

# Interferencia de la lipoproteína (a) en la cuantificación del colesterol de las HDL mediante ultracentrifugación

J.J. Álvarez, M.A. Lasunción, J.M. Olmos y E. Herrera

Servicio de Bioquímica-Investigación. Hospital Ramón y Cajal. Universidad de Alcalá de Henares. Madrid.

Se ha determinado la influencia de la presencia de la Lp (a) en el plasma sobre el valor de colesterol HDL. El plasma de 604 sujetos, seleccionados sin atender a ningún criterio restrictivo de edad, sexo o enfermedad, se procesó para la determinación de la concentración de colesterol y triglicéridos en HDL, que fueron separados tanto por precipitación con fosfotungstato-MgCl<sub>2</sub> como por ultracentrifugación diferencial secuencial en el límite de densidad 1,063-1,21 kg/l. La presencia de Lp (a) se determinó atendiendo a la aparición, en electroforesis en gel de agarosa, de una banda con movilidad pre-β ("pre-β-oculta") en el infranadante del plasma de densidad superior a 1,006 kg/l (libre de VLDL) y las muestras se clasificaron en pre-β-oculta (+) y pre-β-oculta (-), respectivamente. La Lp (a) también se cuantificó en el plasma mediante ensayo inmunoenzimático y se observó una estrecha correspondencia entre la aparición de pre-β-oculta y una concentración plasmática de Lp (a) superior a 300 mg/l. En las muestras pre-β-oculta (+), pero no en las pre-β-oculta (-), el valor de cHDL obtenido por ultracentrifugación fue significativamente superior al obtenido por precipitación y existía una correlación lineal y positiva entre la diferencia de ambos y la concentración de Lp (a) en el plasma. Una concentración de Lp (a) de 300 mg/l (que presenta más del 27 % de la

población estudiada) determina un valor de cHDL por ultracentrifugación superior al de precipitación en 0,129 mmol/l, aproximadamente. La diferencia entre ambos valores se atribuye a que la Lp (a) precipita junto con las LDL bajo la acción de los polianiones mientras que, por ultracentrifugación, se separa parcialmente junto con las HDL.

## INTERFERENCE OF LIPOPROTEIN(A) IN THE MEASUREMENT OF CHOLESTEROL FROM ULTRACENTRIFUGALLY ISOLATED HIGH DENSITY LIPOPROTEINS

We studied the influence of the presence of Lp (a) on the measurement of plasma HDLc. The plasma of 604 unselected subjects was processed to measure the concentrations of cholesterol and triglycerides in the HDL fraction, separated both by phosphotungstate-MgCl<sub>2</sub> precipitation and by sequential ultracentrifugation at the 1.063-1.21 kg/l density range. Lp (a) was detected as a band of pre-B mobility ("occult pre-B") by sepharose gel electrophoresis of d > 1.006 kg/l infranadant plasma (VLDL free), and the samples were classified as positive or negative. Lp (a) was also quantified in plasma by enzymatic immunoassay, and a close correspondence was found between the appearance of an "occult pre-B" band and a plasma concentration of Lp (a) higher than 300 mg/l. In samples positive for occult pre-B, but not in the negative ones, the value of HDLc obtained by ultracentrifugation was significantly higher than that obtained by precipitation. In addition, a positive linear correlation existed between the difference in the two HDL

Correspondencia: Dr. M.A. Lasunción.  
Servicio de Bioquímica-Investigación. Hospital Ramón y Cajal.  
Ctra. Colmenar, km 9. 28034 Madrid.

El presente trabajo se ha realizado con ayudas de la Fundación Ramón Areces y del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (90/0269). Se agradece la valiosa asistencia técnica de A. Arbiell y de secretaria de G. Alfayate.

measurements and plasma Lp (a) concentration. An Lp (a) concentration of 300 mg/dl was present in more than 27 % of the study population and determined a HDLc value by ultracentrifugation an average of 0.129 mmol/l higher than that obtained by precipitation. The difference between the two values is due to the fact that Lp (a) precipitates along with LDL under the effect of polyanions, while it partially separates with HDL during ultracentrifugation.

## Introducción

Existe un creciente interés por el estudio de la lipoproteína (a) (Lp [a]) dado que debido a su doble carácter aterogénico y antifibrinolítico<sup>1</sup> es, probablemente, un factor de riesgo independiente de enfermedad cardiovascular<sup>2,5</sup>. En individuos normolipémicos, una concentración plasmática de Lp (a) superior a 300 mg/l supone un riesgo de enfermedad cardiovascular doble sobre el de la población general<sup>2,3</sup>. Por otra parte, en individuos con hipercolesterolemia familiar, recientemente se ha observado que la concentración de Lp (a) en plasma es el factor de riesgo cardiovascular con mayor poder discriminante<sup>6,7</sup>.

