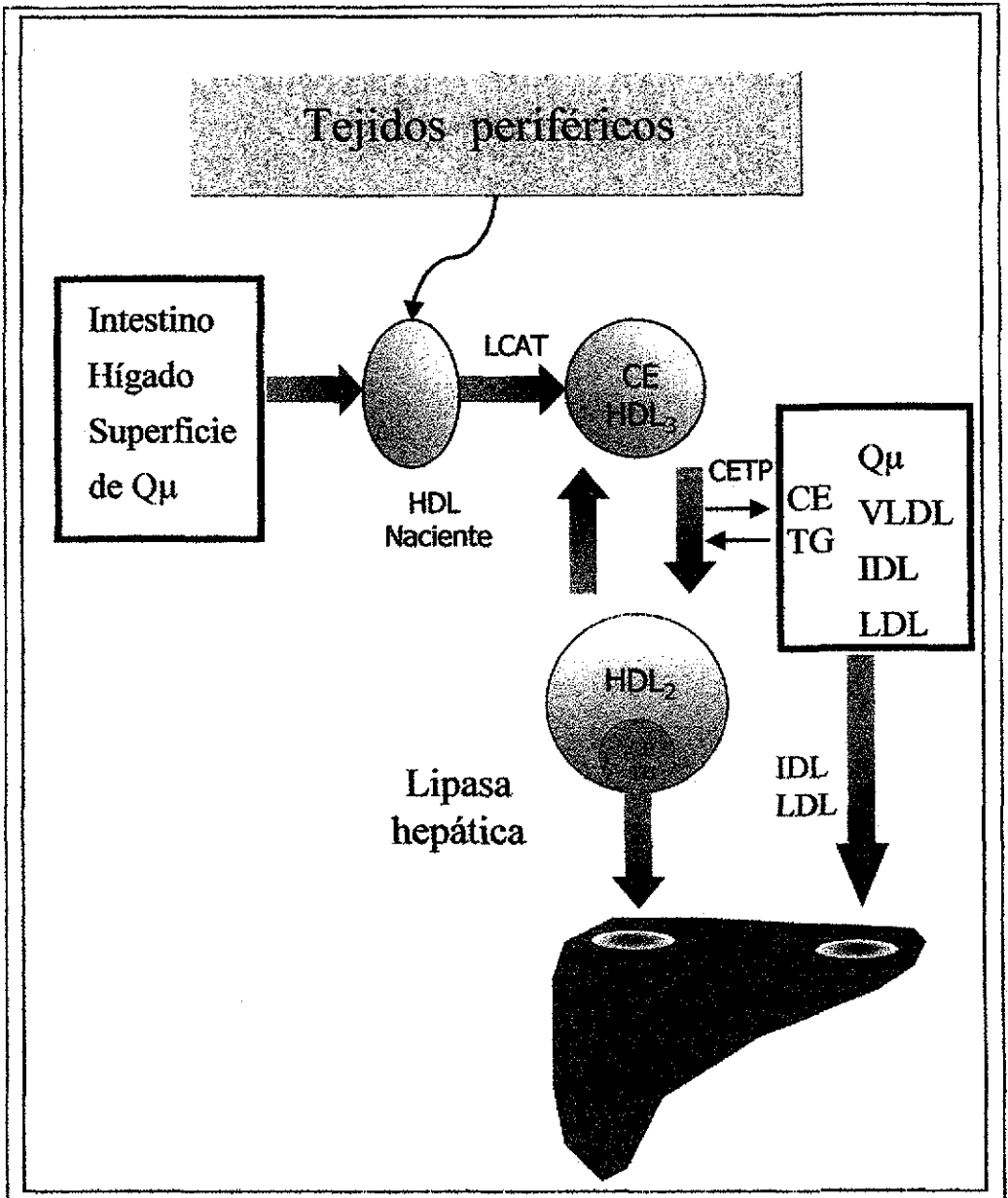


Figura 4. Metabolismo de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Q μ : quilomicrón, LCAT: lecitina:colesterol O-aciltransferasa, CE: colesterol esterificado, CETP: enzima transferidora de ésteres de colesterol, VLDL, IDL, LDL y HDL₃ y ₂: lipoproteínas muy baja, intermedia, baja y alta densidad, respectivamente(7).

III DIABETES MELLITUS Y ATEROSCLEROSIS.

La Diabetes Mellitus (DM) es un síndrome que se caracteriza por anormalidad en la secreción de insulina o por deficiencia en la acción de esta hormona que, en ambos casos, conduce a la hiperglucemia. La diabetes mellitus se suele acompañar de un incremento plasmático de aminoácidos y lípidos.

La hiperglucemia crónica puede provocar múltiples complicaciones en el paciente con DM: retinopatía, nefropatía, neuropatía periférica y autonómica, alteraciones en la función sexual, hipertensión arterial, enfermedad cerebro vascular, anormalidades en el metabolismo de lípidos y un desarrollo acelerado de la aterosclerosis.

Actualmente y a la luz del conocimiento generado en los últimos veinte años en las áreas de la genética, la inmunología, la bioquímica y la epidemiología, la DM se clasifica desde 1997 de acuerdo a la etiopatogenia en: diabetes mellitus Tipo 1, diabetes mellitus Tipo 2 (Tabla I), diabetes asociada a otras enfermedades, diabetes gestacional e intolerancia a la glucosa (15).

La aterosclerosis es un proceso crónico-degenerativo de la pared vascular, resultado de la exposición a múltiples factores de riesgo tanto genéticos como ambientales. En el paciente con diabetes, la aterosclerosis es la causa número uno de mortalidad. Diversos estudios epidemiológicos y clínicos han mostrado que en el paciente con diabetes mellitus la enfermedad

arterial coronaria es hasta cuatro veces más frecuente que en los sujetos sin diabetes(16-19). Aunque su incidencia está estrechamente asociada a factores como la hipertensión arterial, el tabaquismo, las dislipidemias, la obesidad, el estilo sedentario de vida y los antecedentes familiares, en el paciente con diabetes, una parte significativa del riesgo de aterosclerosis no se ha podido explicar satisfactoriamente (3). Actualmente en México existen aproximadamente 3.8 millones de diabéticos y la DM ocupa el 3er lugar entre las causas de mortalidad en el país(20).

Alteraciones del metabolismo de los lípidos en la diabetes mellitus tipo 1.

Las alteraciones de lípidos y lipoproteínas dependen, en mayor o menor grado, del tipo de diabetes, por lo que es preciso diferenciar entre las anormalidades de lípidos que ocurren en los pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2. En los adolescentes con diabetes tipo 1, la concentración del colesterol total es igual a las de sus familiares no diabéticos; el colesterol de las HDL es más alto y los TG son más elevados, este perfil de lípidos suele observarse con mayor claridad en las mujeres(21). En los sujetos con diabetes tipo 2, el colesterol total no difiere de los no diabéticos, el colesterol de las HDL está disminuido y los TG son claramente más elevados que en los sujetos sanos(22).

Las alteraciones en el metabolismo de los lípidos y lipoproteínas en el paciente con diabetes mellitus son el resultado de la ausencia o deficiencia de insulina (diabetes tipo 1) o bien de la hiperinsulinemia (diabetes tipo 2). En la figura 5, se destacan (números en círculos negros) las principales alteraciones del metabolismo lipoprotéico que pueden encontrarse en un sujeto con diabetes: 1) La biosíntesis de Q_u en los enterocitos del intestino no está alterada; sin embargo, en los DM obesos y con dieta rica en grasas aumenta la producción de Q_u y se retarda la lipólisis. 2) Cuando la relación insulina/glucagón es alta aumenta el flujo de ácidos grasos del tejido adiposo al hígado estimulando la biosíntesis de VLDL. 3) La deficiencia de insulina disminuye la actividad de la LPL, favoreciendo la acumulación en plasma de lipoproteínas ricas en TG. 4) El exceso de ácidos grasos en el hígado del paciente diabético es frecuente y es muy probable que el aumento de TG al interior de los hepatocitos regule a la baja la expresión de los receptores para apoE, mediante los cuales se internalizan los remanentes de Q_u y las IDL. 5) En la DM mal controlada la depuración de las IDL ricas en apoE y la depuración de LDL vía receptor apoB/E se encuentran disminuidas. 6) La actividad del receptor de las LDL está alterada debido a la deficiencia de insulina y las LDL no son depuradas adecuadamente de la circulación. 7) En la DM aumenta la glucosilación no enzimática y la oxidación de las LDL que,

en el subendotelio vascular, son reconocidas por los receptores atípicos de los macrófagos, favoreciendo el desarrollo de las placas aterosclerosas (23).

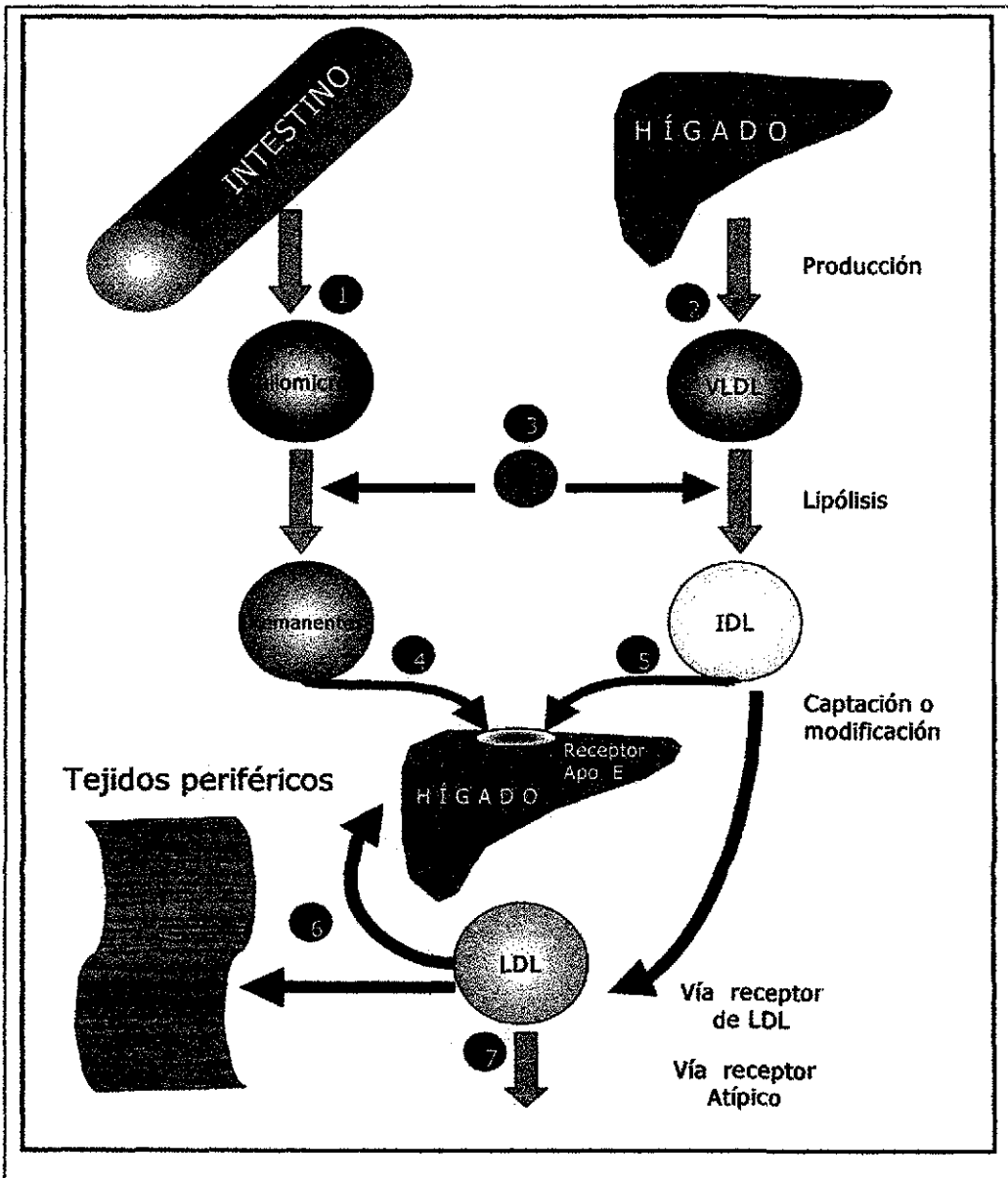


Figura 5. Anormalidades en el metabolismo lipoprotéico en la diabetes mellitus. VLDL, IDL, LDL y HDL₃ y ₂: lipoproteínas de muy baja, intermedia, baja y alta densidad, respectivamente, LPL: lipasa de lipoproteínas (7).

A estos antecedentes se agrega el hecho de que las concentraciones altas de Lp(a) en plasma se asocian con cualquiera de las manifestaciones de aterosclerosis coronaria prematura(24-30).

III LIPOPROTEÍNA(a) Y FENOTIPOS DE APO(a).

