

Lipoproteína Intermedia en el Plasma de Pacientes con Cardiopatía Isquémica

Dres.: HECTOR ENRIQUE MOSSO, REGINA W. DE WIKINSKI,
ANA MARIA PAGLIONE y MARCELO M. MOLLERACH

RESUMEN Y CONCLUSIONES

La lipoproteína intermedia es el producto de la degradación parcial de las lipoproteínas de muy baja densidad.

Tiene una vida media de 6 horas en el plasma, y de su posterior degradación a nivel hepático, se formaría la L.D.L.

Su contenido proteico es proporcionalmente mayor que el de sus precursores, y menor que el de las L.D.L., mientras que su proporción en lípidos varía inversamente.

Su estudio permite conocer el catabolismo plasmático de las lipoproteínas de muy baja densidad.

En el lípido electroforético, posee una movilidad en posición Beta, por lo cual la L.D.L. la enmascara normalmente, haciéndose por ello necesario, la utilización de técnicas específicas para su detección.

El objeto del presente trabajo es investigar la presencia de lipoproteína intermedia (L.P.I.) en pacientes que han sufrido cardiopatía isquémica y en controles normales.

Se seleccionaron 25 adultos normales como control, y 60 pacientes que habían sufrido infarto de miocardio, siendo estudiados desde el punto de vista clínico, humoral, electrocardiográfico y en 14 casos con prueba ergométrica y coronariografía.

Se extrajeron muestras de sangre venosa luego de un ayuno de 14 hs. y se determinaron los valores del lípido electroforético, colesterol y triglicéridos, y la presencia de la lipoproteína intermedia.

Las lipoproteínas fueron separadas electroforéticamente usando gel de agarosa y de poli-acrilamida. La L.P.I. se detectó con el método combinado de electroforesis y posterior precipitación con heparina-Mg, y mediante ultracentrifugación preparativa.

Los resultados obtenidos muestran que la lipoproteína intermedia no se encuentra en las muestras en ayunas de personas normales, estando en cambio presente, en el 75% de los que padecían una cardiopatía isquémica, ya fueran normolipémicos o portadores de hiper-

lipemias de tipo II o IV de la clasificación de Fredrickson.

Este hallazgo significa que el plasma de estos pacientes transporta permanentemente lipoproteínas ricas en colesterol y triglicéridos sin que los sistemas enzimáticos sean capaces de degradarlas y sin que la electroforesis de rutina los detecte.

Esas lipoproteínas no degradadas pueden tener influencia para la penetración del colesterol y de los triglicéridos en la pared arterial, mecanismo que favorece el desarrollo de aterosclerosis coronaria, con todas sus implicancias clínicas y evolutivas.

INTRODUCCION

La aterosclerosis coronaria, ya lo hemos anotado, es la causa más común de cardiopatía isquémica e infarto de miocardio, siendo los lípidos plasmáticos uno de los factores de riesgo conocidos, que interviene en la génesis de tal enfermedad.

Si bien es cierto que aún es desconocida la causa que lleva al acúmulo de lípidos a nivel de la pared arterial, existen indiscutiblemente, tres mecanismos que en forma ineludible, y en distinta proporción contributiva conducen a la instauración del proceso ateromatoso.

a) Filtración de lipoproteínas desde el plasma, especialmente de L.D.L. (Lipoproteínas de baja densidad) y de V.L.D.L. (Lipoproteínas de muy baja densidad), las cuales son ricas en colesterol y triglicéridos respectivamente (1).

b) Almacenamiento de compuestos lipídicos por la pared arterial, ante la incapacidad de degradar o desprenderse de los mismos, por falla enzimática local.

c) Síntesis in situ, que si bien se realiza

en reducidas proporciones, puede estar aumentada (12).

