

Asociación entre el perfil lipídico y genotipo de la apoproteína E en niños españoles (8 - 15 años)

A. Bercedo Sanz¹, D. González-Lamuño¹, P. Muñoz Cacho¹, M. Albajar Molera², J. C. Rodríguez Rey², S. Braga Fernández³, S. Málaga Guerrero³, M. García Fuentes¹

Resumen. Diferentes estudios demuestran que la apoproteína E (apo E) es un determinante genético de los niveles lipídicos y del riesgo de enfermedad cardiovascular, aunque dichos estudios han sido realizados fundamentalmente en adultos, siendo escasos y con resultados variables los realizados en la población infantil.

Objetivos: Analizar la posible asociación entre el perfil lipídico y las distintas isoformas de la apo E (E2, E3 y E4) en un grupo de niños españoles.

Material y métodos: En un estudio transversal, se determinaron el genotipo de la apo E y el perfil lipídico (colesterol total [CT], LDL-c, HDL-c, triglicéridos [TG], apo AI, apo B y Lp (a)) de 191 niños (110 niños y 81 niñas), de 8 a 15 años de edad. El genotipo de la apo E fue realizado mediante PCR y digestión con la enzima de restricción *HhaI*.

Resultados: Las frecuencias alélicas relativas de los alelos e3, e4 y e2 fueron 0,87, 0,09 y 0,04, respectivamente. Los niveles séricos de CT, LDL-c y apo B eran significativamente más elevados en el grupo con el genotipo E3/E4, que en los E3/E3, y en estos que en los E2/E3. Al examinar dicha relación en ambos sexos, encontramos que sólo había significación estadística en el grupo de las niñas ($p < 0,004$).

Conclusiones: El genotipo de la apoE se asocia significativamente a las diferencias lipídicas de nuestra población infantil, siendo dicha influencia sexo específica para este grupo de edad.

An Esp Pediatr 1998;49:120-124.

Palabras clave: Adolescente; Apoproteína E; Niños; Colesterol; Lípidos; Lipoproteínas; Polimorfismos genéticos.

LIPID PROFILE AND Apo E GENOTYPES IN SPANISH CHILDREN BETWEEN 8 AND 15 YEARS OF AGE.

Abstract. Objective: Different studies conclude that apoprotein E (Apo E) is a genetic determinant of lipid levels and cardiovascular risk, although these studies have been carried out principally in adults, with scarce and variable results available in children. The aim of our study was to analyze the association between lipid profile and the different Apo E isoforms (E2, E3 and E4) in a group of Spanish children.

Patients and methods: In a transversal study, apo E genotypes and the lipid profile [total cholesterol (TC), LDL-c, HDL-c, triglycerides

(TG), Apo A1, apo B and Lp(a)] were determined in 191 children (110 boys and 81 girls) between 8 and 15 years of age. Apo E genotyping was performed by means of polymerase chain reaction and subsequent digestion with the restriction enzyme *HhaI*.

Results: The relative frequency for the E3, E4 and E2 alleles were 0.87, 0.09 and 0.04, respectively. Total cholesterol, LDL-c and Apo B serum levels were highest in the group of individual with the genotypes E3/E4 and lowest in the group E2/E3, while E3/E3 individuals had intermediate levels. When analyzed according to gender, we only found statistical significance in the group of girls ($p < 0.004$).

Conclusions: The apo E genotype was significantly associated with lipid differences observed in the childhood population and this is modulated by gender.

Key words: Adolescence. Apolipoprotein E. Child. Cholesterol. Lipids. Lipoproteins. Polymorphism. Genetics.