En 1963(31) Berg, describió una "variación genética" de la LDL, que definió como un determinante antigénico al que llamó lipoproteína(a) o Lp(a). Posteriormente se demostró que la propiedad antigénica de la Lp(a) se debe a otra proteína a la que se llamó apoproteína(a). La existencia de la Lp(a) como una lipoproteína distinta a la LDL se demostró mediante electroforesis. Esta lipoproteína migra entre las partículas beta y pre-beta, por lo que también se le llamó pre-beta 1 o pre-beta hundida(32). Al iniciarse la década de los setenta se caracterizó la estructura de la Lp(a), sin embargo, durante los siguientes años recibió poca atención. Entre 1987 y 1992 se describió la homología de los genes del plasminógeno y de la apo(a) (33-35). El gen de la apo(a) se caracterizó a mediados de los noventa y actualmente se conocen bien la región 5' adyacente al gen y los sitios de interacción de algunas hormonas y factores que regulan su expresión(36,37).

La lipoproteína(a) (Lp(a)) está compuesta por una lipoproteína de baja densidad (LDL) y la apolipoproteína(a) o apo(a), una

A estos antecedentes se agrega el hecho de que las concentraciones altas de Lp(a) en plasma se asocian con cualquiera de las manifestaciones de aterosclerosis coronaria prematura(24-30).

III LIPOPROTEÍNA(a) Y FENOTIPOS DE APO(a).

En 1963(31) Berg, describió una "variación genética" de la LDL, que definió como un determinante antigénico al que llamó lipoproteína(a) o Lp(a). Posteriormente se demostró que la propiedad antigénica de la Lp(a) se debe a otra proteína a la que se llamó apoproteína(a). La existencia de la Lp(a) como una lipoproteína distinta a la LDL se demostró mediante electroforesis. Esta lipoproteína migra entre las partículas beta y pre-beta, por lo que también se le llamó pre-beta 1 o pre-beta hundida(32). Al iniciarse la década de los setenta se caracterizó la estructura de la Lp(a), sin embargo, durante los siguientes años recibió poca atención. Entre 1987 y 1992 se describió la homología de los genes del plasminógeno y de la apo(a) (33-35). El gen de la apo(a) se caracterizó a mediados de los noventa y actualmente se conocen bien la región 5' adyacente al gen y los sitios de interacción de algunas hormonas y factores que regulan su expresión(36,37).

La lipoproteína(a) (Lp(a)) está compuesta por una lipoproteína de baja densidad (LDL) y la apolipoproteína(a) o apo(a), una

glucoproteína de elevado peso molecular unida por un puente disulfuro a la apoB-100. La apo(a) contiene unidades estructurales y funcionales llamadas "kringles" (K), que son secuencias de aminoácidos en forma de asa formada por 3 puentes disulfuro, similares a las del plasminógeno(33) y a las de otras proteínas del sistema fibrinolítico y de la coagulación. La apo(a) tiene además, un dominio de proteasa inactivo debido a la sustitución de una Arg por una Ser (Figura 6), Tabla IV.

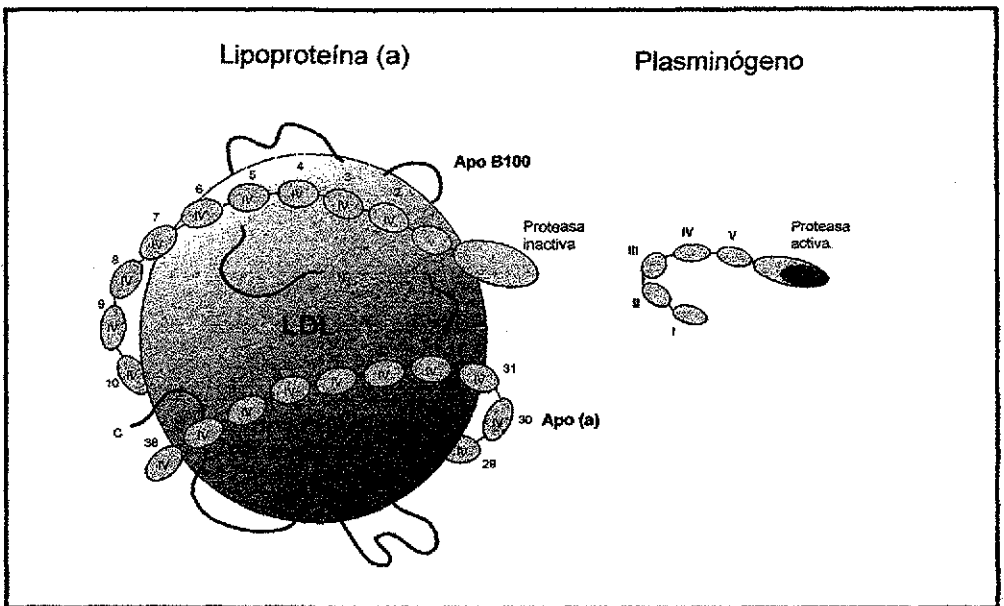


Figura 6. Esquema comparativo de la lipoproteína(a) y del plasminógeno. La Lp(a) está formada por una lipoproteína de baja densidad (LDL), unida a la apo(a) a través de su Apo B100. En la lipoproteína(a) no existe la actividad de proteasa de serina como en el plasminógeno. I a V: unidades estructurales conocidas como "kringle" (38).

El polimorfismo de la apo(a) está determinado hasta en un 90% por el gen de la apo(a) (39). En teoría, pueden existir isoformas de apo(a) de hasta 52 K y en cualquiera de ellas

siempre se encontrarán: una copia del KV, una copia del KIV tipo 1, múltiples copias del KIV tipo 2 y una copia de los tipos 3 al 10. Por lo tanto, el número de copias del KIV tipo 2, confiere a la apo(a) su gran polimorfismo en tamaño y peso molecular (Figura 6).

Tabla IV

Comparación de la Apo(a) y el plasminógeno humanos (40).

PARÁMETRO	APO(a)	PLASMINÓGENO	% DE HOMOLOGÍA
Peso molecular	280,000- 800,000	≈ 90,000	
Secuencia señal	19 residuos	19 residuos	100
Secuencia NH ₂ terminal	Glu-Gli-Ser- His-Val-Val	Glu-Pro-Leu- Asp-Asp-Tir	98
Kringle I	Ausente	1 copia	-
Kringle II	Ausente	1 "	-
Kringle III	Ausente	1 "	-
Kringle IV	13-37 copias	1 "	75-85
Kringle V	1 copia	1 "	91
Sitio Activo	Ser-Ile	Arg-Val	94
Triada catalítica	Ser-His-Asp	Ser-His-Asp	

Las isoformas pequeñas y de bajo peso molecular se asocian con el riesgo de enfermedad cardiovascular(41,42) y tienen mayor actividad fibrinolítica, por lo tanto, es posible que no sólo la concentración de la Lp(a) en plasma, sino que también el tamaño de la apo(a) determine el riesgo cardiovascular asociado a esta lipoproteína.

La existencia de las diferentes isoformas de apo(a) se determinó inicialmente mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS) con muy baja sensibilidad, en 65% de las muestras no era posible la identificación de las isoformas por lo que se clasificaban como muestras portadoras de "alelos nulo". En 1991, la sensibilidad se había mejorado y solo 28% de las muestras eran clasificadas de esa manera(43), ese mismo año otros autores emplearon la electroforesis en agarosa(44) y la electroforesis en campo pulsado(45), a existencia de 23 y 19 isoformas de apo(a), respectivamente. Tomando como referencia la movilidad relativa con respecto a la apoB-100 y utilizando PAGE-SDS, se describieron seis diferentes isoformas: F, B, S1, S2, S3 y S4, siendo la isoforma F la que migra más rápido y la S4 más lento. Posteriormente, algunos investigadores asignaron valores numéricos consecutivos del 1 al 11 a las diferentes isoformas de apo(a) (46). Sin embargo, la manera más adecuada de clasificar esta lipoproteína debe ser con base al número de kringles.

Las propiedades fisicoquímicas de la apo(a) como la glucosilación de la molécula hasta en un 23% de su peso(47), el número variable de repeticiones del kringle IV tipo 2 y la gran variación en su concentración plasmática (<1 mg/dL a más de 120 mg/dL) han sido los principales obstáculos para el desarrollo de un método electroforético sensible, específico y preciso, capaz de separar adecuadamente todas las isoformas. La

aplicación de diferentes métodos y el uso de diversos estándares de peso molecular(48-50), han sido otras de las causas de las discrepancias en los resultados.

IV LIPOPROTEÍNA(a) Y ATEROSCLEROSIS.

Poco tiempo después del descubrimiento de la Lp(a), varios estudios retrospectivos de casos y controles demostraron que las concentraciones elevadas de la lipoproteína se asocian con incremento en la incidencia de enfermedades cardiovasculares como: enfermedad arterial coronaria(EAC), infarto agudo del miocardio, aterosclerosis carotídea, enfermedad vascular cerebral, y enfermedad arterial periférica oclusiva(51,52). Sin embargo, en estudios prospectivos los resultados son contradictorios. Algunos estudios informan incremento de la Lp(a) en los pacientes con EAC(53,54), mientras que otros no encuentran asociación(55,56). Las posibles explicaciones a estas contradicciones pueden ser el tamaño de la muestra, los criterios de inclusión, la duración del estudio, la colección y almacenamiento de la muestra y los métodos de medición de Lp(a).

La disminución del colesterol del plasma con fármacos hipolipemiantes, puede reducir el número de eventos coronarios hasta un 35%, es decir que 65% de los pacientes que reciben el tratamiento continúan con cifras elevadas de colesterol y por

aplicación de diferentes métodos y el uso de diversos estándares de peso molecular(48-50), han sido otras de las causas de las discrepancias en los resultados.

IV LIPOPROTEÍNA(a) Y ATEROSCLEROSIS.

Poco tiempo después del descubrimiento de la Lp(a), varios estudios retrospectivos de casos y controles demostraron que las concentraciones elevadas de la lipoproteína se asocian con incremento en la incidencia de enfermedades cardiovasculares como: enfermedad arterial coronaria(EAC), infarto agudo del miocardio, aterosclerosis carotídea, enfermedad vascular cerebral, y enfermedad arterial periférica oclusiva(51,52). Sin embargo, en estudios prospectivos los resultados son contradictorios. Algunos estudios informan incremento de la Lp(a) en los pacientes con EAC(53,54), mientras que otros no encuentran asociación(55,56). Las posibles explicaciones a estas contradicciones pueden ser el tamaño de la muestra, los criterios de inclusión, la duración del estudio, la colección y almacenamiento de la muestra y los métodos de medición de Lp(a).

La disminución del colesterol del plasma con fármacos hipolipemiantes, puede reducir el número de eventos coronarios hasta un 35%, es decir que 65% de los pacientes que reciben el tratamiento continúan con cifras elevadas de colesterol y por

lo tanto con riesgo elevado de desarrollar aterosclerosis(57,58). Con base en estudios epidemiológicos realizados en diversos países y de acuerdo con datos obtenidos en una muestra representativa de la Ciudad de México, la Lp(a) se encuentra elevada hasta en 33% de los pacientes con cardiopatía(59). Ya que las cifras elevadas de esta lipoproteína equivalen a tener una concentración de colesterol total mayor de 240 mg/dL(60) o valores menores de 35 mg/dL de CHDL, el riesgo de infarto al miocardio en sujetos con Lp(a) elevada se incrementa hasta 3 veces(61).

Estas conclusiones se basan en que: 1) En los últimos 30 años, estudios de casos y controles han demostrado la elevación de las concentraciones de Lp(a) en pacientes con EAC(62). 2) Las cifras elevadas de Lp(a) se correlacionan con la incidencia de aterosclerosis coronaria, periférica y cerebral. 3) Los estudios prospectivos permiten probar de manera directa la contribución de la Lp(a) al desarrollo de la enfermedad coronaria. Sin embargo, los datos obtenidos de estudios clínicos y de algunos estudios epidemiológicos son controversiales. 4) En estudios con inmunohistoquímica se ha demostrado la presencia de Lp(a) en la pared de arterias coronarias y la concentración de Lp(a) en plasma correlaciona significativamente con la concentración de la lipoproteína en la pared arterial(63). 5) Las mismas isoformas de apo (a) han sido identificadas en el plasma y en la pared arterial. 6)

También se ha informado que la Lp(a) compete con el plasminógeno por los sitios de unión a la lisina que poseen diversas proteínas localizadas en la membrana de las células endoteliales, incluyendo la fibrina. La unión de Lp(a) a la fibrina disminuye la formación de plasmina y, en consecuencia la actividad fibrinolítica, lo que conduce a un estado protrombótico. Informes recientes señalan que la inhibición de la fibrinólisis depende de la cantidad y tamaño de la apo(a) (64,65). Todas estas evidencias apoyan la hipótesis de que la concentración elevada de Lp(a) en plasma, es un factor de riesgo en el desarrollo de enfermedad arterial coronaria.

VI LIPOPROTEÍNA(a) Y DIABETES MELLITUS.

