

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa de Doctorado 030E:

Bioquímica clínico-médica e inmunología



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

**MARCADORES DE INFLAMACIÓN E INSULINORRESISTENCIA
EN LA HIPERLIPEMIA FAMILIAR COMBINADA**

Tesis Doctoral

Presentada por:

Arturo Carratalá Calvo

Dirigida por:

Prof. Juan F. Ascaso Gimilio

Prof. Guillermo Sáez Tormo

Valencia, 2014

Agradecimientos

A mis directores, los profesores Juan F. Ascaso y Guillermo Sáez, por estimular mi interés por la investigación, compartir conmigo sus conocimientos, recibir su apoyo y generosidad.

A mi compañero Enrique Rodríguez Borja por enseñarme la tecnología multiplex y ayudarme en el tratamiento de los datos.

Al endocrinólogo Sergio Martínez Hervás por facilitarme el reclutamiento de los sujetos a estudio.

A los compañeros del Laboratorio del Hospital Clínico por transmitirme su ilusión por el trabajo bien hecho.

A mi familia por su paciencia y cariño.

A Anabel, Alicia , Celeste, Marina y Vega

ÍNDICE

Listado de abreviaturas utilizadas	9
I. Introducción	11
1. Arteriosclerosis y riesgo cardiovascular	13
1.1. Origen y desarrollo de las lesiones arterioscleróticas	14
1.2. Lipoproteínas de alta densidad y el transporte inverso de colesterol	21
2. Hiperlipidemia familiar combinada	26
2.1. Introducción	26
2.2. Diagnóstico	28
2.3. Etiología	29
2.4. Patogenia	30
2.4.1. Sobreproducción hepática de VLDL	30
2.4.2. Disminución de la actividad de la LPL	31
2.4.3. Alteración de la lipasa hormonosensible (LHS)	31
2.4.4. Alteración de la esterificación de los ácidos grasos en el tejido adiposo	32
2.4.5. Resistencia a la insulina	33
2.4.5.1. Secreción de la insulina	33
2.4.5.2. Acción de la insulina	35
2.4.5.3. Bases moleculares de las acciones de la insulina	36
2.4.5.4. Mecanismos de regulación de la señal de la insulina	40
2.4.5.5. Mecanismos de resistencia a la insulina	41
2.4.5.6. Resistencia a la insulina y ácidos grasos libres	42
2.5. Lipemia postprandial	43
2.6. Inflamación, arteriosclerosis e insulinorresistencia	46
II. Hipótesis, objetivos y aplicación práctica	53
III. Sujetos y métodos	57
3.1. Sujetos	59

3.1.1	Grupo HFC	59
3.1.2.	Grupo control	60
3.2.	Métodos	61
3.2.1	Parámetros antropométricos	61
3.2.2	Parámetros bioquímicos	
3.2.2.1	Determinación del perfil lipídico	61
3.2.2.2	Determinación del perfil de insulinoresistencia	64
3.2.2.3	Determinación de marcadores de inflamación y riesgo aterotrombótico	67
3.2.2.4	Tecnología <i>multiplex</i>	74
3.2.2.5	Determinación de IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- α	79
3.2.2.6	Determinación de PCR de alta sensibilidad	82
3.2.2.7	Determinación de Adiponectina, ICAM, VCAM, MPO, MMP9 y PAI-1	83
3.2.3.	Análisis estadístico	86
IV.	Resultados	87
4.1.	Características demográficas	89
4.2.	Parámetros lipídicos	90
4.3.	Parámetros de insulinoresistencia	94
4.4.	Marcadores de inflamación y riesgo aterotrombótico	98
4.5.	Correlaciones	112
V.	Discusión	119
5.1.	Insulinoresistencia	121
5.2.	Moléculas de adhesión	122
5.3.	Marcadores de inflamación	122
5.4.	Marcadores de riesgo aterotrombótico	123
VI.	Conclusiones	127
VII.	Bibliografía	131
Anexo		149

Listado de abreviaturas utilizadas

ACAT:	acil-coenzima A:colesterol aciltransferasa
ACV:	accidente cerebrovascular
AE:	arteriosclerosis
AGL:	ácidos grasos libres
ASP:	proteína estimuladora de acilación
CEPT:	proteína transportadora de ésteres de colesterol
cHDL:	colesterol HDL
cLDL:	colesterol LDL
CT:	colesterol
cVLDL:	colesterol VLDL
ECV:	enfermedad cardiovascular
eNOS:	sintetasa de óxido nítrico endotelial
EO:	estrés oxidativo
HFC:	hiperlipidemia familiar combinada
IAM:	infarto agudo de miocardio
ICAM:	moléculas de adhesión intercelular
IKK:	inhibidor de $\kappa\beta$ cinasa
IL-1:	interleucina 1
IL-6:	interleucina 6
IL-8:	interleucina 8
IL-10:	interleucina 10
IMC:	índice de masa corporal
IR:	receptor de la insulina
IRS:	sustrato del receptor de la insulina
LCAT:	lecitina:colesterol aciltransferasa
LHS:	lipasa hormonosensible
LPL:	lipoproteinlipasa
LPP:	lipemia postprandial
MCP-1	proteína quimioatrayente de monocitos
MCSF:	factor estimulante de colonias de macrófagos
MMP-9:	metaloproteinasa de matriz 9
MPO:	mieloperoxidasa
NAD(H):	nicotín adenín dinucleótido (reducido)
NF- $\kappa\beta$:	factor nuclear $\kappa\beta$
NO:	óxido nítrico
PAI-1:	inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1
PCRs:	proteína C reactiva de alta sensibilidad
QM:	quilomicrones
RI:	resistencia a la insulina
ROS:	especies reactivas del oxígeno
TG:	triglicéridos
TNF- α :	factor de necrosis tumoral alfa
VCAM:	moléculas de adhesión endotelial

I INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son en la actualidad la primera causa de morbi-mortalidad en el mundo desarrollado. En España supone aproximadamente el 40% de la mortalidad en edad adulta y un coste económico muy importante para toda la sociedad. Su base patogénica es la arteriosclerosis (AE). El riesgo de desarrollar AE y sus consecuencias, en forma de enfermedad cardiovascular, no es uniforme en toda la población y depende de numerosos factores. Las ECV de origen arteriosclerótico son un modelo de patología multifactorial, donde confluyen tanto factores ambientales como genéticos. Uno de los principales factores de riesgo es la dislipemia. Entre las dislipemias primarias destaca, por su alto riesgo cardiovascular y prevalencia, la hiperlipemia familiar combinada (HFC) ^{1,2,3}

1. Arteriosclerosis y riesgo cardiovascular

La AE afecta a las arterias coronarias, aorta, carótidas, cerebrales e incluso las arterias periféricas y se caracteriza por endurecimiento con pérdida de elasticidad de su pared y formación de placas aterosclerosas que estrechan la luz arterial. Comienza ya en las primeras etapas de la vida y progresa de una manera asintomática durante la vida adulta; a partir de la tercera o cuarta década empieza a manifestarse clínicamente. Afecta a todos los sujetos independientemente del sexo y la etnia. La velocidad de progresión y la gravedad de la enfermedad en las diferentes arterias están moduladas por la presencia de ciertos factores de riesgo, como hiperlipemia, hipertensión, diabetes, tabaco, etc ^{4, 5}

En la AE se produce un engrosamiento y endurecimiento de la pared de las arterias debido a la acumulación de material lipídico, tejido fibroso, depósitos de calcio y otros productos en el espacio subendotelial; como consecuencia, se produce una reducción del lumen arterial llegando incluso a disminuir el flujo sanguíneo y provocando episodios isquémicos. La enfermedad arteriosclerótica debe ser considerada clínicamente una única entidad patológica que afecta a diferentes arterias del organismo. Cuando se manifiesta sintomatología clínica en

alguna de las arterias no coronarias el riesgo de sufrir un episodio coronario agudo en el futuro es mucho más elevado.

La enfermedad coronaria y sus complicaciones trombóticas constituyen la mayor causa de mortalidad y morbilidad en las sociedades desarrolladas y las predicciones indican un incremento en la incidencia de esta enfermedad. Las razones más importantes son, por un lado, el envejecimiento de la población en los países desarrollados, con el consiguiente incremento de enfermedades valvulares y fallo cardíaco; mientras que en los países en vías de desarrollo, la aceptación de hábitos que incluyen una mayor ingestión de grasas en la dieta, con el consiguiente impacto sobre la obesidad y la diabetes, así como una vida mucho más sedentaria, mantendrá las enfermedades cardiovasculares como la principal causa de mortalidad y morbilidad en nuestra sociedad ³.

1.1. Origen y desarrollo de las lesiones arterioscleróticas

Estudios anatomopatológicos han demostrado la existencia de lesiones arteriales desde la infancia en la mayoría de los sujetos de los países industrializados. La progresión y disrupción de estas lesiones en ciertas situaciones producen complicaciones aterotrombóticas con una gran morbilidad y mortalidad ^{4,5}

Entre las diferentes teorías postuladas sobre el origen y el desarrollo de la arteriosclerosis, las que han recibido una mayor aceptación son las teorías trombogénica y lipídica. Ambas convergen en un proceso crítico y común como es la disfunción endotelial. Hoy se considera la disfunción endotelial como el primer proceso patológico de la enfermedad arteriosclerótica (figura 1).

El endotelio es la capa monocelular que recubre la superficie luminal del árbol vascular separando la pared de la sangre circulante. Su importancia fisiopatológica está basada tanto en su magnitud –se calcula una superficie endotelial de más de 150 m²– como en la situación geográfica que le permite regular la fluidez luminal de la sangre, la vasorreactividad y permeabilidad de la pared.

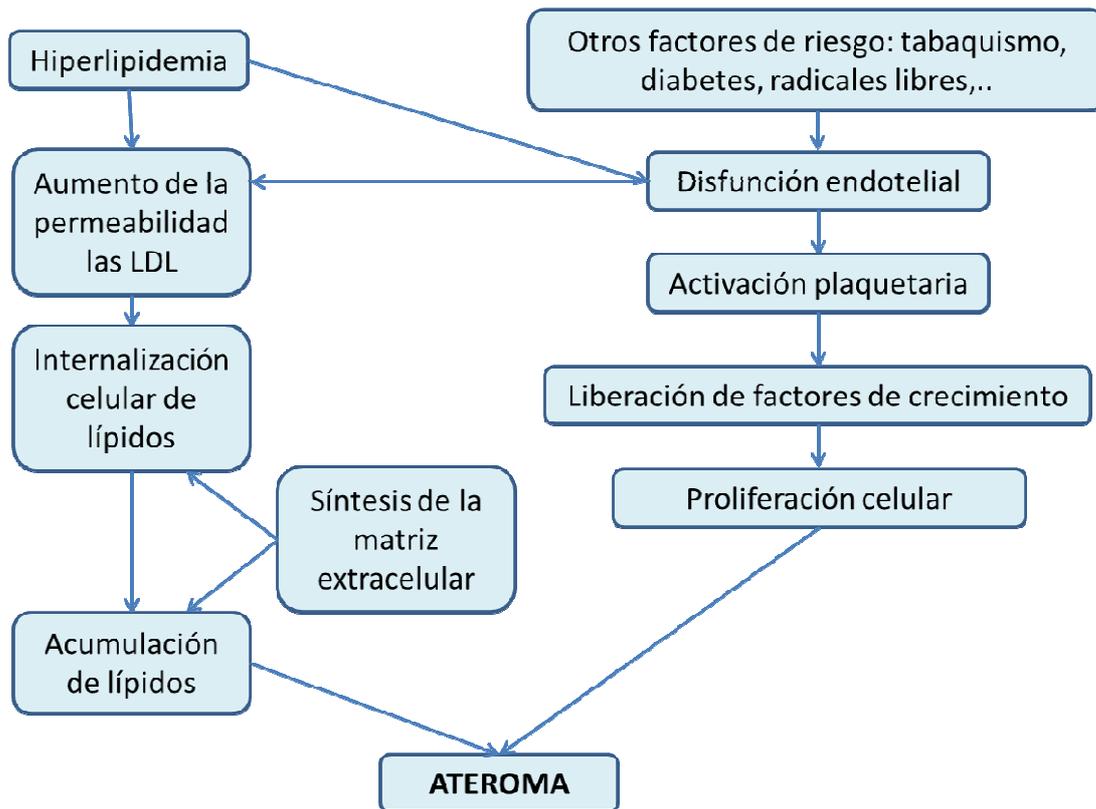


Figura 1. Teoría multifactorial de la arteriosclerosis unificando las teorías lipídica y trombogénica. Tomada de *Fisiopatología de la enfermedad aterotrombótica coronaria*. J.J. Badimon, L. Badimon y V. Fuster. *Clin Invest Arterioscl* 2002;14(5):258-71³

El endotelio está expuesto a tres tipos de fuerzas mecánicas: a) la presión de la fuerza hidráulica de la sangre; b) el estrés circunferencial a consecuencia de la vasoactividad de la pared vascular, y c) las fuerzas de cizalladura (*shear rate*) resultantes de la velocidad de la sangre y el radio vascular. La fuerza de cizalladura es la que desempeña un papel más importante porque estimula la liberación de agentes vasoactivos e induce cambios en la expresión de diferentes genes, metabolismo celular e incluso en la morfología de las células endoteliales⁶,⁷. La correlación existente entre la disfunción endotelial y las áreas de baja cizalladura está ilustrada por la elevada incidencia de lesiones arterioscleróticas en las áreas de curvatura o puntos de bifurcación del sistema arterial^{8,7} (figura 2).

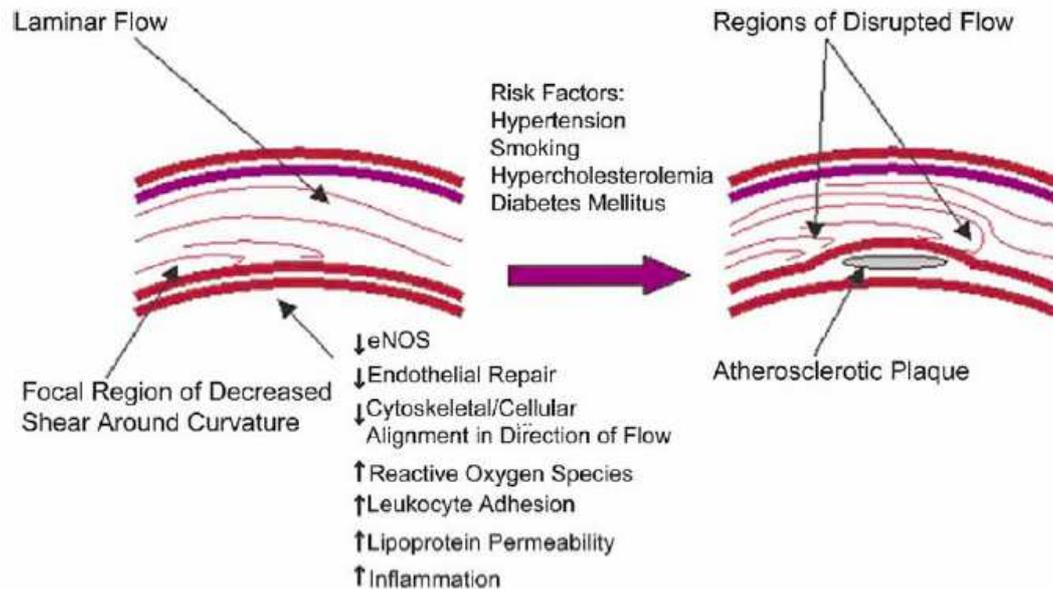


Figura 2. Efecto de la fuerza de cizalladura sobre el endotelio. Tomada de *The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis* Kristopher S Cunningham and Avrum I Gotlieb Laboratory Investigation (2005) 85, 9–23⁹

El endotelio es fuente y diana para una serie de agentes vasoactivos. Estos agentes liberados por las células endoteliales son capaces de desarrollar sus actividades endocrinas y paracrinas, no únicamente sobre el endotelio sino también sobre las células musculares lisas vecinas. Las células endoteliales sanas, al interactuar con los agonistas adecuados, generan una serie de procesos citosólicos que activan la enzima óxido nítrico sintetasa, responsable de la síntesis y liberación de óxido nítrico (NO, también conocido como factor relajante derivado del endotelio, EDRF). Este agente tiene un claro efecto vasodilatador, antitrombótico, antiproliferativo, antiapoptótico y antiinflamatorio. El endotelio sano es capaz de desarrollar su actividad protectora frente a la enfermedad arteriosclerótica a través de los múltiples procesos regulados por el óxido nítrico (NO)³ (figura 3).

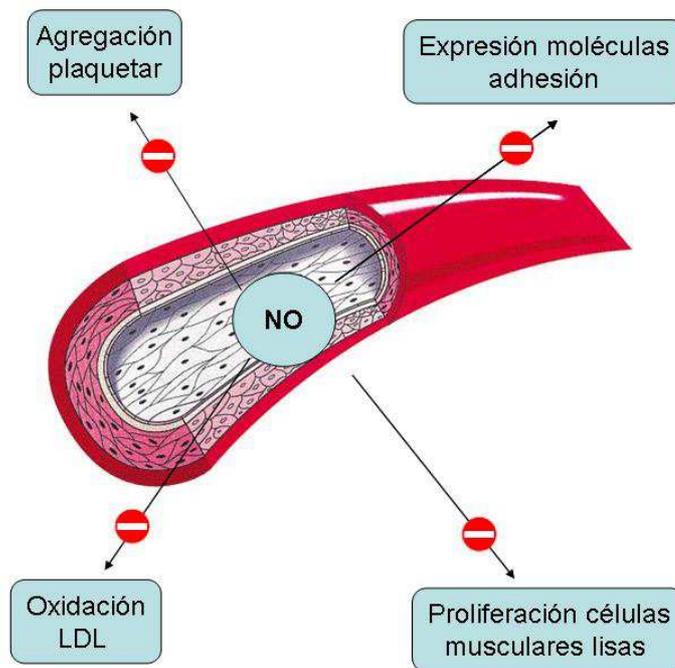


Figura 3. Esquema de los procesos regulados por un endotelio sano mediante la liberación de NO sobre un *background* de un cultivo de células endoteliales humanas. La célula endotelial sana reacciona frente a sus agonistas activando la NO-sintasa con el consiguiente incremento en la síntesis y liberación de NO. En presencia de un endotelio disfuncional, existe una inhibición de la liberación del NO y de los efectos antiaterogénicos mediados por éste. *Adaptada de Fisiopatología de la enfermedad aterotrombótica coronaria. J.J. Badimon, L. Badimon y V. Fuster. Clin Invest Arterioscl 2002;14(5):258-71*³

La activación de las células endoteliales induce una disminución en la síntesis de NO generándose un ambiente proarteriosclerótico que facilita la formación y el desarrollo de lesiones arterioscleróticas. El endotelio regula una serie de procesos bioquímicos y moleculares, como son la permeabilidad vascular a las lipoproteínas plasmáticas, expresión de moléculas de adhesión, reclutamiento de monocitos, liberación de agentes con actividad pro y antitrombótica, factores de crecimiento y sustancias vasoactivas^{10, 11}. De ahí la importancia capital que tiene la disfunción endotelial en varios procesos patológicos, como aterosclerosis, trombosis, etc. Estas evidencias han supuesto un desvío de la hipótesis inicial (*response-to-injury*) que requería la existencia de una lesión endotelial como la primera evidencia de la enfermedad aterotrombótica. Hoy sabemos que una simple disfunción de la actividad endotelial es suficiente para desencadenar los procesos proateroscleróticos. La importancia de la disfunción endotelial está claramente ilustrada por la relación

directa existente entre los factores de riesgo cardiovascular (tabaco, hiperlipidemia, hipertensión, obesidad, diabetes, inflamación, etc.) y la disfunción endotelial (figura 4). Mucho más importante es la observación de que el tratamiento efectivo de estos factores de riesgo conlleva una normalización de la actividad endotelial.

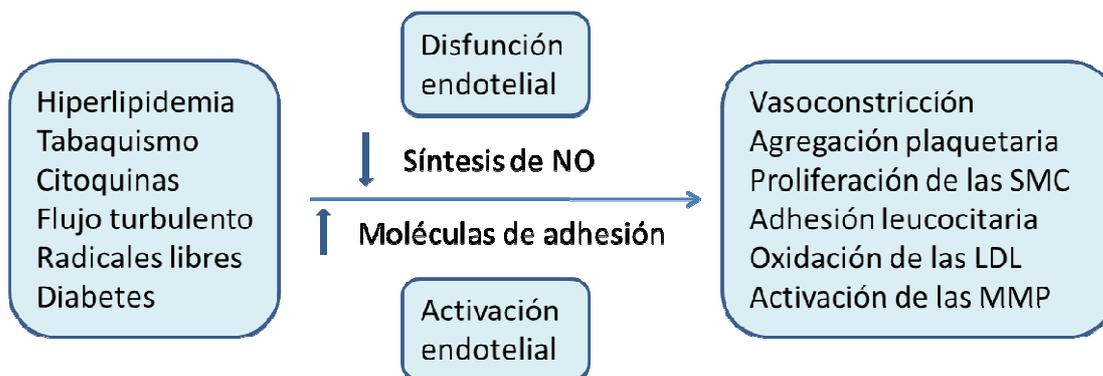


Figura 4. Factores de riesgo cardiovascular y disfunción endotelial. La presencia de los factores de riesgo cardiovascular induce la activación y la disfunción del endotelio. Esta activación está caracterizada por la reducción de la síntesis de NO y un incremento en la expresión de proteínas adhesivas, facilitando de esta manera el proceso de aterogénesis. . Tomada de *Fisiopatología de la enfermedad aterotrombótica coronaria*. J.J. Badimon, L. Badimon y V. Fuster. *Clin Invest Arterioscl* 2002;14(5):258-71³

Las zonas de baja fuerza de cizalladura del árbol vascular son más propensas a desarrollar lesiones arterioscleróticas. Estas zonas presentan una permeabilidad incrementada a las proteínas y células plasmáticas. Entre las diferentes lipoproteínas plasmáticas, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) son las que van a desarrollar un papel más importante en el proceso aterogénico. La acumulación de las LDL en el espacio subendotelial es una consecuencia de la interacción entre la apoproteína-B100 y los glucosaminoglicanos de la pared arterial¹². Estas LDL son transformadas o modificadas en el espacio subendotelial mediante lipólisis, agregación u oxidación a través de los radicales libres. Estas lipoproteínas “modificadas” inician una reacción inflamatoria facilitando el reclutamiento e internalización del sistema monocito/linfocito¹³. Esto llevó a postular que la enfermedad arteriosclerótica podría ser considerada como un proceso crónico inflamatorio^{14, 15}. La activación de las células endoteliales está asociada a la expresión de unas proteínas adhesivas de la superfamilia de las selectinas (L-selectina y P-selectina). Estas proteínas se unen a los ligandos (carbohidratos) de la superficie de los leucocitos y estimulan la marginación de los

monocitos circulantes desde el torrente sanguíneo hacia la superficie endotelial donde se van a adherir. La transcripción de la expresión de estas proteínas adhesivas está regulada por el factor nuclear NF- κ B^{16, 17}. La expresión de las selectinas va seguida de la expresión de las proteínas adhesivas de la familia de las ELAM (moléculas de adhesión endotelio-leucocito; ICAM y VCAM). Estas proteínas facilitan la internalización de los monocitos/linfocitos adheridos en la pared vascular. El papel de estas proteínas en la aterogénesis se ha podido demostrar en estudios de aterosclerosis experimental en modelos de ratones transgénicos deficientes en estas proteínas adhesivas. La supresión de P y E-selectinas, ICAM o MCP-1 ha demostrado una cierta protección frente al desarrollo de arteriosclerosis experimental en ratones transgénicos^{18, 19}. Se ha asociado valores elevados de estas proteínas con una incidencia mayor de episodios cardiovasculares isquémicos^{20, 21}. Una vez formada la lesión arterial inicial, si los factores de riesgo cardiovasculares (tabaco, hiperlipidemia, diabetes, etc.) responsables de la formación de esta lesión inicial están todavía presentes, se forma un círculo vicioso que acaba por perpetuar estos procesos aterogénicos ya descritos. Los macrófagos y linfocitos activados liberan enzimas hidrolíticas, citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento que van a producir el engrosamiento de la lesión vascular. El engrosamiento de la pared se verá acelerado por la síntesis incrementada de componentes de la matriz extracelular (colágeno, elastina, etc.). La acumulación intracelular de material lipídico en macrófagos o células musculares lisas llega a un nivel en que el efecto citotóxico sobrepasa la capacidad de almacenamiento, produciendo la muerte celular, zonas de necrosis celular y depósitos lipídicos extracelulares característicos de lesiones más avanzadas. Si bien las arterias son capaces de dilatarse para compensar este engrosamiento inicial de la pared, llega un momento en que este proceso sobrepasa el remodelado vascular afectando el lumen arterial²².

La transformación de las LDL acumuladas en el espacio subendotelial es un estímulo inflamatorio muy importante para el endotelio y las células musculares lisas de la media, no únicamente a través de los radicales libres sino mediante la acción de otras enzimas también presentes en la pared arterial arteriosclerótica (mieloperoxidasas, fosfolipasas, etc.) o a través de la glicosilación, como en el caso de la diabetes^{23, 24, 25}. Estas LDL transformadas, además de inducir la expresión de VCAM, ICAM y E-selectina a través del factor nuclear de

transcripción NF- κ B, también activan la transcripción de genes responsables de la síntesis de agentes quimiotácticos, como MCP-1 y MCSF. El factor NF- κ B también incrementa la síntesis y la liberación de las citoquinas IL-1, IL-2 y IL-6, que a su vez activan las células inflamatorias perpetuando el proceso de acumulación celular en el espacio subendotelial¹⁷.

Los monocitos/macrófagos de la pared se transforman en macrófagos espumosos cuando incrementan su contenido lipídico al fagocitar las LDL oxidadas acumuladas en la pared arterial. Estas células espumosas son el componente celular más importante de las estrías grasas^{26, 27} (figura 5).

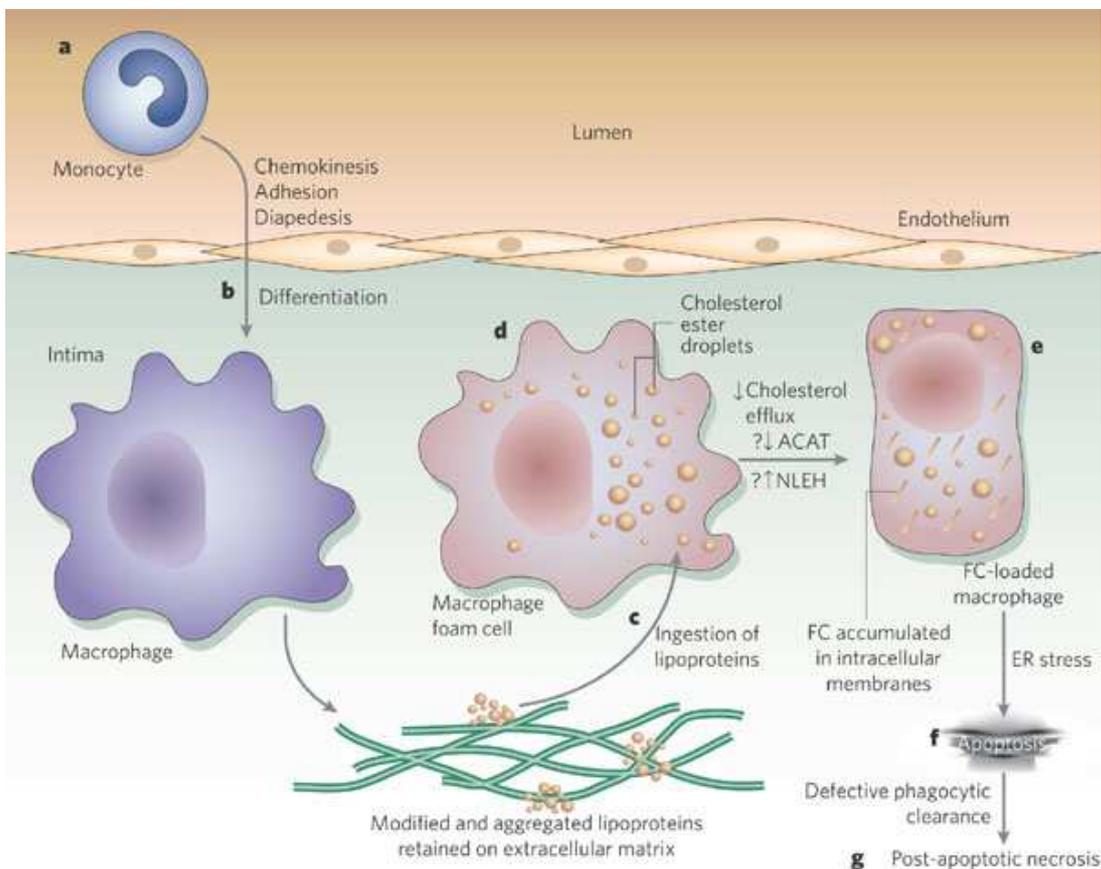


Figura 5. **a**, Los monocitos son atraídos hacia áreas focalizadas de la pared arterial en las que han sido retenidas lipoproteínas aterogénicas en la matriz extracelular. Estas lipoproteínas retenidas, particularmente aquellos fosfolípidos modificados por oxidación, inducen al endotelio a expresar quimioquinas y moléculas de adhesión. **b**, Los monocitos migran a través del endotelio y se transforman en macrófagos. **c**, Los macrófagos ingieren las lipoproteínas retenidas por endocitosis y fagocitosis cargándose de colesterol derivado de las lipoproteínas. **d**, Al comienzo de las lesiones, el colesterol se almacena en forma de ésteres producidos por la enzima ACAT, dando a la célula el aspecto de célula espumosa. **e**, Conforme avanzan las lesiones, el colesterol no esterificado se acumula provocando la apoptosis de macrófago (**f**) y necrosis (**g**). Tomada de *Role of cholesterol and lipid organization in disease*. Frederick R. Maxfield and Ira Tabas, *Nature* 438, 612-621 (1 December 2005)²⁸

Las células espumosas liberan agentes quimiotácticos que van a activar las células musculares lisas de la capa media. Estas células musculares lisas activadas migran hacia la íntima, atravesando la lámina elástica interna, sufriendo un cambio en su fenotipo. Estas células, que eran responsables de la vasoactividad arterial, al atravesar la media se transforman en “sintéticas” y son las responsables de la síntesis de los componentes de la matriz extracelular (colágenos, elastina, etc.) que van a fomentar el engrosamiento de la íntima reduciendo el lumen arterial ³.

El proceso de internalización celular del material lipídico tiene lugar a través de dos mecanismos, uno de ellos es mediado por el receptor clásico de las LDL descrito por Goldstein et al ²⁹. Este mecanismo es regulable por los valores de colesterol intracelular. El otro mecanismo no es regulable y es mediado por los receptores *scavengers* (SR-A y CD-36).

El papel de este mecanismo ha sido demostrado por estudios con animales transgénicos deficientes de estos receptores; estos animales poseen una resistencia a la inducción de lesiones arterioscleróticas ³⁰.

El problema de los mecanismos no regulables es que, en tanto y en cuanto las células estén en un medio rico en material lipídico, continuarán internalizándolo, independientemente del contenido lipídico intracelular. El contenido de colesterol intracelular tiene un efecto regulador a la baja sobre los receptores clásicos de las LDL. El colesterol libre intracelular es esterificado a través de la acción de la enzima ACAT. Los ésteres de colesterol son menos citotóxicos y bioquímicamente más estables. La imposibilidad de regular la internalización conlleva una acumulación desmesurada de material lipídico intracelular que puede llegar a producir la muerte de la célula, debido a estímulos inflamatorios o a procesos apoptóticos ³¹.

1.2. Lipoproteínas de alta densidad y el transporte inverso de colesterol

Las HDL desempeñan un papel decisivo en el transporte inverso del colesterol y constituyen el mecanismo fisiológico protector frente a una acumulación excesiva de material lipídico. Como los mamíferos sólo pueden metabolizar el colesterol en el hígado, se requiere un mecanismo de transporte del colesterol acumulado en los tejidos extrahepáticos hasta el hígado para su metabolismo y eliminación. El depósito de lípidos en la pared vascular es

consecuencia de un desequilibrio entre los procesos de entrada y salida de colesterol en la pared arterial. El mecanismo de entrada de lípidos en la pared arterial está directamente relacionado con los valores de LDL, mientras que el transporte desde la pared hacia el hígado, es dependiente de los valores de HDL. Por ello, la acumulación de material lipídico en la pared arterial podría producirse tanto por un transporte excesivo hacia la pared (valores elevados de LDL) como por una remoción disminuida (valores reducidos de HDL) (figura 6) ³².

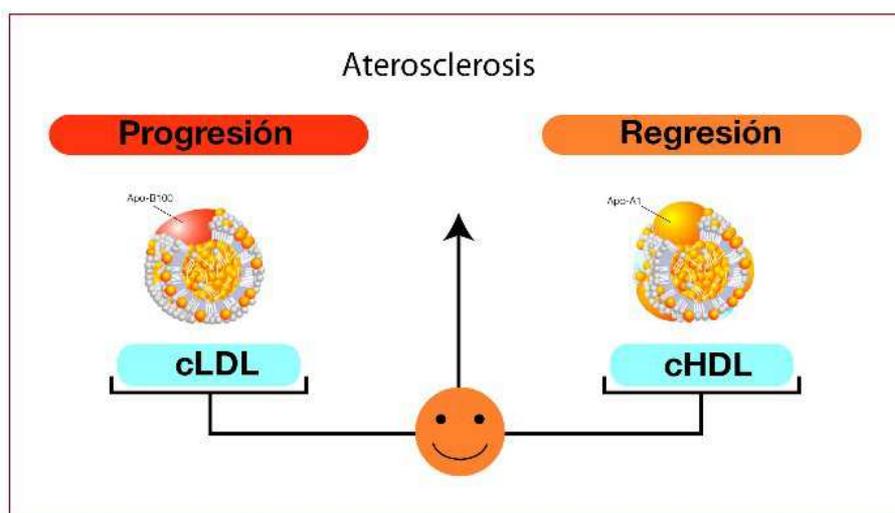


Figura 6. Esquema del impacto del equilibrio entre los mecanismos de entrada y salida de colesterol a los tejidos extrahepáticos sobre la progresión de la enfermedad arteriosclerótica. Una reducción de las HDL o un incremento en las LDL provocará la progresión de la arteriosclerosis; por otro lado, la reducción de los valores de LDL o un incremento en las HDL facilitarían la inhibición de la progresión o incluso la posible regresión de las lesiones arteriales. *Tomada de Badimón JJ, Santos-Gallego CG y Badimón L. Importance of HDL cholesterol in atherothrombosis: how did we get here? Where are we going?. Rev Esp Cardiol. 2010 Jun;63 Suppl 2:20-35* ³²

El papel protector frente a la enfermedad arteriosclerótica de unos valores incrementados de HDL se ha demostrado de forma experimental y en estudios de población, tanto epidemiológicos como de intervención. La hipótesis inicial del efecto antiaterogénico de las HDL fue postulada por Glomset ³³. Posteriormente, fue corroborada en estudios con conejos ateroscleróticos, donde la administración de HDL homólogas no sólo inhibió la progresión sino que incluso facilitó la regresión de lesiones aórticas previamente establecidas ^{34, 35}.

Estas observaciones han sido posteriormente confirmadas con modelos experimentales transgénicos, donde la expresión incrementada de apo A-I fue asociada con una resistencia a la aterosclerosis inducida por dietas aterogénicas en ratones y conejos ^{36, 37}.

Los estudios epidemiológicos de observación proporcionaron las primeras evidencias en humanos. Un meta-análisis de cuatro estudios prospectivos (Framingham Heart Study, Lipid Research Clinic [LRC], Prevalence Mortality Follow-up Study, Coronary Primary Prevention Trial Control Group, y Multiple Risk Factor Intervention Trial Control Group) demostró que por cada 1 mg/dL de incremento en la cifra de cHDL existía una reducción del 2 al 3% en el riesgo coronario en varones y mujeres, respectivamente ³⁸. Esta correlación era independiente de la presencia concomitante de otros factores de riesgo cardiovascular como edad, obesidad, cLDL, tabaco, etc. Evidencias similares se obtuvieron en un gran número de estudios posteriores, como el PROCAM y el Texas/AFCAPS ^{39, 40}.

Las evidencias epidemiológicas promovieron estudios de intervención. El primero fue el Helsinki Heart Study (HHS). Este estudio de prevención primaria, aleatorizado, incluyó a más de 4.000 varones hiperlipémicos que fueron aleatorizados entre placebo y gemfibrozilo ⁴¹. La administración de gemfibrozilo redujo en un 34% el riesgo de enfermedad cardíaca coronaria. Un análisis de regresión multifactorial demostró que el efecto beneficioso era debido al 11% de incremento en las HDL, así como al 11% de reducción en las LDL ⁴². Un estudio similar, pero en prevención secundaria, fue el Veterans Administration HDL Intervention Trial (VA-HIT). Este estudio aleatorizó a pacientes con enfermedad cardíaca coronaria entre gemfibrozilo y placebo. Los valores de HDL se incrementaron un 6% durante el tratamiento con reducciones de un 4% en el colesterol total y un 31% en los triglicéridos, sin cambios en los valores de LDL.

Entre los diferentes mecanismos de acción postulados para explicar el efecto antiaterogénico de las HDL, cuatro son los generalmente aceptados: a) transporte inverso de colesterol; b) efecto antioxidante mediado a través de la paraoxonasa en la inhibición de la oxidación de las LDL; c) reducción de los valores de expresión de las moléculas de adhesión vasculares (selectinas, ICAM, VCAM, etc.) que facilitan la adhesión de los monocitos circulantes a la pared arterial, y d) un incremento de la capacidad fibrinolítica endógena. De todos ellos, el mecanismo más aceptado parece ser el transporte inverso de colesterol.

Aunque todas las células nucleadas del organismo sintetizan colesterol, solo los hepatocitos y enterocitos lo excretan eficazmente por la bilis o en el interior del intestino. En el hígado, directamente o después de ser transformado

en ácidos biliares. Las partículas de HDL nacientes se sintetizan en el intestino y en el hígado. La apo A-1 recién secretada adquiere rápidamente fosfolípidos y colesterol no esterificado a través de la salida estimulada por la proteína A1 del transportador de secuencias de unión a ATP (ATP-binding cassette protein A1, ABCA1) a las proteínas de membrana. Este fenómeno hace que se formen partículas de HDL discoides que reclutan colesterol no esterificado adicional desde la periferia. El colesterol es esterificado dentro de la partícula de HDL por la enzima lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) y el éster de colesterol, más hidrófobo, se desplaza al interior de la molécula (figura 7).

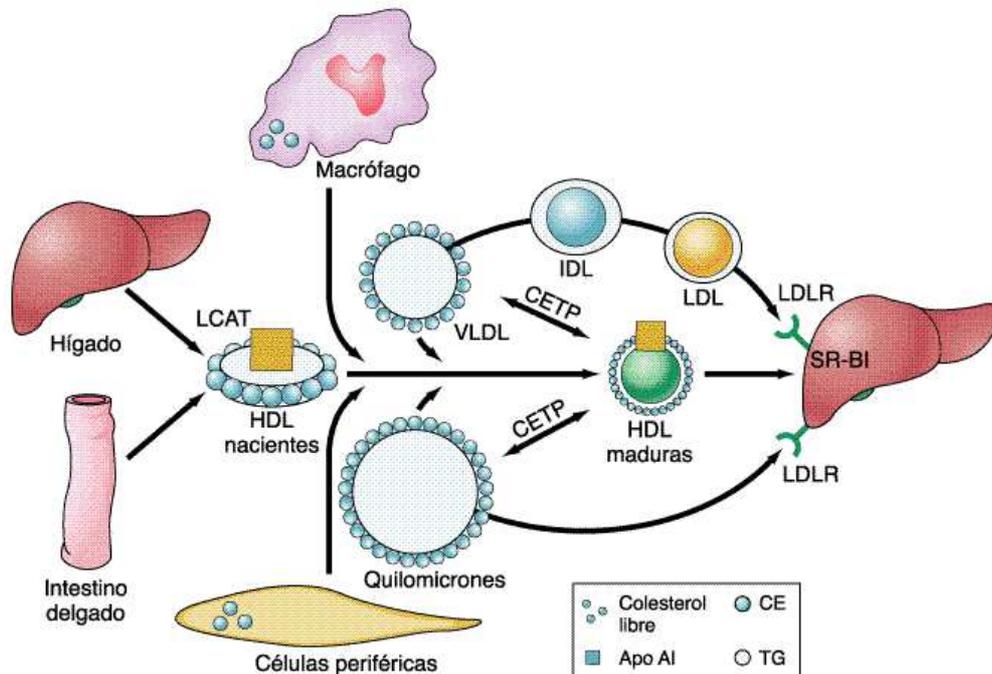


Figura 7. Metabolismo de las HDL y transporte inverso del colesterol. Esta vía transporta el exceso de colesterol desde la periferia al hígado para su excreción en la bilis. El hígado y el intestino producen HDL nacientes. El colesterol libre es adquirido por macrófagos y otras células periféricas y esterificado por LCAT, formando HDL madura. El colesterol unido a HDL puede ser captado selectivamente por el hígado a través de SR-B1. Como alternativa, el éster de colesterol de HDL puede ser transferido por CETP desde las HDL hasta las VLDL y los quilomicrones, que luego pueden ser captados por el hígado. LCAT, de lecitina-colesterol aciltransferasa; CETP, proteína de transferencia de ésteres de colesterol; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; IDL, lipoproteínas de densidad intermedia; LDL, lipoproteínas de baja densidad; HDL, lipoproteínas de alta densidad; LDLR, receptor de lipoproteína de baja densidad; TG, triglicéridos. *Tomada de Arder DJ y Hobbs HH. Trastornos del metabolismo de las lipoproteínas. En: Harrison. Principios de Medicina Interna, 18ª ed*⁴³

Conforme las HDL adquieren más ésteres de colesterol, se vuelven esféricas y reciben lípidos adicionales procedentes de la superficie de quilomicrones y VLDL durante la lipólisis. El colesterol de las HDL es transportado al hígado por una vía directa y otra indirecta. Directamente cuando es captado por

el hepatocito mediante los receptores depuradores BI (scavenger receptor class BI, SR-BI), un receptor de la superficie celular que media el transporte selectivo de lípidos hacia las células e, indirectamente, intercambiando ésteres de colesterol por triglicéridos a lipoproteínas que contienen apo B100 por la acción de la proteína transportadora de ésteres del colesterol (CETP). Los ésteres de colesterol finalmente son retirados de la circulación por endocitosis mediada por los receptores de las LDL ⁴³.