Introducción

Los niveles séricos de las lipoproteínas están condicionados por factores ambientales (dieta, actividad física, tabaquismo, etc.), así como por condicionantes genéticos que modulan el efecto de dichos factores. La apoproteína E (apo E) juega un importante papel en la regulación del metabolismo lipídico al actuar como ligando para la unión de diversas lipoproteínas a los correspondientes receptores celulares. La apo E está codificada por un gen localizado en el cromosoma 19 (19q13.2), existiendo 3 alelos comunes (e2, e3 y e4), cuya combinación da lugar a 6 posibles genotipos, de los que el más frecuente es el e3/e3 seguido de e3/e4 y e3/e2⁽¹⁻⁴⁾. Diversas publicaciones referidas a individuos adultos, demuestran una asociación entre las distintas isoformas de la apo E y los niveles plasmáticos de colesterol total (CT) y LDL-colesterol⁽⁵⁻⁸⁾, sin embargo, los estudios a este respecto realizados en la población infantil son escasos y con resultados variables en función de la edad y sexo⁽⁹⁻¹¹⁾. El objetivo del presente estudio es analizar, en un grupo de niños y niñas españoles de 8 a 15 años de edad, la posible relación de las distintas isoformas de la apo E con el perfil lipídico de la población estudiada.

Material y métodos

Población de estudio y técnicas utilizadas:

Se ha analizado el genotipo de apo E y el perfil lipídico (CT, LDL-c, HDL-c, triglicéridos -TG-, apoproteína AI -apo AI-, apoproteína B -apo B- y lipoproteína (a) -Lp(a)) en 191 niños (110 niños y 81 niñas), de edades comprendidas entre los 8 y 15 años,

¹Unidad de Nutrición y Riesgo Cardiovascular. Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas. ²Departamento de Biología Molecular. Facultad de Medicina. Universidad de Cantabria. Santander. ³Hospital Central de Asturias. Oviedo. Laboratorio de Pediatría. Unidad de Nutrición y Riesgo Cardiovascular. Facultad de Medicina. Santander.

Proyecto Financiado parcialmente mediante beca de ayuda a la investigación otorgada por Caja Cantabria en la XIV Convocatoria.

Correspondencia: Alberto Bercedo Sanz. Laboratorio de Pediatría. Facultad de Medicina. C/ Cardenal Herrera Oria s/n. 39012. Santander.

Recibido: Noviembre 1997

Aceptado: Abril 1998

Tabla I Perfil lipídico de la población. Comparación de las medias y medianas obtenidas para cada una de las variables lipídicas entre ambos sexos

| mg/dl | Total (Media±DS) (Mediana) | Varones | Mujeres | p* |
|----------|----------------------------------|----------------------|-----------------------|--------|
| TG | 60,18±22,35 55 | 57,34±22,08 50 | 64,04±22,26 63 | 0,0085 |
| CT | 173,41±26,85 173 | 170,24±25,15 171 | 177,72±28,60 175 | 0,0882 |
| HDL-c | 60,12±12,76 59 | 58,91±12,66 57 | 61,76±12,79 62 | 0,1385 |
| LDL-c | 101,25±23,78 99,6 | 99,84±22,38 98 | 103,15±25,57 100,4 | 0,4811 |
| VLDL-c | 12,03±4,47 11 | 11,46±4,41 10 | 12,81±4,45 12,6 | 0,0085 |
| Apo AI | 142,84±24,72 141 | 141,14±24,38 139 | 145,16±25,13 144 | 0,1788 |
| Apo B | 70,61±13,46 69,6 | 69,44±12,51 67,5 | 72,20±14,59 72,204 | 0,1925 |
| Lp (a) | 23,97±23,45 15 | 25,63±24,90 15,25 | 21,71±21,27 14 | 0,4471 |
| CT/HDL | 2,97±0,61 2,9 | 2,98±0,63 2,93 | 2,96±0,59 2,88 | 0,8643 |
| LDL/HDL | 1,76±0,54 1,71 | 1,77±0,55 1,7 | 1,73±0,53 1,71 | 0,7983 |
| Apo B/AI | 0,50±0,12 0,50 | 0,50±0,13 0,49 | 0,51±0,12 0,51 | 0,6035 |

*Se ha utilizado el test de Kruskal-Wallis para el análisis estadístico.

incluidos en el estudio epidemiológico longitudinal español sobre los factores de Riesgo Cardiovascular en la Infancia y Adolescencia (RICARDIN), realizado entre los años 1992-1996. Los niños incluidos en este estudio son residentes en la ciudad de Oviedo, uno de los 10 centros españoles participantes en el estudio, y fueron investigados en el control de seguimiento realizado en 1995. Se excluyeron aquellos niños que en el momento del estudio presentaban patologías agudas o cualquier enfermedad (cardiopatía, nefropatía,...) que pudiera afectar a algunos de los parámetros estudiados.