Contrapuestamente al efecto aterogénico de estas dos lipoproteínas, las L.D.L. y las V.L.D.L., como factores de riesgo coronario, en los últimos años se ha enfatizado sobre el papel de las H.D.L. (Lipoproteína de alta densidad), en su calidad de protectoras contra la aterosclerosis coronaria (3). Existen, en efecto, evidencias de que la H.D.L. favorecería la toma de colesterol desde los tejidos periféricos y desde la pared arterial, transportándolo hacia el hígado para su posterior catabolismo y excreción (4).

En esta última década, sin embargo, además de estas tres grandes familias de lipoproteínas, las V.L.D.L., L.D.L. y H.D.L., se ha detectado e identificado por distintos métodos analíticos, la existencia de una lipoproteína, que por ser intermediaria en el proceso degradativo de las V.L.D.L. a L.D.L., ha recibido el nombre de Lipoproteína Intermedia (L.P.I.) (5). Sus posibles implicancias clínicas, respecto a la cardiopatía isquémica, se analizarán en el presente trabajo.

Interesa resaltar que esta L.P.I. es el resultado de la degradación parcial en el plasma, de la V.L.D.L. por acción del sistema de lipoprotein lipasa 1 (6), proceso en el cual esta macromolécula pierde parte de sus lípidos constitutivos. Los triglicéridos son hidrolizados a ácidos grasos no esterificados (A.G.N.E.) y glicerol, y el colesterol libre es transferido a las H.D.L., en las cuales se esterifica por acción de la enzima, lecitín-colesterol-acil-transferasa (L.C.A.T.) de síntesis hepática, siendo en estas condiciones a su vez, devuelto a las L.D.L. y a las propias V.L.D.L. (7) (8).

Esta enzima esterificante (L.C.A.T.), ejerce su acción cuando es activada por la apoproteína A1 (9), (algunos autores opinan sin embargo que en realidad existiría una nueva apoproteína denominada A111, la cual sería la verdadera activadora (10), y por lo tanto al ser este polipéptido parte constitutiva de las H.D.L., la acción enzimática se ejercería en forma preponderante sobre esta fracción lipoproteica.

Las apoproteínas apo C, que primitivamente forman parte de las V.L.D.L., son transferidas a las H.D.L. cuando estas son parcialmente degradadas por acción de la L.P.L. de los endotelios capilares (L.P.L₁), quedando así formada esta lipoproteína L.P.I., la

cual no puede continuar degradándose en el plasma al carecer del péptido activador esencial, la apo C₂. (5) (9).

Esta lipoproteína así formada tiene un rango de densidades entre 1,006 y 1,019 gr/ml, con un Sf de 12 a 20 (11), conserva todo el contenido de apo B, de su predecesora (lo cual la hace proporcionalmente más rica en este polipéptido) y es pobre (o carece) de apo C, pues la ha perdido en el proceso degradativo, como ya ha sido señalado.

Comparativamente con la V.L.D.L., puede decirse entonces que posee un contenido proteico proporcional, mayor que el de esta lipoproteína, mientras que su contenido lipídico ha variado inversamente. La concentración de colesterol ha aumentado con respecto a los otros componentes, y lo ha hecho en parte a expensas de los triglicéridos, que han disminuído considerablemente a través del proceso hidrolítico.

De la degradación posterior de esta nueva lipoproteína L.P.I., se origina la L.D.L., posiblemente por acción sobre ella de la lipoprotein lipasa 2, enzima de origen hepático que no requiere como la L.P.L₁ de heparina para su activación (5). Este proceso catabólico aún necesita de nuevos estudios evaluativos.

Esta segunda etapa, por así llamarla, se efectuaría a nivel hepático produciéndose una toma inicial de la L.P.I., sobre la cual actuarían distintas enzimas hidrolíticas, presentes a nivel de las membranas plasmáticas de las células del hígado, como son la L.P.L₂ (que es una triglicérido hidrolasa), una fosfolipasa A y una colesterol esterasa (12) (5). Es importante señalar que la actividad de estas enzimas hepáticas es independiente de la presencia de Apo C.

