

# Expresión fenotípica de la Lp(a) en niños y adolescentes españoles

Juan Antonio Gómez Gerique, Dolores López Martínez, Pilar Cancelas, María Teresa Montoya, María Dolores Gutiérrez y Amelia Porres

Departamento de Bioquímica Clínica. Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

**FUNDAMENTO:** Conocer la distribución de los fenotipos de Lp(a) en una población infantil y juvenil.

**MÉTODOS:** Se determinó el perfil lipoproteico, lipoproteína(a), apolipoproteínas y fenotipos de Lp(a) en 105 niños, seleccionados según sus concentraciones de colesterol.

**RESULTADOS:** Las concentraciones medias de Lp(a) eran significativamente mayores en el grupo con isoformas de bajo peso molecular respecto a los de alto peso molecular. La isoforma más frecuente fue S3.

**CONCLUSIONES:** Las concentraciones de Lp(a) se correlacionaron inversamente con el peso molecular de las isoformas de Apo(a).

*Palabras clave:* Lipoproteína; Fenotipo.

Phenotypic expression of Lp(a) in Spanish children and adolescents

**BACKGROUND:** To know the distribution of phenotypes Lp(a) in a young population.

**METHODS:** Lipoprotein levels, lipoprotein(a), apolipoproteins and the Lp(a) phenotypes were determined in 105 children, selected according to their cholesterol concentrations.

**RESULTS:** The Lp(a) concentrations were significantly higher in group with low molecular weight respect to group with high molecular weight. The most frequent isoform was S3.

**CONCLUSIONS:** The Lp(a) concentrations correlate inversely with the molecular weight of Apo(a) isoforms.

*Med Clin (Barc)* 2000; 114: 13-15.

Correspondencia: Dr. J.A. Gómez Gerique.  
Departamento de Bioquímica Clínica.  
Fundación Jiménez Díaz.  
Avda. Reyes Católicos, 2. 28040 Madrid.  
Correo electrónico: jagomezg@meditex.es

Recibido el 26-6-1999; aceptado para su publicación el 9-11-1999

Las concentraciones elevadas de lipoproteína(a) (Lp[a]) se consideran como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de la cardiopatía isquémica<sup>1</sup>. La Lp(a) es una lipoproteína estructuralmente semejante a la lipoproteína de baja densidad (LDL) respecto a su contenido en colesterol, fosfolípidos y apolipoproteína B100, pero posee además una proteína adicional, la apo(a), que se une a la apo B mediante un puente disulfuro. La Lp(a) representa una población heterogénea de partículas que presentan distintos tamaños y densidades; esta variedad se debe a diferencias en el contenido de lípidos, al tipo de carbohidratos y al tipo de apo(a) de que se trate. La concentración plasmática de Lp(a) está relacionada con el polimorfismo genético de la apo(a)<sup>2</sup>. Se han descrito numerosas isoformas de apo(a), que se diferencian por su peso molecular y por su movilidad electroforética respecto a la apo B100. Utermann et al<sup>3</sup> describieron 6 isoformas, designadas según su peso molecular de menor a mayor como F, B, S1, S2, S3 y S4. El peso molecular de la apo(a) se correlaciona inversamente con las concentraciones plasmáticas de la Lp(a). Así, los fenotipos F, B, S1 y S2, que tienen menor peso molecular, se asocian a concentraciones plasmáticas de Lp(a) más elevadas que los fenotipos S3 y S4.

Los factores que controlan las concentraciones plasmáticas de Lp(a) no están claramente definidos, aunque existe una relación inversa entre el tamaño de la apo(a) y las concentraciones plasmáticas de Lp(a); sin embargo, se han descrito diferencias raciales en las concentraciones de Lp(a) y en la distribución de los alelos de apo(a)<sup>4</sup>. Así, parece que otros factores, además del polimorfismo de la apo(a), participan en la regulación de las concentraciones plasmáticas de esta lipoproteína.

Sandholzer et al<sup>5</sup>, en un estudio realizado en 6 poblaciones étnicamente diferentes, han descrito que los pacientes que presentan isoformas B, S1 y S2, que se asocian con concentraciones elevadas de Lp(a), presentan con mayor frecuencia

ECV en cada uno de los grupos étnicos estudiados.

Por lo expuesto anteriormente, el conocimiento de los fenotipos de Lp(a) podrían aportar una información más precisa que la procedente de las concentraciones de Lp(a), a pesar de que éstas sean muy poco variables dentro de un mismo individuo, respecto al riesgo cardiovascular de los pacientes con alteraciones en su perfil lipídico.