Tras el consentimiento paterno por escrito, se obtuvieron las muestras de sangre (10 ml en EDTA) mediante venopunción, después de 10-12 horas de ayuno, en los colegios de los niños participantes.

Las determinaciones analíticas en el plasma se realizaron en un autoanализador Hitachi 717. Durante el procesamiento de las muestras se introdujeron los controles internos de calidad correspondientes. Las concentraciones de CT y TG se analizaron por tests enzimáticos colorimétricos⁽¹²⁾. El HDL-c se determinó en el sobrenadante de la centrifugación, tras precipitar las lipoproteínas (quilomicrones -QM-, VLDL y LDL) con

ácido fosfotúngstico e iones de magnesio⁽¹³⁾. Los niveles de apo AI y apo B se determinaron por inmunoturbidimetría^(14,15). La determinación cuantitativa de Lp(a) plasmática fue realizada mediante un inmunoensayo (ELISA) comercial (TintElize Lp(a)). Los niveles de LDL-c fueron calculados mediante la fórmula de Friedewald⁽¹⁶⁾.

El genotipo de la apo E se realizó a partir de DNA extraído de sangre completa⁽¹⁷⁾, mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguida de una digestión de los productos amplificados con la enzima de restricción *HhaI* y electroforesis de los fragmentos digeridos en un gel de poli(acrilamida) al 12%. La PCR se llevó a cabo en un termociclador (Robocycler, Stratagene), realizándose 35 ciclos sucesivos con los siguientes tiempos y temperaturas: desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, hibridación a 60°C durante 50 segundos y una extensión a 70°C durante 2 minutos. Las secuencias de los cebadores usados para la amplificación de la región estudiada del exón 4 del gen de la apoproteína E fueron las siguientes: 5'-TAAGCTTGGCAGCCTGTC-CAAGGA-3' y 5'-ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACAC-3'. El volumen final de la PCR fue de 50 µl con las siguientes condiciones: 500-1.000 ng de DNA genómico, tampón de PCR x1, Cl₂Mg 1,5 mM, cebadores a 0,4 µM (Pharmacia Biotech), dNTPs 200 µM, dimetilsulfóxido (DMSO) 10% (Sigma), y *Taq* DNA polimerasa (GibcoBRL) 3 UI, obteniéndose un producto único de 144 pares de bases (pb). Se realizó una digestión de 25 µl del producto amplificado con 10 UI de la enzima de restricción *HhaI* (Gibco BRL) durante 3 horas a 37°C⁽¹⁸⁾. Los fragmentos de restricción resultantes se separaron mediante una electroforesis vertical en gel de poli(acrilamida) al 12% a 45 mA constantes y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta tras tinción del gel con bromuro de etidio durante 30 minutos.

Análisis estadístico:

La estimación de las frecuencias alélicas se realizó mediante el método de contaje alélico. El test de chi cuadrado para bondad de ajuste, fue usado para comprobar si las frecuencias alélicas observadas estaban de acuerdo con las esperadas según la ley de equilibrio de Hardy-Weimberg.

La desviación en la distribución de las variables lipídicas respecto a la distribución normal se testó mediante la utilización de la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se analizaron los estadísticos descriptivos (media, desviación estándar -DS- y mediana) de las variables determinadas en el estudio, inicialmente de forma global y posteriormente, según los tres diferentes grupos de edades que se establecieron (8-9 años, 11-12 años y 13-15 años) y el sexo. Las concentraciones de los valores lipídicos de cada grupo, de acuerdo al genotipo de apo E y al sexo, fueron comparadas mediante el test de Kruskal-Wallis. Se calcularon los intervalos de confianza (IC) para el 95 % en todos los casos estudiados, considerando que existía significación estadística cuando $p < 0,05$.