En un estudio previo (13) y corroborando el de otros autores (14) se demostró que la L.P.I. se halla ausente en el plasma de personas con ayunos de 12 a 14 horas, habiéndose determinado una vida media de 6 horas en la circulación de sujetos sanos tomados como controles (15).

Contrariamente, la presencia de L.P.I. ha sido verificado, en iguales condiciones de ayuno, en los sueros de pacientes con síndrome nefrótico sin insuficiencia renal. (16).

La identificación de esta lipoproteína puede hacerse por ultracentrifugación, pero también puede ser caracterizada a través de un método sencillo, como es la precipitación post electroforética, con solución de polia-

niones en presencia de cationes bivalentes (17).

Su estudio nos brinda una mayor información respecto al catabolismo de las lipoproteínas de muy baja densidad.

OBJETO

Ante la identificación y aislamiento de esta nueva lipoproteína, la L.P.I., hasta hace pocos años desconocida, hemos efectuado el presente trabajo que tiene por objeto investigar la presencia de L.P.I. en pacientes que sufrían de cardiopatía isquémica (infarto de miocardio), y en controles normales, ya sea normo o hiperlipémicos. Fue así postulado como hipótesis de trabajo, verificar si existe correlación entre la persistencia en el plasma de L.P.I., en ayunas de 12 a 14 horas, y las coronariopatías.

MATERIAL Y METODOS

Los estudios fueron realizados en un conjunto de 85 pacientes divididos en dos grupos:

Grupo A: Constituido por 60 pacientes que habían sufrido infarto de miocardio, de los cuales 48 eran hombres y 12 mujeres. Sus edades estaban comprendidas entre los 37 y 76 años.

Grupo B: Formado por 25 controles normales desde el punto de mira cardiovascular, de los cuales 8 eran hombres y 17 mujeres, con edades entre los 18 y 70 años.

Todos los pacientes fueron estudiados exhaustivamente en el aspecto clínico, humoral y electrocardiográfico, habiéndose comprobado que además de la cardiopatía coronaria, 8 padecían *angor pectoris* residual, 5 arteriopatía periférica y 2 eran diabéticos. En 14 pacientes se realizó la prueba ergométrica y el estudio cineangiográfico.

Los pacientes fueron clasificados desde el punto de vista humoral según el criterio de Fredrickson y col. (18).

En el grupo A encontramos 25 normolipémicos, 17 hiperlipémicos del tipo II a, 6 del tipo II b, y 12 del tipo IV.

En el grupo B encontramos 16 normolipémicos, 8 hiperlipémicos del tipo II a y 1 del tipo II b.

METODOS ANALITICOS

Las muestras de sangre venosa se extrajeron luego de un ayuno de 14 horas y se

determinaron los valores químicos de colesterol total (19), y triglicéridos (20). La separación electroforética de lipoproteínas se efectuó sobre soporte de gel de agarosa (21) y en gel de poliacrilamida (22).

Para la identificación de la L.P.I. se efectuó la técnica de precipitación post electroforética de Seidel y col. (17), es decir la corrida electroforética en gel de agarosa al 1% (en buffer de veronal - veronal sódico) sumergiendo posteriormente la placa en solución precipitante de heparina en concentración del 1,5 g%, cloruro de magnesio 0,1 molar y cloruro de sodio al 10%, visualizándose de esta forma la L.P.I., en posición Beta, es decir en el sitio que ocupa la L.D.I., en una corrida electroforética en las condiciones dadas. En este caso y con esta solución precipitante, las lipoproteínas de baja densidad (rango 1,019 - 1,063), no precipitan, por lo cual de estar presente una fracción precipitada en esta posición beta, se trata de la L.P.I. que como ya se ha mencionado corre con esta movilidad electroforética.

Su posición de corrida electroforética hace necesario que para determinar la presencia o no de esta lipoproteína intermedia, deba recurrirse a un método específico para su caracterización, y no al simple lipidograma, ya que en éste queda enmarcada por la beta L.P.