La Lp (a) resulta de la unión de la apolipoproteína (a) Apo A a una partícula de LDL, mediante un puente disulfuro con la Apo B-100<sup>8</sup>. La Apo A es una glucoproteína rica en ácido siálico por lo que, a diferencia de las LDL, la Lp (a) presenta una migración pre- $\beta$  en la electroforesis. La densidad de la Lp (a) está comprendida entre 1,04 y 1,11 kg/l<sup>9</sup>. Por estas características la Lp (a) se identificó inicialmente como la pre- $\beta$ -oculta, banda con movilidad pre- $\beta$  que aparecía en el infranadante del plasma de  $d > 1,006$  kg/l de ciertos individuos<sup>10</sup>.

La Apo A tiene un alto grado de homología con el plasminógeno<sup>1,7</sup>. Contiene un dominio serinproteasa (semejante en un 94 % al del plasminógeno) y dos tipos de dominios homólogos *kringle*-plasminógeno: una copia del *kringle*-5 y de 15 a 37 copias del *kringle*-4<sup>11,12</sup>. A través de los *kringle*-4, la Lp (a) compite con el plasminógeno por su sitio de unión a fibrina, fibrinógeno<sup>13,14</sup> y a los aceptores de los diferentes tipos celulares<sup>15,17</sup>, con una capacidad y afinidad equivalentes<sup>1</sup>. Se ha estimado que concentraciones de Lp (a) en plasma superiores a 300 mg/l reducen la unión celular de plasminógeno en un 20 %, disminuyendo así la capacidad fibri-

nolítica<sup>16</sup>. Por otra parte, se ha detectado acúmulo de Lp (a) en las arterias esclerosadas, lo que no se observa en los vasos normales y ocurre todo lo contrario con el plasminógeno<sup>15</sup>. Estas propiedades pueden explicar la asociación de concentraciones altas de Lp (a) con la enfermedad cardiovascular.

Para la evaluación del riesgo aterogénico, entre otros parámetros, en nuestro laboratorio se cuantifican las HDL separadamente por precipitación del plasma con ácido fosfotúngstico y por ultracentrifugación secuencial en equilibrio de densidad (1,063-1,21 kg/l). Dado que en el primer método los polianiones interactúan con las lipoproteínas del plasma precipitando selectivamente las fracciones VLDL, LDL y Lp (a)<sup>18</sup>, mientras que el rango de densidades de la Lp (a) se solapa con el de las HDL<sup>9</sup>, en el presente trabajo hemos analizado la posible influencia de la presencia de Lp (a) en el plasma sobre los valores de cHDL obtenidos por ultracentrifugación con respecto a la precipitación.

## Material y métodos

### Sujetos

El estudio se ha realizado con el plasma de 604 sujetos, 308 mujeres y 296 varones. Dada la finalidad metodológica de este trabajo, no se aplicó ningún criterio de exclusión, por lo que la muestra incluye sujetos supuestamente sanos, hiperlipémicos o con alteraciones endocrinas, etc. Los valores de colesterol en plasma fueron  $6,30 \pm 0,08$  (1,96-17,11) mmol/l y los de triglicéridos  $1,93 \pm 0,14$  (0,40-50,17) mmol/l.

### Análisis de las lipoproteínas

A los sujetos se les extrajo una muestra de sangre, tras 10-12 horas de ayuno, que se recogió sobre EDTA-Na<sub>2</sub> (concentración final 1 mg/ml) como anticoagulante. En el plasma se determinaron, mediante métodos enzimáticos, el colesterol total (Menarini) y los triglicéridos (Boehringer Mannheim). Una alícuota del plasma se precipitó con fosfotúngstico-MgCl<sub>2</sub> (Boehringer Mannheim) y se determinaron las concentraciones de colesterol y triglicéridos en el sobrenadante (ppHDL). Otra alícuota del plasma se colocó en tubos del rotor 50 Ti Bechman, se completó con 0,189 M NaCl, 1 mM EDTA ( $d = 1,006$  kg/l), y se ultracentrifugó (LS 50 Beckman) a 45.000 r.p.m. durante 18 h a 10° C para separar las VLDL en el sobrenadante. Al infranadante se le adicionó KBr sólido (82,1 mg/ml) para incrementar su densidad hasta 1,063 kg/l, volviéndose a centrifugar, ahora a 47.000 r.p.m. durante 20 h. Las LDL se recogieron en el sobrenadante y el infranadante se traspasó a otros tubos, se le adicionó KBr sólido (221 mg/ml) para incrementar su densidad hasta 1,21 kg/l, y se ultracentrifugó a 47.000 r.p.m. durante 44 h. En este último sobrenadante (ucHDL) se determinaron las concentraciones de colesterol y de triglicéridos como anteriormente.

