

Nuevos marcadores de riesgo aterogénico: Perfil hemorreológico en niños y adolescentes con hipercolesterolemia familiar

J. Dalmau Serra¹, A. Vayá Montaña², M. Martínez Silvestre², L.C. Blesa Baviera¹, J. Aznar Lucea²

Resumen. Objetivo. Recientes estudios en adultos han demostrado que las alteraciones hemorreológicas son predictivas de enfermedad cardiovascular precoz, pero no es conocido si éstas están asociadas a hiperlipemias o son secundarias a un proceso ateroscleroso establecido, y si aparecen ya en la infancia.

Material y métodos. Se ha estudiado en 36 pacientes con hipercolesterolemia familiar (HF) (2-16 años de edad), 12 de los cuales estaban siendo tratados con colestiramina, y en 35 controles (GC), pareados por edad y sexo, diversos parámetros reológicos.

Resultados. Los pacientes HF tratados con colestiramina no presentaban diferencias significativas en ninguno de los seis parámetros reológicos estudiados con respecto al resto de pacientes, por lo que los resultados del grupo HF se analizan globalmente al compararlos con el GC, existiendo entonces las siguientes diferencias significativas: índice de agregación eritrocitaria en estasis: $5,0 \pm 1,2$ vs $3,6 \pm 1,0$ ($p < 0,001$), índice de agregación eritrocitaria a baja velocidad de cizallamiento sanguíneo: $8,1 \pm 1,7$ vs $6,9 \pm 1,4$ ($p < 0,001$) y viscosidad plasmática: $1,19 \pm 0,11$ vs $1,16 \pm 0,04$ mPa x s ($p < 0,01$). No hubo diferencias significativas en el fibrinógeno plasmático ni en la viscosidad sanguínea a velocidad de cizallamiento de $230s^{-1}$ y a $23s^{-1}$. A los pacientes con HF se realizó Eco-Doppler carotídeo que fue normal, lo que es indicativo de ausencia de lesión de aterosclerosis en estadio de placa fibrosa.

Conclusiones. Estos resultados indican que existen alteraciones hemorreológicas en ausencia de lesión aterosclerosa establecida, asociadas a la hipercolesterolemia y que se manifiestan ya en población pediátrica, por lo que su estudio en pacientes con HF ofrece un nuevo dato para valorar el riesgo aterogénico y sus complicaciones.

An Esp Pediatr 1996;45:393-397.

Palabras clave: Hipercolesterolemia familiar; Niños y adolescentes; Hemorreología; Fibrinógeno; Agregabilidad eritrocitaria; Viscosidad plasmática; Viscosidad sanguínea.

NEW MARKERS OF ATHEROGENIC RISK: HEMORRHOLOGICAL PROFILE IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH FAMILIAR HYPERCHOLESTEROLEMIA

Abstract. Objective: Recent studies in adults have shown that hemorrheological alterations are predictive of early cardiovascular disease, but it is unknown if they are related to hyperlipemia or are secondary to an established atherosclerotic process and if they appear during childhood.

Patients and methods: Several rheological parameters have been studied in 36 patients with familiar hypercholesterolemia (FH). These patients were between 2 and 16 years of age and 12 of them were being treated with cholestyramine. Thirty-five controls (CG) were individually matched for age and sex.

Results: The FH patients treated with cholestyramine did not show significant differences in any of the six rheological parameters that were studied when compared to the other patients. Therefore, the results of the FH group were analyzed as a whole when they were compared with the CG. The following significant differences were found: Index of erythrocyte aggregation at stasis 5.0 ± 1.2 vs 3.6 ± 1.0 ($p < 0.001$), index of erythrocyte aggregation at low rate of blood shears 8.1 ± 1.7 vs 6.9 ± 1.4 ($p < 0.001$) and plasma viscosity 1.19 ± 0.11 vs 1.16 ± 0.04 mPa/s ($p < 0.01$). There were no significant differences in the plasma fibrinogen nor in the blood viscosity at shear rates of 230/s and 23/s. Carotid echodoppler was taken in the HF patients which was normal, indicative of the absence of atherosclerosis lesions in the fibrous plaque phase.