En el paciente con diabetes mellitus, la aterosclerosis acelerada es una complicación frecuente, especialmente cuando no existe un buen control metabólico(66); sin embargo, los factores que contribuyen a incrementar el riesgo de aterosclerosis en estos pacientes, no se conocen bien. Los resultados de estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales(67,68) sugieren que en el diabético existe una relación directa entre la concentración elevada de Lp(a) y el desarrollo de aterosclerosis, aunque también se han informado concentraciones similares de Lp(a) en pacientes diabéticos y en

También se ha informado que la Lp(a) compete con el plasminógeno por los sitios de unión a la lisina que poseen diversas proteínas localizadas en la membrana de las células endoteliales, incluyendo la fibrina. La unión de Lp(a) a la fibrina disminuye la formación de plasmina y, en consecuencia la actividad fibrinolítica, lo que conduce a un estado protrombótico. Informes recientes señalan que la inhibición de la fibrinólisis depende de la cantidad y tamaño de la apo(a) (64,65). Todas estas evidencias apoyan la hipótesis de que la concentración elevada de Lp(a) en plasma, es un factor de riesgo en el desarrollo de enfermedad arterial coronaria.

VI LIPOPROTEÍNA(a) Y DIABETES MELLITUS.

En el paciente con diabetes mellitus, la aterosclerosis acelerada es una complicación frecuente, especialmente cuando no existe un buen control metabólico(66); sin embargo, los factores que contribuyen a incrementar el riesgo de aterosclerosis en estos pacientes, no se conocen bien. Los resultados de estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales(67,68) sugieren que en el diabético existe una relación directa entre la concentración elevada de Lp(a) y el desarrollo de aterosclerosis, aunque también se han informado concentraciones similares de Lp(a) en pacientes diabéticos y en

controles sanos(55,56). En otros estudios la mediana de Lp(a) y la prevalencia de valores elevados de esta lipoproteína, es mayor en sujetos con diabetes(69,70), particularmente en diabéticos con albuminuria(71,72). Igualmente controvertido, es el hallazgo de que las cifras de Lp(a) dependan del grado de control metabólico del paciente(73-76).

VI PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Identificación de los fenotipos de apo(a).

El número de repeticiones del kringle IV tipo 2 de la apo(a) y el amplio margen de variación de las concentraciones de Lp(a) en plasma, han sido los principales obstáculos para poder desarrollar un método electroforético, específico, sensible y preciso, capaz de separar los diferentes fenotipos de esta apolipoproteína. Los métodos descritos para la identificación de la apo(a) emplean como referencia proteínas diferentes a la apo(a) como la fosforilasa B y la apoB-100, difieren también en sensibilidad y en resolución(77-82), Tabla V.

controles sanos(55,56). En otros estudios la mediana de Lp(a) y la prevalencia de valores elevados de esta lipoproteína, es mayor en sujetos con diabetes(69,70), particularmente en diabéticos con albuminuria(71,72). Igualmente controvertido, es el hallazgo de que las cifras de Lp(a) dependan del grado de control metabólico del paciente(73-76).

VI PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Identificación de los fenotipos de apo(a).

El número de repeticiones del kringle IV tipo 2 de la apo(a) y el amplio margen de variación de las concentraciones de Lp(a) en plasma, han sido los principales obstáculos para poder desarrollar un método electroforético, específico, sensible y preciso, capaz de separar los diferentes fenotipos de esta apolipoproteína. Los métodos descritos para la identificación de la apo(a) emplean como referencia proteínas diferentes a la apo(a) como la fosforilasa B y la apoB-100, difieren también en sensibilidad y en resolución(77-82), Tabla V.

Tabla V.

Métodos frecuentemente usados en la identificación de Apo (a) (77).

GEL	CONCENTRACIÓN	ELECTROFORÉISIS	TRANSFERENCIA
	%	TIEMPO (H)	TIEMPO (H)
Agarosa	1.5	7	10
Submarina			
Agarosa	3.75/0.8	18	18
Acrilamida			
PAGE gradiente	2.5-6	Frente + 2	10 (PVDF)
PAGE gradiente	2-16	Frente + 2	10 (PVDF)
PAGE gradiente	4-16	Frente + 2	0.5 (PVDF)
PAGE HOMOGENEO	4	2.5	10
PAGE HOMOGENEO	6	2.5	10

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida, PVDF: Fluoruro de polivinilideno.

Por lo anterior, se consideró necesario implementar un método, específico, sensible, reproducible y práctico para la identificación adecuada de las isoformas de apo(a).



Papel de la Lp(a) en la aterogénesis del paciente con diabetes mellitus.

Se ha sugerido que la elevación de la concentración de Lp(a) pudiera participar, independientemente de las otras lipoproteínas y otros factores de riesgo, en el desarrollo de la enfermedad vascular de la diabetes (83,84).

A diferencia de las otras lipoproteínas, las concentraciones de Lp(a) están determinadas, hasta 90%, por el gen de la apo(a). En general, los estudios epidemiológicos han mostrado que el tamaño de las isoformas de apo(a) correlacionan inversamente con la concentración de Lp(a) (85,86). Estos antecedentes sugieren la existencia de algún determinante genético que, en el paciente diabético, determine mayor prevalencia de algunas isoformas de apo(a) y que pudieran influir en la concentración de Lp(a) y contribuir al desarrollo de aterosclerosis. Estudiar los fenotipos de apo(a) y las concentraciones de Lp(a) en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y en sus familiares sin diabetes, permitirá probar esta hipótesis.

Finalmente quisiera destacar que en México, no existe información sobre las frecuencias de los fenotipos de la apolipoproteína(a), ni de la asociación de las isoformas con la concentración de Lp(a) en el plasma del paciente diabético.

HIPÓTESIS

1. Si la concentración elevada de Lp(a) es un factor de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis coronaria, y si existe mayor prevalencia de Lp(a) superior de 30 mg/dL en los pacientes con diabetes, es posible que en la diabetes mellitus tipo 1 exista algún determinante genético asociado a los fenotipos de apo(a) menores de 22 "kringles", que explique las concentraciones elevadas de Lp(a).
2. Si no hay diferencias en las concentraciones de Lp(a), ni en las isoformas de apo(a) del paciente diabético al compararlas con sus familiares sin diabetes, entonces la Lp(a) no contribuye con el riesgo de aterosclerosis en la diabetes tipo 1.
3. Las correlaciones de la Lp(a) y de los fenotipos de apo(a) del paciente con diabetes mellitus tipo 1 y la de su hermano sin diabetes con la Lp(a) y la apo(a) de sus padres son diferentes.

VII OBJETIVOS DE LA TESIS

1. Desarrollar un método específico, sensible, reproducible y práctico para la identificación de isoformas de apo(a).

HIPÓTESIS

1. Si la concentración elevada de Lp(a) es un factor de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis coronaria, y si existe mayor prevalencia de Lp(a) superior de 30 mg/dL en los pacientes con diabetes, es posible que en la diabetes mellitus tipo 1 exista algún determinante genético asociado a los fenotipos de apo(a) menores de 22 "kringles", que explique las concentraciones elevadas de Lp(a).
2. Si no hay diferencias en las concentraciones de Lp(a), ni en las isoformas de apo(a) del paciente diabético al compararlas con sus familiares sin diabetes, entonces la Lp(a) no contribuye con el riesgo de aterosclerosis en la diabetes tipo 1.
3. Las correlaciones de la Lp(a) y de los fenotipos de apo(a) del paciente con diabetes mellitus tipo 1 y la de su hermano sin diabetes con la Lp(a) y la apo(a) de sus padres son diferentes.

VII OBJETIVOS DE LA TESIS

1. Desarrollar un método específico, sensible, reproducible y práctico para la identificación de isoformas de apo(a).

2. Conocer los valores de Lp(a) en niños y adolescentes mexicanos con DM 1.
3. Conocer la frecuencia de distribución de las isoformas de la apolipoproteína(a) en el niño y adolescente con DM1, en los hermanos sin diabetes y en su padres e investigar si entre padres e hijos, sanos o con DM1, existe asociación en la isoforma de la apolipoproteína(a)
4. Estudiar el grado de correlación de los valores de Lp(a) de los padres con los de los hijos no diabéticos y si hay diferencias al compararlos con los hermanos diabéticos.

VIII MATERIAL, METODOS Y PROCEDIMIENTO

Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se hicieron modificaciones al método originalmente descrito por Laemmli (87), tanto en la preparación de la muestra como en la composición del gel de poliacrilamida. El gel discontinuo de poliacrilamida, 3.75%/6%, se preparó en un sistema para electroforesis vertical Mini-Protean II de BIO-RAD (Richmond CA, EUA). El gel de separación se preparó mezclando 1000 µl de una solución de acrilamida al 30% bis-acrilamida 0.6%, 1250 µl de tris-HCl 1.5M pH 8.8, 50 µl de SDS 10%, 250 µl de persulfato de amonio 1.5%, 2445 µl de agua desionizada y 5 µl de TEMED. El

2. Conocer los valores de Lp(a) en niños y adolescentes mexicanos con DM 1.
3. Conocer la frecuencia de distribución de las isoformas de la apolipoproteína(a) en el niño y adolescente con DM1, en los hermanos sin diabetes y en su padres e investigar si entre padres e hijos, sanos o con DM1, existe asociación en la isoforma de la apolipoproteína(a)
4. Estudiar el grado de correlación de los valores de Lp(a) de los padres con los de los hijos no diabéticos y si hay diferencias al compararlos con los hermanos diabéticos.

VIII MATERIAL, METODOS Y PROCEDIMIENTO

Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Se hicieron modificaciones al método originalmente descrito por Laemmli (87), tanto en la preparación de la muestra como en la composición del gel de poliacrilamida. El gel discontinuo de poliacrilamida, 3.75%/6%, se preparó en un sistema para electroforesis vertical Mini-Protean II de BIO-RAD (Richmond CA, EUA). El gel de separación se preparó mezclando 1000 µl de una solución de acrilamida al 30% bis-acrilamida 0.6%, 1250 µl de tris-HCl 1.5M pH 8.8, 50 µl de SDS 10%, 250 µl de persulfato de amonio 1.5%, 2445 µl de agua desionizada y 5 µl de TEMED. El

gel concentrador en el que fueron formados los pozos para depositar la muestra se preparó con 625 µl de acrilamida 30%-bis-acrilamida 0.8%, 1250 µl de Tris-HCl 0.5M pH 6.8, 50 µl de SDS 10%, 250 µl de persulfato de amonio 1.5%, 2532 µl de agua desionizada y 5 µl de TEMED.

Preparación de muestra y estándares.

El plasma se diluyó de 1:2 a 1:6, con amortiguador de reducción (N-etilenmorfolina 0.34M en Tris 1.5M, pH 8.8, 2-mercaptoetanol 0.83M y azul de bromofenol 17.8 % en glicerol al 10%). El estándar con cinco isoformas de apo(a) recombinante (r-apo(a)) de 10,14,18,26 y 34 kringles, se preparó como se describió previamente(88). Tanto el estándar como el control y las muestras, incubaron en agua en ebullición durante 5 min. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente, a 35 V constantes durante 35 minutos y a 70 V durante 3 h.

Inmunotransferencia.

La transferencia de las isoformas de apo(a) a la membrana de nitrocelulosa de alta unión (NitroPure MSI INC. de 0.45 µm), se realizó en un sistema de transferencia líquido, a 600 mA durante 45 min(89). La membrana se bloqueo con una solución de leche descremada al 5% en amortiguador salino de fosfatos

(PBS) 40 mM - Tween20 0.3%, pH 7.5, durante 30 min a 37°C. Las isoformas de apo(a) se identificaron con un anticuerpo monoclonal anti apo(a) humana de Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania, clona M1A2; IgG1(90) y con un anticuerpo de cabra anti ratón, conjugado con peroxidasa de rábano (Gibco BRL, Rockville, MD, EUA, fracción IgG, H+L), ambos anticuerpos fueron diluidos 1:1000 en PBS 40mM - Tween20 0.1%, pH 7.5: La nitrocelulosa se expuso a cada uno de los anticuerpos durante 1 h, a temperatura ambiente. Entre cada incubación se realizaron 3 lavados de 5 min. con PBS 40 mM - Tween20 0.1%. La mezcla cromógeno-sustrato fue de H₂O₂ - diaminobenzidina 0.03% en PBS 40 mM. La reacción se detuvo colocando el papel de nitrocelulosa en agua en ebullición.

Determinación del tamaño de las isoformas apo(a).

El análisis de la inmunotransferencia se realizó digitalizando la imagen con el programa Molecular AnalystTM/PC en un densitómetro BTO-RAD Mod. GS-670. La determinación del tamaño de las isoformas de apo(a) se realizó mediante el análisis de la migración relativa (Rf), en función de la curva estándar de apo(a) recombinante(91). La sensibilidad del procedimiento se determinó por dilución seriada de una muestra con 100 mg/dl de Lp(a) (~33 mg/dl de proteína) que contenía un solo fenotipo de apo(a) de 18 kringles IV, aproximadamente 480 kDa. Los CV intra e inter análisis se determinaron en cuatro muestras con

fenotipos conocidos de 14, 16, 18 y 22 kringles IV, analizadas en 12 geles preparados en diferentes días.

Sujetos estudiados.