Resultados

En la población estudiada, con una edad media semejante en

Tabla II Perfil lipídico y edad. Comparación de los valores lipídicos entre los 3 grupos de edad establecidos

| mg/dl | 8-9 años (Media±DS) (Mediana) | 11-12 años (Media±DS) (Mediana) | 13-15 años (Media±DS) (Mediana) | p* |
|----------|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------|
| TG | 54,66±22,32 50 | 62,13±21,38 60 | 64,13±23,14 60,5 | 0,02 |
| CT | 176,22±27,60 174 | 172,61±22,93 170 | 171,08±32,19 170 | 0,62 |
| HDL-c | 63,51±11,98 64 | 60,42±12,25 58 | 55,02±13,30 52,5 | 0,0006 |
| LDL-c | 101,76±25,26 98 | 99,76±20,23 98 | 103,23±27,7 106,2 | 0,71 |
| VLDL-c | 10,93±4,46 10 | 12,42±4,27 12 | 12,82±4,62 12,1 | 0,02 |
| Apo AI | 148,67±24,34 149,5 | 145,49±22,47 142 | 130,21±25,17 125 | 0,0001 |
| Apo B | 71,60±14,40 71,3 | 69,68±11,95 69 | 70,96±14,86 70,2 | 0,79 |
| Lp (a) | 22,36±20,79 14,25 | 22,12±20,20 16,3 | 29,46±30,85 13,55 | 0,86 |
| CT/HDL | 2,85±0,59 2,82 | 2,94±0,56 2,87 | 3,20±0,66 3,20 | 0,0085 |
| LDL/HDL | 1,66±0,51 1,59 | 1,72±0,50 1,67 | 1,95±0,61 1,88 | 0,02 |
| Apo B/AI | 0,49±0,12 0,48 | 0,49±0,12 0,47 | 0,56±0,13 0,57 | 0,0045 |

*Se ha utilizado el test de Kruskal-Wallis para el análisis estadístico.

el grupo de niños y niñas (11,19 años *versus* 10,98 años), los niveles séricos de las distintas fracciones lipídicas, con la excepción de la Lp(a), mostraban valores más elevados en las niñas que en los niños, siendo este aumento estadísticamente significativo en el caso de los TG y de las VLDL (Tabla I).

Tanto los niveles séricos de TG, como los valores de los cocientes CT/HDL, LDL/HDL y Apo B/Apo AI presentaban una correlación positiva con respecto a la edad. Dicha correlación era negativa en el caso de la fracción HDL y de la Apo AI (Tabla II).

Las frecuencias relativas observadas para los alelos e2, e3 y e4 fueron 0,04, 0,87 y 0,09, respectivamente. Estas frecuencias están de acuerdo con las frecuencias esperadas según la Ley de equilibrio de Hardy-Weinberg⁽⁸⁾, (p=0,42). La distribución de los genotipos de la apo E en la población estudiada fue la siguiente: E2/E3 (7%), E2/E4 (1%), E3/E3 (76%), E3/E4 (15%) y E4/E4 (1%).

La tabla III muestra las medias y medianas de las fracciones lipídicas en relación a los genotipos de la apo E más frecuentemente encontrados. Las concentraciones plasmáticas medias correspondientes al CT, LDL-c y Apo B eran significativamente

más elevadas en el grupo con el genotipo E3/E4, que en los E3/E3, y en estos a su vez eran superiores que en aquéllos cuyo genotipo era E2/E3. Al examinar dicha relación por separado en ambos sexos, se puso de manifiesto que las diferencias referidas en los niveles de CT, LDL-c y Apo B sólo eran significativas en el grupo de las niñas.

