

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Medicina



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Programa doctorado 030 Bioquímica Clínico Médica i Immunologia

“ALTERACIONES METABÓLICAS DE LA HIPERLIPEMIA  
FAMILIAR COMBINADA Y SU ASOCIACIÓN CON LA OBESIDAD  
ABDOMINAL Y LA INFLAMACIÓN DE BAJO GRADO”

TESIS DOCTORAL

Presentada por: María Díaz Ruiz

Dirigida por: Prof. Dr. Antonio Hernández Mijares

Dra. María Luisa Martínez-Triguero

ANTONIO HERNÁNDEZ MIJARES catedrático del Departamento de Medicina de la Universitat de València y la Doctora MARÍA LUISA MARTÍNEZ TRIGUERO Facultativo Especialista del Hospital Universitario de La Fe,

INFORMAN QUE: la licenciada en Farmacia María Díaz Ruiz ha realizado, bajo su dirección y en los laboratorios del Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario Doctor Peset, el trabajo que lleva por título “ALTERACIONES METABÓLICAS DE LA HIPERLIPEMIA FAMILIAR COMBINADA Y SU ASOCIACIÓN CON LA OBESIDAD ABDOMINAL Y LA INFLAMACIÓN DE BAJO GRADO” y autorizan su presentación para optar al Grado de Doctor en Farmacia.

Y para que así conste, expiden y firman el presente informe, en Valencia, Octubre de 2014.

Fdo. Antonio Hernández Mijares

Fdo. María Luisa Martínez Triguero

## AGRADECIMIENTOS

El camino andado para la realización de esta tesis doctoral ha sido largo, lleno de ilusión, de esfuerzo y de colaboración por parte de distintas personas que de una manera u otra han dejado su sello en ella y en mí.

Quisiera por ello agradecer en primer lugar al Profesor Dr. Antonio Hernández por dirigirme esta tesis, por poner gran dedicación al proyecto, por sus profundos conocimientos y por su confianza en mí.

A su vez también quiero agradecer a mi codirectora de tesis, compañera analista y sobre todo amiga, la doctora María Luisa Martínez, por ofrecerme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral y estar siempre a mi lado.

A mis compañeros de residencia, especialmente a Ana, Mireya, y María del Monte, ¡cuantas vivencias en esos cuatro años!

Agradecer a Celia su inestimable ayuda en el tratamiento estadístico de los datos, por estar siempre dispuesta y con gran paciencia.

A Valentina por tanto apoyo mutuo, en tragos que nunca hubiéramos deseado. Tenemos garantizada la amistad a prueba!

A mis amigas, Blanca y Marta, por tantos momentos maravillosos en Farmacia y a lo largo de los años, por mantenernos siempre unidas y ser un gran apoyo en los momentos buenos y en los no tan buenos.

A mi querida Ceci, mi amiga casi hermana, desde la infancia, siempre todo ha sido más fácil estando a tu lado, gracias por tu alegría, optimismo y vitalidad, ¡no cambies nunca!

A todos mis familiares y amigos, a Carmen, Diana y Mónica, qué suerte haberos encontrado, espero que sigamos disfrutando de nuestra amistad por mucho tiempo!

A mi hermano, Daniel, por ser mi amigo y compartir toda mi vida, con tanto cariño. “¡Así de juntitos siempre, eh!”.

Mi sentimiento más profundo de admiración, a mis padres, Lucio e Isabel, ellos son los que me han enseñado a amar las cosas bien hechas, disfrutar con el trabajo y valorar el esfuerzo por conseguir metas. No hay palabras para agradeceros todo lo que me habéis inculcado, y por haberme ayudado a ser lo que soy.

Mil gracias a mi marido, Juan, compañero y amigo, por apoyarme siempre, por quererme tanto, por estar a mi lado y dar sentido a nuestro proyecto de vida.

“No hay nada mejor, que encontrar un amor..., a medida”

Y por último gracias a la vida por darme a mis dos amores, mis hijas, Jimena y Lucía, ellas son el motor y la fuerza para enfrentarme a todo. Os quiero.



<b>ÍNDICE</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>3</b>
<b>1.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
1. A Metabolismo lipídico	6
1. B Clasificación de las dislipemias	11
1. C Enfermedad cardiovascular e hiperlipemias	14
1. D Hiperlipemia familiar combinada	16
1.D.1 Epidemiología	17
1.D.2 Diagnóstico	18
1.D.3 Etiopatogenia	23
1.D.3.1 Alteraciones bioquímicas	23
1.D.3.2 Desórdenes metabólicos asociados	27
1.D.4 Fisiopatología	31
1.D.4.1 Arteriosclerosis y disfunción endotelial	31
1.D.4.2 Inflamación y arteriosclerosis	34
1.D.4.3 Marcadores inflamatorios	39
1.D.4.3.1 Proteína C reactiva	40
1.D.4.3.2 Citoquinas	41
1.D.4.3.3 Moléculas de adhesión celular	48

<b>2.- HIPÓTESIS</b>	56
<b>3.- OBJETIVOS</b>	58
<b>4.- PACIENTES Y MÉTODOS</b>	60
4.A Material	61
4.B Métodos	64
4.C Tratamiento estadístico	78
<b>5.- RESULTADOS</b>	80
5. A Variables antropométricas	81
5.B Parámetros hidrocarbonados	82
5.C Parámetros lipídicos	83
5.D Relación entre resistencia insulínica y parámetros lipídicos	84
5.E Parámetros inflamatorios	91
5.F Relación entre inflamación y parámetros hidrocarbonados	92
5.G Relación entre inflamación y parámetros lipídicos	94
5.H Parámetros de resistencia insulínica y fenotipo de las LDL	102
5.I. Parámetros inflamatorios y fenotipo de las LDL	104
<b>6.- DISCUSIÓN</b>	106
<b>7.- CONCLUSIONES</b>	115
<b>8.- BIBLIOGRAFÍA</b>	117

## ABREVIATURAS:

CT: Colesterol total

TG: Triglicéridos

QM: Quilomicrones

VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

IDL: Lipoproteína de densidad intermedia

LDL: Lipoproteína de baja densidad

HDL: Lipoproteína de alta densidad

LPL: Lipoproteinlipasa

LH: Lipasa hepática

HMGCoA reductasa: Hidroxi metil glutaril-Coenzima A reductasa

ACAT: Acil-Coenzima A colesterol aciltransferasa

ABCA1: ATP-binding cassette transporter A1

LCAT: Lecitin colesterol acil transferasa

CEPT: Proteína transferidora de ésteres de colesterol

ECV: enfermedades cardiovasculares

AE: Arteriosclerosis

HFC: Hiperlipemia familiar combinada

HF: Hipercolesterolemia familiar

HTGF: Hipertrigliceridemia familiar

RI: Resistencia a la insulina

AGL: Ácidos grasos libres

SM: Síndrome metabólico

IL: Interleuquinas

TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa

NF- $\kappa$ B: Factor de necrosis kappa B

UPS 1: Upstream transcription factor 1

ASP: Proteína estimuladora de la acilación

sdLDL: LDL pequeñas y densas

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

bFGF: Factor básico de crecimiento de fibroblastos

IGF-1: Factor 1 de crecimiento parecido a la insulina

TGF: Factor de crecimiento transformante

NO: Óxido nítrico

PGI<sub>2</sub>: Prostaciclina

PCR-u: Proteína C reactiva ultrasensible

VCAMs: Moléculas de adhesión vascular

ICAMs: Moléculas de adhesión intracelular

ELAMs: Moléculas de adhesión endotelial de leucocitos

MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

IMC: Índice masa corporal

IAP: Índice aterogénico del plasma

## **INTRODUCCIÓN**

## 1.- INTRODUCCIÓN

### 1. A METABOLISMO LIPÍDICO

Los lípidos son un grupo heterogéneo de moléculas solubles en solventes orgánicos no polares, e insolubles en solventes polares como el agua. Los lípidos más importantes son: el colesterol, triglicéridos, ácidos grasos y fosfolípidos. Entre sus funciones principales destacan el almacenamiento de energía (triglicéridos y ácidos grasos), constitución de membranas celulares (colesterol y fosfolípidos), participación en la digestión (constitución de sales biliares), y en el metabolismo formando parte de hormonas, vitaminas y cofactores (colesterol).

El estero principal tanto en seres humanos como en animales es el colesterol. Tanto el colesterol (CT) como los triglicéridos (TG) son lípidos con muy baja solubilidad que, para circular por el plasma, necesitan hacerlo unidos a proteínas (apoproteínas), formando así, las llamadas lipoproteínas, que están constituidas por un núcleo central o core, formado por ésteres de colesterol y triglicéridos (no polares o insolubles) y una envoltura con colesterol libre, fosfolípidos y apoproteínas.

Las lipoproteínas se clasifican atendiendo a su densidad (a mayor contenido en proteínas mayor densidad), a su peso molecular, a su tamaño y a su movilidad electroforética.

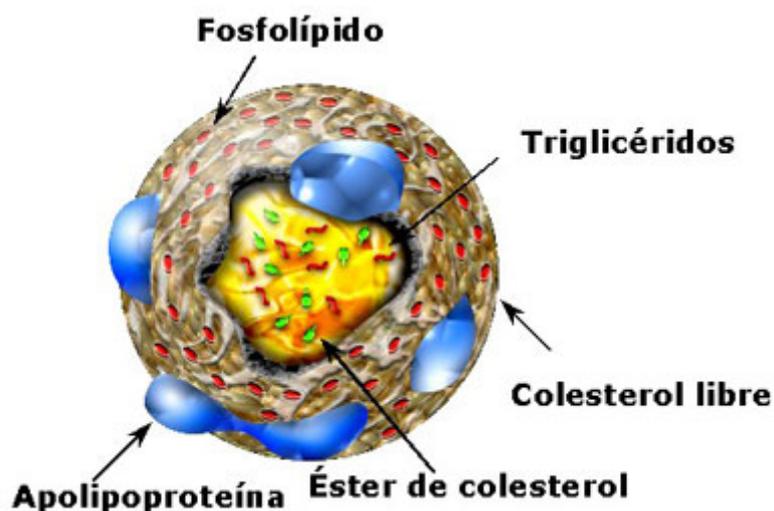


Figura 1. Estructura de las lipoproteínas

El metabolismo lipídico se compone de una vía exógena, por la cual se absorben, metabolizan y almacenan las grasas ingeridas a través de la dieta, cuya principal lipoproteína son los quilomicrones (QM) y una vía endógena por la cual se sintetizan y metabolizan lipoproteínas, sobre todo de origen hepático o derivadas de otras lipoproteínas. El hígado sintetiza lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) que luego se transformarán en lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y estas a su vez en lipoproteínas de baja densidad (LDL). Mediante el transporte reverso del colesterol, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son capaces de captar el colesterol de los tejidos periféricos y devolverlo al hígado, proceso crucial para evitar la arteriosclerosis.

#### Vía exógena del metabolismo lipídico

Los lípidos de la dieta, antes de ser absorbidos, deben hacerse solubles mediante su inclusión en micelas mixtas que contienen colesterol libre, monoglicéridos, fosfolípidos y ácidos biliares conjugados. Así se facilita el transporte de colesterol y otros lípidos. Si no hubiera ácidos biliares, la absorción y digestión de grasas se vería muy disminuida. De esta manera se absorben al día entre el 30-60% del colesterol de la dieta en el intestino (máximo 1g al día) y 200-300 mg de esteroides. Después de ser absorbidas, las micelas se rompen y se libera su contenido, reensamblándose triglicéridos y colesterol esterificado, y uniéndose a fosfolípidos para formar la primera lipoproteína del organismo, el quilomicron. Los quilomicrones, como vemos, son las lipoproteínas encargadas del transporte de los lípidos que provienen de la ingesta. Se sintetizan en el intestino en forma de QM nacientes, contienen la apoproteína B-48 y se incorporan al torrente circulatorio a través del conducto torácico. La lipoproteinlipasa (LPL) hidroliza los QM en la circulación y van perdiendo TG haciéndose más pequeños y más densos y van adquiriendo más colesterol y apoproteínas (Apo E y Apo C-II) y perdiendo otras (Apo A-I y Apo A-IV) que van intercambiando con las lipoproteínas de alta densidad (HDL) convirtiéndose en QM remanente. La apo E es necesaria para la unión por receptores hepáticos que no reconocen la apo B-48.

De esta manera, los lípidos absorbidos en el intestino permanecen en el plasma poco tiempo. Los QM no deben encontrarse en el suero de sujetos sanos, sólo deben aparecer en situación postprandial.

#### Vía endógena del metabolismo lipídico

Las VLDL son las encargadas de iniciar el metabolismo de los lípidos endógenos. Son sintetizadas en el hígado, donde el colesterol y los triglicéridos de origen hepático son empaquetados junto a fosfolípidos y apoproteínas B-100, C y E, formando las VLDL nacientes. Las VLDL transportan TG a los tejidos periféricos, tejido muscular y adiposo, y colesterol a las suprarrenales y membranas celulares. En el torrente circulatorio, estas VLDL sufren un proceso catabólico similar al de los QM, transformándose en VLDL maduras y luego en VLDL residuales o lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), partículas con pocos triglicéridos, poca Apo C y ricas en colesterol esterificado y Apo E. Las partículas residuales de las VLDL o IDL pueden tener 2 destinos, la mayoría son captadas por los receptores hepáticos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y eliminadas de la circulación, y el resto son hidrolizadas por la triglicérido lipasa hepática, extrayendo sus triglicéridos y Apo C para transformarse en LDL. De esta manera, las LDL surgen por transformación de las VLDL. En condiciones normales, este proceso es muy rápido y no suele haber IDL en circulación. Las LDL son el principal transportador del colesterol endógeno a los tejidos.

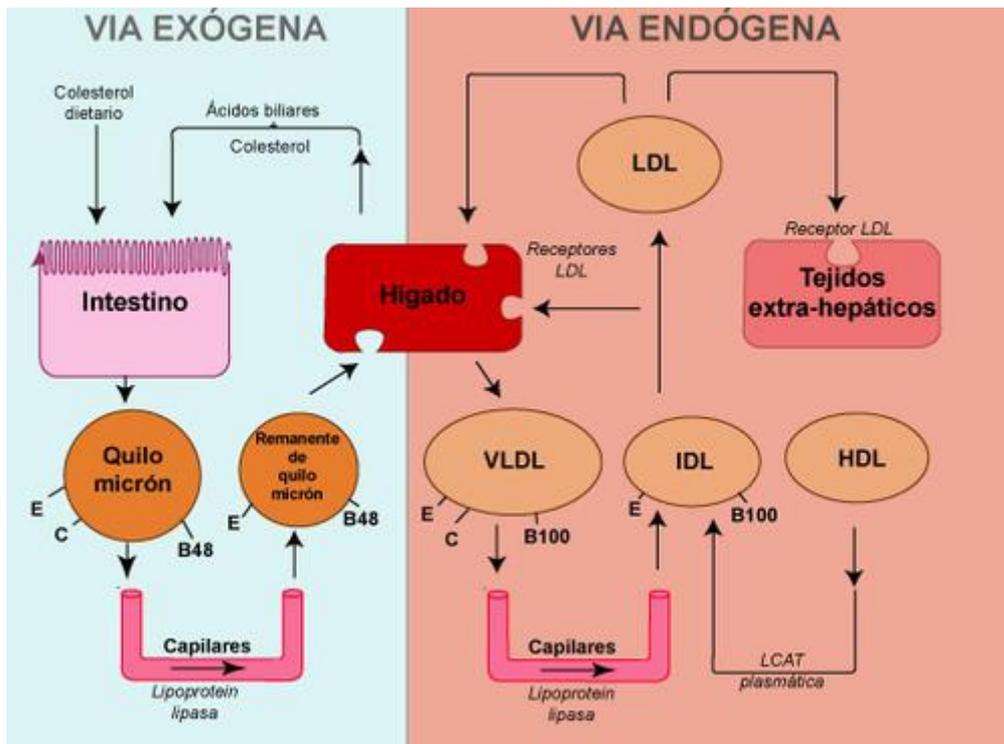


Figura 2. Vía exógena y endógena del metabolismo de los lípidos.

La mayoría de las LDL son captadas por el hígado (a través del receptor LDL) y por otras vías en menor proporción (receptor basurero o scavenger). El resto son captadas por tejidos extrahepáticos, suprarrenales y tejido adiposo. Los receptores de las LDL se encuentran en la superficie celular, captando las LDL circulantes y permitiendo su posterior hidrólisis para reutilizar el colesterol y las apoproteínas. El colesterol intracelular ejerce un efecto regulador, suprime la síntesis endógena de colesterol a través de la inhibición de la hidroximetilglutarilCoA reductasa (HMG-CoA reductasa), favorece el almacenamiento del exceso de colesterol activando la enzima ACAT (Acil-Coenzima A colesterol aciltransferasa) que esterifica el colesterol libre y regula la síntesis del número de receptores LDL para evitar captar colesterol en exceso. El receptor scavenger, localizado en macrófagos, células musculares lisas o células endoteliales, reconoce a las LDL oxidadas o modificadas de otra manera, careciendo de mecanismo regulador, lo cual hace que estas células puedan cargarse de colesterol indefinidamente, participando en el desarrollo de la lesión ateromatosa.

### Transporte reverso del colesterol y metabolismo de HDL:

La función principal de las lipoproteínas de alta densidad consiste en captar el colesterol de los tejidos periféricos y devolverlo al hígado, esta función se conoce como transporte reverso del colesterol<sup>1</sup>. Este proceso se considera crucial para prevenir la acumulación de macrófagos espumosos en la íntima arterial. El paso inicial consiste en la captación del colesterol celular sobrante por la Apo A1 de las HDL nacientes, pobres en lípidos, es el receptor ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) del macrófago el que interacciona con la Apo A1 (figura 3 y 4). De esta manera, las partículas de HDL nacientes, pequeñas y pobres en lípidos, se van cargando de colesterol, y van sufriendo la acción de la lecitín colesterol acil transferasa (LCAT) y almacenando en su interior este colesterol, proveniente de los tejidos y también de las lipoproteínas ricas en triglicéridos. Así, las partículas se van haciendo más grandes y maduras. La cesión del colesterol de las HDL al hígado se puede realizar mediante 2 vías, una directa a través del receptor CLA-1/SR-BI y otra indirecta mediante la transferencia de ésteres de colesterol por la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP) que cataliza el intercambio con otras lipoproteínas con Apo B (QM, VLDL y LDL) y la subsiguiente captación hepática de dichas lipoproteínas mediante el receptor LDL, cerrándose el círculo y devolviendo este colesterol al hígado. La figura 4 ilustra este proceso.

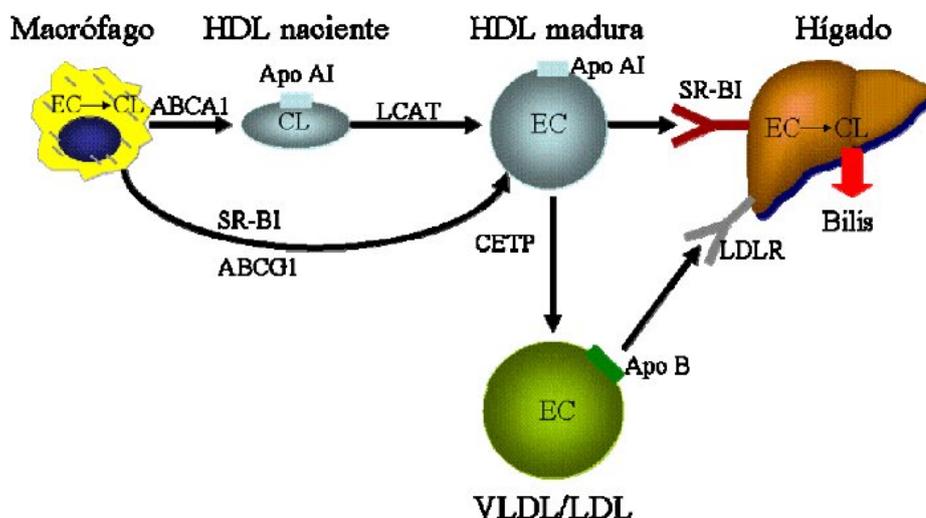


Figura 3. Transporte reverso del colesterol

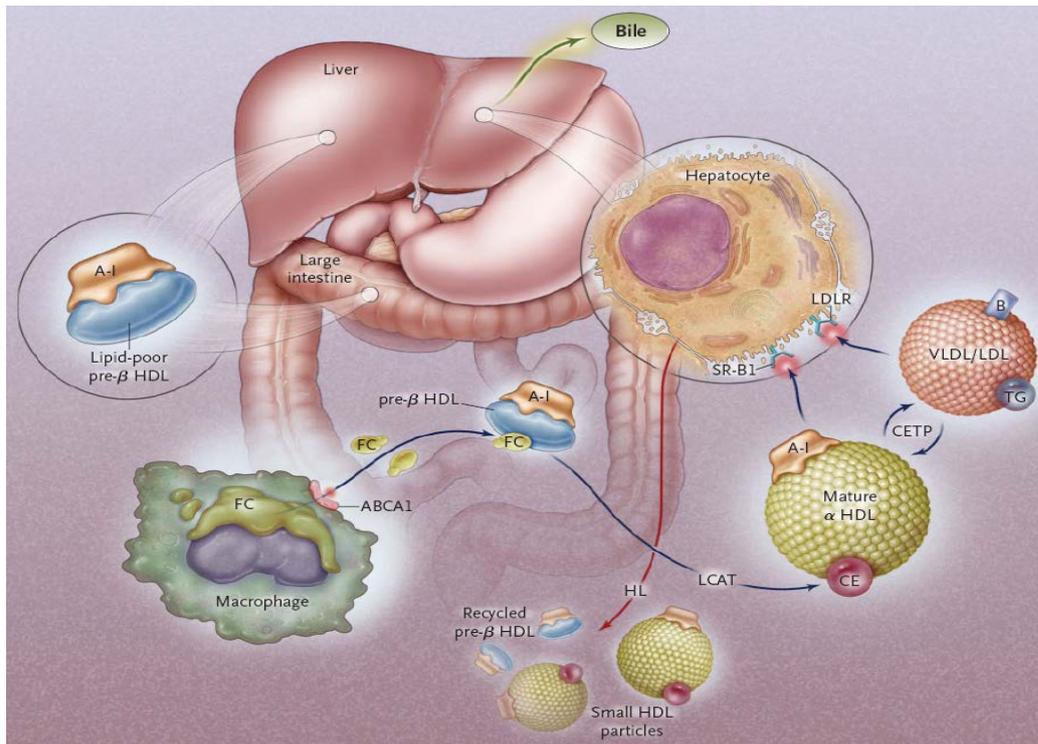


Figura 4. Transporte reverso del colesterol

## **1. B CLASIFICACIÓN DE LAS DISLIPEMIAS**

La clasificación de las dislipemias se realiza atendiendo a su origen. Hablaremos de dislipemias primarias cuando son el resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales y hablaremos de dislipemias secundarias si la dislipemia está relacionada con otras enfermedades que no afectan de forma primaria al metabolismo lipídico, o bien son consecuencia del uso de fármacos o tóxicos<sup>2</sup>

### **HIPERLIPEMIAS PRIMARIAS**

Las hiperlipidemias primarias se clasifican en hipertrigliceridemias primarias, hipercolesterolemias primarias e hiperlipidemias mixtas. La clasificación queda de la siguiente manera:

- Hipertrigliceridemias primarias: Hiperquilomicronemia familiar
  - Hipertrigliceridemia familiar
  - Déficit de apo A-V
  - Déficit de GPIHBP1
- Hipercolesterolemias primarias: Hipercolesterolemia familiar
  - Déficit familiar de ApoB100
  - Hipercolesterolemia AD
  - Hipercolesterolemia AR
  - Sitosterolemia
- Hiperlipidemias mixtas:
  - Hiperlipemia familiar combinada**
  - Disbetalipoproteinemia familiar
  - Déficit de lipasa hepática

Se puede ver la clasificación de las hiperlipidemias primarias<sup>3</sup> en la tabla 1.