Para confirmar la presencia real de L.P.I., se efectuó la separación de lipoproteínas, por ultracentrifugación preparativa a 98.000 g durante 16 horas, aislando la fracción de densidad menor de 1,019, con la cual volvió a efectuarse la corrida electroforética, detectándose la presencia de una fracción en posición Beta, lo cual confirmó entonces la presencia virtual de esta fracción intermedia.

En todos los casos las muestras se procesaron dentro de las 48 horas de efectuada la extracción, siendo conservados los sueros durante ese intervalo a 4°C.

RESULTADOS

Grupo A

En la cohorte de 60 pacientes portadores de infarto de miocardio se encontró que la L.P.I. estaba presente en ayunas en 45 casos (75%) y ausente en 15 (25%). La distribución según el lipidograma electroforético fue la siguiente:

Normolipémicos	(25 casos)	L.P.I. presente:	19 casos (76 %)
		L.P.I. ausente:	6 casos (24 %)
Tipo IIa	(17 casos)	L.P.I. presente:	10 casos (58,8 %)
		L.P.I. ausente:	7 casos (41,2 %)
Tipo IIb	(6 casos)	L.P.I. presente:	6 casos (100 %)
		L.P.I. ausente:	0 casos
Tipo IV	(12 casos)	L.P.I. presente:	10 casos (83,3 %)
		L.P.I. ausente:	2 casos (16,6 %)

En 19 (76 % de los coronarios normolipémicos y en 26 (74,28 %) hiperlipémicos, se encontró L.P.I. presente, contra 6 (24 %)

coronarios normolipémicos y 9 (25,71 %) coronarios hiperlipémicos, en que la L.P.I. estaba ausente.

Cuadro N° 1

CARDIOPATIA ISQUEMICA

Fenotipo	Número	L.P.I. (+)	L.P.I. (—)	% pres.	% aus.
N.L.	25	19	6	76	24
IIa	17	10	7	58,8	41,2
IIb	6	6	0	100	0
IV	12	10	2	83,3	16,6
total	60	45	15	75	25

Cuadro N° 2

CARDIOPATIA ISQUEMICA

	L.P.I. (+)	% pres.	L.P.I. (—)	% aus.
Normolipémicos	19	76,0	6	24
Hiperlipémicos	26	74,28	9	25,71
Total	45	75,0	15	25,0

Grupo B

En la cohorte de 25 controles normales se encontró que la L.P.I. estaba presente

en 4 casos (16 %) y ausente en 21 (84 %).

La distribución según el tipo de hiperlipemia fue la siguiente:

Normolipémicos	(16 casos)	L.P.I. presente:	0 casos
		L.P.I. ausente:	16 casos (100 %)
Tipo IIa	(8 casos)	L.P.I. presente:	3 casos (37,5 %)
		L.P.I. ausente:	5 casos (62,5 %)
Tipo IIb	(1 caso)	L.P.I. presente:	1 caso (100 %)
		L.P.I. ausente:	0 caso

Comparando los normolipémicos con los hiperlipémicos resulta que en 16 controles normolipémicos la L.P.I. estaba ausente en todos los casos, mientras que en 9 con-

troles hiperlipémicos la L.P.I. estaba presente en 4 casos, es decir en 44 % de los mismos.

CUADRO N° 3

CONTROLES NORMALES

Fenotipo	Número	L.P.I. (+)	L.P.I. (—)	% pres.	% aus.
N.L.	16	0	16	0	100
IIa	8	3	5	37,5	62,5
IIb	1	1	0	100	0
IV	—	0	—	—	—
total	25	4	21	16	84

CUADRO N° 4

CONTROLES NORMALES

	L.P.I. (+)	% pres.	L.P.I. (—)	% aus.
Normolipémicos	0	0	16	100
Hiperlipémicos	4	44	5	56
Total	4	16	21	84

CUADRO N° 5

RESULTADOS DE LA PRESENCIA Y AUSENCIA DE L. P. I.