Los objetivos de este trabajo fueron: conocer la distribución de fenotipos de Lp(a) en la población infantojuvenil de la Comunidad de Madrid; analizar las concentraciones de Lp(a) asociadas a cada uno de estos fenotipos, y conocer si la distribución de las distintas isoformas según su peso molecular eran distintas en los grupos que presentaban concentraciones extremas (percentiles 10 y 90) de colesterol total.

## Población y métodos

La población procedía de un estudio previo de 3.635 niños y adolescentes, de ambos sexos, con edades comprendidas entre 4 y 18 años, representativos de la Comunidad de Madrid<sup>6</sup>. Se les había determinado Lp(a) a 1.900; de ellos, se seleccionaron, estratificados por edad y sexo, los que tenían concentraciones de colesterol total (CT) en los percentiles 10, 50 y 90. El total de niños y adolescentes estudiados en este contexto fue de 105, distribuyéndose a partir de los percentiles de CT de la siguiente forma: 38 tenían una determinación previa situada en el percentil 90, 39 se encontraban previamente en el percentil 10, y 28 procedían del percentil 50.

Las extracciones de sangre se realizaron por punción venosa, tras un ayuno previo de 12 h. El análisis de lipoproteínas se realizó siempre en un tiempo máximo de 72 h, por el método combinado de ultracentrifugación-precipitación recomendado por las Lipid Research Clinic (LRC). Las alícuotas destinadas a la determinación de Lp(a) fueron conservadas a -20 °C, hasta el momento de su análisis.

Los métodos utilizados para la determinación del CT y triglicéridos (TG) fueron CHOD-PA (B-M N.º ref. 236691) y GPO-PAP (B-M N.º ref. 701912), respectivamente, adaptadas a un autoanalizador RA-XT (Technicon). En todas las determinaciones el coeficiente de variación (CV%) fue inferior al 5%.

La cuantificación de las apolipoproteínas A1 y B se realizó por métodos inmunoturbidimétricos, automatizados. El CV% intraserie fue del 2,1% para ambas apolipoproteínas, y el interserie fue del 4,8%. La Lp(a) se determinó mediante una técnica de ELISA. La determinación de la Lp(a) ofreció unos coeficientes de variación intra e interensayo de 2,6 y 5,8% respectivamente.

La determinación del fenotipo de Lp(a) se realizó mediante electroforesis en gel SDS-PAGE/agarosa y posterior *immunoblotting*. Para la preparación de la muestra se preincubaron 10 µl de suero durante 10 min a temperatura ambiente en 80 µl de tampón (0,06 M TRIS, pH 8,6, SDS 5,4% y 0,002% de azul de bromofenol) y se añadieron 5 µl de mercaptoetanol. La electroforesis se realizó en geles SDS de poliacrilamida que contienen un 3,75% de acrilamida, un 0,10% de bisacrilamida y un 0,75% de agarosa. El tampón de electroforesis contenía 25 mM de TRIS, 0,2 M de glicina y 0,1% de SDS. La electroforesis se realizó a temperatura ambiente durante 4 h a 20 mA constantes con una cubeta MiniProtean II. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µ, en un tampón (TRIS 25 mM, glicina 0,2 M y 20% metanol) durante 5 h a 15 V h constante en un equipo de transferencia Unidad Multiphor (Pharmacia). La membrana fue bloqueada durante 1 h en 20 mmol TRIS/HCl, pH 7,5 y 0,5 mol/l de NaCl (TBS) con un 3% de suero de albúmina bovina (BSA).

La apo(a) se detectó en la membrana de nitrocelulosa incubando la misma con un primer anticuerpo anti-Lp(a) humana de cabra diluido 1:500 en TBS durante toda la noche. Tras sucesivos lavados de la membrana, se incubó durante 2 h con un segundo anticuerpo anticabra de conejo conjugado con fosfatasa alcalina. Las bandas se visualizaron tras incubar la membrana con una solución de desarrollo que contiene 5bromo-4cloro-3indoxilofosfato (BCIP) y Nitroblue Tetrazolium (NBT).

Para identificar las distintas isoformas de Lp(a), se utilizó un estándar de Lp(a) humana (referencia Inmuno AGA-1221, Wien) que permitía la visualización de las isoformas S1, S2, S3 y S4 de mayor peso molecular que la apo B100 y que migran más lentamente que ésta, y las F con peso molecular menor y mucho más rápidas que la apo B100.

El estudio estadístico se realizó mediante el paquete informático SPSS/PC+.