Las líneas maestras del National Cholesterol Education Program (NCEP) americano ⁴⁴, han remarcado la importancia de los valores de cHDL al recomendar la inclusión de un análisis fraccionado lipoproteínico con el primer análisis del perfil lipídico. También recomienda que los valores de cHDL reducidos (< 40 mg/dL) deben de ser considerados como un factor de riesgo importante y deben ser objeto de intervención, ya sea por cambios en el estilo de vida (dieta y ejercicio) o incluso de forma farmacológica.

2. Hiperlipidemia familiar combinada

2.1. Introducción

La denominación hiperlipidemia familiar combinada fue empleada por Joseph Goldstein et al ^{45, 46, 47} por primera vez en 1973 en la Universidad de Washington para hacer referencia a un nuevo trastorno hereditario de los lípidos, apreciado en sujetos jóvenes que habían sobrevivido a un infarto agudo de miocardio (IAM) y caracterizado por la presencia de múltiples fenotipos lipoproteicos. Se observó que éstos y sus familiares afectados podían presentar elevaciones de los triglicéridos, del colesterol total, o de ambos, reflejando incrementos plasmáticos de las VLDL o fenotipo IV, de las LDL o fenotipo IIA, o de ambas, respectivamente o fenotipo IIB. Se trataba de 500 casos, hombres de menos de 40 años y mujeres menores de 50 años la mayoría. Eran hiperlipémicos el 31%, presentando fenotipos IV el 15,6%, fenotipo IIB el 7,8% y fenotipo IIA el 7,6%. Entre los hipertriglicéridémicos (fenotipo IIB y IV) era más prevalente la hipertensión arterial, la obesidad y la diabetes. Paralelamente, fueron descritas familias similares por Esko Nikkila en Helsinki ⁴⁸ y por Herbert Rose en Nueva York ⁴⁹.

A continuación observaron que los familiares de los 176 sujetos supervivientes con hiperlipemia presentaban cinco alteraciones lipídicas distintas. Tres de ellas fueron consideradas trastornos monogénicos autosómicos dominantes por el patrón de transmisión. Una era la hipercolesterolemia familiar (sujeto índice y los familiares afectados presentaban constantemente un fenotipo IIA), otra la hipertriglicéridemia familiar (donde el probando y los familiares afectados tenían un fenotipo IV) y una nueva entidad que denominaron hiperlipidemia familiar combinada (HFC). En esta última hiperlipemia variaba el fenotipo lipoproteico de los familiares afectados, que podía ser IIA, IIB y IV, con menor frecuencia presentaban un fenotipo V.

Los valores de triglicéridemia de todos los familiares mostraba una distribución bimodal, que diferenciaba claramente entre los afectados y no afectados. En cambio, la distribución de los valores de colesterolemia era unimodal. Estos hallazgos, y los patrones de afectación familiar (prevalencia de 45-55% en familiares de primer grado y 20-30% en los de segundo grado), hacían

a esta hiperlipemia compatible con un trastorno monogénico, autosómico dominante con expresión variable ⁴⁶.

En el grupo estudiado por Nikkila et al ⁴⁸, en Finlandia, encontraron al mismo tiempo, en los familiares de 101 pacientes supervivientes a un IAM precoz, hiperlipoproteinemia familiar preferentemente, de fenotipo lipoproteico múltiple y variable dentro de la misma familia incluso. La mitad de sus integrantes eran hiperlipémicos a partes iguales entre los fenotipos IIA, IIB y IV. Los valores plasmáticos de triglicéridos de todos los familiares no mostraban una diferencia clara entre afectados y no afectados; la distribución de los valores de colesterol era también unimodal. Esta discordancia les hizo desestimar, como mecanismo de transmisión genética, la herencia autosómica dominante, e inclinarse a que el trastorno fuera debido a una expresión polimórfica de varios fenotipos.

En las familias con fenotipo variable estudiadas por Rose et al ⁴⁹ se encontró mayor prevalencia de intolerancia a la glucosa, obesidad e hiperuricemia.

Se han hecho múltiples intentos de caracterizar y definir la enfermedad. La HFC es una enfermedad muy frecuente, con una prevalencia estimada del 1-3% en la población general y hasta del 20% en pacientes con cardiopatía isquémica precoz ⁵⁰. La más común de las hiperlipemias familiares, con una prevalencia en la población con hiperlipemia primaria del 15% ^{51, 52}. Se comienza a presentar a partir de los 20 años aunque de forma muy variable. Se caracteriza por presentar varios fenotipos lipoproteicos en la misma familia, e incluso en el mismo individuo, a lo largo de su evolución, generalmente por cambios en los factores exógenos (dieta, ejercicio, etc.). Afecta habitualmente al 50% de los familiares de primer grado, asociándose a predisposición a cardiopatía isquémica precoz. Su base metabólica y genética no ha sido todavía identificada, siendo el mecanismo más probable la interacción de diferentes genes y el ambiente.

Actualmente el diagnóstico se basa en el estudio familiar y la expresión fenotípica variable con elevación de la apolipoproteína B100 (Apo-B100) plasmática e historia positiva de enfermedad cardiovascular prematura. Otras anomalías frecuentemente asociadas son bajos niveles de colesterol HDL, alteraciones en la composición de las lipoproteínas, con presencia de LDL pequeñas y densas, y aumento de los ácidos grasos libres (AGL) ^{51, 52}.

2.2. Diagnóstico

No se ha encontrado ningún marcador clínico, metabólico o genético específico para el diagnóstico de la HFC. Para diagnosticar a estos pacientes se siguen los criterios propuestos por Bredie et al⁵³ en 1997:

1 Criterios mayores de inclusión

- Presencia de una hiperlipemia múltiple en familiares de primer grado, incluyendo: hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e hiperlipemia combinada, definidas por concentraciones plasmáticas en ayunas de colesterol y/o triglicéridos > percentil 90 de acuerdo a edad y sexo
- Herencia de la hiperlipemia con una transmisión autosómica dominante
- Presencia de arteriosclerosis prematura (antes de los 60 años) en familiares de primer grado

2 Criterios de exclusión

- Presencia de xantomas en familiares de primer grado
- Presencia de una causa secundaria de hiperlipemia en familiares afectados
- Presencia de genotipo de Apo E E2/E2 en sujetos afectados

3 Criterios de inclusión adicionales

- Concentración elevada de Apo-B100 en plasma
- Presencia de un patrón de LDL predominando las partículas pequeñas y densas
- Manifestación de la hiperlipemia en la adolescencia

Diagnóstico: tres criterios mayores de inclusión y exclusión; los criterios mayores de inclusión 1 y 2, 0 criterios de exclusión y al menos 1 criterio de inclusión adicional.

Los criterios más consistentes para el diagnóstico, y que mejor diferencian los sujetos afectados de los familiares no afectados, son la presencia de valores plasmáticos elevados de Apo-B100 y de LDL pequeñas y densas^{51, 54, 55} por lo que se ha propuesto la necesidad de modificar los criterios diagnósticos iniciales

56

2.3. Etiología

Descartado que la enfermedad sea de naturaleza monogénica, aún no se ha podido establecer su base genética a pesar los múltiples estudios que se han llevado a cabo ^{57, 58, 59, 60, 61}.

Dada la sobreproducción de VLDL, la elevación de las concentraciones de Apo-B100 y las LDL pequeñas y densas características de estos pacientes, se consideró inicialmente el gen de la Apo-B100, en el cromosoma 2, como candidato principal, pero no se alcanzaron resultados concluyentes ^{62, 63}. Después de que se describiese un defecto funcional de la lipoproteinlipasa (LPL) en un grupo de sujetos con HFC, también se pensó en el gen de la LPL, localizado en el cromosoma 8. Aunque se han descrito más de 50 mutaciones asociadas a dicho gen, ninguna de ellas está presente en la mayoría de los sujetos afectados ^{64, 65}. Se ha sugerido la participación de un gen en el cromosoma 1 ⁶⁶, ya que se ha descrito en población finlandesa una alteración en dicho cromosoma (1q21-q23) que se asocia con sobreproducción de VLDL. En familias canadienses con HFC y con diabetes tipo 2 se ha descrito una alteración en este cromosoma que podría relacionarse con la RI asociada a la HFC ⁶⁷. También se ha descrito una alteración en el cromosoma 11 (11q23-q24), el denominado cluster de Apo AI-CIII-AIV, asociado con la dislipemia en siete familias con HFC ⁶⁸. Ninguno de estos hallazgos, no obstante, es un marcador genético específico para la HFC ⁶⁹.

Actualmente se considera la HFC como una enfermedad genéticamente heterogénea, en cuya etiopatogenia interviene un número desconocido de genes mayores junto a otros genes modificadores de la expresión de la misma, además de la contribución de los factores ambientales. Ribalta et al sugieren que la búsqueda de marcadores genéticos podría orientarse a un fenotipo más amplio que denominan “déficit de gestión de ácidos grasos libres”, haciendo referencia a una situación en la que existen múltiples causas potenciales para que se produzca la HFC ⁷⁰.

2.4. Patogenia

Los mecanismos patogénicos implicados en la HFC son muy heterogéneos y no totalmente conocidos. Se consideran fundamentalmente los siguientes: hiperproducción hepática de VLDL, defecto en la actividad de la LPL, alteraciones en la esterificación de los ácidos grasos en el tejido adiposo y la presencia de resistencia a la insulina (figura 8).

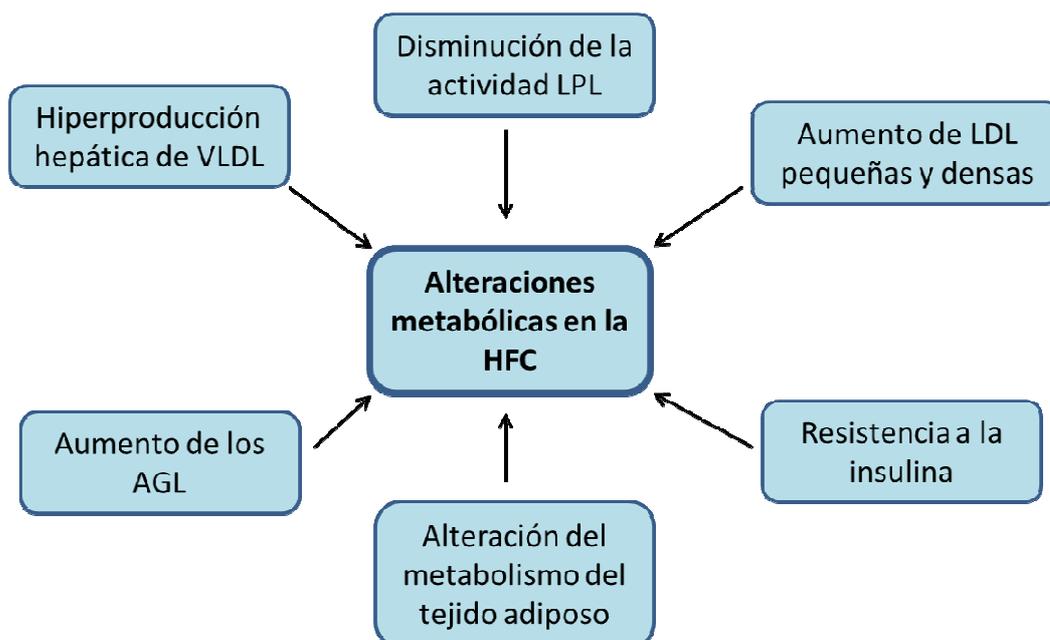


Figura 8: Diferentes procesos metabólicos en la HFC. *Adaptada de de Graaf J, Veerkamp MJ, Stalenhoef AFH. Metabolic pathogenesis of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on insulin resistance, adipose tissue metabolism and free fatty acids. J R Soc Med 2002;95:46-53*⁵².

2.4.1. Sobreproducción hepática de VLDL

La característica principal de la HFC es la hiperproducción hepática de VLDL^{51, 54, 70, 71}, que viene determinada por el aumento de la síntesis de TG por el hepatocito, aumentando de forma secundaria la síntesis de Apo-B100, ya que se produce un acúmulo de partículas ricas en TG, que contienen Apo-B100. Se considera que el mecanismo patogénico es la concentración elevada de AGL en plasma, que sobrecarga al hígado, y que se debe a una cierta disminución de la capacidad lipolítica, pero sobre todo, a una reducción de la capacidad del tejido adiposo y del músculo para captar los AGL procedentes de la lipólisis de los triglicéridos⁷⁰.

2.4.2. Disminución de la actividad de la LPL

El nivel sérico de triglicéridos muestra el balance entre su producción y su catabolismo, del que es responsable principal la activación de la LPL. Los triglicéridos de origen intestinal o exógeno son transportados por QM y QM residuales y, los de origen endógeno, por las VLDL e IDL. Es probable que una muy elevada producción hepática de VLDL llegue a saturar la capacidad de la LPL, alterándose el catabolismo de las VLDL y QM.

Babirak et al ^{72, 73} demostraron en sujetos con fenotipos IIB y IV una disminución de la actividad LPL post-heparina proponiendo que hasta en un tercio de los sujetos HFC habría un defecto de la enzima. Al disminuir la hidrólisis de los TG por la alteración de la actividad LPL se origina una disminución del catabolismo de las VLDL y QM, una menor recaptación hepática de VLDL y mayor liberación de éstas al plasma. Como consecuencia, se produce un aumento del tiempo de permanencia de las lipoproteínas ricas en triglicéridos en el plasma y una alteración del intercambio con las HDL y en la transformación en LDL.

2.4.3. Alteración de la lipasa hormonosensible (LHS)

La LHS está inhibida por la acción de la insulina durante la etapa postprandial. Al disminuir la acción insulínica durante el ayuno y aumentar las hormonas contrainsulares, se produce un estímulo de la LHS del tejido adiposo liberándose ácidos grasos libres que circulan unidos a la albúmina y son captados por el hígado y el músculo cardíaco y esquelético ⁷⁴.

Se ha descrito una disminución de la actividad in vitro de LHS en pacientes de Suecia con HFC, aunque no en fineses ni daneses ^{75, 76, 77}.

Como consecuencia del estado de resistencia insulínica asociado a la HFC, la inhibición de la lipólisis en situación postprandial se pierde produciéndose una elevación plasmática de AGL que aumenta la oferta de éstos al hígado, contribuyendo así a la hiperproducción hepática de VLDL y Apo-B100. Este aumento de los AGL en situación basal y postprandial estimula la producción de VLDL.

2.4.4. Alteración de la esterificación de los ácidos grasos en el tejido adiposo

Se cree que la actividad de la proteína estimuladora de la acilación (ASP) está descendida en los pacientes con HFC y que la esterificación y movilización de los AGL en el adipocito se halla muy alterada por lo que se reduce significativamente la incorporación de los AGL al adipocito (figura 9) ⁵².

Se debe al parecer a una interacción defectuosa entre la ASP y su receptor. La ASP es estructuralmente idéntica a un producto de la degradación del factor C3 del complemento (C3adesArg). Se ha observado que en el estado postprandial existen elevaciones de C3, probablemente debidas a alteraciones en la activación del factor C3, y esto se ha relacionado con el aumento del flujo de AGL al hígado característico de la HFC y con su ineficiente aclaramiento de remanentes aterogénicos postprandiales ⁷⁰.

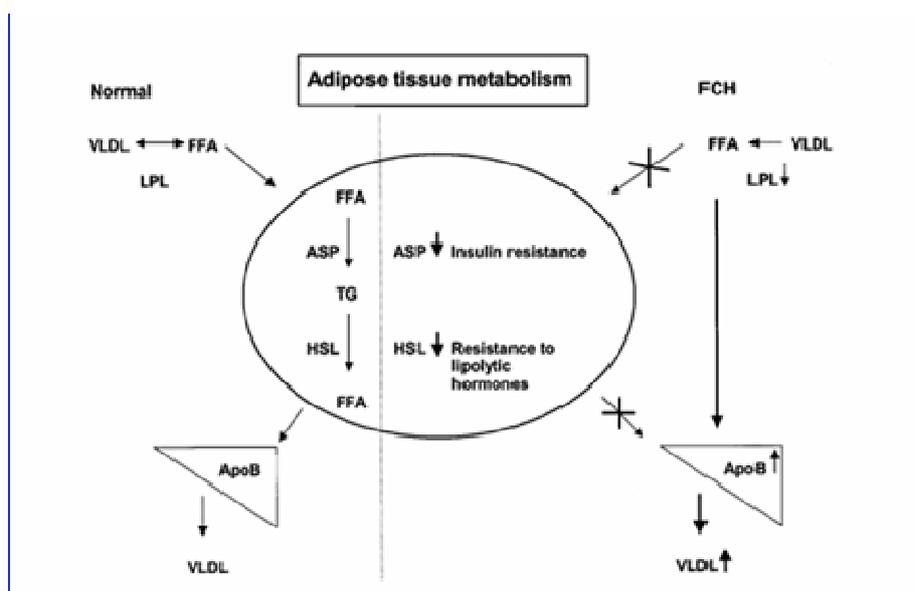


Figura 9. Alteraciones del tejido adiposo en la HFC. Tomada de de Graaf J, Veerkamp MJ, Stalenhoef AFH. *Metabolic pathogenesis of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on insulin resistance, adipose tissue metabolism and free fatty acids.* J R Soc Med 2002;95:46-53 ⁵².

La hipótesis más consistente en la actualidad es la existencia de un defecto combinado en la lipogénesis y en la lipólisis en el tejido adiposo por alteraciones en la ASP y acción de la insulina por un lado, y la disminución de la acción de la LHS por otro, dando lugar a una tejido adiposo metabólicamente inactivo, por lo que los AGL se dirigen directamente al hígado, aumentando la producción de VLDL, aunque no se sabe cuál de ellos es el defecto primario, o si se trata de la coexistencia de ambos de forma simultánea ⁵².

2.4.5. Resistencia a la insulina

Se denomina resistencia a la insulina a una situación clínica en la que las células que habitualmente responden a esta hormona, dejan de hacerlo adecuadamente. Se manifiesta por una disminución del transporte de glucosa inducido por insulina al interior de la célula en el músculo y el tejido adiposo, por un aumento de la producción hepática de glucosa y alteraciones en el metabolismo lipídico en los tejidos adiposo y hepático ^{78,79}.

2.4.5.1. Secreción de insulina

Aunque también ejercen su influencia aminoácidos, cetonas, neurotransmisores y péptidos vasoactivos, la glucosa es el regulador principal de la secreción de insulina por la célula beta pancreática. Estimula la secreción de insulina cuando se introduce en la célula beta mediante el transportador GLUT-2. A continuación, el metabolismo intracelular de la glucosa genera ATP que inhibe la actividad de un canal de potasio originando la despolarización de la membrana y la apertura consecuente de canales de calcio que estimula la secreción de insulina (figura 10). A esta vía se le denomina dependiente de potasio (KATP).

El receptor de sulfonilurea (*sulfonylurea receptor*, SUR) es el sitio de fijación para fármacos que actúan como secretagogos de la insulina. Las alteraciones en los procesos u hormonas subrayados en la figura son causa de diabetes de inicio en la madurez (figura 10).

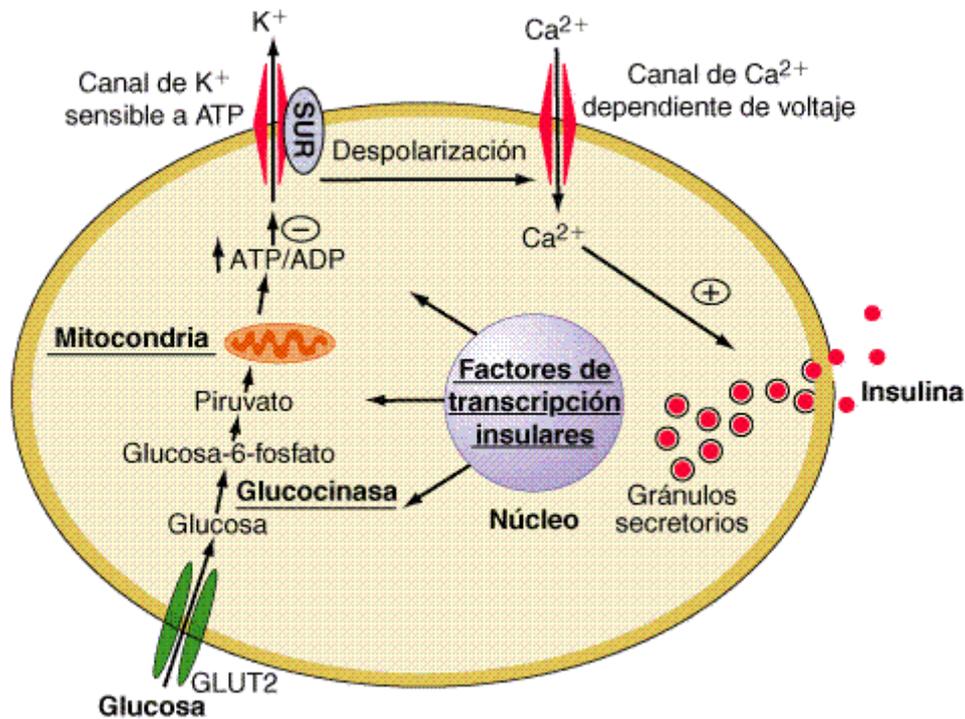


Figura 10. Secreción de insulina. Adaptada de WL Lowe, en JL Jameson [ed]: *Principles of Molecular Medicine*. Totowa, NJ, Humana, 1998⁸⁰.

En condiciones de alta energía aumentan los niveles de malonil-CoA que inhibe la isoforma hepática de la carnitina palmitoiltransferasa I (LCPT I), frenando así la β -oxidación de los AG, de manera que su concentración en el citosol de la célula β aumenta. Se ha denominado a esta vía de secreción de insulina vía independiente de potasio. La importancia de la LCPTI reside en su poder regulador de las concentraciones de AG en la célula β y por lo tanto en su repercusión en la secreción de insulina (figura 11) .

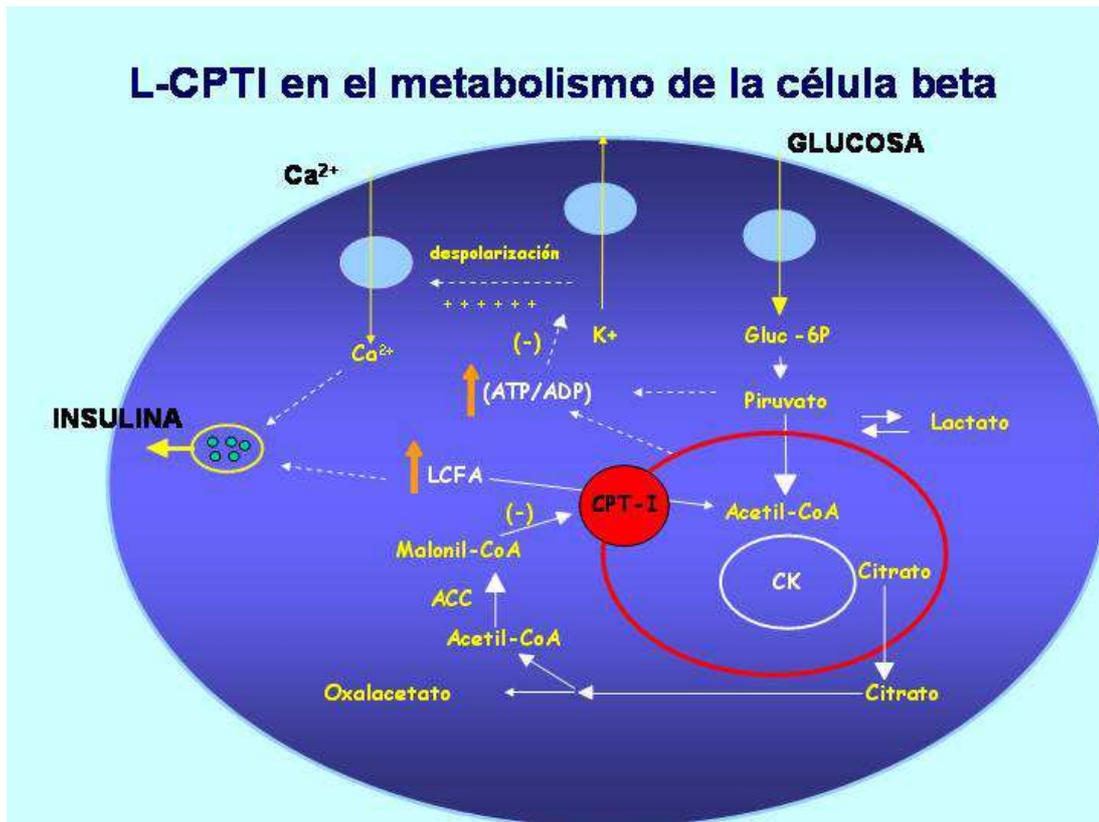


Figura 11. Importancia de la LCPTI en el metabolismo de la célula β . Tomada de Fausto G. Hegardt, www.ub.edu/bbm/webfausto3/celulabeta.htm, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Barcelona

2.4.5.2. Acción de la insulina

Una vez secretada la insulina es recogida por la sangre venosa portal y, la que no es captada por el hígado, llega a la circulación general donde se fija a sus receptores presentes en los órganos diana, fundamentalmente el tejido muscular y adiposo. La interacción con el receptor estimula la actividad cinasa de tirosina dando como resultado la autofosforilación del receptor y el reclutamiento de moléculas de señalización intracelulares, como los sustratos del receptor de la insulina (IRS) (figura 12). Estas moléculas inician una cascada de fosforilación y desfosforilación que desembocan en los importantes efectos metabólicos y mitogénicos de la insulina. La activación de la cinasa de fosfatidilinositol-3 (PI3K) estimula la transposición de los transportadores de glucosa GLUT-4 a la superficie celular para la captación de glucosa. Otras vías de señalización del receptor de insulina llevan a la síntesis de glucógeno, proteínas, lípidos y a la regulación de diversos genes en células sensibles a la acción de la insulina.

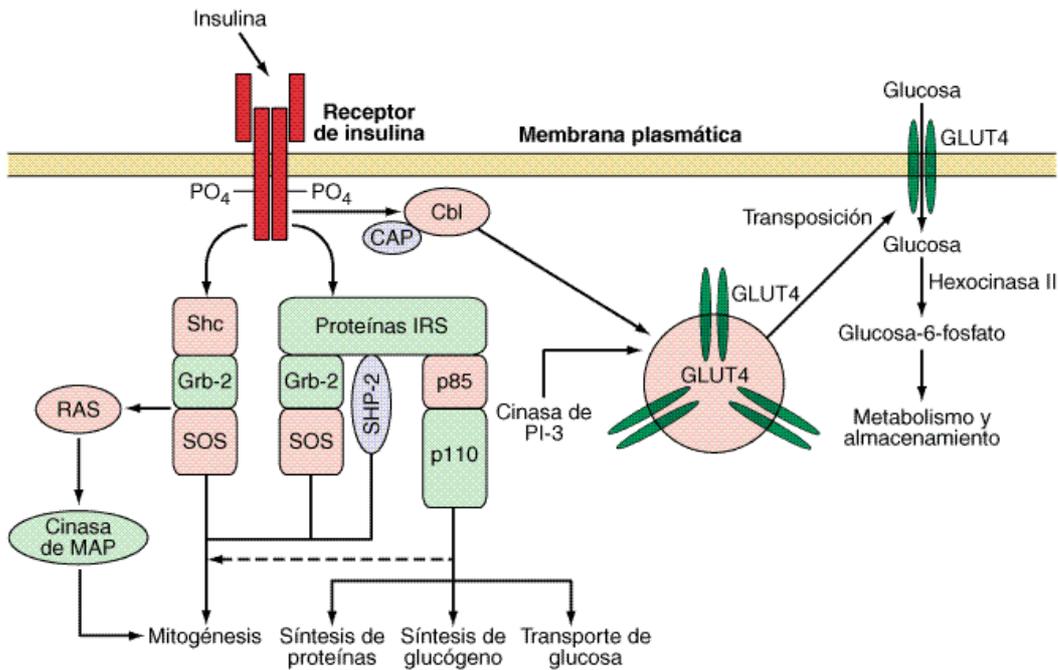


Figura 12. Vía de transducción de señales de la insulina en el músculo esquelético. El receptor de la insulina tiene actividad intrínseca de cinasa de tirosina y entra en interacción con proteínas sustratos del receptor de insulina ([insulin receptor substrates, IRS] y Shc). Se fijan a estas proteínas celulares diversas proteínas de "acoplamiento" e inician las acciones metabólicas de la insulina [Grb-2, SOS, SHP-2, p85, p110 y cinasa de fosfatidilinositol-3' (phosphatidylinositol-3'-kinase, cinasa de PI-3)]. La insulina incrementa el transporte de glucosa por medio de la cinasa de PI-3 y la vía Cbl, lo que a su vez promueve la transposición de vesículas intracelulares que contienen el transportador de glucosa GLUT4 hacia la membrana plasmática. *Tomada de WL Lowe, en JL Jameson [ed]: Principles of Molecular Medicine. Totowa, NJ, Humana, 1998*⁸⁰

El regulador más importante del equilibrio entre la producción hepática de glucosa y su utilización por los tejidos es la insulina. En estado de ayuno, la baja concentración de insulina promueve la producción de glucosa a través de la gluconeogénesis y la glucogenólisis hepáticas, disminuye la síntesis de glucógeno, se reduce la captación de glucosa en los tejidos y se promueve la movilización de precursores almacenados. En el periodo postprandial, la carga de glucosa aumenta la secreción de insulina y disminuye la de glucagón, invirtiéndose estos procesos. La mayor parte de la glucosa será captada por el músculo esquelético por mediación de la insulina.

2.4.5.3. Bases moleculares de las acciones de la insulina

Las acciones de la insulina son mediadas por cascadas de señalización intracelular que se inician con la fosforilación del receptor en residuos de tirosina (Tyr) que sigue a su unión con la insulina. A continuación, una sucesión de eventos de fosforilación-desfosforilación de cinasas de Tyr y serina/treonina

(Ser/Thr) son las responsables de transmitir la señal de la insulina regulando las reacciones metabólicas en el interior de la célula ^{81, 82, 83}

El receptor de la insulina (IR)

El receptor de la insulina se encuentra localizado en la membrana celular. Se trata de una glucoproteína perteneciente a la familia de receptores de factores de crecimiento con actividad de cinasas de Tyr que, al unirse a su ligando, se autofosforilan en residuos de Tyr ⁸⁴.

Está compuesto por dos subunidades α y dos β unidas por puentes disulfuro. Las subunidades α contienen las regiones de unión a insulina $\alpha 1IR$ y $\alpha 2IR$ en adición a una región rica en cisteínas (Cys). La subunidad β contiene una porción extracelular, una transmembrana y una intracelular. En su porción intracelular se localiza un dominio catalítico de cinasa de tirosina con un sitio de unión a ATP y sitios de fosforilación en tirosina que se localizan en las regiones yuxtamembrana (Tyr965, Tyr972), asa de activación (Tyr1158, Tyr1162, Tyr1163) y carboxi-terminal (Tyr1328, Tyr1334) (figura 13) ⁸⁵.

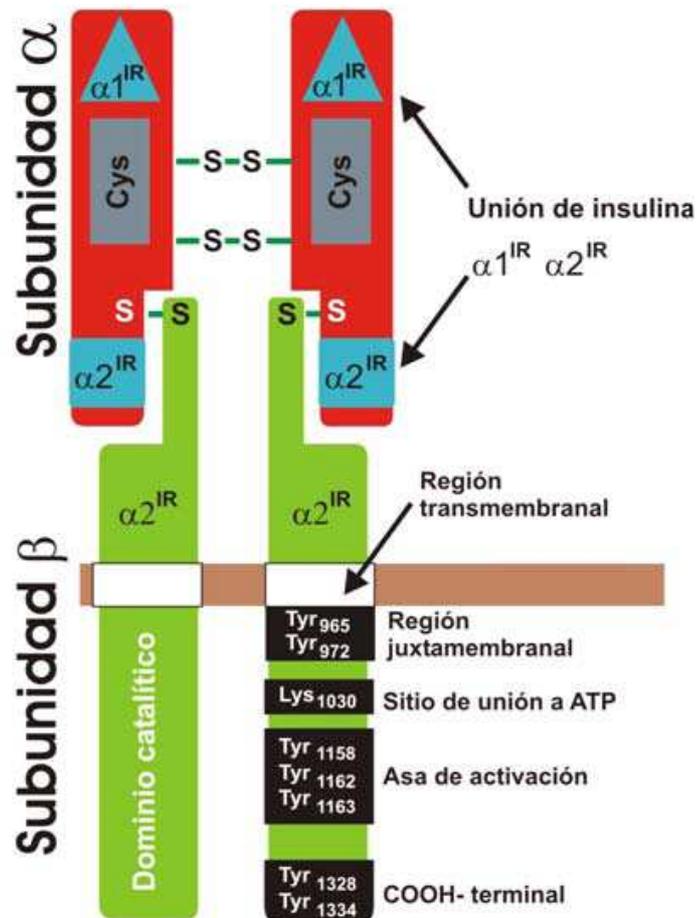


Figura 13. Estructura del Receptor de Insulina: dominios funcionales del receptor *Tomada de Olivares Reyes, JA y Arellano Plancarte, A. Bases moleculares de la acción de la insulina. Revista de Educación Bioquímica 27 (1): 9-18, 2008*⁸⁵

Cuando la insulina se une al receptor se producen cambios de las subunidades α que permiten la activación de las subunidades β para autofosforilarse en Tyr. Se requiere de siete sitios de fosforilación de tirosina al menos para el funcionamiento apropiado del IR⁸⁶.

Vías de señalización de la insulina

Tras la activación del IR por la insulina, se inicia una cascada de señalización que discurre por dos vías principales: a) la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la vía del fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K). Ambas regulan la mayoría de las acciones de la insulina asociadas al metabolismo energético, la expresión genética y los efectos mitogénicos^{83, 84}.

a) Vía de señalización de las MAPK

La vía de señalización MAPK media los efectos de la insulina en la regulación de la síntesis de proteínas (Figura 12). La fosforilación en residuos de Tyr del dominio citoplasmático del IR desencadena acciones en una amplia gama de sustratos potenciales, incluyendo factores de transcripción y otras cinasas que participan en la regulación de la expresión genética en tejidos sensibles a la insulina, pero no en la regulación del transporte de glucosa^{83, 81}.

b) Vía de señalización PI3K

Es el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la glucosa y los lípidos. Se inicia cuando el receptor activo y autofosforilado interacciona con el sustrato del IR (IRS) y lo fosforila. Existen 4 isoformas del IRS y es la IRS-1 la que está implicada en el transporte de glucosa por medio de la cinasa de PI-3 y la vía Cbl, lo que a su vez promueve la transposición de vesículas intracelulares que contienen el transportador de glucosa GLUT4 hacia la membrana plasmática (Figura 12)⁸⁵.

La PI3 quinasa es un elemento clave en la respuesta metabólica de la insulina, que regula el transporte de glucosa, el efecto antilipolítico, la síntesis de ácidos grasos y la síntesis de glucógeno.

2.4.5.4. Mecanismos de regulación de la señal de insulina

El alcance y la duración de las señales inducidas por la acción de la insulina para conseguir un correcto funcionamiento metabólico y un adecuado balance energético, está regulado por complejos y sensibles mecanismos. Unos de autorregulación a través del IR y sus receptores y otros de desensibilización a través de vías alternativas (Figura 14)

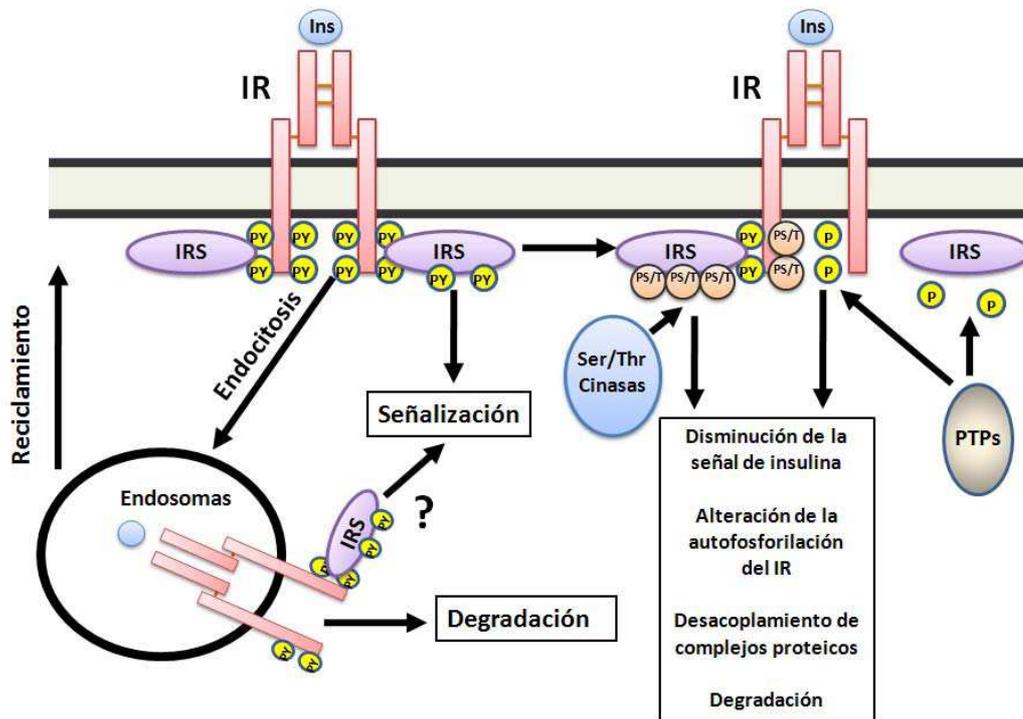


Figura 14. Mecanismos de regulación de la señal de insulina. Tomada de Olivares Reyes, JA y Arellano Plancarte, A. Bases moleculares de la acción de la insulina. Revista de Educación Bioquímica 27 (1): 9-18, 2008)⁸⁵

a) Regulación a nivel del IR

Se han identificado tres mecanismos de regulación de la señal de la insulina a nivel del IR: el que afecta al proceso de endocitosis, al generado por la acción de proteínas fosfatasa de tirosina (PTPs) y al de fosforilación de residuos de Ser/Thr.

La endocitosis ocurre una vez que la insulina se ha unido al IR, se internaliza el complejo formado hacia los endosomas primarios, donde permanece activo y fosforilado. El pH ácido de éstos induce la disociación de la insulina y el IR, la enzima insulinasa ácida lisosomal degrada la insulina y el IR se recicla de nuevo a

la membrana celular. En condiciones de estimulación prolongada por saturación de insulina, el IR es transportado hasta los lisosomas para ser degradado. El número de IR disponibles en la superficie celular es, de este modo, determinado por la internalización, el reciclado y la degradación del IR.

La acción de las PTPs consistiría en la desfosforilación de residuos claves de Tyr en el asa de activación del receptor, desactivándolo

La fosforilación en residuos de Ser y Thr es el tercer mecanismo que modula la señalización intracelular a través del IR, de manera que altera la autofosforilación del IR en residuos de Tyr⁸⁵

b) Regulación a través del sustrato del IR (IRS)

La estimulación con insulina conlleva una notable fosforilación en residuos de Tyr, pero también de Ser y Thr, implicados en la atenuación de la señal de insulina por desacoplamiento de la unión del IRS a proteínas efectoras como la PI3K⁸⁷.

Las proteínas supresoras de la señalización de citoquinas (SOCS) regulan negativamente la activación de IRS, alterando su estructura y su unión a IR y PI3K⁸⁶.

2.4.5.5. Mecanismos de resistencia a la insulina

A nivel molecular, la RI es consecuencia de una deficiente señalización de la insulina por alteraciones en su receptor o en las moléculas efectoras de su vía metabólica. Aunque en algunos casos la RI se debe a un defecto en la unión de la insulina a su receptor, lo más frecuente es que se deba a alteraciones posteriores a la unión de la insulina, que alteran desde las funciones del receptor hasta la actividad de las proteínas activadas cuyas funciones son importantes en la vías de señalización de la insulina⁸².

Entre las alteraciones más frecuentes se encuentran:

- La disminución del número de receptores y de su actividad cinasa
- Un aumento del estado de fosforilación en residuos de serina y treonina de proteínas clave, como el propio receptor y su sustrato
- La disminución de la actividad de las cinasas PI3K y Akt
- Defectos en la expresión y función del transportador GLUT4⁷⁸.

El aumento de la fosforilación en los residuos de serina y treonina a nivel del receptor (IR) y su sustrato (IRS) se considera uno de los mecanismos clave para el desarrollo de la RI debido a que puede bloquear sitios de fosforilación en tirosina, disminuir su activación e inducir su degradación ^{78, 79}.

Se ha demostrado en estudios clínicos que en hígado, músculo y tejido adiposo de pacientes obesos, hay un aumento de la degradación del IRS y que puede ser motivado por el aumento de la fosforilación de IRS en residuos de serina y treonina.

Como inductores de RI se han implicado varios agentes y condiciones metabólicas, los más comunes son:

- Los ácidos grasos y sus metabolitos
- TNF- α y otras citoquinas
- Hormonas catabólicas como la adrenalina, el glucagón y la angiotensina II
- Hormonas como la resistina secretadas por el tejido adiposo.

El incremento de la concentración plasmática de ácidos grasos libres induce resistencia a la insulina por la inhibición del transporte de glucosa estimulado por insulina. A nivel molecular, la concentración de ácidos grasos libres puede llevar a cambios en la expresión del IR y alterar tanto la unión de la insulina con el receptor como el estado de fosforilación de su dominio de quinasa. Además, pueden inhibir la activación de la enzima PI3K dependiente de IRS-1 por un aumento de la fosforilación de los residuos de serina y treonina del IRS-1. También se ha descrito que los ácidos grasos libres pueden alterar la activación de Akt por el aumento de la cantidad de ceramida y diacilglicerol en células musculares en cultivo ^{78, 79}.