Se estudiaron 50 niños y adolescentes, entre 1 y 17 años de edad 27 hombres y 23 mujeres, 25 pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (DM1) de 1 a 8 años de evolución, 25 hermanos no diabéticos y ambos padres 25 hombres y 25 mujeres. Todos ellos aceptaron participar voluntariamente en el estudio. Ninguno de los sujetos estudiados padecía enfermedades que alteraran la concentración de lípidos y lipoproteínas y tampoco tenían antecedentes de hospitalización 3 meses previos al estudio. Tanto al paciente con diabetes, como a sus familiares se les determinaron variables antropométricas y fisiológicas como: el peso, talla, índice de masa corporal, tensión arterial y variables bioquímicas como glucosa, lípidos, lipoproteínas, Lp(a), apoA, apoB e isoformas de apo(a). Al paciente con DM1, también se le cuantificó microalbuminuria y hemoglobina glucosilada (HbA1).

Análisis de laboratorio.

Después de un ayuno de 10 a 12 h, con el paciente en posición sedente durante 20 min y sin estasis venosa, se colectaron 10 mL de sangre en un tubo con EDTA (1mg/mL). El plasma se separó por centrifugación a 2500 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C y se

almacenó en alícuotas de 250 a 500 μ l a -70°C hasta su análisis.

La Lp(a) se cuantificó por inmunonefelometría(92) con reactivos de Beckman Inc., (Fullerton, CA, EUA.) Los coeficientes de variación (CV) intra e inter análisis para la Lp(a) fueron menores a 10%. Las mediciones de colesterol total y triacilgliceroles(93,94) se realizaron utilizando métodos enzimáticos (Boehringer Mannheim). El colesterol en lipoproteína de baja densidad se estimó con la fórmula de Friedewald ($\text{C-LDL} = \text{CT} - ((\text{TG} \times 0.016) + \text{C-HDL})$) (95). La determinación del colesterol de lipoproteínas de alta densidad se realizó después de precipitar las lipoproteínas que contienen apoB con dextrán-sulfato y el colesterol de la fracción HDL₃ se cuantificó después de doble precipitación, también con dextrán-sulfato(96). El colesterol de HDL₂ se calculó restando el C-HDL₃ del C-HDL total. El control de calidad de las mediciones se efectuó a través del programa de Estandarización de Lípidos del Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, U.S.A. Los CV intra ensayo para CT, TG y C-HDL fueron de 1.1%, 0.6% y 1.1%, respectivamente; y los CV inter ensayo fueron de 3.1, 2.6 y 3.9%, respectivamente. Los valores de corte para la clasificación de hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hipoalfalipoproteinemia, en los niños, fueron; CT >200, TG >150 y el C-HDL <35 mg/dL, respectivamente. En los progenitores los valores de corte fueron; CT >240, TG >200 y C-HDL <35 mg/dL.

La HbA₁ se aisló en una columna con resina de intercambio catiónico Bio-Rex 70 (Bio-Rad) y se cuantificó por espectrofotometría(97). La glucemia se determinó por el método de glucosa oxidasa (Boehringer Mannheim)(98).

Análisis estadístico.

Se hizo análisis de varianza (ANOVA) para comparar las variables con distribución paramétrica y t de student no pareada para comparar los valores medios. Las frecuencias de distribución de Lp(a) y de los fenotipos de apo(a) entre los grupos se compararon mediante análisis no paramétrico con la prueba de Kolmogorov-Smirnov para dos muestras. La concentración de Lp(a) del DM1 se comparó con las de sus familiares con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prevalencia de dislipidemia se comparó por análisis de χ^2 . El análisis de covarianza se utilizó para comparar los grupos después de controlar por variables de confusión como el C-LDL, los TG y los fenotipos de apo(a). Se usó el coeficiente de regresión por mínimos cuadrados para conocer la independencia de las concentraciones de la Lp(a) de los niños y las de sus padres. El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa, SPSS 9.0.

RESULTADOS.

Immunotransferencia de apo(a).

La curva de sensibilidad para concentraciones de 30 a 300 ng de proteína en la Lp(a), fue obtenida por dilución de una muestra con 100 mg/dL de Lp(a) (Figura 7). La sensibilidad del método fue de 50 ng de proteína. La correlación fue positiva ($y = 0.158(X) - 0.252$) y estadísticamente significativa ($p < 0.001$) con una r^2 de 0.989.

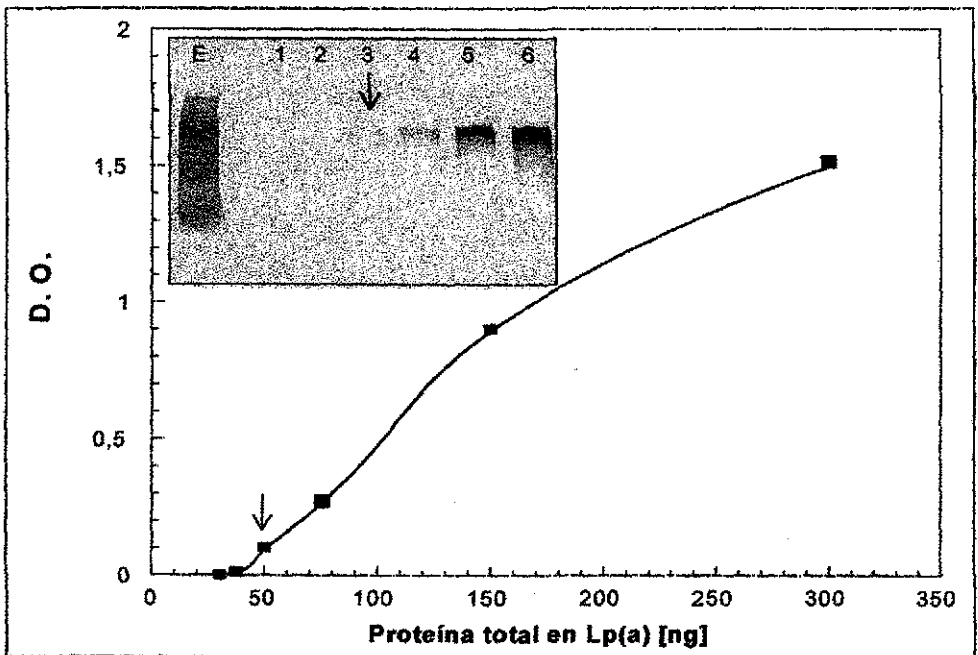


Figura 7. Curva de sensibilidad para la identificación de isoformas de apo(a). Una muestra con isoforma de 18 KIV (100 mg/dL de Lp(a)) se diluyó para obtener concentraciones de 30(1), 37.5(2), 50(3), 75(4), 150(5) y 300 ng(6) de proteína total. En el inserto se muestra la inmunotransferencia para la curva de sensibilidad E= Estándar de apo(a) recombinante. La flecha indica la concentración mínima cuantificable por el método utilizado.

En la Figura 8, se muestra la resolución del método en 8 muestras con diferentes fenotipos de apo(a). La isoforma de menor tamaño fue de 11 KIV, muestra 1 y la más grande 28 KIV, muestra 3. La máxima resolución fue de 2 KIV en la muestra 8 con 22 y 24 kringles IV.

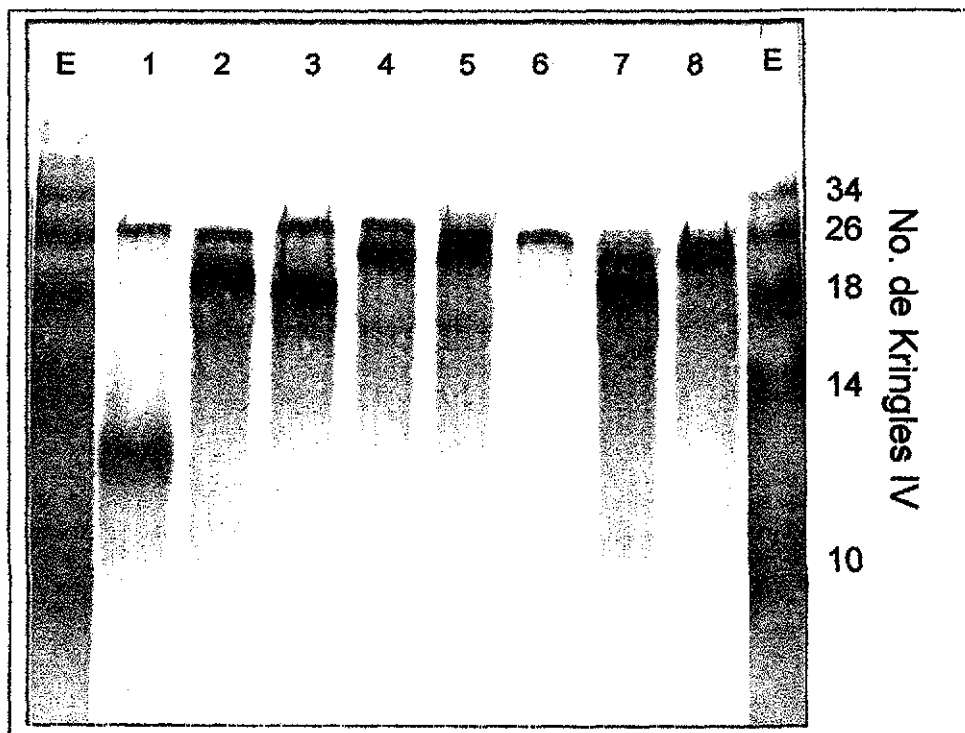


Figura 8. Resolución de la inmunotransferencia de apo(a) en 8 muestras de plasma. E= estándar recombinante de apo(a). muestra 1: 27/11 KIV, muestra 2: 26/20 KIV, muestra 3: 28/19 KIV, muestra 4: 27/22 KIV, muestra 5: 26/22 KIV, muestra 6: 25 KIV, muestra 7: 22/19 KIV, muestra 8: 24/22 KIV.

Una regresión cuadrática fue la que mejor describió la tasa de migración (Rf) de los cinco estándares recombinantes de apo(a) (Figura 9).

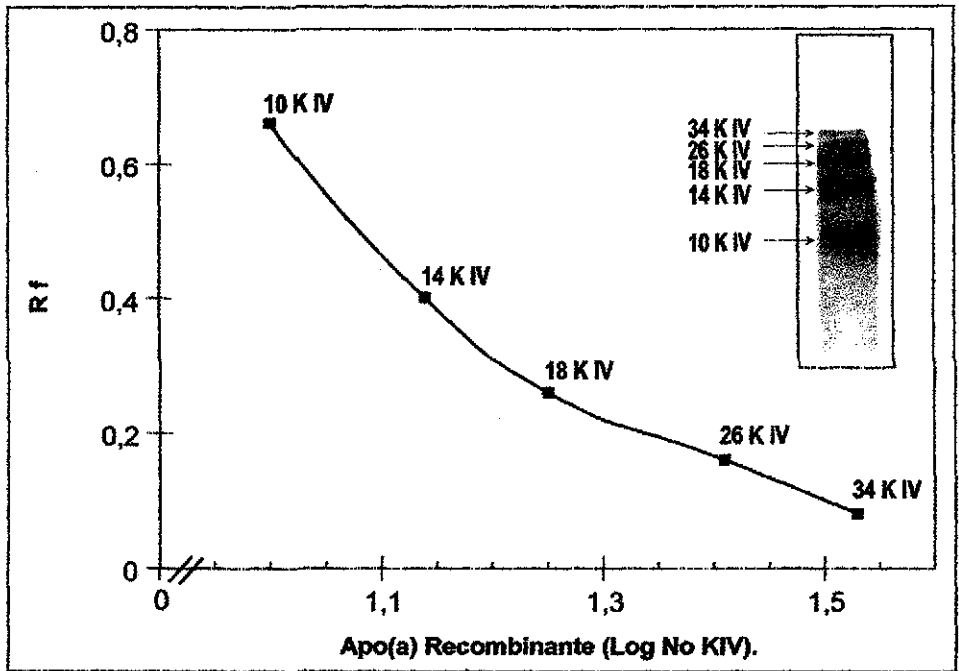


Figura 9. Tasa de migración (Rf) de los fenotipos de apo(a) (10, 14, 18, 26 y 34 KIV recombinante) en PAGE 6%.

Los coeficientes de variación inter ensayo en 12 repeticiones de diferentes muestras de plasma congelado a -70°C , fueron de 1.7, 2 y 1.4% para los fenotipos 14 KIV (414 kDa), 18 KIV (550 kDa) y 22 KIV (670 kDa), respectivamente. El tiempo total empleado en la realización del inmunotransferencia y la determinación del tamaño de la isoforma en el densitómetro fue aproximadamente de 7 h.

Características de los grupos.

En la Tabla 1 se muestran los valores medios para las variables antropométricas y fisiológicas del DM1 y sus familiares. No hubo diferencia significativa entre niños y niñas para estas variables por lo que fueron analizados conjuntamente. El promedio de edad de los DM1 fue de 11.9 y 11.3 años en los DM1 y en sus hermanos no diabéticos, respectivamente (p ns). No hubo diferencia significativa en estatura, tensión arterial sistólica o diastólica del DM1 y de su hermano sin diabetes. Aunque el peso y el IMC fueron menores en los DM1, las diferencias no fueron significativas. En las madres, la edad, el peso y la estatura fueron menores al compararse con los padres ($p < 0.02$) (Tabla 1). El IMC, fue similar en ambos progenitores.