Las alícuotas del sobrenadante y del infranadante obtenidas al centrifugar a densidad de 1,006 kg/l, así como el plasma entero se utilizaron para electroforesis de zona. Esta electroforesis se realizó sobre geles de agarosa del 0,5 % (Paragón-Lipo, Beckman) con tampón barbital pH 8,6 y tinción de lípidos con Negro-Sudán. Aquellas muestras que a la inspección visual presentaban una banda con movilidad pre- $\beta$  en el infranadante de densidad superior a 1,006 kg/l (que no conte-

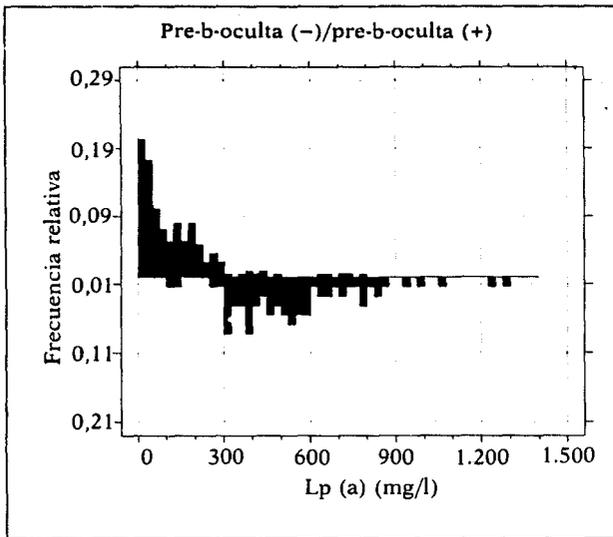


Figura 1. Distribución de frecuencias de la concentración plasmática de Lp (a) en pacientes pre-β-oculta (-) (arriba) y pre-β-oculta (+) (abajo). La concentración plasmática de Lp (a) se determinó en 299 muestras, 226 de las cuales correspondían al grupo de pre-β-oculta (-) y las 73 restantes, al de pre-β-oculta (+). La clasificación de pre-β-oculta (+) o (-) se realizó atendiendo a la aparición o no de una banda con movilidad pre-β en el infranadante del plasma ultracentrifugado a densidad 1,006 kg/l ("pre-β oculta").

nía VLDL) se identificaron como pre-β-oculta (+). La Lp (a) se cuantificó en 299 plasmas de entre los anteriores mediante enzaimunoenálisis (TintElize Lp[a], Biopool, Suecia) con anticuerpo policlonal contra Lp (a) purificada y plasma humano liofilizado como patrón, expresándose los resultados como mg de Lp (a) total por litro de plasma.

**Cálculos y tratamiento estadístico de los resultados**

Los resultados que se ofrecen en el texto corresponden a la media ± error estándar y a los límites. La identificación visual de la Lp (a) en electroforesis se comparó con la cuantificación de la Lp (a) mediante enzimoimunoanálisis, tomándose como límite de referencia el valor de 300 mg/l<sup>3</sup>. La especificidad se calculó como el porcentaje de los casos verdaderos negativos con respecto a la suma de falsos positivos y verdaderos negativos. La sensibilidad se calculó como el porcentaje de los casos verdaderos positivos con respecto a la suma de verdaderos positivos y falsos negativos. Finalmente, la eficiencia se calculó como el porcentaje de la suma de verdaderos positivos y verdaderos negativos con respecto al número total de observaciones.

La comparación estadística de los grupos se realizó mediante el test de la t de Student. Las operaciones matemáticas y las gráficas se realizaron con ayuda del programa Statgraphics (Statistical Graphics Corporation) instalado en un ordenador IBM PS-2, 55 SX.

**Resultados**

La identificación de los sujetos con Lp (a) se realizó inicialmente en función de la presencia de una banda con movilidad pre-β en el infranadante

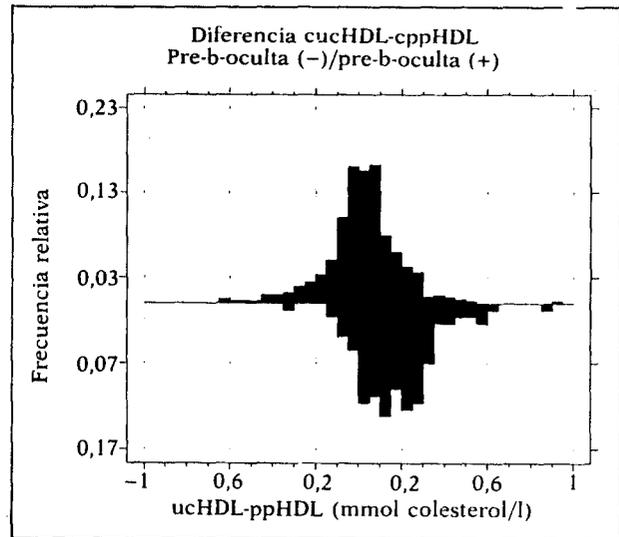


Figura 2. Distribución de frecuencias de la diferencia entre los valores de cHDL obtenidos por ultracentrifugación (ucHDL) y los obtenidos por precipitación (ppHDL) en muestras pre-β-oculta (-) (arriba) y pre-β-oculta (+) (abajo). El plasma de 604 sujetos se procesó para la determinación de cHDL mediante su separación por ultracentrifugación en los límites de densidad 1,063-1,21 kg/l (ucHDL) o bien por precipitación con fosfotungstato-MgCl<sub>2</sub> (ppHDL). Las muestras se subdividieron en pre-β-oculta (-) o (+) atendiendo a su patrón electroforético (véase pie de figura 1).