2.4.5.6. Resistencia a la insulina y ácidos grasos libres

Ha quedado demostrado en múltiples estudios que los sujetos HFC tienen RI ^{71, 88, 89, 90, 91, 92, 93}, su presencia puede ser un importante factor modulador de los distintos fenotipos de HFC.

El aumento de la liberación de AGL por el tejido adiposo y del flujo de AGL al hígado eleva la síntesis y liberación de VLDL y facilitan la aparición de partículas LDL pequeñas y densas ⁷⁴. Por otro lado, el aumento plasmático de AGL produce una disminución de la captación muscular de glucosa y hepática de

insulina. Se cree que la RI y los AGL desempeñan un papel importante en el desarrollo de las alteraciones metabólicas de la HFC y que hay una relación directa entre AGL, hiperproducción hepática de VLDL y Apo-B100, y las concentraciones circulantes de triglicéridos, aunque no queda claro si la RI es la causa o una consecuencia de las alteraciones lipídicas observadas en la HFC.

El incremento de grasa visceral⁹⁴ (independientemente de la existencia de obesidad), el descenso de la vasodilatación inducida por la insulina en músculo esquelético o la alteración del metabolismo postprandial de los AG pueden contribuir a la RI en HFC. Otro mecanismo potencial que contribuye a la RI es la activación del factor de necrosis tumoral (TNF- α) y su receptor. Además, el incremento de la concentración de leptina que se ha visto en la HFC también puede ocasionar RI debido al efecto que la leptina tiene en la secreción pancreática de insulina y en la sensibilidad periférica a la insulina⁹⁵.

2.6. Lipemia postprandial (LPP)

Al acúmulo en plasma de lipoproteínas ricas en TG (VLDL, QM y sus remanentes) aproximadamente entre 6 y 10 horas tras la ingesta de una comida grasa se denomina LPP^{96, 97}. Los sujetos con HFC tienen alterada la LPP⁹⁶ y podría deberse a diferentes causas.

En primer lugar, a la RI, un aspecto central de la patogenia de la HFC, que como ya se ha comentado, es un hallazgo muy común en estos sujetos, y que condiciona un mayor riesgo cardiovascular. Como consecuencia de la RI en situación postprandial, se produce un incremento en el flujo de remanentes de quilomicrones y VLDL ricas en TG al hígado, que se vería sobrecargado, con lo que aumentaría la producción endógena de VLDL, lo cual contribuiría a una mayor LPP.

En segundo lugar, en sujetos con HFC se ha demostrado una falta de captación periférica en el tejido adiposo de los AGL en situación postprandial mediada por la RI y por una probable resistencia a la acción de la ASP. Además, la fracción C3 del complemento, que es un precursor de ASP, se reduce en las primeras horas tras una sobrecarga oral grasa en sujetos con HFC, lo que implicaría un descenso postprandial de ASP y, por tanto, de la captación de AGL en tejidos periféricos. Por este motivo, en situación postprandial los AGL no se aclararían de forma fisiológica por el tejido adiposo y sobrecargaría al hígado.

Esta situación metabólica de incremento del flujo de AGL al hígado lleva a la sobreproducción de VLDL, con lo que se genera un círculo vicioso que perpetúa la hiperlipidemia postprandial,^{72 98} (figura 15).

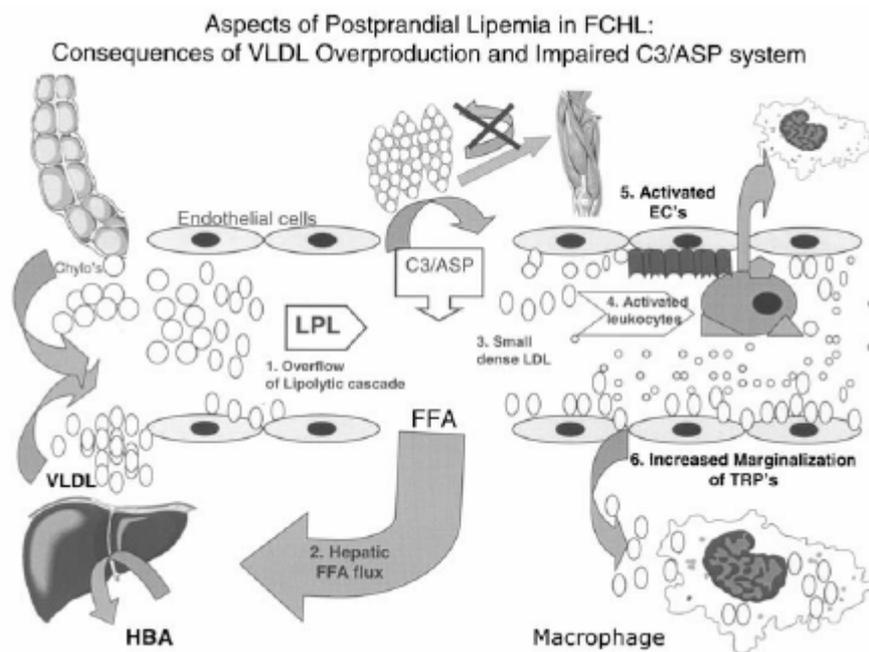


Figura 15. Lipemia postprandial en HFC. Tomada de Castro Cabezas M. *Postprandial lipaemia in familial combined hyperlipidaemia*. Biochemical Society Transactions, 2003;31:1090-1093⁹⁸

Ha quedado establecida la importancia de una elevada concentración plasmática de TG en ayunas como otro factor de riesgo cardiovascular independiente. Es probable que la LPP alterada sea también un factor importante de riesgo cardiovascular, ya que pasamos la mayor parte del día en situación postprandial⁹⁹. Ya en la década de los 70, se describió la AE como un proceso postprandial¹⁰⁰, y son varios los estudios epidemiológicos que relacionan el papel de las lipoproteínas postprandiales con el inicio y el desarrollo de arteriosclerosis prematura¹⁰¹. Se ha demostrado que los remanentes de QM procedentes de la dieta pueden atravesar el endotelio vascular donde son fagocitados por los macrófagos e inducirán la formación de células espumosas sin presentar ninguna modificación previa, a diferencia de lo que ocurre con las partículas LDL, que antes deben modificarse^{96, 98}. Ter Avest et al. han demostrado la relación entre la concentración sérica de estas partículas y el grosor de la íntima-media carotídea en sujetos afectados de HFC respecto a sus familiares no hiperlipémicos¹⁰². Por tanto, el endotelio vascular de los pacientes con HFC está expuesto a

concentraciones elevadas de estas lipoproteínas aterogénicas a lo largo del día, alterando su función e incrementando el acúmulo subendotelial de remanentes, que conducirán a la formación de la placa de ateroma. Además, la hiperlipemia postprandial produce de manera indirecta una cascada de procesos inflamatorios que favorecen el desarrollo de la arteriosclerosis (figura 16). Entre ellos, destaca la activación de leucocitos por las lipoproteínas ricas en triglicéridos y sus remanentes y la activación de la célula endotelial, con mayor adherencia a células inflamatorias. Esto deberá producir un mayor estrés oxidativo y producción de citoquinas, perpetuando el daño endotelial ¹⁰³.

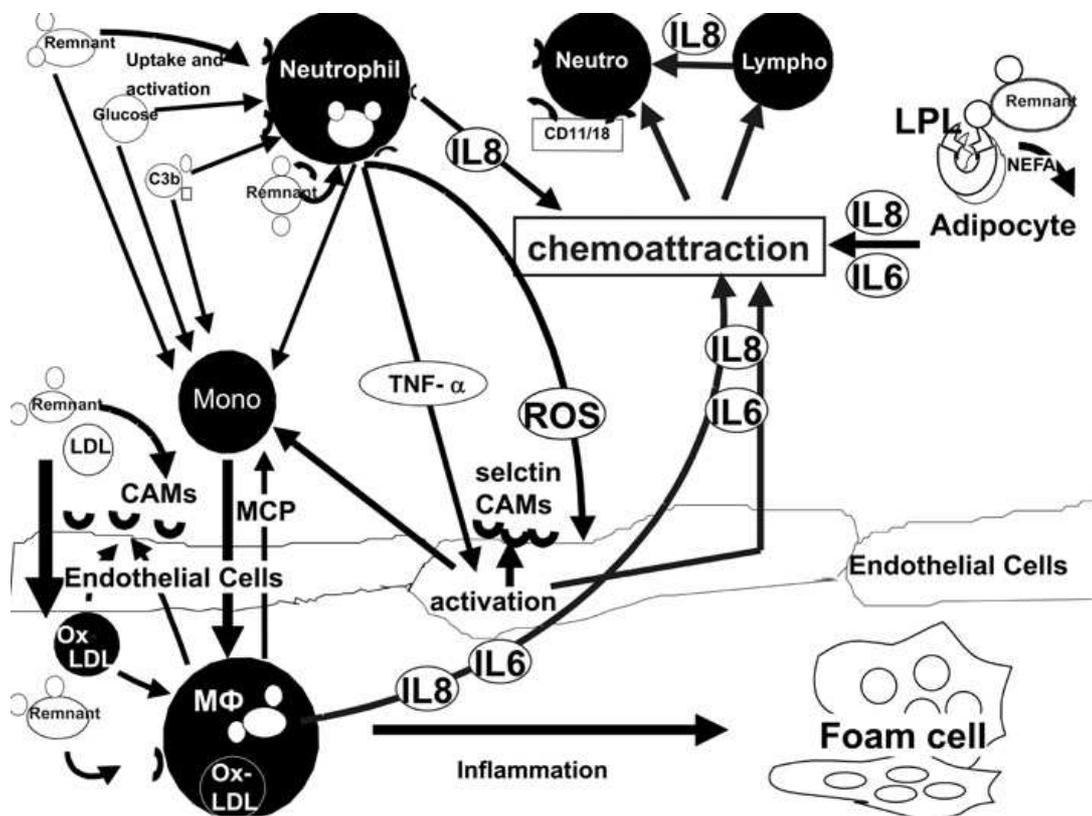


Figura 16. Iniciación de la aterosclerosis en el torrente sanguíneo: remanentes, glucosa y C3b son capaces de inducir la activación de monocitos y neutrófilos. Esto conducirá a la adhesión de estas células al endotelio, así como a la producción de factores quimiotácticos que conducen al reclutamiento y la activación de otros leucocitos. Tomada de Alipour, A. et al. *Postprandial inflammation and endothelial dysfunction. Biochem Soc Trans, 2007, 35:466-469* ¹⁰⁴

Así, la LPP podría explicar la heterogeneidad en el riesgo coronario observado entre distintos pacientes con HFC, puesto que puede ser un factor de riesgo cardiovascular encubierto y precoz, aún en ausencia de hipertrigliceridemia en ayunas ^{96, 99}.

Se han aportado datos sobre la existencia de RI y una alteración en el metabolismo postprandial de lipoproteínas ricas en triglicéridos en sujetos con HFC.

En este sentido, algunos estudios ¹⁰⁵ han mostrado que los sujetos con HFC tienen alterada la LPP, evaluado con el perfil diurno de triglicéridos respecto a sujetos control. Además, estas diferencias se mantienen cuando se introducen variables conocidas que influyen en la LPP, como son la edad, el IMC y el perímetro de la cintura. Este resultado demuestra la importancia de los factores genéticos, probablemente responsables de la HFC, en la regulación postprandial de los TG. Similares resultados se han observado en población holandesa utilizando el mismo método ^{106, 107}.

Se ha demostrado que la RI es muy común en sujetos con HFC ¹⁰⁸ e independiente de la presencia o no de obesidad abdominal ¹⁰⁹ y del fenotipo lipoproteico ⁴⁸. Además, condiciona mayor riesgo cardiovascular en sujetos con HFC ⁴⁹, de tal modo que dichos sujetos presentaron de forma estadísticamente significativa mayores valores de insulinemia y HOMA en ayunas como expresión de una mayor RI, que a su vez contribuye a una mayor LPP. Además, Halkes et al ¹¹⁰ demostraron una relación positiva entre el grado de RI y la LPP en sujetos con sobrepeso y valores normales de TG en ayuno, y que las diferencias encontradas entre sexos, en la LPP desaparecen por el efecto de la obesidad ¹¹¹. En nuestro grupo, también hemos visto que la LPP se relaciona positivamente con el perímetro de la cintura en controles y con el perímetro de la cintura y el IMC en sujetos con HFC, y en éstos, probablemente también la situación de RI empeore con una mayor obesidad abdominal que condiciona mayor LPP.

La HFC es, por tanto, un modelo genético de hiperlipidemia postprandial, y la obesidad y el depósito de grasa abdominal se relacionan con la LPP, probablemente mediado por la RI.

2.7. Inflamación, arteriosclerosis e insulinoresistencia

La inflamación es un elemento fundamental de la patogenia de la AE ^{15, 112, 113}, al ser ésta una enfermedad inflamatoria lentamente progresiva. En todas las etapas de la aterogénesis se evidencian procesos inflamatorios, desde el desarrollo temprano de la disfunción endotelial, pasando por la formación del ateroma, hasta su ruptura posterior. Esclarecer el papel que desempeña cada uno

de los factores que intervienen en esta compleja cascada ha adquirido una importancia creciente para identificar predictores de riesgo cardiovascular más precisos y objetivos para la intervención terapéutica ¹¹⁴.

La respuesta inflamatoria intenta resolver en un principio la alteración y daño producidos por la modificación de las LDL. Sin embargo, esta respuesta inflamatoria se perpetúa y desencadena una situación inflamatoria crónica, que contribuye a la progresión de la placa arteriosclerótica. Proteínas como las interleucinas (IL-1, IL-6), TNF- α y proteína C reactiva (PCR) se han relacionado etiológicamente en diferentes estudios tanto epidemiológicos, como clínicos y experimentales con la AE ¹⁵, ya que estos factores regulan el recambio y diferenciación de células a nivel vascular, y pueden influir en el desarrollo de la placa.

El factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa\beta$) es un factor de transcripción clave en la regulación de la inflamación. Desempeña un papel importante en la patogenia del proceso arteriosclerótico como regulador del balance entre genes pro y antiinflamatorios, y como regulador de la supervivencia y proliferación celular.

NF- $\kappa\beta$ controla la transcripción de múltiples genes que desempeñan un papel en la patogenia de la arteriosclerosis. Induce la expresión de citoquinas (IL-1, IL-6), quimioquinas, moléculas de adhesión (VCAM, ICAM...) y proteínas de respuesta de fase aguda (TNF- α , PCR) que intervienen en el inicio y desarrollo de la arteriosclerosis ^{115, 116, 117, 118, 119}. Además, NF- $\kappa\beta$ es un factor de transcripción que parece mediar en las primeras fases de la respuesta al estrés oxidativo (EO) ¹¹⁵. Se trata de un factor de transcripción que activa la expresión de genes que pueden mediar en el daño vascular ¹²⁰, pero también su presencia es necesaria para la expresión de otras proteínas importantes para la protección frente al EO, como la MnSOD ¹²¹ y frente a la apoptosis.

La activación de NF- $\kappa\beta$ puede ser iniciada por un amplio grupo de estímulos, entre los que se incluyen agentes inmunológicos, factores de crecimiento, procesos relacionados con el EO y diversas citoquinas (TNF- α , IL-1, IL-6), que se han implicado directa o indirectamente en la patogenia de la AE ^{116, 118, 119}.

TNF- α es una de las citoquinas proinflamatorias e inmunomoduladoras más importantes, está producida principalmente por macrófagos. Es liberada en el

lugar de la inflamación y juega un papel principal en el reclutamiento y activación de células inflamatorias, ya que regula moléculas de adhesión, activa células endoteliales, induce la producción de interleucinas e incrementa la permeabilidad vascular^{119, 122}. Sus efectos biológicos son alcanzados por activación de cascadas de señalización que desarrollan un programa de expresión genética específico, siendo una de las principales vías implicadas NF- κ B^{119, 123}. Basado en su actividad inflamatoria, se ha especulado que TNF- α es proaterogénica y su posible papel en la AE procede de los resultados de distintos estudios realizados en animales. Así, se ha observado que la inhibición de TNF- α en ratones apoE-/- mediante la administración crónica de receptor de TNF- α soluble supone una importante reducción del tamaño de la lesión¹²⁴, y que la deficiencia de TNF- α en ratones se asoció específicamente con menor presencia de lesiones avanzadas¹²⁵.

IL-1 es también una citoquina proinflamatoria. Su relación con la patogenia de la AE se ha estudiado en ratones con deficiencia de IL-1 o ausencia de receptor de IL-1. Se ha visto que la ausencia de IL-1 en ratones apo E-/- reduce la presencia de AE aproximadamente en un 30%¹²⁶, y que la ausencia de receptor de IL-1 ha mostrado recientemente un importante descenso en el desarrollo de AE en ratones apoE-/-¹²⁷.

La IL-10, también conocida como factor de inhibición de la síntesis de citoquinas (CSIF), es una citoquina con propiedades antiinflamatorias capaz de inhibir la síntesis de citoquinas proinflamatorias por los linfocitos T y los macrófagos. Ha sido demostrada su presencia en las placas ateroscleróticas humanas, observándose en estudios experimentales que niveles bajos de IL-10 favorecen el desarrollo de lesiones ateroscleróticas más extensas y morfológicamente más inestables.

Otro importante marcador de inflamación y daño tisular es la PCR, que es uno de los principales reactantes de fase aguda. Activa la vía clásica del complemento, media la fagocitosis, regula la inflamación, y es un marcador poco específico, pero muy sensible de infección e inflamación tisular. Su secreción está bajo control de transcripción por IL-6. Sin embargo, IL-1 y TNF- α también contribuyen a la síntesis de PCR, que a su vez, induce la secreción de IL-1 y TNF- α ^{124, 128}. La PCR es proaterogénica y protrombótica. En las células endoteliales induce descenso de óxido nítrico sintasa (eNOS) y prostaciclina, e incremento de

endotelina 1, moléculas de adhesión celular, IL-8 y PAI-1. En las células del sistema monocito-macrófago induce secreción de factor tisular, incremento de ROS, liberación de citoquinas proinflamatorias y promueve la quimiotaxis y adhesión de monocitos y el incremento de la captación de LDL oxidadas. Además, también se ha demostrado que la PCR incrementa la activación de NF- κ B¹²³.

Por tanto, la AE es una enfermedad inflamatoria, en la que participan múltiples citoquinas inflamatorias que producen la activación de NF- κ B, que es el encargado de regular la transcripción de distintos genes involucrados, a su vez, en una gran variedad de procesos. La activación de NF- κ B está sujeta a múltiples mecanismos de control. El primero de ellos a través de I κ B que mantiene inactiva a NF- κ B, pero a la vez, I κ B está regulada transcripcionalmente por NF- κ B, mediante un mecanismo de feed back¹¹⁶.

Los genes activados por NF- κ B incluyen los que codifican los mismos factores responsables de su activación, es decir, que activa la transcripción de los genes que codifican para citoquinas como IL-1 y TNF- α . Ambas producen la activación de NF- κ B, generando un estado de inflamación, en el que a su vez aumentan tanto los niveles plasmáticos como la expresión de ARNm de IL-1, IL-6 y TNF- α . Es decir, estas citoquinas son activadores de NF- κ B, pero a la vez son regulados por ella. Por tanto, estas citoquinas pueden participar en la AE por regulación de otros muchos genes dependientes de NF- κ B y por amplificación de la respuesta inflamatoria^{116, 118, 119}.

Por otro lado, productos de EO pueden producir translocación de NF- κ B, mientras que los agentes antioxidantes pueden bloquear la fosforilación de I κ B. La importancia de NF- κ B en el desarrollo de RI se ha observado al estudiar el tejido adiposo. Este tejido secreta un elevado número de hormonas con múltiples acciones biológicas y TNF- α , que juega un papel importante en la estimulación de la producción de leptina, junto con IL-6 y otros mediadores inflamatorios, cuya expresión está incrementada durante la ganancia de peso y reducida con la pérdida del mismo. TNF- α estimula la lipólisis, y su presencia se asocia con hiperinsulinemia y RI, de tal forma que su neutralización en ratones obesos ha demostrado mejorar la insulinosensibilidad. Por otro lado, la obesidad se asocia con bajos niveles de adiponectina (que se asocia con las manifestaciones del síndrome metabólico, como son la RI y la diabetes tipo 2), mientras que la pérdida

de peso produce un incremento de ésta. Además, se ha demostrado que TNF- α estimula la activación de NF- κ B, induciendo un aumento en la producción de citoquinas y moléculas de adhesión, junto con un incremento de EO, mientras que la adiponectina inhibe la activación de NF- κ B, y promueve un perfil metabólico protector ¹²⁹. Además, NF- κ B también ha sido relacionada con RI. Recientemente, en un modelo de animal transgénico con ausencia de IKK β , regulador principal y central de la respuesta inflamatoria por activación de NF- κ B, se ha probado la relación de estos factores con la RI ¹³⁰.

También, en otro modelo de ratón transgénico con expresión selectiva de IKK β en hepatocitos, se ha demostrado la relación entre activación hepática de NF- κ B y cascada inflamatoria (citoquinas como TNF- α , IL-1 e IL-6) con el desarrollo de RI y diabetes. Similares resultados se obtuvieron en animales no transgénicos alimentados con una dieta rica en grasa ¹³¹. En estos modelos la RI mejoró con la neutralización de IL-6 o con la inhibición de IKK β .

Estos estudios indican la importante relación entre los distintos factores inflamatorios, mediados por NF- κ B y la RI, que es la base fisiopatológica de la diabetes tipo 2 y del síndrome metabólico (figuras 17 y 18).

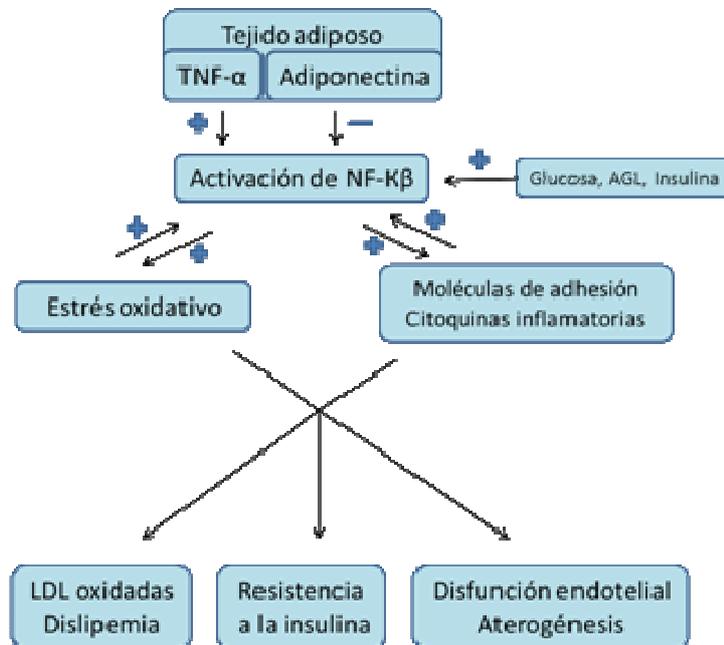


Figura 17 Papel de los productos secretados por el tejido adiposo y NF- κ B en los procesos que conducen a las manifestaciones clínicas del síndrome metabólico. *Adaptada de Sonnenberg GE, Krakower GR, Kissebah AH. A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome. Obesity Research 2004;12:180-6* ¹³².

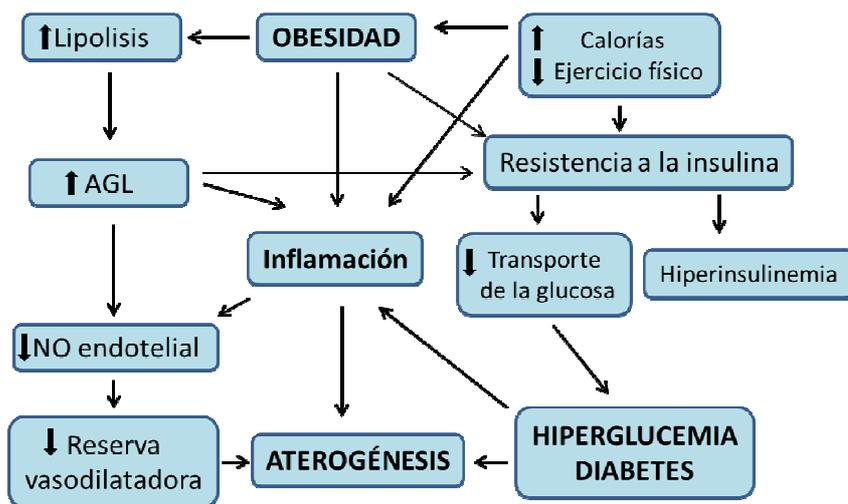


Figura 18. Patogénesis de la resistencia insulínica e inflamación en la obesidad y relación con aterogénesis y DM2. Adaptada de Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Bandyopadhyay A. *The potential influence of inflammation and insulin resistance on the pathogenesis and treatment of atherosclerosis-related complications in type 2 diabetes.* J Clin Endocrinol Metab 2003;88:2422-9
133

La inflamación y el estrés oxidativo están asociados en la aterosclerosis. La enzima mieloperoxidasa (MPO) está vinculada tanto a la inflamación como al estrés oxidativo por su localización en leucocitos y su capacidad catalítica de generar agentes oxidantes. Varias líneas de evidencia sugieren que la MPO puede desempeñar un papel en la aterogénesis ¹¹⁴.

La MPO es un miembro de la superfamilia hemoperoxidasas, está presente en los fagosomas de los granulocitos neutrófilos y de los monocitos. Es responsable de la actividad microbicida contra un amplio espectro de microorganismos. En los granulocitos estimulados, la MPO cataliza la producción de ácidos hipohalogenados, principalmente ácido hipocloroso, y otros intermedios tóxicos que aumentan poderosamente la actividad microbicida.



Una vez producido el hipoclorito, éste forma una serie de productos microbicidas como el cloro, cloraminas, radical hidroxilo y oxígeno singlete ¹³⁴. Estas especies reactivas son capaces de iniciar la peroxidación lipídica ^{135, 135} y producir una serie de modificaciones a las proteínas diana, incluyendo la halogenación, la nitración y el entrecruzamiento oxidativo ^{136, 137}

Análisis inmunohistoquímicos y bioquímicos localizan a la enzima y sus productos de oxidación en las lesiones ateroscleróticas ^{138 139 140 141 142 143}. Los

individuos con deficiencia de MPO tienen menos probabilidades de sufrir ECV ¹⁴⁴. Se conocen actualmente múltiples procesos en la evolución de la aterosclerosis en los que está implicada la actividad MPO (figura 19):

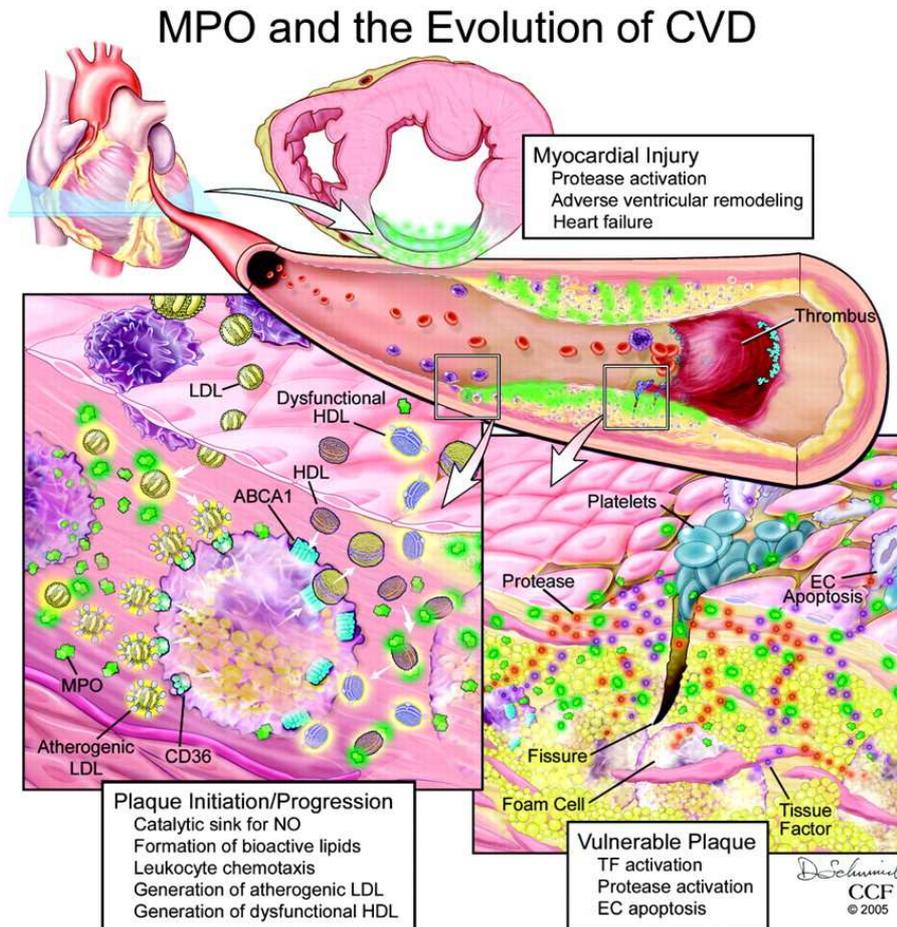


Figura 19. Esquema que ilustra múltiples procesos a lo largo de la evolución de la aterosclerosis en la que está implicada la MPO: peroxidación de lípidos, generación de lipoproteínas aterogénicas y HDL disfuncional, y el consumo catalítico de óxido nítrico (NO). Tomada de Nicholls, SJ y Hazen, SL. *Myeloperoxidase and Cardiovascular Disease*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005 ¹¹⁴.

La MPO puede por lo tanto contribuir a la disfunción endotelial, la trans migración de leucocitos, y la acumulación de células espumosas. MPO puede participar en las complicaciones isquémicas de la aterosclerosis a través de la activación de cascadas de proteasas y promoviendo la apoptosis de células endoteliales (CE), lo que lleva a la ruptura de la capa fibrosa y enlaza con la activación del factor tisular (TF) y la cascada de la coagulación ¹¹⁴.

II HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y UTILIDAD PRÁCTICA

La HFC es un modelo genético de dislipemia mixta con RI y elevado riesgo de cardiopatía isquémica por el desarrollo precoz de arteriosclerosis. En este trabajo de investigación pretendemos conocer si los factores inflamatorios antes comentados se encuentran elevados y si se relacionan con el grado de RI. Es decir, trasladar los resultados encontrados in vitro, en modelos animales de arteriosclerosis precoz y en otras poblaciones de alto riesgo cardiovascular, a nuestro modelo. No existen en la actualidad estudios al respecto en la HFC.

La RI es una característica mayor de la HFC y es independiente del grado de obesidad y del fenotipo lipoproteico ^{145, 108, 146}. Además, la RI es un factor de riesgo cardiovascular en estos pacientes ¹⁴⁷.

Actualmente existe una gran evidencia de que en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis subyacen mecanismos inmunológicos e inflamatorios ^{148, 15}. Algunos estudios han demostrado que proteínas de fase aguda y algunas interleucinas fueron factores predictivos de progresión y gravedad de enfermedad coronaria. Se ha demostrado una fuerte asociación entre elevación de marcadores de inflamación y aumento de la RI ¹⁴⁹. Recientemente, en modelos animales y humanos, la inflamación crónica y el grado de estrés oxidativo se han relacionado con la obesidad y el desarrollo de RI ^{130, 131} y en la HFC se ha demostrado relación entre el grado de estrés oxidativo y la RI ^{150, 151}. En modelos humanos de dislipemia primaria y arteriosclerosis precoz se ha demostrado un aumento de la actividad inflamatoria y su relación con la RI, sin embargo, no se ha demostrado la relación entre inflamación y grado de RI en la HFC.

La PCR y otros marcadores de inflamación son factores predictivos de progresión y gravedad de enfermedad coronaria. Se asocian independientemente con la RI y otros marcadores de disfunción endotelial en la etapa inicial del proceso aterogénico.

Por ello planteamos la **hipótesis que en la HFC la RI debe estar relacionada con el grado de inflamación crónica y estado protrombótico.**

Objetivos

- a) Estudiar el nivel de inflamación en sujetos afectos de HFC y su relación con la RI.
- b) Estudiar el estado protrombótico en sujetos con HFC y su relación con la RI

Utilidad práctica

En sujetos HFC hemos encontrado RI y una respuesta alterada de la lipemia postprandial medida con la autodeterminación de triglicéridos capilares¹⁰⁸,¹⁰⁵. Esta alteración metabólica está relacionada con parámetros antropométricos y grado de resistencia a la insulina medida por índice HOMA. Asimismo, deberá existir una correlación entre los parámetros de inflamación y riesgo trombótico y el grado de RI.

Este conocimiento podría permitir desarrollar nuevos procedimientos diagnósticos de riesgo cardiovascular y diseñar nuevas dianas terapéuticas.

Estos beneficios tendrán una clara repercusión asistencial y de coste sanitario en el área de salud dada la elevada prevalencia de las enfermedades cardiovasculares y su repercusión en la mortalidad global de nuestro país.

III SUJETOS Y MÉTODOS

III. SUJETOS Y MÉTODOS

3.1. Sujetos

3.1.1. Grupo HFC

Se han estudiado 36 pacientes (17 mujeres y 19 varones) diagnosticados de HFC, procedentes de la Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV). El rango de edad de los pacientes estudiados fue de 22 a 78 años y un IMC entre 22.6 y 33,8 kg/m². Ninguno de ellos había presentado ningún episodio cardiovascular. La selección de los pacientes se realizó por muestreo consecutivo y todos ellos aceptaron su participación en el estudio firmando la hoja de consentimiento informado (Anexo).

3.1.1.1. Criterios de inclusión:

- Edad: mayor de 18 años.
- El diagnóstico de HFC se basó en los siguientes criterios:
- Historia familiar con patrón autosómico dominante de una dislipemia con fenotipo lipoproteico múltiple (IIa, IIb o IV).
- Dislipemia: colesterol y triglicéridos mayores del percentil 90 (CT \geq 200 mg/dL y/o TG \geq 150 mg/dL) con apo-B100 \geq 120 mg/dL.
- Situación basal, sin tratamiento farmacológico que pueda alterar los parámetros lipídicos o de inflamación.

3.1.1.2. Criterios de exclusión:

- Ingesta de alcohol \geq 30 g/día.
- Hábito tabáquico (si es exfumador, al menos un año).
- TSH $>$ 10 μ U/mL
- Enfermedad hepática avanzada (con insuficiencia hepática).
- Colestasis, definida por valores de γ -glutamyl transpeptidasa (GGT) $>$ 32 U/L, bilirrubina directa $>$ 0,2 mg/dL y fosfatasas alcalinas $>$ 250 mU/mL; valores máximos de nuestro laboratorio.
- Creatinina sérica $>$ 2 mg/dL o insuficiencia renal terminal en diálisis.
- Obesidad grave con IMC \geq 40 kg/m².
- Fluctuaciones ponderales mayores al 10% del peso corporal en los últimos tres meses.

- Seguimiento de dietas hipocalóricas para la reducción de peso.
- Medicación hipolipemiente o cualquier fármaco que modifique el perfil lipídico, situación de EO e inflamación y no pueda ser retirado 6 semanas antes de iniciar el estudio.
- Embarazo o lactancia en los 3 últimos meses.
- Enfermedad neoplásica metastásica.
- Pacientes en prevención secundaria (infarto agudo de miocardio, angioplastia transluminal, by-pass aorto-coronario, angor pectoris con test de esfuerzo positivo, ACV).
- Diabetes mellitus.
- Hipertensión arterial.
- Cualquier infección sufrida en las seis semanas previas al estudio.

3.1.2. Grupo control

Fueron estudiados 36 voluntarios sanos normolipidémicos (19 mujeres y 17 varones), con un rango de edad de 20 a 75, procedentes del personal del HCUV y familiares no afectados de los casos índice.

3.1.2.1. Criterios de inclusión:

- Edad: mayor de 18 años.
- CT < 200 mg/dL con TG < 200 mg/dL.
- Ausencia de antecedentes personales o familiares de dislipemia.

3.1.2.2. Criterios de exclusión:

Se siguieron los mismos criterios de exclusión que los aplicados para los pacientes, descartando además a los sujetos con apo-B100 \geq 120 mg/dL o tolerancia anormal a la glucosa.

3.2.. Métodos

Se ha diseñado un estudio de casos-controles. En ambos grupos se ha aplicado el siguiente protocolo de estudio, recogiendo:

- Parámetros antropométricos.
- Parámetros bioquímicos.

3.2.1. Parámetros antropométricos

Se determinaron los datos siguientes:

- Peso en kilogramos (kg), talla en metros (m) y el índice de masa corporal (IMC) en kg/m².
- Circunferencia de la cintura: se mide en el punto medio entre la espina ilíaca anterosuperior y el margen costal inferior. La medida se obtiene con una cinta métrica graduada en centímetros (cm) estando el sujeto en bipedestación y los brazos en posición anatómica¹⁴⁷.

3.2.2. Parámetros bioquímicos

En el Laboratorio Central del Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV) se realizan las siguientes pruebas:

Estudio del metabolismo lipídico basal, tras 12 horas de ayuno nocturno y sin medicación hipolipemiente (periodo de lavado de 6 semanas) con determinaciones de CT, TG, cHDL, cLDL, y apolipoproteína B100.

Estudio de insulinoresistencia, en las mismas condiciones, con determinación de glucemia e insulinemia basal.

Estimación de la glucemia media mediante la determinación de hemoglobina glicada A1c (HbA1c).

Determinación del marcador de inflamación proteína C reactiva de alta sensibilidad.

En el laboratorio de la Fundación de Investigación del HCUV (INCLIVA) se realiza el estudio de marcadores de inflamación y factores aterotrombóticos, con determinación de IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , adiponectina, ICAM, VCAM, MPO, MMP9 y PAI-1.

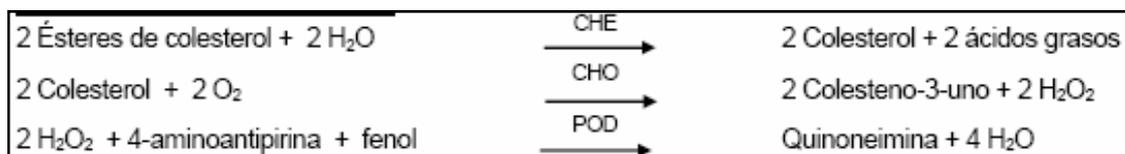
3.2.2.1. Perfil lipídico

Las muestras de sangre se obtienen por punción venosa tras 12 horas de ayuno nocturno y sin medicación hipolipemiente (periodo de lavado de 6 semanas). Se realiza la extracción con sistema de vacío en tubo sin aditivo

anticoagulante. Se mantiene a temperatura ambiente hasta la coagulación de la muestra y se centrifuga a 1600 g durante 10 minutos. Las muestras se procesan inmediatamente.

Colesterol total (CT):

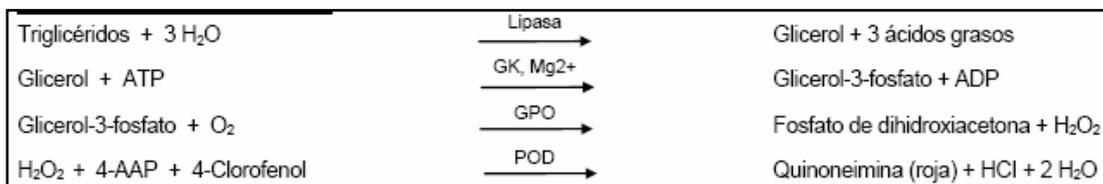
Se determina su concentración por un método enzimático colorimétrico ¹⁵², con reactivos comerciales de Olympus en un autoanalizador Olympus AU5400 (Olympus Life and Material Science Europa GmbH Lismeehan, O'Callaghan's Mills, Co. Clare, Irlanda). El método consiste en que los ésteres de colesterol de una muestra se hidrolizan mediante la enzima colesterol esterasa (CHE). El colesterol libre resultante se oxida con colesterol oxidasa (CHO) y se transforma en colesteno-3-uno, produciéndose simultáneamente peróxido de hidrógeno (H₂O₂) que se combina oxidativamente con 4-aminoantipirina y fenol en presencia de peroxidasa (POD), para dar lugar a un cromóforo. El incremento de absorbancia del colorante quinoneimina roja, formado en cantidad proporcional al colesterol total presente, se cuantifica espectrofotométricamente a 540/600 nm.



Triglicéridos (TG):

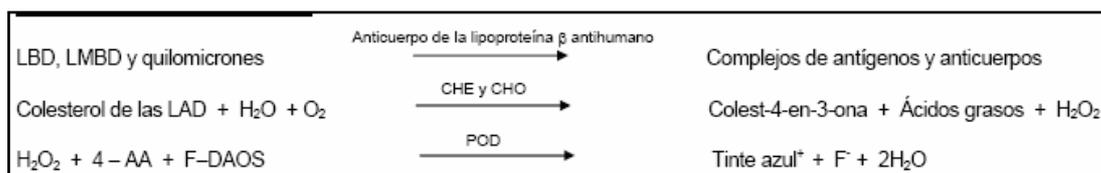
Se cuantifican por un método enzimático colorimétrico ¹⁵³, con reactivos comerciales de Olympus en un autoanalizador Olympus AU5400 (Olympus Life and Material Science Europa GmbH Lismeehan, O'Callaghan's Mills, Co. Clare, Irlanda). El método se basa en una serie de reacciones enzimáticas acopladas. Los triglicéridos de la muestra se hidrolizan con lipasas microbianas para obtener glicerol y ácidos grasos. El glicerol se fosforila con trifosfato de adenosina (ATP) en presencia de glicerolcinaasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato. Este glicerol-3-fosfato se oxida mediante oxígeno molecular en presencia de oxidasa de glicerolfosfato (GPO) para producir peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y fosfato de dihidroxiacetona. El H₂O₂ permite combinar oxidativamente p-clorofenol y 4-aminoantipirina (4-AAP) catalizada con peroxidasa (POD) para obtener un colorante rojo con una absorbancia máxima a 500 nm. El aumento de la

absorbancia es proporcional a la concentración de triglicérido contenido en la muestra.