	Lipemia	L.P.I. presente	L.P.I. ausente	Totales	Porcentaje
Normales	normal	0	16	16	— (1)
Normales	elevada	4	5	9	44 % (1')
Cardiopatía isquémica	normal	19	6	25	76 % (2)
Cardiopatía isquémica	elevada	26	9	35	74 % (2')
	totales	49	36	85	

Prueba de x^2 con 3 Gr. L. = 29,3 $p < 0,001$
 Prueba de x^2 entre (1) y (1') = 8,35 $p < 0,01$
 Prueba de x^2 entre (2) y (2') = 0,48 No significativa

De la lectura de estos cuadros se desprende en primer lugar la elevada frecuencia con que se encuentra la lipoproteína intermedia en ayunas en el grupo de pacientes portadores de cardiopatía isquémica en relación con el grupo control siendo los porcentajes de 75 y 16 % respectivamente, ($p < 0,001$). Realizado el estudio de significación estadística por el test x^2 según Pearson, resulta que la presencia o no de la L.P.I. puede decirse que está vinculada casualmente a la enfermedad coronaria, pues es altamente improbable ($< 1: 1000$) la posibilidad de que por azar se obtuvieran los mismos resultados. El hallazgo de L.P.I. en un porcentaje estadísticamente significativo de pacientes portadores de cardiopatía isquémica es un hecho que consideramos importante, pues estaría señalando la existencia de una alteración en el mecanismo de degradación de las L.P. de muy baja densidad, que predispondría a padecer dicha enfermedad, con lo que estaríamos entonces en presencia de un nuevo factor de riesgo que deberá ser evaluado en el futuro.

En segundo término se observa que si bien la L.P.I. se encuentra en el 75% de los pacientes portadores de cardiopatía isquémica, no hay una diferencia significativa entre los que tenían lipemia normal (76%) y los que tenían lipemia elevada (74%).

No obstante el hecho sirve para poner de

manifiesto que una cierta proporción de coronarios normolipémicos transportan lipoproteínas no degradadas que pueden tener influencia para la penetración de colesterol y triglicéridos en la pared arterial, aun cuando aparentemente por sus estados de normolipemia, según las técnicas clásicas de estudio de sus lípidos, nada lleve a pensar en una posible alteración de su metabolismo lipoproteico.

En los controles normales la L.P.I. se encuentra presente entre aquellos que tienen lipemia elevada en forma estadísticamente significativa con respecto a aquellos que tienen lipemia normal, aunque el porcentaje es solamente de un 44% de los sujetos con hiperlipemia.

Un tercer hallazgo dentro de los coronarios hiperlipémicos fue encontrar que la lipoproteína intermedia se halla presente, sobre todo, en los tipos IIb (100%) y IV (83,3%). La proporción en el tipo IIa es de menor cuantía (58,8%).

COMENTARIO

En el presente estudio hemos hallado la presencia de L.P.I. en el plasma de una gran mayoría de pacientes portadores de cardiopatía isquémica, cuando fueron estudiados con un ayuno previo de 14 horas. En este mismo trabajo y en otros anteriores (13) se observó que esta lipoproteína

está prácticamente ausente del plasma en sujetos controles bajo iguales condiciones de toma de muestra.

Ya ha sido comentado el mecanismo plasmático a través del cual, las lipoproteínas de muy baja densidad dan lugar a la formación de la lipoproteína intermedia, y también se ha señalado de qué forma ésta puede continuar su proceso catabólico para dar origen después de su paso por el hígado a la L.D.L.