Discusión

Las variaciones encontradas en el perfil lipídico de nuestra población en relación con la edad, están de acuerdo con diferentes estudios que indican la existencia de cambios dinámicos en las lipoproteínas séricas durante la maduración sexual antes de que el perfil lipídico del adulto se establezca definitivamente⁽¹⁹⁻²¹⁾. Así, los niveles séricos de HDL-c y apo AI van disminuyendo, mientras que los TG aumentan paulatinamente, desde el grupo de 8-9 años de edad hasta el de 13-15 años. Para el CT y LDL-c aunque no hay diferencias significativas, se observa una tendencia descendente en los niveles de CT.

Al analizar el perfil lipídico separadamente en ambos sexos, hemos observado que, excepto para los niveles de Lp(a), las concentraciones medias de todas las variables lipídicas incluido el colesterol, eran más elevadas en las niñas que en los niños. Esta situación en la que las niñas tienen valores más altos de LDL-c que los niños, se presenta únicamente en el grupo de edades pediátricas^(22,23), ya que en la población adulta las mujeres tienden a tener concentraciones más altas de HDL-c y apo AI, mientras que los varones tienden a tener niveles altos de CT y LDL-c. Para la Lp(a), cuyos niveles tienen un intenso condicionamiento genético⁽²⁴⁾, no encontramos diferencias significativas en relación al sexo y la edad.

En cuanto a la asociación del perfil lipídico con el genotipo de la apo E, varios estudios han demostrado que el alelo e2 se asocia a una disminución de los niveles de CT, LDL-c y apo B en relación al alelo e3, mientras que el efecto observado para el alelo e4 es el opuesto^(9, 25-27). Este hecho se constata también en nuestra población analizada de forma global, donde las concentraciones de CT, LDL-c y Apo B, son más elevadas en el grupo con el genotipo e3/e4 y más bajas en los portadores del e2/e3, ambas con respecto al genotipo más común e3/e3.

La influencia del sexo en el impacto del polimorfismo de la apo E sobre los niveles lipídicos, ha sido investigada en un grupo de niños italianos de 8 a 11 años⁽⁹⁾ y en otro estudio realizado en niños finlandeses de 3 a 18 años⁽²⁵⁻²⁷⁾, evidenciándose en ambos estudios que dicho impacto es mayor en varones que en mujeres. Sin embargo, en una submuestra de 9 a 18 años de edad correspondiente al estudio anterior de niños finlandeses realizado por Lehtimäki y cols., el efecto del fenotipo de apo E sobre el perfil lipídico sólo estaba presente en el sexo femenino, considerando los autores que el resultado pudiera haberse obtenido por el azar⁽²⁸⁾. Estos datos concuerdan con los resultados de nuestra población de 8 a 15 años, donde se demuestra claramente que el efecto del genotipo de la apo E sobre los niveles séricos de colesterol total, LDL-c y apo B, se produce de forma significativa en las niñas y no en los niños.

Tabla III Perfil lipídico y genotipo de apo E. Se han excluido los genotipos menos representados (E4/E4 y E2/E4)

| mg/dl | E2/E3 (Media±DS) (Mediana) | E3/E3 (Media±DS) (Mediana) | E3/E4 (Media±DS) (Mediana) | p* |
|--------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------|
| CT | 158,3±22,6 154 | 172,5±27,6 171 | 183,1±22,3 185 | 0,0035 |
| LDL-c | 83,8±16,6 80,4 | 101,3±24,7 99,6 | 107,2±17,5 104,4 | 0,0018 |
| HDL-c | 60,5±16,6 60 | 59,5±11,9 59 | 63,7±14,2 63 | 0,3842 |
| TG | 70,1±29,5 67 | 58,3±21,2 53 | 61±22,2 57 | 0,258 |
| VLDL | 14,03±5,9 13,4 | 11,6±4,2 10,6 | 12,2±4,4 11,4 | 0,258 |
| Apo AI | 140,1±20,8 144 | 142,01±24,3 141 | 178,1±26,5 148 | 0,4745 |
| Apo B | 59,03±10,6 58,9 | 70,6±13,6 69,9 | 74,8±10,6 72,9 | 0,0004 |
| Lp (a) | 16,37±15,77 8,3 | 23,03±22,64 15 | 31,50±29,56 15,7 | 0,2781 |

*Se ha utilizado el test de Kruskal-Wallis para el análisis estadístico.