TABLA VI

Características antropométricas de los sujetos estudiados.

	DM1	No DM	p ^a	Padres	Madres	p ^a
N	25	25		25	25	
Sexo(H/M)	13/12	18/7		25/-	-/25	
Edad (años)	11.9±3.6	11.3±4.4	0.60	41.1±6.4	37.2±5.6	0.02
Peso (Kg)	39.7±14.4	45.0±18.5	0.26	73.5±9.0	65.4±13.4	0.01
Estatura (cm)	144.8±2.2	147.0±2.5	0.81	169.0±0.8	154.0±0.7	0.005
IMC (Kg/m ²)	18.1±2.71	19.6±3.8	0.08	25.7±2.9	27.3±5.0	0.10

Los datos expresan el promedio ± DE. DM1: Diabéticos tipo 1, IMC: índice de masa corporal. ^a prueba de t no pareada.

Concentración de lípidos, lipoproteínas y apoproteínas.

La concentración promedio de las variables bioquímicas de los pacientes con diabetes y sus familiares se muestran en la Tabla 2. La glucosa, colesterol total (CT), colesterol de HDL (C-HDL), colesterol de la fracción HDL₂, la apoA y apoB, fueron significativamente mayores en el DM1 que en su hermano sano ($p < 0.02$). En las otras variables no hubo diferencias significativas. La relación C-LDL/C-HDL, fue igual en ambos grupos. En los progenitores, estas variables se encontraron más altas en los hombres que en las mujeres, pero solo alcanzaron diferencia significativa el CT ($p = 0.02$), los TG ($p = 0.007$) y la concentración de apoB ($p = 0.002$).

TABLA VII

Variables bioquímicas en pacientes con diabetes tipo 1 y sus familiares.

	DM1	No DM	p^*	Padres	Madres	p^*
Glucosa mmol/L	11.5±5	4.9±0.2	<0.01	6.4±2.9	5.0±0.54	0.45
HbA1 %	16.6±3	ND	-	ND	ND	-
MA µg/min	0.7±1.8	ND	-	ND	ND	-
CT mmol/L	4.9±1	4.2±0.8	0.03	5.3±0.9	4.8±0.6	0.02
TG mmol/L	1.1±0.7	0.9±0.4	0.40	2.0±0.9	1.2±0.6	0.001
C-LDL mmol/L	3.1±0.8	2.8±0.7	0.13	3.6±0.8	3.2±0.5	0.09
C-HDL mmol/L	1.2±0.4	1.0±0.2	0.05	0.9±0.2	1.0±0.3	0.16
C-HDL ₂ mmol/L	0.4±0.4	0.2±0.2	0.02	0.3±0.3	0.3±0.2	0.45
C-HDL ₃ mmol/L	0.85±0.3	0.85±0.1	0.88	0.76±0.3	0.81±0.2	0.52
C-LDL/C-HDL	2.6±0.9	2.7±0.7	0.8	3.8±0.7	3.2±0.8	0.01
Apo AI mg/dl	133.4±31	117.2±19	0.04	123.9±29	119.2±21	0.56
ApoB100 mg/dl	110.2±31	91.7±2.0	0.02	141.5±30	116.5±24	0.005

Los resultados expresan la media±DE. * : $p =$ DM1 vs. No DM, * : $p =$ Padres vs. Madres ajustado por edad e índice de masa corporal IMC. HbA1: hemoglobina glucosilada, MA: Microalbuminuria, ND: No medido, CT: Colesterol total, C-LDL: Colesterol en lipoproteína de baja densidad, C-HDL, C-HDL₂, C-HDL₃: Colesterol en lipoproteínas de alta densidad, TG: Triglicéridos. p calculada por ANOVA.

La prevalencia de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, fueron mayores en el DM1 que en su hermano sano, (36% y 20% vs. 20% y 8%, p ns, respectivamente). La prevalencia de hipoalfalipoproteinemia fue mayor en los niños sanos que en los DM1 (20% vs.16%, p ns). La prevalencia de dislipidemia fue mayor en los padres que en las madres; hipercolesterolemia 28% vs. 4%; hipertrigliceridemia 32% vs. 8%, e hipoalfalipoproteinemia 36% vs. 32%. Ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa.

Concentración y distribución de Lp(a).

La distribución de Lp(a) en los cuatro grupos estuvo desplazada hacia valores bajos, y la prevalencia de cifras de Lp(a) <10 mg/dL en el DM1, en el hermano sano, en los padres y madres fue de 52%, 68%, 64% y 60%, respectivamente (Figura 10). La distribución de las concentraciones de Lp(a) en los DM1 no fue estadísticamente diferente a la de sus familiares. En la tabla 3, se muestran las concentraciones de lipoproteína(a) para cada uno de los grupos. La mediana de Lp(a) fue igual en el DM1 y su hermano sano y casi dos veces mayor que en los padres. La mediana de Lp(a) en las madres fue la más alta de los cuatro grupos; sin embargo, las diferencias, con los otros tres grupos, no fueron significativas.

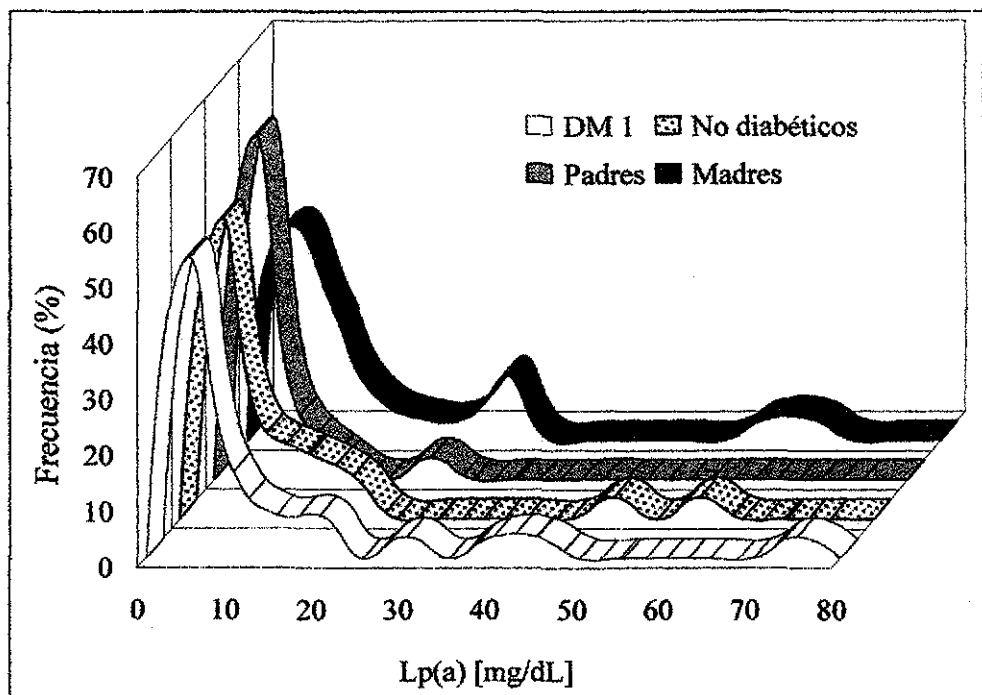


Figura 10. Distribución de la concentración de Lp(a) en el paciente con diabetes mellitus tipo 1 y en sus familiares.

La prevalencia de exceso de Lp(a) (>30 mg/dl), fue de 12% en el DM1 y en ambos padres y de 20% en el hermano sin diabetes (p ns).

TABLA VIII

Concentración de lipoproteína(a) en diabéticos tipo 1 y sus familiares.

	DM1	No DM	P	Padres	Madres	P
Mediana Lp(a) (mg/dL)	8.3	8.20	ns*	4.20	9.35	ns*
25 percentila (mg/dL)	2.6	3.45	-	1.69	2.35	-
75 percentila (mg/dL)	25.7	19.05	-	13.85	24.00	-
(%) Lp(a) > 30 (mg/dL)	12	20	ns†	12	12	ns†

* = Mann Withney, † = χ^2

El análisis de correlación de la Lp(a) con las diferentes variables antropométricas y bioquímicas en cada grupo mostró que la Lp(a), únicamente correlacionó positivamente con el IMC ($r=0.424$, $p=0.03$) en los pacientes con DM1, en los padres correlacionó positivamente con el C-HDL3 ($r=0.530$, $p=0.002$) y negativamente con los TG ($r=-0.585$ $p=0.002$).

En 97% de los sujetos se identificó por lo menos una isoforma de apo(a), 39% con una y 58% con dos isoformas. La distribución de la apo(a) en los DM1 y sus familiares se muestra en la Figura 11.

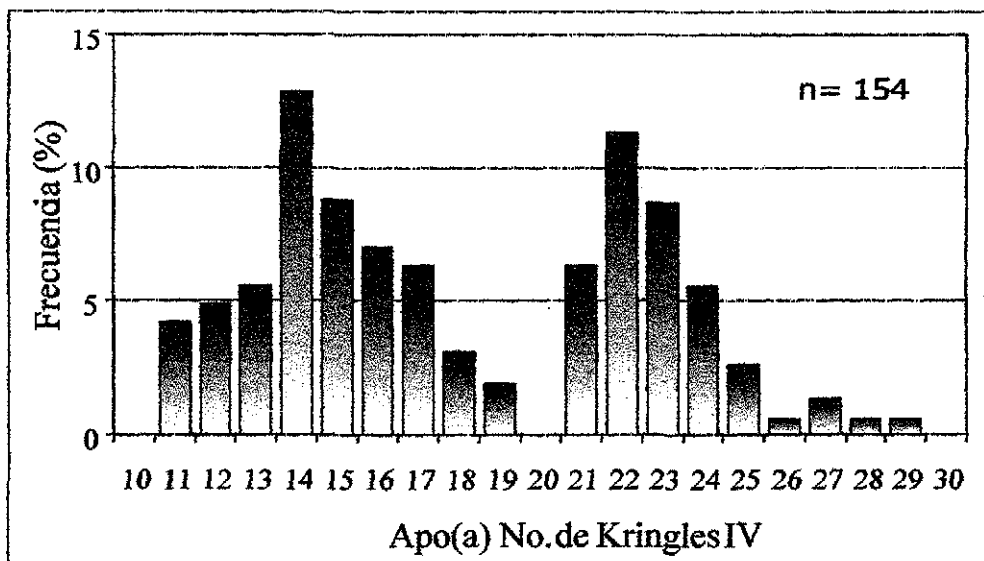


Figura 11. Distribución de los fenotipos de apo(a) en la población estudiada.

En los 100 sujetos estudiados se identificaron 154 fenotipos de apo(a) cuyos tamaños estuvieron entre los 10 y 29 kringles IV

con una la distribución de frecuencias bimodal. 59% de las isoformas se encontraron en la primera moda (15 KIV), y 41% se encontraron en la segunda moda (22 KIV). La distribución de las isoformas de apo(a) fue similar en los cuatro grupos estudiados y de acuerdo con la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov, para comparar frecuencias, las diferencias en la distribución no fueron significativas. Sin embargo, el fenotipo más frecuente en los DM1 fue de 23 KIV, de 15 KIV en sus hermanos sanos y en las madres, y de 22 KIV en los padres Figura 12.

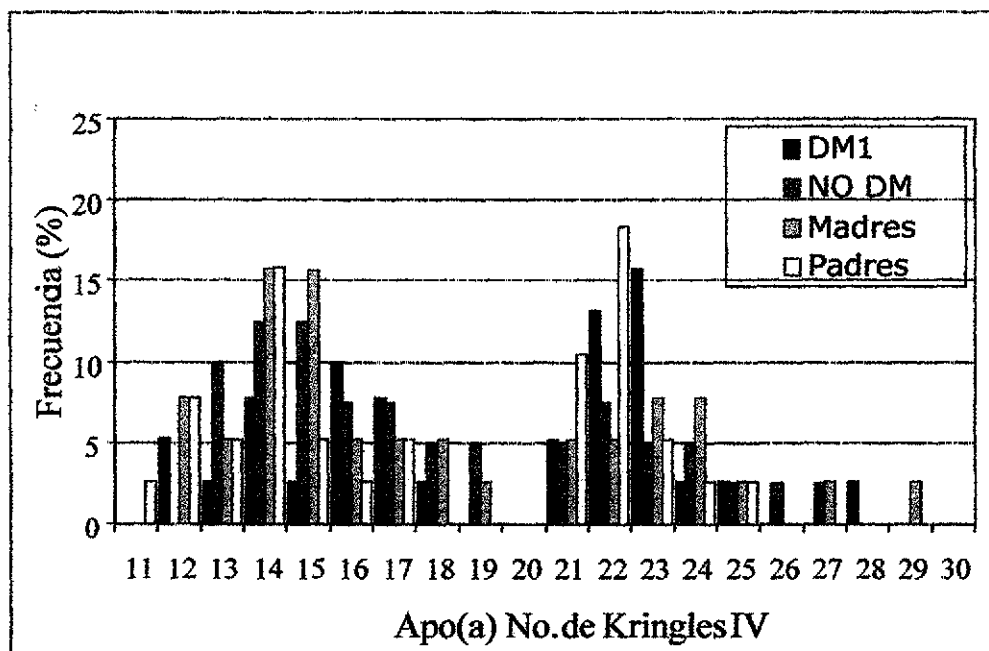


Figura 12. Distribución de fenotipos de apo(a) en diabéticos tipo 1 y en sus familiares.