#### HIPERLIPIDEMIAS SECUNDARIAS

- Hipercolesterolemia: Hipotiroidismo, Síndrome nefrótico, Colestasis, Anorexia nerviosa, Porfiria aguda intermitente.
- Hipertrigliceridemia: Diabetes mellitus, Obesidad, Alcoholismo, Hepatitis aguda, Insuficiencia renal crónica, Trasplante renal, Síndrome de Cushing, estrés, Quemaduras, Tratamiento antirretroviral.
- Hiperlipoproteinemia mixta: Diabetes mellitus mal controlada, Alcoholismo, Anticonceptivos orales, Disgammaglobulinemias, Hipotiroidismo, Síndrome nefrótico, Tratamiento antirretroviral.

Tabla 1. Clasificación de las hiperlipidemias primarias

<b><u>Trastorno genético</u></b>	<b><u>Defecto génico</u></b>	<b><u>Lp elevada</u></b>	<b><u>Signos clínicos</u></b>	<b><u>Herencia</u></b>	<b><u>Incidencia</u></b>
<b>Déficit LPL</b>	LPL	Quilomicrones	Xantomas eruptivos hepatoesplenomegalia, Pancreatitis	AR	1/1.000.000
<b>Déficit apo C-II familiar</b>	ApoC2	Quilomicrones	Xantomas eruptivos, hepatoesplenomegalia, pancreatitis	AR	< 1/1.000.000
<b>Disbetalipoproteinemia familiar</b>	ApoE	Quilomicrones y restos de VLDL	Xantomas palmares y turberoeruptivos, cardiopatía coronaria, vasculopatía periférica	AR	1/10.000
<b>Déficit lipasa hepática familiar</b>	Lipasa hepática	Restos de VLDL	Aterosclerosis, prematura, pancreatitis	AR	<1/1.000.000
<b>Déficit apo A-V</b>	APOAV	Quilomicrones, VLDL	Xantomas eruptivos, hepatoesplenomegalia, pancreatitis	AD	< 1/1.000.000
<b>Déficit GPIHBP1</b>	GDIHBP1	Quilomicrones	Xantomas eruptivos, Pancreatitis	AR	< 1/1.000.000
<b>Hipercolesterolemia familiar</b>	Receptor LDL	LDL	Xantomas en tendones, cardiopatía coronaria	AD	1/500
<b>Déficit familiar de apo B-100</b>	ApoB-100	LDL	Xantomas en tendones, cardiopatía coronaria	AD	< 1/1.000
<b>Hipercolesterolemia AD</b>	PCSK9	LDL	Xantomas en tendones, cardiopatía coronaria	AD	< 1/1.000.000
<b>Hipercolesterolemia AR</b>	ARH	LDL	Xantomas en tendones, cardiopatía coronaria	AR	< 1/1.000.000
<b>Sitosterolemia</b>	ABCG5	LDL	Xantomas en tendones	AR	< 1/1.000.00

La alteración del metabolismo lipoproteico es con frecuencia familiar y en la mayoría de los casos la herencia es poligénica. Está condicionada por factores como la obesidad y el contenido en grasas de la dieta. La hipercolesterolemia familiar heterocigótica y la hipertrigliceridemia familiar son las formas más prevalentes en la población general. La hiperlipidemia familiar combinada es la hiperlipidemia genética más frecuente, aunque no existe ningún marcador genético específico de la enfermedad. Las hipertrigliceridemias primarias constituyen hasta el 50% de las hipertrigliceridemias remitidas a las unidades de lípidos.

El diagnóstico y tratamiento precoz de las hiperlipemias es fundamental en la prevención de las enfermedades cardiovasculares (ECV).

El nivel normal de triglicéridos, según las directrices del National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel (NCEP ATP III<sup>4</sup>), debe ser inferior a 150 mg/dl. Con este dato, la prevalencia de hipertrigliceridemia en los países occidentales es de aproximadamente un 30%.

Este aumento en las cifras de triglicéridos puede atribuirse al deterioro de los hábitos de vida de la población, en particular al consumo de grasas en la dieta y al sedentarismo. Se asocia con frecuencia a otras alteraciones lipídicas y al síndrome metabólico, situaciones vinculadas al incremento del riesgo de ECV<sup>5</sup>.

## **1. C ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR E HIPERLIPEMIAS**

Las enfermedades cardiovasculares representan actualmente la causa más frecuente de mortalidad a nivel mundial, con cifras del 40% en los países desarrollados y del 28% en los subdesarrollados. Este creciente aumento viene acompañado por cambios en el estilo de vida, un mayor consumo de alimentos de alto contenido calórico junto con una disminución de la actividad física. Este incremento se acompaña de una mayor prevalencia de la obesidad y la diabetes en la población.

Algunas entidades clínicas asociadas a la ECV son la enfermedad arterial coronaria, los accidentes cerebrovasculares y la enfermedad arterial periférica<sup>6</sup>.

La arteriosclerosis (AE) es la principal manifestación responsable de la enfermedad cardiovascular cuya expresión final es el infarto agudo de miocardio.

Desde hace tiempo la teoría del origen y desarrollo de la arteriosclerosis se presentaba bajo dos patrones el lipídico y trombótico, que consisten en un depósito de lípidos en el endotelio de la arteria y un engrosamiento de la íntima por depósito de fibrina con posterior formación del trombo. Actualmente se están añadiendo más procesos que participan en el desarrollo de la AE como la inflamación, estrés oxidativo, etc.

La AE es una enfermedad crónica que comienza con una lesión endotelial en los primeros años de la vida y cuya evolución tiene lugar durante mucho tiempo de forma lenta y silente. Existen numerosos factores de riesgo cardiovascular, tanto relacionados con el estilo de vida (tabaco, sedentarismo...) como genéticos (presencia de hiperlipemia, hipertensión o diabetes).

El endotelio es el primer dañado en el desarrollo arteriosclerótico, se considera como el principal órgano de regulación de numerosas funciones vasculares y consigue mantener en condiciones normales un equilibrio entre: contracción y relajación, agregación y antiagregación, trombosis y fibrinólisis y proliferación y antiproliferación de células musculares lisas. Cuando se altera este equilibrio tiene lugar la llamada disfunción endotelial en la que predomina una mayor permeabilidad, proliferación de células musculares lisas, vasoconstricción, adhesión celular y agregación.

Las lesiones arterioscleróticas son estrechamientos de la íntima de la pared de las arterias y presentan un crecimiento focal y asimétrico. Están presentes en número variable en todo el árbol arterial, las zonas donde aparecen suelen coincidir con aquellas hemodinámicamente más comprometidas, tras bifurcaciones donde hay turbulencias y enlentecimiento de la circulación, y una menor fuerza de cizalladura, características que provocan daño endotelial. En estas zonas el flujo de la sangre no es laminar y está directamente involucrado en el comportamiento del endotelio vascular<sup>7</sup>, de manera que promueve cambios en la expresión de determinados genes<sup>8</sup>, altera la expresión de la

adhesión de leucocitos, así como la vasoreactividad o la inducción de oxidación e inflamación.

### **1. D HIPERLIPEMIA FAMILIAR COMBINADA (HFC)**

La HFC es un síndrome dislipémico descrito por Goldstein et al en 1973<sup>9,10,11</sup> identificado al estudiar a jóvenes supervivientes de un infarto agudo de miocardio y a sus familias. Observaron en ellos diferentes fenotipos metabólicos y lipoproteicos, con presencia de elevaciones de los niveles de colesterol total y/o triglicéridos, junto con elevación de lipoproteínas VLDL, de LDL, o de ambas lipoproteínas. Tras el estudio de los afectos y familias y de la presentación de los fenotipos en ellos, que correspondían a:

fenotipo IV elevación de VLDL

fenotipo IIA elevación de LDL

fenotipo IIB elevación de ambas

Los fenotipos, junto a los niveles de lípidos, concluyeron que la enfermedad se transmitía de forma autosómica dominante y con expresión variable<sup>12</sup>.

Al principio de estudiar esta enfermedad hace más de 30 años se atendía a los niveles de colesterol y triglicéridos, el equipo de Rose<sup>13</sup> en 1972 la identificó como una hiperlipemia nueva con un fenotipo nuevo distinto del de la hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia; los trabajos de Goldstein y Nikkila<sup>14</sup>, ese año, también lo identificaron, atendiendo a la presencia de varios fenotipos y de enfermedad cardiovascular precoz; vieron que era el fenotipo más frecuente entre supervivientes a infarto de miocardio prematuro.

Así se utilizaban únicamente los parámetros lipídicos para el diagnóstico de la enfermedad, estos parámetros eran:

- Acumulación de VLDL, LDL, VLDL+LDL
- Baja incidencia de hipercolesterolemia aislada (IIa)
- A diferencia de HF e HTGF, se acumulan VLDL+LDL

- A diferencia de HF no hay niños IIa descendientes de padres IIb
- La combinación de progenitores IIa y normolipidemia su descendencia tiende a la acumulación de VLDL
- La combinación de progenitores IV y normolipidemia su descendencia tiende a la acumulación de LDL
- Transmisión compatible con una alteración monogénica (los autores expresaron la posibilidad de que la alteración no fuera debida a la misma mutación en todas la familias estudiadas. Como luego se demostró)
- El primer defecto que se manifiesta en niños es la acumulación de VLDL, lo cual induce a pensar que la HFC es una alteración del metabolismo de los triglicéridos

Más tarde se fueron añadiendo otras características. La HFC es un síndrome que incluye varios desórdenes metabólicos, hidrocarbonados como la intolerancia hidrocarbonada y resistencia insulínica (RI), obesidad, o la hipertensión arterial así como alteraciones lipoprotéicas.

### **1.D.1 EPIDEMIOLOGÍA**

La HFC es una enfermedad que presenta una prevalencia del 0.5-2%<sup>15</sup> en la población general, esta prevalencia es casi 5 veces superior que la hipercolesterolemia familiar. En la población española se calcula una incidencia de entre 400.000-800.000 personas<sup>16</sup>. No hay diferencias por sexos en la presentación de manera que afecta por igual a hombres y mujeres.

Los pacientes con HFC tienen una alta probabilidad de desarrollar enfermedad coronaria prematura, en concreto arteriosclerosis y la prevalencia de la arteriosclerosis en pacientes menores de 60 años con HFC es alta y está estimada en un 15%<sup>17, 18, 19, 20</sup>. La prevalencia sube al 20% en población afecta de cardiopatía isquémica precoz.

Hay pocos estudios sobre la presencia de cardiopatía isquémica precoz en población HFC más joven de 40 años. Pero se cree que una proporción

elevada de pacientes menores de 40 años con infarto agudo de miocardio tienen HFC. Un estudio realizado con 102 supervivientes a infarto agudo de miocardio menores de 40 años reveló que el 38% de ellos tenían un fenotipo lipídico compatible con HFC y los que pudieron estudiarse sus familiares se confirmó, en la mayoría, el diagnóstico de HFC<sup>21</sup>.

Entre la población con hiperlipemia primaria la prevalencia es del 15%<sup>13, 28</sup>.

### **1.D.2 DIAGNÓSTICO**

La HFC no tiene unos criterios diagnósticos universalmente aceptados. El diagnóstico se establece principalmente realizando un estudio familiar y atendiendo a las características de la dislipemia, como son la hiperapobetalipoproteinemia, hipertrigliceridemia, y presencia de fenotipos IIA, IIB, IV en los miembros de una misma familia.

Desde hace muchos años se está estudiando las bases genéticas de la HFC y aunque todavía no se han encontrado claramente los genes implicados directamente sí está quedando evidenciada la presencia de alteraciones en muchos de ellos que están implicados en la patogenia de la HFC<sup>22</sup>. Además de la posibilidad de que exista alteración en varios de ellos también se está viendo la importancia de una interacción genética-epigenética. Se han realizado estudios del genoma en distintas poblaciones, el primer estudio en la población finlandesa<sup>23</sup> se realizó sobre el cromosoma 1 y su implicación en los niveles de colesterol, triglicéridos y apolipoproteína B. Se estudió la región q21-q23 de dicho cromosoma 1 (1q21-q23)<sup>24</sup>, y en otros estudios se amplió a población mejicana, china y alemana<sup>25, 26</sup>. También incluida en esta región se encuentra el gen del factor UPS 1 (upstream transcription factor 1) cuya participación en la HFC se confirmó<sup>27</sup> con una implicación en el metabolismo lipídico e hidrocarbonado. Otros estudios se realizaron sobre distintos cromosomas como el 16, quedando ligada su relación a la HFC, es la región 16q24<sup>28, 29</sup>.

Otros genes implicados en el metabolismo lipídico que han sido estudiados, son el gen de la lipoproteína lipasa<sup>30, 31</sup>, el gen de la lipasa hepática<sup>32</sup>, el gen de la proteína transferidora de ésteres de colesterol<sup>33</sup>, el gen de la lecitin

colesterol acil transferasa, también el gen da la agrupación génica A1-CIII-AIV<sup>34, 35</sup>, y la expresión del gen del factor de necrosis tumoral- $\alpha$ , interleuquina 6 o moléculas de adhesión intracelular (ICAM-1)<sup>36</sup>.

Para el diagnóstico de la HFC Bredie y col.<sup>37</sup> han propuesto unos criterios de inclusión y exclusión:

Criterios mayores de inclusión:

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

Criterios de inclusión adicionales o menores:

- Concentración elevada de Apo B en plasma.
- Presencia de un patrón de LDL predominando las partículas pequeñas y densas.
- Presencia de hiperlipemia en la infancia.

Criterios de exclusión:

- Presencia de xantomas en la familia.
- Presencia de causas secundarias de hiperlipemia en familiares afectos.
- Presencia de genotipo de Apo-E E2/E2 en sujetos afectos.

Por tanto el diagnóstico de la HFC se basa en el cumplimiento de tres criterios mayores de inclusión y exclusión, o criterios mayores de inclusión 1 y 2, criterios de exclusión y al menos un criterio de inclusión adicional.

Recientemente se están introduciendo nuevos criterios<sup>38</sup> para mejorar el diagnóstico que incluyen los siguientes parámetros:

- CT > percentil 75-90
- TG > percentil 90
- ApoB > 120mg/dL
- Predominio de LDL pequeñas y densas.

Además se asocian a la HFC niveles descendidos de colesterol HDL<sup>39</sup>, obesidad centrípeta<sup>40</sup>, resistencia a la insulina<sup>41, 42</sup>, hipertensión arterial, e hiperuricemia que ayudan al diagnóstico, así como la ausencia de algunos signos semiológicos como los citados anteriormente (xantomas) junto con xantelasmas o el arco corneal que son más sugerentes de otras dislipemias.

La HFC se solapa tanto fisiopatológicamente como clínicamente con otros síndromes dislipémicos y plurimetabólicos como la insulinoresistencia, obesidad<sup>32</sup>, intolerancia a los hidratos de carbono, Diabetes Mellitus tipo 2, hiperapobetalipoproteinemia, patrón B de LDL o predominio de LDL pequeñas y densas<sup>43</sup>, hipertensión familiar dislipémica, síndrome metabólico (SM).

Es necesario por tanto, establecer un diagnóstico diferencial. La presencia de dislipemias similares en familiares de primer grado respecto del caso índice nos debe proporcionar el diagnóstico, pero la dificultad a veces de comprobarlo hace necesario establecer un diagnóstico diferencial; primeramente con hipertrigliceridemias secundarias, a alteraciones de la dieta, obesidad, diabetes, consumo de alcohol, etc. Así pues la HFC es una entidad independiente de la Diabetes Mellitus 2<sup>44</sup>, así como de la hipertrigliceridemia del síndrome metabólico que cursa con concentraciones bajas de colesterol HDL, y suele cursar con ApoB más bajas. La HFC presenta frecuentemente síndrome metabólico pero su expresión familiar lo independiza de este síndrome. El aumento de los criterios diagnósticos del síndrome metabólico propuestos por el NCEP ha hecho que aumente la posibilidad de superposición con el diagnóstico de da HFC. La tabla 2 muestra los hallazgos comunes y diferentes entre HFC y síndrome metabólico.

Tabla 2. Hallazgos comunes y las principales diferencias entre HFC y SM

	<b>HFC</b>	<b>SM</b>
<b>Hipertrigliceridemia</b>	Sí	Sí
<b>HDL-c disminuido</b>	Sí	Sí
<b>Hipertensión</b>	Sí	Sí
<b>Obesidad abdominal</b>	Sí	Sí
<b>Intolerancia hidrogenocarbonada</b>	Sí	Sí
<b>Diabetes</b>	Sí	Sí
<b>Aumento del riesgo cardiovascular</b>	Sí	Sí
<b>Hiperapoproteinemia B</b>	Sí	No
<b>LDL-c normal o bajo</b>	No	Sí
<b>Fenotipo variable (paciente y familiares)</b>	Sí	No
<b>Evidencia de herencia</b>	Sí	Menos
<b>Influencia del estilo de vida</b>	Menos	Más
<b>Manifestaciones clínicas</b>	Más tempranas	Menos tempranas
<b>Manifestaciones laboratorio</b>	Más tempranas	Menos tempranas

También debe hacerse un diagnóstico diferencial con la disbetalipoproteinemia en la cual no suelen encontrarse antecedentes familiares, y son enfermos homocigotos para la Apo E E2/E2. Sólo haciendo una determinación del genotipo puede establecerse el diagnóstico diferencial.

### Fenotipos:

Los individuos afectados pueden presentar tres fenotipos distintos según el colesterol total y los triglicéridos, clasificación de Fredrickson<sup>45</sup>:

- Elevación de LDL que se corresponde con la Hipercolesterolemia aislada o Fenotipo IIa. Presente en una tercera parte de los pacientes.
- Elevación de VLDL (que provoca un aumento de los triglicéridos) se corresponde con Hipertrigliceridemia aislada o Fenotipo IV. Presente en otra tercera parte.
- Elevación de ambas lipoproteínas que se corresponde con la Hipertrigliceridemia mixta o combinada o Fenotipo IIb. La tercera parte del resto de los pacientes.

Es característico en esta dislipemia la detección de los diferentes fenotipos en los distintos miembros de una misma familia, Mc Neelly et al<sup>46</sup> encontraron en un estudio de seguimiento de 20 años que un tercio de los familiares variaron su fenotipo, también el fenotipo de un individuo puede variar a lo largo del tiempo, en relación con factores externos como ejercicio físico, cambios de la dieta, consumo de alcohol o fármacos (como beta-bloqueantes, estrógenos), obesidad o diabetes. Este estudio mostró que la apoB era la variable más estable de manera que los pacientes que tenían los niveles más altos de apoB siguieron siendo hiperlipémicos, los que tenían niveles intermedios modificaban su fenotipo y los de niveles más bajos pasaron a ser normolipémicos

El 50% de los familiares de primer grado presentan algún fenotipo de los tres descritos y en al menos un familiar el fenotipo es distinto al caso índice. Los pacientes con ambos progenitores con HFC suelen presentar hipertrigliceridemia (fenotipo IV), sin embargo si sólo la presenta uno de los dos progenitores y el afecto tiene el tipo IV el descendiente suele presentar fenotipo

Ila con elevación de LDL. Se suele ver afectados el 50% de los familiares de primer grado.

La presencia de determinados polimorfismos en los genes que codifican para las proteínas involucradas en el metabolismo de lípidos y lipoproteínas contribuiría a la aparición de los distintos fenotipos de la HFC provocando el aumento en la secreción de VLDL y elevación de los triglicéridos que es la responsable de dichos fenotipos.

Factores exógenos, ya nombrados, al actuar sobre la producción y/o la aclaración de las VLDL influyen sobre la aparición de un fenotipo u otro.

### **1.D.3 ETIOPATOGENIA**

1.D.3.1 Alteraciones Bioquímicas: La alteración bioquímica fundamental que se encuentra en la HFC es un aumento de la síntesis hepática de apoB. Esto es debido a la existencia de una gestión deficiente de los ácidos grasos en los tejidos periféricos como el tejido adiposo, el cual capta los ácidos grasos libres en menor medida y esto provoca un mayor flujo al hígado, donde aumenta la síntesis de triglicéridos y de partículas de VLDL<sup>38, 43, 65</sup>, así como de apolipoproteína B. A su vez aumenta las partículas LDL e IDL. Este mayor aporte de ácidos grasos libres hace que también aumenten los cuerpos cetónicos<sup>47</sup>

El enriquecimiento en triglicéridos se asocia con una mayor actividad de la lipoproteinlipasa y de la lipasa hepática sobre las partículas ricas en triglicéridos, esto induce el aumento en sangre de remanentes de VLDL y de partículas LDL ricas en triglicéridos, que son sustrato de las lipasas, la acción combinada de la CEPT y la lipasa hepática sobre lipoproteínas ricas en triglicéridos (LDL, TGRL) provoca la aparición de partículas LDL pequeñas y densas<sup>48</sup>.