Conclusions: These results indicate that there are hemorrheological alterations in absence of established atherosclerotic lesions, which are associated with hypercholesterolemia and that emerge in the pediatric population. Therefore, research in FH patients offers new data to evaluate the atherogenic risk and its complications.

Key words: Familiar hypercholesterolemia. Children and adolescents. Hemorrheology. Fibrinogen. Erythrocyte aggregation. Plasma viscosity. Blood viscosity.

Introducción

La aterosclerosis se inicia en la infancia y la intensidad de sus alteraciones se correlaciona con la concentración sanguínea de colesterol, que a su vez se correlaciona intensamente con la grasa de la dieta y también con el sedentarismo y la diabetes, que junto a la hipertensión y tabaquismo constituyen los factores de riesgo de desarrollar aterosclerosis y enfermedad coronaria precoz⁽¹⁾. La importancia de los niveles sanguíneos de colesterol total (C-total) y colesterol de baja densidad (C-LDL) ha llevado a la aceptación de la hipótesis lipídica en la génesis de la aterosclerosis, aunque ésta no excluye la existencia de otros factores de riesgo endógenos y exógenos⁽²⁾. De hecho, Ross⁽³⁾ la ha integrado dentro de un más complejo proceso en el cual los cuatro elementos celulares involucrados en la patogenia de la aterosclerosis (endoteliales, musculares, plaquetas y monocitos-macrófagos) son afectados por sustancias diferentes al C-LDL y que producen el daño endotelial inicial y su posterior progresión. En la actualidad se ha identificado una serie de factores diferentes a los mencionados anteriormente que pueden iniciar o contribuir al desarrollo de la aterosclerosis, algunos compro-

¹Departamento de Pediatría. ²Departamento Biopatología Clínica. Hospital «La Fe». Valencia.

Correspondencia: Dr. J. Dalmau. Hospital Infantil «La Fe». Avda. Campanar, 21. 46009 Valencia.

Recibido: Diciembre 1995

Aceptado: Marzo 1996

bados con complejas técnicas de laboratorio y otros por evidencias clínico-epidemiológicas. Entre estos factores están: lipoproteína (a)⁽⁴⁻⁶⁾, homocisteína^(5,7,8), apoproteína B⁽⁹⁻¹¹⁾, C-LDL oxidado^(12,13), antioxidantes endógenos⁽¹⁴⁻¹⁶⁾, determinadas alteraciones inmunológicas e inflamatorias en la pared vascular^(17,18) que conllevan la producción de ciertas sustancias vasoactivas^(3,19), factores hemorreológicos⁽²⁰⁻²²⁾, etc.

En los últimos años diversos estudios epidemiológicos han demostrado que los factores hemorreológicos desempeñan un importante papel en la aterogénesis y en la incidencia de complicaciones tromboembólicas de las enfermedades ateroscleróticas, considerándolos factores predictivos de enfermedad coronaria⁽²³⁾. Se acepta que en adultos la hipercolesterolemia familiar (HF) cursa con diversas alteraciones hemorreológicas⁽²⁴⁻²⁸⁾ aunque no existe acuerdo acerca de si la dislipemia «per se» es capaz de producir dichas alteraciones, o si éstas las presentan solamente aquellos pacientes dislipémicos que ya han desarrollado un proceso ateroscleroso, constituyendo un epifenómeno del mismo^(23,25,29).

El objetivo del presente estudio es conocer si la hipercolesterolemia aisladamente modifica la reología sanguínea, y si estas alteraciones aparecen ya en la población pediátrica, por lo que se ha estudiado un grupo de niños y adolescentes afectos de HF sin lesiones ateroscleróticas vasculares demostradas.