del plasma ultracentrifugado a densidad de 1,006 kg/l. El 24,1 % de los sujetos estudiados presentaban dicha banda y fueron considerados pre-β-oculta (+). En 299 muestras tomadas aleatoriamente de todo el conjunto (226 pre-β-oculta [-] y 73 pre-β-oculta [+]) se cuantificó la Lp (a) y su distribución de frecuencias se presenta en la figura 1. Como puede observarse, ambas poblaciones son claramente distintas por cuanto, entre los pre-β-oculta (-) menos del 6 % presentaban valores de Lp (a) superiores a 300 mg/l, mientras que entre los pre-β-oculta (+), eran más del 94 %. El análisis de los resultados indica que la visualización de la banda pre-β con respecto a la cuantificación de la Lp (a), presenta una especificidad del 98 %, una sensibilidad del 84 % y una eficacia del 94 %.

A la vista de los resultados, era satisfactorio mantener la subdivisión de los sujetos estudiados en pre-β-oculta (+) y pre-β-oculta (-), de acuerdo con su patrón electroforético. Al analizar los datos de cHDL obtenidos por precipitación del plasma (ppHDL) o por ultracentrifugación (ucHDL), se observó que había una correlación altamente significativa entre ellos. En los sujetos pre-β-oculta negativos la ecuación que relacionaba ucHDL con ppHDL fue  $y = 0,944x + 0,093$  (en mmol/l) ( $r =$

0,936,  $n = 416$ ), mientras que en los pre- $\beta$ -oculta (+), la ecuación fue  $y = 0,938x + 0,200$  (en mmol/l) ( $r = 0,917$ ,  $n = 127$ ). Estos datos señalaban un posible efecto aditivo de la Lp (a) sobre los valores de cHDL obtenidos por ultracentrifugación con respecto a la precipitación dado el mayor valor del término independiente en el grupo de pre- $\beta$ -oculta (+) que en el de pre- $\beta$ -oculta (-). Para analizar esta posibilidad se calcularon las diferencias entre los valores de ucHDL y los de ppHDL para las mismas muestras. En el grupo de pre- $\beta$ -oculta (-) los valores fueron  $0,019 \pm 0,008$  mmol/l, y en el de pre- $\beta$ -oculta (+)  $0,177 \pm 0,015$  mmol/l, siendo las diferencias altamente significativas ( $p < 0,001$ ). El histograma de frecuencias correspondiente revela que la distribución es normal para el caso de los pre- $\beta$ -oculta (-) (fig. 2, arriba), situándose la moda próxima al valor de 0, mientras que en el grupo de pre- $\beta$ -oculta (+) (fig. 2, abajo) se aprecia un desplazamiento hacia la derecha, siendo en más del 90 % de los casos superior a 0. Estos resultados indican que, mientras en el grupo de pre- $\beta$ -oculta (-) es de una coincidencia satisfactoria entre los valores de cHDL obtenidos por ultracentrifugación y los obtenidos por precipitación, en el grupo de pre- $\beta$ -oculta (+) existen diferencias significativas entre ellos, siendo más altos los valores obtenidos por ultracentrifugación.

En las mismas muestras (ucHDL y ppHDL) se determinó también la concentración de triglicéridos. No se observaron diferencias significativas entre el grupo de pre- $\beta$ -oculta (+) y el de pre- $\beta$ -oculta (-), en cuanto a tucHDL ni en cuanto a tppHDL (resultados no mostrados). Se calcularon las diferencias ucHDL-ppHDL triglicéridos y los resultados se muestran en forma de histograma de frecuencias (fig. 3). Se observa que los valores perfilan una distribución normal, tanto el grupo de pre- $\beta$ -oculta (-) (fig. 3, arriba) como el de pre- $\beta$ -oculta (+) (fig. 3, abajo), no habiendo diferencias significativas entre ellos (pre- $\beta$ -oculta (+):  $-0,035 \pm 0,003$  mmol/l; pre- $\beta$ -oculta (-):  $-0,045 \pm 0,003$  mmol/l;  $p > 0,1$ ). Por lo tanto, la presencia de Lp(a) en la muestra no afecta el valor de tHDL obtenido por ultracentrifugación con respecto al obtenido por precipitación.

El hecho de que los valores de tHDL obtenidos por precipitación sean superiores a los obtenidos por ultracentrifugación (como indica el que la diferencia sea negativa) debe atribuirse a la presencia de glicerol libre en el plasma, que obviamente es valorado en la muestra tratada por precipitación, pero que queda diluido 3 veces en la muestra de ucHDL por exigencias metodológicas.