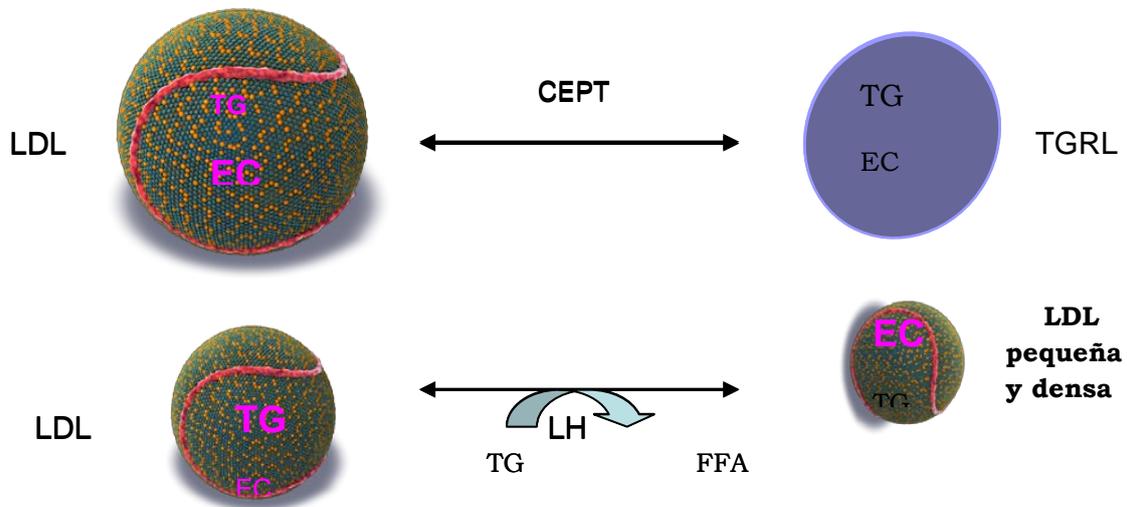


Figura 5. Formación de las LDL pequeñas y densas. Adaptado de Barter P, Rye KA. A new therapeutic target: cholesterol ester transfer protein (CETP): current status and future directions. Birmingham, UK: Sherbourne Gibbs, 2008

Hay una competencia entre las distintas lipoproteínas (VLDL, LDL, IDL) y los lípidos de la dieta (quilomicrones) por su hidrólisis de manera que se retrasa su aclaramiento, nos encontramos que estas partículas están un mayor tiempo en sangre favoreciendo la formación de LDL pequeñas y densas y en contacto con el endotelio durante más tiempo. La elevación del número de partículas ricas en triglicéridos circulantes asociada a una aclaración defectuosa de los mismos se evidencia más en periodo postprandial<sup>49, 50</sup>.

En contra de la idea inicial de que las partículas LDL pequeñas y densas son el resultado de un metabolismo periférico anormal, estudios recientes sugieren que los diferentes tipos de LDL son también el resultado del catabolismo de diferentes tipos de VLDL sintetizadas en el hígado. Cuando las partículas VLDL son relativamente pobres en triglicéridos (VLDL 2) se solapan con las partículas de densidad intermedia y se transforman en LDL grandes con gran afinidad por el receptor LDL y, por tanto, con vida media plasmática corta. Sin embargo, en presencia de resistencia periférica a la insulina, las partículas sintetizadas por el hígado son ricas en triglicéridos (VLDL1), tienden a enriquecerse en apo CIII,

lo que retrasa su metabolismo periférico y su afinidad por el receptor LDL dando lugar con mayor facilidad a las LDL pequeñas y densas.

Las LDL también tienen una composición anormal tanto cualitativa como cuantitativamente, son más pequeñas y más densas, atraviesan el espacio subendotelial, permaneciendo más tiempo en él que las LDL grandes. Una vez en el interior de la arteria, tienen mayor afinidad por los proteoglicanos, lo que favorece su oxidación y captación por los macrófagos y el desarrollo de células espumosas. Son partículas más aterogénicas porque tienen más vida media plasmática, menos moléculas antioxidantes en su núcleo<sup>51</sup> y son más susceptibles a modificaciones siendo especialmente captadas por receptores basurero (“scavenger”) de los macrófagos del espacio subendotelial<sup>52,53</sup> su predominio confiere el llamado fenotipo B y es característica importante en la patogenia de la HFC.

Los mecanismos aterogénicos de las partículas LDL pequeñas y densas son<sup>54</sup>:

- Aumento del tiempo de permanencia en el espacio subendotelial
- Mayor unión a los proteoglicanos arteriales
- Mayor susceptibilidad a la oxidación y agregación
- Menor afinidad por el receptor LDL
- Mayor afinidad por los receptores “scavenger” de los macrófagos endoteliales.

El tamaño de las LDL está relacionado con la concentración de partículas VLDL y de triglicéridos totales. La mayor parte de los sujetos con una trigliceridemia superior a 200 mg/dL, tienen un patrón B de LDL<sup>55</sup>, como se puede apreciar en la figura 6.

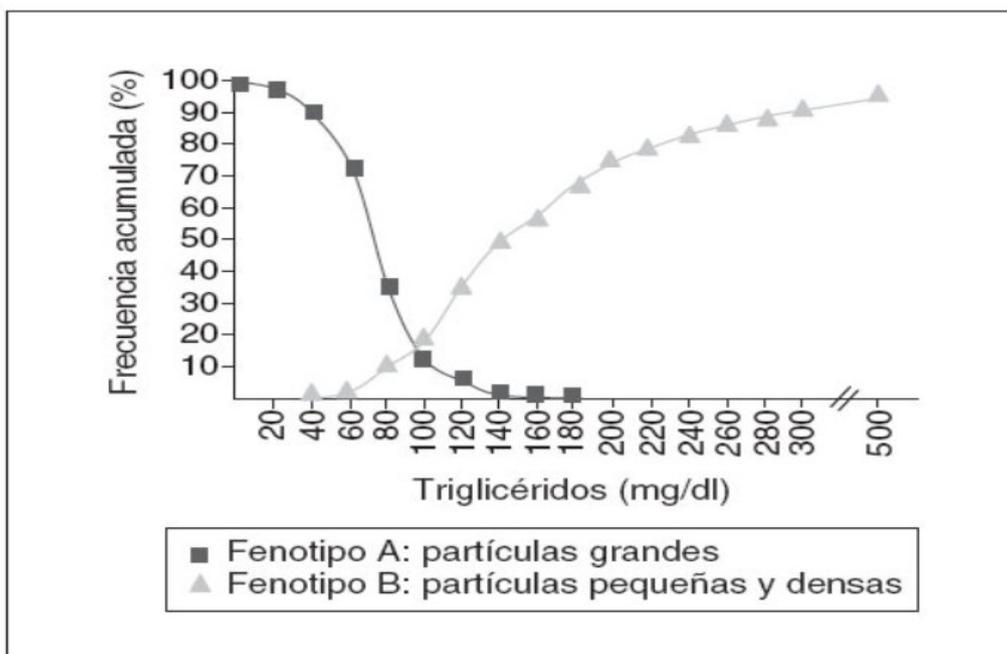


Figura 6. Frecuencia de fenotipos de la partícula LDL en relación a la concentración de triglicéridos (modificada de Austin et al<sup>56</sup>)

Los quilomicrones nacientes son también partículas aterogénicas<sup>57</sup> que no necesitan modificaciones en su estructura para formar células espumosas<sup>58</sup>. Las VLDL son más pequeñas y su aclaramiento del torrente circulatorio es más lento que el de las VLDL de mayor tamaño, lo que las hace más aterogénicas.

La composición anormal de la LDL ocurre en pacientes y familiares normolipémicos, mientras que las VLDL sólo están afectadas en los pacientes. El fenotipo B de las LDL se observa en una tercera parte de los pacientes, estos además suelen presentar hipertrigliceridemia. Los pacientes que presentan el fenotipo A de las LDL suelen ser normotrigliceridémicos aunque con concentraciones elevadas de apoB.

Las concentraciones de LDL en la HFC suelen ser inferiores a las detectadas en la Hipercolesterolemia Familiar Heterocigótica. Los niveles de apoB plasmáticos están elevados por encima de 125 mg/dl. Las concentraciones de triglicéridos se presentan entre 200 y 400 mg/dl, niveles que se elevan mucho más si el paciente lleva una dieta anómala o consume alcohol. Los pacientes con el fenotipo IV, hipertriglicéridémicos, no presentan valores de colesterol LDL inferiores a 100 mg/dl como es habitual en la Hipertriglicéridemia Familiar.

Las concentraciones del colesterol HDL están frecuentemente disminuidas, lo que confiere un riesgo coronario especialmente importante a estos sujetos.

La hiperapobetalipoproteinemia y la elevación de los lípidos plasmáticos suelen presentarse a partir de la segunda década de vida, siendo poco frecuente encontrarlos en niños, en estos casos, infancia y adolescencia, se acompañan de obesidad. La aparición de la hipertriglicéridemia suele preceder a la hipercolesterolemia.

1.D.3.2 Desórdenes metabólicos asociados: Los pacientes de HFC presentan muy frecuentemente alteraciones metabólicas como resistencia insulínica, obesidad centrípeta, diabetes tipo 2, gota, hipertensión arterial, y otras manifestaciones del síndrome plurimetabólico. La resistencia a la acción de la insulina está directamente relacionada con alteraciones del metabolismo de lípidos; la insulina es una hormona que controla el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas a través de diferentes reacciones bioquímicas. A nivel de los lípidos la insulina actúa sobre distintas enzimas como son la Acetil CoA carboxilasa para aumentar la síntesis de ácidos grasos, en hígado, aumenta el aporte de dihidroxiacetona fosfato para la reesterificación de los triglicéridos en hígado mediante la activación de la glucólisis, y sobre la lipasa hormonosensible inhibiéndola impidiendo que hidrolice los triglicéridos en glicerol y ácidos grasos, por tanto regula el metabolismo de triglicéridos controlando su reesterificación y lipólisis, sobre la piruvato deshidrogenasa para aumentar la síntesis de AcetilCoA en hígado.

Cuando los tejidos que normalmente responden a insulina dejan de hacerlo hablamos de resistencia insulínica. Esto ocurre bien por defectos en la unión con su receptor o por otras alteraciones posteriores en la cascada de

señalización. Se han descrito multitud de alteraciones asociadas a la RI. Se pueden ver en la tabla 3.

Tabla 3. Alteraciones asociadas a la RI

Intolerancia a la glucosa	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Glucemia basal alterada</li> <li>- Intolerancia a la glucosa (ITG)</li> <li>- DM2</li> </ul>
Dislipemia aterogénica	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hipertrigliceridemia</li> <li>- HDL baja</li> <li>- LDL pequeñas y densas</li> <li>- Hipertrigliceridemia postprandial</li> </ul>
Disfunción endotelial	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Elevada adhesión de células mononucleares y de las moléculas de adhesión celular</li> <li>- Disminución de la vasodilatación endotelial</li> </ul>
Aumento de factores procoagulantes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento PAI-1</li> <li>- Hiperfibrinogenemia</li> </ul>
Cambios hemodinámicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento de la actividad del SNS</li> <li>- Aumento de la retención renal de Na</li> </ul>
Aumento de mediadores inflamatorios Alteraciones del ácido úrico	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento de la PCR-US</li> <li>- Aumento de los niveles de ácido úrico y descenso de su aclaramiento renal</li> </ul>
Incremento de la secreción ovárica de la testosterona	<ul style="list-style-type: none"> <li>- SOP (ciclos anovulatorios, amenorrea, acné, hirsutismo)</li> </ul>
Alteraciones respiratorias durante el sueño	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ronquido, pausas de apnea</li> </ul>
Alteraciones cutáneas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Acantosis nigricans</li> </ul>
Alteraciones hepáticas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Enfermedad grasa del hígado no alcohólica (EGHNA)</li> </ul>
Tumores	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cáncer de colon, mama, endometrio</li> </ul>
<p><i>PAI-1: inhibidor de la activación del plasminógeno; SNS: sistema nervioso simpático; PCR-US: proteína C reactiva ultrasensible; SOP: síndrome de ovario poliquístico.</i></p>	

Así pues se produce una hipertrigliceridemia, una cesión excesiva de ácidos grasos libres (AGL) por parte de las células de grasa debido a la hidrólisis de los triglicéridos de depósito a causa de la falta de la acción de la insulina sobre el adipocito. Este aporte de ácidos grasos libres al hígado aumenta la producción de TG y apoB y por tanto de VLDL, provocando alteraciones en la oxidación de la glucosa<sup>59</sup>. La presencia de IR coincide además con el aumento de las LDL pequeñas y densas. La implicación de la acción de la insulina en los distintos órganos se puede ver en la figura 7.

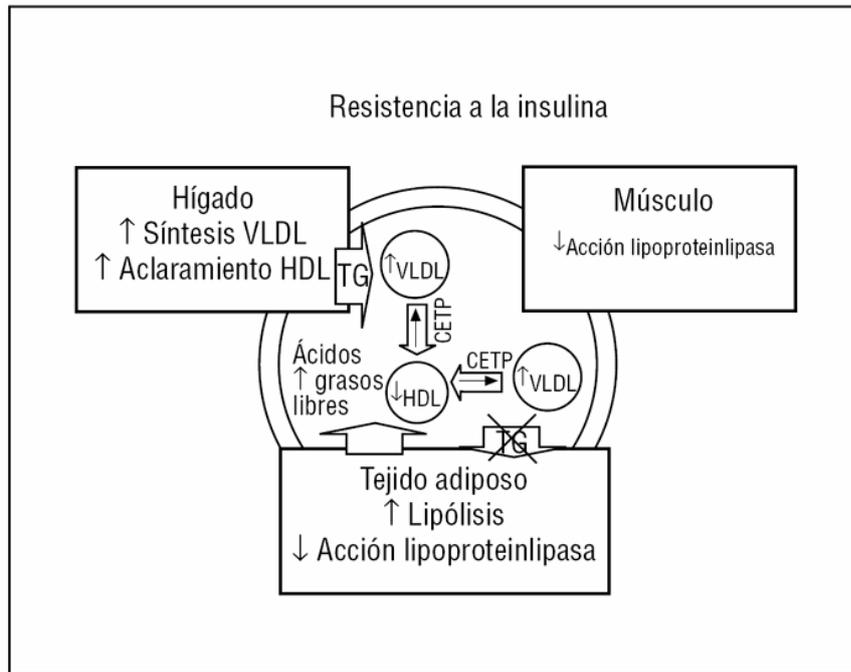


Figura 7. Acciones de la insulina sobre músculo, hígado y tejido adiposo.

Se está viendo que existe una relación entre la resistencia insulínica y la inflamación crónica que subyace en la HFC, ya que al mejorar el grado de inflamación de estos pacientes, mejora la resistencia a la insulina. La insulina disminuye la transcripción de la interleuquina-6 (IL-6) y del factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), disminuyendo la inflamación pero bajo condiciones de resistencia insulínica esta modulación del proceso inflamatorio no tiene lugar y el círculo que se establece entre citoquinas e insulina pierde su control; Por otra parte el TNF- $\alpha$  actúa sobre la molécula del receptor de insulina<sup>60</sup> (a nivel de la fosforilación de residuos de aminoácidos) y la IL-6 inhibe la transducción de señales de la insulina<sup>61</sup> actuando sobre el receptor de la insulina a nivel molecular<sup>62</sup> la activación de kinasas induce en gran medida a la inflamación<sup>63</sup>, la kinasa c-Jun N-terminal (JNK), el inhibidor de  $\kappa$  kinasa nuclear (IKK), y la protein kinasa R (PKR), a través de factores nucleares como el NF-KB, provocan la fosforilación del sustrato del receptor de insulina IRS-1 disminuyendo la señalización de la insulina a través de él. Son algunas citoquinas inflamatorias las que provocan la activación de dichas kinasas por lo que existe una clara relación entre la inflamación y la resistencia insulínica<sup>64</sup>.

El grado de insulinoresistencia es mayor en los pacientes HFC dislipémicos que en los normolipémicos. El estado de insulinoresistencia está relacionado con el fenotipo de la HFC<sup>65</sup> ya que los que presentan el fenotipo hipertriglicéridémico y el mixto tienen mayor grado de resistencia insulínica que los que presentan el fenotipo hipercolesterolémico, además los cambios en la expresión fenotípica a lo largo del tiempo van asociados a cambios del grado de insulinoresistencia e incluso los pacientes que varían de ser hipercolesterolémicos a ser hipertriglicéridémicos o mixtos aumentan mucho más su grado de insulinoresistencia y su IMC que aquellos en los que no varía su fenotipo con el tiempo.

Aunque se está viendo que la resistencia a la insulina no explica totalmente los niveles aumentados de apoB ni de LDL pequeñas y densas, ya que todos los pacientes presentan elevación de la apoB y de LDL pequeñas y densas, tengan el grado que tengan de IR, se sugiere la influencia de determinados polimorfismos genéticos tanto en la hiperapobetalipoproteinemia como en los niveles de LDL pequeñas y densas los cuales estarían modulados por la insulinoresistencia y por la obesidad<sup>15, 66</sup>.

La resistencia a la insulina está con frecuencia asociada a obesidad, presentándose intolerancia a hidratos de carbono y dislipemia.

El tejido adiposo es un órgano endocrino que participa en la homeostasis energética. Es capaz de producir citoquinas denominadas adipoquinas como la IL-6, TNF- $\alpha$ , leptina, adiponectina, resistina, etc. El aumento de determinadas adipoquinas y de proteínas de fase aguda (PCR) y fibrinógeno lo cual ocurre en la obesidad, se relaciona con resistencia a la insulina, con disfunción endotelial y con arteriosclerosis. Existe una relación entre marcadores de inflamación de bajo grado, obesidad y síndrome metabólico<sup>67</sup>. Hay estudios en obesos que indican que una desregularización en la señalización de la insulina en intestino debido probablemente a estrés oxidativo e inflamación, se relaciona con un aumento de la lipogénesis y de la síntesis de lipoproteínas, relacionado a su vez con el desarrollo de aterogénesis<sup>68</sup>.

Durante el desarrollo de la obesidad se producen una serie de cambios en los adipocitos, con modificaciones en su función paracrina. El aumento del tamaño del tejido graso hace que se liberen ácidos grasos libres a la circulación y disminuye el consumo de oxígeno por los adipocitos. Se segrega, en las primeras fases de la obesidad, TNF- $\alpha$ , que estimula la producción de la MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos) atrayendo a los monocitos hacia el tejido adiposo. Estos macrófagos segregan a su vez citoquinas inflamatorias como la IL-1 o la IL-6 que van produciendo una inflamación sistémica de bajo grado, y las citoquinas actúan en otros tejidos (hígado y músculo) perpetuándose el estado inflamatorio.

#### **1.D.4 FISIOPATOLOGÍA**

##### **1.D.4.1 Arteriosclerosis y disfunción endotelial:**

La HFC tiene como expresión clínica más importante la aparición de la arteriosclerosis, responsable de la enfermedad coronaria y finalmente del infarto agudo de miocardio. La arteriosclerosis es una enfermedad crónica que comienza con una lesión endotelial ya en las primeras etapas de la vida y cuya evolución tiene lugar durante muchos años de forma lenta y silente. La velocidad en que progresa depende de múltiples factores de riesgo cardiovascular, no existe una edad concreta de inicio de la lesión, se ha visto que incluso antes de los tres años de edad aparecen las primeras estrías grasas, que es la lesión más temprana en el desarrollo de la arteriosclerosis, y que es simplemente una acumulación de células cargadas de lípidos, macrófagos y células T.

El inicio de la lesión arteriosclerótica comienza en el endotelio, con la llamada disfunción endotelial. Fisiológicamente es el endotelio vascular el primer afectado durante el desarrollo de la arteriosclerosis.

El endotelio es una delgada capa de células continuas que limitan a todo el sistema circulatorio. A pesar de sus dimensiones microscópicas (1 micra de ancho) tiene múltiples funciones, y su estado fisiológico puede ser un factor crítico de patología vascular. Físicamente separa el compartimento

intravascular del resto de tejidos y órganos del cuerpo, y biológicamente esta interfase aporta numerosas funciones vitales:

- Contiene a la sangre
- Es una barrera permeable y selectiva; tiene zonas especializadas como los complejos de unión célula-célula, canales transcelulares y la matriz extracelular subendotelial que controla el paso de sustancias en el espacio intravascular
- Media el paso de señales conducidas por la sangre
- Tiene receptores en la superficie de las células endoteliales para citoquinas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y otras hormonas

El endotelio se considera como el principal órgano de regulación de numerosas funciones vasculares, a través de sus acciones endocrina, paracrina y autocrina.

El endotelio interacciona con una serie de factores, como son:

- Externos:
  - monocitos, linfocitos, plaquetas
  - fuerzas físicas (presión de la fuerza de la sangre, fuerza de cizalladura), flujo turbulento
  - sustancias circulantes o liberadas por células cercanas (angiotensina, catecolaminas, prostaglandinas, cininas, etc.)...
- Internos: células musculares lisas, lipoproteína (a)...
- Otros: diabetes, tabaco, hiperlipemias, hipertensión...

Las células endoteliales, en respuesta, son capaces de liberar diversas sustancias como:

- Factores vasodilatadores como óxido nítrico, prostaciclina, factor hiperpolarizante derivado del endotelio.
- Factores vasoconstrictores como endotelina, tromboxanos, prostaglandinas.
- Sustancias moduladoras de crecimiento: Promotores del crecimiento como factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor 1 de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1), endotelina 1. Inhibidores de crecimiento como heparinoides, (HPS), factor de crecimiento transformante (TGF), óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI<sub>2</sub>)
- Moduladores de la inflamación: moléculas de adhesión vascular (VCAMs), moléculas de adhesión intracelular (ICAMs), moléculas de adhesión endotelial de leucocitos (ELAMs), selectinas (p-selectina, e-selectina), citoquinas como la interleuquina 6, interleuquina 8 o el Factor  $\alpha$  de necrosis tumoral.
- Factores hemostáticos y trombóticos: Inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), activador del plasminógeno tisular tPA), trombomodulina.