Extensamente ha sido señalado y demostrado también por diversos autores el papel aterogénico de la L.D.L. (23), en virtud de su capacidad de poder filtrar a través de los endotelios capilares, y así depositarse a nivel de la pared arterial, dando posteriormente lugar a la placa ateromatosa. En estos últimos años ha sido comprobado también que las V.L.D.L. podrían filtrar también a través del endotelio, a pesar de su gran tamaño molecular, hecho que ha sido confirmado al detectarse apoproteínas C marcadas, incluídas en la misma pared arterial, después de haberse inyectado como constituyentes de estas lipoproteínas de muy baja densidad (24).

Contrariamente a estos importantísimos aportes en el estudio de esta enfermedad tan generalizada en el mundo occidental como es la aterosclerosis, no hemos encontrado en la literatura a nuestro alcance, publicaciones referentes a la importancia de la L.P.I. con relación a la cardiopatía isquémica o al infarto de miocardio.

El hallazgo de esta L.P.I. en el plasma de estos pacientes en las condiciones de ayuno establecidas, significaría que estas personas transportarían permanentemente lipoproteínas ricas en colesterol (contienen del 29 al 33%) (25) y en triglicéridos (contienen del 35 al 39%) (25), sin que los sistemas enzimáticos del plasma sean capaces de degradarlas, con el agravante riesgo que al ser partículas de menor tamaño que las lipoproteínas de muy baja densidad, muy probablemente puedan filtrar a nivel de los endotelios con mayor facilidad.

Así como en esta última década ha sido señalada la gran importancia que tiene la H.D.L. en pacientes con coronariopatía isquémica, demostrando fehacientemente cómo en personas que padecen esta enfermedad, los niveles de esta lipoproteína son menores que los de una población nor-

mal, es nuestro deseo señalar la importancia que la lipoproteína intermedia de partículas características por su composición y tamaño, puede llegar a tener como factor de riesgo en coronariopatías.

Así pues, al concepto clásico que admite la existencia de una correlación entre el colesterol total, la L.D.L., la V.L.D.L. y los triglicéridos y el riesgo de padecer enfermedad coronaria (26) (27) (28) (29), habría que añadir entonces la detección de la L.P.I. en ayunas y la necesidad de realizar estudios bioquímicos dinámicos para detectar los posibles defectos en la degradación de las lipoproteínas de muy baja densidad, haciendo resaltar que estos pueden ser tan necesarios en pacientes normolipémicos como en hiperlipémicos, pues tanto en unos como en otros, se ha podido identificar esta lipoproteína intermedia, que puede ser considerada a la luz de estos estudios como un nuevo factor de riesgo.

SUMMARY

THE INTERMEDIATE LIPOPROTEIN IN THE PLASMA OF PATIENTS WITH ISCHEMIC CARDIAC DISEASE

The Intermediate lipoprotein (L.P.I.) is the product of the partial degradation of the Very Low Density lipoproteins.

It has a half life of six hours in the plasma and of its later degradation at the hepatic level there would be the formation of Low Density Lipoproteins Its proteic contents is proportionally higher than its precursors and lower than the L.D.L., whereas its proportion in lipids varies inversely.

Its study allows the knowledge of plasmatic catabolism of the V.L.D.L.

In the electrophoretic lipidogram has a mobility in the beta position, whereby the L.D.L. covers it, therefore making it necessary the usage of specific techniques for its detection.

The objet of this paper is to investigate the prescence of L.P.I. in patients who have suffered miocardial infarcts and in normal controls.

Twenty five normal adults were selected as control and sixty patients who had suffered miocardial infarct, haveing studied them from the clinical point of view, humoral, electrocardiographic and in fourteen cases with ergometric and coronariographic tests.

Venous blood samples were extracted after a fourteen hours fast and the electrophoretic lipidogram values were determined, also cholesteol, triglycerides and the presence of intermediate lipoprotein. The lipoproteins were separated electroforetically in agarose and poliacrilamyde gels. The L.P.I. were detected with the combined method of electrophoresis

and later precipitation with Mg-heparine and by means of preparative ultracentrifugation.

The results obtained show that the L.P.I. is not found in the fast samples of normal persons, being present instead in 75 % of those who had ischemic cardiopatic disease whether they be normolipemics or carriers of hyperlipemias of type II or IV of the Fredrickson clasification.