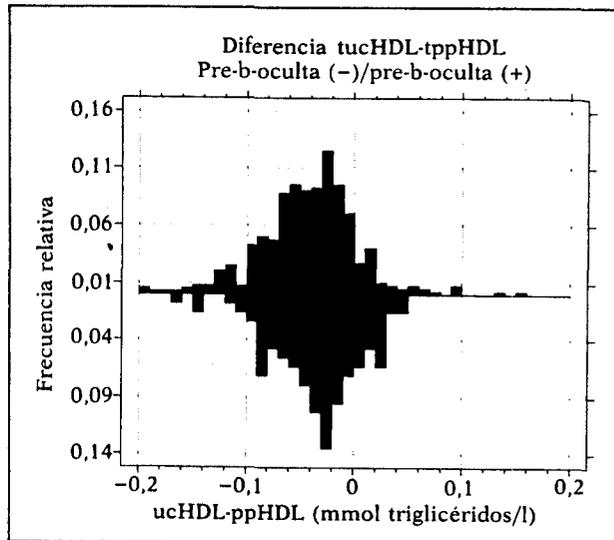


Figura 3. Distribución de frecuencias de la diferencia entre los valores de HDL-triglicérido obtenidos por ultracentrifugación (ucHDL) y los obtenidos por precipitación (ppHDL) en muestras pre- $\beta$ -oculta (-) (arriba) y pre- $\beta$ -oculta (+) (abajo). El plasma de 604 sujetos se procesó para la determinación de tHDL mediante su separación por ultracentrifugación en el límite de densidad 1,063-1,21 kg/l (ucHDL) o bien por precipitación con fosfotungstato-MgCl<sub>2</sub> (ppHDL). Las muestras se subdividieron en pre- $\beta$ -oculta (-) o (+) atendiendo a su patrón electroforético (véase pie de figura 1).

De hecho, una concentración media de glicerol en plasma de 0,1 mmol/l produciría una diferencia entre los valores de tucHDL y tppHDL de  $-0,066$  mmol/l, que es próxima a la hallada.

Para finalizar, se analizaron las regresiones entre los valores de las diferencias ucHDL-ppHDL para colesterol y triglicéridos, por un lado, y la concentración de Lp (a) en el plasma determinadas mediante enzoinmunoanálisis, por otro. En estos análisis se incluyeron tanto muestras pre- $\beta$ -oculta (-) como pre- $\beta$ -oculta (+), según la electroforesis de zona. En la figura 4 se observa que existe una correlación lineal positiva entre (ucHDL-ppHDL) colesterol y la Lp (a), siendo la ecuación  $y = 0,00035x - 0,058$  ( $r = 0,406$ ,  $n = 252$ ,  $p < 0,001$ ). En la figura 5 se observa, por el contrario, que el valor de la diferencia (ucHDL-ppHDL) triglicéridos no está influida por la concentración de Lp (a) en el plasma ( $y = 0,000033x - 0,059$ ;  $r = 0,142$ ,  $n = 240$ ,  $p > 0,02$ ).

Dado que la muestra estudiada era un grupo heterogéneo que comprendía sujetos con patologías diversas, para conocer la distribución de la concentración plasmática de Lp (a) en un grupo más representativo de la población normal se estu-

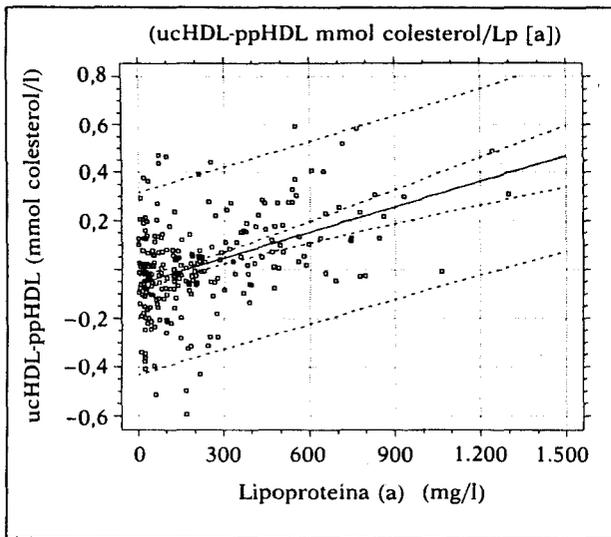


Figura 4. Regresión lineal entre la diferencia de los valores de cHDL obtenidos por ultracentrifugación y por precipitación (ucHDL-ppHDL), y la concentración de Lp (a) en plasma. La regresión corresponde a 252 muestras, ajustándose a la ecuación  $y = 0,00035x - 0,058$  ( $r = 0,406$ ,  $p < 0,001$ ).