En condiciones normales, en el endotelio, existe un equilibrio entre: contracción y relajación, agregación y antiagregación, trombosis y fibrinólisis y proliferación y antiproliferación de células musculares lisas. Cuando se altera este equilibrio tiene lugar la llamada disfunción endotelial en la que predomina una mayor permeabilidad, proliferación de células musculares lisas, vasoconstricción, adhesión celular y agregación.

Las lesiones arterioscleróticas son estrechamientos de la íntima de la pared de las arterias y presentan un crecimiento focal y asimétrico. Están presentes en número variable en todo el árbol arterial. Estas lesiones afectan principalmente a la íntima y en menor medida a la media de las arterias, principalmente de

grueso y mediano calibre, sobre todo aorta, carótidas, coronarias, basílicas, ilíacas y femorales.

Una de las características que hemos visto de la placa de ateroma es la focalidad en su distribución, es decir la aparición de placas de ateroma en determinadas zonas, estas zonas suelen coincidir con aquellas hemodinámicamente más comprometidas. Son los espacios tras las bifurcaciones, en los cuales existen turbulencias y enlentecimiento de la circulación, y una menor fuerza de cizalladura, características que provocan daño endotelial.

El flujo no laminar de la sangre está directamente involucrado en el comportamiento del endotelio vascular<sup>69</sup>, de manera que promueve cambios en la expresión de determinados genes<sup>70</sup>, altera la expresión de la adhesión de leucocitos, así como la vasoreactividad o la inducción de oxidación e inflamación.

#### 1.D.4.2 Inflamación y Arteriosclerosis:

Desde hace tiempo la aterosclerosis se presentaba bajo dos patrones de desarrollo, el depósito de lípidos en el endotelio de la arteria y el engrosamiento de la íntima por depósito de fibrina y posterior formación del trombo. Sin embargo, desde hace unos años se ha visto que el proceso aterosclerótico tiene una base inflamatoria clara, crónica, clave en la evolución de la lesión ya que esta es por si misma una lesión inflamatoria. La lesión inflamatoria que subyace en toda lesión arteriosclerótica es diferente de otras lesiones arteriales inflamatorias como las vasculitis, por el carácter localizado de la lesión aterosclerótica. En comparación con otras enfermedades inflamatorias crónicas presenta diferente mecanismo patogénico ya que afecta a las células endoteliales provocando la ya mencionada disfunción endotelial, sin embargo tiene como elementos comunes la presencia de células inflamatorias como monocitos-macrófagos, linfocitos, o los distintos componentes de la matriz extracelular como los diferentes tipos de colágeno, fibronectinas o proteoglicanos.

El proceso de desarrollo aterosclerótico es el siguiente: la lesión endotelial comienza con el depósito de lipoproteínas en el espacio de la arteria, junto con fibras de colágeno, esto sucede en los primeros años de vida. Comienza a aumentar la permeabilidad del endotelio, en estos puntos. Es posible que ya en esta primera etapa múltiples factores, como hipercolesterolemia, hipertensión, diabetes, tabaquismo, ayuden a la progresión de la lesión primaria.

La apoB 100 de las lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL, VLDL) es reconocida por la trama de proteoglicanos de la matriz subendotelial<sup>71</sup>. Al unirse el proteoglicano con la apoB 100 se dificulta su regreso al plasma, y sufre una serie de alteraciones que lo hacen más susceptible a modificaciones proteolíticas por distintas enzimas como las tripsinas, fosfolipasas, además se pierden lípidos y finalmente su estructura tridimensional, favoreciendo su oxidación.

La entrada de la LDL a la célula muscular lisa provoca que prolifere y produzca pequeños engrosamientos, elementos de defensa para evitar la ruptura de la arteria por esas zonas más débiles.

La infiltración y retención de las LDL en la íntima arterial inicia una respuesta inflamatoria, con la expresión de moléculas de adhesión como p-selectinas y I-selectinas así como de ICAM, VCAM y de genes inflamatorios por las células endoteliales.

Hay una aparición de monocitos-macrófagos desde el principio de la lesión arteriosclerótica a la zona que captan, de manera no regulada, LDL oxidadas, formando las llamadas células espumosas. Muchas de las células inmunes que llegan a la lesión presentan signos de activación y producen citoquinas inflamatorias. La lesión evoluciona hasta formar la estría grasa. La estría grasa es visible microscópicamente sobre la superficie del endotelio. Las LDL oxidadas inducen la migración de la célula muscular lisa desde la capa muscular del vaso hacia el espacio subintimal.

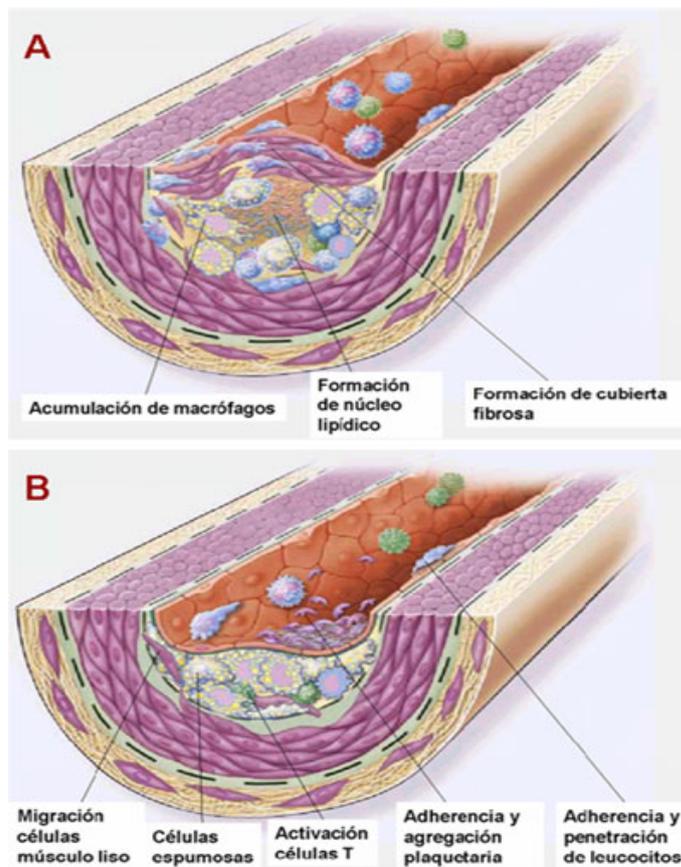
Además las LDL oxidadas activan a la célula endotelial y esta sintetiza moléculas de adhesión y citoquinas que actúan como quimiotácticas de linfocitos T y más monocitos/macrófagos. Entre las quimiocinas más

estudiadas destaca la MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos), cuyo papel quimiotáctico de monocitos es muy importante. Las células endoteliales estimuladas por citoquinas aumentan la secreción en su superficie de moléculas de adhesión, que unen las selectinas de las células sanguíneas. Estas células, circulantes, cercanas a la pared celular se frenan, ruedan por la superficie y finalmente se unen, y atraviesan el endotelio. Las moléculas de adhesión de células vasculares 1 (VCAM-1) son reguladas positivamente en respuesta a una hipercolesterolemia y unen monocitos y linfocitos. Una vez se han ligado las células sanguíneas a sus receptores, las citoquinas producidas en la íntima estimulan su migración a través del endotelio.

Una citoquina o factor de crecimiento producido por la íntima inflamada, el M-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos) induce a los monocitos que están en la placa a diferenciarse a macrófagos. Además las células endoteliales segregan la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) en respuesta a citoquinas, atrayendo a más monocitos y cuando se transforman en macrófagos maduros liberan citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1) que estimulan la producción de proteínas inflamatorias por otros tejidos como hígado y músculo.

La expresión de receptores basurero o scavenger es importante en el desarrollo de la arteriosclerosis ya que su regulación por parte del colesterol no responde a altas concentraciones de este, de manera que a pesar de existir un aumento de los niveles de colesterol no deja de captar y acumular partículas de LDL modificadas.

Las células musculares lisas son el componente mayoritario de la capa media de las arterias. Se distinguen dos tipos de estas células, las que responden a agentes inductores de vasoconstricción o vasodilatación, manteniendo el tono vascular, y las que son capaces de secretar citoquinas y factores de crecimiento participando en el proceso inflamatorio y proliferativo de la lesión aterosclerótica. Estas últimas son las predominantes en la lesión.



### Formación de la placa de ateroma

Figura 8. Placa de ateroma en un corte de arteria. Composición y mecanismos que en ella tienen lugar.

También participa el sistema del complemento, que se une al macrófago, activándolo y potenciando el proceso inflamatorio. Componentes activados de la cascada del complemento están presentes en las lesiones arterioscleróticas, el “complejo de ataque a la membrana” formado por C5b-C9 participa actuando sobre las células musculares lisas activándolas y haciendo que proliferen. La unión del complejo a las células musculares lisas lleva a una liberación de la MCP-1. Además el sistema del complemento también actúa sobre células endoteliales, y favorece la lisis celular en la pared arterial.

Con la evolución del proceso las células espumosas mueren liberando su contenido al intersticio, depositando en el medio extracelular cristales de colesterol, proteasas, y ejerciendo una serie de efectos muy tóxicos sobre el

endotelio. Los linfocitos-T activados se diferencian a células efectoras de una respuesta Th1, liberando citoquinas inflamatorias, que activa macrófagos y células vasculares inflamatorias. Las citoquinas inflamatorias secretadas

inducen la producción de grandes cantidades de interleuquina 6 que es la responsable de la liberación por parte del hígado de la proteína C reactiva, proteína directamente relacionada con el proceso inflamatorio, participa en él y lo promueve.

Los depósitos seguirán creciendo y la pared arterial sustituye las fibras elásticas extracelulares por fibras de colágeno para aumentar su resistencia a la presión. Los macrófagos activados liberan metaloproteinasas que degradan proteínas de la matriz extracelular del tejido conjuntivo, disminuyendo la cantidad de colágeno y aumentando la fragilidad de la placa. Además se sintetiza factor tisular, provocándose una vasoconstricción, adhesión de plaquetas y liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que activa el proceso trombótico. Durante la evolución de la placa se pueden producir pequeñas fisuras en su superficie que activaría los fenómenos de agregación plaquetaria y de coagulación.

La placa de ateroma es una estructura dinámica, dónde existe un equilibrio entre el efecto estabilizante de las células musculares lisas y la influencia destructiva de las células inflamatorias. Las placas más vulnerables son aquellas con mayor núcleo lipídico, capa fibrosa más fina (con poco tejido conectivo), mayor proporción de células inflamatorias y menor número de células musculares lisas. La rotura o erosión de la placa provoca que se expongan a la sangre la matriz colágena, el core lipídico y el factor tisular, activando la agregación plaquetaria, depositándose fibrina y formando el trombo. Además se liberan a la sangre sustancias vasoactivas que producen espasmo y oclusión del vaso favoreciendo la aparición del síndrome coronario agudo.

Las placas ateromatosas de larga evolución se van haciendo ricas en colágeno y células musculares lisas, son más estables y su crecimiento lento hace posible la aparición de vasos colaterales que permiten la estabilización y no aparición de fisuras o roturas de la placa. Sin embargo las placas jóvenes, de

crecimiento rápido, ricas en lípidos y macrófagos tienen un gran componente inflamatorio, y la presencia de enzimas ayuda a debilitar el tejido conectivo. Estas placas son mucho más vulnerables y se rompen con más facilidad activando fenómenos de adhesión plaquetaria incluso trombosis. Los productos de degradación de la fibrina tienen un efecto quimiotáctico en macrófagos y promueven la migración y proliferación de células musculares lisas, además provocan efectos vasoactivos e inducen la secreción de IL-1, PAI-2 y factor tisular en monocitos.

El proceso inflamatorio juega un papel muy importante en todo el desarrollo de la arteriosclerosis; participa tanto en la aparición, como progresión y desestabilización de la placa de ateroma.

Desde la lesión más temprana, llamada estría grasa, hasta la placa vulnerable, nos encontramos con una lesión puramente inflamatoria, con infiltración de células inflamatorias como monocitos-macrófagos, componentes del sistema del complemento, citoquinas como la IL-6 y TNF- $\alpha$ , células espumosas o linfocitos-T.

1.D.4.3 Marcadores inflamatorios: Se han estudiado diversos marcadores inflamatorios en relación con la arteriosclerosis como:

- Citoquinas proinflamatorias (IL 6, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8...)
- Moléculas de adhesión (ICAMs, VCAMs, selectinas ...)
- Proteínas fase aguda (Proteína C reactiva, fibrinógeno)
- Componentes del sistema del complemento (C3, C3a, C3b, C5b-C9)
- Otros indicadores de la respuesta inflamatoria como el aumento del número de leucocitos.

1.D.4.3.1 Proteína C reactiva: De todos los marcadores inflamatorios la PCR está totalmente relacionada con el proceso inflamatorio y es un marcador muy potente de riesgo cardiovascular.

Es una proteína, con 5 subunidades idénticas unidas de forma no covalente para formar un pentámero cíclico de un PM de 110-140kDa. Tiene una semivida de 19 horas.

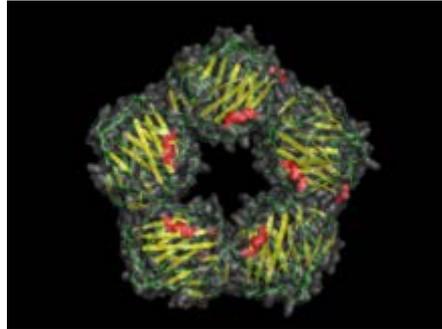


Figura 9. Estructura Proteína C reactiva

El papel exacto que juega in vivo no lo conocemos pero se propone que su principal función en el foco inflamatorio sería la de unir estructuras extrañas endógenas (membranas alteradas, cromatina expuesta, restos celulares) o exógenas (bacterias, parásitos). Esta unión facilitaría los mecanismos de defensa del huésped, activando el sistema del complemento directamente en las placas ateromatosas. Además la PCR actúa estimulando la opsonización, fagocitosis y la producción de citoquinas, participando además en el recambio de LDL modificado en macrófagos y en la quimiotaxis de neutrófilos. También provoca la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales. Se ha estudiado la presencia de la PCR en placas arterioscleróticas en comparación con arterias sin arteriosclerosis y los niveles son diez veces superiores en las primeras.

De los marcadores estudiados en la respuesta inflamatoria, la proteína C reactiva parece ser el predictor independiente más fuerte de futuros eventos cardiovasculares, mostrándose como un buen indicador de la vulnerabilidad de la placa de ateroma y del riesgo de ruptura de la misma.

Diversos estudios sugieren que la PCR es un potente predictor de futuros sucesos cardiovasculares tanto en enfermos como individuos aparentemente sanos<sup>72</sup>. En pacientes con síndrome coronario agudo la PCR medida tanto al momento del ingreso como al alta, podría tener un valor pronóstico (Liuzzo y cols.<sup>73</sup>, Ferreiro y cols.<sup>74</sup>, Morrow y cols.<sup>75</sup>, Winter y cols.<sup>76</sup>, ECAT<sup>77</sup>, CARE<sup>78</sup>).

El estudio Framingham<sup>79</sup> demuestra que el 50% de los pacientes que han sufrido un IAM o una angina inestable no tenían ningún factor clásico de riesgo cardiovascular.

Además en otros estudios se demuestra que la PCR puede identificar aquellas personas que teniendo los niveles de lípidos normales presentan un mayor riesgo cardiovascular (MRFIT<sup>80</sup>, MONICA<sup>81</sup>, CHS/RHPP<sup>82</sup>, WHS<sup>83</sup>, PHS<sup>84</sup>).

En la mayoría de estudios sobre población general el valor predictivo de la PCR ultrasensible fue el mayor dentro de los marcadores bioquímicos tradicionales de riesgo cardiovascular.

Los límites de decisión del riesgo que se han establecidos<sup>85</sup> son:

- < 1 mg/l como riesgo bajo
- 1-3 mg/l como riesgo medio
- > 3 mg/l como riesgo alto

Su utilidad como marcador de riesgo cardiovascular parece ser tan útil en prevención primaria, mejorando la eficacia diagnóstica, como en prevención secundaria, mostrando su poder predictor para complicaciones futuras.

1.D.4.3.2 Citoquinas: son moléculas que intervienen activamente en la inflamación. Las citoquinas son un grupo de proteínas solubles de bajo peso molecular normalmente entre 15-30 KDa producidas por una gran variedad de células, entre ellas las del sistema inmune. Las distintas denominaciones con que podemos encontrarlas dependerán de las células que la hayan producido, por ejemplo las interleuquinas son moléculas que actúan como señales de comunicación entre distintos tipos de leucocitos. Se han ido numerando correlativamente a medida que se descubrían (IL-1, IL-2, etc.). Algunas de ellas

se detectaron inicialmente en ensayos funcionales in vitro y aún conservan su denominación original de acuerdo con la función biológica que permitió su identificación, como es el caso del TNF (factor de necrosis tumoral), las monoquinas por monocitos-macrófagos, pero como muchas son producidas por varios tipos celulares es más correcto agruparlas como citoquinas.

Su expresión está estrictamente regulada, siendo necesaria una activación celular para que se produzcan citoquinas en cantidades suficientes para ejercer sus efectos biológicos. La mayoría de las citoquinas son secretadas al espacio extracelular. En general, son moléculas que poseen una vida media muy corta y actúan a muy bajas concentraciones, del orden de picogramos, mediante la unión a receptores de alta afinidad presentes en la superficie de la propia célula productora o en otros muy variados tipos celulares. Las citoquinas pueden tener efectos autocrinos, paracrinos y liberarse a la circulación sanguínea o linfática, ejerciendo su efecto en otros órganos y tejidos, actuando así como las hormonas, de forma endocrina

Actúan mediando interacciones entre células linfoides, células inflamatorias y células hematopoyéticas. Sus funciones son muy variadas, dentro del sistema inmunitario participan en la activación, diferenciación y maduración de células inmunitarias.

Presentan dos características funcionales, el pleiotropismo, una misma citoquina es capaz de ejercer efectos biológicos diferentes al actuar sobre distintos tipos celulares, y la redundancia, varias citoquinas pueden contribuir al desarrollo de la misma función en un determinado tipo celular.

Las acciones de las citoquinas se engloban dentro de una red funcional, donde el efecto de una está estrechamente regulado, positiva o negativamente, por otras. Así, la secreción de una citoquina puede estar inducida, potenciada o inhibida por otra citoquina que, a su vez, puede incrementar o inhibir la expresión de sus receptores.

Las citoquinas participan en el proceso arteriosclerótico actuando como mediadores de la infiltración y acumulación de células inmunocompetentes,

facilitan la formación de células espumosas, intervienen en el recambio de colágeno y con ello en la fragilidad de la placa.

Las citoquinas están implicadas también en la respuesta inflamatoria vascular crónica. Están presentes junto a sus receptores en el tejido ateromatoso y se relacionan con la regulación positiva de moléculas de adhesión, activación de macrófagos, y proliferación de células musculares lisas. Como se observa en la figura 10<sup>86</sup>.

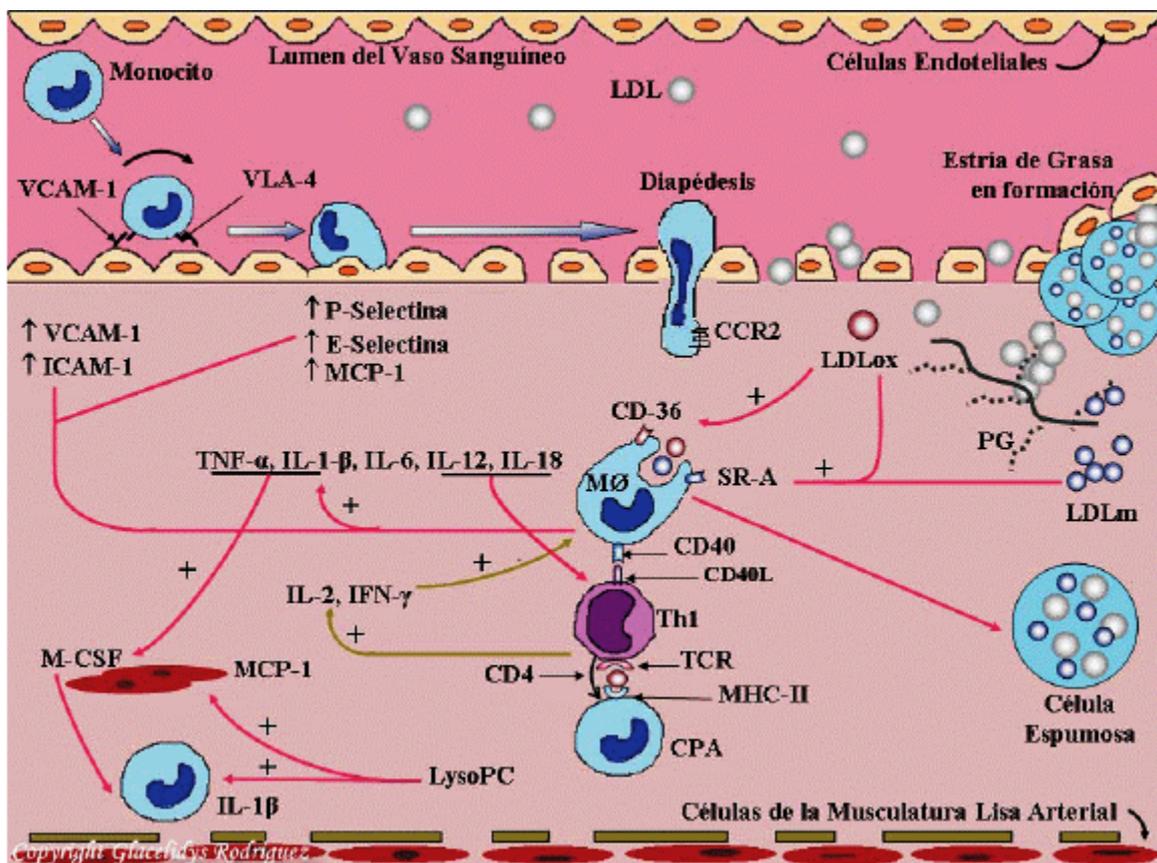


Figura 10. Relación de las citoquinas en el endotelio vascular. Rodríguez G y cols. Role of inflammation in atherogenesis. Invest Clin 2009; 50: 109 - 129

De todas las citoquinas, la interleuquina 6 (IL-6) es producida fundamentalmente por monocitos/macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, linfocitos T y células del estroma de la médula ósea.