These findings mean that the plasma in these patients permanently transport lipoproteins rich in cholesterol and triclycerides without the enzymatic systems being capable of degradeing them and without rutine electrophoresis being able to detect it.

These proteins not degraded may have influence for the penetration of cholesterol and of the triglycerides in the arterial wall th's mechanism favours the development of coronary arteriosclerosis, with all its clinical implications.

BIBLIOGRAFIA

1. Walton, K.W.; Willamson, N.; J. Atheros. Res., 8: 599, 1968.
2. Krausch D., Hollander W., J. Clin. Invest. 52: 236, 1973.
3. Miller G. J., Miller N. E., The Lancet, 1: 16, 1975.
4. Glomset J. A., J. of Lipid Res. 9: 15, 1968.
5. Eisenberg S., Levy R., Adv. of Lipid Res. 1: 90, 1975.
6. Eisenberg S., Atherosclerosis Review. Vol. 1, Ed. Paoletti and Gotto. Raven Press, N. Y., 1976.
7. Simon J. B., Boyer J. L., Biochim. Biophys. Acta, 218: 549, 1970.
8. Glomset J. A., Janssen E. T., Kennedy et al., J. Lipid. Res. 7: 638, 1966.
9. Levy R., Eisenberg S., Am. Biol. Clin. 32: 1-8, 1974.
10. Kostner A., Scand. J. Clin. Lab. Invest. 33: Sup. 137, 19-21, 1974.
11. Eisenberg S., Rachmilewitz D., Biochim. Biophys. Acta 326: 378, 1973.
12. Stein O., Rachmilewitz D., Sanger L., Eisenberg S., Stein Y., Biochim. Biophys. Acta 360: 391, 1973.
13. Mollerach M., Paglione A. M., Halperin H. K. de, Wikinski R. W. de, 3er. Congreso Argentino de Bioquímica. Bs. Aires, 1975.
14. Fellin R., Agostini B., Rost W., Seidel D., Clin. Chim. Acta, 54: 325, 1974.
15. Eisenberg S., Rachmilewitz D., Biochim. Biophys. Acta 326: 391, 1973.
16. Mollerach M., Paglione A. M., Halperin H. K. de, Wikinski R., Zanetti N., Pizzolatto M., M. Grossman H., Torres S., 43: Triduo Bca. Mar del Plata.
17. Weiland H., Seidel D., Clin. Chem. 9: 1139, 1973.
18. Fredrickson D. S., Levy R., Lees R. S., New Eng. J. Med. 276: 32, 1967.
19. Huang T. C., Chen C. P., Weller V., Raftery A., Anal. Chem. 33:10, 1961.
20. Eggstein M., Klin. Wschr, 44: 267, 1966.
21. Paglione A. M., Banchik M., Mollerach M., Wikinski R. W. de: Técnicas propuestas. 3er. Cong. Arg. de Bioq. Bs. Aires, 1975.
22. Halperin H. K. de, Stoliar A., Grosman H., Wikinski R. W. de: Rev. Asociac. Bioq. Arg. 16: 211, 1974.
23. Dayton A., Fed. Proc. 30: 849, 1971.
24. Hoff H., Heideman C., Circulation 50: Sup. III, 1976.
25. Shore B., Shore V., J. of Atheroscl. Res. 2: 104, 1962.
26. Castelli W., Doyle J. T., Gordon T., Hames C. G., Hjortland M., Hulley S. et al. Circulation 55: 767, 1977.
27. Carlson L. A., Bottinger L. E., The Lancet 1: 365, 1972.
28. Kannel W. B., Castelli W. P., Gordon T. et. al. Ann. Int. Med. 24: 1, 1971.
29. Gordon T., Castelli W. P., Hjortland M. C., Kannel W. B., Dawler T. R., Am. J. of Med. 62: 707, 1977.