## Resultados

Debido a la gran dispersión en los distintos fenotipos de Lp(a), para analizar los resultados de los niños y adolescentes de ambos sexos estudiados, categorizamos a los niños en dos grupos de fenotipos de

Lp(a) en función del tamaño molecular de las isoformas presentes:

– Grupo 1. Homo o heterocigotos que no presentaban ninguna isoforma de tamaño menor a S3. Este grupo fue considerado como de Lp(a) de alto peso molecular y sólo incluían S3, S4, S3/S3, S4/S4 y S4/S3.

– Grupo 2. Los que presentaban por lo menos una isoforma de tamaño igual o inferior a S2. Este grupo fue considerado como de Lp(a) de bajo peso molecular, formado por aquellos con las isoformas S1, S2 y F, tanto en forma homocigota como heterocigota (incluyendo los heterocigotos con S4 o S3).

En la **tabla 1** se observan las concentraciones medias de los lípidos, lipoproteínas y apolipoproteínas de ambos grupos (alto y bajo peso molecular), no observándose diferencias significativas entre los parámetros analizados, excepto entre las concentraciones medias de Lp(a), que fueron superiores en el grupo 2 respecto al grupo 1 (23,9 [22,6] frente a 8,8 [8,3] mg/dl) ( $p < 0,0001$ ).

Cuando analizamos la distribución de las distintas isoformas de Lp(a) en los niños que habían sido seleccionados según percentiles de CT, no se observan diferencias entre los distintos grupos. En el grupo de niños que pertenecían al percentil 10 de CT, el 55,3% tenían isoformas de alto peso molecular, mientras que los niños que pertenecían al percentil 50 y percentil 90 de CT, más del 60% tenían isoformas de Lp(a) de bajo peso molecular.

La isoforma que aparece con mayor frecuencia es la S3, seguida de S4 y S2. No se observan diferencias entre los distintos parámetros lipídicos, excepto en las concentraciones medias de Lp(a) (**tabla 2**), ya que los que presentan el fenotipo S2/F tenían unas concentraciones medias de 41,8 mg/dl, diferenciándose de los que presentaban el fenotipo S4, S3/S4 y S3. Asimismo, se puede observar cómo existe una gradación de las concentraciones medias de Lp(a) en función del fenotipo.

## Discusión

La relación inversa entre el peso molecular de la apo(a) y las concentraciones de

Lp(a) ha sido observada previamente. Sin embargo, se han descrito diferencias raciales tanto en concentraciones de Lp(a) como en la distribución de los alelos de apo(a)<sup>7</sup>. En un estudio realizado en distintos grupos étnicos se observó que los pacientes de raza caucásica y china tenían concentraciones de Lp(a) similares, pero presentaban diferencias significativas en la distribución de las isoformas de apo(a)<sup>8</sup>.

En nuestro estudio, al igual que ocurre en otros de raza caucásica<sup>8</sup>, también observamos la relación inversa entre el tamaño de apo(a) y las concentraciones de Lp(a). Así, en el grupo 2, constituido por las isoformas de menor peso molecular, las concentraciones de Lp(a) son más elevadas.

Las concentraciones de Lp(a) se consideran un factor de riesgo cardiovascular independiente de las demás lipoproteínas<sup>9</sup>; no obstante, debemos considerar que al cuantificar el cLDL, por razones metodológicas, también estamos incluyendo la concentración de Lp(a), existiendo una estimación incrementada de las concentraciones de CT y cLDL si las concentraciones de Lp(a) son elevadas<sup>10</sup>.

Sandholzer et al<sup>5</sup> opinan que el mayor riesgo cardiovascular que presentan los pacientes con isoformas B, S1 y S2 se debe a los efectos que éstas tienen sobre las concentraciones de Lp(a), y que son independientes de las concentraciones de CT y cLDL. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con estos datos ya que, si observamos la **tabla 1**, ningún parámetro lipídico presenta concentraciones significativamente distintas entre los dos subgrupos de apo(a) (bajo y alto peso molecular), a excepción lógica de las concentraciones de Lp(a). Sin embargo, en el grupo correspondiente al percentil 90 de CT se encontraban el 61,1% con isoformas de bajo peso molecular, mientras que en el grupo del percentil 10 tenía mayor porcentaje con isoformas de alto peso molecular (55,3%). No se suele observar relación entre las isoformas de apo(a) y las concentraciones de CT, pero la mayoría de los estudios no aportan un diseño similar al nuestro para poder comparar los datos. Sí podemos confirmar que la relación entre las isoformas de apo(a) y las concentraciones de Lp(a) son similares a otras poblaciones caucásicas.