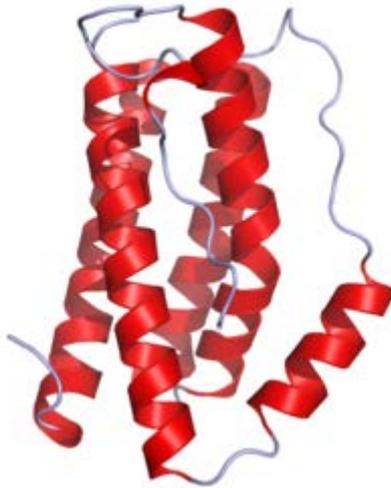


Figura 11. Interleuquina 6.

Junto con la IL-1 es la principal inductora de la síntesis de proteínas de fase aguda, por el hígado, como la Proteína C reactiva o el fibrinógeno. Su acción más llamativa es la de participar en el desarrollo de la inflamación; además se ha observado que promueve la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas, induciendo la producción de inmunoglobulinas. También puede aumentar la producción de IL-2 y el desarrollo de los precursores hematopoyéticos dependientes de la IL-3 y actuar como un factor de activación de células T.

Otra citoquina inflamatoria es el factor  $\alpha$  de necrosis tumoral (TNF  $\alpha$ ) que fue descrito inicialmente por su capacidad de causar necrosis en algunos tumores y posteriormente se reconocieron múltiples funciones que ejercen sobre las respuestas inmunes.

Es una hormona glicopeptídica formada por 185 aminoácidos, que procede de un propéptido formado por 212 aminoácidos.

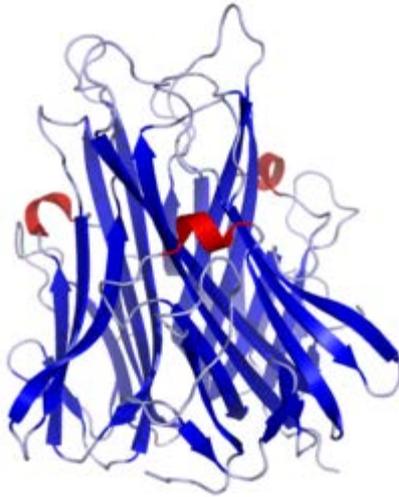


Figura 12. Factor de necrosis tumoral alfa.

El TNF-  $\alpha$  es producido fundamentalmente por monocitos y macrófagos en respuesta a antígenos bacterianos, tales como el lipopolisacárido, siendo esta citoquina el principal responsable del shock séptico asociado a bacteriemias. También puede ser producido por células T y B, células natural killers (NK), fibroblastos y mastocitos..

El factor  $\alpha$  de necrosis tumoral induce la expresión de moléculas de adhesión y estimula la producción de IL-8 por células del endotelio vascular, lo que contribuye a la extravasación de linfocitos, neutrófilos y monocitos

El TNF- $\alpha$  provoca la secreción de IL-6 por las células espumosas y células musculares lisas presentes en la lesión arteriosclerótica en. También estimula el eje hipotálamo-hipófisis-glándula adrenal provocando una obesidad central, hipertensión e insulinoresistencia. El tejido adiposo produce citoquinas como TNF-alfa, IL-6, IL1 $\beta$ , IL-8, que son proinflamatorias y promueven la atracción de macrófagos que a su vez secretan más citoquinas perpetuándose el proceso, y liberándose proteínas inflamatorias en hígado y músculo, estableciéndose una inflamación de bajo grado.

Las citoquinas modulando positivamente el eje hipotálamo-hipófisis aumentan la liberación de CRH, ACTH y finalmente cortisol y disminuyen la transcortina, proteína transportadora de cortisol, con lo que aumenta el cortisol libre.

La implicación de las citoquinas sobre los distintos órganos se puede ver en la figura 13.

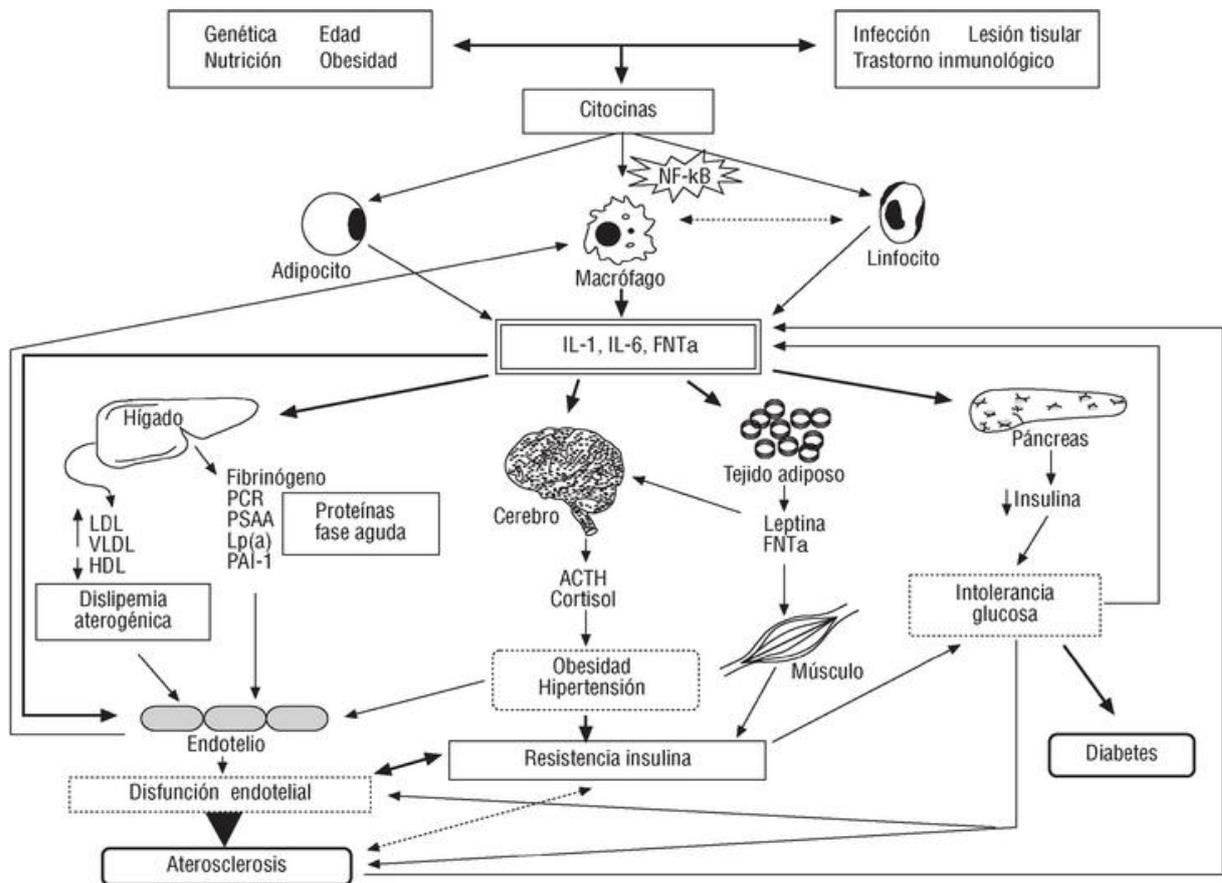


Figura 13. Relación de las de las citoquinas sobre los diversos órganos y procesos metabólicos implicados

Las distintas funciones de las citoquinas y la célula que las produce se han resumido en la tabla 4.

Tabla 4. Principales citoquinas y sus funciones

<b>CITOQUINA</b>	<b>CÉLULA PRODUCTORA</b>	<b>FUNCIÓN</b>
<b>IL-1</b>	Monocitos-Macrófagos	Fiebre (pirógeno endógeno), sueño, anorexia, inflamación, activación linfocitaria, producción de IL-6 y CSF.
<b>IL-2</b>	Células T	Induce la proliferación de la célula T, coestimula la proliferación y diferenciación de la célula B
<b>IL-3</b>	Células T, Mastocitos	Potencia a las NK y LAK
<b>IL-4</b>	Células T, Mastocitos	Induce la proliferación del mastocito, proliferación de la célula hematopoyética pluripotencial
<b>IL-5</b>	Células T, mastocitos	Induce la proliferación de la célula T. Coestimula la proliferación de la célula B, sinergiza con la IL-3 en la proliferación del mastocito, estimula la producción de IgE e IgG4, induce la expresión y liberación de CD 23, la clase II del CMH en la células B
<b>IL-6</b>	Monocitos, Fibroblastos	Induce la diferenciación de eosinófilos y la producción de Ig A
<b>IL-7</b>	Células de la médula ósea y del estroma tímico	Pirogénica, induce la proliferación de plasmocitomas e hibridomas, aumenta la producción de Ig, la clase I en los fibroblastos, acción con la IL-2 en la producción de proteínas de fase aguda por lo hepatocitos, acción sinérgica con la IL-3 en la producción de la célula hematopoyética, induce la diferenciación del LTc
<b>IL-8</b>	Monocitos, células endoteliales, macrófagos alveolares, fibroblastos.	Induce la quimiotaxis y activación de neutrófilos y células T
<b>IL-10</b>	Células T	Induce la proliferación de algunas células T, potencia la proliferación del mastocito inducida por la IL-3.
<b>IL-11</b>	Células T, células B activadas y monocitos.	Inhibe la activación del MAC, estimula la producción de célula B y la producción de Ac, estimula los mastocitos y cambia de TH1 a TH2.
<b>IL-12</b>	Células del microambiente hematopoyético	Estimula la producción de Ac, acción sinérgica con la IL-3 en la producción de megacariocitos, estimula los progenitores del macrófago

1.D.4.3.3 Moléculas de adhesión celular: En las primeras fases de la arteriosclerosis se produce el reclutamiento de células inflamatorias desde la circulación y su migración a través del endotelio. Las moléculas de adhesión celular se expresan en la superficie de las células endoteliales y leucocitos y participan en los fenómenos de adhesión entre ellos, extravasación y posterior migración a través del tejido durante el proceso de inflamación crónica que existe en esta enfermedad<sup>87</sup>. Las moléculas de adhesión no sólo son sistemas de anclaje, sus interacciones tienen efectos como la transducción de señales intracelulares y estimulan la producción de interleuquinas que continúan ejerciendo sus efectos.

Algunas de las moléculas de adhesión celular son pertenecen a la superfamilia de las Inmunoglobulinas como:

- ICAM o moléculas de adhesión intercelular: pertenecen a una subfamilia de 5 miembros. Presentan varios dominios extracelulares constantes, una región transmembranal y una porción intracitoplasmática corta<sup>88</sup>. La porción intracelular de las moléculas de adhesión intercelular posee residuos de serina, treonina y tirosina, los cuales son fosforilados durante la activación celular<sup>89</sup>.

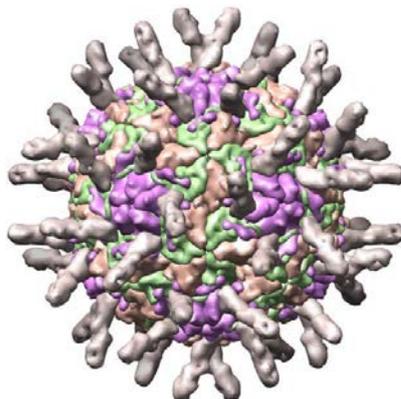


Figura 14. Molécula de adhesión intercelular 1.

La ICAM-1 juega un papel importante en la respuesta inmune innata y adaptativa. Está involucrada en la migración transendotelial de los leucocitos hacia el foco inflamatorio<sup>90</sup>. Se expresa ampliamente en forma constitutiva pero su expresión aumenta tras una activación celular, mientras que la ICAM-2 está presente en leucocitos, plaquetas y endotelio. La ICAM-3 se detecta en la superficie de las células endoteliales y leucocitos y es la única molécula de esta familia expresada en neutrófilos. La expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 puede ser inducida a través de la estimulación por citoquinas como la interlequina-1 y Factor de Necrosis Tumoral. En los casos de inflamación aguda y crónica, es expresada en células dendríticas, fibroblastos, células endoteliales, células mesenquimatosas como condrocitos y células epiteliales; lo cual incrementa la interacción entre célula-célula y la extravasación de los leucocitos hasta el sitio de la inflamación.

La función principal de ICAM es servir de ligando para permitir la interacción de los leucocitos con el endotelio.

- VCAM o molécula de adhesión vascular: son glucoproteínas expresadas en células endoteliales activadas, fibroblastos de la médula ósea, macrófagos en los tejidos, células dendríticas, mioblastos y miotúbulos, para de esta manera mediar la adhesión de linfocitos, monocitos y eosinófilos al endotelio.

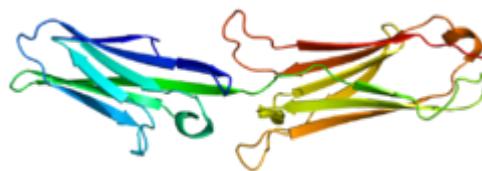


Figura 15. Molécula de adhesión vascular-1.

Diferentes mediadores inflamatorios estimulan su producción<sup>91</sup> y su acción es conjunta con ICAM en la migración de células hematopoyéticas a través del endotelio durante el proceso inflamatorio crónico<sup>92</sup>, el bloqueo con anticuerpos de estas moléculas de adhesión reduce la migración de dichas células<sup>93</sup>.

- Integrinas: son ligandos de las ICAM y VCAM. Las ICAM tienen como ligandos a integrinas específicas de leucocitos. Las ICAM-1 a 3 intervienen en la adhesión de glóbulos blancos al endotelio activado mediante la formación de puentes con las integrinas. Causan adhesión firme entre las células inflamatorias y la superficie vascular y participan en la extravasación de los leucocitos. Las VCAM también interactúan con integrinas de manera específica. Actúan en la presentación antigénica y activación linfocitaria estabilizando la unión entre el linfocito T y la célula presentadora de antígenos. Esta unión es altamente específica, pero de baja afinidad y debe ser estabilizada mediante moléculas de adhesión. La unión con las integrinas genera una cascada de transducción de señales intracelular.

Oppenheimer-Marks y cols. (1991) y Hakkert y cols. (1991), citados por Walton y cols. (1994), sugirieron que la molécula de adhesión VCAM-1 podría mediar la adhesión inicial de los linfocitos T y monocitos en las células endoteliales activadas y la molécula de adhesión ICAM-1 podría ser importante en el refuerzo de dicha adhesión y facilitando la subsecuente transmigración de otras células. De ahí la importancia de estas moléculas para el proceso de adhesión leucocitaria al endotelio (marginación y pavimentación) y la transmigración a través de la pared del vaso hasta el lugar de la inflamación (diapédesis y migración).

Los niveles de estas moléculas se correlacionan con factores de riesgo cardiovascular como el tabaquismo, hipertensión, bajos niveles de HDL, hipertrigliceridemia. Su correlación con lípidos se observa desde edades tempranas<sup>94</sup>.

Los niveles de ICAMs están asociados a los de apoB en pacientes HFC hiperlipémicos y a proinsulina en normolipémicos, es decir a resistencia insulínica<sup>95</sup>.

Diferentes estudios como el ARIC, PHS, British Regional Heart Study revelan la asociación de estas moléculas con la evolución de la enfermedad cardiovascular.

La forma soluble de la ICAM se correlaciona con reactantes de fase aguda como la PCR y parece que tiene el mismo significado que esta, como marcador del estado proinflamatorio; al expresarse de manera constitutiva es un factor de riesgo cardiovascular en sanos, sin embargo la VCAM que no se expresa de forma constitutiva sino bajo determinadas condiciones como inflamación, no sería un factor de riesgo en personas sanas sin disfunción endotelial y así aparece en diversos estudios como el AtheroGene Study, sino que parece ser un fuerte marcador predictivo de eventos futuros cardiovasculares en sujetos con patología preexistente.

- Selectinas: son receptores de adhesión caracterizados por poseer una estructura muy conservada.

Se han identificado tres miembros de esta familia que son antígenos de diferenciación leucocitaria. Se denominan según su localización: E-selectina en células endoteliales, P-selectina en plaquetas y células endoteliales y L-selectina en leucocitos.

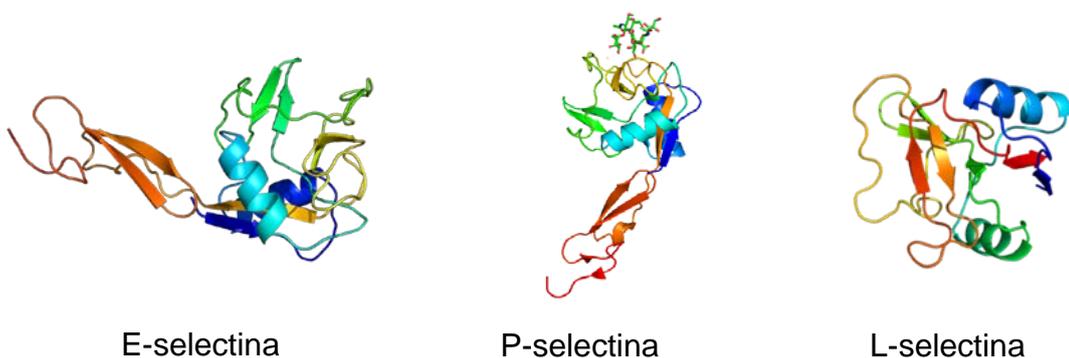


Figura 16. E-selectina, P-selectina, L-selectina

La L-selectina está presente en la mayoría de los glóbulos blancos, de manera constitutiva. Al ser activados, se genera enzimáticamente la forma soluble de la selectina y es liberada al medio extracelular. En cambio, la P-selectina se almacena en células inactivas, en los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas y en los cuerpos de Weibel-Palade en las células endoteliales. Se movilizan a la superficie tras una activación celular. Por último, la E-selectina está presente en células endoteliales activadas; su expresión es inducida por citoquinas inflamatorias. La expresión exagerada o sostenida de estas moléculas puede tener enormes consecuencias sobre la pared vascular. De allí la importancia que asumen los mecanismos involucrados en su desaparición. Tras la activación celular, son movilizadas de la superficie celular por un mecanismo de internalización a lisosomas (P y E-selectina) o por corte proteolítico (L y E-selectina). Las formas solubles de E-selectina y L-selectina son consecuencia de este último proceso. Estas moléculas solubles no sólo son producto de degradación; pueden tener acciones propias por competir por la unión a receptores específicos sin desencadenar reclutamiento celular. Pueden actuar como inhibidores o como agonistas.

Todas las selectinas actúan de forma distinta pero superpuesta. Crean puentes de unión débiles entre las células endoteliales (E-selectina y P-selectina) y leucocitos (L-selectina). La unión de P-selectina con su ligando desencadena activación celular, movilización de integrinas, inflamación y trombosis. Las selectinas también amplifican el proceso de reclutamiento al favorecer la interacción entre plaquetas y leucocitos o entre leucocitos y L-selectina. Esta última participa en el tráfico de leucocitos y en el reclutamiento selectivo en diversos órganos.

Múltiples estudios relacionan las moléculas de adhesión solubles y la enfermedad coronaria. Las ICAMs están presentes en suero de personas sanas<sup>96</sup> y se han encontrado niveles elevados en pacientes con enfermedad cardiovascular, cáncer y enfermedades autoinmunes. Numerosos estudios correlacionan sus niveles con la severidad de la enfermedad.

Los niveles de moléculas de adhesión solubles se correlacionan con varios factores de riesgo cardiovascular como tabaquismo, hipertensión, baja

concentración de colesterol asociado con lipoproteínas de alta densidad, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia. La correlación entre ICAM-1 y VCAM-1 con lípidos se observa desde edades muy tempranas. Se ha visto que el tratamiento con estatinas reduce el nivel de ICAM-1 y de P-selectina.

El estudio Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC)<sup>97</sup> mostró que el nivel de ICAM-1s es un factor predictivo de eventos coronarios futuros, después del ajuste de otras variables de riesgo. En cambio, la relación entre la E-selectina y el riesgo de ECV desaparece tras controlar otras variables conocidas de riesgo. Asimismo, el Physicians' Health Study reveló que la concentración de ICAM-1, aunque no la de VCAM-1, se relaciona con la evolución de la ECV.

El estudio prospectivo British Regional Heart Study encontró una asociación significativa entre el nivel de ICAM-1 y ECV. Otra investigación en hombres sanos de 50 a 59 años de Francia e Irlanda del Norte (dos poblaciones con una incidencia muy distinta de ECV) mostró que la ICAM-1s es un factor predictivo significativo de eventos coronarios. Los niveles de ICAM-1 fueron sustancialmente más altos en sujetos de Irlanda del Norte que en habitantes de Francia.

En el contexto de prevención secundaria el AtheroGene Study evaluó una cohorte de enfermos con ECV establecida. En ellos, el nivel de VCAM-1 fue un factor predictivo de riesgo de eventos cardiovasculares futuros, independientemente de otros parámetros de confusión. Aunque el nivel de E-selectina y de ICAM-1 también se asoció con el pronóstico, la influencia desapareció cuando se tuvieron en cuenta otras variables inflamatorias.

En el Heart Outcomes Prevention and Evaluation (HOPE), un estudio prospectivo que evaluó el efecto de ramipril y de vitamina E en pacientes con riesgo cardiovascular muy alto, la concentración de ICAM-1s se relacionó en forma significativa con el punto de análisis cardiovascular. Entre varios marcadores de inflamación, sólo las concentraciones de ICAM-1 y de fibrinógeno permanecieron como parámetros predictivos de riesgo de eventos coronarios.

En el estudio Bezafibrate Infarction Prevention (BIP), la concentración basal de ICAM-1 se asoció con mayor riesgo futuro de eventos cardiovasculares, de forma independiente a la presencia de otros factores de confusión. Además, esta molécula también predijo el riesgo de accidente cerebrovascular (ACV). En el British Regional Heart Study, el nivel de VCAM-1 fue predictivo de eventos futuros, mientras que en otros dos trabajos prospectivos en pacientes con diabetes fue una variable que anticipó el riesgo de mortalidad, tras el ajuste según parámetros de funcionalidad renal.