Colesterol HDL (cHDL):

Se basa su determinación en la cuantificación del colesterol existente en la muestra por el método descrito para el colesterol total después de bloquear mediante anticuerpos anti-betalipoproteína humana la reacción de los ésteres de colesterol unidos a LDL, VLDL y quilomicrones¹⁵⁴ con reactivos comerciales de Olympus en un autoanalizador Olympus AU5400 (Olympus Life and Material Science Europa GmbH Lismeehan, O'Callaghan's Mills, Co. Clare, Irlanda)



Colesterol LDL (cLDL):

Se calcula aplicando la fórmula de Friedewald hasta concentración de triglicéridos inferior a 400 mg/dL. Cuando resulta superior, se determina con un método de medida directa con reactivos comerciales de Olympus en un autoanalizador Olympus AU5400 (Olympus Life and Material Science Europa GmbH Lismeehan, O'Callaghan's Mills, Co. Clare, Irlanda)

$$\text{Fórmula de Friedewald: cLDL} = \text{CT} - (\text{cHDL} + \text{TG}/5)$$

Colesterol LDL por medida directa:

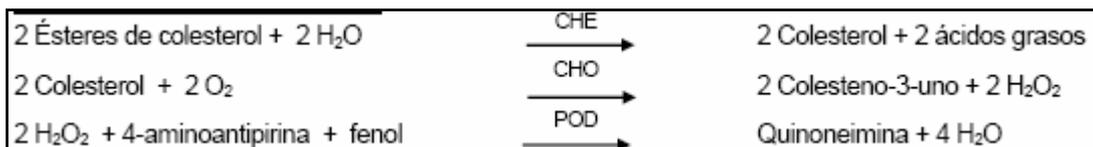
El método se desarrolla en dos etapas. En la primera se añade a la muestra un tensioactivo anfótero que actúa como agente protector de las LDL impidiendo la hidrólisis de los ésteres de colesterol unido a éstas, junto con las enzimas empleadas en la determinación del colesterol total. A continuación, todas las lipoproteínas que no sean de baja densidad (HDL, VLDL y

quilomicrones) se degradan por reacción con la esterasa de colesterol (CHE) y con la oxidasa de colesterol (CHO). El peróxido de hidrógeno (POD) resultante de esta reacción se descompone por efecto de la catalasa. En la segunda etapa se agrega *N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline (*HDAOS*) que libera el reactivo protector contenido en las LDL y acida sódica que desactiva la catalasa. Con ello ya es posible utilizar el sistema CHO/PAP para cuantificar exclusivamente el colesterol unido a las LDL ¹⁵⁵.

Primera etapa:



Segunda etapa:



Apolipoproteína B100 (Apo B100):

Se determina por un método inmunturbidimétrico empleando anticuerpos anti Apo-B100 de cabra ¹⁵⁶ con reactivos comerciales de Olympus en un autoanalizador Olympus AU5400 (Olympus Life and Material Science Europa GmbH Lismeehan, O'Callaghan's Mills, Co. Clare, Irlanda).

3.2.2.2. Perfil de insulinoresistencia:

La determinación del grado de resistencia a la insulina puede llevarse a cabo mediante técnicas de estimación directa o indirecta. Las primeras son de mayor complejidad, duración y coste y han sido relegadas de la práctica clínica ¹⁵⁷. Son:

La *técnica del clamp euglucémico-hiperinsulinémico*, considerada como el estándar-oro de los métodos que cuantifican la sensibilidad a la insulina in vivo, consiste en la infusión intravenosa de una cantidad fija de insulina y una variable

de glucosa para mantener una concentración prefijada de glucemia. El promedio de la glucosa infundida representa la sensibilidad a la insulina.

La prueba de *supresión pancreática* es un procedimiento para cuantificar la sensibilidad a la insulina que se basa en suprimir la secreción de insulina mediante la administración de fármacos. El protocolo más usado comprende la administración intravenosa de una cantidad fija de glucosa e insulina, así como propranolol y adrenalina. Suprimida la célula beta, aquellos individuos con mayor sensibilidad a la insulina serán los que tengan unas concentraciones de glucemia menores una vez alcanzado el estado estacionario. Esta ha sido mucho menos usada.

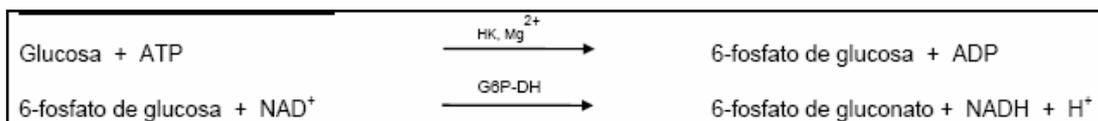
La técnica del *modelo mínimo* del metabolismo de la glucosa se basa también en la rotura matemática del feed-back glucémico-insulinémico, determinando la sensibilidad a la insulina en una situación experimental no estacionaria, a diferencia de las otras, mediante un test de tolerancia intravenosa a la glucosa con muestreo frecuente.

Los métodos de estimación indirectos, dada su menor complejidad, duración y coste, son los más utilizados actualmente. El método HOMA (*homeostasis model assessment*) es el más empleado en la práctica clínica. Se basa en la determinación de los valores plasmáticos de glucosa e insulina en ayunas y la aplicación de modelos matemáticos obtenidos previamente que de forma empírica hacen referencia a la relación que se establece entre glucemia e insulinemia y que se corresponden con dos variables: la sensibilidad a la insulina y la función de la célula β . Los resultados de este modelo proporcionan nomogramas en los que a cada par de valores de glucemia e insulinemia le corresponden otros dos de sensibilidad a la insulina y de funcionamiento de la célula beta pancreática, y viceversa.

Glucosa

La determinación se ha llevado a cabo por el método enzimático de glucosa hexoquinasa con reactivos comerciales de Olympus en un autoanalizador Olympus AU5400 (Olympus Life and Material Science Europa GmbH Lismeehan, O'Callaghan's Mills, Co. Clare, Irlanda) La glucosa se fosforila con hexoquinasa

(HK) en presencia de trifosfato de adenosina (ATP) e iones de magnesio para producir glucosa-6-fosfato y difosfato de adenosina (ADP). La glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH) oxida específicamente la glucosa-6-fosfato y produce 6-fosfogluconato con la correspondiente reducción de NAD⁺ a NADH. El aumento de la absorbancia a 340 nm es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra ¹⁵⁸.



Insulina

Se realiza la determinación mediante un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) con reactivos comerciales de Roche Diagnostics en un autoanalizador Modular Analyticis E170 (Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim, Alemania). El método consiste en un inmunoensayo con doble anticuerpo, tipo sándwich, en etapas.

En la primera incubación se une la insulina de la muestra, un anticuerpo monoclonal biotinilado específico anti-insulina procedente de ratón y un anticuerpo monoclonal específico anti-insulina procedente de ratón marcado con un quelato de rutenio (trisbipiridil-rutenio y tripropilamida) formando un complejo tipo sándwich.

En la segunda incubación, se incorporan micropartículas recubiertas de estreptavidina y el complejo anterior formado se fija a la fase sólida por interacción entre la biotina y la estreptavidina.

La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan temporalmente a la superficie de un electrodo de platino. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con un tampón de lavado. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador (figura 20).

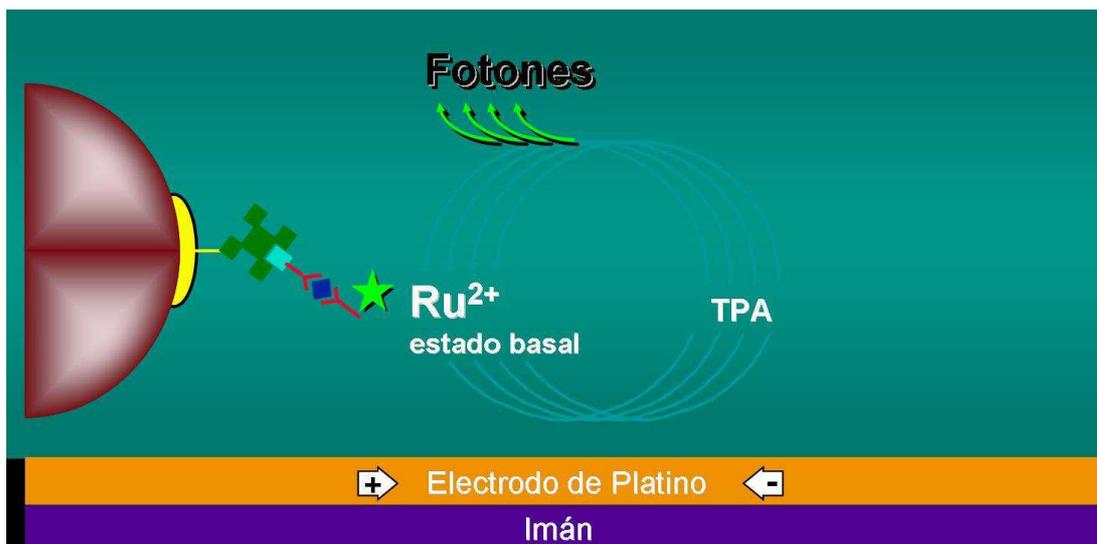


Figura 20. Inmunensayo electroquimioluminiscente para la determinación de insulina

Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración realizada en el sistema a partir de una calibración a dos puntos y una curva principal, incluida para cada lote por el fabricante, en el código de barras del reactivo ¹⁵⁹.

Cálculo del índice HOMA

El índice HOMA se calculó según la fórmula descrita por Matthews et al ¹⁶⁰.

$$\text{Índice HOMA} = \text{insulina } (\mu\text{U/mL}) * [\text{glucosa (mmol/L)} / 22,5]$$

Este índice es considerado como un índice indirecto de insulinoresistencia. Estudios de Ascaso y colaboradores han demostrado que un índice HOMA de 3,2, que corresponde al percentil 75 en sujetos de la Comunidad Valenciana, define la situación de insulinoresistencia ^{161, 162}.

3.2.2.3 Determinación de marcadores de inflamación y riesgo aterotrombótico.

Incluye las determinaciones plasmáticas de IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , adiponectina, ICAM, VCAM, MPO, MMP9, PAI-1 y PCR de alta sensibilidad (PCRas, rango de 0 a 3 mg/L).

La elección de los marcadores de inflamación y riesgo aterotrombótico a determinar en este estudio se fundamenta en la estrecha relación de estos

marcadores con el proceso de inflamación y aterosclerosis que ilustran las siguientes figuras (tomadas de Hansson, G. 2005, N Eng J Med) ¹⁶³:

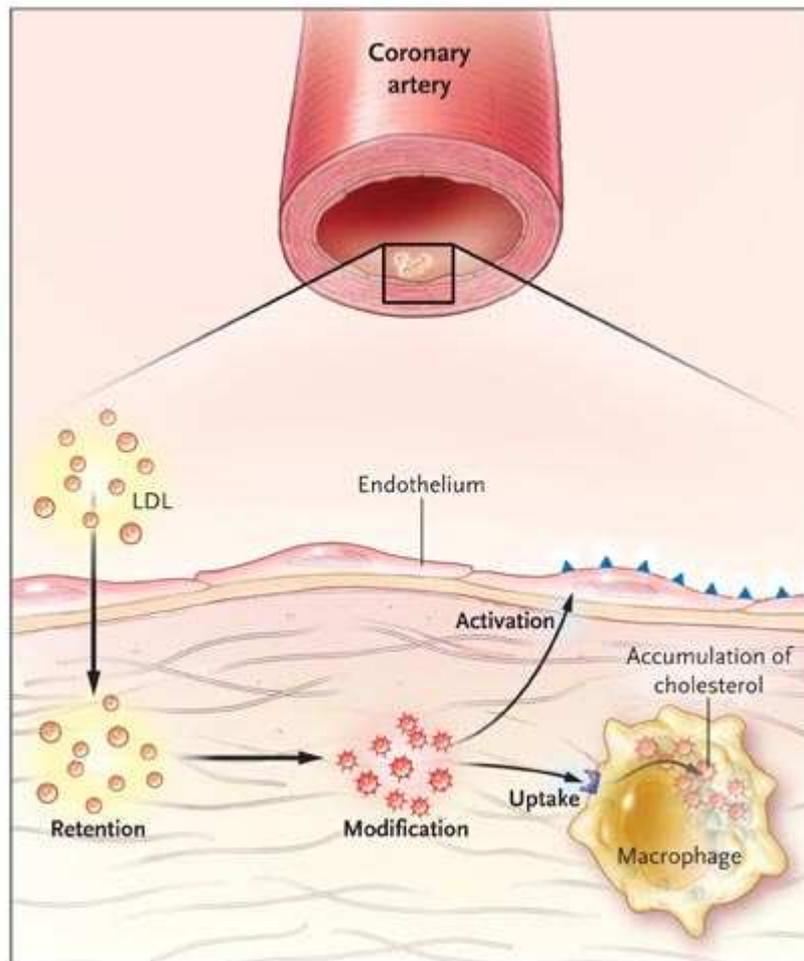


Figura 21. Infiltración LDL e inflamación de la arteria. En pacientes con hipercolesterolemia, el exceso de LDL se infiltra en la arteria y se retiene en la íntima, especialmente en los sitios de tensión hemodinámica. Las modificaciones oxidativas y enzimáticas conducen a la formación de lípidos proinflamatorios que inducen a las células endoteliales a expresar moléculas de adhesión de leucocitos. Las partículas de LDL modificadas son captadas por los receptores scavenger de los macrófagos, que evolucionan a células espumosas.

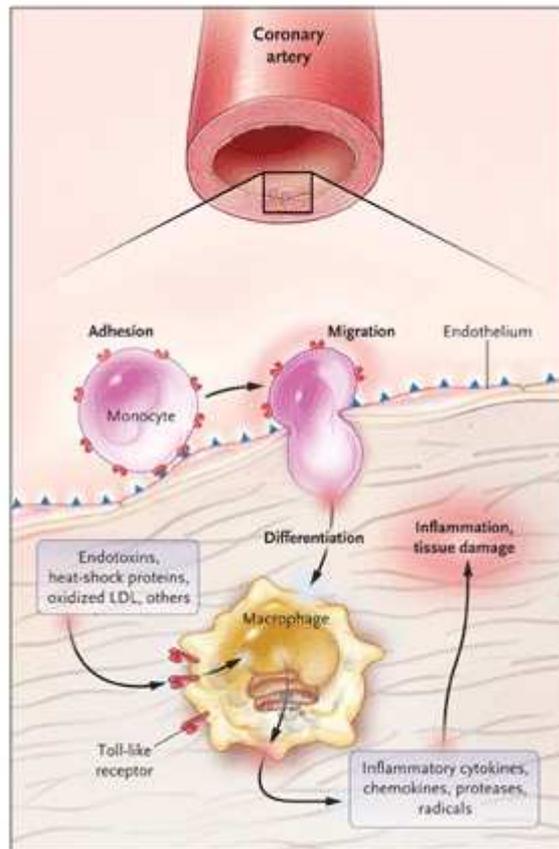


Figura 22. Papel de los macrófagos en la inflamación de la arteria. Los monocitos reclutados a través del endotelio activado se transforman en macrófagos. Estos expresan receptores tipo *toll* que inducen la activación y liberación de citoquinas inflamatorias, quimiocinas, radicales de oxígeno y nitrógeno, y otras moléculas inflamatorias y, en última instancia, a la inflamación y daño tisular.

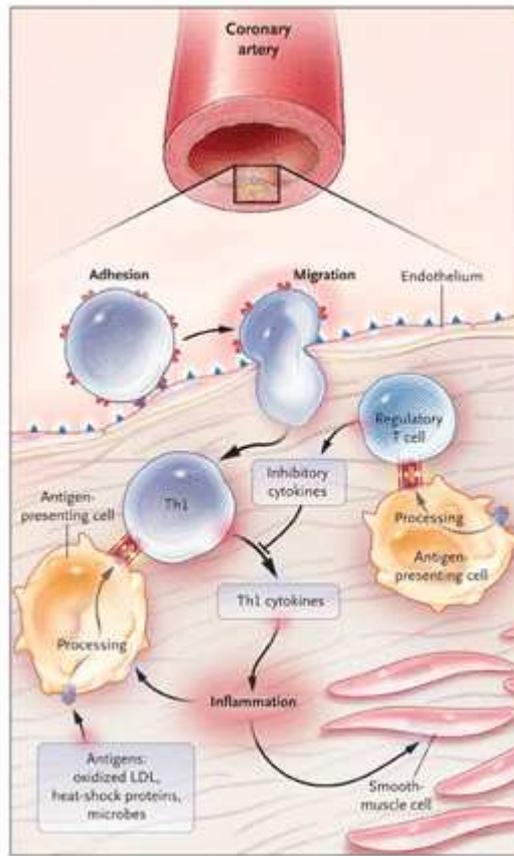


Figura 23. Los antígenos presentados por los macrófagos y células dendríticas desencadenan la activación de las células T específicas de antígeno en la arteria. La mayoría de las células T activadas producen citoquinas Th1, que activan los macrófagos y células endoteliales que conducen a la inflamación. Las células T reguladoras modulan el proceso mediante la secreción de citoquinas antiinflamatorias (como la IL-10).

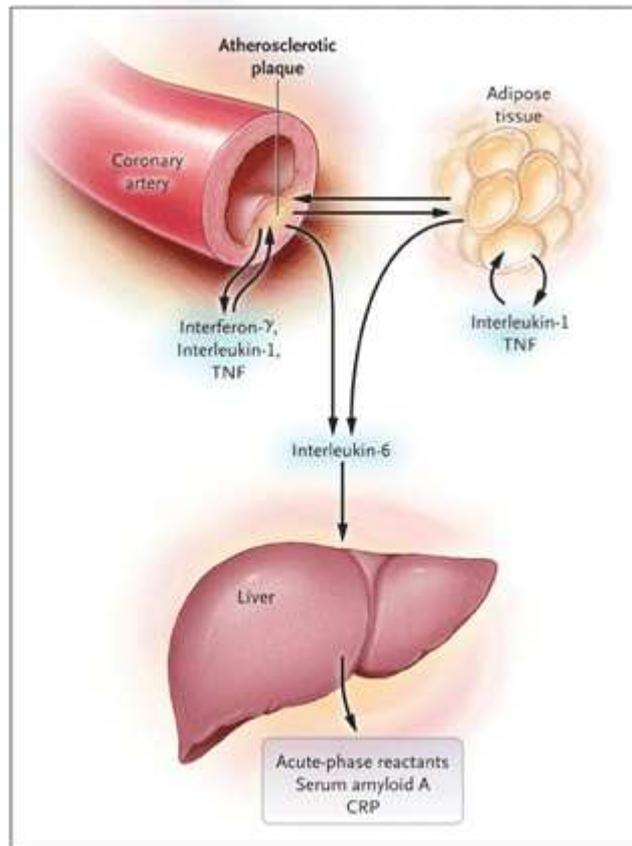


Figura 24. La cascada de citoquinas. Las células inmunes activadas en la placa producen citoquinas inflamatorias (interferón, IL-1 y TNF- α), que inducen la producción de cantidades sustanciales de IL-6. Estas citoquinas también se producen en diversos tejidos en respuesta a la infección y en el tejido adiposo de los pacientes con síndrome metabólico. La IL-6, a su vez, estimula la producción de grandes cantidades de reactantes de fase aguda, incluyendo proteína C reactiva (PCR), el amiloide A sérico y el fibrinógeno, especialmente en el hígado. Aunque las citoquinas en todas sus etapas tienen importantes efectos biológicos, su amplificación en cada paso de la cascada hace que la medida de marcadores de inflamación tales como la PCR puedan resultar particularmente útiles para el diagnóstico clínico.

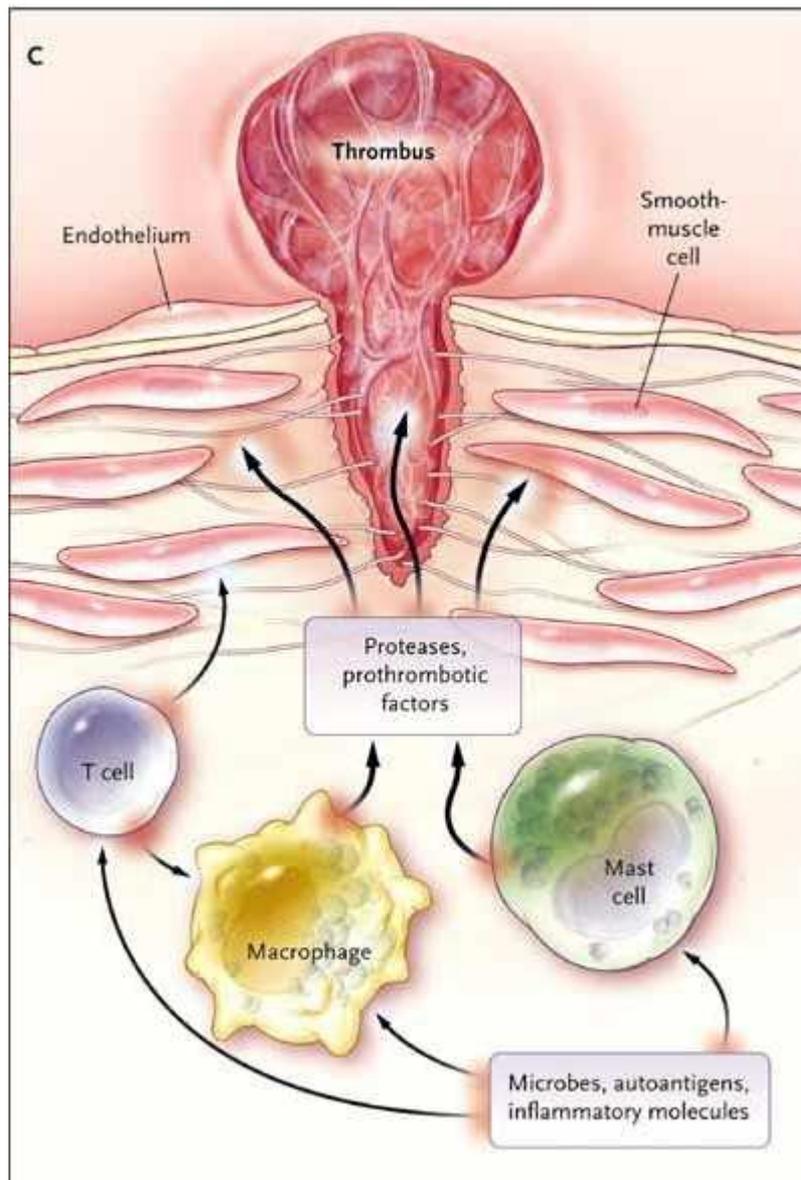


Figura 25. Lesión aterosclerótica en una arteria. Varias moléculas inflamatorias pueden activar las células T, macrófagos y mastocitos, lo que conduce a la secreción de citoquinas inflamatorias, que reducen la estabilidad de la placa. La activación de los macrófagos y los mastocitos también provoca la liberación de metaloproteinasas y cisteín proteasas, que atacan directamente al colágeno y otros componentes de la matriz tisular. Estas células también pueden producir factores protrombóticos y procoagulantes que desencadenan directamente la formación del trombo en el lugar de ruptura de la placa.

El proceso inflamatorio en la arteria aterosclerótica puede dar lugar a niveles sanguíneos elevados de estas citoquinas inflamatorias y reactantes de fase aguda. Los niveles de PCR y la IL-6 están elevados en pacientes con angina inestable e infarto de miocardio, los altos niveles predicen peor pronóstico. Los niveles de otros marcadores inflamatorios como IL-8 y TNF- α , están elevados en pacientes con angina inestable, una condición que es probablemente dependiente de la trombosis coronaria de las placas ateroscleróticas, no en aquellos con angina variante causada por vasospasmo. Colectivamente, estos hallazgos sugieren que la activación inmune inflamatoria en las arterias coronarias inicia síndromes coronarios agudos.

Las lesiones ateroscleróticas pueden liberar mediadores inflamatorios en la circulación sistémica (Figura 24). La elevación moderada de PCR sérica en un inmunoensayo de alta sensibilidad es un factor de riesgo independiente para la aterosclerosis coronaria en población sana¹¹³ al igual que las moléculas de adhesión ICAM y VCAM.

La adiponectina es una hormona producida específicamente por el tejido adiposo que tiene actividad insulinosensibilizante, antiinflamatoria y antiaterogénica. Recientemente se han descubierto además, funciones cardio y hepatoprotectoras y antiangiogénicas. Forma parte de la familia de las adipocitoquinas, péptidos activos secretados por el adipocito, que actúan en forma local (autocrina-paracrina) y sistémica (endocrina). En diferentes estados de resistencia a la insulina como la obesidad y la diabetes tipo 2 y en las enfermedades cardiovasculares, hay una disminución de la concentración de adiponectina. La cuantificación de esta proteína podría permitir la caracterización de estos pacientes en función del riesgo de desarrollar complicaciones si está disminuida su capacidad protectora. Presenta también un prometedor potencial terapéutico en el tratamiento de la AE.

El inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) se considera el principal regulador de la fibrinólisis *in vivo*^{164, 165}, papel que desempeña al inhibir la activación del plasminógeno a plasmina.

El sistema fibrinolítico tiene como objetivo la lisis de la fibrina depositada en el árbol vascular. Es un sistema reactivo a la activación de la coagulación y a la generación final de trombina. La plasmina, una serín-proteasa de 85kDa, es la

enzima central en este sistema. En condiciones normales circula por el plasma humano en forma de proenzima: el plasminógeno. La transformación del plasminógeno en plasmina la llevan a cabo los denominados activadores del plasminógeno: el activador tisular del plasminógeno (t-PA) y el activador tipo uroquinasa (u-PA).

La plasmina es una enzima extraordinariamente inespecífica capaz de degradar a la fibrina, al fibrinógeno, a los factores de la coagulación V y VIII entre otros sustratos. Para regular esta actividad proteolítica de la plasmina, el plasma humano posee un inhibidor muy selectivo y potente llamado alfa-2-antiplasmina. Los activadores del plasminógeno también están regulados por los inhibidores de los activadores del plasminógeno tipo 1 (PAI-1), tipo II (PAI-2) y tipo III (PAI-3). El más importante de ellos es el PAI-1. Se trata de una glucoproteína de 52kDa que se halla en el plasma a una baja concentración, encontrándose la mayor parte en las plaquetas, almacenado en los gránulos alfa, y su liberación se produce cuando se activan las plaquetas. El resto del PAI-1 se encuentra en la célula endotelial y en el hepatocito. El PAI-1 puede liberarse desde las células endoteliales mediante diferentes estímulos: trombina, endotoxinas bacterianas, citoquinas proinflamatorias, etc ¹⁶⁶.

3.2.2.3.1. Determinación de niveles sanguíneos: Tecnología Multiplex

Debido a que en la AE y otras enfermedades como la diabetes en estadios subclínicos cursan con niveles bajos o indetectables de marcadores séricos de inflamación cuando se emplean técnicas de inmunoensayo tipo ELISA o, incluso, quimioluminiscencia, se ha optado por aplicar una técnica multiplex de alta sensibilidad para la determinación de las citoquinas a estudio (LINCOp \textit{lex} High Sensitivity Human Cytokine Panel Milliplex®, Millipore). Esta técnica combina las ventajas del sistema Luminex con un inmunoensayo de alta sensibilidad para la cuantificación más exacta, precisa y reproducible de estas proteínas cuando se encuentran a concentraciones de escasos picogramos por mililitro. La tecnología multiplex xMAP® está patentada por Luminex Corporation (Austin, Texas, EE.UU.)

La tecnología xMAP® conjuga técnicas tradicionales en el campo de la investigación como la citometría de flujo y los inmunoensayos para desarrollar una

nueva herramienta que permite el análisis de hasta 100 biomarcadores para una misma muestra biológica de manera casi instantánea.

En primer lugar, se emplean unas microesferas (“beads”) de latex de 5,6 micras de diámetro agrupadas en familias. Cada familia de estas microesferas, contiene en su interior una determinada proporción de dos fluoróforos. Una vez excitados por un láser o un diodo emisor de luz (LED), uno de ellos emite en la franja del rojo del espectro electromagnético, mientras que el otro emite en la región del infrarrojo. Utilizando diferentes intensidades o proporciones de ambos fluoróforos, se consigue obtener un total de hasta 100 combinaciones diferentes para 100 familias de microesferas distintas, cada una de ellas con su patrón de fluorescencia característico (figura 26).

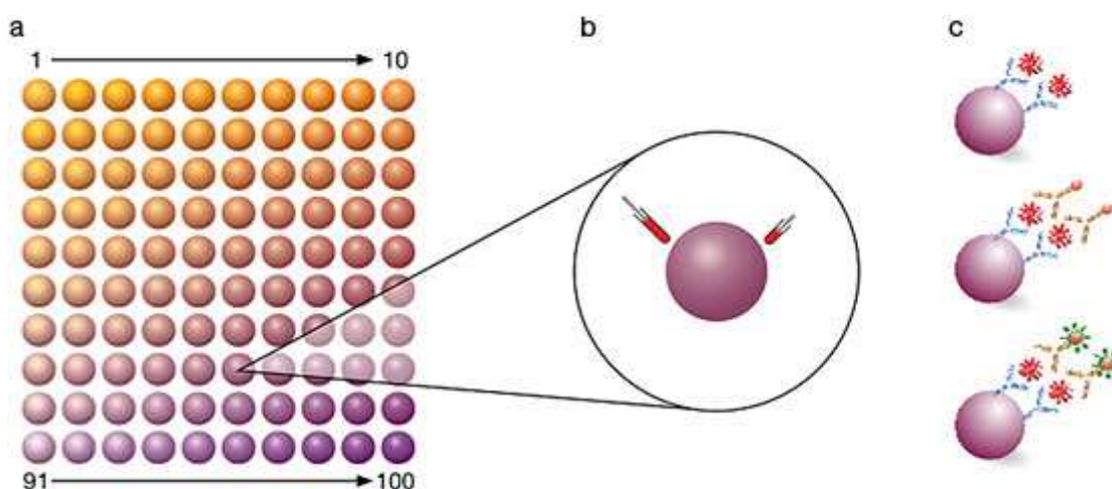


Figura 26. Inmunoensayo multiplex: Microesferas combinando gradualmente distintas proporciones entre los dos fluoróforos y su unión a los distintos anticuerpos de captura.

A la hora de realizar un ensayo, se pueden combinar diferentes familias de microesferas que serán diferenciadas por el sistema lector LuminexMAP® en función del patrón de fluorescencia interno. De ahí que se pueda llegar a analizar 100 biomarcadores en un único volumen de reacción. A la tecnología que presenta esta característica se le conoce comúnmente como “multiplex”.

La superficie de esta microesfera permite fácilmente la unión química a la misma de diferentes moléculas como anticuerpos monoclonales, oligonucleótidos, péptidos y receptores. Los fabricantes de reactivos para esta tecnología recubren la superficie de cada familia de beads con la molécula de interés para cada caso.

Por ejemplo, en el caso del desarrollo de un inmunoensayo multiplex para la detección de 10 analitos, tendríamos en nuestro kit, 10 familias de microesferas recubiertas con 10 anticuerpos diferentes de captura respectivamente. Así, la familia de esferas A estaría recubierta de anticuerpos dirigidos solo frente al antígeno α de nuestra muestra, la familia de esferas B solo frente al antígeno β y así respectivamente.

La tecnología xMAP[®] empleada en este estudio trabaja con placas de 96 pocillos y en cada uno de ellos pueden llegar a determinarse hasta 100 analitos diferentes. En primer lugar se adicionan las familias de microesferas a cada pocillo de reacción. Seguidamente, añadimos las muestras biológicas de interés (suero, plasma, líquidos biológicos, lisado de cultivos, etc.), de tal manera que en cada pocillo dispensemos una muestra diferente.

Durante una primera incubación, los péptidos de interés en nuestras muestras se unirán a los distintos anticuerpos que recubren las distintas familias de microesferas siguiendo el principio de unión “antígeno–anticuerpo”. Este tiempo de incubación puede variar en función de las características del inmunoensayo. Posteriormente y tras varios pasos de lavados donde se elimina el exceso de muestra y por lo tanto a todas aquellas moléculas que no se han unido a sus anticuerpos, se añadirá una mezcla de segundos anticuerpos de captura biotinilados y, posteriormente, marcados todos ellos con un mismo fluorocromo, la ficoeritrina (PE) unida a estreptavidina para su anclaje a biotina. El resultado de una segunda incubación será la formación de un inmunocomplejo tipo “sándwich” que comprenderá a la microesfera recubierta con anticuerpos, el antígeno de interés unido a la microesfera y un segundo anticuerpo unido al antígeno a través de otro epítipo diferente. Estos inmunocomplejos se encontrarán disueltos en el propio pocillo de reacción, de ahí que a este tipo de tecnología se le denomine vulgarmente como “array líquido” (figura 27).

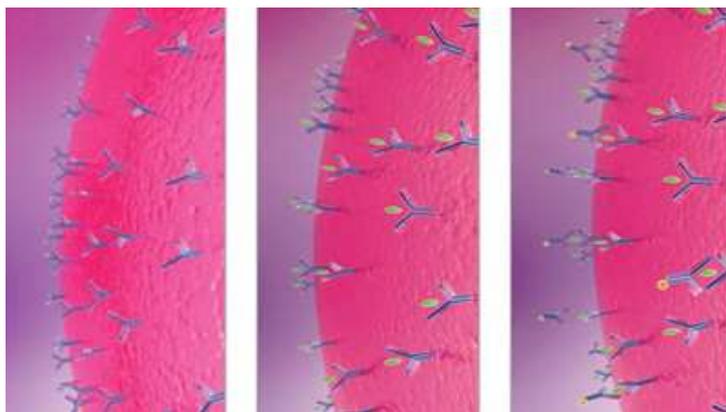


Figura 27. Primera y segunda incubación para formar el inmunocomplejo tipo “sándwich”.

La lectura final (previo lavado para eliminar el exceso de estos segundos anticuerpos marcados) de la presencia de estos inmunocomplejos se realizará en un citómetro LuminexMAP ®. Este equipo funciona a modo de un citómetro de flujo especializado y de igual manera que los citómetros tradicionales constituirá un flujo monopartícula líquido que hará pasar por una cámara de detección. En esta cámara se encuentran dos fuentes emisoras láseres. La primera de ellas (láser rojo) excitará a los fluoróforos contenidos en las microesferas que emitirán su patrón de radiación característica, proporcionando información sobre a que familia pertenece la microesfera analizada y por lo tanto sobre la especificidad del anticuerpo que recubre su superficie. El segundo láser por el contrario, excitará a la ficoeritrina anclada al segundo anticuerpo. En función de la cantidad de antígeno presente en la muestra, la intensidad de la fluorescencia emitida por la ficoeritrina variará siendo mayor a mayor cantidad de antígeno presente (figura 28).

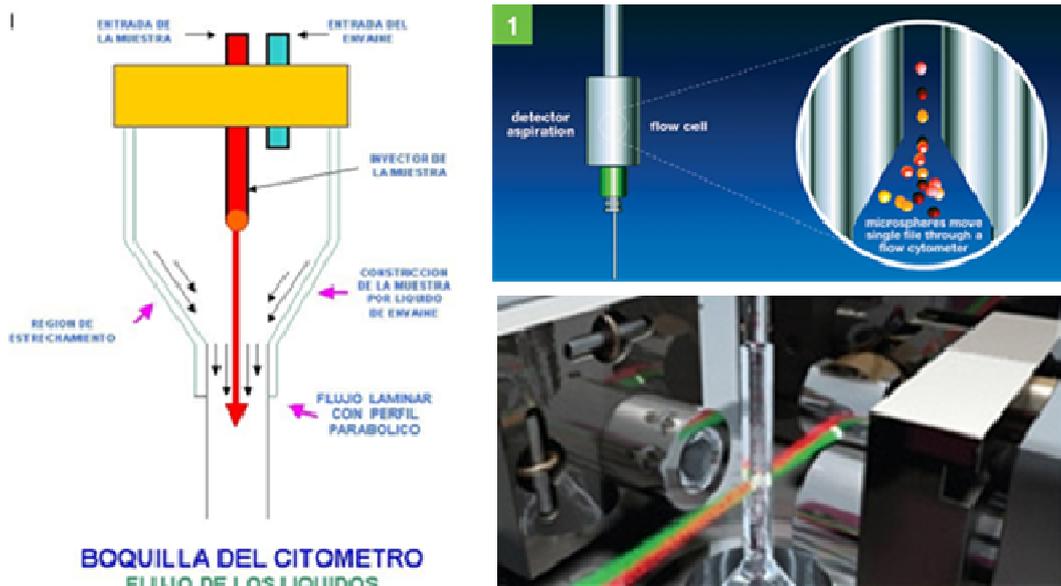


Figura 28. Citómetro: flujo monopartícula y fuentes emisoras de láseres

Puesto que la técnica es cuantitativa, el empleo de material calibrador nos permitirá confeccionar una curva de calibración donde podemos interpolar los valores de fluorescencia de las muestras con el fin de obtener las concentraciones de los distintos analitos.

Las ventajas de trabajar con la tecnología multiplex y más específicamente en el campo de los inmunoensayos, son diversas. En general se destacan su versatilidad, flexibilidad y reproducibilidad, pero es importante mencionar su rapidez y el ahorro de volumen de muestra que suponen:

- Por una parte, gracias a la velocidad de lectura y procesamiento de señales, las plataformas Luminex pueden analizar hasta 100 analitos simultáneamente en un solo pocillo. Esto confiere a esta tecnología una gran rapidez de procesamiento si la comparamos con los inmunoensayos convencionales (p.ej. ELISA).
- Por otra parte, el hecho de poder realizar múltiples inmunoensayos en un único pocillo de reacción, supone un descenso drástico en el volumen de muestra necesario para realizar experimentos, en comparación con técnicas no multiplex. Este aspecto es muy interesante en aquellos estudios en los que se necesita determinar un buen número de parámetros pero en los que se dispone de poco volumen de muestra. Con apenas 50 –

100 microlitos de suero o plasma pueden llegarse a determinar hasta 100 analitos.

Por último es relevante mencionar que con respecto a la tecnología de arrays en fase sólida, las técnicas xMAP® no se ven sujetas a las cinéticas de reacción inherentes a la fase sólida. Dado que el inmunoensayo se produce en disolución, las velocidades de reacción antígeno – anticuerpo son superiores, reduciéndose los tiempos de incubación.

3.2.2.3.2 Determinación de IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10 y TNF-α

Preparación y conservación de la muestra

La muestra de sangre se obtiene por punción venosa empleando la sal tripotásica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA-K3) como aditivo anticoagulante. A continuación se centrifuga a 1000g durante 10 minutos, se separan alícuotas en tubos de polipropileno y se congelan a -85°C.

Preparación de los reactivos para el inmunoensayo

1. Preparación de las microesferas con los anticuerpos inmovilizados

Las microesferas unidas a sus correspondientes anticuerpos y mezcladas se someten a sonicación durante 30 segundos y agitación en vórtex durante 1 minuto inmediatamente antes de usarse.

2. Preparación de los controles de calidad

Se reconstituyen con 250 µL de agua desionizada 2 muestras control liofilizadas para controlar la calidad analítica a distintos niveles de concentración de los constituyentes durante 10 minutos tras inversión, reposo y agitación para conseguir la expansión óptima del liofilizado.

3. Preparación del tampón de lavado

Se diluyen 30 mL de la solución tampón en 270 mL de agua desionizada.

4. Preparación de la matriz sérica

La matriz sérica se prepara diluyendo el suero matriz liofilizado con 5 mL de agua desionizada con inversión, reposo y agitación durante 10 minutos.

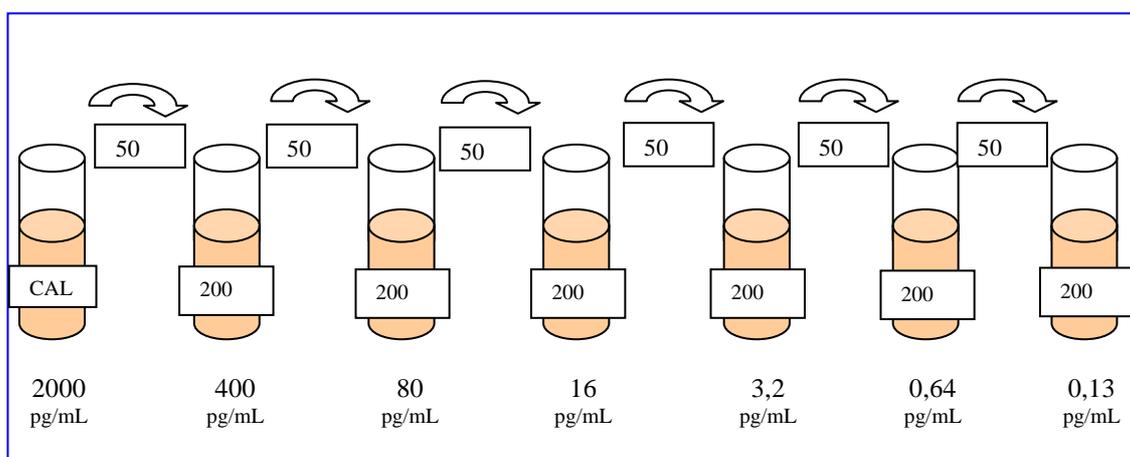
5. Preparación del calibrador del ensayo

En primer lugar se reconstituye el calibrador liofilizado con 250 μL de agua desionizada para conseguir una concentración de 2000 pg/mL en cada una de las interleucinas patrón. A los 10 minutos tras inversión, agitación y reposo, se pueden preparar las diluciones que originarán la curva de calibración.

6. Preparación de los calibradores de trabajo

Se preparan rigurosamente las diluciones tal como ilustran la tabla y el gráfico:

Concentración del calibrador (pg/mL)	Volumen de agua desionizada a añadir	Volumen de calibrador a añadir
2000	250 μL	0
400	200 μL	50 μL de 2000 pg/mL
80	200 μL	50 μL de 400 pg/mL
16	200 μL	50 μL de 80 pg/mL
3,2	200 μL	50 μL de 16 pg/mL
0,64	200 μL	50 μL de 3,2 pg/mL
0,13	200 μL	50 μL de 0,64 pg/mL



Inmunoensayo

La distribución de calibradores, controles y muestras en los pocillos de la placa del ensayo está determinada por el programa de lectura del citómetro.