El tamaño de las isoformas de apo(a) de los diabéticos y de las madres, correlacionó inversamente con la concentración de Lp(a) sin alcanzar significado estadístico, ($r=-0.145$, y $r=-0.10$, respectivamente). Mientras que en los hermanos sin diabetes y en los padres, esta correlación fue positiva ($r=0.02$, p ns y $r=0.179$, p ns, respectivamente)

Mediante análisis de regresión lineal, se examinó la relación entre el tamaño de la apo(a) en los cuatro grupos (Figura 13).

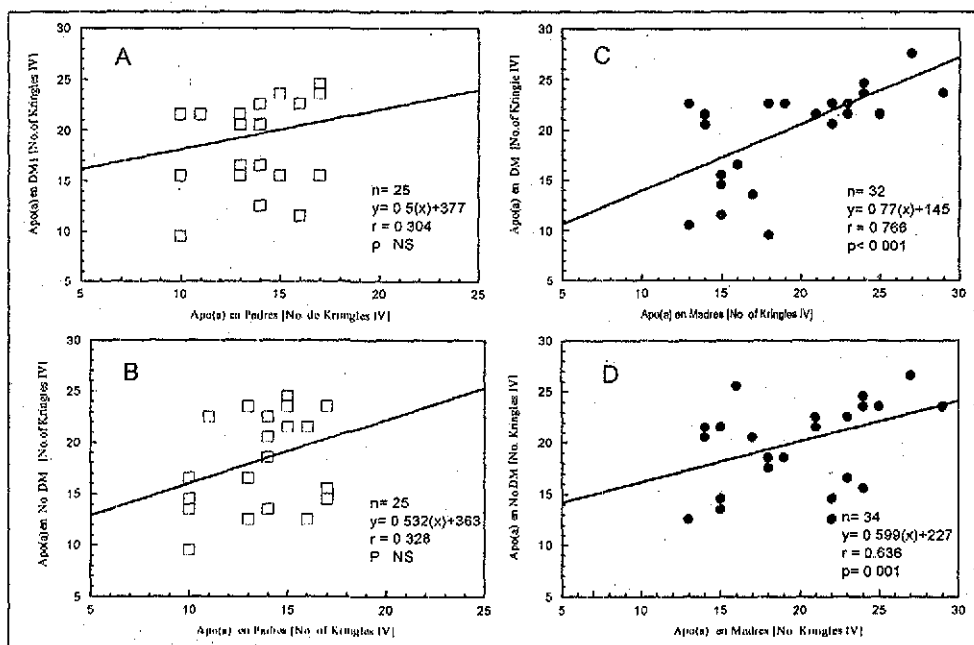


Figura 13. Análisis de regresión lineal entre los fenotipos de apo(a) de los padres y los fenotipos de sus hijos con (A, C) y sin (B, D) diabetes mellitus tipo 1.

El tamaño de los fenotipos de apo(a), tanto de los padres como de las madres correlacionaron significativamente con los fenotipos del hijo sano, y con los del DM1. El tamaño de las isoformas de apo(a) en el DM1 estuvo determinado, en 8% por los fenotipos del padre y hasta en 24% por las isoformas de la madre, los fenotipos del hermano sin diabetes, en 3% y 28%, respectivamente. Las isoformas del DM1, también correlacionaron significativamente con las de su hermano no diabético, $r=0.709$, $p < 0.001$.

DISCUSIÓN

En este trabajo, dos aspectos relacionados con la Lp(a) fueron abordados: 1) La identificación de los fenotipos de apo(a) y 2) su asociación con las concentraciones de Lp(a) en la diabetes mellitus tipo 1.

Con relación al primer punto, diferentes métodos y diversos estándares como la miosina, fosforilasa B, B-galactosidasa y apoB-100 han sido utilizados para la identificación de las isoformas de apo(a), esto ha contribuido a la imprecisión en la identificación de las isoformas de apo(a) y a que los resultados de diversos estudios no sean comparables. Por ejemplo, los estándares que se han usado son proteínas con propiedades fisicoquímicas distintas a las de la apo(a), algunas con peso molecular menor al de las isoformas de apo(a)

El tamaño de los fenotipos de apo(a), tanto de los padres como de las madres correlacionaron significativamente con los fenotipos del hijo sano, y con los del DM1. El tamaño de las isoformas de apo(a) en el DM1 estuvo determinado, en 8% por los fenotipos del padre y hasta en 24% por las isoformas de la madre, los fenotipos del hermano sin diabetes, en 3% y 28%, respectivamente. Las isoformas del DM1, también correlacionaron significativamente con las de su hermano no diabético, $r=0.709$, $p < 0.001$.

DISCUSIÓN

En este trabajo, dos aspectos relacionados con la Lp(a) fueron abordados: 1) La identificación de los fenotipos de apo(a) y 2) su asociación con las concentraciones de Lp(a) en la diabetes mellitus tipo 1.

Con relación al primer punto, diferentes métodos y diversos estándares como la miosina, fosforilasa B, B-galactosidasa y apoB-100 han sido utilizados para la identificación de las isoformas de apo(a), esto ha contribuido a la imprecisión en la identificación de las isoformas de apo(a) y a que los resultados de diversos estudios no sean comparables. Por ejemplo, los estándares que se han usado son proteínas con propiedades fisicoquímicas distintas a las de la apo(a), algunas con peso molecular menor al de las isoformas de apo(a)

de menor tamaño. El empleo de apoB-100, una de las proteínas de la Lp(a), tiene un peso molecular de 550 kDa que se encuentra entre el rango de los pesos moleculares de la apo(a) 300 a 900 kDa, sin embargo, su migración es deficiente en geles de poliacrilamida (99), por lo que el peso molecular de la isoformas de apo(a) pudiera ser subestimado. El uso de isoformas recombinantes de apo(a) con número de repeticiones del K IV tipo 2 conocido, es posiblemente una de las mejores opciones para estandarizar la determinación de los fenotipos de apo(a) (88). La relación entre el número de kringles IV y el Rf en nuestro sistema, se ajustó a una ecuación de segundo orden con una resolución de 1 a 2 KIV comparable con lo informado por otros investigadores (100,101). El método para la identificación de los fenotipos de apo(a) que se implementó para este estudio tiene una resolución de 1 a 2 kringles IV y la correlación con el genotipo de apo(a) determinado por campo pulsado es de 0.93 (88). Otros procedimientos que también han contribuido a la variabilidad de los resultados son la concentración por liofilización, alquilación de la proteína o el uso de isótopos radiactivos (102,46). En nuestra experiencia, ajustando por la concentración de Lp(a) en plasma se puede prescindir de estos procedimientos y es posible identificar las dos isoformas de un sujeto en 84.5% de los casos, una isoforma en 14% y solamente en 1.5% de las muestras, la apo(a) no fue identificada probablemente debido a la baja concentración en plasma.

Resultados similares a estos han sido informados por otros autores(103). Es importante señalar que la sensibilidad del método descrito puede verse afectada por las condiciones y tiempo de almacenamiento de la muestra, por el tipo de anticuerpo anti apo(a), la enzima acoplada al anticuerpo y el sustrato usados en la inmunotransferencia(28). En conclusión, los resultados indican que el uso del método descrito, permite obtener resultados comparables a los de algunos métodos previamente informados, pero con algunas ventajas: (1) no se requiere de tratamiento previo de la muestra, concentración o modificación química, (2) el tiempo para obtener los resultados se reduce, en promedio, casi un 50%, (3) los resultados pueden ser interpretados en función del peso molecular o del número de repeticiones del kringle IV en la isoforma de apo(a).

Con relación al segundo punto que nos interesó estudiar podemos decir que la diabetes mellitus es un factor de riesgo independiente de EAC(104); tanto en la tipo 1 como en el tipo 2, y que el riesgo puede incrementarse hasta 4 veces en estos enfermos(105). El mecanismo mediante el cual el paciente con diabetes desarrolla la aterosclerosis no es bien conocido, pero intervienen numerosos factores, como la glucosilación de proteínas, la oxidación de las LDL, la hipertensión arterial, la enfermedad renal y la formación de trombos(106). Aunque se ha sugerido que en la diabetes mellitus, la Lp(a) puede incrementar el riesgo de aterotrombogénesis(107), no en todos

los estudios, la concentración de esta lipoproteína se ha encontrado elevada(108). Recientemente se ha informado que el aumento en la concentración de Lp(a) en plasma puede ocurrir en pacientes diabéticos con menos de 15 años de evolución(109), nuestros resultados no apoyan esta hipótesis y confirman que en la DM1 con 8.4 años de evolución y el no diabético, no existe diferencia significativa en la concentración de esta lipoproteína. Resultados similares también se han observado en diabéticos tipo 1 con 40 años de edad y con más de diez años de evolución de la enfermedad(110). Es probable que las discrepancias en los resultados de la literatura se deban al diseño de los estudios o a que los diabéticos estudiados presentaran algunas variables confusoras como: procesos inflamatorios, hipotiroidismo o insuficiencia renal, que pueden incrementar la concentración de esta lipoproteína(111,112). En este estudio, se puso especial cuidado en no incluir sujetos con algún trastorno que modificara la concentración de lípidos o lipoproteínas, incluyendo la Lp(a).

La similitud en la distribución de las concentraciones de Lp(a) en los cuatro grupos estudiados y la correlación significativa de las cifras de Lp(a) de los DM1 con la de sus familiares, confirma que no hay diferencia en las cifras de Lp(a) de los diabéticos con relación a sus familiares sanos. Por otro lado, los coeficientes de determinación de la apo(a) obtenidos de los DM1 con sus padres fue de 43 % y 61%, respectivamente, también

confirman el alto grado de heredabilidad de esta apoproteína. Resultados como los nuestros, han sido informados por otros investigadores(113,114). El hecho de que no exista una mayor frecuencia de isoformas pequeñas en los DM1 al compararlos con sus familiares, sugiere que los fenotipos de apo(a) no confieren mayor riesgo de aterosclerosis a los pacientes como se ha informado recientemente(109).

La distribución bimodal de los fenotipos de apo(a) observada en el DM1 y en sus familiares, confirma lo informado en otros estudios(115,116); varias hipótesis se han propuesto para explicar este fenómeno: 1) Puede ser un sesgo del método al determinar el tamaño del fenotipo de apo(a). En nuestro caso, esta posibilidad es mínima, ya que las isoformas fueron asignadas automáticamente por el programa en el que se analizaron las inmunitransferencias y a que dos estándares de la curva, el de 14 KIV y el de 26 KIV, corresponden exactamente con la mayor frecuencia de cada una de las modas y a que el estándar de 18 KIV, corresponde a la isoforma de apo(a) con la frecuencia más baja entre las dos modas.

Se ha propuesto que la distribución bimodal de la apo(a) se debe a que los individuos expresan dos alelos de apo(a) de diferente tamaño. Sin embargo, en nuestra serie la distribución de apo(a) en los sujetos con una sola isoforma, también fue bimodal. En la muestra estudiada, obtenida de una población mestiza, el fenómeno también pudiera explicarse por la mezcla

de 2 grupos étnicos con distribuciones de frecuencia de apo(a) distintas, caucásicos españoles y amerindios, sin embargo, en otros grupos étnicos en los que existe equilibrio génicotambién se ha encontrado una distribución bimodal(115).

Finalmente, la distribución bimodal puede ser el resultado de variaciones genéticas en el promotor del gen de apo(a), el cual puede regularse afectando la expresión de algunos alelos de apo(a) (117). De ser así, esta regulación diferencial sería un mecanismo normal para la expresión del gen de la apo(a).

En nuestra serie, no encontramos una relación inversa significativa entre la apo(a) y la concentración de Lp(a) del DM1 o de sus familiares, como se ha informado en otros estudios(118). Esta relación inversa, no siempre se ha encontrado en estudios clínicos. Con base en resultados obtenidos en hepatocitos de primates, se ha sugerido que la relación inversa se debe a un retraso en la maduración y en la secreción de las isoformas de apo(a) de mayor tamaño(119,120). Sin embargo, en el humano se ha demostrado que los sujetos homocigotos portadores de isoformas pequeñas de apo(a), (<22 kringles), pueden tener concentraciones de 3 a 284 mg/dl de Lp(a) y que homocigotos con apo(a) grandes, (> 30 kringles), pueden tener valores bajos de Lp(a) entre 1 y 24 mg/dL(104). Por lo tanto, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que el tamaño de la apo(a), no es el único ni el determinante más importante de la concentración de Lp(a) en la diabetes mellitus tipo 1 y que la relación entre la Lp(a) y la apo(a) es más compleja.