El nivel de ICAM-1, VCAM-1, P-selectina y E-selectina estuvo elevado en pacientes con infarto de miocardio; en sujetos con angina inestable o con infarto sin onda Q, la concentración de estas cuatro proteínas se mantuvo alta semanas a meses después del episodio agudo.

El nivel de VCAM-1 y de ICAM-1 se correlacionó significativamente con el espesor de la media e íntima de la carótida, un índice de arteriosclerosis precoz. Más aun, la concentración de VCAM-1s se asoció considerablemente con la gravedad de la arteriosclerosis periférica. Sin embargo, en un trabajo posterior que evaluó la contribución respectiva de ICAM-1 y de VCAM-1 en enfermedad arterial periférica, el efecto de la VCAM-1 perdió significado tras el ajuste por tabaquismo. En cambio, la ICAM-1 pareció ser un mejor marcador de patología y de su progresión.

En amplios estudios prospectivos en sujetos sanos, el nivel de ICAM-1 pero no el de VCAM-1 se relacionó con aparición de ECV. La ICAM-1 se expresa en forma constitutiva en una amplia variedad de células de linaje hematopoyético y fibroblastos. La forma soluble se correlaciona con reactantes de fase aguda como la proteína C reactiva. En estudios de prevención primaria tuvo la misma capacidad predictiva que dicha proteína. Es por ello que el nivel de ICAM-1 parece ser un marcador general de estado proinflamatorio. En forma opuesta, VCAM-1 no se expresa en forma constitutiva; su expresión aumenta sustancialmente en condiciones de inflamación. Esto explicaría por qué esta molécula no aparece como un factor de riesgo en estudios que incluyeron individuos sanos sin disfunción del endotelio mientras que surge como un fuerte factor predictivo de eventos futuros en sujetos con patología preexistente

como angina inestable, diabetes o ECV. En el ámbito de la prevención primaria, la PCR tiene mucha utilidad pronóstica mientras que en sujetos con ECV documentada, el nivel de VCAM-1 parece ser más útil aun.

## **HIPÓTESIS**

## **2.-HIPÓTESIS**

La hiperlipemia familiar combinada es la dislipemia aterogénica familiar más frecuente en la población general así como en pacientes afectos de enfermedad coronaria y en supervivientes a infarto agudo de miocardio. Tiene un elevado riesgo de desarrollar arteriosclerosis prematura y presenta una alteración del metabolismo hidrocarbonado con niveles elevados de glucosa e insulina que nos expresa una respuesta alterada a la acción de la insulina por los tejidos que conlleva a una defectuosa captación y utilización de glucosa por ellos; este estado es el de resistencia a la insulina. La HFC también se caracteriza por niveles elevados de lípidos (colesterol LDL, VLDL, triglicéridos, apolipoproteína B), presencia de lipemia postprandial y de elevación de las LDL pequeñas y densas (patrón B de las LDL) con un aumento de obesidad abdominal (evidenciada por mayor IMC y perímetro de cintura) así como de otros procesos como hipertensión arterial, etc.

La alta prevalencia de una resistencia a la insulina en la HFC es independiente del grado de obesidad abdominal. Ambos estados están adquiriendo en los últimos años gran importancia y aunque son factores de riesgo independientes entre si están muy relacionados y se contribuyen a la hora de agravar la enfermedad. La resistencia insulínica y la obesidad abdominal tienen en común la asociación de un estado de inflamación crónica, de bajo grado que aparece en las primeras etapas de la enfermedad y tiene lugar en todo el desarrollo de la misma, participando tanto en el proceso de resistencia a la insulina como en la obesidad, es decir que forma parte de la patogenia de la enfermedad HFC y relaciona los procesos metabólicos que de ella se derivan.

Nuestra hipótesis de trabajo es que el fenotipo aterogénico de la HFC conlleva unas alteraciones bioquímicas, hidrocarbonadas y lipídicas, como consecuencia de la resistencia a la insulina y expresada como obesidad abdominal, esta situación se asocia a inflamación de bajo grado como proceso común que está presente desde el comienzo de la enfermedad siendo parte activa en su fisiopatología.

## **OBJETIVOS**

### **3.-OBJETIVOS**

Para comprobar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudio del metabolismo hidrocarbonado y valoración de la resistencia insulínica en pacientes con HFC.
2. Estudio de las alteraciones lipídicas asociadas a la HFC.
3. Relación entre la resistencia insulínica y la dislipemia característica de estos pacientes.
4. Cuantificar la inflamación de bajo grado presente en la HFC mediante:
  - Proteínas de fase aguda inflamatoria: PCR ultrasensible.
  - Citoquinas inflamatorias: IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$ .
  - Moléculas de adhesión: ICAMs, VCAMs, Selectinas.
5. Relación de la inflamación con la resistencia insulínica y el metabolismo lipídico.

## **PACIENTES Y MÉTODOS**

## **4.-PACIENTES Y MÉTODOS**

### **4.A MATERIAL**

- Pacientes HFC: El estudio incluye 77 pacientes con Hiperlipemia Familiar Combinada diagnosticados según los criterios de inclusión y exclusión de Bredie y cols.<sup>7</sup>:

Criterios mayores de inclusión:

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

Criterios de inclusión adicionales o menores:

- Concentración elevada de Apo B en plasma.
- Presencia de un patrón de LDL predominando las partículas pequeñas y densas.
- Presencia de hiperlipemia en la infancia.

Criterios de exclusión:

- Presencia de xantomas en la familia.
- Presencia de causas secundarias de hiperlipemia en familiares afectados.
- Presencia de genotipo de Apo-E E2/E2 en sujetos afectados.

### Selección de pacientes:

Criterios de inclusión en el estudio: tres criterios mayores de inclusión y exclusión, o criterios mayores de inclusión 1 y 2, criterios de exclusión y al menos un criterio de inclusión adicional.

Criterios de exclusión en el estudio: se excluyeron los sujetos que presentaron alguna de las siguientes características:

Diabetes	Glucemia basal $\geq$ 126 mg/dl al menos en dos ocasiones o glucemia a las 2 horas de la sobrecarga oral de glucosa $\geq$ 200 mg/dl, y HBA1c $\geq$ 6,5 <sup>98</sup> .
Obesidad mórbida	IMC $\geq$ 40 Kg/m <sup>2</sup> . Según los valores aceptados por la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad <sup>99</sup> .
Enfermedad renal	Filtrado glomerular $<$ 60 ml/min/1,73m <sup>2</sup>
Hepatopatía crónica	Valores de transaminasas superiores a 2DS
Enfermedad aguda	
Neoplasias	

Todos pacientes pertenecen a las Consultas externas del Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia.

- Sujetos control: Se han estudiado un grupo de personas sin ningún tipo de antecedente o riesgo cardiovascular ni infecciones o inflamaciones agudas, de igual edad y sexo al grupo de pacientes. Con valores de apolipoproteína B < 120 mg/dl y colesterol total < 200 mg/dl y triglicéridos < 150 mg/dl.

Hemos considerado hiperapolipoproteinemia B valores de apolipoproteína B  $\geq$  120 mg/dL.

Hemos considerado hipercolesterolemia valores de colesterol total superiores al percentil 90 (CT  $\geq$  200 mg/dl) ajustados por edad y sexo.

Hemos considerado hipertrigliceridemia valores de triglicéridos al percentil 90 (TG  $\geq$  150 mg/dl), ajustados por edad y sexo.

Hemos considerado intolerancia hidrocarbonada<sup>100</sup> o estado de prediabetes a valores de glucemia entre 100-125 mg/dl o valores de 140-199 mg/dl tras sobrecarga de 75g de glucosa y pasadas 2 horas o HBA1c entre 5,7-6,4%.

Hemos considerado diabetes mellitus<sup>100</sup> valores de glucemia  $\geq$  126 mg/dl o valores de glucemia  $\geq$  200 mg/dl tras sobrecarga de 75 g de glucosa pasadas 2 horas o HBA1c  $\geq$  6,5%.

Hemos considerado hiperinsulinismo y resistencia a la insulina<sup>101</sup> el percentil 75 de insulina (12,75  $\mu$ g/ml) y HOMA (3,03)

Hemos considerado presión arterial elevada<sup>102</sup> cifras de presión arterial sistólica superior a 140 mmHg y/o diastólica superior a 90 mmHg, o que siguieran tratamiento hipotensor.

## **4.B MÉTODOS**

Se ha realizado un estudio de casos-controles.

El protocolo ha incluido:

- Anamnesis completa de los hábitos del paciente (consumo de tabaco, alcohol, medicamentos), medición de la presión arterial.
- Determinación de parámetros antropométricos: peso (Kg), talla (m), índice de masa corporal (IMC) ( $\text{Kg}/\text{m}^2$ ), medida de la circunferencia de la cintura (cm) y de la cadera (cm).
- Determinaciones bioquímicas:
  - para el estudio hidrocarbonado: glucosa, insulina.
  - para el estudio lipídico: colesterol total, triglicéridos, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol VLDL, apolipoproteína A, apolipoproteína B, diámetro de las LDL.
  - para el estudio inflamatorio: proteína C reactiva, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , p-selectina, e-selectina, VCAM, ICAM.

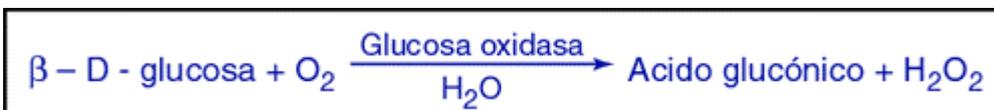
La extracción de sangre se ha realizado en ayunas de 12 horas, las muestras se han centrifugado inmediatamente a 2500 r.p.m. en centrífuga refrigerada a 4° C, 10 minutos. Las determinaciones que no se realizaron en el mismo día se guardaron congeladas a -80°C hasta su determinación.

Las determinaciones realizadas siguieron las siguientes metodologías:

Glucosa: la determinación se ha realizado en los analizadores Synchron LX20 Pro de Beckman Coulter que determinan la concentración de glucosa mediante un método cinético que emplea un electrodo para oxígeno<sup>103</sup>. Para ello, un volumen preciso de muestra (10 microlitros), es inyectado en una cubeta de reacción que contiene solución de glucosa oxidasa. La proporción es una parte de muestra por 76 partes de reactivo. La velocidad pico de consumo de oxígeno es directamente proporcional a la concentración de glucosa que hay en la muestra.

Esquema de la reacción:

El oxígeno se consume a la misma velocidad en la que la glucosa reacciona para formar ácido glucónico.



Debido a que se mide el consumo de oxígeno en vez de la formación de peróxido, el único requisito es que el peróxido debe ser destruido de tal forma que no vuelva a formar oxígeno. Según la siguiente reacción, la adición de etanol al reactivo hace que el peróxido, en presencia de la catalasa, se destruya sin producir oxígeno:



Para asegurar la destrucción completa del peróxido, se agrega yoduro y molibdato al reactivo enzimático, lo que produce la siguiente reacción:



La sensibilidad de la técnica es de 3 mg/dL y tiene un coeficiente de variación intraensayo de 3,6%.

Insulina: la determinación se ha realizado en el analizador Immulite 1000 de Siemens por un método inmunométrico quimioluminiscente.

El analizador utiliza una fase sólida con anticuerpo antiinsulina monoclonal y una fase líquida con fosfatasa alcalina (de intestino de ternera) conjugada con anticuerpos policlonales (de oveja) antiinsulina y fosfatasa alcalina (de intestino de ternera) conjugada con anticuerpos monoclonales (de ratón) antiinsulina en solución tampón. Tras una hora de incubación de la muestra junto con la

insulina presente en la muestra forma un complejo tipo sándwich con el anticuerpo antiinsulina monoclonal de ternera fijado, con la fosfatasa alcalina conjugada con anticuerpos policlonales y con los anticuerpos monoclonales de ratón del reactivo. Tras los lavados y posterior adición de sustrato quimioluminiscente se obtiene una señal proporcional a la cantidad de insulina.

La sensibilidad de la técnica es 2µU/ml

El coeficiente de variación intraensayo es 6,4%

Para el cálculo de la resistencia insulínica se ha utilizado el índice HOMA<sup>104</sup> (homeostasis model assesment) por la fórmula descrita por Matthews et al<sup>105</sup>.  
 $HOMA = \text{insulina } (\mu\text{U/ml}) * [\text{glucosa } (\text{mg/dl}) / 18] / 22,5$ .

Colesterol: para su determinación se ha utilizado un método enzimático en el autoanalizador Synchron LX20 Pro de Beckman Coulter.

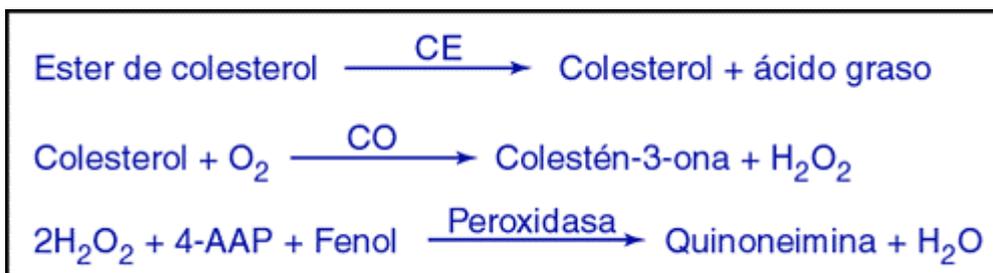
EL analizador utiliza el método de medida a tiempo final<sup>106</sup>. La reacción usa la hidrólisis de ésteres de colesterol por la colesterol esterasa para obtener colesterol libre y ácidos grasos. El colesterol libre es oxidado por la colesterol oxidasa a colesteno 3one y peróxido de hidrógeno. A continuación la peroxidada cataliza la reacción del peróxido de hidrógeno con 4-aminoantipirina (4AAP) y fenol obteniendo un producto coloreado, la quinoniemina.

El cambio de absorbancia a 520 nm en un intervalo de tiempo fijo nos proporciona la concentración de colesterol, de manera directamente proporcional.

El método tiene un coeficiente de variación intraensayo de 14,9%.

El sistema controla el cambio de absorbancia a 520 nanómetros. Este cambio de absorbancia es directamente proporcional a la concentración de colesterol en la muestra.

Esquema de la reacción:



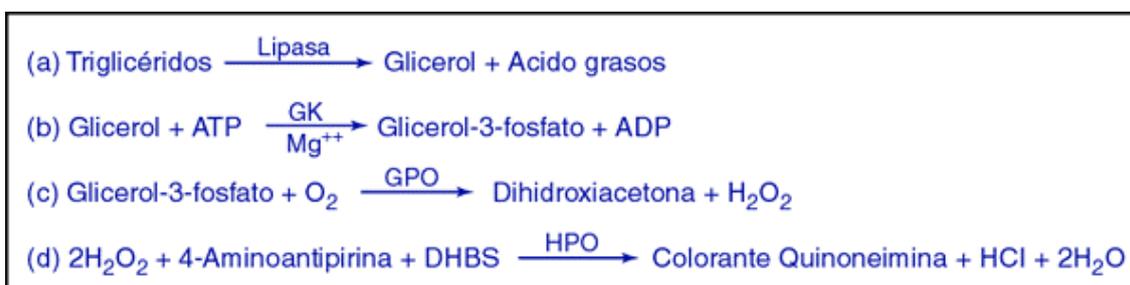
La sensibilidad es de 5 mg/dL, y el coeficiente de variación intraensayo del 4%.

Triglicéridos: para su determinación se ha utilizado un método enzimático en el autoanalizador Synchron LX20 Pro de Beckman Coulter.

El Reactivo glicerol fosfato oxidasa (GPO) se usa para medir la concentración de triglicéridos mediante un método de punto final a tiempo fijo<sup>107</sup>. Los triglicéridos en la muestra son hidrolizados a glicerol y ácidos grasos libres por acción de la lipasa. Una secuencia de tres pasos enzimáticos acoplados usando glicerol kinasa (GK), glicerol fosfato oxidasa (GPO), y peroxidasa de rábano picante (HPO) causa el acoplamiento oxidante del ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfónico (DHBS) con 4-aminoantipirina y forma un colorante rojo de quinoneimina.

El sistema controla el cambio de absorbancia a 520 nanómetros. Este cambio de absorbancia es directamente proporcional a la concentración de TG en la muestra

Esquema de la reacción:

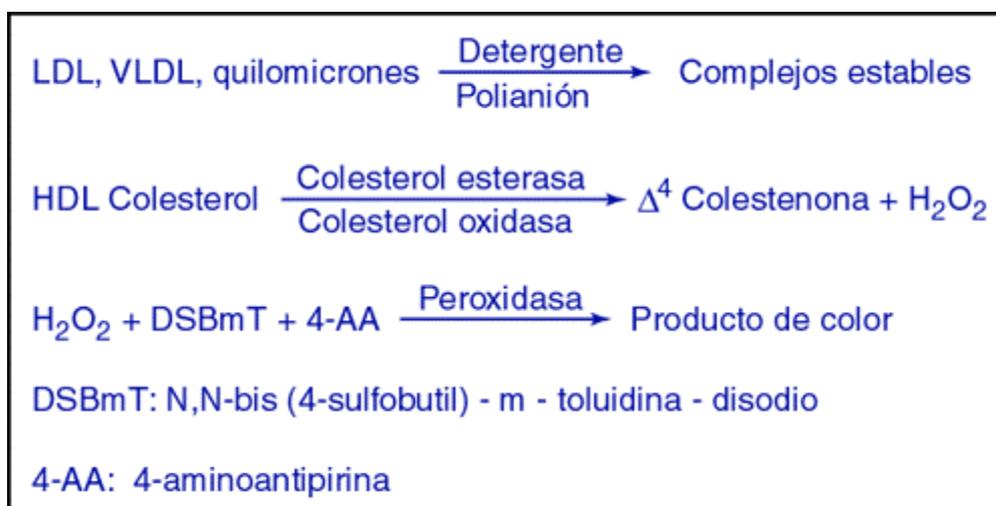


La sensibilidad para la determinación de TG es de 10 mg/dL, y un coeficiente de variación intraensayo de 6,3%.

Colesterol HDL: para su determinación se ha utilizado un método directo en el autoanalizador Synchron LX20 Pro de Beckman Coulter.

Este método directo para HDL<sup>108</sup> utiliza un detergente especial que solubiliza únicamente las partículas de lipoproteína HDL y libera HDL colesterol para que reaccione con la colesterol esterasa y la colesterol oxidasa en presencia de cromógenos para producir un producto de color. El mismo detergente también inhibe la reacción de las enzimas de colesterol con las lipoproteínas LDL, VLDL y los quilomicrones mediante la adsorción a sus superficies. Un polianión contenido en el reactivo mejora la selectividad del ensayo de HDL colesterol estableciendo enlaces con LDL, VLDL y quilomicrones. Es un método de punto final a tiempo fijo. El sistema controla el cambio de absorbancia a 560 nanómetros. Este cambio de absorbancia es directamente proporcional a la concentración de colesterol HDL en la muestra.

Esquema de la reacción:



El método tiene una sensibilidad de 5 mg/dl y un coeficiente de variación intraensayo de 3,19%.

Colesterol LDL: calculamos el colesterol LDL aplicando la fórmula de Friedewald para triglicéridos < 400 mg/dl

$$\text{Colesterol LDL} = \text{CT} - (\text{cHDL} + \text{cVLDL})$$

Colesterol VLDL: calculamos el colesterol VLDL aplicando la fórmula siguiente:

$$\text{Colesterol VLDL} = \text{TG}/5$$

Apolipoproteína A<sub>1</sub>: para su determinación se ha utilizado un ensayo de inmunonefelometría en Nefelómetro II de Dade Behring.

Es un método inmunoquímico en el que se forma un inmunocomplejo entre la apoproteína A<sub>1</sub> y un anticuerpo específico. El inmunocomplejo dispersa un haz de luz cuya intensidad es proporcional a la concentración de apoproteína A<sub>1</sub> en la muestra. Se establece una curva de calibración con cinco puntos obtenidos de diluciones a partir de un suero patrón, que será utilizada por el sistema para proporcionar el resultado de Apolipoproteína A<sub>1</sub> en la muestra.

La sensibilidad de la técnica está establecida por el límite inferior de la curva de calibración y el coeficiente de variación intraensayo es 5,7%.

Apolipoproteína B: para su determinación se ha utilizado un ensayo de inmunonefelometría en Nefelómetro II de Dade Behring.

Utiliza un método inmunoquímico en el que se forma un inmunocomplejo entre la apoproteína A<sub>1</sub> y un anticuerpo específico. El inmunocomplejo dispersa un haz de luz cuya intensidad es proporcional a la concentración de apoproteína B en la muestra. . Se establece una curva de calibración con cinco puntos obtenidos de diluciones a partir de un suero patrón, que será utilizada por el sistema para proporcionar el resultado de Apolipoproteína B en la muestra.

La sensibilidad de la técnica está establecida por el límite inferior de la curva de calibración y el coeficiente de variación intraensayo es 5,7%.

Colesterol no-HDL calculamos el colesterol no HDL restándolo del colesterol total.

Índice aterogénico del plasma (IAP): calculamos el IAP aplicando la fórmula siguiente:

$$\text{IAP} = \text{lg TG/cHDL}$$

Fenotipo B de las LDL: el fenotipo B de las LDL se ha determinado mediante la técnica de separación de las distintas moléculas de LDL por electroforesis en gradiente en gel de poliacrilamida <sup>109, 110</sup>.

En la distribución del fenotipo de las LDL hemos utilizado el patrón habitual: patrón A con un diámetro medio > 25.5 nm y patrón B o predominio de partículas pequeñas y densas con un diámetro medio < 25.5 nm <sup>111</sup>.

La técnica consiste en utilizar una electroforesis en gel de poliacrilamida en gradiente a concentraciones del 2 al 16% según según método descrito por Nichol y cols <sup>109</sup>.

Las muestras fueron teñidas con una solución de etilenglicol y Negro Sudán al 0.1%. La electroforesis se llevó a cabo refrigerada (4-8°C) con una preelectroforesis de 1 h a 120 V, seguida de electroforesis 30 minutos a 20 V, 30 minutos a 70 V y 12.5 h a 90-100 V.