Pacientes

Se han estudiado 36 pacientes (V: 17, M: 19) remitidos para estudio de hipercolesterolemia. Sus edades estaban comprendidas entre 2 y 17 años. Todos tenían un estado nutricional normal, con peso, talla e índice de masa corporal entre los percentiles 10 y 90 de las gráficas de crecimiento españolas⁽³⁰⁾. El estudio analítico basal (hemograma, SMAC, hormonas tiroideas), así como la tensión arterial, fue normal en todos los casos, descartándose causas secundarias de hipercolesterolemia. Tras comprobar en dos análisis sucesivos con un intervalo de 1 mes cifras de C-total > 200 mg/dl, se procedió al estudio de C-total y fracciones, triglicéridos, apoproteínas A1, B y lipoproteína (a) al paciente, padres y hermanos. En base a estos datos, y junto a los antecedentes en padres, abuelos y tíos de enfermedad vascular precoz y/o dislipemia, los pacientes fueron diagnosticados de HF de acuerdo con los criterios de Cortner y cols.⁽³¹⁾ y del National Cholesterol Education Program para niños y adolescentes⁽¹⁾. Dos pacientes de 2 y 4 años de edad tenían C-LDL de 336 y 469 mg/dl, el primero de ellos con xantomas, test de ensayo funcional de receptores LDL y antecedentes familiares de IMA precoz, compatibles con HF homocigota.

En el momento de realizar el estudio hemorreológico cinco pacientes no recibían aún tratamiento dietético (casos nuevos), 19 recibían tratamiento dietético (con diferentes grados de cumplimiento), durante un período de tiempo entre 3 meses y 5 años, y 12 tomaban, además de la dieta, resinas de intercambio iónico (colestiramina) durante un intervalo de tiempo entre 6 meses y 3 años. A todos los pacientes HF se les practicó Eco-Doppler carotídeo.

Tabla I Media y desviación estándar (mg/dl) de lípidos plasmáticos, apoproteínas y lipoproteína (a) en pacientes con hipercolesterolemia familiar (HF) (n = 36) y grupo control (GC) (n = 35). NS: no significativo

	HF	GC	p
C-total	276 ± 69	160 ± 23	< 0,001
Triglicéridos	81 ± 53	60 ± 22	< 0,05
C-LDL	196 ± 49	95 ± 16	< 0,001
Apo B	171 ± 51	81 ± 16	< 0,001
Apo A1	127 ± 23	126 ± 18	NS
Lp(a)	24 ± 18	14 ± 20	< 0,05

El grupo control (GC) estuvo constituido por 35 niños y adolescentes pareados por edad y sexo con los pacientes estudiados. Su tensión arterial e índice de masa corporal eran normales y su C-total < 200 mg/dl. Dieron su consentimiento para efectuar el estudio al tiempo que se les hacía extracción de sangre para estudio preoperatorio de cirugía menor.

Métodos

Las muestras de sangre fueron obtenidas de la vena antecubital, con el paciente sentado y sin oclusión venosa, tras un ayuno de 10-12 horas. Cinco ml de sangre fueron utilizados para los parámetros bioquímicos y hematológicos y otros 3 ml para los estudios hemorreológicos. De acuerdo con el Committee on Hemorheology Standardization⁽³²⁾, la sangre fue procesada en las primeras 2 horas para evitar la deteriorización de las propiedades reológicas. La sangre de los pacientes y de los controles fue procesada simultáneamente.

El C-total y triglicéridos fueron analizados con técnicas enzimáticas usando autoanalizador Bayer RA 1000 (Bayer Diagnostic, Tarrytown, New York). El colesterol de alta densidad (C-HDL) fue medido tras precipitación con heparina y manganeso⁽³³⁾. El C-LDL fue calculado con la fórmula de Friedewald⁽³⁴⁾. Las apoproteínas A1 y B fueron cuantificadas por inmunonefelometría usando anticuerpos específicos de Beckman (Beckman Instruments, CA-USA)⁽³⁵⁾. La lipoproteína (a) fue calculada por enzimoimmunoanálisis (ELISA) usando Macro Lp(a), Terumo⁽³⁶⁾. Los parámetros hematológicos fueron medidos por el autoanalizador Sysmex NE 8000 (TOA Medical Electronics, Kobe-Japan). El fibrinógeno fue medido en un autoanalizador ACL-300 (Instrumentation Laboratory, IL, Milano-Italy). La agregación eritrocitaria en estasis y a baja velocidad de cizallamiento sanguíneo (3 segundos⁻¹) fue determinada en un agregómetro eritrocitario MA-1⁽³⁷⁾, previo ajuste del hematócrito a 40-45%. La viscosidad plasmática fue medida en un viscosímetro capilar Fresenius⁽³⁸⁾, a 37 °C. La viscosidad sanguínea a dos velocidades de cizallamiento (230 segundos⁻¹ y 23 segundos⁻¹) fue medida en un viscosímetro Brookfield DV-II (Soughton, MA-USA) a 37 °C previo ajuste del hematócrito a 40-45%.