Aunque el grado de desarrollo puberal no ha sido investigado en nuestro estudio ni en el de Lehtimäki y cols., teniendo en cuenta la edad de la población estudiada en ambas series, es muy probable que en ambos casos la mayoría de los individuos estudiados hubieran iniciado el desarrollo puberal en el momento del estudio⁽²⁹⁾, lo que diferencia estos dos grupos de población con el estudio de los niños italianos de 8 a 11 años.

En este sentido, el análisis global de los datos de la literatura anteriormente referidos y de los nuestros propios, parece indicar que existe un mayor impacto del genotipo de la apo E sobre el perfil lipídico en los niños prepúberes con respecto a las niñas, invirtiéndose esta situación al llegar a la pubertad. Este hallazgo pudiera estar en relación con alguno de los hechos diferenciales que se producen entre ambos sexos durante la adolescencia, siendo uno de los más destacados el mayor acúmulo de grasa que se produce en las mujeres durante esta etapa. Asimismo, estos resultados son un reflejo más del dinamismo que caracteriza todo el proceso de crecimiento y maduración durante la edad pediátrica, que en este caso se refleja en el perfil lipídico, que a la luz de los resultados obtenidos presenta una gran variabilidad en función de la edad, sexo y desarrollo puberal.

Por otro lado, es importante señalar que las consecuencias e implicaciones de la determinación del genotipo de Apo E son más amplias de las que se derivan por su asociación con el perfil lipídico y con la hiperlipoproteinemia tipo III, dislipidemia en la que más del 90% son homocigóticos para el alelo e2, y que se

caracteriza por una aterosclerosis prematura^(2,4). Así, en los sujetos con enfermedad cardiovascular existe una alta prevalencia del alelo e4^(5,30,31), presentando, además, los portadores de este alelo e4 un aumento del riesgo de muerte por infarto de miocardio y una mayor extensión de las placas de ateromas^(32,33). Todas estas circunstancias refuerzan el interés de la determinación del genotipo de la apo E en la edad pediátrica, para la identificación de aquellos niños con riesgo de desarrollo de enfermedad cardiovascular en la edad adulta, siendo la presencia del alelo e4 un indicador para la puesta en marcha de las medidas preventivas oportunas. La selección de estos niños con historia familiar de riesgo, permitirá someterlos a intervenciones dietéticas específicas, ya que, además, existen respuestas individuales diferentes, siendo los individuos portadores del alelo e4 más sensibles a los cambios dietéticos que los individuos sin este alelo⁽³⁴⁻³⁶⁾.

La necesidad de incorporar en la práctica clínica marcadores genéticos, entre los que se encuentra el genotipo de la apo E, viene avalada por el hecho de que, dependiendo del criterio de riesgo lipídico utilizado en la infancia y adolescencia, los grupos de edad y sexo sobre los que estaría indicada una actuación son diferentes⁽³⁷⁻³⁹⁾. En definitiva, la presencia o ausencia del alelo e4 podría ser un marcador útil de riesgo cardiovascular en etapas presintomáticas, como es la edad infantil.