Se utilizaron como estándares sueros con fracciones de diámetros de LDL conocidas para establecer una recta de calibración. Se utilizaron muestras de suero como controles (C1, C2 y C3), conteniendo 3 fracciones de LDL con diámetros conocidos de 28.67 nm, 26.98 nm, 26.35 y 24.19 nm. Se escanearon los geles y se midió la distancia recorrida por las diferentes bandas (Rf o Índice de migración), desde el punto de salida hasta la banda más prominente. Con las muestras control se calcula una recta de regresión y en ella se extrapolan las muestras.

El coeficiente de variación intraensayo fue inferior a 1%.

La instrumentación puede verse en las Figura 11 y 12 y las muestras listas para comenzar a migrar en la figura 13.

Un ejemplo de gel resultado de la migración es la figura 14.



Figura 11. Instrumentación para llevar a cabo la realización del gel en gradiente y la electroforesis



Figura 12. Instrumentación para llevar a cabo la realización del gel en gradiente y la electroforesis

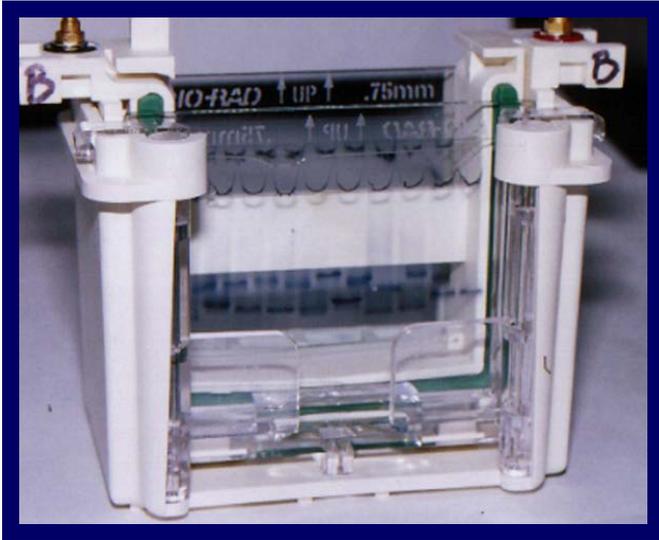


Figura 13. Imagen de las muestras en el gel para llevar a cabo la migración.

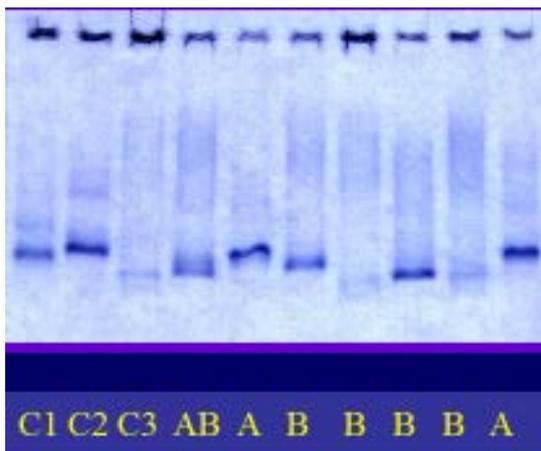


Figura 14. Gel con las muestras problema y los controles.

Las muestras se clasifican en los distintos fenotipos, **Fenotipo A** y **B** según el pico máximo de electroforesis en:

**Fenotipo A:** diámetro mayor de 25,5 nm.

**Fenotipo B:** diámetro inferior de 25,5 nm.

Las LDL pequeñas y densas son introducidas por el ATPIII como un factor de riesgo lipídico emergente. Su predominio en plasma se considera un indicador de dislipemia aterógena, junto con el descenso de colesterol HDL y la hipertrigliceridemia.

PCR ultrasensible: para su determinación se ha utilizado una técnica de inmunonefelometría en el Nefelometro II de Dade BerinHg.

La técnica consiste en la utilización de partículas de látex de poliestireno recubiertas con anticuerpos monoclonales contra la PCR. Se aglutinan al mezclarse con las muestras que contienen PCR. La intensidad de la luz dispersada en el nefelómetro varía en función del contenido de PCR de la muestra. A partir de una recta de calibración con diluciones de estándar conocido se determina la cantidad de PCR de la muestra.

El límite de sensibilidad es 0.175 mg/l. y el coeficiente de variación intraensayo es 3.5%

IL-6: para su determinación se ha utilizado un ensayo enzimoimmunoanálisis secuencial en fase sólida por quimioluminiscencia en el Immulite 1000 de Siemens.

La técnica consiste en el uso de una fase sólida (bola de poliestireno) contenida dentro de la unidad de medida del analizador y recubierta por un antiligando. La IL-6 presente en la muestra queda unida formando un sándwich con dos anticuerpos que reconocen diferentes epitopos de la molécula de IL-6. Este complejo se une a la fase sólida por un puente ligando-antiligando. El conjugado ligado se elimina por lavado con centrifugación. Se utiliza un sustrato quimioluminiscente (éster fosfato de adamantil dioxetano) que sufre una hidrólisis para generar un producto intermedio inestable. La producción

continua de este producto resulta en una emisión mantenida de luz que es medida por un luminómetro. La cantidad de luz es proporcional a la concentración de IL-6 de la muestra.

El límite de sensibilidad es 2 pg/ml y el coeficiente de variación intraensayo es 4.85%.

IL-8: para su determinación se ha utilizado un ensayo enzimoinmunométrico por quimioluminiscencia en fase sólida en el Immulite 1000 de Siemens.

La técnica es similar y consiste en una fase sólida (bola de poliestireno) contenida dentro de la unidad de medida del analizador y recubierta por un antiligando. La IL-8 presente en la muestra queda ligada formando un sándwich con dos anticuerpos que reconocen diferentes epitopos de la molécula de IL-8. Este complejo se une a la fase sólida por un puente ligando-antiligando. El conjugado ligado se elimina por lavado con centrifugación. Se utiliza un sustrato quimioluminiscente (éster fosfato de adamantil dioxetano) que sufre una hidrólisis para generar un producto intermedio inestable. La producción continua de este producto resulta en una emisión mantenida de luz que es medida por un luminómetro. La cantidad de luz es proporcional a la concentración de IL-8 de la muestra.

El límite de sensibilidad es 2 pg/ml y el coeficiente de variación intraensayo es 6.5%.

TNF- $\alpha$ : para su determinación se ha utilizado un ensayo inmunométrico por quimioluminiscencia en Immulite 1000 de Siemens.

La técnica consiste en una fase sólida (bola de poliestireno) contenida dentro de la unidad de medida del analizador y recubierta por un antiligando. El TNF- $\alpha$  presente en la muestra queda ligada formando un sándwich con dos anticuerpos que reconocen diferentes epitopos de la molécula de TNF- $\alpha$ . Este complejo se une a la fase sólida por un puente ligando-antiligando. El conjugado ligado se elimina por lavado con centrifugación. Se utiliza un sustrato quimioluminiscente (éster fosfato de adamantil dioxetano) que sufre una hidrólisis para generar un producto intermedio inestable. La producción

continúa de este producto resulta en una emisión mantenida de luz que es medida por un luminómetro. La cantidad de luz es proporcional a la concentración de TNF $\alpha$  de la muestra.

El límite de sensibilidad es 1.7 pg/ml y el coeficiente de variación intraensayo es 6.5%.

Moléculas de adhesión ICAM, VCAM y selectinas (p-selectina y s-selectina): para su determinación se ha utilizado la técnica fluorescente multiplex xMAP del Luminex®.

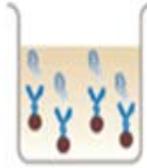
El ensayo consta de una primera incubación, donde las moléculas se unen a los distintos anticuerpos que recubren unas microesferas formando una unión “antígeno–anticuerpo”. Se incuba un tiempo que varía según las características del inmunoensayo. Posteriormente se realizan varios lavados para eliminar el exceso de muestra y las moléculas que no se han unido a sus anticuerpos, a continuación se añaden una mezcla de segundos anticuerpos unidos a biotina y, posteriormente, se añade un fluorocromo, que es la ficoeritrina unida a estreptovidina para que se una a la biotina. A continuación la segunda incubación en la que se forma de un inmunocomplejo tipo “sándwich” formado por una microesfera recubierta con anticuerpos, el antígeno de la muestra estudio unido a la microesfera y un segundo anticuerpo unido al antígeno a través de otro epítipo diferente. A continuación se vuelve a lavar y se pasa por un citómetro de flujo que mide la intensidad de la fluorescencia emitida por la ficoeritrina que será proporcional a la cantidad de molécula de la muestra.

El esquema del proceso se puede observar en la figura 15.

Añadimos 25 $\mu$ L anticuerpo + 200  $\mu$ L solución de lavado

Lavamos 2 X 200  $\mu$ L

+ 50  $\mu$ L buffer

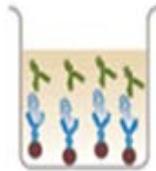


+ 50  $\mu$ L diluyente, buffer y muestra

+ 100  $\mu$ L estándar

+ 50  $\mu$ L buffer

Agitar 2h en oscuridad y lavar 2 X 200  $\mu$ L



+ 100  $\mu$ L anticuerpo detector

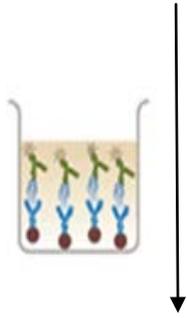
Agitar 1h en oscuridad y lavar 2 X 200  $\mu$ L



+ 100 $\mu$ L Phycoeritrina y agitar 30 min en oscuridad

Lavar 3 X 200  $\mu$ L

+ 100  $\mu$ L de buffer de lavado y agitar 2-3 min



leer en el sistema de detección Luminex

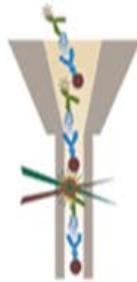


Figura 15. Etapas de la técnica de la determinación en Luminex 200

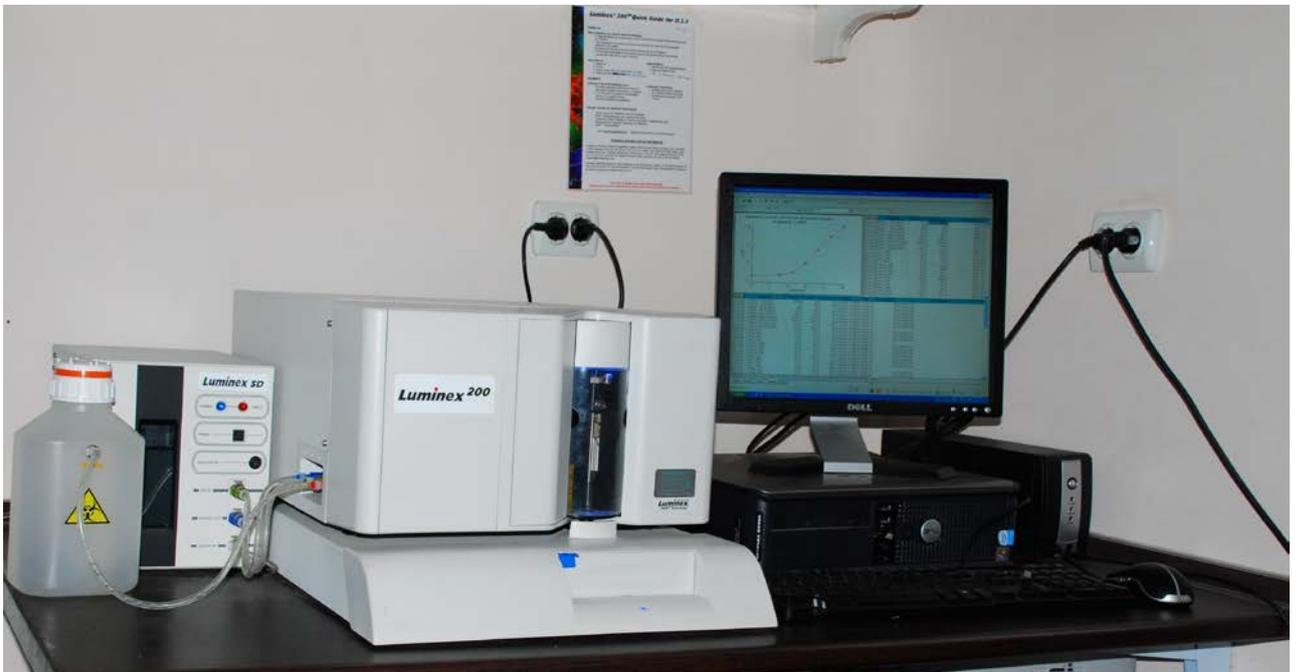


Figura 16. Equipo de Luminex 200.

#### **4.C TRATAMIENTO ESTADÍSTICO**

Para el tratamiento estadístico de los resultados se ha utilizado el programa SPSS 15.0.

Se ha calculado la media aritmética y la desviación estándar como medidas de estadística descriptiva. Se ha aplicado el test de Kolmogorov-Smirnov a los datos para determinar si la distribución de las variables era normal. Con ello se vio que todas las variables seguían una distribución normal excepto los triglicéridos y la interleuquina 8.

Hemos aplicado la prueba t-Student para comparar medias en las variables normales y la prueba U de Mann-Whitney para comparar las variables no normales.

Las variables que seguían una distribución normal se han expresado como media  $\pm$  1desviación estándar (SD) y las no normales como mediana con percentiles de 25% y 75%.

Para establecer correlaciones entre las variables hemos utilizado el coeficiente de Correlación de Pearson para variables normales y de Spearman para variables no normales.

Para la realización de terciles con variables cuantitativas hemos utilizado el test de ANOVA.

Hemos considerado significación estadística una  $p < 0.05$ .

Calculo de tamaño muestral:

Para el cálculo del tamaño muestral hemos hecho un estudio de varios de nuestros parámetros lipídicos ( triglicéridos, colesterol, HOMA, PCR-u, ApoB y diametro de las LDL pequeñas y densas) y los que necesitan de una mayor "n" son el diámetro de las LDL pequeñas y densas y la ApoB.

Así podemos ver que la desviación estándar del diámetro de las LDL pequeñas y densas entre los grupos control y la de pacientes analizados es de

0,7nm, y para encontrar diferencias significativas entre el grupo control y el de enfermos la diferencia entre los valores medios de ambas variables debe ser de 0,9 nm. Aceptando un riesgo de 0,05 y si se desea una potencia estadística del 100 % para detectar diferencias, el tamaño muestral debería ser de 75 pacientes para encontrar diferencias.

A su vez para la apoB la desviación estándar entre los grupos control y la de pacientes analizados es de 24 mg/dl, y para encontrar diferencias significativas entre el grupo control y el de enfermos la diferencia entre los valores medios de ambas variables debe ser de 46 mg/dl. Aceptando un riesgo de 0,05 y si se desea una potencia estadística del 100% para detectar diferencias, el tamaño muestral debería ser también de 75 pacientes para encontrar diferencias.

## **RESULTADOS**

## **5.-RESULTADOS**

### **5.A VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS**

Se seleccionaron 75 pacientes, 30 hombres (40%) y 45 mujeres (60%), con una edad media de 41 años, el 49% presentan sobrepeso, el 20% obesidad, y el 28% hipertensión arterial. Estos datos se expresan en la tabla 5.

Se seleccionaron 75 controles, 23 hombres (30%) y 52 mujeres (70%), con una edad media de 37 años, el 12% presentan sobrepeso, el 4% obesidad, y el 2% hipertensión arterial. Estos datos se expresan en la tabla 5.

Tabla 5. Descriptivos de controles y enfermos HFC

	<b>CONTROLES n=75</b>	<b>ENFERMOS n=75</b>	<b>P</b>
<b>Hombre/Mujer (%)</b>	30/70	40/60	NS
<b>Edad media (años)</b>	37 ±13	41 ±14	NS
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	23,1 ± 2,8	26,9 ± 4,0	<0,001
<b>Sobrepeso %</b>	12	49	<0,001
<b>Obesidad %</b>	4	20	<0,001
<b>HTA %</b>	2	28	<0,001
<b>Mujeres cintura ≥88</b>	18%	50%	<0,001
<b>Hombres cintura ≥102</b>	6%	27%	<0,001

## **5.B PARÁMETROS HIDROCARBONADOS**

Los parámetros del metabolismo hidrocarbonado, glucosa basal, insulina y HOMA de pacientes y controles presentan diferencias significativas entre ellos, con valores superiores de glucemia, insulinemia y HOMA en los pacientes de HFC. Los resultados se expresan en la tabla 6.

Tabla 6. Valores del metabolismo hidrocarbonado. Glucemia basal, Insulinemia basal y HOMA en los grupos control y HFC.

	<b>CONTROLES n=75</b>	<b>HFC n=75</b>	<b>P</b>
<b>Glucemia basal (mg/dl)</b>	92,44 ± 9,47	97,37 ± 10,57	0,01
<b>Insulinemia basal (μU/ml)</b>	7,77 ± 4,21	10,81 ± 4,39	0,007
<b>HOMA</b>	1,72 ± 0,97	2,65 ± 1,27	<0,001

## **5.C PARÁMETROS LIPÍDICOS**

Los resultados del metabolismo lipídico en los grupos control y HFC presentan diferencias significativas en todos los parámetros. Están aumentados el colesterol total, triglicéridos, colesterol LDL, colesterol VLDL, Apolipoproteína B, colesterol no HDL, Índice Aterogénico del Plasma, y disminuidos el colesterol HDL y Apolipoproteína A. También presenta diferencias significativas el patrón B de las LDL resultando un menor diámetro las LDL del grupo HFC y por tanto un predominio del patrón B en el grupo HFC frente a un predominio del patrón A en el grupo control. Los valores están expresados en tabla 7.

Tabla 7. Valores de parámetros lipídicos en grupo control y HFC

	<b>CONTROLES n=75</b>	<b>HFC n=75</b>	<b>P</b>
<b>CT mg/dl</b>	173.8 ± 26.3	230.5± 48.4	<0.0001
<b>TG mg/dl</b>	67.0 ± -34.2	227.5± 195.6	<0.0001
<b>cHDL mg/dl</b>	58.3± 14.6	44.3 ± 16.0	<0.0001
<b>cLDL mg/dl</b>	102.0± 25.5	147.8± 43.7	<0.0001
<b>cVLDL mg/dl</b>	13.4 ± 6.8	43.4 ± 36.1	<0.0001
<b>APO A mg/dl</b>	146.2 ± 18.5	128.7± 27.8	0.008
<b>APO B mg/dl</b>	80.0 ± 19.4	126.7 ± 28.3	<0.0001
<b>Col no HDL mg/dl</b>	107.37± 44.51	187.3 ± 35.9	<0.001
<b>Índice aterogénico del plasma</b>	0.01 ± 0.32	0.59 ± 0.41	<0.001
<b>Diámetro de las LDL nm</b>	26.2 ± 0.57	25.34 ± 0.84	<0.001
<b>% Fenotipo B</b>	4,8	52	<0.0001
<b>% Fenotipo A</b>	95,2	48	<0.0001

## **5.D RELACIÓN ENTRE LA RESISTENCIA INSULÍNICA Y LOS PARÁMETROS LIPÍDICOS**

La glucosa presenta una correlación positiva significativa con cintura e IMC, triglicéridos, colesterol no HDL, y correlación negativa significativa con LDL pequeñas y densas. El HOMA ha presentado una relación positiva significativa con la cintura, los triglicéridos, IAP, y negativa con el colesterol HDL y con el diámetro de las LDL. La insulina ha presentado correlación negativa significativa con colesterol HDL y con el diámetro de las LDL. Los datos están expresados en la tabla 8.

A continuación expresamos las figuras de dispersión que intervienen en la RI y las distintas variables lipídicas que presentaron significación estadística.

Tabla 8. Correlación de Pearson entre parámetros de resistencia insulínica y variables lipídicas.