Tabla II Media y desviación estándar de los parámetros hemorreológicos de los pacientes con hipercolesterolemia familiar tratados con dieta (n = 24) y con dieta y fármacos (n = 12)

	Tto. dietético	Tto. dietético + farmacológico	p
Fibrinógeno (mg/dl)	278 ± 56	269 ± 42	NS
AE0	4,87 ± 1,24	5,04 ± 0,78	NS
AE1	8,20 ± 1,64	8,05 ± 1,04	NS
VP (mPa x s)	1,20 ± 0,05	1,19 ± 0,07	NS
VS 230s ⁻¹ (mPa x s)	4,10 ± 0,28	3,96 ± 0,29	NS
VS 23s ⁻¹ (mPa x s)	6,89 ± 1,00	6,72 ± 0,89	NS

AE0: Índice de agregación eritrocitaria en estasis; AE1: Índice de agregación eritrocitaria a baja velocidad de cizallamiento (3s⁻¹); VP: Viscosidad plasmática; VS 230s⁻¹ y VS 23s⁻¹: Viscosidad sanguínea a 230s⁻¹ y a 23s⁻¹ de velocidad de cizallamiento; NS: No significativo.

Se utilizó la «t» de Student para el estudio de las diferencias entre series desapareadas, considerando significativas las diferencias con p < 0,05. El análisis de correlación fue realizado mediante la «r» de Pearson utilizando el paquete estadístico Oxstat, Hewlett Packard.

Resultados

Los pacientes con tratamiento dietético más farmacológico tenían diferencias significativas respecto al resto de pacientes HF en los siguientes parámetros lipídicos: C-total, 239 ± 26 vs 295 ± 60 mg/dl (p < 0,001); C-LDL, 179 ± 20 vs 209 ± 43 mg/dl (p < 0,01); apoproteína B, 141 ± 25 vs 181 ± 38 mg/dl (p < 0,001). Ningún paciente cumplía el objetivo del tratamiento del NCEP⁽¹⁾, esto es, C-LDL < 130 mg/dl, siendo en todos los casos la concentración de C-LDL en el momento de hacer el estudio > 150 mg/dl (percentil > 95), por lo que el análisis comparativo con el GC se realizó utilizando los valores globales de los pacientes HF. En la tabla I se muestran los valores de C-total, triglicéridos, C-LDL, apoproteínas B y A1 y lipoproteína (a). Como puede observarse los pacientes con HF difieren significativamente (p < 0,001) en C-total, C-LDL y apo B con respecto al GC.

El Eco-Doppler carotídeo realizado a los pacientes HF fue normal en todos los casos.

Se ha agrupado a los pacientes nuevos (n = 5) con los que recibían tratamiento dietético (n = 19) por no existir diferencias significativas entre sí, y dado que ninguno de los cinco recibía una dieta altamente desequilibrada, y su bajo número no permitió un estudio estadístico más concluyente. No hubo diferencias significativas en los parámetros hemorreológicos de estos 24 pacientes HF con respecto a los que además recibían medicación (n = 12) (Tabla II). Por ello el estudio comparativo con el GC se realizó utilizando los valores globales de los 36 pacientes HF. En la tabla III se muestran los parámetros hemo-

Tabla III Media y desviación estándar de los parámetros hemorreológicos en pacientes con hipercolesterolemia familiar (HF) (n = 36) y grupo control (GC) (n = 35)