Bibliografía

- Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988; **240**:622-630.
- Utermann G, Hees M, Steinmetz A. Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinemia in man. *Nature* 1977; **269**:604-607.
- Zannis VI, Just PW, Breslow JL. Human apolipoprotein E isoprotein subclasses are genetically determined. *Am J Hum Genet* 1981; **33**:11-24.
- Rall JR, Mahley RW. The role of apolipoprotein E genetic variants in lipoprotein disorders. *J Intern Med* 1992; **231**:653-659.
- Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; **8**:1-21.
- Boerwinkle E, Utermann G. Simultaneous effects of the apolipoprotein E polymorphism on apolipoprotein E, apolipoprotein B and cholesterol metabolism. *Am J Hum Genet* 1988; **42**:104-112.
- Xhignesse M, Lussier-Cacan S, Sing CF, Kessling AM, Davignon J. Influences of common variants of apolipoprotein E on measures of lipid metabolism in a sample selected for health. *Arterioscler Thromb* 1991; **11**:1100-1110.
- Fiol C, Argimón JM, Hurtado I, Machuca I, Pintó X, Castiñeiras MJ, Gracia V, Llangués E, Jiménez J. Estudio poblacional de la distribución del fenotipo de la apolipoproteína E. *Clin Invest Arteriosclerosis* 1991; **3**:130-134.
- Xu CF, Talmud PJ, Angelico F, Del Ben M, Savill J, Humphries SE. Apolipoprotein E polymorphism and plasma lipid, lipoprotein, and Apolipoprotein levels in Italian children. *Genet Epidemiol* 1991; **8**:389-398.
- Lehtimäki T, Porkka K, Viikari, Ehnholm C, Akerblom HK, Nikkari T. Apolipoprotein E phenotypes and serum lipids in newborns and 3-year-old children: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Pediatrics* 1994; **94**:489-493.