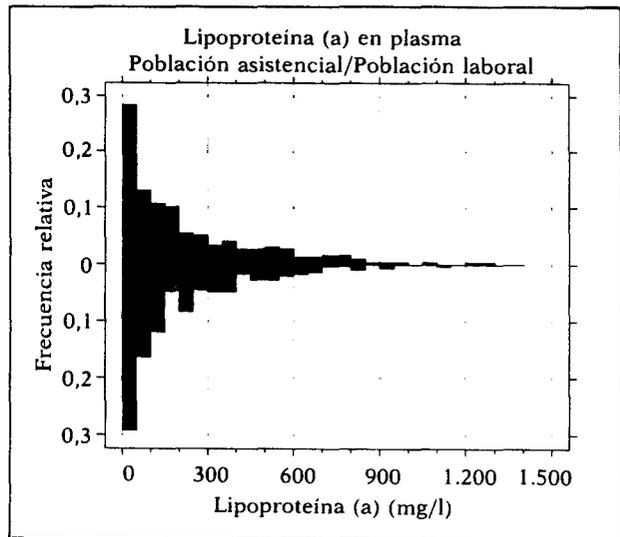


Figura 6. Distribución de frecuencias de la concentración plasmática de Lp (a) en una muestra de población asistencial (arriba) y en otra de la población laboral del Hospital Ramón y Cajal (abajo). La muestra de la población asistencial incluye 299 sujetos con patología diversa a quienes se les realizó el estudio del perfil de lipoproteínas por razones de tipo diagnóstico. La muestra de la población laboral del Hospital Ramón y Cajal corresponde a 288 empleados, supuestamente sanos, elegidos al azar.

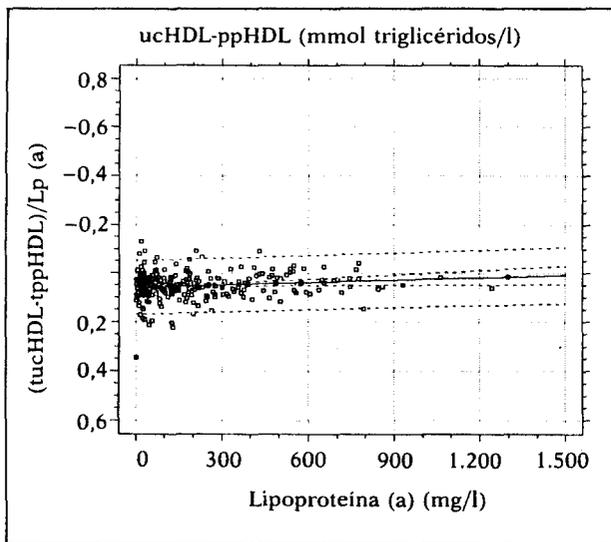


Figura 5. Regresión lineal entre la diferencia de los valores de tHDL obtenidos por ultracentrifugación y por precipitación (ucHDL-ppHDL), y la concentración de Lp (a) en plasma. La regresión corresponde a 240 muestras, ajustándose a la ecuación  $y = 0,000033x - 0,059$  ( $r = 0,142$ ,  $p > 0,02$ , no significativo).

cionados aleatoriamente. Los resultados se presentan en la figura 6 (abajo) y se comparan con la población asistencial estudiada, que incluye los pre- $\beta$ -oculta (+) y los pre- $\beta$ -oculta (-) (fig. 6, arriba). La población asistencial presentaba una concentración plasmática de Lp (a) de  $226,9 \pm 14,0$  mg/l frente a los  $197,7 \pm 12,3$  mg/l de la población de empleados del hospital ( $p > 0,1$ ). La distribución de frecuencias es similar en ambas poblaciones, si bien el porcentaje de sujetos con Lp (a) superior a 300 mg/l en la población laboral es del 25 %, mientras que en los pacientes es del 27,4 % (fig. 6).

**Discusión**

En el presente trabajo se ha constatado la interferencia de la presencia de Lp (a) en la determinación del colesterol de HDL mediante su separación por ultracentrifugación. Este estudio encuentra su justificación en el hecho de que la Lp (a) presenta un límite de densidades (1,04-1,11 kg/l, aproximadamente) que cabalga entre el límite de separación de las LDL y las HDL<sup>9</sup>, de manera que parte de la Lp (a), de encontrarse presente, se obtiene por ultracentrifugación junto con las HDL<sup>9,19,20</sup>. Por el contrario, la Lp (a) precipita bajo la acción de los polianiones<sup>18</sup>, por lo que se contabiliza junto con las LDL.

diaron 288 sujetos entre los empleados del Hospital Ramón y Cajal, 201 mujeres y 87 varones, con edades comprendidas entre los 22 y 63 años, selec-

La presencia de Lp (a) en la muestra se ha identificado en este trabajo inicialmente atendiendo a la aparición de lipoproteínas con movilidad pre- $\beta$  en el infranadante después de haber ultracentrifugado el plasma a  $d = 1,006$  kg/l (que no contiene VLDL). La identificación se realizó visualmente, y las muestras se clasificaron en pre- $\beta$ -oculta (+) y pre- $\beta$ -oculta (-), respectivamente. Este método ha sido utilizado por otros laboratorios habiéndose comprobado que, efectivamente, las lipoproteínas que se separan en dicha zona corresponden a la Lp (a)<sup>10</sup>. La bondad de este método se ha comparado aquí con la cuantificación de la Lp (a) mediante enzimo-inmunoanálisis en una muestra aleatoria significativa, comprobándose que más del 94 % de los pre- $\beta$ -oculta (+) presentaban una concentración superior a 300 mg/dl (especificidad = 98 %). A la vista de que la eficacia fue igualmente muy alta (superior al 94 %), estos resultados permiten seguir manteniendo los dos grupos considerados para los fines metodológicos que aquí se persiguen.