	HF	GC	p
Fibrinógeno (mg/dl)	275 ± 52	260 ± 40	NS
AE0	5,0 ± 1,2	3,6 ± 1,0	< 0,001
AE1	8,1 ± 1,7	6,9 ± 1,4	< 0,001
VP (mPa x s)	1,19 ± 0,11	1,16 ± 0,04	< 0,01
VS 230s ⁻¹ (mPa x s)	4,06 ± 0,81	4,08 ± 0,32	NS
VS 23s ⁻¹ (mPa x s)	6,82 ± 1,10	6,59 ± 0,77	NS

AE0: Índice de agregación eritrocitaria en estasis; AE1: Índice de agregación eritrocitaria a baja velocidad de cizallamiento (3s⁻¹); VP: Viscosidad plasmática; VS 230s⁻¹ y VS 23s⁻¹: Viscosidad sanguínea a 230s⁻¹ y a 23s⁻¹ de velocidad de cizallamiento; NS: No significativo.

reológicos de los pacientes HF comparados con GC. Los datos más llamativos son el alto índice de agregación eritrocitaria en estasis y a baja velocidad de cizallamiento en el grupo HF con respecto al GC (p < 0,001), así como una mayor viscosidad plasmática (p < 0,01). El fibrinógeno, aunque está más elevado en el grupo HF, no alcanza el nivel de significación estadística. No hubo diferencias significativas en los demás parámetros hemorreológicos. Otros parámetros sin significación estadística entre grupo HF y GC fueron: recuento leucocitario, 6.790 ± 1.560 vs 6.500 ± 1.620/mm³ y hematocrito, 38 ± 2% vs 39 ± 3%.

En el estudio de correlaciones entre los parámetros hemorreológicos y lipídicos en los pacientes HF destaca la correlación existente entre la viscosidad plasmática y la concentración de C-total (p < 0,05) y casi significativa con C-LDL (p = 0,06). No hubo correlación entre las alteraciones hemorreológicas y otras variables como edad, índice de masa corporal (no había pacientes obesos), etc.

Discusión

La hemorreología estudia el comportamiento y propiedades del flujo sanguíneo y la interacción de los elementos formes entre sí y con la pared vascular. La resistencia al flujo viene impuesta, por una parte, por la geometría del vaso y, por otra, por la viscosidad de la sangre; ésta es una propiedad multifactorial que viene modulada fundamentalmente por el número de hematíes, su agregabilidad y deformabilidad, y por la viscosidad del plasma, dependiente en gran medida del fibrinógeno; asimismo, el fibrinógeno influye considerablemente en la agregación eritrocitaria. El aumento del hematocrito, del fibrinógeno y de la agregación eritrocitaria, y la disminución de la deformabilidad eritrocitaria aumenta la viscosidad sanguínea, la cual al enlentecer el flujo favorece el desarrollo de la aterosclerosis. Por ello diferentes parámetros hemorreológicos como la viscosidad plasmática y el fibrinógeno son considerados como factores independientes de riesgo de enfermedades cardiovascula-

res^(22,23).

El papel que los lípidos plasmáticos juega en la patogenia de la aterosclerosis está bien establecido⁽³⁾. Sin embargo, no está aclarado si las alteraciones hemorreológicas halladas en enfermos dislipémicos anteceden o actúan conjuntamente con las alteraciones lipídicas^(23,25,27). La interpretación de los estudios realizados en este sentido es difícil puesto que han sido efectuadas en adultos con HF, algunos de ellos con manifestaciones clínicas de isquemia y en fase avanzada de deterioro ateroscleroso vascular, que por sí mismo se asocia a alteraciones reológicas concretas^(39,40), de forma que la influencia «per se» del aumento de las lipoproteínas sobre los parámetros reológicos no es bien conocida. El presente estudio, realizado en niños y adolescentes afectados de HF sin daño vascular sintomático, aporta datos que pueden ayudar a la comprensión del citado problema.