Los fenotipos observados con mayor frecuencia en nuestra población fueron los S3, S4 y S2, que se corresponden a su vez con concentraciones medias de Lp(a) menos elevadas que los fenotipos S3/S1 y S2/F que se presentan con menor frecuencia. Sin embargo, continuamos manteniendo una serie de interrogantes sobre la relación con otras lipoproteínas e inclu-

TABLA 1

### Relación entre las isoformas de alto y bajo peso molecular de Lp(a) y las concentraciones de lipoproteínas y apolipoproteínas

	Grupo 1 (n = 47) (alto peso molecular)	Grupo 2 (n = 58) (bajo peso molecular)
CT	166 (35)	174 (38)
cHDL	56,5 (13)	54,3 (14)
cLDL	101 (34)	113 (33)
VLDL	10,2 (27)	5,5 (4,8)
Apo AI	147,9 (26,4)	142,4 (28,8)
Apo B	67,4 (24,3)	76,6 (24,4)
Lp(a)	8,8 (8,3)	23,9 (22,6)*

\*Valores expresados en mg/dl (media [DE]);  $p < 0,0001$ .

TABLA 2

### Concentraciones de lipoproteínas ( $\bar{X}$ [DE]) según los distintos fenotipos de Lp(a)

Fenotipos	n	CT	cLDL	cHDL	cVLDL	Lp(a)
S4	19	166,8 (43)	103,9 (38)	53,3 (11)	7,1 (6,4)	6,6 (5,6)
S3	28	162,8 (31)	98,6 (33)	55,8 (11)	13,8 (7,6)	10,2 (10,8)
S2	14	165,1 (39)	108,8 (35)	52,3 (10)	2,9 (1,6)	19,7 (20,7)
S1	12	189,5 (45)	131,1 (37)	57,8 (22)	4,9 (3,4)	21 (9,9)
S4/S3	12	174,2 (36)	102,7 (32)	64,6 (19)	4,9 (5,9)	9,2 (3,8)
S3/S1	10	197,2 (25)	131,3 (35)	52,5 (11)	10,1 (8,5)	24,2 (12,3)
S2/F	10	159,5 (51)	104,3 (43)	49,6 (7)	7,1 (5,4)	41,8 (29,7)*

\*Significación entre el grupo S2/F y los grupos S3, S4 y S3/S4;  $p < 0,05$ .

so con otros factores de riesgo cardiovascular que podrían modificar las concentraciones de Lp(a).

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sandkamp M, Assmann G. Lipoprotein(a) in PROCAM participants and young myocardial infarction survivors. En: Scanu AM, editor. Lipoprotein(a): 25 years progress. Nueva York: Academic Press Inc., 1990; 183-204.
2. Marcovina SM, Morrisett JD. Structure and metabolism of lipoprotein(a). *Curr Opin Lipidol* 1995; 6: 136-145.
3. Utermann G, Duba C, Menzel HJ. Genetics of the quantitative Lp(a) lipoprotein trait. II: Inheritance of Lp(a) glycoprotein phenotypes. *Hum Genet* 1988; 78: 47-50.
4. Schreiner PJ, Chambles LE, Brown SA, Watson RL, Toole J, Heiss G. Lipoprotein(a) as a correlate of stroke and transient ischemic attack prevalence in a biracial cohort: the ARIC Study. *Atherosclerosis Risk in Communities. Ann Epidemiol* 1994; 4: 351-359.
5. Sandholzer C, Saha N, Kark JD, Rees A, Jaross W, Dieplinger H et al. Apo(a) isoforms predict risk for coronary heart disease. A study in six populations. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 1214-1226.
6. López Martínez D, Gil A, Porres A, Blázquez E, Montoya T, Vivanco F et al. Perfil lipoproteico en niños y adolescentes de la Comunidad Autónoma de Madrid. *Med Clin (Barc)* 1996; 107: 366-370.
7. Srinivasan S, Dahlen G, Jarpa R, Webber L, Berenson G. Racial (black-white) differences in serum Lipoprotein(a) distribution and its relation to parental myocardial infarction in children. *Bogalusa Heart Study. Circulation* 1991; 84: 160-167.
8. Gaw A, Boerwinkle E, Cohen JC, 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* 1994; 93: 2526-2534.
9. Nogués X, Sentí M, Pedro-Botet J, Molina L, Serrat R, Pons S et al. Enfermedad cardíaca coronaria y lipoproteína(a): su relación con otros factores lipídicos de riesgo cardiovascular. *Med Clin (Barc)* 1992; 98: 171-174.
10. Gómez-Gerique JA, Porres A, López-Martínez D, Álvarez-Sala LA, Montoya MT, De Oya M. Levels of lipoprotein(a) and plasma lipids in Spanish children aged from 4 to 18 years. *Acta Paediatr* 1996; 85: 38-42.