En conclusión, los resultados muestran que, tanto la concentración de Lp(a) como la distribución de las isoformas de apo(a) en el paciente con diabetes mellitus tipo 1 son similares a las de sus familiares sanos, que el riesgo de aterosclerosis en la DM1 no está asociado con los niveles de Lp(a), ni con una mayor frecuencia de alguna de las isoformas de apo(a).

REFERENCIAS

1. Magos LC. Lipoproteínas y apoproteínas. En Zorrilla HE, Lípidos séricos en la clínica, 2ª Ed., Editorail Interamericana, México 1989. pp. 30-44.
2. Gerald F, Watts MD: Cholesterol and coronary heart disease. Discovering the link, Ed. Merck Sharp and Dohome, London 1990. pp. 52-66.
3. Ginsberg NH. Lipoprotein physiology in nondiabetic and diabetic states. Relationship to atherosclerosis. *Diabetes Care* 14:839-55, 1991.
4. Green PHR, Glickman RM. Intestinal lipoprotein metabolism. *J lipid Res* 22:1153-73, 1981.
5. Rifai N. Lipoproteins and apolipoproteins. Composition, metabolism, and association with coronary heart disease. *Arch Pathol Lab Med* 110:694-701, 1986.
6. Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science* 212:628-635, 1981.
7. Erkelens DW. Lipids, lipoproteins and atherosclerosis in Dibetes Mellitus. In *Diabetes Mellitus*. 9a ed. Galloway AJ Edit. Indianapolis, Lilly research Laboratories, 1988, pp. 66-83
8. Janero DR, Siuta-Mangano P, Miller KW, Lane MD. Synthesis, processing, and secretion of hepatic very low density lipoprotein. *J Cell Biochem* 24:131-152, 1984.
9. Hornick CA, Jones AL, Renaud G, Hradek G, Havel RJ. Effect of chloroquine on the low density lipoprotein catabolic pathway in rat hepatocytes. *Am J Physiol* 246:187-194, 1984.
10. Slater EE, Alberts AW, Smith RL. HMG-CoA reductase inhibitors. In *The role of Cholesterol on Atherosclerosis: New Therapeutic Opportunities*, edited by S. M. Grundy and A.G. Bearn, Haley & Belfus, Inc. Philadelphia, pp 35-50, 1987.
11. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, and Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive



- cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:333-377, 1979.
12. Gotto AM Jr. High density lipoproteins: Biochemical and metabolic factors. *Am J Cardiol* 52:2B-4B, 1983.
 13. Tall RA. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res* 34:1255-1273, 1993.
 14. Quintão ECR, Medina LW, Pasarelli M. Reverse cholesterol transport in diabetes mellitus. *Diabetes metab Res Rev* 16:237-250, 2000.
 15. American Diabetes Association. Report of The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20:1183-1197, 1997.
 16. Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T, Kannel WB. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow-up study. *Diabetes*. 23:105-111, 1974.
 17. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular disease. The Framingham study. *JAMA* 241:2035-2038, 1979.
 18. Assmann G, Schulte H. The Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) study: prevalence of hyperlipidemia in persons with hypertension and/or diabetes mellitus and the relationship to coronary heart disease. *Am Heart J* 116:1713-1724, 1988.
 19. Krolewski AS, Kosinski EJ, Warram JH, Leland OS, Busick EJ, Asmal AC, Rand LI, Christlieb AR, Bradley RF, Kahn CR. Magnitude and determinants of coronary artery disease in juvenile-onset, insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 59:750-755, 1987.
 20. INEGI, SSA/DGEI, 1999.
 21. Cruickshanks KJ, Orchard TJ, Becker DJ. The cardiovascular risk profile of adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Care* 8:118-124, 1985.
 22. Uusitupa M, Siitonen O, Voutilainen E, Aro A, Hersio K, Pyorala K, Penttila I, Ehbholm C. Serum lipids and lipoproteins in newly diagnosed non-insulin-dependent (type II) diabetic patients, with special reference to

factors influencing HDL cholesterol and triglyceride levels. *Diabetes Care* 9:17-22, 1986.

23. Taskinen MR: Lipoprotein lipase in diabetes. *Diabetes Metab Tev* 3:551-570, 1987.
24. Durrington PN, Ishola M, Hunt L, Arrol S, Bahtnagar D. Apolipoproteins(a), A1, and B and parental history in men with early onset ischaemic heart disease. *Lancet* 14:1070-1073, 1988.
25. Rhoads GG, Dahlén G, Berg K, Morton NE, Dannenberg AL. Lp(a) lipoprotein as a risk factor for myocardial infarction. *JAMA* 256:2540-2544, 1986.
26. Sigurdsson G, Baldursdottir A, Sigvaldason H, Agnarsson U, Thorgeirsson G, Sigfusson N. et al: Predictive value of apolipoproteins in a prospective survey of coronary artery disease in men. *Am J Cardiol* 69:1251-1254, 1992.
27. Rosengren A, Wilhelmsen L, Eriksson E, Risberg B, Wedel H. Lipoprotein(a) and coronary heart disease: a prospective case-control study in a general population sample of middle aged men. *Br Med J* 301:1248-1251, 1990.
28. Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Jenner JL, McNamara JR, Ordovas JM, Davis CE, Abolafia JM, Lippel K, Levy RI. Lipoprotein(a) levels and the risk of coronary heart disease in men: The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial. *JAMA* 271:999-1003, 1994.
29. Wild SH, Fortmann SP, Marcovina SM. A prospective case-control study of lipoprotein(a) levels and apo(a) size and risk of coronary heart disease in Stanford Five-City Project Participants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:239-245, 1997.
30. Shlipak, MG, Simon, JA, Vittinghoff, E, Lin, F, Barrett-Connor, E, Knopp, RH, Levy, RI, and Hulley, SB Estrogen and progestin, lipoprotein(a), and the risk of recurrent coronary heart disease events after menopause. *JAMA*. 283:1845-1852, 2000.
31. Berg K. A new serum type system in men: The Lp system. *Acta pathol Microbiol Scand* 59:369-382, 1963.
32. Dahlen G, Berg K, Gillas T, Ericson C. Lp(a) lipoprotein /prebeta1-lipoprotein in Swedish middle-aged males and in

- patients with coronary heart disease. *Clin Genet.* 7:334-341, 1975.
33. McLean JW, Tomlinson JE, Kuang WJ, Eaton DL, Chen EY, Fless GN, Scanu AM, Lawn RM. CDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature*, 330:132-137, 1987.
 34. Petersen TE, Martzen MR, Ichinose A, Davie EW. Characterization of the gene for human plasminogen, a key proenzyme in the fibrinolytic system. *J Biol Chem.* 265:6104-6111, 1990.
 35. Ichinose A. Multiple members of the plasminogen-apolipoprotein(a) gene family associated with thrombosis. *Biochemistry* 31:3113-3118, 1992.
 36. Ichinose A. Characterization of the apolipoprotein(a) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 209:365-71, 1995.
 37. Suzuki K, Kuriyama M, Saito T, Ichinose A. Plasma lipoprotein(a) levels and expression of the apolipoprotein(a) gene are dependent on the nucleotide polymorphisms in its 5'-flanking region. *J Clin Invest* 99:1361-1366, 1997.
 38. MBewu, AD and Durrington PN. Lipoprotein (a): structure, properties and possible involvement in thrombogenesis and atherogenesis. *Atherosclerosis* 85:1-14, 1990.
 39. Boerwinkle E, Leffert CC, Lin J, Lackner C, Chiesa G, and Hobbs HH. Apolipoprotein (a) gene accounts for greater than 90% of the variation in plasma lipoprotein (a) concentrations. *J Clin Invest* 90:52-60, 1992.
 40. Scanu, A.M. and Fless, GM. Lipoprotein (a). Heterogeneity and biological relevance. *J Clin Invest* 85:1709-1715, 1990.
 41. Klausen IC, Sjol A, Hansen PS, Gerdes LU, Moller L, Lemming, L, Schroll M, and Faergeman O. Apolipoprotein(a) isoforms and coronary heart disease in men: a nested case-control study. *Atherosclerosis* 132:77-84, 1997.
 42. Katsouras CS, Karabina SA, Tambaki AP, Goudevenos JA, Michalis LK, Tsironis LD, Stroumbis CS, Elisaf MS, Sideris DA, and Tselepis AD. Serum lipoprotein(a) concentrations and apolipoprotein(a) isoforms: association with the severity of clinical presentation in

- patients with coronary heart disease. *J Cardiovasc Risk* 8:311-317, 2001.
43. Huang CM, Kraft HG, Gregg RE. Modified immunoblotting technique for phenotyping lipoprotein(a). *Clin Chem* 37:576-578, 1991.
 44. Kamboh MI, Ferrell RE, Kottke BA. Expressed hypervariable polymorphism of apolipoprotein (a). *Am J Hum Genet* 49:1063-1074, 1991.
 45. Lackner C, Boerwinkle E, Leffert CC, Rahmig T, Hobbs HH. Molecular basis of apolipoprotein (a) isoform size heterogeneity as revealed by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Invest* 87:2153-2161, 1991.
 46. Gaubatz JW, Ghanem KI, Guevara J, Nava LM, Patsch W, Morrisett DJ. Polymorphic forms of human apolipoprotein(a): inheritance and relationships of their molecular weights to plasma levels of lipoprotein(a). *J Lipid Res* 31:603-613, 1990.
 47. Fless GM, Snyder ML, Furbee JW, Garcia-Hedo MT, Mora R. Subunit composition of lipoprotein(a) protein. *Biochemistry* 33:13492-13501, 1994.
 48. Rainwater DL. Genetic basis for multimodal relationship between apolipoprotein (a) size and lipoprotein (a) concentration in Mexican-Americans. *Atherosclerosis* 115:165-171, 1995.
 49. Craig WY, Forster NR, Ledue TB, Johnson AM, Neveux LM, Ritchie RF. An improved method for determining high molecular weights by protein immunoblotting: application to apolipoprotein(a) phenotyping. *Appl Theor Electrophor* 2:135-140, 1991.
 50. Kraft HG, Lingenhel A, Bader G, Kostner GM, and Utermann G. The relative electrophoretic mobility of apo(a) isoforms depends on the gel system: proposal of a nomenclature for apo(a) phenotypes. *Atherosclerosis* 125:53-61, 1996.
 51. Rodriguez CR, Seman LJ, Ordovas JM, Jenner J, Genest MS Jr, Wilson PW, Schaefer EJ. Lipoprotein(a) and coronary heart disease. *Chem Phys Lipids* 67-68:389-398, 1994.
 52. Lippi G, Guidi G. Biochemical risk factors and patient's outcome: the case of lipoprotein(a). *Clin Chim Acta* 280:59-71, 1999.

53. Wild SH, Fortmann SP, Marcovina SM. A prospective case-control study of lipoprotein(a) levels and apo(a) size and risk of coronary heart disease in Stanford Five-City Project participants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:239-45, 1997.
54. Bostom AG, Cupples LA, Jenner JL, Ordovas JM, Seman LJ, Wilson PW, Schaefer EJ, Castelli WP. Elevated plasma lipoprotein(a) and coronary heart disease in men aged 55 years and younger. A prospective study. *JAMA* 276:544-548, 1996.
55. Császár A, Dieplinger H, Sandholzer C, Karadi Y, Juhász E, Drexel H. Plasma lipoprotein (a) concentration and phenotypes in diabetes mellitus. *Diabetologia* 36:47-51, 1993.
56. Levitsky LL, Scanu MA, Gould HS. Lipoprotein(a) levels in black and white children and adolescents with IDDM. *Diabetes Care* 14:283-287, 1991.
57. von Eckardstein A, Assmann G. Clinical implications of elevated lipoprotein(a). *Curr Ather Rep* 3:267-270, 2001.
58. Ince SC. (1999) Lipoproteins and atherosclerosis - The role of HDL cholesterol, Lp(a), and LDL particle size. In: 48th Annual Scientific Session. March 7-10, American College of Cardiology.
59. Cardoso SG, Ize LI, Kimura LY, Zamora GJ, Posadas RC. Lipoprotein(a) and cardiovascular risk in adult Mexicans. *Rev Invest Clin* 49:85-92, 1997.
60. Rosengren A, Wilhelmsen L, Eriksson E, Risberg B, Wedel H. Lipoprotein(a) and coronary heart disease: a prospective case-control study in general population sample of middle aged men. *BMJ* 301:1240-1248, 1990.
61. Bostom AG, Cupples LA, Jenner JL, Ordovas JM, Seman LJ, Wilson PW, Schaefer EJ, Castelli WP. Elevated plasma lipoprotein(a) and coronary heart disease in men aged 55 years and younger. A prospective study. *JAMA* 276:544-548, 1996.
62. Koschinsky ML and Marcovina SM. Lipoprotein(a): structural implications for pathophysiology. *Int J Clin Lab Res* 27:14-23, 1997.