Las muestras correspondientes al grupo de estudio y al grupo control siguen un orden aleatorio.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 pg/mL Cal (Blanco)	16 pg/mL Cal	Control 1	...								
B	0 pg/mL Cal (Blanco)	16 pg/mL Cal	Control 1									
C	0,13 pg/mL Cal	80 pg/mL Cal	Control 2									
D	0,13 pg/mL Cal	80 pg/mL Cal	Control 2									
E	0,64 pg/mL Cal	400 pg/mL Cal	Muestra 1									
F	0,64 pg/mL Cal	400 pg/mL Cal	Muestra 1									
G	3,2 pg/mL Cal	2000 pg/mL Cal	Muestra 2									
H	3,2 pg/mL Cal	2000 pg/mL Cal	Muestra 2									

Procedimiento

Añadir 200 μL de tampón de lavado en cada pocillo

Agitar 10 minutos y aspirar

- Añadir 25 μL de microesferas a cada pocillo y aspirar
- Añadir 50 μL de calibrador o control en sus correspondientes posiciones
- Añadir 50 μL de tampón de ensayo a los pocillos de blanco y muestras
- Añadir 50 μL de matriz sérica a los pocillos de blanco, calibradores y controles
- Añadir 50 μL de muestra en sus correspondientes pocillos

Tapar la placa e incubar agitando durante 16-20h a 4°C

Aspirar y lavar 2x con tampón de lavado

Añadir 50 μL de anticuerpo de detección a cada pocillo

Incubar 1h a TA

Añadir 50 μL de estreptavidina-ficoeritrina en cada pocillo

Incubar 30 minutos a TA

Aspirar y lavar 2x con 200 μL de tampón de lavado

Añadir 100 μL de líquido envolvente en cada pocillo

Lectura en el citómetro. Condiciones:
Volumen de aspiración 50 μL
Nº microesferas por lectura 50
Tiempo de lectura 60 seg

3.2.2.3.3. Proteína C reactiva de alta sensibilidad (PCRas).

Se determina mediante un método inmunonefelométrico con reactivos comerciales de Siemens en un nefelómetro BN II (Siemens Healthcare Medical Solutions, Alemania). El reactivo utilizado está compuesto por una suspensión de partículas de poliestireno recubiertas con un anticuerpo monoclonal de ratón contra la PCR humana.

La técnica consiste en que las partículas de poliestireno recubiertas con el anticuerpo específico contra la PCR humana, al mezclarse con muestras que contienen PCR, forman agregados, los cuales van a dispersar el rayo de luz incidente. La intensidad de la luz dispersada depende de la concentración de la

correspondiente proteína en la muestra. La valoración se hace por comparación con un estándar de concentración conocida.

El valor teórico de la PCR en el calibrador está estandarizado contra la preparación de referencia internacional BCR - CRM 470^{167, 168}.

3.2.2.3.4. Determinación de Adiponectina, ICAM, VCAM, MPO, MMP9 y PAI-1

La técnica multiplex empleada para la cuantificación de adiponectina, ICAM, VCAM, MPO, MMP9 y PAI-1 es la misma que para las interleucinas y el TNF- α . La diferencia entre ambos inmunoensayos se debe a las distintas magnitudes de concentración de los constituyentes y de estos entre sí, lo que origina la necesidad de trabajar con muestras diluidas y preparar los calibradores con diferentes concentraciones para cada analito (Human Cardiovascular Disease Panel de Milliplex®, Millipore).

Preparación y conservación de la muestra

La muestra de sangre se obtiene por punción venosa empleando EDTA-K3 como aditivo anticoagulante. A continuación se centrifuga a 1000g durante 10 minutos, se separan alícuotas en tubos de polipropileno y se congelan a -85°C. Las muestras se diluyen 1:50 para el análisis.

Preparación de los reactivos para el inmunoensayo

1. Preparación de las microesferas con los anticuerpos inmovilizados

Se sonica individualmente cada vial de anticuerpo unido a microesferas durante 30 segundos y se agita en vórtex durante 1 minuto. Se añaden 150 μ L de cada vial a un frasco donde se mezclan, se lleva el volumen final de éste a 3,0 mL con diluyente de microesferas y se mezcla bien con ayuda del vórtex.

2. Preparación de los controles de calidad analítica

Se reconstituye material control liofilizado a 2 niveles de concentración de constituyentes con 250 μ L de agua desionizada, se invierte el vial, se agita y se deja reposar al menos 10 minutos antes de usar.

3. Preparación de la solución de lavado

Se diluyen 30 mL de la solución tampón en 270 mL de agua desionizada.

4. Preparación del calibrador del ensayo

Se reconstituye el calibrador liofilizado con 250 μ L de agua desionizada para conseguir una concentración final de 250 ng/mL de VCAM-1 e ICAM-1 y de 50

ng/mL de MMP-9, MPO y PAI-1, se invierte varias veces mezclar y se deja en reposo unos 10 minutos.

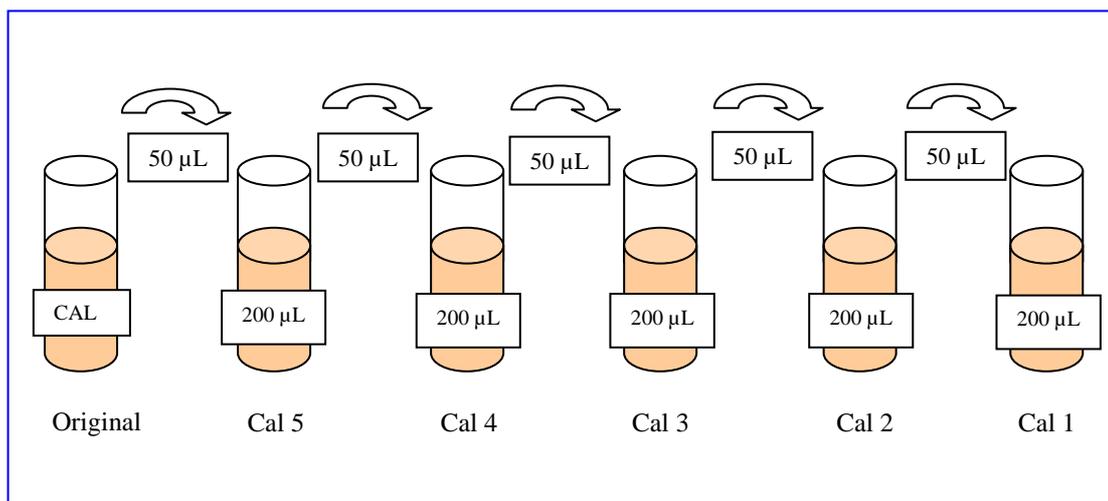
5. Preparación de los calibradores de trabajo

Se preparan rigurosamente las diluciones tal como ilustran la tabla y el gráfico:

Dilución del calibrador	Volumen de agua desionizada a añadir	Volumen de calibrador a añadir
Calibrador original	250 µL	0
Dilución del calibrador	Volumen de tampón del ensayo a añadir	Volumen de calibrador a añadir
Calibrador 5	200 µL	50 µL de cal. original
Calibrador 4	200 µL	50 µL de Calibrador 5
Calibrador 3	200 µL	50 µL de Calibrador 4
Calibrador 2	200 µL	50 µL de Calibrador 3
Calibrador 1	200 µL	50 µL de Calibrador 2

Las concentraciones de los calibradores quedan como sigue:

Dilución del calibrador	Adiponectina (ng/mL)	VCAM (ng/mL)	ICAM (ng/mL)	MMP-9 (ng/mL)	MPO (ng/mL)	PAI-1 (ng/mL)
	250	250	250	50	50	50
1:5	50	50	50	10	10	10
1:25	10	10	10	2	2	2
1:125	2	2	2	0,4	0,4	0,4
1:625	0,4	0,4	0,4	0,08	0,08	0,08
1:3125	0,08	0,08	0,08	0,016	0,016	0,016



Procedimiento

Añadir 200 µL de tampón de lavado en cada pocillo

Agitar 10 minutos y aspirar

- Añadir 25 µL de microesferas a cada pocillo y aspirar
- Añadir 25 µL de calibrador o control en sus correspondientes posiciones
- Añadir 25 µL de tampón de ensayo a los pocillos de blanco y muestras
- Añadir 25 µL de matriz sérica a los pocillos de blanco, calibradores y controles
- Añadir 25 µL de muestra en sus correspondientes pocillos

Tapar la placa e incubar agitando durante 16-20h a 4°C

Aspirar y lavar 2x con tampón de lavado

Añadir 25 µL de anticuerpo de detección a cada pocillo

Incubar 1h a TA

Añadir 25 µL de estreptavidina-ficoeritrina en cada pocillo

Incubar 30 minutos a TA

Aspirar y lavar 2x con 200 µL de tampón de lavado

Añadir 100 µL de líquido envolvente en cada pocillo

Lectura en el citómetro. Condiciones:
 Volumen de aspiración 50 µL
 Nº microesferas por lectura 50
 Tiempo de lectura 60 seg

3.2.4. Análisis estadístico

El tamaño muestral para el estudio transversal se calculó teniendo en cuenta un error alfa estándar del 5 %, un error beta del 20 %. La muestra comprende un mínimo de 20 controles sanos, y 20 sujetos con HFC.

La población diana de casos son los pacientes afectados de HFC controlados en nuestro centro. Los controles, sujetos sanos normolipidémicos no diabéticos, proceden del personal del Hospital Clínico Universitario y familiares no afectados de los casos.

La comparación de los parámetros estudiados entre ambos grupos se ha realizado con la prueba U de Mann-Whitney. La correlación entre dichas variables se ha estimado mediante el coeficiente de correlación de Spearman (spearman's rho).

Las comparaciones se han realizado, al menos, entre los resultados obtenidos en los grupos CONTROL con HFC y CONTROL con HFC afectos de RI (HFC HOMA>3,2). El análisis de correlaciones se ha realizado en los grupos CONTROL, HFC y HFC HOMA>3,2.

IV RESULTADOS

IV. RESULTADOS

Resultados obtenidos de la comparación de los parámetros analizados en el grupo afecto de HFC frente al grupo control.

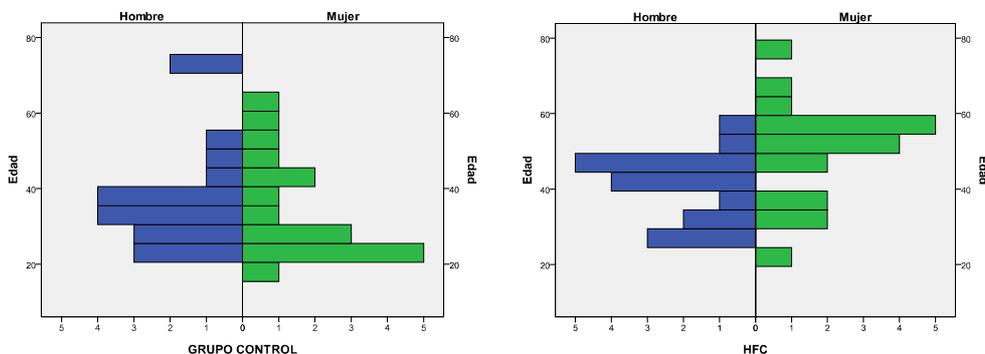
Se exponen a continuación los datos comparativos de ambos grupos en cuanto a sus características demográficas, antropométricas y los parámetros bioquímicos séricos estudiados del metabolismo lipídico, los relacionados con la resistencia a la insulina y los marcadores de inflamación y riesgo aterotrombótico.

4.1. Características demográficas

El grupo de afectados de HFC y el grupo control tienen el mismo número de sujetos. La proporción de hombres y mujeres en cada uno es ligeramente diferente. En cuanto a sus edades, no se presentan diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla 1)

Tabla 1. Características demográficas de ambos grupos

	GRUPO CONTROL	GRUPO HFC
Casos	36	36
Hombres/mujeres	19/17	17/19
Edad	46 (22-78)	41 (18-75)



4.2. Parámetros del metabolismo lipídico

Los parámetros lipídicos están implicados en la selección de los casos de HFC. Los niveles de CT, TG, cLDL y Apo B100 resultan, como consecuencia, claramente más elevados en los casos de HFC, presentando diferencias significativas respecto del grupo control (Tabla 2, Figuras 29, 30, 31, 32, 33 y 34). Las concentraciones de cHDL y ApoA son similares en ambos grupos.

Tabla 2. Comparación entre los parámetros lipídicos

	CONTROL				HFC				P
	n	mediana	P5	P95	n	mediana	P5	P95	
CT (mg/dL)	36	198	143	235	36	269	222	334	<0,001
TG (mg/dL)	36	84	39	201	36	134	59	518	<0,001
cHDL (mg/dL)	36	53	38	81	36	57	35	86	NS
cLDL (mg/dL)	36	124	75	167	36	174	135	241	<0,001
ApoA (mg/dL)	36	138	102	200	36	133	89	188	NS
ApoB (mg/dL)	36	89	55	117	36	121	109	167	<0,001

Figura 29. CT, (mg/dL)

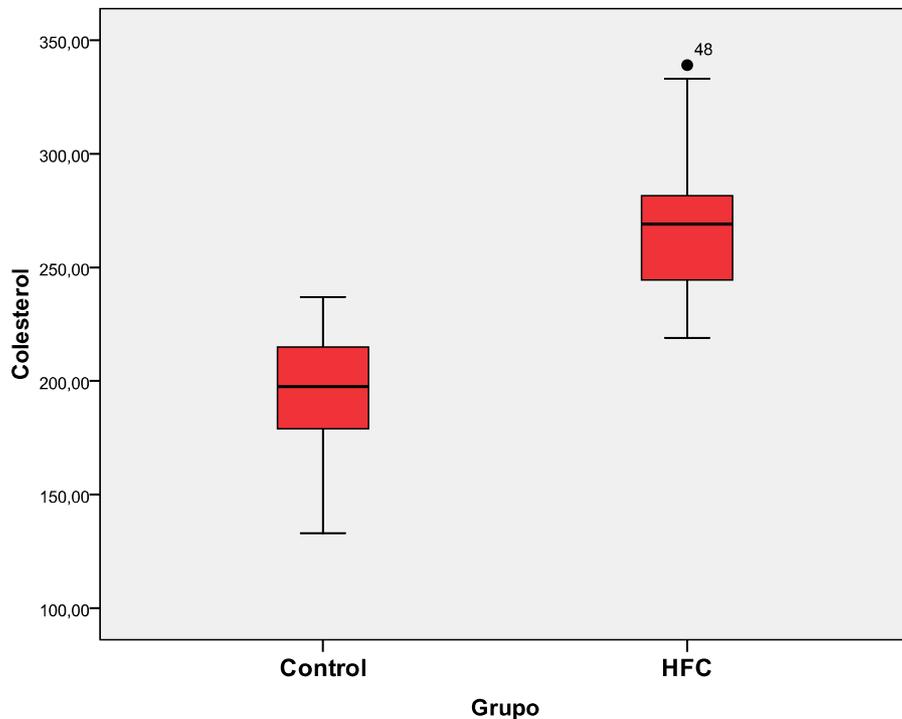


Figura 30. TG (mg/dL)

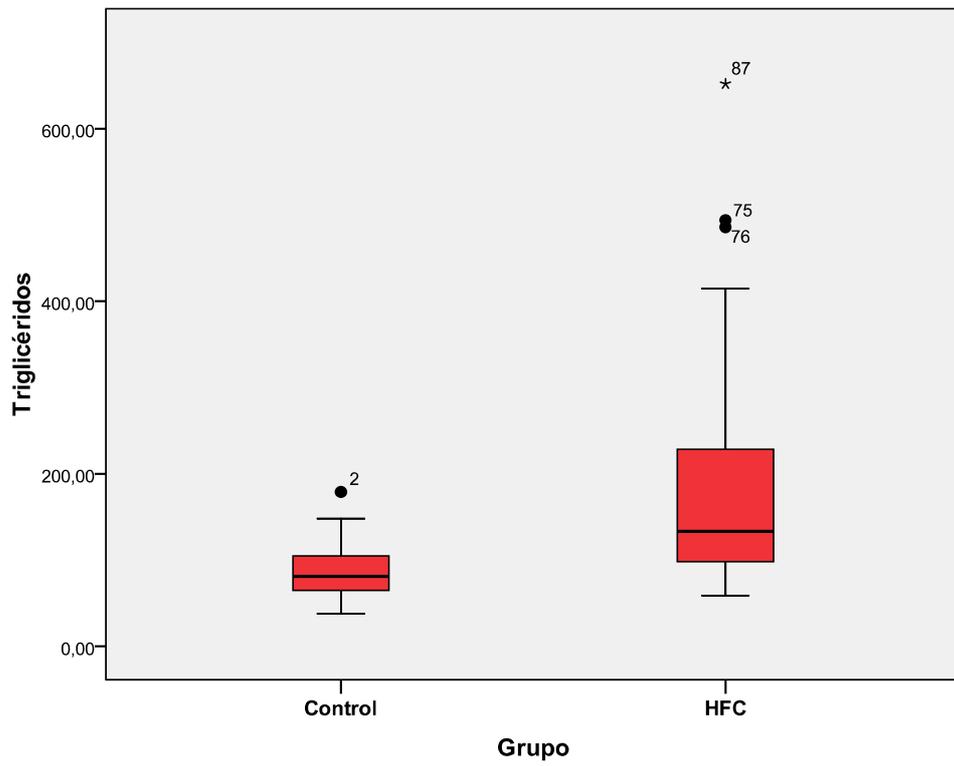


Figura 31. cLDL (mg/dL)

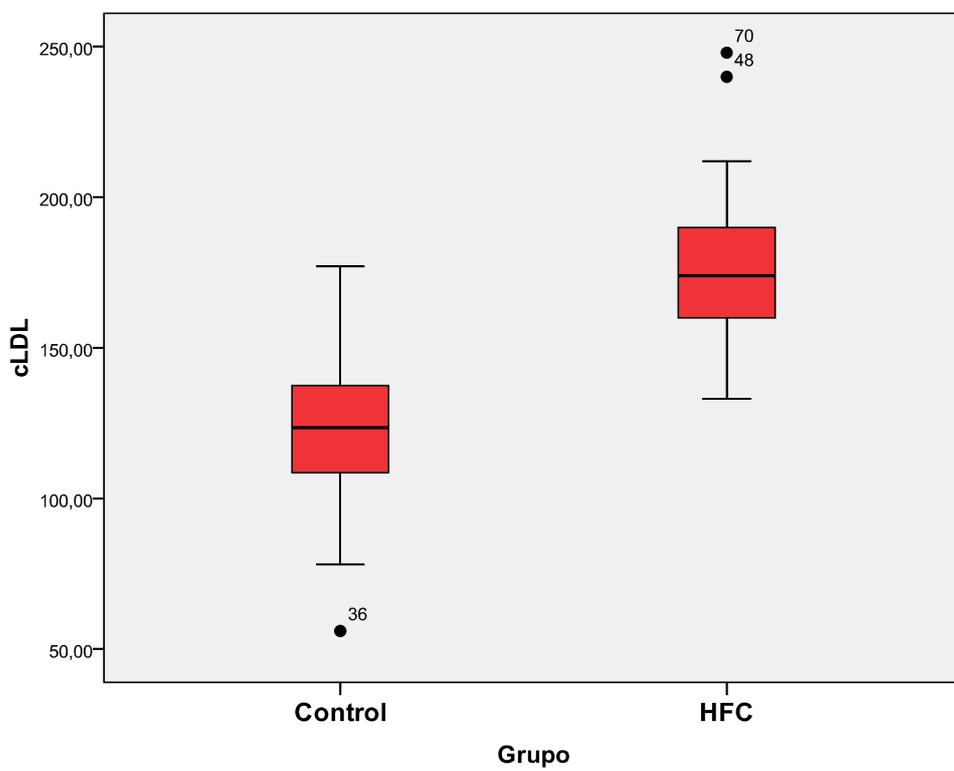


Figura 32. cHDL (mg/dL)

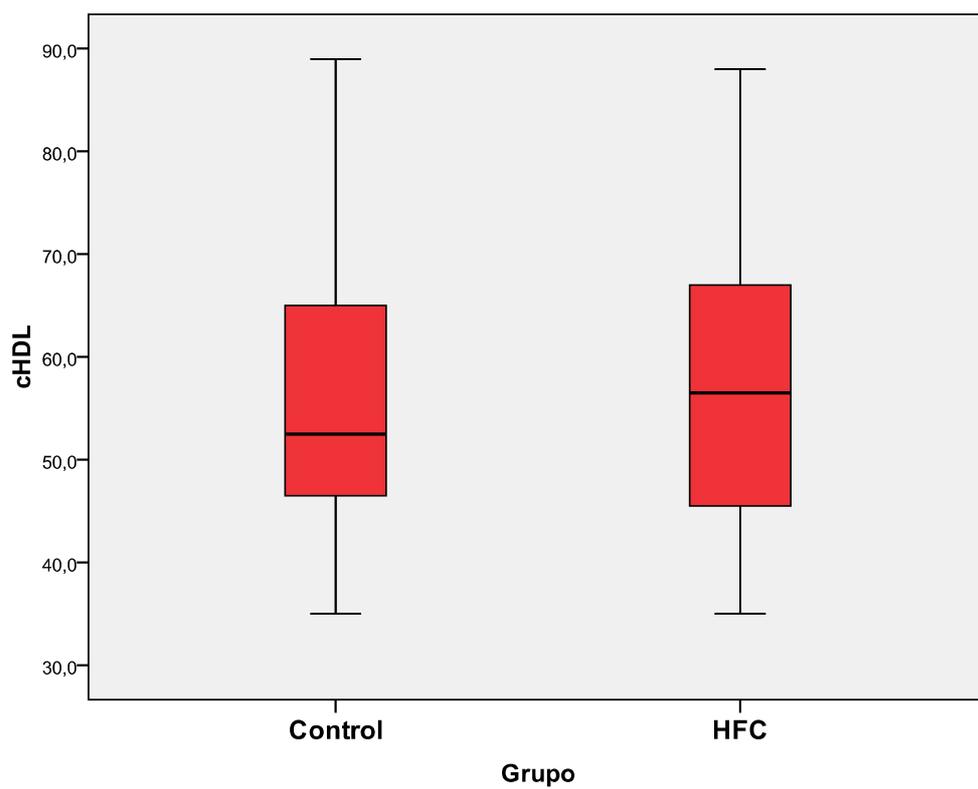


Figura 33. Apo B100 (mg/dL)

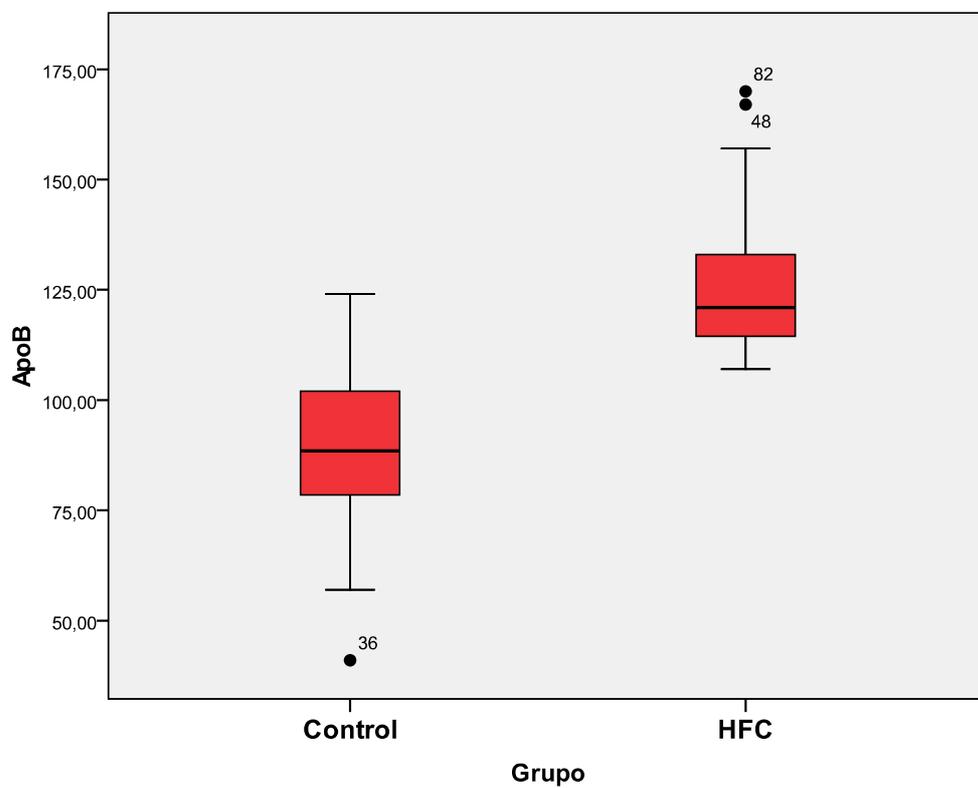
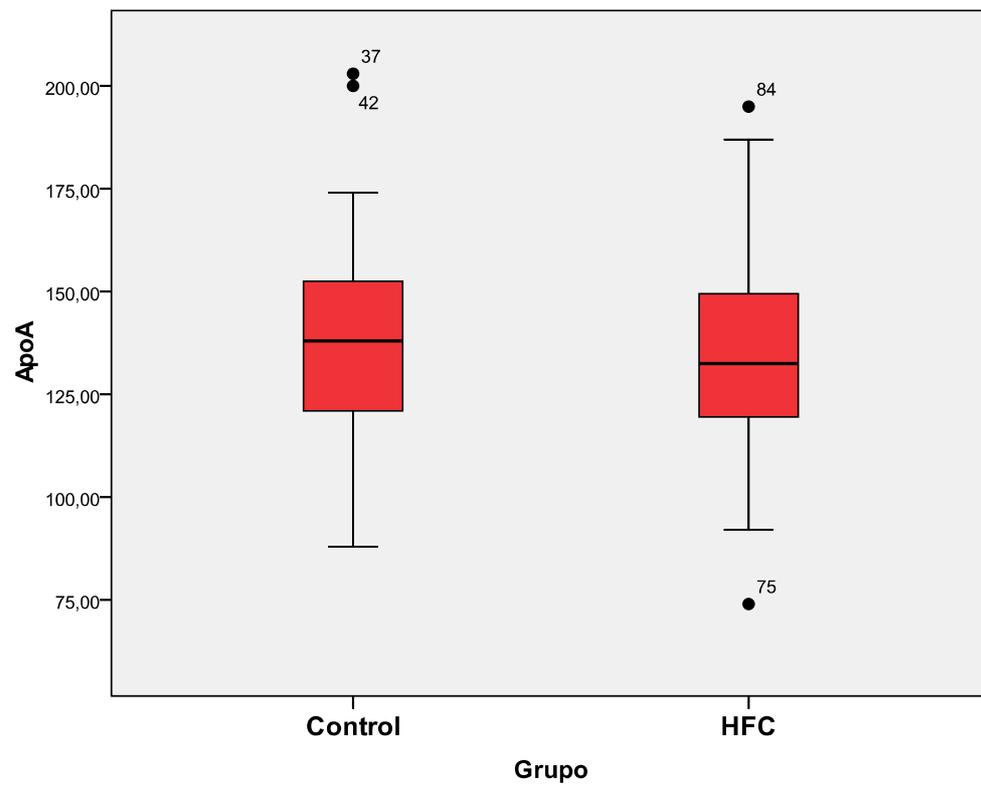


Figura 34. Apo A (mg/dL)



4.3. Parámetros de insulinoresistencia

Se valoran comparativamente los datos antropométricos IMC y perímetro de cintura y los bioquímicos séricos Glucosa e Insulina de los que se obtiene el índice HOMA de insulinoresistencia. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas en el IMC y perímetro de cintura; el grado de RI determinado mediante el índice HOMA resulta superior en el grupo HFC (Tablas 3 y 4, Figuras 35, 36, 37, 38 y 39).

Tabla 3. Descriptivos y comparaciones entre los parámetros de insulinoresistencia

	GRUPO CONTROL				GRUPO HFC				P
	n	Median	P25	P75	n	Median	P25	P75	
Índice Homa	36	1,84	1,02	2,7	36	3,02	1,6	4,2	,009
IMC (Kg/m²)	36	26,0	23,7	29,6	36	27,5	24,9	30,5	NS
Cintura (cm)	36	86,8	79,5	99,1	36	93,0	82,0	103,5	NS
Glucosa (mg/dL)	36	87	83	93	36	97	90	106	,001
HbA1c (%)	36	5,1	4,9	5,5	36	5,4	5,2	5,6	,011
Insulina (µU/mL)	36	8,2	4,6	11,9	36	12,1	7,4	16,2	,033

Tabla 4. Comparación independiente del perímetro de cintura entre hombres y mujeres

	CONTROL HOMBRES			HFC HOMBRES		P
	n	Media	SD	Media	SD	
Perímetro de cintura	19	93,7	11,3	98,6	8,7	NS
	CONTROL MUJERES			HFC MUJERES		P
	n	Media	SD	Media	SD	
	17	85,4	16,5	86,7	10,9	NS

Figura 35. IMC (kg/m^2)

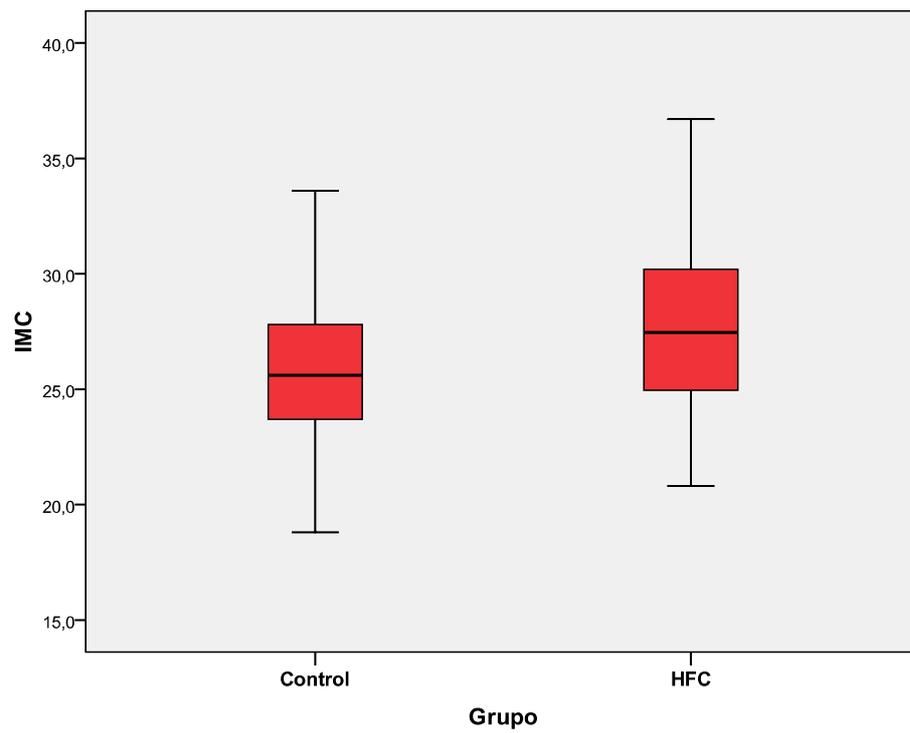


Figura 36. Cintura (cm)

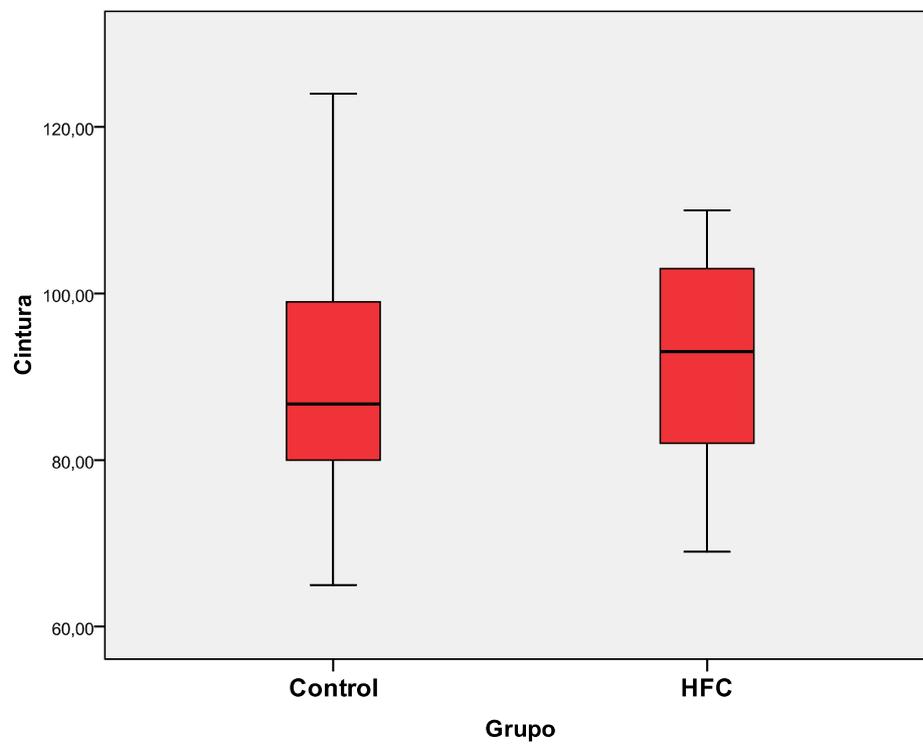


Figura 37. Glucosa (mg/dL)

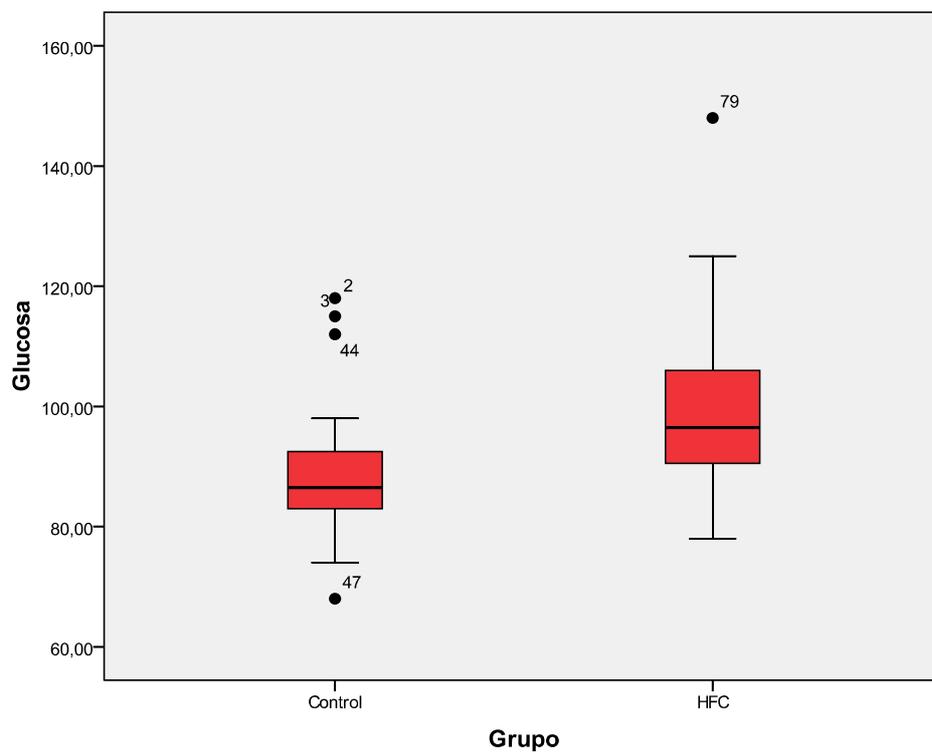


Figura 38. Insulina (μ U/mL)

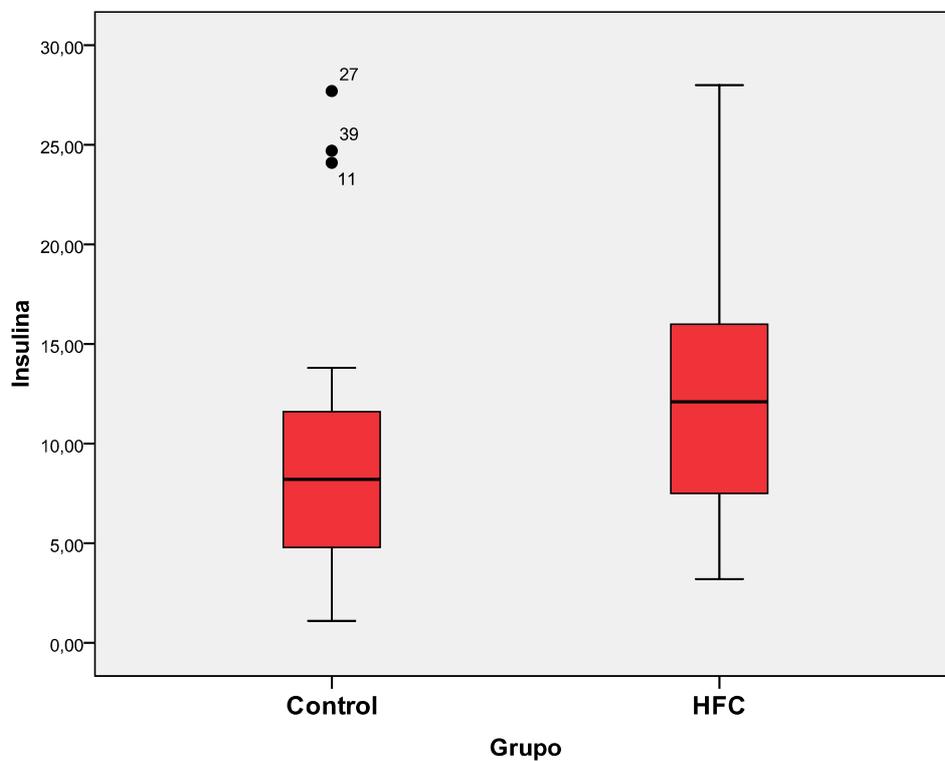
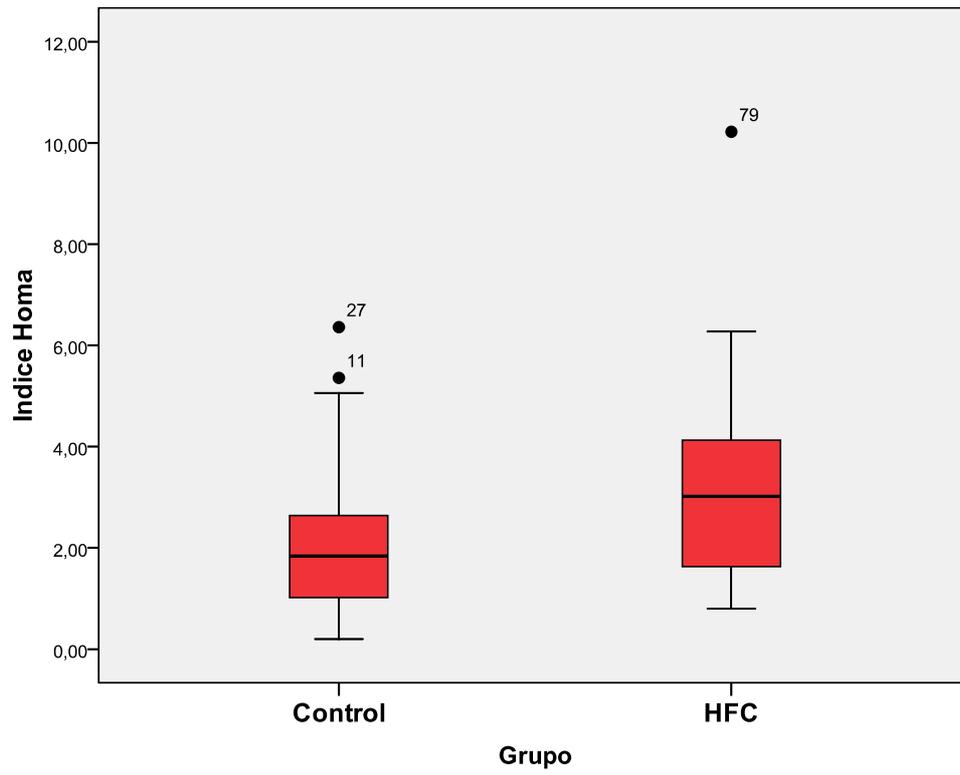


Figura 39. Índice HOMA



4.4.. Marcadores de inflamación y factores protrombóticos

Los marcadores de inflamación estudiados no han presentado diferencias significativas entre ambos grupos (Tabla 5, figuras 40, 41, 42, 43, 44 y 45):

		CONTROL				HFC			
	n	Mediana	P25	P75	n	Mediana	P25	P75	p
TNF-α (pg/mL)	36	9,9	5,5	13,2	36	10,1	6,8	13,2	NS
IL-6 (pg/mL)	36	15,2	6,4	28,0	36	13,1	7,5	30,1	NS
IL-8 (pg/mL)	36	3,6	2,6	5,1	36	3,7	2,6	6,4	NS
IL-10 (pg/mL)	36	51,1	18,3	71,0	36	47,6	14,8	85,0	NS
IL-1b (pg/mL)	36	1,0	0,4	2,7	36	1,2	0,4	2,3	NS
PCR (mg/L)	36	1,4	0,8	2,8	36	1,7	0,8	3,1	NS