La observación central de este trabajo es que, en las muestras pre- $\beta$ -oculta (+), el valor de cHDL obtenido por ultracentrifugación es significativamente superior al obtenido por precipitación del plasma con fosfotungstato-MgCl<sub>2</sub>. Esto se ha constatado al comparar los valores (ucHDL-ppHDL). Por lo tanto, como podía anticiparse por las características físicas de la Lp (a), mediante ultracentrifugación diferencial secuencial ésta se aísla en parte junto con las HDL, de manera que los valores de cHDL así obtenidos están parcialmente artefactados.

Atendiendo a la regresión lineal obtenida (fig. 4), una concentración Lp (a) de 300 mg/l determina que el valor de cHDL por ultracentrifugación sea 0,129 mmol/l superior al obtenido por precipitación. Es interesante señalar que se llega a cifra similar si consideramos la proporción de colesterol en la Lp (a) (1/3 del peso total, aproximadamente) y asumimos que en ultracentrifugación la Lp (a) se distribuye en partes iguales entre las LDL ( $d = 1,019$ - $1,063$  kg/l) y las HDL ( $1,063$ - $1,21$  kg/l)<sup>21</sup>. Actualmente se está abordando en nuestro laboratorio la cuantificación de la Lp (a) en las muestras de LDL y HDL obtenidos por ultracentrifugación, para determinar directamente ese extremo.

Esta interferencia de la Lp (a) fue ya observada por Bachorik et al<sup>22</sup> en alguna de las series de muestras estudiadas, pero no en todas, y, de hecho, ese hallazgo tuvo escasa repercusión. Hay que señalar, no obstante, que el artefacto que supone la Lp (a) en el valor de cucHDL no es irrelevante ni anecdótico por cuanto la concentración media de

Lp (a) en la población estudiada fue de 227 mg/l y más del 27 % presentaban concentraciones plasmáticas superiores a los 300 mg/l de referencia. Estos resultados contrastan, por lo tanto, con la consideración generalizada de que la ultracentrifugación es el método de referencia para la separación y cuantificación de las HDL, puesto que la perfecta correlación entre los valores de cHDL por ultracentrifugación y por precipitación sólo puede cumplirse para las muestras libres de Lp (a).

A diferencia de lo observado para el colesterol, la presencia de Lp (a) no interfiere apreciablemente en el valor de ucHDL. En primer lugar, el valor de la diferencia ucHDL-ppHDL no se correlaciona con la concentración de la Lp (a) en plasma (fig. 5) y, en segundo lugar, esa diferencia es semejante en los sujetos pre- $\beta$ -oculta (+) que en los pre- $\beta$ -oculta (-) (fig. 3). Esto se observa a pesar de que, como acaba de demostrarse, parte de la Lp (a) se localiza dentro de los límites de las HDL. La explicación debe hallarse en la escasa proporción de triglicéridos que contiene la Lp (a) (menos del 5 %)<sup>21</sup>, por lo que es poco significativa la contribución de los triglicéridos de Lp (a) en la fracción de HDL.

En este trabajo también se ha determinado la concentración plasmática de Lp (a) en una muestra significativa de la población laboral del Hospital Ramón y Cajal, que puede ser representativa de la población general adulta. Se ha observado que el 25 % aproximadamente presenta concentraciones de Lp (a) superiores a los 300 mg/l, lo cual les coloca en una situación de elevado riesgo de padecer enfermedad cardiovascular. La comparación de nuestros resultados con los de otros autores es difícil de realizar por los diferentes métodos empleados al no existir aún control ni estandarización para todos ellos, e incluso existir divergencias en la expresión de los resultados (masa total de Lp [a] frente a masa de Apo-Lp [a] o masa de Apo [a]). Por otra parte, como la concentración plasmática de Lp (a) no se ajusta a una distribución gaussiana, el valor medio es poco representativo. A pesar de ello, los valores medios aquí observados son similares<sup>6,7</sup> o ligeramente superiores<sup>4,9</sup> a los de otras poblaciones de nuestro continente. Actualmente estamos ampliando este estudio para conocer con más exactitud la distribución de Lp (a) en nuestra población, así como determinar las posibles correlaciones con otros parámetros lipídicos y de otra índole.