Los resultados obtenidos indican que los pacientes estudiados tienen un perfil hemorreológico alterado, consistente en una mayor viscosidad plasmática y en una mayor agregación eritrocitaria tanto en estasis como a baja velocidad de cizallamiento sanguíneo. Ambos parámetros reológicos dependen en gran medida del fibrinógeno⁽²¹⁾, aunque también del nivel de lipoproteínas plasmáticas⁽⁴¹⁻⁴³⁾. El hecho de que no se haya encontrado un incremento significativo de fibrinógeno sugiere que los valores aumentados tanto de agregación eritrocitaria como de la viscosidad plasmática dependen, por lo menos en parte, de las lipoproteínas; esta hipótesis también viene sugerida por la correlación significativa existente entre la viscosidad plasmática y el colesterol sérico, hecho ya sugerido por otros autores⁽²³⁾. A su vez, el dato de que el fibrinógeno no esté significativamente aumentado sugiere la ausencia de lesión vascular establecida⁽⁴⁴⁾.

A pesar del aumento de la viscosidad plasmática y de la agregación eritrocitaria, no existe elevación simultánea de la viscosidad sanguínea. Esto puede ser debido a que el incremento de los mencionados determinantes reológicos no son de la suficiente intensidad como para modificar la viscosidad sanguínea total, parámetro más global y dependiente de otros varios factores⁽²¹⁾.

Hasta el momento actual, el único estudio hemorreológico efectuado en pacientes pediátricos con HF fue realizado por Jay y cols.⁽²⁹⁾, que valoraron los mismos parámetros que en el presente trabajo y no hallaron diferencias significativas en ninguno de ellos. Si bien los presentes datos concuerdan con los referentes a fibrinógeno y viscosidad sanguínea, existe discrepancia respecto a la viscosidad plasmática y agregación eritrocitaria explicable, sólo parcialmente, por la diferente metodología utilizada. Hay que considerar que el número de pacientes estudiados por Jay y cols. (n = 16) es sensiblemente inferior al del presente estudio (n = 36).

Existen pocos datos, y a veces contradictorios, sobre la influencia de fármacos hipolipemiantes en los parámetros hemorreológicos⁽²⁷⁾. Los únicos que claramente modifican el fibrinógeno son los fibratos⁽²³⁾, medicamentos que no tomaban ninguno de los pacientes estudiados. En el presente estudio no hubo diferencias significativas en los pacientes con tratamiento farmacológico con respecto a los que sólo reciben dieta, probable-

mente porque las concentraciones de C-total y C-LDL en el momento de realizar el análisis eran del mismo orden que las de los pacientes sometidos únicamente a tratamiento dietético. En el citado estudio de Jay y cols.⁽²⁹⁾ seis pacientes recibían colestiramina, y tampoco hallaron diferencias significativas con respecto a los pacientes tratados sólo con dieta.

Todo ello sugiere que los parámetros hemorreológicos sólo están influidos por las concentraciones de C-total y C-LDL, y no se modifican con el tiempo transcurrido recibiendo tratamiento dietético o dietético más farmacológico. Asimismo, la edad y el índice de masa corporal no parecen influir en los parámetros hemorreológicos.

Los hallazgos del presente estudio muestran que algunas alteraciones hemorreológicas existen aún en ausencia de enfermedad vascular establecida, ya que no se detectó ninguna alteración mediante Eco-Doppler carotídeo. Este método no invasivo puede detectar pequeñas reducciones del flujo sanguíneo⁽⁴⁵⁾ y permite la identificación de lesiones ateroscleróticas en el estadio de placa fibrosa con obstrucción mínima y asintomática de la luz vascular. Sin embargo, no se puede descartar la presencia de estrías lipídicas o de una disfunción endotelial previa al desarrollo de la placa⁽⁴⁶⁾, aunque dicha disfunción, en caso de existir, no tendría por qué producir alteraciones reológicas.

En resumen, los datos hallados en el presente estudio sugieren que los niños y adolescentes afectados de HF ya presentan alteraciones reológicas atribuibles a la propia dislipemia, que preceden al deterioro vascular y que pueden contribuir al desarrollo de la lesión ateromatosa, por lo que constituyen un nuevo factor de riesgo aterogénico poco conocido hasta ahora en la población pediátrica. Se precisarán más estudios que profundicen en este campo puesto que, por un lado, permitirán conocer mejor la patogenia de la aterosclerosis y, por otro, identificar precozmente a aquellos pacientes HF con mayor riesgo de accidentes tromboembólicos, así como adoptar decisiones terapéuticas más eficaces.