Figura 40. TNF- α

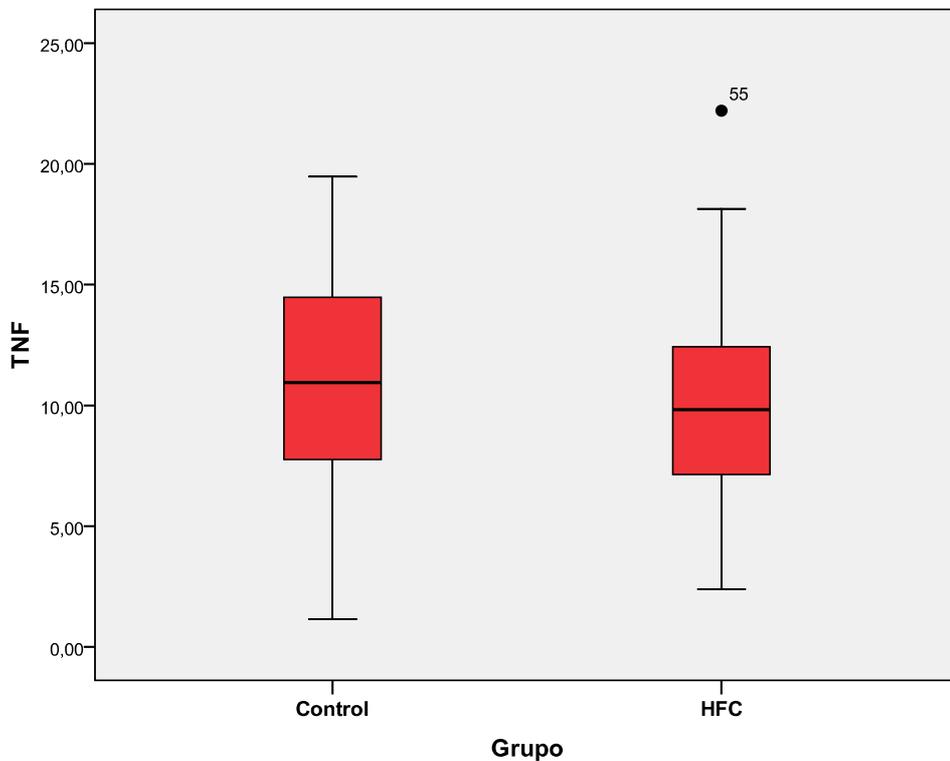


Figura 41. IL-6

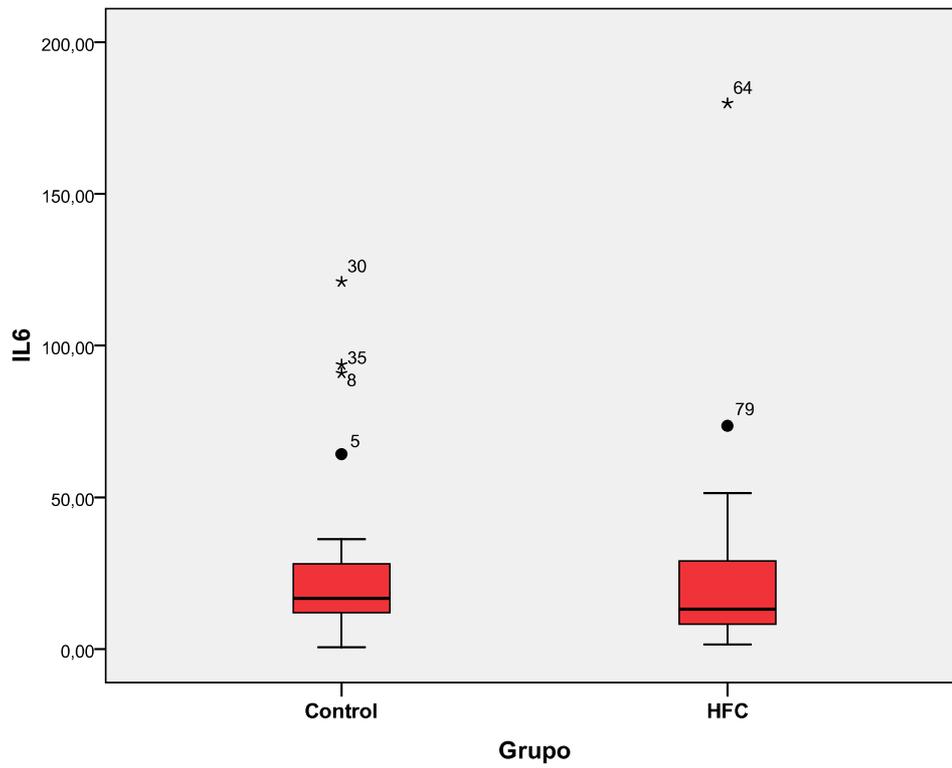


Figura 42. IL-8

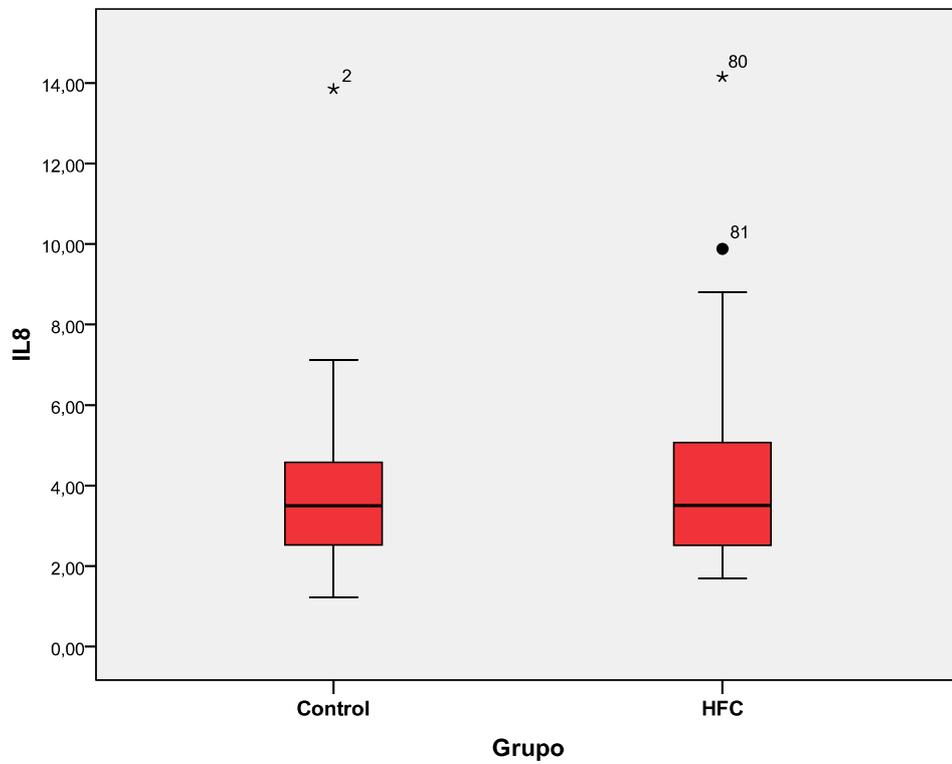


Figura 43. IL-10

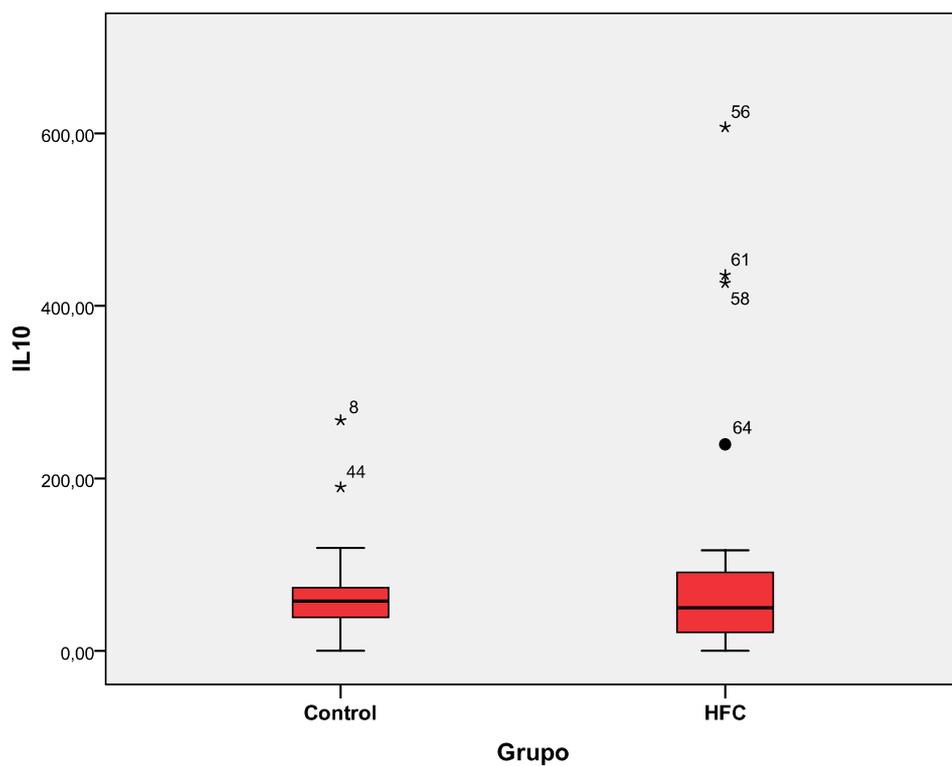


Figura 44. IL-1b

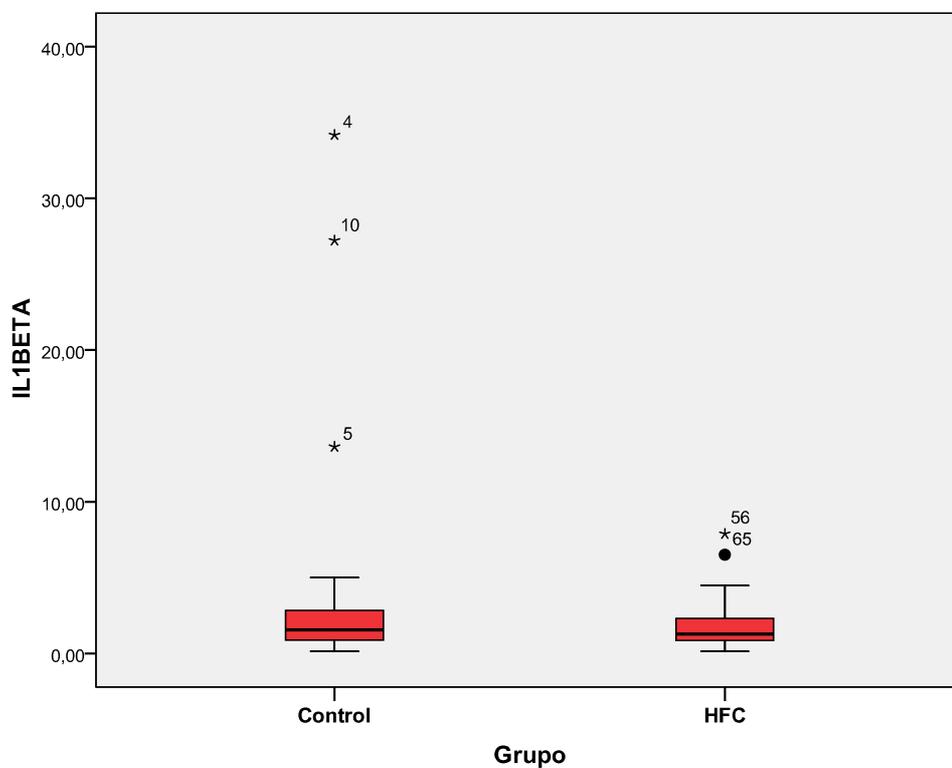
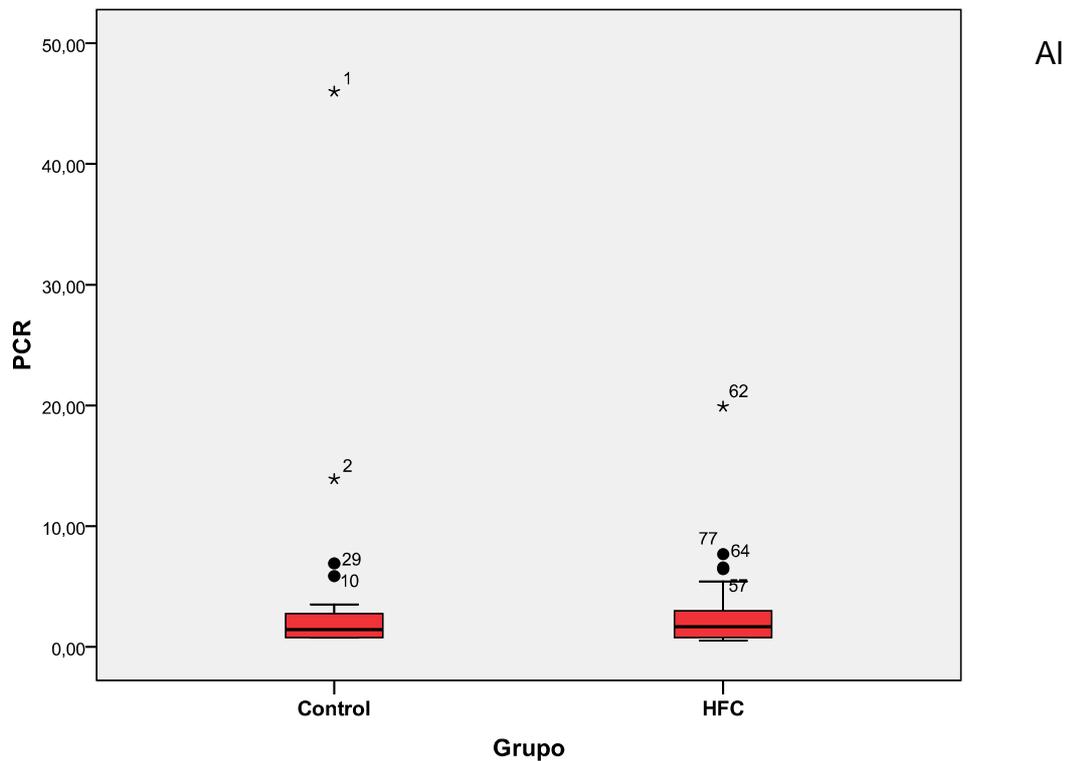


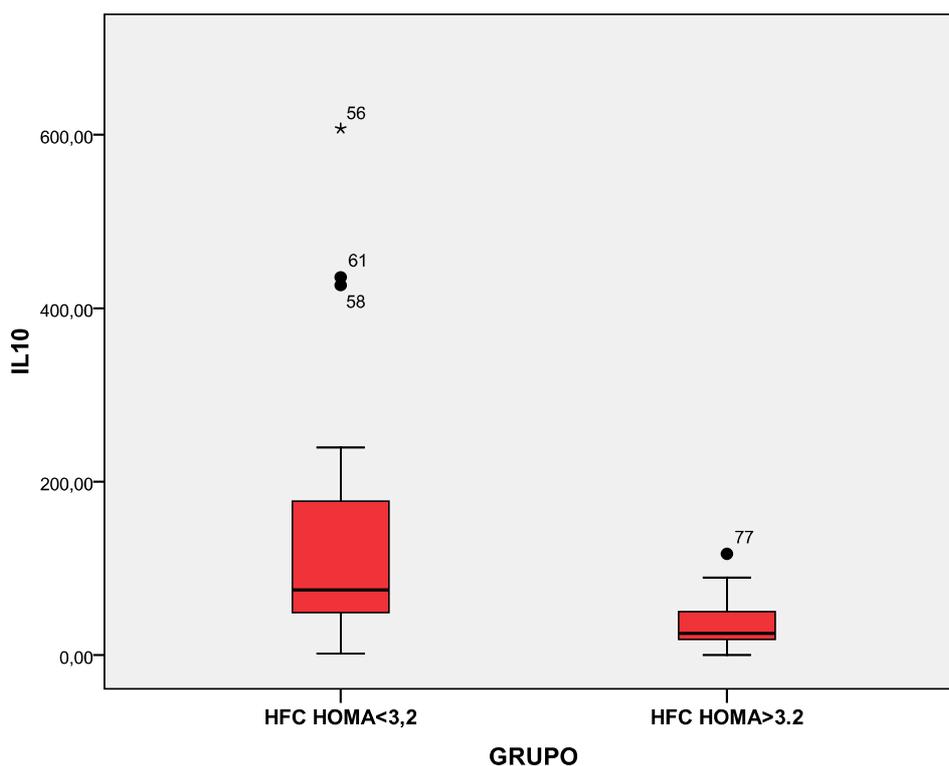
Figura 45. PCR



comparar los marcadores de inflamación entre los subgrupos HFC sin (HOMA<3.2) y con RI (HOMA>3.2), se observan valores de la interleucina antiinflamatoria IL-10 muy inferiores en los sujetos con RI (Tabla 6, figura 46):

	HFC HOMA<3,2				HFC HOMA>3,2				
	n	mediana	P25	P75	n	mediana	P25	P75	P
TNF-α (pg/mL)	19	9,8	6,4	11,6	17	10,5	7,4	13,9	,606
IL-6 (pg/mL)	19	20,3	10,6	36,0	17	10,2	7,2	18,0	,081
IL-8 (pg/mL)	19	3,2	2,3	4,0	17	4,6	2,9	7,6	,068
IL-10 (pg/mL)	19	75,2	48,2	208,5	17	25,1	16,4	54,2	,011
IL-1b (pg/mL)	19	1,7	1,1	3,9	17	1,0	,2	1,8	,077
PCR (mg/L)	19	1,6	,8	3,1	17	1,7	1,1	3,2	,470

Figura 46. IL-10



Entre los marcadores de riesgo aterotrombótico destacan los mayores niveles de PAI-1 en el grupo HFC respecto al grupo control. Esta diferencia no se aprecia en el resto de marcadores (Tabla 7, figuras 47, 48, 49, 50, 51 y 52):

	CONTROL				HFC				
(ng/mL)	n	mediana	P25	P75	n	mediana	P25	P75	P
Adipo.	36	20317	16706	23533	36	19918	15808	23244	NS
VCAM	36	933	824	1053	36	878	725	986	NS
ICAM	36	180	119	250	36	174	143	246	NS
MMP9	36	57	39	93	36	51	31	84	NS
MPO	36	10,8	9,5	16,1	36	12,1	8,1	26,4	NS
PAI-1	36	29	22	48	36	55	29	87	0,005

Figura 47. Adiponectina

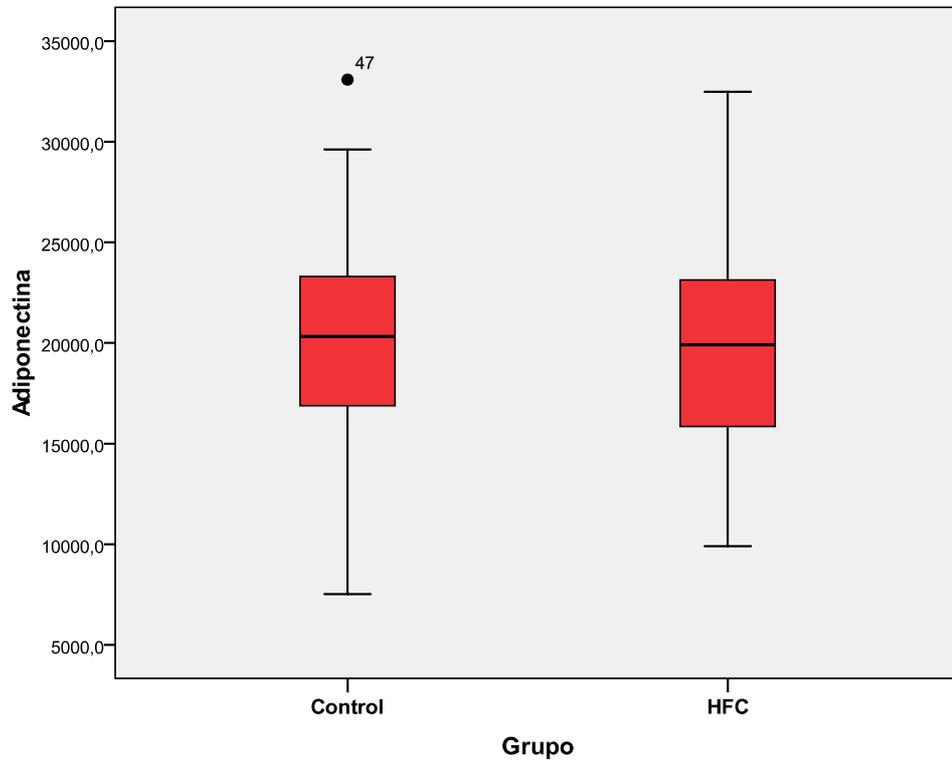


Figura 48. VCAM

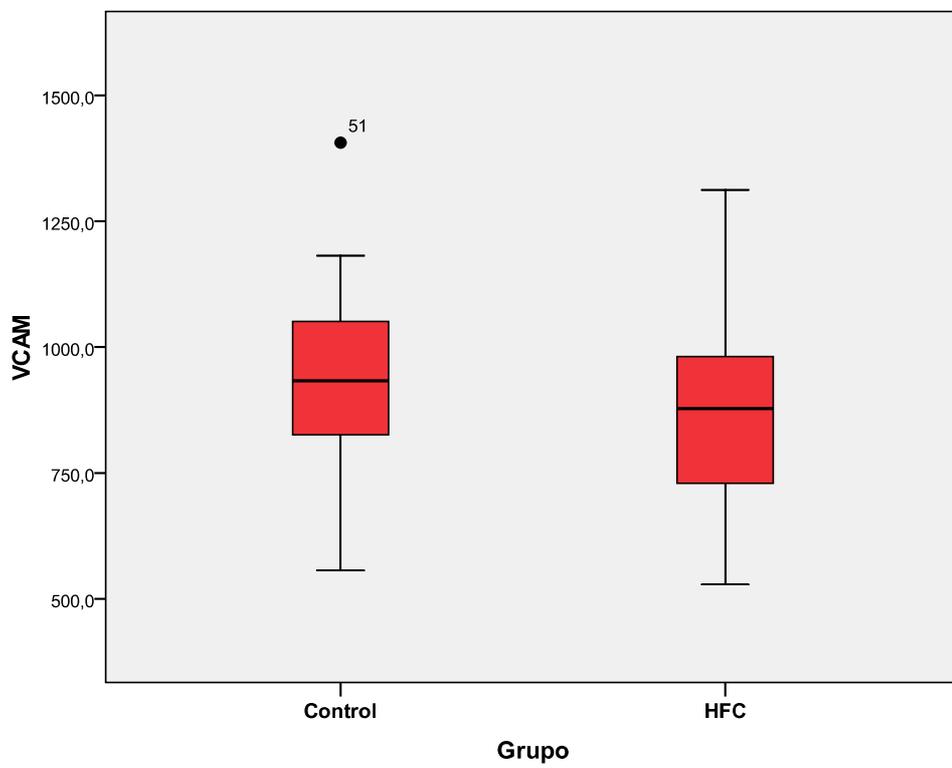


Figura 49. ICAM

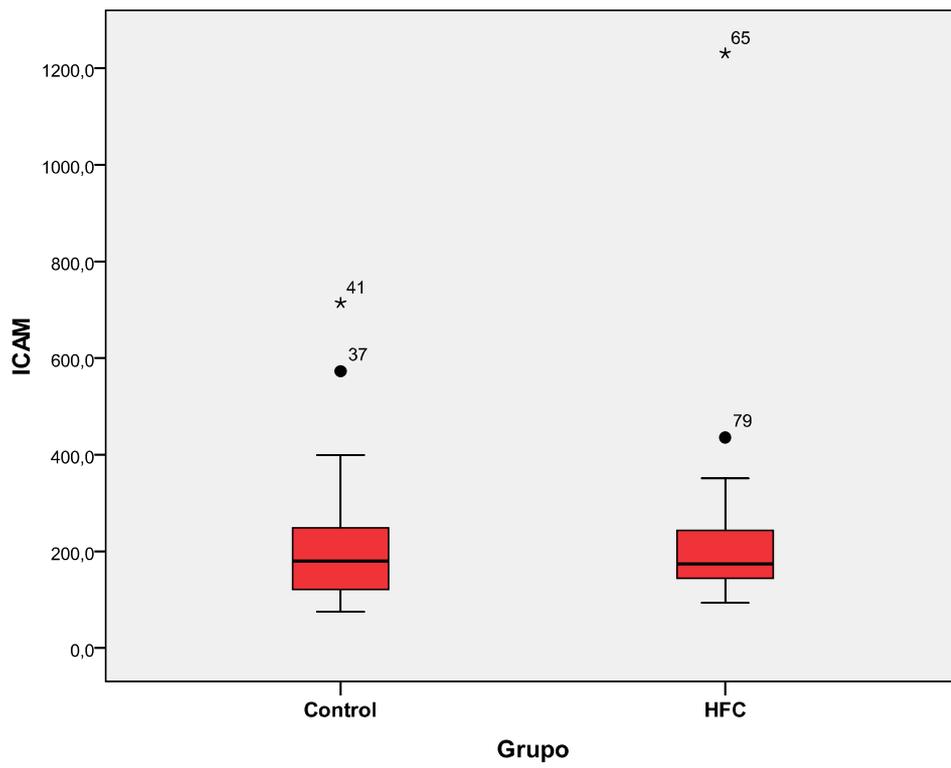


Figura 50. MMP9

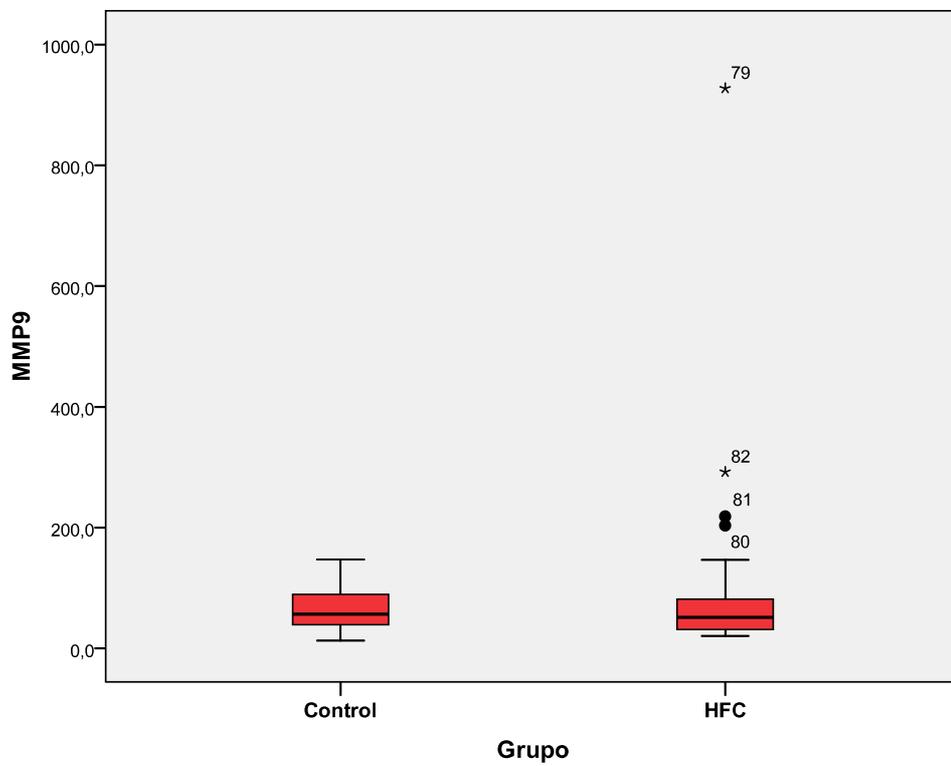


Figura 51. MPO

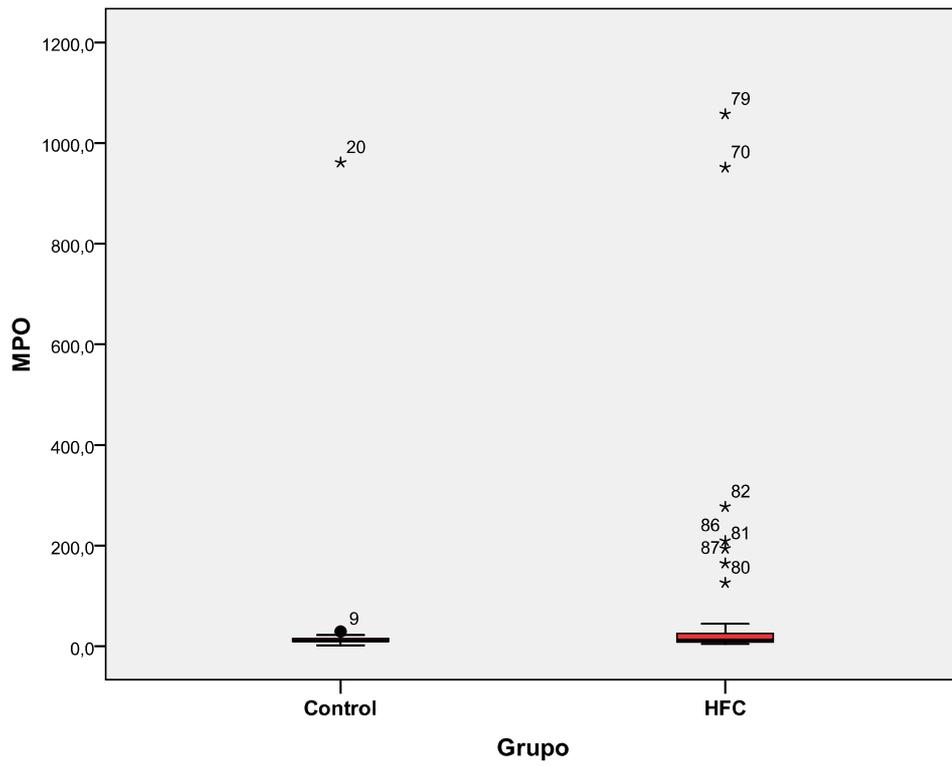
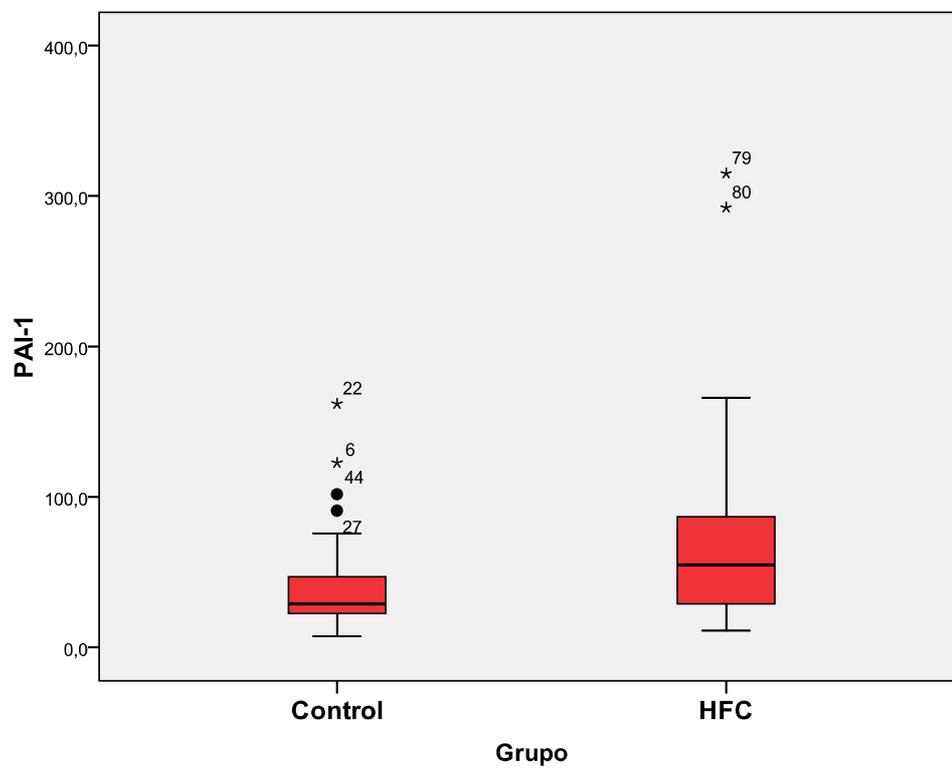


Figura 52. PAI-1



Cuando se han comparado los valores de PAI-1 entre el grupo control y los afectados de HFC sin RI (HOMA<3.2), ya no se detectan diferencias (Tabla 8):

	CONTROL				HFC HOMA<3,2				
(ng/mL)	n	mediana	P25	P75	n	mediana	P25	P75	P
Adipo.	36	20317	16706	23533	19	20564	16972	26420	NS
VCAM	36	933	824	1053	19	887	743	995	NS
ICAM	36	180	119	250	19	168	147	201	NS
MMP9	36	57	39	93	19	47	30	73	NS
MPO	36	10,8	9,5	16,1	19	9,4	7,2	12,7	NS
PAI-1	36	29	22	48	19	33	26	77	NS

Si la comparación se lleva a cabo entre el grupo control y los sujetos HFC con RI (HOMA>3.2), las diferencias se hacen más notorias, dándose además una diferencia significativa entre las concentraciones de MPO (Tabla 9):

	CONTROL				HFC HOMA>3,2				
(ng/mL)	n	mediana	P25	P75	n	mediana	P25	P75	P
Adipo.	36	20317	16706	23533	17	17453	15623	22226	NS
VCAM	36	933	824	1053	17	802	718	947	NS
ICAM	36	180	119	250	17	189	128	289	NS
MMP9	36	57	39	93	17	61	34	148	NS
MPO	36	10,8	9,5	16,1	17	14,5	11,8	179,4	0,003
PAI-1	36	29	22	48	17	70	43	125	<0,001

Cuando se han comparado los valores de marcadores de riesgo aterotrombótico entre los afectados de HFC con y sin RI, los valores de PAI-1 y MPO resultan significativamente más elevados en el grupo con RI (Tabla 10, figuras 53, 54 y 55):

	HFC HOMA<3,2				HFC HOMA>3,2				
(ng/mL)	n	mediana	P25	P75	n	mediana	P25	P75	P
Adipo.	19	20564	16972	26420	17	17453	15623	22226	NS
VCAM	19	887	743	995	17	802	718	947	NS
ICAM	19	168	147	201	17	189	128	289	NS
MMP9	19	47	30	73	17	61	34	148	NS
MPO	19	9,4	7,2	12,7	17	14,5	11,8	179,4	0,009
PAI-1	19	33	26	77	17	70	43	125	0,016

Figura 53. MPO en el grupo control, en el grupo HFC sin RI y en el grupo HFC con RI

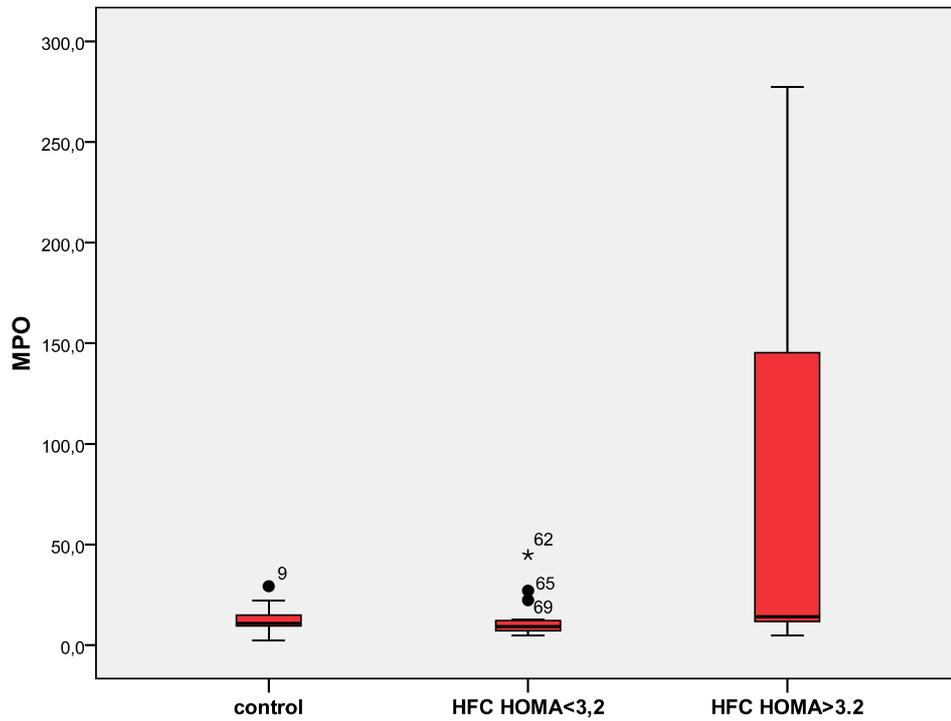


Figura 54. PAI-1 en el grupo control, en el grupo HFC sin RI y en el grupo HFC con RI

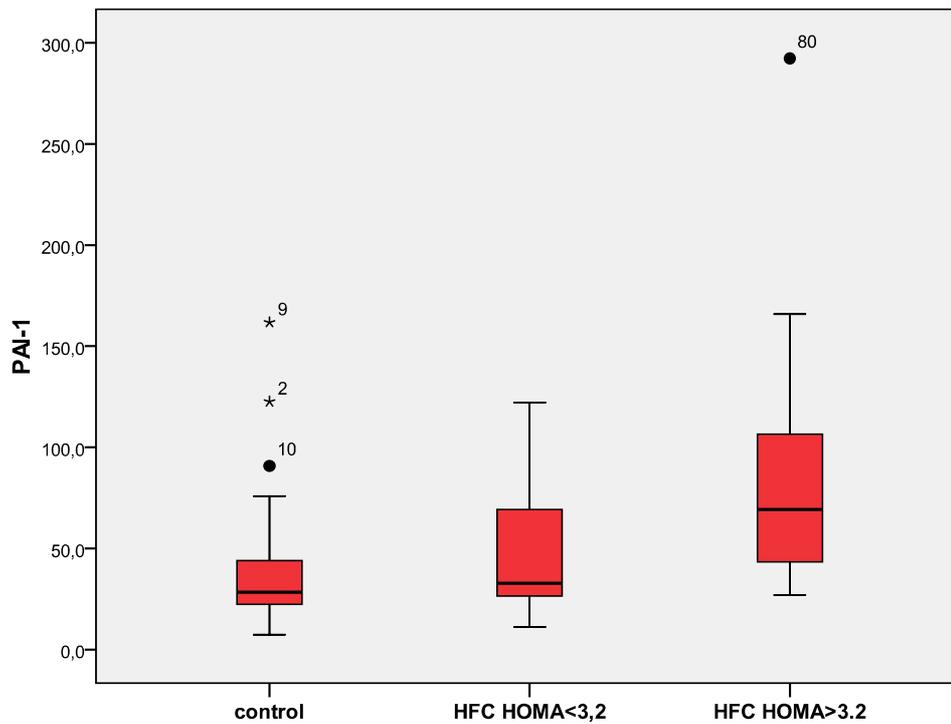
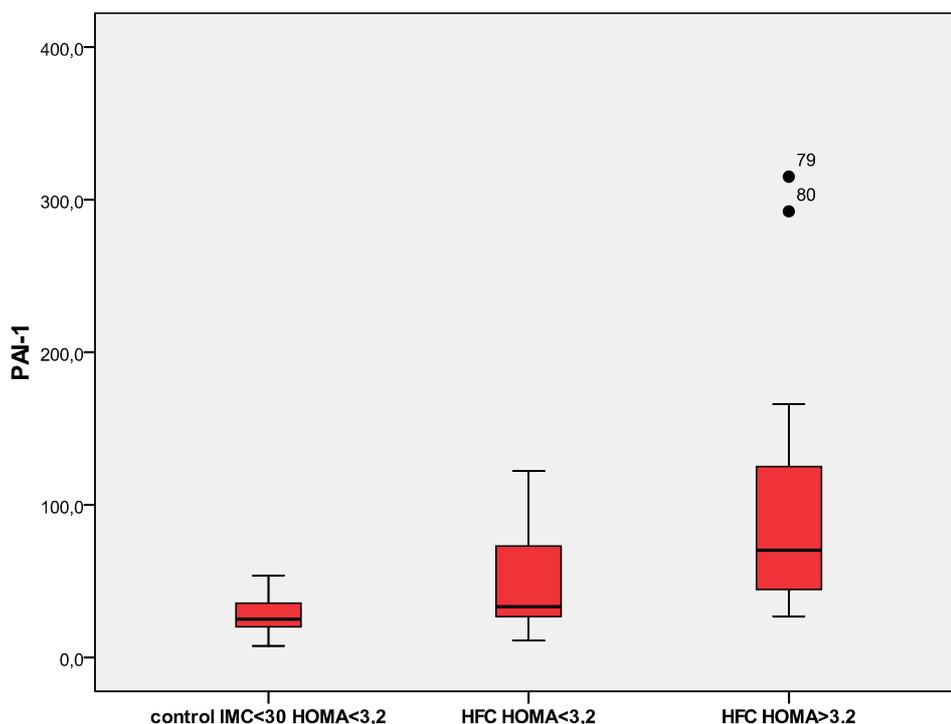


Figura 55. PAI-1 en el grupo control excluyendo obesos y RI, en el grupo HFC sin RI y en el grupo HFC con RI



Al comparar los marcadores de riesgo aterotrombótico entre los sujetos del grupo control sin RI (HOMA<3.2) ni obesidad (IMC<30) con el grupo HFC completo, se mantiene la diferencia de PAI-1 y no se detectan nuevas diferencias (Tabla 11):

	CONTROL IMC<30, HOMA<3,2				HFC				
(ng/mL)	n	mediana	P25	P75	n	mediana	P25	P75	P
Adipo.	36	20317	16706	23376	36	19918	15808	23244	,964
VCAM	36	932	817	1008	36	878	725	986	,245
ICAM	36	180	117	234	36	174	143	246	,402
MMP9	36	54	37	68	36	51	31	84	,734
MPO	36	10,4	9,5	14,9	36	12,1	8,1	26,4	,450
PAI-1	36	25	20	36	36	55	29	87	,000

Si incluimos en el grupo HFC solamente a los sujetos sin RI, se mantiene una diferencia significativa en la concentración de PAI-1 respecto al subgrupo control anterior (Tabla 12):

	CONTROL IMC<30, HOMA<3,2				HFC HOMA<3,2				
(ng/mL)	n	mediana	P25	P75	n	mediana	P25	P75	P
Adipo.	36	20317	16706	23376	19	20564	16972	26420	,420
VCAM	36	932	817	1008	19	887	743	995	,557
ICAM	36	180	117	234	19	168	147	201	,769
MMP9	36	54	37	68	19	47	30	73	,299
MPO	36	10,4	9,5	14,9	19	9,4	7,2	12,7	,359
PAI-1	36	25	20	36	19	33	26	77	,020