En conclusión, se ha constatado que la Lp (a) se separa parcialmente junto con las HDL por ultracentrifugación. Esto equivale a una interferencia de la Lp (a) en los valores de cHDL determinados

mediante esta técnica, que es proporcional a la concentración de Lp (a) en plasma. Como consecuencia, los valores de cHDL obtenidos por ultracentrifugación son claramente superiores a los obtenidos por precipitación del plasma, cuando la muestra contiene Lp (a). Esta interferencia no es anecdótica por cuanto el 25 % de la población general presenta una concentración de Lp (a) en plasma superior a 300 mg/l.

### Bibliografía

1. Scott J. Lipoprotein (a): Thrombogenesis linked to atherogenesis at last? *Nature* 1989; 341:22-23.
2. Armstrong VW, Cremer P, Eberle E et al. The association between serum Lp (a) concentrations and angiographically assessed coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1986; 62:249-257.
3. Brown MS, Goldstein JL. Plasma lipoproteins: Teaching old dogmas new tricks. *Nature* 1987; 330:113-114.
4. Hofler G, Harnoncourt F, Paschke E, Mirtl W, Pfeiffer KH, Kostner GM. Lipoprotein Lp (a): A risk factor for infarction. *Arteriosclerosis* 1988; 8:398-401.
5. Sandkamp M, Funke H, Schulte H, Kohler E, Asmann G. Lipoprotein (a) is an independent risk factor for myocardial infarction at a young age. *Clin Chem* 1990; 36:20-23.
6. Wiklund O, Angelin B, Olofsson S et al. Apolipoprotein (a) and ischaemic heart disease in familial hypercholesterolaemia. *Lancet* 1990; 335:1.360-1.363.
7. Utermann G. The mysteries of lipoprotein (a). *Science* 1989; 246:904-910.
8. Gaubatz JW, Heideman C, Gotto AM, Morrisett JD. Human plasma lipoprotein (a) structural properties. *J Biol Chem* 1983; 258:4.582-4.584.
9. Labeur C, Michiels G, Bury J, Usher DC, Rosseneu M. Lipoprotein (a) quantified by an enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibodies. *Clin Chem* 1989; 35:1.380-1.384.
10. Albers JJ, Cabana VG, Warnick GR, Hazzard WR. Lp (a) Lipoprotein: Relationship to sinking pre- $\beta$  lipoprotein, hiperlipoproteinaemia, and apolipoprotein B. *Metabolism* 1975; 24:1.047-1.054.
11. McLean JW, Tomlinson JE, Kuang WJ et al. cDNA sequence of human apolipoprotein (a) is homologous to plasminogen. *Nature* 1987; 300:132-137.
12. Koschinsky ML, Beisiegel U, Henne-Bruns D, Eaton DL, Lawn RM. Apolipoprotein (a) size heterogeneity is related to variable number of repeat sequences in its mRNA. *Biochemistry* 1990; 29:640-644.
13. Harpel PC, Gordon BR, Parker TS. Plasmin catalyzes binding of lipoprotein (a) to immobilized fibrinogen and fibrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:3.847-3.851.
14. Edelberg JM, González-Gronow M, Pizzo SV. Lipoprotein (a) inhibition of plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. *Thromb Res* 1990; 57:155-162.
15. Hajar KA, Gavish D, Breslow JL, Nachman RL. Lipoprotein (a) modulation of endothelial cell surface fibrinolysis and its potential role in atherosclerosis. *Nature* 1989; 339:303-305.
16. Miles LA, Fless GA, Levin EG, Scanu AM, Plow EF. A potential basis for the thrombotic risks associated with lipoprotein (a). *Nature* 1989; 339:301-303.
17. González-Gronow M, Edelberg JM, Pizzo SV. Further characterization of the cellular plasminogen binding site: Evidence that plasminogen 2 and lipoprotein (a) compete for the same site. *Biochemistry* 1989; 28:2.374-2.377.
18. Grinstead GF, Ellefson RD. Heterogeneity of lipoprotein Lp (a) and apolipoprotein (a). *Clin Chem* 1988; 34:1.036-1.040.
19. Warnick GE, Cheung MC, Albers JJ. Comparison of current methods for high-density lipoprotein cholesterol quantitation. *Clin Chem* 1979; 25:596-604.
20. Demacker PNM, Vos-Janssen HE, Hijmans AGM, Laar AV, Jansen AP. Measurement of high-density lipoprotein cholesterol in serum: Comparison of six isolation methods combined with enzymic cholesterol analysis. *Clin Chem* 1980; 26:1.780-1.786.
21. Morrisett JD, Guyton JR, Gaubatz JW, Gotto AM. Lipoprotein (a): Structure, metabolism and epidemiology. En: Gotto AM, Jr., ed. *Plasma Lipoproteins*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1987; 129-152.
22. Bachorik PS, Wood PD, Albers JJ et al. Plasma high-density lipoprotein cholesterol concentrations determined after removal of other lipoproteins by heparin/manganese precipitation or by ultracentrifugation. *Clin Chem* 1976; 22:1.828-1.834.