Bibliografía

- 1 National Cholesterol Education Program. Report of the expert panel on blood cholesterol levels in children and adolescents. *Pediatrics* 1992; **89**(Suppl):525-584.
- 2 Grande Covián F. Prevención pediátrica de la aterosclerosis. *An Esp Pediatr* 1995; **43**:87-93.
- 3 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis. An update. *N Engl J Med* 1986; **314**:488-500.
- 4 Kostner GM, Czinner A, Pfeiffer KH, Bihari-Varga M. Lipoprotein (a) concentrations as risk indicators for atherosclerosis. *Arch Dis Child* 1991; **66**:1054-1056.
- 5 Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. II. *N Engl J Med* 1992; **326**:310-318.
- 6 Barnathan ES. Has lipoprotein «little» (a) shrunk?. *JAMA* 1993; **270**:2224-2225.
- 7 Genest JJ, McNamara JR, Salem DN, Wilson PWF, Schaefer EJ, Malinow MR. Plasma homocysteine levels in men with premature coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1990; **16**:1114-1119.

- 8 Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991; **324**:1149-1155.
- 9 Avogaro P, Bittolo Bon G, Cazzalato G, Quinci GB. Are apolipoproteins better discriminators than lipids for atherosclerosis?. *Lancet* 1979; **1**:901-903.
- 10 Durrington PN, Hunt L, Ishola M, Arrol S. Apolipoproteins (a); A1 and B and parenteral history in men with early onset ischaemia heart disease. *Lancet* 1988; **1**:1070-1073.
- 11 Sehayek E, Eisenber S. The role of native apolipoprotein B containing lipoproteins in atherosclerosis: cellular mechanism. *Current Opinion Lipidology* 1994; **5**:350-353.
- 12 Witztum JL. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *Br Heart J* 1993; **69**(Suppl):S12-S18.
- 13 Stocker R. Lipoprotein oxidation: mechanistic aspects, methodological approaches and clinical relevance. *Current Opinion Lipidology* 1994; **5**:422-433.
- 14 Berry EM. The effects of nutrients on lipoprotein susceptibility to oxidation. *Current Opinion Lipidology* 1992; **3**:5-11.
- 15 Cleland JGF, Krikler DM. Modification of atherosclerosis by agents that do not lower cholesterol. *Br Heart J* 1993; **69**(Suppl):S54-S62.
- 16 Motilva MB, Bretó M, Dalmau J. Vitaminas de la dieta en la prevención de arteriosclerosis: Acción antioxidante del beta-caroteno y las vitaminas E y C. *Act Ped Esp* 1995; **53**:77-84.
- 17 Hansson GK. Immune and inflammatory mechanisms in the development of atherosclerosis. *Br Heart J* 1993; **69**(Suppl):S38-S41.
- 18 Siegel G, Rückborn K, Schnalke F, Muller J. Endothelial dysfunction in human atherosclerotic coronary arteries. *Eur Heart J* 1993; **14**(Suppl I):99-103.
- 19 Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. I. *N Engl J Med* 1992; **326**:242-250.
- 20 Bilheimer D, Tuddenham E. Cardiovascular disease: hyperlipidaemia and coagulation. *Current Opinion Lipidology* 1991; **2**:227-229.
- 21 Lowe GDO. Blood viscosity, lipoproteins and cardiovascular risk. *Circulation* 1992; **85**:2329-2331.
- 22 Lowe GDO. Blood viscosity and cardiovascular disease. *Thromb Haemostas* 1992; **67**:494-498.
- 23 Koenig W, Sund M, Ernst E, Mraz W, Hombach V, Keil U. Association between rheology and components of lipoprotein in human blood. *Circulation* 1992; **85**:2197-2204.
- 24 Leonhardt H, Arntz HR, Klemens UH. Studies of plasma viscosity in primary hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis* 1977; **28**:29-40.
- 25 Lowe GDO, McArdle B, Stromberg P, Lorimer AD, Forbes S, Prentice CR. Increased blood viscosity and fibrinolytic activity in type II hyperlipoproteinemia. *Lancet* 1982; **1**:472-475.