- 11 Lapinleimu H, Viikari J, Rönnemaa T, Välimäki I, Tuominen J, Marniemi J, Ehnholm C, Jokinen E, Simell O. Apolipoprotein E polymorphism and serum lipids in a randomized, prospective trial of an infant diet with reduced saturated fat and cholesterol. *Pediatrics* 1996; **98**:757-762.
- 12 Wahlefeld AW. En H.U. Bergmeyer, ed. *Methods of Enzymatic Analysis*. 2^a English ed. 1974: 1831.
- 13 Lopes-Virella M, Stone P, Ellis S, Colwel JA. Cholesterol determination in high density lipoproteins separated by three different methods. *Clin Chem* 1977; **23**:882-884.
- 14 Marcovina SM, Albers JJ, Henderson LO, Hannon WH. International Federation of Clinical Chemistry standardization project for measurements of apolipoproteins AI and B. (III). Comparability of apolipoprotein AI values by use of international reference material. *Clin Chem* 1993; **39**:773-781.
- 15 Marcovina SM, Albers JJ, Kennedy H, Mei JV, Henderson LO, Hannon WH. International Federation of Clinical Chemistry standardization project for measurements of apolipoproteins AI and B. (IV). Comparability of apolipoprotein B values by use of international reference material. *Clin Chem* 1994; **40**:586-592.
- 16 Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the separative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972; **18**:499-502.
- 17 Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**:1215.
- 18 Hixson JE, Vernier DT. Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res* 1990; **31**:545-548.
- 19 Srinivasan SR, Sundaram GS, Williamson GD, Webber LS, Berenson GS. Serum lipoproteins and endogenous sex hormones in early life: Observations in children with different lipoprotein profiles. *Metabolism* 1985; **34**:861-867.
- 20 Tell GS, Mittelmark MB, Vellar OD. Cholesterol, high density lipoprotein cholesterol and tryglicerides during puberty: The Oslo Youth Study. *Am J Epidemiol* 1985; **122**:750-761.
- 21 Pesonen E, Viikari J, Räsänen L, Moilanen T, Turtinen J, Akerblom HK. Nutritional and genetics contributions to serum cholesterol concentration in a children's follow-up study. *Acta Paediatr* 1994; **83**:378-382.
- 22 Freedman DS, Srinivasan SR, Harsha DW, Webber LS, Berenson GS. Relation of body fat patterning to lipid and lipoprotein concentrations in children and adolescents: The Bogalusa Heart study. *Am J Clin Nutr* 1989; **50**:930-939.
- 23 Reilly SL, Kottke BA, Sing CF. The effects of generation and gender on the joint distributions of lipid and apolipoprotein phenotypes in the population at large. *J Clin Epidemiol* 1990; **43**:921-940.
- 24 Utermann G. The mysteries of lipoprotein (a). *Science* 1989; **246**:904-910.
- 25 Lehtimäki T, Moilanen T, Viikari J, Akerblom HK, Ehnholm C, Rönnemaa T, Marniemi J, Dahlen G, Nikkari T. Apolipoprotein E phenotypes in Finnish youths: a cross-sectional and 6-years follow-up study. *J Lipid Res* 1990; **31**:487-495.
- 26 Srinivasan SR, Ehnholm C, Wattigney WA, Berenson GS. Apolipoprotein E polymorphism and its association with serum lipoprotein concentrations in black versus white children: The Bogalusa Heart Study. *Metabolism* 1993; **42**:381-386.
- 27 Porkka KVK, Taimela S, Kontula K, Lehtimäki T, Aalto-Setälä K, Akerblom HK, Viikari JSA. Variability gene effects of DNA polymorphism at the apo B, apo AI/CIII and apo E loci on serum lipids: The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Clin Genet* 1994; **45**:113-121.
- 28 Lehtimäki T, Moilanen T, Aalto-Setälä K, Kontula K, Porkka K, Akerblom HK, Ehnholm C, Rönnemaa T, Viikari J. Association of apolipoprotein E and B polymorphisms with serum lipids. *Ann Med* 1991; **23**:657-662.
- 29 Lee PA. Disorders of puberty. En: F. Lifshitz, ed. *Pediatric Endocrinology. A clinical guide*. Second edition. Marcel Dekker, New York (USA), 1990: 217-248.
- 30 Eichner JE, Kuller LH, Orchard TJ, Grandits GA, McCallum LM, Ferrell RE, Neaton JD. Relation of apolipoprotein E phenotype to myocardial infarction and mortality from coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1993; **71**:160-165.
- 31 Nieminen MS, Mattila KJ, Aalto-Setälä K, Kuusi T, Kontula K, Ehnholm C, Taskinen MR. Lipoproteins and their genetics variation in subjects with and without angiographically verified coronary artery disease. *Arterioscler Thromb* 1992; **12**:58-69.
- 32 Stengard JH, Zerba KE, Pekkanen J, Ehnholm C, Nissinen A, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism predicts death from coronary heart disease in a longitudinal study of elderly Finnish men. *Circulation* 1995; **91**:265-269.
- 33 Scheer WD, Boudreau DA, Malcom GT, Middaugh JP. Apolipoprotein E and atherosclerosis in Alaska Natives. *Atherosclerosis* 1995; **114**:197-202.
- 34 Tikkanen MJ, Huttunen JK, Ehnholm C, Pietinen P. Apolipoprotein E4 homozygosity predisposes to serum cholesterol elevation during high fat diet. *Arteriosclerosis* 1990; **10**:285-288.
- 35 Mänttari M, Koskinen P, Ehnholm C, Huttunen JK, Manninen V. Apolipoprotein E polymorphism influences the serum cholesterol response to dietary intervention. *Metabolism* 1991; **40**:217-221.
- 36 Miettinen TA, Gylling H, Vanhanen H, Ollus A. Cholesterol absorption, elimination, and synthesis related to LDL kinetics during varying fat intake in men with different apoprotein E phenotypes. *Arterioscler Thromb* 1992; **12**:1044-1052.
- 37 Bercedo A. Estudio del polimorfismo de la apoproteína E y su influencia en el perfil lipídico de una población infantil española (8-15 años). Tesis doctoral, 1997. Universidad de Cantabria.
- 38 Elcarte R, Villa I, Sada J, Gasco M, Oyarzabal M, Sola A, García C, Martínez A, Ferrer M, Fontaneda A. Estudio de Navarra (PECNA). Hiperlipemias IV. Prevalencia de hiperlipemias en la población infanto-juvenil de Navarra. Variaciones según la edad, sexo y Areas Sanitarias. *An Esp Pediatr* 1993; **38**:205-212.
- 39 García Fuentes M, González-Lamuño D, Lozano MJ. Condicionantes genéticos del riesgo cardiovascular. *An Esp Pediatr* 1997; **46**:3-7.