63. Sandholzer C, Hallman DM, Saha N, Sigurdsson G, Lackner C, Császár A, Boerwinkle E, and Utermann G. Effects of the apolipoprotein(a) size polymorphism on the lipoprotein(a) concentration in 7 ethnic groups. *Hum Genet.* 86:607-614, 1991.
64. Kang C, Durlach V, Soulat T, Fournier C, Anglés-Cano E. Lipoprotein(a) isoforms display differences in affinity for plasminogen-like binding to human mononuclear cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:2036-2043, 1997.
65. Hervic L, Durlach V, Girard-Globa A, Anglés-Cano E. Multiple binding with identical linkage: a mechanism that explains the effect of lipoprotein(a) on fibrinolysis. *Biochemistry* 34:1353-8, 1995
66. Krolewsky AS, Warran JH, Rand LI, Kahn CR. Epidemiologic approach to the etiology of type 1 diabetes mellitus and its complications. *N Eng J Med.* 317:1390-1398, 1987.
67. Dahlén GH, Gyton JR, Attar M, Farmer JA, Kautz JA, Gotto AM. Association of levels of lipoprotein Lp(a), plasma lipids, and other lipoproteins with coronary artery disease documented by angiography. *Circulation* 74:758-765, 1986.
68. Maher VMG, Brown BG. Lipoprotein(a) and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol.* 6:229-35, 1995.
69. Durlach V, Gillery P, Bertin E, Grulet H, Gross A, and Leutenegger M. Influence of endogenous and environmental factors on variations of serum lipoprotein (a) concentrations in a large population of insulin-treated diabetic patients. *Diabetes Metab* 24:124-130, 1998.
70. Salzer B, Stavljenic A, Jurgens G, Dumic M, and Radica A. Polymorphism of apolipoprotein E, lipoprotein(a), and other lipoproteins in children with type I diabetes. *Clin Chem* 39:1427-1432, 1993.
71. Durruty P, Diaz J, Zanetti L, de la Varas MA, Garcia de los Rios M [Microalbuminuria, lipid changes and coronary heart disease in non-insulin-dependent diabetics]. *Rev Med Chil* 126:1425-1433, 1998.
72. Clodi M, Oberbauer R, Bodlaj G, Hofmann J, Maurer G, Kostner K. Urinary excretion of apolipoprotein(a) fragments in type 1 diabetes mellitus patients. *Metabolism* 48:369-372, 1999.

73. Bruckert E, Davidoff P, Grimaldi A, Truffert J, Giral P, Doumith R, Thervet F, De Gennes J.L. Increased serum levels of lipoprotein(a) in diabetes mellitus and their reduction with glycemc control. *JAMA* 263:35-36, 1990.
74. Levitsky LL, Scanu AM, and Gould SH. Lipoprotein(a) levels in black and white children and adolescents with IDDM. *Diabetes Care* 14:283-287, 1991.
75. Kilushi T, Onuma T, Shimura M et al,. Different changes in lipoprotein(a) concentrations from lipid concentrations of other lipoprotein with improved glycemc control in patients with NIDDM. *Diabetes Care* 17:1059-1061, 1994.
76. Duell BP, Hagemenas F, Connor WE. The relationship between serum lipoprotein(a) and insulinemia in healthy non-diabetic adult men. *Diabetes Care* 17:1135-1140,1994.
77. Furbee WJ Jr, Fless MG. Evaluation of common electroforetic methods on determining the molecular weight of apolipoprotein(a) polymorphs. *Anal Biochem* 234:66-73, 1996.
78. Rainwater DL, Manis GS. Immunochemical characterization and quantitation of lipoprotein (a) in baboons. Development of an assay depending on two antigenically distinct proteins. *Atherosclerosis* 73:23-31, 1988.
79. Geiss HC, Ritter MM, Richter WO, and Schwandt P. Determination of apolipoprotein(a) isoforms by sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide electrophoresis and immunoblotting. *Anal.Biochem.* 213:168-169, 1993.
80. Geroldi D, Bellotti V, Buscaglia P, Bonetti G, Gazzaruso C, Caprioli A, and Fratino P. Characterization of apo(a) polymorphism by a modified immunoblotting technique in an Italian population sample. *Clin.Chim.Acta* 221:159-169, 1993.
81. Albers JJ, Marcovina MS. Lipoprotein(a) quantification: comparison of methods and strategies for standardization. *Curr Op Lipidol* 5:417-421, 1994.
- 82 Kraft HG, Lingenhel A, Bader G, Kostner GM, and Utermann G. The relative electrophoretic mobility of apo(a) isoforms depends on the gel system: proposal of a nomenclature for apo(a) phenotypes. *Atherosclerosis* 125:53-61, 1996.

83. Steinberg G. Atherosclerosis, the major complication of diabetes. *Adv Exp Med Biol* 189:277-297, 1995.
84. Durlach V, Gillery P, Bertin E, Grulet H, Gross A, and Leutenegger M. Influence of endogenous and environmental factors on variations of serum lipoprotein (a) concentrations in a large population of insulin-treated diabetic patients. *Diabetes Metab* 24:124-130, 1998.
85. Boerwinkle E, Menzel HG, Kraft HG, Utermann G. Genetics of the quantitative Lp(a) lipoprotein trait III: contribution of Lp(a) glycoprotein phenotypes to normal lipid variation. *Hum Genet* 82:73-78, 1989.
86. Gaubatz JW, Ghanem KI, Guevara J, Nava LM, Patsch W, Morrisett DJ. Polymorphic forms of human apolipoprotein(a): inheritance and relationships of their molecular weights to plasma levels of lipoprotein(a). *J Lipid Res* 31: 603-13, 1990.
87. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during de assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685, 1970.
88. Anglés-Cano E, Loyau S, Cardoso SG, Couderc R, and Gillery P. A novel kringle-4 number-based recombinant apo[a] standard for human apo[a] phenotyping. *J Lipid Res* 40:254-359, 1999.
89. Towbin H, Staehlin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354, 1979.
90. Utermann G, Duba C, Menzel HJ. Genetics of the quantitative Lp(a) lipoprotein trait. II. Inheritance of Lp(a) glycoprotein phenotypes. *Hum Genet* 78:47-50, 1988.
91. Cardoso SG, Masso F, Montañó LF, Medina A, Posadas R, Zamora J, Posadas C. Simplified method for the detection of apo(a) isoforms. *Prep Biochem Biotechnol.* 31:401-410, 2001.
92. Cazzolato G, Prakash G, Green S, Kostner GM. The determination of lipoprotein Lp(a) by rate and endpoint nephelometry. *Clin Chem Acta* 153:203-208, 1983.
93. Siedel J, Hägele OE, Ziegenhorn J, Wahlefeld AW. Reagent for the enzymatic determination of serum total

cholesterol with improved lipolytic efficiency. *Clin Chem* 29:1075-1080, 1983.

94. Nägele U, Hägele OE, Sauer G, Wiedwemann E, Lehmann P, Wahlefeld AW, et al. Reagent for the enzymatic determination of serum triglycerides with improved lipolytic efficiency. *J Clin Chem Biochem* 22:165-174, 1984.
95. DeLong DA, DeLong ER, Weed PD. A comparison of methods for the estimation of plasma low and very low density lipoproteins cholesterol. *JAMA* 286:2372-2377, 1986.
96. Warnick GR, Benderson J, Albers JJ. Dextran-sulfate-Mg+2 precipitation procedure for equalization of high-density lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 28:1379-1388, 1982.
97. Kinoch PAM, Lahmann H. Rapid estimation (21/2 hours) of glycosylated haemoglobin for routine purpose. *Lancet* 2:16, 1977.
98. Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem* 6:24-27, 1969.
99. Elovson J, Jacobs JC, Schumaker VN, Puppione DL. Molecular weights of apoprotein B obtained from human low-density lipoprotein (apoprotein B-PI) and from rat very low density lipoprotein (apoprotein B-PIII). *Biochemistry* 24:1569-1578, 1985.
100. Valenti K, Aveyrier E, Laporte F, Hadian JA. Evaluation of the genotyping and phenotyping approaches in the investigation of apolipoprotein (a) size polymorphism. *Clin Chem Acta* 263:249-260, 1997.
101. Marcovina SM, Hobbs HH, Albers JJ. Relation between number of apolipoprotein(a) kringle 4 repeats and mobility of isoforms in agarose gel; basis for a standardized isoform nomenclature. *Clin Chem* 42:436-439, 1996.
102. Geiss HC, Ritter MM, Richter WO, Schwandt P. Determination of apolipoprotein(a) isoforms by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide electroforesis and immunoblotting. *Anal Biochem* 213; 1:198-169, 1993.

103. Geroldi D, Bellotti V, Buscaglia P, Bonetti G, Gazzaruso C, Caprioli A, Fratino P. Characterization of apo(a) polymorphism by a modified immunoblotting technique in an Italian population sample. *Clin Chim Acta* 221:159-169, 1993.
104. Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T, Kannel EB. Morbidity and mortality in diabetes in the Framingham population. *Diabetes* 23:105-111, 1974.
105. Krolewski AS, Kosinski EI, Warram JH, Leads OS, Busick EJ, Asmal AC, Rand LI, Christlieb AR, Bradley RF, Kahan CR (1987) Magnitude and determinants of coronary artery disease in juvenile-onset, insulin dependent diabetes mellitus, *Am J Cardiol* 59:750-755
106. Ginsberg NH. Lipoprotein physiology in non diabetic and diabetic states. Relationship to atherogenesis. *Diabetes Care* 9:839-855, 1991.
107. Hernandez C, Chacon P, Garcia-Pascual L, Mesa J, Simo R. Relationship between lipoprotein(a) phenotypes and plasminogen activator inhibitor type 1 in diabetic patients. *Thromb Res* 99:119-127, 2001.
108. Durlach V, Gillery P, Bertin E, Grulet H, Gross A, and Leutenegger M. Influence of endogenous and environmental factors on variations of serum lipoprotein (a) concentrations in a large population of insulin- treated diabetic patients. *Diabetes Metab* 24:124-130, 1998.
109. Kronenberg F, Auinger M, Trenkwalder E, Irsigler K, Utermann G, and Dieplinger H. Is apolipoprotein(a) a susceptibility gene for Type I diabetes mellitus and related to long-term survival?. *Diabetologia* 42:1021-1027, 1999.
110. Dubrey WS, Reavely A, Leslie GD, Odonnell M, Oconor MB, Seed M. Effect of insulin-dependent diabetes mellitus on lipids and lipoproteins: a study of identical twins. *Clin Sci* 84:537-542, 1993.
111. Khan MA, Baseer A. Magnitude of lipoprotein(a) in diabetes mellitus. *J Pak Med Assoc* 48:11-13, 1998.
112. Gazzaruso C, Garzaniti A, Buscaglia P, D'Annunzio G, Porta A, Vandelli G, Lorini R, Finardi G, Fratino P, and Geroldi D. Lipoprotein(a) levels and



- apolipoprotein(a) polymorphism in type 1 diabetes mellitus: relationships to microvascular and neurological complications. *Acta Diabetol* 35:13-18, 1998.
113. Gaubatz JW, Ghanem KI, Guevara J, Nava LM, Patsch W, Morrisett DJ. Polymorphic forms of human apolipoprotein(a): inheritance and relationships of their molecular weights to plasma levels of lipoprotein(a). *J Lipid Res* 31:603-613, 1990.
 114. Chiu, L, Hamman, RF, and Kamboh, MI. Apolipoprotein A polymorphisms and plasma lipoprotein(a) concentrations in non-Hispanic Whites and Hispanics. *Hum Biol* 72:821-835, 2000.
 115. Gaw A, Boerwinkle E, Cohen JC, and Hobbs HH. Comparative analysis of the apo(a) gene, apo(a) glycoprotein, and plasma concentrations of Lp(a) in three ethnic groups. Evidence for no common "null" allele at the apo(a) locus. *J Clin Invest* 93:2526-2534, 1994.
 116. Marcovina SM, Albers JJ, Wijsman E, Zhang, Z, Chapman NH, and Kennedy H. Differences in Lp[a] concentrations and apo[a] polymorphs between black and white Americans. *J Lipid Res* 37:2569-2585, 1996.
 117. Geroldi D, Bellotti V, Buscaglia P, Bonetti G, Gazzaruso C, Caprioli A, and Fratino P. Characterization of apo(a) polymorphism by a modified immunoblotting technique in an Italian population sample. *Clin Chim Acta* 221:159-169, 1993.
 118. Susuki K, Kuriyama M, Saito T, Ichinose A. Plasma lipoprotein(a) levels and expression of the apolipoprotein(a) gene are dependent on the nucleotide polymorphism in its 5-flanking region. *J Clin Invest* 99:1361-1366, 1997.
 119. Haffner SM, Tuttle KR, and Rainwater DL. Decrease of lipoprotein(a) with improved glycemic control in IDDM subjects [see comments]. *Diabetes Care* 14:302-307, 1991.
 120. Azrolan N, Gavish D, Breslow JL, Plasma lipoprotein(a) concentration is controlled by apolipoprotein(a) (Apo(a)) protein size and the abundance of hepatic apo(a) mRNA in cynomolgus monkey model. *J Biol Chem* 266:13866-13872, 1991.