- 26 Stoltz JF, Gaillard S, Rouselle D, Voisin P, Drowin P. Rheological study of blood during primary hyperlipoproteinemia. *Clin Hemorheol* 1981; **1**:227-232.
- 27 Jay RH, Rampling MW, Betteridge DJ. Abnormalities of blood rheology in familial hypercholesterolemia: effects of treatment. *Atherosclerosis* 1990; **85**:249-256.
- 28 Vayá A, Martínez M, Carmena R, Aznar J. The lipid composition of red blood cells and their hemorheological behavior in patients with primary hyperlipoproteinemia. *Clin Hemorheol* 1993; **13**:447-457.
- 29 Jay RH, McCarthy SN, Rampling MW, Betteridge DJ. Blood rheology and fibrinogen in children with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 1991; **91**:117-121.
- 30 Hernández M, Castellet J, Narvaiza JL, Rincón JM, Ruiz I, Sánchez E, Sobradillo B, Zurimendi A. Curvas y tablas de crecimiento. Instituto de Investigación sobre Crecimiento y Desarrollo. Fundación F. Orbegozo. Madrid. Garsi Editorial, 1988.
- 31 Cortner JA, Coales PM, Gallgher PR. Prevalence and expression of familial combined hyperlipidemia in childhood. *J Pediatr* 1990; **16**:514-519.
- 32 Guidelines for measurement of blood viscosity and erythrocyte deformability. International Committee for Standardization in Haematology. Expert panel on blood rheology. *Clin Hemorheol* 1986; **6**:439-453.
- 33 Warnick GR, Abers JJ. A comprehensive evaluation of the heparin-manganese precipitation procedure for estimating high density lipoprotein cholesterol. *J Lip Res* 1978; **19**:65-76.
- 34 Friedewald WT, Levy IR, Fredrichson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without the use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; **18**:499-502.
- 35 Heuck CC, Schlierf G. Nephelometry of apolipoprotein B in human serum. *Clin Chem* 1979; **25**:221-226.
- 36 Sillbermann RS, Armentrout MA, Vella A, Saha AL. Macra Lp(a) for quantification of human lipoprotein (a) by enzyme-linked immunoassay. XIV International Congress of Clinical Chemistry. San Francisco, CA; 1990.
- 37 Schmid-Schönbein H, Volger E, Teitel P, Kiesewetter H, Daver V, Heilmann L. New hemorheological techniques for the routine laboratory. *Clin Hemorheol* 1983; **2**:93-95.
- 38 Jung F, Roggenkamp HG, Schneider R, Kiesewetter H. Das Kapillarschlauch-Plasmaviskosimeter ein neues Messgerät zur Quantifizierung der Blutplasmaviskosität. *Biomed Technik* 1983; **28**:249-252.
- 39 Lowe GDO. Blood rheology in arterial disease. *Clin Sci* 1986; **71**:137-146.
- 40 Stuart J, George AJ, Davies AJ, Aukland A, Hurlow RA. Haematological stress syndrome in atherosclerosis. *J Clin Pathol* 1981; **34**:464-467.
- 41 Sepowitz AH, Chien S, Smith FR. Effects of lipoproteins on plasma viscosity. *Atherosclerosis* 1981; **38**:89-95.
- 42 Vayá A, Martínez M, Carmena R, Aznar J. Red blood cell aggregation and primary hyperlipoproteinemia. *Thromb Res* 1993; **72**:119-126.
- 43 Razavian SM, Atger V, Giral M, Cambillau M, Del Pino M, Simón AC, Moatti J, Levenson J. Influence of HDL subfractions on erythrocyte aggregation in hypercholesterolemic men. *Atheroscl Thromb* 1994; **14**:361-366.
- 44 Ernst E. Plasma fibrinogen: an independent cardiovascular risk factor. *J Int Med* 1990; **227**:365-372.
- 45 Pujia A, Rubba P, Spencer MP. Prevalence of plaques and stenoses detectable by echo-doppler examination in the femoral arteries of an elderly population. *Atherosclerosis* 1994; **105**:201-208.
- 46 Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID, LLoyd JK, Deanfield JE. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992; **340**:1111-1115.