Cuando se comparan los marcadores de inflamación y de riesgo aterotrombótico del grupo control excluyendo a los RI y obesos frente al subgrupo HFC con RI (HOMA>3.2), se observan diferencias estadísticamente significativas en los valores de IL-8, IL-10, MPO y PAI-1 (Tabla 13)

	CONTROL IMC<30, HOMA<3,2				HFC HOMA>3,2				
	n	Median	P25	P75	n	mediana	P25	P75	P
Adipo. (ng/mL)	36	20317	16706	23376	17	17453	15623	22226	,427
VCAM (ng/mL)	36	932	817	1008	17	802	718	947	,161
ICAM (ng/mL)	36	180	117	234	17	189	128	289	,250
MMP9 (ng/mL)	36	54	37	68	17	61	34	148	,597
MPO (ng/mL)	36	10,4	9,5	14,9	17	14,5	11,8	179,4	,021
PAI-1 (ng/mL)	36	25	20	36	17	70	43	125	,000
TNF-α (pg/mL)	36	11,0	6,7	14,5	17	10,5	7,4	13,9	,678
IL-6 (pg/mL)	36	18,4	10,0	28,0	17	10,2	7,2	18,0	,146
IL-8 (pg/mL)	36	3,0	2,3	4,4	17	4,6	2,9	7,6	,046
IL-10 (pg/mL)	36	64	36	77	17	25	16	54	,032
IL-1b (pg/mL)	36	1,8	,9	2,9	17	1,0	,2	1,8	,100
PCR (mg/L)	36	1,1	,8	2,4	17	1,7	1,1	3,2	,132

Las diferencias encontradas entre los valores de PAI-1 se mantienen cuando excluimos del grupo HFC con RI a los sujetos obesos. Las diferencias respecto a IL-8, IL-10 y MPO en este caso, no se mantienen (Tabla 14):

	CONTROL HOMA<3,2 IMC<30				HFC HOMA>3,2 IMC<30				P
	n	Median	P25	P75	n	Median	P25	P75	
Adipo. (ng/mL)	24	20317	16706	23376	10	16786	14929	23299	,597
VCAM (ng/mL)	24	932	817	1008	10	755	707	913	,064
ICAM (ng/mL)	24	180	117	234	10	183	126	311	,438
MMP9 (ng/mL)	24	54	37	68	10	47	27	124	,678
MPO (ng/mL)	24	10,4	9,5	14,9	10	12,8	11,4	66,8	,135
PAI-1 (ng/mL)	24	25	20	36	10	62	44	97	,000
TNF- α (pg/mL)	24	11,0	6,7	14,5	10	9,8	5,2	13,7	,365
IL-6 (pg/mL)	24	18,4	10,0	28,0	10	9,5	6,1	13,1	,062
IL-8 (pg/mL)	24	3,0	2,3	4,4	10	3,5	2,4	7,3	,365
IL-10 (pg/mL)	24	64	36	77	10	31	20	78	,270
IL-1b (pg/mL)	24	1,8	,9	2,9	10	1,3	,2	2,1	,183
PCR (mg/L)	24	1,1	,8	2,4	10	2,2	1,0	4,8	,179

Finalmente, comparamos los resultados de la totalidad de componentes lipídicos, metabólicos, inflamatorios y aterotrombóticos considerados en el estudio entre los grupos control y HFC excluyendo a los sujetos obesos. Las diferencias respecto al PAI-1 siguen siendo muy significativas entre ambos grupos, así como respecto al índice HOMA, sin que existan diferencias entre el IMC y el perímetro de cintura (Tabla 15):

	CONTROL IMC<30				HFC IMC<30				P
	n	Median	P25	P75	n	Median	P25	P75	
Adipo. (ng/mL)	27	20387	16535	23761	24	21191	15982	26139	,450
VCAM (ng/mL)	27	931	810	1014	24	813	717	994	,417
ICAM (ng/mL)	27	188	117	239	24	170	140	224	,977
MMP9 (ng/mL)	27	54	37	70	24	43	27	63	,227
MPO (ng/mL)	27	10,0	9,4	14,6	24	11,1	7,4	12,8	,623
PAI-1 (ng/mL)	27	25	20	38	24	55	28	81	,001
TNF- α (pg/mL)	27	11,0	8,1	14,5	21	9,8	7,1	12,2	,250
IL-6 (pg/mL)	27	17,2	12,7	28,1	21	12,4	7,8	23,0	,163
IL-8 (pg/mL)	27	3,1	2,4	5,1	21	3,2	2,3	4,8	,892
IL-10 (pg/mL)	27	64	51	78	21	63	29	108	,989
IL-1b (pg/mL)	27	1,6	,8	3,0	21	1,4	,8	2,2	,498
PCR (mg/L)	27	1,1	,8	2,4	21	1,6	,8	2,8	,517
Indice Homa	27	1,5	,9	2,2	24	2,3	1,5	4,0	,010
Glucosa (mg/dL)	27	85	83	91	24	97	89	106	,006
Insulina (μ U/mL)	27	7,5	4,5	10,1	24	9,5	6,6	15,6	,019
HbA1c (%)	27	5,1	4,9	5,4	22	5,3	5,2	5,5	,022
IMC (Kg/m ²)	27	24,2	22,4	26,6	24	25,9	24,0	28,2	,119
Cintura (cm)	27	85,0	77,0	92,3	21	89,0	79,8	95,3	,235
CT (mg/dL)	27	196	179	211	24	269	244	281	,000
TG (mg/dL)	27	81	65	105	24	119	96	175	,001
cHDL (mg/dL)	27	56	47	66	24	60	49	70	,533
cLDL (mg/dL)	27	121	107	137	24	177	163	193	,000
ApoA (mg/dL)	27	146	120	162	24	136	124	151	,445
ApoB (mg/dL)	27	86	77	97	24	122	113	134	,000

4.5. Correlaciones

En el grupo control, se observa una relación positiva entre PAI-1 y los parámetros directamente relacionados con RI. Además, se observa relación positiva entre PAI-1 y MPO y negativa entre adiponectina y TG y Glucosa (Tabla 16, test de Spearman's rho de 2 colas):

GRUPO CONTROL	Adipo	MPO	PAI-1	Indice Homa	IL-8	IL-10	IMC	Cintura	Glucosa	TG	Insulina
Adipo	1,000	0,18	-0,15	-0,22	0,028	0,23	0,05	-0,202	-0,341	-0,51	-0,158
	.	0,3	0,37	0,21	0,889	0,24	0,78	0,253	0,042	0,000	0,366
	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
MPO	0,179	1	0,36	0,162	0,005	-0,01	0,26	0,268	-0,034	0,11	0,188
	0,296	.	0,03	0,351	0,981	0,97	0,13	0,126	0,845	0,53	0,279
	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
PAI-1	-0,154	0,36	1	0,403	0,320	-0,09	0,54	0,634	0,390	0,53	0,358
	0,368	0,03	.	0,016	0,104	0,65	0	6E-05	0,019	0,000	0,035
	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
Indice Homa	-0,217	0,16	0,4	1	0,348	-0,08	0,65	0,629	0,383	0,45	0,977
	0,210	0,35	0,02	.	0,081	0,7	0	9E-05	0,023	0,01	1E-06
	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
IL-8	0,028	0,005	0,320	0,348	1,000	0,650	0,260	0,220	0,515	0,225	0,311
	0,889	0,981	0,104	0,081	.	0,000	0,200	0,290	0,006	0,259	0,122
	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
IL-10	0,234	-0,01	-0,09	-0,08	0,650	1	-0,17	-0,143	0,118	-0,17	-0,077
	0,239	0,97	0,65	0,701	0,000	.	0,41	0,495	0,557	0,4	0,710
	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
IMC	0,050	0,26	0,54	0,647	0,260	-0,17	1	0,887	0,234	0,48	0,628
	0,775	0,13	0,000	4E-05	0,200	0,41	.	1E-06	0,176	0,000	7E-05
	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
Cintura	-0,202	0,27	0,63	0,629	0,220	-0,14	0,89	1	0,443	0,63	0,550
	0,253	0,13	0,000	9E-05	0,290	0,49	0	.	0,009	0,000	0,0009
	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
Glucosa	-0,341	-0,03	0,39	0,383	0,515	0,12	0,23	0,443	1	0,45	0,231
	0,042	0,84	0,02	0,023	0,006	0,56	0,18	0,009	.	0,01	0,183
	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
TG	-0,508	0,11	0,53	0,448	0,225	-0,17	0,48	0,635	0,449	1	0,389
	0,002	0,53	0,000	0,007	0,259	0,4	0	5E-05	0,006	.	0,021
	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
Insulina	-0,158	0,19	0,36	0,976	0,311	-0,08	0,63	0,55	0,231	0,39	1
	0,365	0,28	0,03	1E-06	0,122	0,71	0	9E-04	0,183	0,02	.
	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36

Cuando excluimos los sujetos con RI y obesidad en el grupo control, desaparece la relación entre PAI-1 y los parámetros directamente relacionados con RI. La correlación negativa entre adiponectina y TG, se mantiene (Tabla 17, test de Spearman's rho de 2 colas):

GRUPO CONTROL HOMA<3.2 IMC<30	Adipo	MPO	PAI-1	Indice Homa	IL-8	IL-10	IMC	Cintura	Glucosa	TG	Insulina
Adipo	1	0,205	-0,07	-0,07	0,244	0,241	0,172	-0,308	-0,384	-0,42	-0,03
	.	0,338	0,741	0,759	0,362	0,368	0,422	0,153	0,064	0,039	0,89
	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
MPO	0,205	1	0,161	0,159	0,205	0,166	0,239	0,094	-0,018	0,07	0,16
	0,338	.	0,453	0,457	0,447	0,538	0,261	0,668	0,935	0,745	0,47
	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
PAI-1	0,071	0,161	1	-0,14	0,079	0,056	0,163	0,265	0,275	0,39	-0,18
	0,741	0,453	.	0,502	0,77	0,837	0,446	0,223	0,194	0,059	0,39
	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
Indice Homa	0,066	0,159	-0,14	1	-0,09	-0,12	0,271	0,238	0,173	-0,02	0,98
	0,759	0,457	0,502	.	0,737	0,656	0,2	0,275	0,418	0,942	0
	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
IL-8	0,244	0,205	0,079	-0,09	1	0,894	-0,04	-0,108	0,344	-0,19	-0,15
	0,362	0,447	0,77	0,737	.	3E-06	0,888	0,703	0,192	0,488	0,57
	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
IL-10	0,241	0,166	0,056	-0,12	0,894	1	-0,16	-0,108	0,321	-0,21	-0,19
	0,368	0,538	0,837	0,656	3E-06	.	0,563	0,703	0,226	0,43	0,47
	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
IMC	0,172	0,239	0,163	0,271	-0,04	-0,16	1	0,758	-0,151	0,325	0,28
	0,422	0,261	0,446	0,2	0,888	0,563	.	0,000	0,48	0,122	0,19
	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
Cintura	0,308	0,094	0,265	0,238	-0,11	-0,11	0,758	1,000	0,287	0,6	0,18
	0,153	0,668	0,223	0,275	0,703	0,703	3E-05	.	0,184	0,002	0,41

	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
Glucosa	- 0,384	-0,02	0,275	0,173	0,344	0,321	-0,15	0,287	1	0,385	0,03
	0,064	0,935	0,194	0,418	0,192	0,226	0,48	0,184	.	0,063	0,89
	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
TG	- 0,425	0,07	0,39	-0,02	-0,19	-0,21	0,325	0,600	0,385	1	-0,09
	0,039	0,745	0,059	0,942	0,488	0,43	0,122	0,002	0,063	.	0,67
	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
Insulina	-0,03	0,156	-0,18	0,979	-0,15	-0,19	0,278	0,179	0,029	-0,09	1
	0,891	0,466	0,389	1E- 06	0,567	0,474	0,189	0,414	0,891	0,666	.
	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24

En el grupo HFC se observan correlaciones positivas entre índice HOMA, PAI-1 y MPO, entre PAI-1, MPO e IL-8 y negativas entre la interleucina antiinflamatoria IL-10 con el PAI-1, MPO e índice HOMA. Adiponectina correlaciona negativamente con MPO y TG (Tabla 18. Test de Spearman's rho de 2 colas):

GRUPO HFC	Adipo	MPO	PAI-1	Indice Homa	IL-8	IL-10	IMC	Cintura	Glucosa	TG	Insulina
Adipo	1	-0,36	-0,02	-0,25	-0,13	0,135	-0,2	-0,344	-0,029	-0,39	-0,25
	.	0,029	0,904	0,135	0,488	0,477	0,269	0,068	0,865	0,017	0,14
	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
MPO	-0,364	1	0,343	0,505	0,512	-0,45	0,275	0,451	0,145	0,329	0,53
	0,029	.	0,041	0,002	0,003	0,012	0,128	0,014	0,399	0,05	0
	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
PAI-1	-0,021	0,343	1	0,466	0,603	-0,41	0,3	0,281	0,319	0,366	0,44
	0,904	0,041	.	0,004	3E-04	0,025	0,096	0,140	0,058	0,028	0,01
	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
Indice Homa	-0,254	0,505	0,466	1	0,316	-0,5	0,455	0,529	0,459	0,514	0,97
	0,135	0,002	0,004	.	0,083	0,005	0,009	0,003	0,005	0,001	0
	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
IL-8	-0,129	0,512	0,603	0,316	1	-0,21	0,027	0,011	0,076	0,382	0,34
	0,488	0,003	3E-04	0,083	.	0,273	0,893	0,958	0,683	0,034	0,06
	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
IL-10	0,135	-0,45	-0,41	-0,5	-0,21	1	-0,37	-0,251	-0,168	0,03	-0,51
	0,477	0,012	0,025	0,005	0,273	.	0,061	0,248	0,376	0,874	0
	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
IMC	-0,201	0,275	0,3	0,455	0,027	-0,37	1	0,791	0,176	0,345	0,45
	0,269	0,128	0,096	0,009	0,893	0,061	.	0,000	0,335	0,053	0,01
	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
Cintura	-0,344	0,451	0,281	0,529	0,011	-0,25	0,791	1	0,338	0,521	0,49
	0,068	0,014	0,14	0,003	0,958	0,248	1E-06	.	0,073	0,004	0,01
	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
Glucosa	-0,029	0,145	0,319	0,459	0,076	-0,17	0,176	0,338	1	0,136	0,27
	0,865	0,399	0,058	0,005	0,683	0,376	0,335	0,073	.	0,429	0,12
	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
TG	-0,395	0,329	0,366	0,514	0,382	0,03	0,345	0,521	0,136	1	0,52
	0,017	0,05	0,028	0,001	0,034	0,874	0,053	0,004	0,429	.	0
	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
Insulina	-0,253	0,529	0,442	0,971	0,34	-0,51	0,447	0,488	0,266	0,522	1
	0,137	9E-04	0,007	1E-06	0,061	0,004	0,01	0,007	0,116	0,001	.
	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36

Cuando en el grupo HFC se excluyen los sujetos afectados de RI (HOMA<3.2), la correlación entre índice HOMA y PAI-1 no se observa aunque sí se mantiene entre índice HOMA con MPO y adiponectina con TG de forma negativa (Tabla 19. Test de Spearmen's rho de 2 colas):

GRUPO HFC HOMA<3.2	Adipo	MPO	PAI-1	Indice Homa	IL-8	IL-10	IMC	Cintura	Glucosa	TG	Insulina
Adipo	1	-0,45	0,095	-0,34	0,032	-0,14	-0,24	-0,414	0,202	-0,46	-0,45
		0,055	0,7	0,15	0,903	0,602	0,358	0,141	0,406	0,049	0,05
	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
MPO	-0,447	1	0,056	0,603	0,25	0,079	0,132	0,472	0,173	0,141	0,61
	0,055		0,819	0,006	0,333	0,77	0,612	0,088	0,479	0,565	0,01
	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
PAI-1	0,095	0,056	1	0,112	0,333	-0,05	0,199	0,370	0,229	0,157	0,08
	0,7	0,819		0,647	0,191	0,854	0,445	0,193	0,346	0,521	0,74
	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
Indice Homa	-0,343	0,603	0,112	1	-0,09	-0,42	0,334	0,522	0,255	-0,05	0,94
	0,15	0,006	0,647		0,74	0,102	0,19	0,056	0,293	0,83	0
	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
IL-8	0,032	0,25	0,333	-0,09	1	0,221	-0,29	-0,179	0,067	0,233	-0,01
	0,903	0,333	0,191	0,74		0,412	0,302	0,579	0,8	0,368	0,98
	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
IL-10	-0,141	0,079	-0,05	-0,42	0,221	1	-0,07	-0,073	-0,282	0,359	-0,35
	0,602	0,77	0,854	0,102	0,412		0,817	0,832	0,29	0,172	0,19
	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
IMC	-0,238	0,132	0,199	0,334	-0,29	-0,07	1	0,907	-0,124	0,354	0,36
	0,358	0,612	0,445	0,19	0,302	0,817		0,000	0,635	0,163	0,15
	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
Cintura	-0,414	0,472	0,37	0,522	-0,18	-0,07	0,907	1	0,128	0,626	0,54
	0,141	0,088	0,193	0,056	0,579	0,832	7E-06		0,664	0,017	0,05
	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
Glucosa	0,202	0,173	0,229	0,255	0,067	-0,28	-0,12	0,128	1	-0,38	-0,04
	0,406	0,479	0,346	0,293	0,8	0,29	0,635	0,664		0,107	0,88
	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
TG	-0,458	0,141	0,157	-0,05	0,233	0,359	0,354	0,626	-0,381	1	0,11
	0,049	0,565	0,521	0,83	0,368	0,172	0,163	0,017	0,107		0,64
	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
Insulina	-0,453	0,608	0,082	0,944	-0,01	-0,35	0,363	0,537	-0,036	0,114	1
	0,052	0,006	0,74	1E-06	0,978	0,189	0,152	0,047	0,883	0,643	
	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19

Al valorar las correlaciones en el grupo HFC con RI (HOMA>3.2) resultan significativas entre PAI-1, índice HOMA, MPO e IL-8 y de forma negativa entre PAI-1 y MPO con la interleucina antiinflamatoria IL-10. (Tabla 20. Test de Spearsman's rho de 2 colas):

GRUPO HFC HOMA>3,2	Adipo	MPO	PAI-1	Indice Homa	IL-8	IL-10	IMC	Cintura	Glucosa	TG	Insulina
Adipo	1	-0,2	-0,12	0,275	-0,02	0,033	0,193	-0,016	-0,025	-0,32	0,41
		0,439	0,66	0,286	0,958	0,911	0,491	0,955	0,925	0,216	0,1
	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
MPO	-0,201	1	0,539	-0,01	0,622	-0,65	0,288	0,422	-0,052	0,164	0,11
	0,439		0,026	0,955	0,018	0,012	0,298	0,117	0,844	0,529	0,68
	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
PAI-1	-0,115	0,539	1	0,515	0,846	-0,58	0,172	0,261	0,174	0,311	0,48
	0,66	0,026		0,034	1E-04	0,029	0,541	0,347	0,503	0,224	0,05
	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
Indice Homa	0,275	-0,01	0,515	1	0,268	-0,04	0,197	0,392	0,335	0,448	0,84
	0,286	0,955	0,034		0,353	0,893	0,482	0,148	0,189	0,072	0
	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
IL-8	-0,015	0,622	0,846	0,268	1	-0,43	0,277	0,098	-0,066	0,116	0,36
	0,958	0,018	1E-04	0,353		0,126	0,384	0,762	0,822	0,692	0,2
	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
IL-10	0,033	-0,65	-0,58	-0,04	-0,43	1	-0,55	-0,371	0,249	0,389	-0,22
	0,911	0,012	0,029	0,893	0,126		0,062	0,235	0,391	0,169	0,45
	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
IMC	0,193	0,288	0,172	0,197	0,277	-0,55	1	0,646	0,235	-0,05	0,14
	0,491	0,298	0,541	0,482	0,384	0,062		0,009	0,4	0,849	0,62
	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
Cintura	-0,016	0,422	0,261	0,392	0,098	-0,37	0,646	1	0,237	0,127	0,27
	0,955	0,117	0,347	0,148	0,762	0,235	0,009		0,396	0,652	0,33
	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
Glucosa	-0,025	-0,05	0,174	0,335	-0,07	0,249	0,235	0,237	1	0,206	-0,16
	0,925	0,844	0,503	0,189	0,822	0,391	0,4	0,396		0,427	0,55
	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
TG	-0,316	0,164	0,311	0,448	0,116	0,389	-0,05	0,127	0,206	1	0,33
	0,216	0,529	0,224	0,072	0,692	0,169	0,849	0,652	0,427		0,19
	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
Insulina	0,408	0,109	0,483	0,836	0,363	-0,22	0,138	0,272	-0,155	0,335	1
	0,104	0,677	0,049	3E-05	0,202	0,454	0,624	0,326	0,551	0,189	
	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17

V DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

La gran incidencia de cardiopatía isquémica precoz entre las personas afectas de HFC y su elevada prevalencia en la población general, justifican el interés por el presente estudio.

El rigor en los criterios de selección tanto de inclusión como de exclusión en ambos grupos pretende evitar elementos de confusión y garantizar que los hallazgos del estudio no puedan ser atribuibles a otros factores de riesgo cardiovascular que a los aquí valorados. Como consecuencia, el número de casos que cumplen criterios de inclusión de este trabajo es pequeño respecto a la prevalencia de HFC en la población general.

Siendo criterio de selección las alteraciones del perfil lipídico propias de la HFC, éstas se muestran claramente aumentadas en el grupo en estudio frente al grupo control. Las diferencias entre ambos, como consecuencia, resultan significativas para CT, TG, cLDL y Apo B100. No encontramos diferencias estadísticamente significativas al comparar cHDL y Apo A, posiblemente por comparar 2 grupos con similar peso y perímetro de cintura.

5.1. Insulinorresistencia

La definición clínica de RI, es decir su cuantificación en la práctica clínica, no está todavía bien establecida. En estudios epidemiológicos y clínicos se han empleado métodos indirectos para la cuantificación de la RI, basados en la medición de la glucosa e insulina plasmática en ayunas (índice HOMA) en población de la Comunidad Valenciana y Española, se define RI con $HOMA_{RI} \geq 3,2$, cifra que corresponde al P75 de la población empleando los métodos de determinación de glucosa e insulina descritos en el presente estudio ¹⁶².

Su importancia reside en su relación con la enfermedad cardiovascular, se ha descrito que la resistencia a la insulina es un importante factor de riesgo para el desarrollo de diabetes y enfermedad cardiovascular. La presencia de RI se relaciona con una prevalencia de diabetes a los 10 años de 5-7%. Si hay síndrome metabólico (SM) la prevalencia aumenta al 10-15% y el grupo de sujetos con RI y SM la prevalencia a 10 años es del 25-30% ¹⁶⁹.

Martínez-Hervás et al. han encontrado una RI significativamente superior

entre un grupo de casos con HFC que habían sufrido un IAM y otro clínicamente libre de enfermedad, ajustados por edad e IMC y con el mismo grado de dislipemia ¹⁷⁰.

La prevalencia de RI es claramente superior en los sujetos afectados de HFC a la encontrada en sujetos no afectados, tal como ha sido demostrado en numerosos estudios ^{171, 108, 146, 145, 52}. Georgieva et al. encuentran una correlación significativa entre TG, tamaño de las LDL e insulina, lo que refuerza su asociación a la presencia de RI ¹⁷². La RI de los sujetos dislipémicos en nuestro estudio es superior a la de los del grupo control con el mismo grado de obesidad, confirmando el hecho, ya conocido, que la HFC se relaciona con RI independientemente del peso y fenotipo lipoproteico.

5.2. Moléculas de adhesión

La sobreproducción hepática de partículas ricas en triglicéridos que presenta esta dislipemia prolonga el tiempo de permanencia de lipoproteínas aterogénicas en plasma, facilitando su unión al endotelio vascular ¹⁷³, aumentando el grado de activación de la célula endotelial, que podría expresar más moléculas de adhesión en su superficie ^{104, 174} y activarse el sistema del complemento ¹⁷⁵. Pauciullo et al. han detectado concentraciones aumentadas de VCAM en sujetos HFC respecto al grupo control ¹⁷⁶ y Karásek et al. de ICAM, aunque no de VCAM ¹⁷⁷. Lo que muestra diferencias entre diferentes poblaciones con HFC. Estas diferencias no se han puesto en evidencia en nuestro estudio, ni se ha comprobado relación entre estas moléculas de adhesión y la RI o el PAI-1 en el grupo HFC.

5.3. Marcadores de inflamación

El tejido adiposo libera gran cantidad de TNF- α , que es uno de los múltiples factores relacionados con el desarrollo de la RI en la obesidad ¹⁷⁸. Se han publicado en un estudio discretas diferencias en los valores de TNF- α entre casos HFC y controles, de forma independiente respecto al síndrome metabólico ¹⁷⁶, sin embargo no hemos encontrado tales diferencias entre nuestros casos y controles.

Se han encontrado valores plasmáticos de IL-6 y PCR más elevados en sujetos HFC respecto a un grupo control ¹⁵⁰ que no hemos encontrado en el presente estudio. Al comparar las diferentes interleucinas entre el grupo HFC y

control no hemos encontrados diferencias estadísticamente significativas, posiblemente por tener una proporción de sobrepeso/obesidad similar (50%) en ambos grupos. Probablemente se haga más evidente la presencia de altos niveles de marcadores de inflamación plasmáticos en casos de aterosclerosis que ya han presentado clínica de enfermedad coronaria y se han valorado en el contexto de prevención secundaria y no de prevención primaria ^{179, 180, 181}.

Sí se han detectado diferencias estadísticamente significativas, entre los marcadores de inflamación valorados, de IL-8 e IL-10 entre el HFC con RI y subgrupo control sin RI ni obesidad. Dichas diferencias, sin embargo, no se han mantenido cuando se han eliminado los sujetos con IMC>30 kg/m² del grupo HFC, por lo que ha de atribuirse la diferencia encontrada respecto a las interleucinas IL-8 e IL-10 a la presencia de obesidad.

En el grupo HFC existe una relación inversa estadísticamente significativa entre la IL-10 con MPO, PAI-1, índice HOMA, así como una relación directa entre IL-8 con MPO y PAI-1. Esta relación no se encuentra en el mismo grupo HFC cuando se excluyen los sujetos sin RI salvo para MPO con el índice HOMA.

5.4. Marcadores de riesgo aterotrombótico

5.4.1. PAI-1

PAI-1 se ha asociado a obesidad visceral, RI y síndrome metabólico, hiperlipidemia, sistema renina-angiotensina-aldosterona, consumo de alcohol y estimulación por citoquinas proinflamatorias y, de forma inversa, con los estrógenos y el ejercicio físico ¹⁸² y se ha sugerido que tiene un papel causal en el desarrollo posterior de enfermedad cardiovascular debido a su actividad protrombótica ¹⁸³ y otros múltiples mecanismos patogénicos ¹⁸⁴.

En patología arterial, un estudio prospectivo amplio mostró una fuerte relación entre una hipofunción fibrinolítica y la incidencia posterior de cardiopatía isquémica en hombres jóvenes de raza blanca ¹⁸⁵. En cuanto a los estudios concretos centrados en el PAI-1 y la cardiopatía isquémica, cabe distinguir entre los que se han centrado en el estudio de la placa de ateroma y los que han analizado el papel del PAI-1 circulante. Respecto al primer apartado, se ha observado un efecto doble, ya que parece que el PAI-1 estimula el crecimiento de la placa y la estabiliza. Así, un

incremento en la expresión de PAI-1 en los macrófagos y células musculares lisas locales aumenta la deposición de fibrina y la migración de células musculares lisas, fenómenos subyacentes en el crecimiento de la placa ^{186, 187, 188}. Por otro lado, el efecto neto estabilizador de la placa, argumentado por algunos autores, se basa en la reducción de la activación de las metaloproteasas de la matriz secundaria a la disminución de la actividad plasmínica por PAI-1 ¹⁸⁶. Sin embargo, si esa placa de ateroma llegara a complicarse y romperse por mediación de otros factores, el PAI-1 acumulado se liberaría y promovería la trombosis sobre su superficie, dando lugar a un síndrome coronario agudo. Con relación a los niveles plasmáticos de PAI-1, muchos estudios de casos y controles han demostrado la presencia de una capacidad fibrinolítica endógena reducida, manifestada con niveles elevados de PAI-1 en pacientes con cardiopatía isquémica crónica documentada ^{189, 190, 191, 192, 193, 194}. Dado que los niveles elevados de PAI-1 en la fase aguda de un infarto de miocardio se mantienen altos en los siguientes meses e incluso años, no se debe aceptar que dicho comportamiento sea similar al de los reactantes de fase aguda ¹⁹⁵. Se ha sugerido que la concentración de PAI-1 tiene un peso pronóstico importante a la luz de los resultados de diferentes trabajos. En algunos de ellos, el PAI-1 se consideró un factor predictor de un primer infarto en población sueca ¹⁹⁶, un factor de riesgo para el desarrollo de reinfarto en sujetos jóvenes ¹⁹⁷, predictor independiente de muerte e infarto no fatal en hombres con angina de pecho ¹⁹⁸, predictor de mortalidad en pacientes no diabéticos con infarto de miocardio precoz ¹⁹⁹, predictor de eventos trombóticos en general ^{200, 201} y marcador de riesgo para desarrollar reestenosis tras una revascularización coronaria percutánea ²⁰² o quirúrgica ²⁰³.

La relación causa-efecto entre un nivel elevado de PAI-1 y el desarrollo de infarto de miocardio ha sido cuestionada por otros estudios. Argumentan que el PAI-1 podría ser exclusivamente un marcador de enfermedad aterotrombótica (aumento de expresión de PAI-1 por un endotelio previamente dañado) y, por otro lado, sostienen que la presencia de otros conocidos factores de riesgo cardiovascular, como hipertrigliceridemia aislada o en el contexto de obesidad y resistencia insulínica, podrían actuar como factores de confusión, al estar relacionados tanto con concentraciones elevadas de PAI-1 como con el desarrollo de cardiopatía isquémica ^{204, 205}.

Las complicaciones aterotrombóticas en el síndrome de resistencia a la insulina son parcialmente atribuidas a la alteración de la fibrinólisis como

consecuencia del aumento de los niveles plasmáticos de PAI-1 ²⁰⁶. Los ácidos grasos libres también estimulan la síntesis hepática de fibrinógeno y PAI-1 ²⁰⁷.

Karásek et al. han encontrado aumentados marcadores hemostáticos endoteliales en miembros asintomáticos de familias con HFC, asociados a RI. Entre ellos, el factor von Willebrand se relaciona con alteración del grosor de la íntima-media carotídea solo en los miembros hiperlipémicos ²⁰⁸ y se han llegado a considerar los niveles de PAI-1 como predictores de un primer evento coronario ¹⁹⁶. También Georgieva et al. observan marcadores procoagulantes y de activación endotelial elevados en los pacientes dislipémicos afectados de HFC ¹⁷².

En nuestro estudio, las concentraciones de PAI-1 de los casos HFC se encuentran elevadas respecto a los sujetos del grupo control. La significación de esta diferencia se mantiene ligada a la RI puesto que al comparar el grupo control con el grupo HFC con índice HOMA inferior a 3.2, ya no se observa. Por el contrario, cuando se seleccionan los casos HFC con RI (HOMA>3.2), estas diferencias se incrementan. Para descartar la influencia de la obesidad en los niveles de PAI-1, se han comparado ambos grupos excluyendo a los obesos (IMC>30 kg/m²) y se encuentran diferencias significativas atribuibles únicamente a la dislipemia propia de la HFC y la RI.

5.4.2. MPO

Son varios los mecanismos potenciales de la MPO para contribuir a promover la aterosclerosis: la oxidación de las LDL que va a desempeñar un papel central en el desarrollo de procesos aterogénicos tales como la acumulación de colesterol, a través del reconocimiento por receptores scavengers, no regulada por la concentración de LDL intracelular, transformando a los macrófagos en células espumosas, primera característica celular de las placas ateroscleróticas ²⁰⁹; la actividad catalítica de la MPO en el propio ateroma generando productos como la clorotirosina procedentes de las proteínas modificadas por agentes halogenados oxidantes ¹⁴⁰, la oxidación de los residuos de lisina en la apolipoproteína B-100 (proteína predominante de las LDL) ²¹⁰, la potente quimiotaxis de leucocitos activada por la presencia de lípidos oxidados por el ácido hipocloroso (HOCl) generado por MPO ¹⁴¹, la modificación oxidativa de las HDL haciéndolas disfuncionantes y cuyo grado de modificación se ha

relacionado de forma independiente con la aterosclerosis coronaria y ECV^{211, 212, 211, 213}, la disfunción endotelial debida a la falta de disponibilidad de NO consumido por la MPO al insertarse entre las células endoteliales y las musculares lisas y el estado protrombótico que ocasiona la contribución del HOCL a la descamación de células endoteliales originando un fenotipo protrombótico²¹⁴.

Respecto a la participación de la MPO en la inestabilidad de la placa y la formación del trombo, se han informado algunas evidencias: la aparición de células apoptóticas en la circulación sistémica es un estímulo potencial para la activación y agregación plaquetaria²¹⁵, la capacidad antitrombótica del endotelio se ve disminuida como consecuencia de la reducción de disponibilidad de NO causada por la MPO, originándose una superficie trombogénica a través de la expresión de diversos factores protrombóticos y antifibrinolíticos²¹⁶.

En nuestro estudio, los niveles plasmáticos de este factor aterotrombótico vinculado tanto a la inflamación como al estrés oxidativo, son significativamente más elevados en los casos HFC con RI que en el grupo control y en el subgrupo HFC sin RI. Las evidencias encontradas sobre la estratificación del riesgo de sufrir ECV mediante la medida plasmática de la concentración de MPO²¹⁷ y los estudios sobre su contribución causal al inicio y desarrollo de la placa ateromatosa, de forma individual, y vinculada a inhibidores de la fibrinólisis como el PAI-1 en su desestabilización y formación del trombo, parecen concurrir en los sujetos HFC afectos de RI en cuanto que ambos marcadores se encuentran en ellos significativamente aumentados.

MPO se encuentra relacionada con PAI-1 tanto en el grupo control como en el HFC, aunque relacionado con PAI-1 y RI, simultáneamente, solo en el grupo HFC de forma muy significativa.

Al excluir del grupo control a los sujetos obesos o con RI no se encuentra relación alguna entre los factores de riesgo aterotrombótico. Únicamente se aprecia, como es conocido, relación inversa entre adiponectina y TG.

V CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

a) **Respecto al nivel de inflamación y su relación con la RI en la HFC:**

Los sujetos con HFC y RI, comparado con una población “sana”, presentan una alteración de los marcadores de inflamación crónica (incremento de la inflamatoria IL-8 y disminución de la antiinflamatoria IL-10).

La interleucina antiinflamatoria IL-10 es muy inferior en el grupo HFC con RI respecto al grupo HFC sin RI.

En los sujetos con HFC los niveles de IL-8 se relacionan significativamente con los niveles de CT y TG.

En los sujetos con HFC los niveles de IL-10 se relacionan significativamente de forma inversa con los niveles de insulina, HOMA, MPO y PAI-1.

Los sujetos con HFC y RI comparados con el grupo control presentan un aumento estadísticamente significativo de MPO.

Los sujetos con HFC y RI comparados con los sujetos con HFC sin RI presentan un aumento estadísticamente significativo de MPO.

La MPO se correlaciona en los sujetos con HFC con insulina, índice HOMA, apoB100 y perímetro de cintura.

b) Respecto al estado protrombótico y su relación con la RI en la HFC

El estado protrombótico estudiado con los niveles plasmáticos de PAI-1 estuvo significativamente aumentado en los sujetos con HFC respecto al grupo control.

En el grupo con HFC y RI respecto al grupo con HFC sin RI hubo un aumento significativo de los niveles de PAI-1.

Los sujetos con HFC sin RI mostraron un aumento significativo del PAI-1 respecto a controles sin RI.

Los niveles de PAI-1 se correlacionan en los sujetos afectados de HFC con TG, insulina, HOMA, MPO, IL-8 y de forma inversa con IL-10.

Este estudio confirma la hipótesis planteada, demostrando en los sujetos con HFC que la existencia de RI se relaciona con un aumento de la inflamación crónica (IL-8, MPO y, de forma inversa, con IL-10) y del estado protrombótico (PAI-1).

VII BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Ordovás JM, Carmena R. Factores de riesgo cardiovascular. Lípidos plasmáticos y riesgo coronario. In: Carmena R, Ordovás JM, eds. *Hiperlipemias: clínica y tratamiento.*: Doyma; 1999.
2. Marrugat J, Medrano JM, Tresserras R. La cardiopatía isquémica como causa principal de muerte en España: realidad epidemiológica, necesidades asistenciales y de investigación. *Clin Invest Arterioscl.* 2001;13:262-270.
3. Badimon JJ, Badimon L, Fuster V. Fisiopatología de la enfermedad aterotrombótica coronaria. *Clin Invest Arterioscl.* 2002;14:258-271.
4. Zaman AG, Helft G, Worthley SG, Badimon JJ. The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2000;149:251-266.
5. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med.* 1992;326:242-250.
6. Gimbrone MA, Jr. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 1999;82:722-726.
7. Malek AM, Alper SL, Izumo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA.* 1999;282:2035-2042.
8. Ku DN, Giddens DP, Zarins CK, Glagov S. Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis.* 1985;5:293-302.
9. Cunningham KS, Gotlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest.* 2005;85:9-23.
10. Liao JK. Endothelium and acute coronary syndromes. *Clin Chem.* 1998;44:1799-1808.
11. Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Eur Heart J.* 1997;18 Suppl E:E19-29.
12. Camejo G, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Bondjers G. Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis.* 1998;139:205-222.
13. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation.* 1995;91:2488-2496.
14. Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1876-1890.
15. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340:115-126.

16. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* 1995;9:899-909.
17. De Caterina R, Bourcier T, Laufs U, La Fata V, Lazzerini G, Neish AS, Libby P, Liao JK. Induction of endothelial-leukocyte interaction by interferon-gamma requires coactivation of nuclear factor-kappaB. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:227-232.
18. Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL. P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med.* 2000;191:189-194.
19. Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1998;102:145-152.
20. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM, Jr., Boerwinkle E. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation.* 1997;96:4219-4225.
21. Rohde LE, Hennekens CH, Ridker PM. Survey of C-reactive protein and cardiovascular risk factors in apparently healthy men. *Am J Cardiol.* 1999;84:1018-1022.
22. Nissen SE, Yock P. Intravascular ultrasound: novel pathophysiological insights and current clinical applications. *Circulation.* 2001;103:604-616.
23. Lefer DJ, Granger DN. Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med.* 2000;109:315-323.
24. Griending KK, Alexander RW. Oxidative stress and cardiovascular disease. *Circulation.* 1997;96:3264-3265.
25. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, Shih DM, Van Lenten BJ, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Fogelman AM. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:831-842.
26. Sary HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis.* 1989;9:119-32.
27. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1262-1275.
28. Maxfield FR, Tabas I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature.* 2005;438:612-621.
29. Goldstein JL, Anderson RG, Brown MS. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature.* 1979;279:679-685.

30. Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K, Silverstein RL. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest*. 2000;105:1049-1056.
31. Bennett MR. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc Res*. 1999;41:361-368.
32. Badimon JJ, Santos-Gallego CG, Badimon L. [Importance of HDL cholesterol in atherothrombosis: how did we get here? Where are we going?]. *Rev Esp Cardiol*. 2010;63 Suppl 2:20-35.
33. Glomset JA. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res*. 1968;9:155-167.
34. Badimon JJ, Badimon L, Fuster V. Regression of atherosclerotic lesions by high density lipoprotein plasma fraction in the cholesterol-fed rabbit. *J Clin Invest*. 1990;85:1234-1241.
35. Badimon JJ, Badimon L, Galvez A, Dische R, Fuster V. High density lipoprotein plasma fractions inhibit aortic fatty streaks in cholesterol-fed rabbits. *Lab Invest*. 1989;60:455-461.
36. Duverger N, Kruth H, Emmanuel F, Caillaud JM, Viglietta C, Castro G, Tailleux A, Fievet C, Fruchart JC, Houdebine LM, Deneffe P. Inhibition of atherosclerosis development in cholesterol-fed human apolipoprotein A-I-transgenic rabbits. *Circulation*. 1996;94:713-717.
37. Plump AS, Scott CJ, Breslow JL. Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:9607-9611.
38. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR, Jr., Bangdiwala S, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation*. 1989;79:8-15.
39. Gotto AM, Jr., Whitney E, Stein EA, Shapiro DR, Clearfield M, Weis S, Jou JY, Langendorfer A, Beere PA, Watson DJ, Downs JR, de Cani JS. Relation between baseline and on-treatment lipid parameters and first acute major coronary events in the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS). *Circulation*. 2000;101:477-484.
40. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, Huang Y. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk. The PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*. 1996;124 Suppl:S11-20.
41. Manninen V, Elo MO, Frick MH, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, Huttunen JK, Kaitaniemi P, Koskinen P, et al. Lipid alterations and decline in the incidence of coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *JAMA*. 1988;260:641-651.
42. Rubins HB, Robins SJ, Collins D, Fye CL, Anderson JW, Elam MB, Faas FH, Linares E, Schaefer EJ, Schectman G, Wilt TJ, Wittes J. Gemfibrozil for

- the secondary prevention of coronary heart disease in men with low levels of high-density lipoprotein cholesterol. Veterans Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group. *N Engl J Med.* 1999;341:410-418.
43. Rader DJ, Hobbs HH. Trastornos del metabolismo de las lipoproteínas. In: Dan L. Longo M, ed. *Harrison. Principios de Medicina Interna, ed. 18ª.* Boston; 2012.
 44. Expert Panel on Detection EaToHBCiAATPI. Executive Summary of the Thrid Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) *J Am Med Assoc.* 2001;285:2486-2497.
 45. Goldstein JL, Hazzard WR, Schrott HG, Bierman EL, Motulsky AG. Hyperlipidemia in coronary heart disease. I. Lipid levels in 500 survivors of myocardial infarction. *J Clin Invest.* 1973;52:1533-1543.
 46. Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky AG. Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest.* 1973;52:1544-1568.
 47. Hazzard WR, Goldstein JL, Schrott MG, Motulsky AG, Bierman EL. Hyperlipidemia in coronary heart disease. 3. Evaluation of lipoprotein phenotypes of 156 genetically defined survivors of myocardial infarction. *J Clin Invest.* 1973;52:1569-1577.
 48. Nikkila EA, Aro A. Family study of serum lipids and lipoproteins in coronary heart-disease. *Lancet.* 1973;1:954-959.
 49. Rose HG, Kranz P, Weinstock M, Juliano J, Haft JI. Inheritance of combined hyperlipoproteinemia: evidence for a new lipoprotein phenotype. *Am J Med.* 1973;54:148-160.
 50. Brunzell JD, Porte D, Jr., Bierman EL. Abnormal lipoprotein-lipase-mediated plasma triglyceride removal in untreated diabetes mellitus associated with hypertriglyceridemia. *Metabolism.* 1979;28:901-907.
 51. Veerkamp MJ, de Graaf J, Bredie SJ, Hendriks JC, Demacker PN, Stalenhoef AF. Diagnosis of familial combined hyperlipidemia based on lipid phenotype expression in 32 families: results of a 5-year follow-up study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:274-282.
 52. de Graaf J, Veerkamp MJ, Stalenhoef AF. Metabolic pathogenesis of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on insulin resistance, adipose tissue metabolism and free fatty acids. *J R Soc Med.* 2002;95 Suppl 42:46-53.
 53. Bredie SJ, Demacker PN, Stalenhoef AF. Metabolic and genetic aspects of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on low-density lipoprotein heterogeneity. *Eur J Clin Invest.* 1997;27:802-811.
 54. Ayyobi AF, McGladdery SH, McNeely MJ, Austin MA, Motulsky AG, Brunzell JD. Small, dense LDL and elevated apolipoprotein B are the common characteristics for the three major lipid phenotypes of familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1289-1294.

55. Veerkamp MJ, de Graaf J, Hendriks JC, Demacker PN, Stalenhoef AF. Nomogram to diagnose familial combined hyperlipidemia on the basis of results of a 5-year follow-up study. *Circulation*. 2004;109:2980-2985.
56. Sniderman AD, Castro Cabezas M, Ribalta J, Carmena R, de Bruin TW, de Graaf J, Erkelens DW, Humphries SE, Masana L, Real JT, Talmud PJ, Taskinen MR. A proposal to redefine familial combined hyperlipidaemia -- third workshop on FCHL held in Barcelona from 3 to 5 May 2001, during the scientific sessions of the European Society for Clinical Investigation. *Eur J Clin Invest*. 2002;32:71-73.
57. Lopez-Ruiz A, Jarabo MM, Martinez-Triguero ML, Morales-Suarez-Varela M, Sola E, Banuls C, Casado M, Hernandez-Mijares A. Small and dense LDL in familial combined hyperlipidemia and N291S polymorphism of the lipoprotein lipase gene. *Lipids Health Dis*. 2009;8:12.
58. Hoffer MJ, Bredie SJ, Boomsma DI, Reymer PW, Kastelein JJ, de Knijff P, Demacker PN, Stalenhoef AF, Havekes LM, Frants RR. The lipoprotein lipase (Asn291-->Ser) mutation is associated with elevated lipid levels in families with familial combined hyperlipidaemia. *Atherosclerosis*. 1996;119:159-167.
59. Suviolahti E, Lilja HE, Pajukanta P. Unraveling the complex genetics of familial combined hyperlipidemia. *Ann Med*. 2006;38:337-351.
60. Civeira F, Jarauta E, Cenarro A, Garcia-Otin AL, Tejedor D, Zambon D, Mallen M, Ros E, Pocovi M. Frequency of low-density lipoprotein receptor gene mutations in patients with a clinical diagnosis of familial combined hyperlipidemia in a clinical setting. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52:1546-1553.
61. Eurlings PM, Van Der Kallen CJ, Geurts JM, Kouwenberg P, Boeckx WD, De Bruin TW. Identification of differentially expressed genes in subcutaneous adipose tissue from subjects with familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res*. 2002;43:930-935.
62. Austin MA, Wijsman E, Guo SW, Krauss RM, Brunzell JD, Deeb S. Lack of evidence for linkage between low-density lipoprotein subclass phenotypes and the apolipoprotein B locus in familial combined hyperlipidemia. *Genet Epidemiol*. 1991;8:287-297.
63. LaBelle M, Austin MA, Rubin E, Krauss RM. Linkage analysis of low-density lipoprotein subclass phenotypes and the apolipoprotein B gene. *Genet Epidemiol*. 1991;8:269-275.
64. Holzl B, Kraft HG, Wiebusch H, Sandhofer A, Patsch J, Sandhofer F, Paulweber B. Two novel mutations in the lipoprotein lipase gene in a family with marked hypertriglyceridemia in heterozygous carriers. Potential interaction with the polymorphic marker D1S104 on chromosome 1q21-q23. *J Lipid Res*. 2000;41:734-741.
65. de Bruin TW, Maily F, van Barlingen HH, Fisher R, Castro Cabezas M, Talmud P, Dallinga-Thie GM, Humphries SE. Lipoprotein lipase gene mutations D9N and N291S in four pedigrees with familial combined hyperlipidaemia. *Eur J Clin Invest*. 1996;26:631-639.

66. Pajukanta P, Bodnar JS, Sallinen R, Chu M, Airaksinen T, Xiao Q, Castellani LW, Sheth SS, Wessman M, Palotie A, Sinsheimer JS, Demant P, Lusi AJ, Peltonen L. Fine mapping of Hyplip1 and the human homolog, a potential locus for FCHL. *Mamm Genome*. 2001;12:238-245.
67. Schaffler A, Orso E, Palitzsch KD, Buchler C, Drobnik W, Furst A, Scholmerich J, Schmitz G. The human apM-1, an adipocyte-specific gene linked to the family of TNF's and to genes expressed in activated T cells, is mapped to chromosome 1q21.3-q23, a susceptibility locus identified for familial combined hyperlipidaemia (FCH). *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;260:416-425.
68. Wojciechowski AP, Farrall M, Cullen P, Wilson TM, Bayliss JD, Farren B, Griffin BA, Caslake MJ, Packard CJ, Shepherd J, et al. Familial combined hyperlipidaemia linked to the apolipoprotein AI-CII-AIV gene cluster on chromosome 11q23-q24. *Nature*. 1991;349:161-164.
69. Aouizerat BE, Allayee H, Bodnar J, Krass KL, Peltonen L, de Bruin TW, Rotter JI, Lusi AJ. Novel genes for familial combined hyperlipidemia. *Curr Opin Lipidol*. 1999;10:113-122.
70. Ribalta J, Castro-Cabezas M, Plana N, Masana L. Visión actualizada de la hiperlipidemia familiar combinada aplicada a la mejora del diagnóstico. *Clin Invest Arterioscl*. 2005;17:34-47.
71. Veerkamp MJ, de Graaf J, Stalenhoef AF. Role of insulin resistance in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1026-1031.
72. Babirak SP, Iverius PH, Fujimoto WY, Brunzell JD. Detection and characterization of the heterozygote state for lipoprotein lipase deficiency. *Arteriosclerosis*. 1989;9:326-334.
73. Babirak SP, Brown BG, Brunzell JD. Familial combined hyperlipidemia and abnormal lipoprotein lipase. *Arterioscler Thromb*. 1992;12:1176-1183.
74. Sniderman AD, Cianflone K, Arner P, Summers LK, Frayn KN. The adipocyte, fatty acid trapping, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18:147-151.
75. Reynisdottir S, Eriksson M, Angelin B, Arner P. Impaired activation of adipocyte lipolysis in familial combined hyperlipidemia. *J Clin Invest*. 1995;95:2161-2169.
76. Ylitalo K, Large V, Pajukanta P, Reynisdottir S, Porkka KV, Vakkilainen J, Nuotio I, Taskinen MR, Arner P. Reduced hormone-sensitive lipase activity is not a major metabolic defect in Finnish FCHL families. *Atherosclerosis*. 2000;153:373-381.
77. Meijssen S, Derksen RJ, Bilecen S, Erkelens DW, Cabezas MC. In vivo modulation of plasma free fatty acids in patients with familial combined hyperlipidemia using lipid-lowering medication. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:1576-1580.
78. Sesti G. Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2006;20:665-679.

79. Bhattacharya S, Dey D, Roy SS. Molecular mechanism of insulin resistance. *J Biosci.* 2007;32:405-413.
80. Lowe WL. Principles of Molecular Medicine. In: Jameson JL, ed.; 1998.
81. Virkamaki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 1999;103:931-943.
82. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001;414:799-806.
83. Avruch J. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem.* 1998;182:31-48.
84. Myers MGJ, White MF. The Molecular Basis of Insulin Action. In: Gruenberg G ZYTaf, ed. *Insulin Signaling: From cultured cells to animal models.* New York; 2002.
85. Olivares JA, Arellano A. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Revista de Educación Bioquímica.* 2008;27:9-18.
86. Youngren JF. Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64:873-891.
87. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie.* 2005;87:99-109.
88. Bredie SJ, Tack CJ, Smits P, Stalenhoef AF. Nonobese patients with familial combined hyperlipidemia are insulin resistant compared with their nonaffected relatives. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1465-1471.
89. Karjalainen L, Pihlajamaki J, Karhapaa P, Laakso M. Impaired insulin-stimulated glucose oxidation and free fatty acid suppression in patients with familial combined hyperlipidemia: a precursor defect for dyslipidemia? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1548-1553.
90. Pihlajamaki J, Karjalainen L, Karhapaa P, Vauhkonen I, Laakso M. Impaired free fatty acid suppression during hyperinsulinemia is a characteristic finding in familial combined hyperlipidemia, but insulin resistance is observed only in hypertriglyceridemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:164-170.
91. Aitman TJ, Godsland IF, Farren B, Crook D, Wong HJ, Scott J. Defects of insulin action on fatty acid and carbohydrate metabolism in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:748-754.
92. Vakkilainen J, Porkka KV, Nuotio I, Pajukanta P, Suurinkeroinen L, Ylitalo K, Viikari JS, Ehnholm C, Taskinen MR. Glucose intolerance in familial combined hyperlipidaemia. EUFAM study group. *Eur J Clin Invest.* 1998;28:24-32.
93. Purnell JQ, Kahn SE, Schwartz RS, Brunzell JD. Relationship of insulin sensitivity and ApoB levels to intra-abdominal fat in subjects with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:567-572.
94. Ascaso JF, Sales J, Merchante A, Real J, Lorente R, Martinez-Valls J, Carmena R. Influence of obesity on plasma lipoproteins, glycaemia and

- insulinaemia in patients with familial combined hyperlipidaemia. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1997;21:360-366.
95. Jacobson MS, Yoon DJ, Frank GR. Serum leptin is elevated out of proportion to the body mass index in adolescent females with familial combined hyperlipidemia (FCH). *Clin Pediatr (Phila)*. 1999;38:49-53.
 96. Watts GF. Postprandial lipaemia in familial hypercholesterolaemia: clinical and metabolic significance. *Atherosclerosis*. 2000;148:426-428.
 97. Anderson RA, Evans ML, Ellis GR, Graham J, Morris K, Jackson SK, Lewis MJ, Rees A, Frenneaux MP. The relationships between post-prandial lipaemia, endothelial function and oxidative stress in healthy individuals and patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. 2001;154:475-483.
 98. Castro Cabezas M. Postprandial lipaemia in familial combined hyperlipidaemia. *Biochem Soc Trans*. 2003;31:1090-1093.
 99. van Wijk JP, Buirma R, van Tol A, Halkes CJ, De Jaegere PP, Plokker HW, van der Helm YJ, Castro Cabezas M. Effects of increasing doses of simvastatin on fasting lipoprotein subfractions, and the effect of high-dose simvastatin on postprandial chylomicron remnant clearance in normotriglyceridemic patients with premature coronary sclerosis. *Atherosclerosis*. 2005;178:147-155.
 100. Zilvermit DB. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation*. 1979;60:473-485.
 101. Castro Cabezas M, de Bruin TW, de Valk HW, Shoulders CC, Jansen H, Willem Erkelens D. Impaired fatty acid metabolism in familial combined hyperlipidemia. A mechanism associating hepatic apolipoprotein B overproduction and insulin resistance. *J Clin Invest*. 1993;92:160-168.
 102. ter Avest E, Holewijn S, Bredie SJ, Stalenhoef AF, de Graaf J. Remnant particles are the major determinant of an increased intima media thickness in patients with familial combined hyperlipidemia (FCH). *Atherosclerosis*. 2007;191:220-226.
 103. van Oostrom AJ, Sijmonsma TP, Verseyden C, Jansen EH, de Koning EJ, Rabelink TJ, Castro Cabezas M. Postprandial recruitment of neutrophils may contribute to endothelial dysfunction. *J Lipid Res*. 2003;44:576-583.
 104. Alipour A, Elte JW, van Zaanen HC, Rietveld AP, Cabezas MC. Postprandial inflammation and endothelial dysfunction. *Biochem Soc Trans*. 2007;35:466-469.
 105. Bartual A, González C, Martínez-Hervás S, Real JT, Chaves FJ, Priego MA, Ascaso JF, Carmena R. Perfil diario de triglicéridos en sujetos con hiperlipidemia familiar combinada de una población del sur de Europa. *Clin Invest Arterioscl*. 2005;17:10-15.
 106. Castro Cabezas M, Halkes CJ, Meijssen S, van Oostrom AJ, Erkelens DW. Diurnal triglyceride profiles: a novel approach to study triglyceride changes. *Atherosclerosis*. 2001;155:219-228.
 107. van Oostrom AJ, Castro Cabezas M, Ribalta J, Masana L, Twickler TB, Remijnse TA, Erkelens DW. Diurnal triglyceride profiles in healthy

- normolipidemic male subjects are associated to insulin sensitivity, body composition and diet. *Eur J Clin Invest*. 2000;30:964-971.
108. Ascaso JF, Merchante A, Lorente RI, Real JT, Martínez-Valls J, Carmena R. A study of insulin resistance using the minimal model in nondiabetic familial combined hyperlipidemic patients. *Metabolism*. 1998;47:508-513.
 109. Priego MA, Civera M, Real JT, Martínez-Valls J, Ascaso JF, Carmena R. Obesidad abdominal e índice de resistencia a la insulina en la hiperlipidemia familiar combinada. *Clin Invest Arterioscl*. 1999;11:291-296.
 110. Halkes CJ, Van Wijk JP, Ribalta J, Masana L, Castro Cabezas M. Diurnal triglyceridaemia and insulin resistance in mildly obese subjects with normal fasting plasma lipids. *J Intern Med*. 2004;255:74-81.
 111. Nourooz-Zadeh J, Smith CC, Betteridge DJ. Measures of oxidative stress in heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*. 2001;156:435-441.
 112. Mueller CF, Laude K, McNally JS, Harrison DG. ATVB in focus: redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:274-278.
 113. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1135-1143.
 114. Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1102-1111.
 115. Mercurio F, Manning AM. NF-kappaB as a primary regulator of the stress response. *Oncogene*. 1999;18:6163-6171.
 116. de Winther MP, Kanters E, Kraal G, Hofker MH. Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:904-914.
 117. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 2004;18:2195-2224.
 118. Luo JL, Kamata H, Karin M. IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest*. 2005;115:2625-2632.
 119. Kempe S, Kestler H, Lasar A, Wirth T. NF-kappaB controls the global pro-inflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a pro-atherogenic program. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:5308-5319.
 120. Yerneni KK, Bai W, Khan BV, Medford RM, Natarajan R. Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes*. 1999;48:855-864.
 121. Maehara K, Oh-Hashi K, Isobe KI. Early growth-responsive-1-dependent manganese superoxide dismutase gene transcription mediated by platelet-derived growth factor. *FASEB J*. 2001;15:2025-2026.
 122. Devaraj S, O'Keefe G, Jialal I. Defining the proinflammatory phenotype using high sensitive C-reactive protein levels as the biomarker. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:4549-4554.

123. Yeh ET. CRP as a mediator of disease. *Circulation*. 2004;109:1111-14.
124. Branen L, Hovgaard L, Nitulescu M, Bengtsson E, Nilsson J, Jovinge S. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:2137-2142.
125. Boesten LS, Zadelaar AS, van Nieuwkoop A, Gijbels MJ, de Winther MP, Havekes LM, van Vlijmen BJ. Tumor necrosis factor-alpha promotes atherosclerotic lesion progression in APOE*3-Leiden transgenic mice. *Cardiovasc Res*. 2005;66:179-185.
126. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. 2000;87:840-844.
127. Chi H, Messas E, Levine RA, Graves DT, Amar S. Interleukin-1 receptor signaling mediates atherosclerosis associated with bacterial exposure and/or a high-fat diet in a murine apolipoprotein E heterozygote model: pharmacotherapeutic implications. *Circulation*. 2004;110:1678-1685.
128. Gómez Gerique JA. Inflamación, hemostasia y enfermedad coronaria. La proteína C reactiva y el dímero D como marcadores del proceso de arteriosclerosis. *Clin Invest Arterioscl*. 2002;14:242-257.
129. Marshall HE, Merchant K, Stamler JS. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *FASEB J*. 2000;14:1889-1900.
130. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med*. 2005;11:191-198.
131. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med*. 2005;11:183-190.
132. Sonnenberg GE, Krakower GR, Kissebah AH. A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome. *Obes Res*. 2004;12:180-186.
133. Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Bandyopadhyay A. The potential influence of inflammation and insulin resistance on the pathogenesis and treatment of atherosclerosis-related complications in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:2422-2429.
134. Klebanoff SJ. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann Intern Med*. 1980;93:480-489.
135. Zhang R, Brennan ML, Shen Z, MacPherson JC, Schmitt D, Molenda CE, Hazen SL. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J Biol Chem*. 2002;277:46116-46122.
136. Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2000;28:1717-1725.
137. Heinecke JW. Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 2003;91:12A-16A.

138. Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1994;94:437-444.
139. Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Virmani R, Heinecke JW, Libby P. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol.* 2001;158:879-891.
140. Hazen SL, Heinecke JW. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest.* 1997;99:2075-2081.
141. Thukkani AK, McHowat J, Hsu FF, Brennan ML, Hazen SL, Ford DA. Identification of alpha-chloro fatty aldehydes and unsaturated lysophosphatidylcholine molecular species in human atherosclerotic lesions. *Circulation.* 2003;108:3128-3133.
142. Beckman JS, Crow JP. Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem Soc Trans.* 1993;21:330-334.
143. Hazell LJ, Baerenthaler G, Stocker R. Correlation between intima-to-media ratio, apolipoprotein B-100, myeloperoxidase, and hypochlorite-oxidized proteins in human atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* 2001;31:1254-1262.
144. Kutter D, Devaquet P, Vanderstocken G, Paulus JM, Marchal V, Gothot A. Consequences of total and subtotal myeloperoxidase deficiency: risk or benefit? *Acta Haematol.* 2000;104:10-15.
145. Ascaso JF, Lorente R, Merchante A, Real JT, Priego A, Carmena R. Insulin resistance in patients with familial combined hyperlipidemia and coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1997;80:1484-1487.
146. Ascaso JF, Real JT, Merchante A, Rodrigo A, Carmena R. Lipoprotein phenotype and insulin resistance in familial combined hyperlipidemia. *Metabolism.* 2000;49:1627-1631.
147. Ascaso JF, Real JT, Carmena R. Insulin resistance and familial dyslipidaemias. *Diabetes Obes Metab.* 1999;1:323-330.
148. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999;340:448-454.
149. Festa A, D'Agostino R, Jr., Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation.* 2000;102:42-47.
150. Martínez_Hervás S. Oxidación e inflamación en la Hiperlipidemia Familiar Combinada *Departamento de Medicina.* Valencia: Universidad de Valencia; 2007.
151. Martinez-Hervas S, Fandos M, Real JT, Espinosa O, Chaves FJ, Saez GT, Salvador A, Cerda C, Carmena R, Ascaso JF. Insulin resistance and oxidative stress in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis.* 2008;199:384-389.

152. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem*. 1974;20:470-475.
153. Wahlefeld AW. Triglycerides: determination after enzymatic hydrolysis. In: Bergmeyer HU, ed. *Methods of enzymatic analysis*. New York,: Academic Press.; 1974.
154. Riesen WF. Lipid metabolism. In: Thomas L, ed. *Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results*. . Frankfurt/Main: TH-Books Verlagsgesellschaft.; 1998.
155. Miki Y, Heller C. A homogeneous assay for the selective measurement of LDL-cholesterol in serum. Enzymatic selective protection method. *Clin Lab*. 1999;45:398-401.
156. Marcovina SM, Albers JJ, Dati F, Ledue TB, Ritchie RF. International Federation of Clinical Chemistry standardization project for measurements of apolipoproteins A-I and B. *Clin Chem*. 1991;37:1676-1682.
157. Garcia-Estevez DA, Araujo-Vilar D, Fiestras-Janeiro G, Saavedra-Gonzalez A, Cabezas-Cerrato J. Insulin resistance in essential hypertension: a conflictive point of view. *Diabet Med*. 2003;20:1035.
158. Barthelmai W, Czok R. [Enzymatic determinations of glucose in the blood, cerebrospinal fluid and urine]. *Klin Wochenschr*. 1962;40:585-589.
159. Sapin R, Le Galudec V, Gasser F, Pinget M, Grucker D. Elecsys insulin assay: free insulin determination and the absence of cross-reactivity with insulin lispro. *Clin Chem*. 2001;47:602-605.
160. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28:412-419.
161. Ascaso JF, Pardo S, Real JT, Lorente RI, Priego A, Carmena R. Diagnosing insulin resistance by simple quantitative methods in subjects with normal glucose metabolism. *Diabetes Care*. 2003;26:3320-3325.
162. Ascaso JF, Romero P, Real JT, Priego A, Valdecabres C, Carmena R. [Insulin resistance quantification by fasting insulin plasma values and HOMA index in a non-diabetic population]. *Med Clin (Barc)*. 2001;117:530-533.
163. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685-1695.
164. Loskutoff DJ, Sawdey M, Mimuro J. *Type 1 plasminogen activator inhibitor*. Philadelphia: WB Saunders Company; 1988.
165. Loskutoff DJ. Regulation of PAI-1 gene expression. *Fibrinolysis*. 1991;5:197-206.
166. Mateo J, Santamaría A, Fontcuberta J. Fisiología y exploración de la hemostasia. In: Sans-Sabrafen J, Besses Raebel C, Vives Corrons JL, eds. *Hematología Clínica*. Barcelona: Elsevier; 2006.
167. Baudner S, Bienvenu J, Blirup-Jensen S, Carlström A, Johnson AM, Milford-Ward A, Ritchie RF, Svendsen PJ, Whicher J. The certification of a

matrix reference material for immunochemical measurement of 14 human serum proteins CRM 470. In: BCR/92/92 1992 Community Bureau of References (BCR) of the Commission of the European Communities. BCR Informations RM, ed. Brussels.; 1993.

168. Whicher JT, Ritchie RF, Johnson AM, Baudner S, Bienvenu J, Blirup-Jensen S, Carlstrom A, Dati F, Ward AM, Svendsen PJ. New international reference preparation for proteins in human serum (RPPHS). *Clin Chem.* 1994;40:934-938.
169. Meigs JB, Rutter MK, Sullivan LM, Fox CS, D'Agostino RB, Sr., Wilson PW. Impact of insulin resistance on risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in people with metabolic syndrome. *Diabetes Care.* 2007;30:1219-1225.
170. Martinez-Hervas S, Real JT, Priego A, Sanz J, Martin JM, Carmena R, Ascaso JF. [Familial combined hyperlipidemia, metabolic syndrome and cardiovascular disease]. *Rev Esp Cardiol.* 2006;59:1195-1198.
171. Ascaso JF, Sales J, Priego A, Merchante A, Carmena-Ramon R, Carmena R. [Changes in insulin secretion in familial combined hyperlipemia]. *Med Clin (Barc).* 1997;108:530-533.
172. Georgieva AM, Cate HT, Keulen ET, van Oerle R, Govers-Riemslog JW, Hamulyak K, van der Kallen CJ, Van Greevenbroek MM, De Bruin TW. Prothrombotic markers in familial combined hyperlipidemia: evidence of endothelial cell activation and relation to metabolic syndrome. *Atherosclerosis.* 2004;175:345-351.
173. Verseyden C, Meijssen S, Cabezas MC. Effects of atorvastatin on fasting plasma and marginated apolipoproteins B48 and B100 in large, triglyceride-rich lipoproteins in familial combined hyperlipidemia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:5021-5029.
174. van Oostrom AJ, van Wijk J, Cabezas MC. Lipaemia, inflammation and atherosclerosis: novel opportunities in the understanding and treatment of atherosclerosis. *Drugs.* 2004;64 Suppl 2:19-41.
175. Alipour A, Elte JW, van Zaanen HC, Rietveld AP, Castro Cabezas M. Novel aspects of postprandial lipemia in relation to atherosclerosis. *Atheroscler Suppl.* 2008;9:39-44.
176. Pauciullo P, Gentile M, Marotta G, Baiano A, Ubaldi S, Jossa F, Iannuzzo G, Faccenda F, Panico S, Rubba P. Tumor necrosis factor-alpha is a marker of familial combined hyperlipidemia, independently of metabolic syndrome. *Metabolism.* 2008;57:563-568.
177. Karasek D, Vaverkova H, Halenka M, Budikova M, Novotny D. Soluble cell adhesion molecules s-VCAM-1 and s-ICAM-1 in subjects with familial combined hyperlipidemia. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005;149:101-108.
178. Ruan H, Hacoheh N, Golub TR, Van Parijs L, Lodish HF. Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes: nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes.* 2002;51:1319-1336.

179. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuzzi AG, Pepys MB, Maseri A. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med.* 1994;331:417-424.
180. Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, Altamura S, Caligiuri G, Monaco C, Rebuzzi AG, Ciliberto G, Maseri A. Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation.* 1996;94:874-877.
181. Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *N Engl J Med.* 2000;343:1139-1147.
182. Hoekstra T, Geleijnse JM, Schouten EG, Kluft C. Plasminogen activator inhibitor-type 1: its plasma determinants and relation with cardiovascular risk. *Thromb Haemost.* 2004;91:861-872.
183. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:2548-2556.
184. Zorio E, Gilabert-Estelles J, Espana F, Ramon LA, Cosin R, Estelles A. Fibrinolysis: the key to new pathogenetic mechanisms. *Curr Med Chem.* 2008;15:923-929.
185. Meade TW, Ruddock V, Stirling Y, Chakrabarti R, Miller GJ. Fibrinolytic activity, clotting factors, and long-term incidence of ischaemic heart disease in the Northwick Park Heart Study. *Lancet.* 1993;342:1076-1079.
186. Lupu F, Heim DA, Bachmann F, Hurni M, Kakkar VV, Kruithof EK. Plasminogen activator expression in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1444-1455.
187. Robbie LA, Booth NA, Brown AJ, Bennett B. Inhibitors of fibrinolysis are elevated in atherosclerotic plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:539-545.
188. Grancha S, Estellés A, Falcó C, Chirivella M, España F, Aznar J. Detailed localization of type 1 plasminogen inhibitor mRNA expression and antigen in atherosclerotic plaque on human coronary artery. *Fibrinol Proteol.* 1998;12:53-61.
189. Almer LO, Ohlin H. Elevated levels of the rapid inhibitor of plasminogen activator (t-PAI) in acute myocardial infarction. *Thromb Res.* 1987;47:335-339.
190. Estelles A, Tormo G, Aznar J, Espana F, Tormo V. Reduced fibrinolytic activity in coronary heart disease in basal conditions and after exercise. *Thromb Res.* 1985;40:373-383.
191. Hamsten A, Wiman B, de Faire U, Blomback M. Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1985;313:1557-1563.
192. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2000;342:1792-1801.
193. Aznar J, Estelles A. Role of plasminogen activator inhibitor type 1 in the pathogenesis of coronary artery diseases. *Haemostasis.* 1994;24:243-251.

194. Aznar J, Estelles A, Tormo G, Sapena P, Tormo V, Blanch S, Espana F. Plasminogen activator inhibitor activity and other fibrinolytic variables in patients with coronary artery disease. *Br Heart J*. 1988;59:535-541.
195. Chandler WL, Stratton JR. Laboratory evaluation of fibrinolysis in patients with a history of myocardial infarction. *Am J Clin Pathol*. 1994;102:248-252.
196. Thogersen AM, Jansson JH, Boman K, Nilsson TK, Weinehall L, Huhtasaari F, Hallmans G. High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation*. 1998;98:2241-2247.
197. Hamsten A, de Faire U, Walldius G, Dahlen G, Szamosi A, Landou C, Blomback M, Wiman B. Plasminogen activator inhibitor in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet*. 1987;2:3-9.
198. Held C, Hjemdahl P, Rehnqvist N, Wallen NH, Bjorkander I, Eriksson SV, Forslund L, Wiman B. Fibrinolytic variables and cardiovascular prognosis in patients with stable angina pectoris treated with verapamil or metoprolol. Results from the Angina Prognosis study in Stockholm. *Circulation*. 1997;95:2380-2386.
199. Malmberg K, Bavenholm P, Hamsten A. Clinical and biochemical factors associated with prognosis after myocardial infarction at a young age. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24:592-599.
200. Cortellaro M, Cofrancesco E, Boschetti C, Mussoni L, Donati MB, Cardillo M, Catalano M, Gabrielli L, Lombardi B, Specchia G, et al. Increased fibrin turnover and high PAI-1 activity as predictors of ischemic events in atherosclerotic patients. A case-control study. The PLAT Group. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:1412-1417.
201. Sargento L, Saldanha C, Monteiro J, Perdigao C, Martins e Silva J. Evidence of prolonged disturbances in the haemostatic, hemorheologic and inflammatory profiles in transmural myocardial infarction survivors. *Thromb Haemost*. 2003;89:892-903.
202. Strauss BH, Lau HK, Bowman KA, Sparkes J, Chisholm RJ, Garvey MB, Fenkell LL, Natarajan MK, Singh I, Teitel JM. Plasma urokinase antigen and plasminogen activator inhibitor-1 antigen levels predict angiographic coronary restenosis. *Circulation*. 1999;100:1616-1622.
203. Rifon J, Paramo JA, Panizo C, Montes R, Rocha E. The increase of plasminogen activator inhibitor activity is associated with graft occlusion in patients undergoing aorto-coronary bypass surgery. *Br J Haematol*. 1997;99:262-267.
204. Doggen CJ, Bertina RM, Cats VM, Reitsma PH, Rosendaal FR. The 4G/5G polymorphism in the plasminogen activator inhibitor-1 gene is not associated with myocardial infarction. *Thromb Haemost*. 1999;82:115-120.
205. Juhan-Vague I, Pyke SD, Alessi MC, Jespersen J, Haverkate F, Thompson SG. Fibrinolytic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. ECAT Study Group. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities. *Circulation*. 1996;94:2057-2063.

206. Juhan-Vague I, Alessi MC, Mavri A, Morange PE. Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk. *J Thromb Haemost.* 2003;1:1575-1579.
207. Aubert H, Frere C, Aillaud MF, Morange PE, Juhan-Vague I, Alessi MC. Weak and non-independent association between plasma TAFI antigen levels and the insulin resistance syndrome. *J Thromb Haemost.* 2003;1:791-797.
208. Karasek D, Vaverkova H, Halenka M, Slavik L, Novotny D. Endothelial haemostatic markers in members of families with familial combined hyperlipidemia. *Thromb Res.* 2009;123:466-475.
209. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.* 1989;320:915-924.
210. Hazell LJ, Stocker R. Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. *Biochem J.* 1993;290 (Pt 1):165-172.
211. Zheng L, Settle M, Brubaker G, Schmitt D, Hazen SL, Smith JD, Kinter M. Localization of nitration and chlorination sites on apolipoprotein A-I catalyzed by myeloperoxidase in human atheroma and associated oxidative impairment in ABCA1-dependent cholesterol efflux from macrophages. *J Biol Chem.* 2005;280:38-47.
212. Bergt C, Pennathur S, Fu X, Byun J, O'Brien K, McDonald TO, Singh P, Anantharamaiah GM, Chait A, Brunzell J, Geary RL, Oram JF, Heinecke JW. The myeloperoxidase product hypochlorous acid oxidizes HDL in the human artery wall and impairs ABCA1-dependent cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:13032-13037.
213. Pennathur S, Bergt C, Shao B, Byun J, Kassim SY, Singh P, Green PS, McDonald TO, Brunzell J, Chait A, Oram JF, O'Brien K, Geary RL, Heinecke JW. Human atherosclerotic intima and blood of patients with established coronary artery disease contain high density lipoprotein damaged by reactive nitrogen species. *J Biol Chem.* 2004;279:42977-42983.
214. Sugiyama S, Kugiyama K, Aikawa M, Nakamura S, Ogawa H, Libby P. Hypochlorous acid, a macrophage product, induces endothelial apoptosis and tissue factor expression: involvement of myeloperoxidase-mediated oxidant in plaque erosion and thrombogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1309-1314.
215. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets. *Blood.* 1999;93:3831-3838.
216. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation.* 2004;109:II27-33.
217. Schindhelm RK, van der Zwan LP, Teerlink T, Scheffer PG. Myeloperoxidase: a useful biomarker for cardiovascular disease risk stratification? *Clin Chem.* 2009;55:1462-1470.

ANEXO

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

SERVICIO DE ENDOCRINOLOGÍA HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALENCIA.

Datos del donante

Apellidos:

Nombre:

Fecha:

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: ESTUDIO DE FACTORES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE ENFERMEDADES DE ALTO RIESGO CARDIOVASCULAR Y DE SUS COMPLICACIONES.

El adecuado avance en la investigación biomédica hace necesario estudiar muestras de sangre y orina de pacientes con diferentes enfermedades y de voluntarios sanos, para conocer diferentes parámetros clínicos, bioquímicos y genéticos de la población sana y de dichos pacientes.

El almacenamiento de las muestras biológicas obtenidas a partir de su sangre por parte del Servicio de Endocrinología permitirá a los científicos disponer de muestras para investigar:

a) Factores clínicos, bioquímicos, genéticos y ambientales que influyen en el desarrollo de determinadas enfermedades o a la protección frente al desarrollo de las mismas; **b)** Factores que influyen en el desarrollo o no de las complicaciones ocasionadas por diferentes enfermedades; **c)** Factores que influyen en la respuesta al tratamiento de una enfermedad; **d)** Mecanismos por los cuales actúan estos factores; **e)** Desarrollo de métodos y protocolos para la detección y análisis de marcadores bioquímicos o genéticos que puedan estar relacionados con estas enfermedades.

El fin último de estos trabajos será siempre la mejora de la salud de la población mediante un conocimiento más profundo de las enfermedades presentes en la misma.

Toda la información personal que se recopile o genere en el estudio quedará protegida de acuerdo con la legislación vigente. Para ello emplearemos las medidas que se detallan más abajo.

Descripción del proceso:

- Se informará al donante sobre los objetivos del proyecto y se le responderá a las dudas que pueda plantear.
- El médico recogerá los datos del donante (sano o enfermo) mediante un cuestionario y los incluirá en una base de datos donde el donante se identificará con un código para proteger su identidad. Se solicitarán datos relacionados con la presencia de enfermedades en su familia, su historia médica, datos antropométricos, y el ambiente donde habita o trabaja. En el proceso de investigación ningún dato podrá relacionarse con su persona o familia.
 - Los datos que proporcione en el cuestionario debe hacerlo de forma totalmente voluntaria.
 - El no proporcionar información no tendrá ninguna consecuencia.
 - Por la información proporcionada en el cuestionario no percibirá ninguna recompensa económica o de otro tipo, exceptuando aquellas que de forma indirecta reviertan sobre la población como consecuencia de los estudios de investigación científica en los que esta información sea empleada o en su propia salud a partir de los estudios que se realicen.
 - La información contenida en el cuestionario una vez completado, será almacenada en soporte informático en por el Servicio de Endocrinología, los datos podrán ser transferidos de forma totalmente codificada a otros grupos.
 - Los datos registrados en dicho archivo serán susceptibles de ser tratados estadísticamente para los fines de investigación científica que se han descrito.
 - Los datos podrán ser proporcionados y tratados, siempre de forma anónima, por terceras personas que podrán hacerlo exclusivamente para los fines de investigación científica para los que nos ha dado su consentimiento.
 - En todo momento tendrá acceso a los datos registrados, pudiendo ejercer el derecho de rectificación, cancelación u oposición a su uso posterior a través del Servicio donde se haya realizado la donación.
 - Una vez haya completado el cuestionario, se le extraerá un volumen relativamente pequeño de sangre venosa (hasta 50 ml de sangre) mediante una punción en el brazo y se obtendrá una muestra de orina (20

ml). La donación de sangre apenas tiene efectos secundarios; lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en la zona de punción que desaparecen transcurridos 1 o 2 días. Para disminuir las molestias se intentará que la extracción coincida con una extracción rutinaria para realizar su seguimiento clínico-bioquímico.

– El Servicio de Endocrinología se compromete a que toda la información y todas las muestras recibidas lo sean de forma anónima mediante codificación para su uso en investigación. De este modo, la identidad del donante nunca podrá ser conocida por los investigadores.

– A partir de las muestras donadas, por una parte se obtendrá plasma y se aislarán células sanguíneas, de donde se extraerá su ADN, ARN y proteínas. En algunos casos se cultivarán células sanguíneas para proyectos de investigación concretos. La orina será guardada sin procesar.

- Los datos bioquímicos (enzimas hepáticas, colesterol, etc.) obtenidos del análisis del plasma se incorporarán al fichero de datos del Servicio.

– Los productos obtenidos de las muestras se archivarán y quedarán custodiados, por un periodo mínimo de 3 años por el Servicio de Endocrinología.

– Al igual que los datos del cuestionario, los productos obtenidos de las muestras podrán ser empleados posteriormente en estudios de investigación biomédica realizados por nuestro centro y otros centros, nacionales o extranjeros, siempre que: 1) se cumplan los objetivos indicados; 2) hayan sido considerados de interés científico por un comité de evaluación del Servicio; 3) se cumplan los requisitos establecidos por los comités externos Científico y de Expertos Asesores en cuestiones Éticas, Económicas, Medio-ambientales, Jurídicas y Sociales.

– El donante podrá conocer para qué estudios de investigación han sido utilizados sus muestras y datos personales. Solo aquellos pacientes a los que se les realice un diagnóstico genético de una enfermedad concreta se le proporcionará la información obtenida del mismo; en el resto de los casos la información no se le comunicará ya que tiene poco valor a nivel individual (aunque sí lo tenga en estudios poblacionales).

– El Servicio de Endocrinología se compromete a no comercializar en ningún caso con las muestras ni con los datos personales obtenidos a partir de las muestras. No obstante, la información generada a partir de los estudios realizados sobre su muestra podría ser fuente de beneficios comerciales. En tal caso se preverán mecanismos para que estos beneficios reviertan en la salud de la población, aunque no de forma individual en el donante.

– El donante tiene derecho a solicitar en cualquier momento, y sin necesidad de especificar el motivo, la eliminación total de las muestras donadas y de la información relacionada con las mismas que en ese momento estén almacenadas.

– Para todo lo no previsto en este documento, se aplicará la legislación vigente sobre protección de datos de carácter personal (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre) y cualquier otra que resultara aplicable.

DECLARACIÓN DEL DONANTE:

He sido informado por el profesional de salud abajo mencionado:

– Sobre las ventajas e inconvenientes de este procedimiento.

– Sobre el lugar de obtención, almacenamiento y el proceso que sufrirán los datos personales y las muestras.

– Sobre el fin para el que se utilizarán mis muestras y datos personales (estudios genéticos, de salud pública o estadísticos, que cumplan todos los requisitos que exigen la ley, el Comité de Expertos Asesores en cuestiones Éticas, Económicas, Medio-ambientales, Jurídicas y Sociales, y el Comité Científico).

- Que la no donación de muestras no tendrá consecuencias sobre mi tratamiento.

– Que mis muestras y datos personales serán proporcionados de forma totalmente anónima a los investigadores.

– Que en cualquier momento puedo revocar mi consentimiento y solicitar la eliminación de mis datos personales y muestras que permanezcan almacenados en el Servicio de Endocrinología relacionados con esta donación. Esto no conllevará consecuencias sobre mi tratamiento.

– Que en cualquier momento puedo solicitar información genérica sobre los estudios para los que se han utilizado mis muestras.

– Que tengo derecho a saber qué datos personales se encuentran archivados en el Servicio de Endocrinología relacionados con esta donación.

– Que he comprendido la información recibida y he podido formular todas las preguntas que he creído oportunas.

- Accedo a que el Servicio de Endocrinología me contacte en el futuro en caso de que se estime oportuno añadir nuevos datos a los recogidos en el cuestionario de salud (sin que esto me obligue a dar estos datos en su momento).

CONSENTIMIENTO GENERAL:

Teniendo en cuenta todo lo anterior quiero realizar la donación de muestras biológicas para que puedan ser utilizadas en investigaciones biomédicas de interés científico y que hayan sido aprobadas por el correspondiente comité de ética.

- Sí
- No

Nombre: Firma:
Fecha de la firma:

CONSENTIMIENTO PARA PRUEBAS DE DIAGNOSTICO GENÉTICO:

He sido diagnosticado clínicamente de _____ y deseo que se me realice el estudio genético para identificar la/las mutaciones causantes de mi enfermedad y verificar este diagnóstico. Si no se encuentran mutaciones en los genes conocidos actualmente autorizo que mis muestras sean utilizadas para identificar otros genes causantes de la enfermedad que padezco o, en su caso, se estudien los genes que se identifiquen en un futuro.

- Sí
- No

Nombre: Firma:
Fecha de la firma:

Declaración del profesional de salud médica de que ha informado debidamente al donante.

Nombre: Firma:
Fecha de la firma:

APARTADO PARA LA REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo,revoco el consentimiento de participación en el estudio, arriba firmado, con fecha
Fecha de la revocación.....
Firma:

(Para revocar la presente autorización se deberá entregar este apartado en el Servicio de Endocrinología del Hospital Clínico Universitario de Valencia).