	CINTURA	IMC	TG	HDL	LDL	APO B	COLESTEROL NO HDL	DIAMETRO-LDL	IAP
<b>GLUCOSA</b>	r= 0,555 p= 0,005	r= 0,486 p= 0,006	r= 0,463 p= 0,001	NS	NS	NS	r= 0,305 p= 0,009	r= -0,518 p= 0,009	0,375 p= 0,011
<b>INSULINA</b>	NS	NS	NS	r= -0,333 p= 0,044	NS	NS	NS	r= -0,435 p= 0,038	r= 0,351 p= 0,033
<b>HOMA</b>	r= 0,474 p= 0,022	NS	r= 0,401 p= 0,014	r= -0,357 p= 0,030	NS	NS	r= 0,305 p= 0,042	r= -0,486 p= 0,019	r= 0,422 p= 0,009

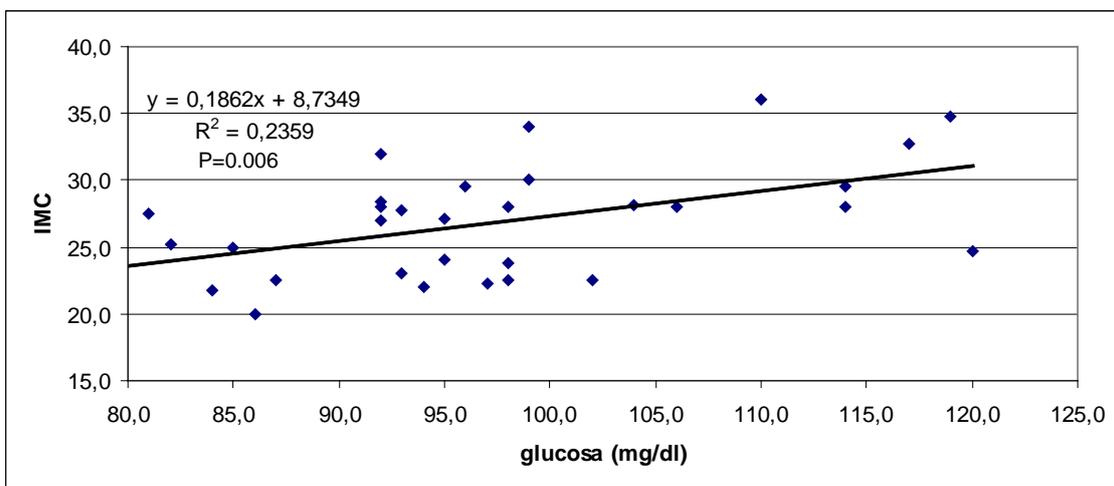
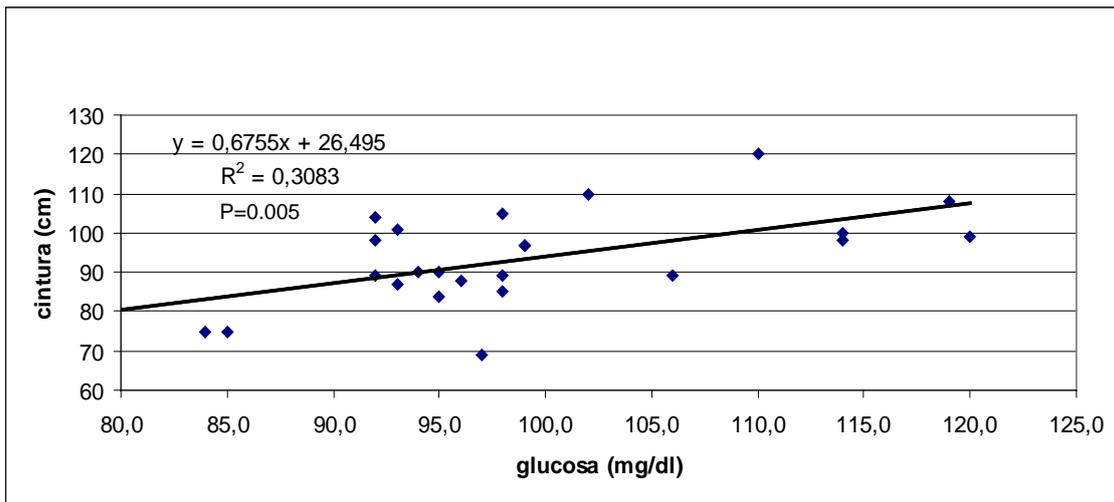


Figura 17. Relación entre la glucosa y las variables antropométricas cintura e índice de masa corporal

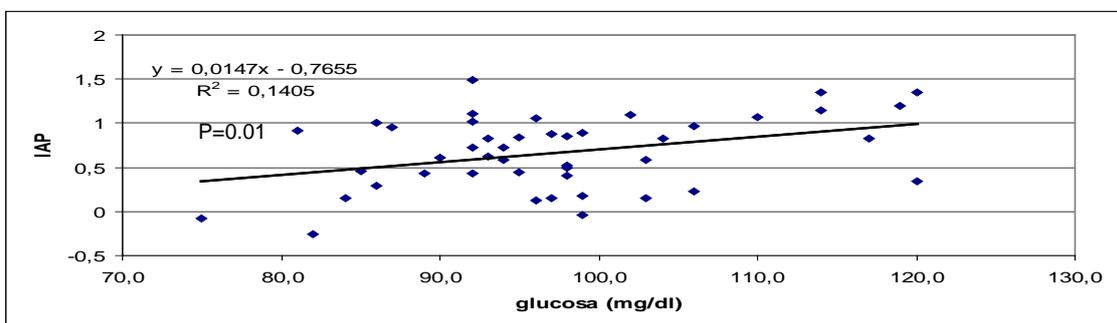
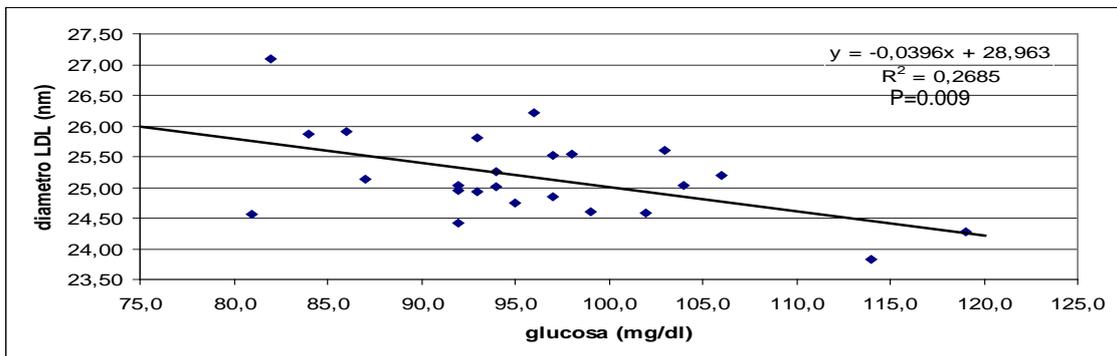
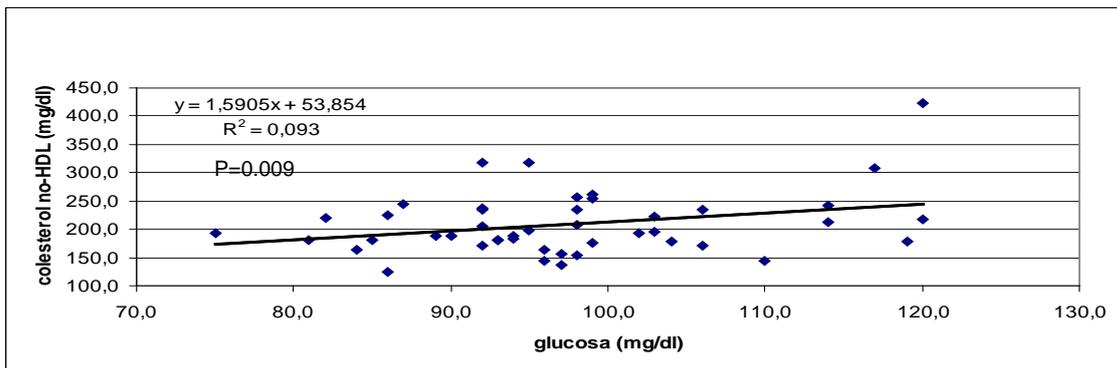
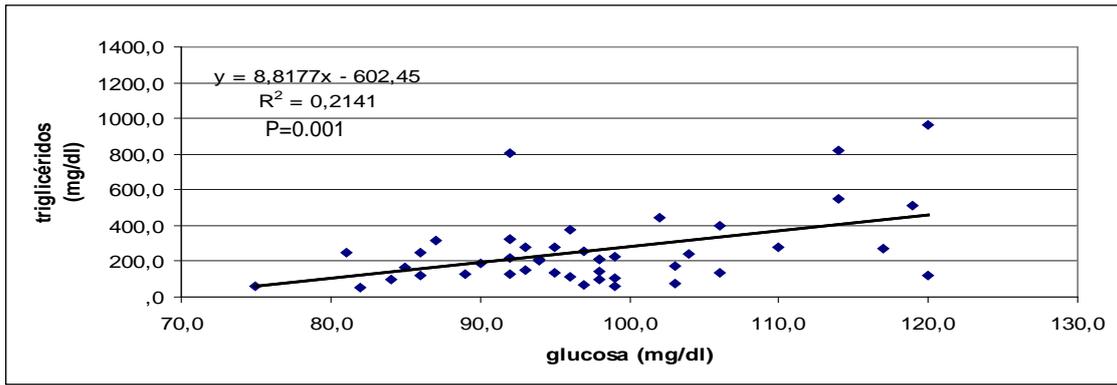


Figura 18. Relación entre la glucosa y los parámetros lipídicos

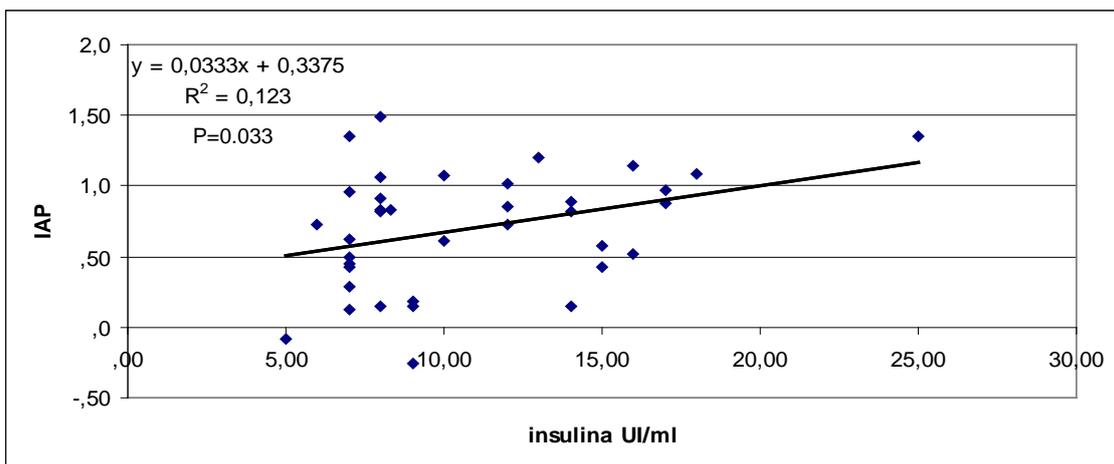
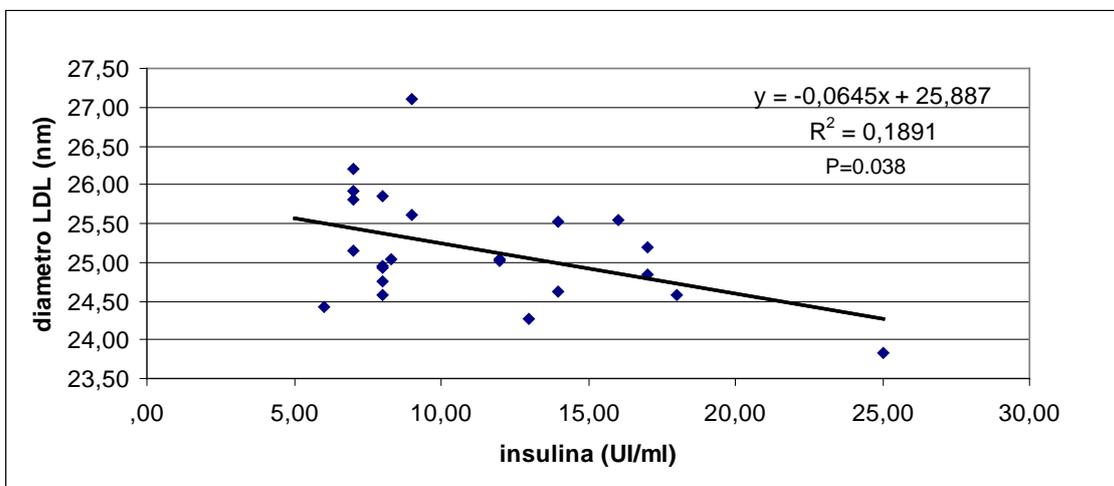
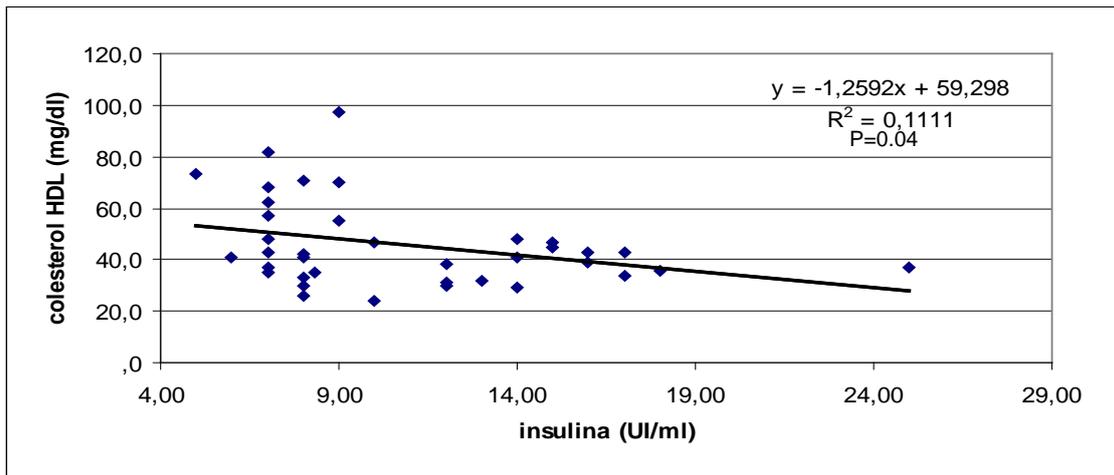


Figura 19. Relación entre la insulina y los parámetros lipídicos

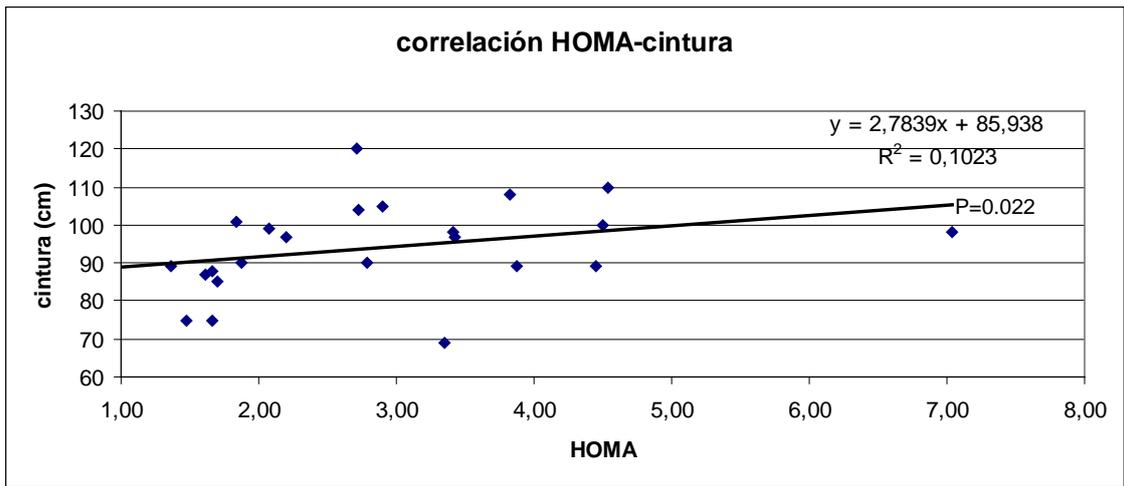


Figura 20. Relación entre HOMA y la variable antropométrica cintura

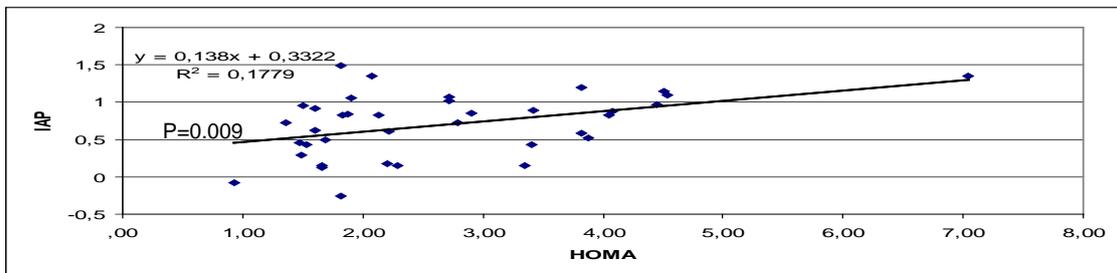
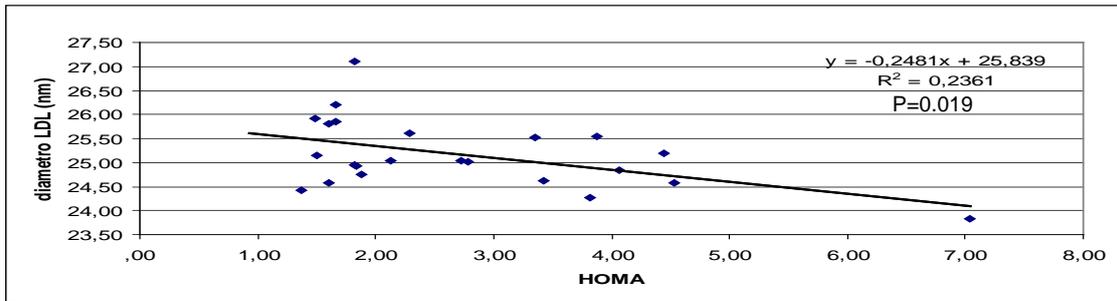
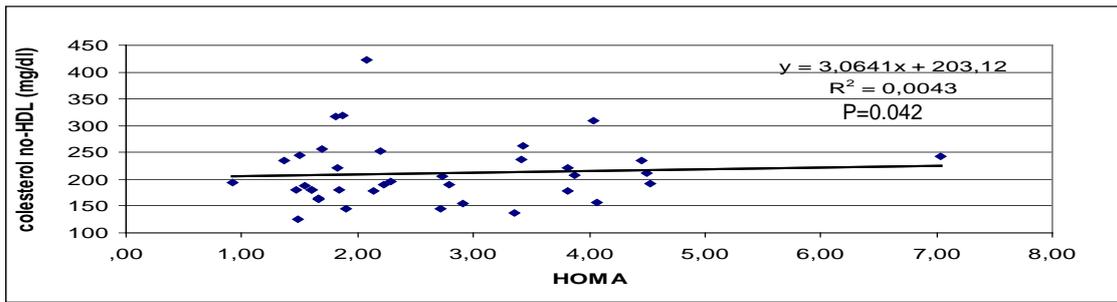
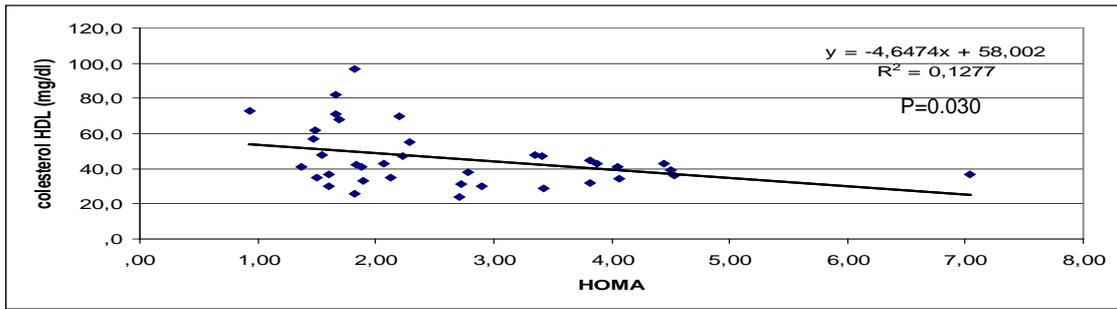
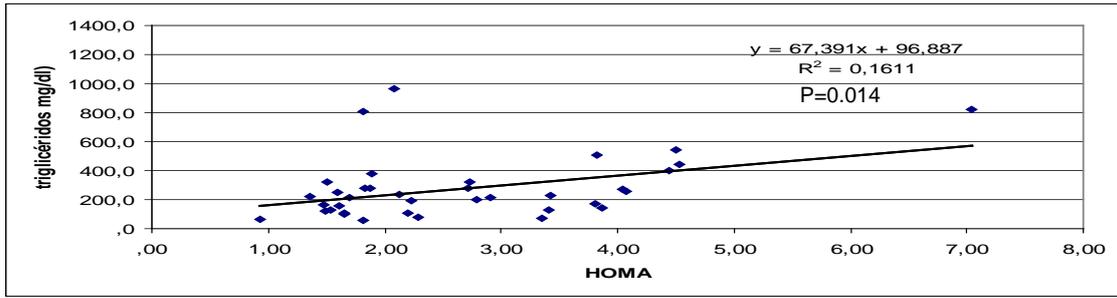


Figura 21. Relación entre la insulina y los parámetros lipídicos

## **5.E PARÁMETROS INFLAMATORIOS:**

Los niveles de las citoquinas inflamatorias IL-6, IL-8, TNF-  $\alpha$ , y de PCR-u están aumentados en HFC respecto del grupo control de manera significativa. Los niveles de selectinas, P-selectina y L-selectina, y de las moléculas de adhesión ICAM están aumentados significativamente en el grupo control respecto de HFC. Los niveles de VCAM son mayores en el grupo HFC pero no estadísticamente significativos. La n del grupo control en la PCR ultrasensible es 53 y del grupo control 57. La n del grupo control y del grupo de HFC en el TNF-  $\alpha$ , IL-6 y IL-8 es 19.

Los resultados de citoquinas y PCR se expresan en la tabla 9, los resultados de selectinas y moléculas de adhesión en la tabla 10.

Tabla 9. Valores de marcadores inflamatorios. IL-6 y TNF- $\alpha$  en pg/ml +/-DS, IL-8 en pg/ml percentil 50 (percentil 25; percentil 75) y PCR ultrasensible expresada en mg/l +/- DS.

	CONTROLES	HFC	P
IL-6 pg/ml	0.8 $\pm$ 0.72	2.69 $\pm$ 2.62	<0.001
IL-8 pg/ml	5,8 (4,9; 9,8)	12,2 (7,9; 24,6)	<0.05
TNF- $\alpha$ pg/ml	2.22 $\pm$ 2.59	8.99 $\pm$ 4.04	<0.001
PCR ultrasensible mg/l	1.23 $\pm$ 1.51	2.58 $\pm$ 2.95	<0.05

Tabla 10. Marcadores inflamatorios selectinas y moléculas de adhesión: p-selectina, e-selectina, VCAM e ICAM en ng/ml.

	CONTROLES	HFC	P
P-selectina ng/ml	61,28 ± 18,59	78,84 ± 22,75	<0.05
E-selectina ng/ml	31,10 ± 12,13	44,77 ± 16,979	<0.05
VCAM ng/ml	574,08 ± 131,49	674,39± 401,26	NS
ICAM ng/ml	126,68 ± 44,42	167,94± 21,79	<0.05

### **5.F RELACIÓN ENTRE LOS PARÁMATROS INFLAMATORIOS Y LOS PARÁMETROS DE RESISTENCIA INSULÍNICA**

La PCR presenta una correlación positiva significativa con la glucosa, insulina y HOMA en la totalidad del estudio (grupo control y grupo HFC) Los resultados se muestran en la tabla 11 y a continuación se representan los gráficos de dispersión de datos para cada parámetro inflamatorio y de resistencia insulínica.

Tabla 11. Correlación entre parámetros inflamatorios y parámetros hidrocarbonados.

	GLU	INS	HOMA
PCR	r= 0,286 p= 0,012	r= 0,367 p= 0,006	r= 0,404 p= 0,002
IL-6	NS	NS	NS
TNF-α	NS	NS	NS

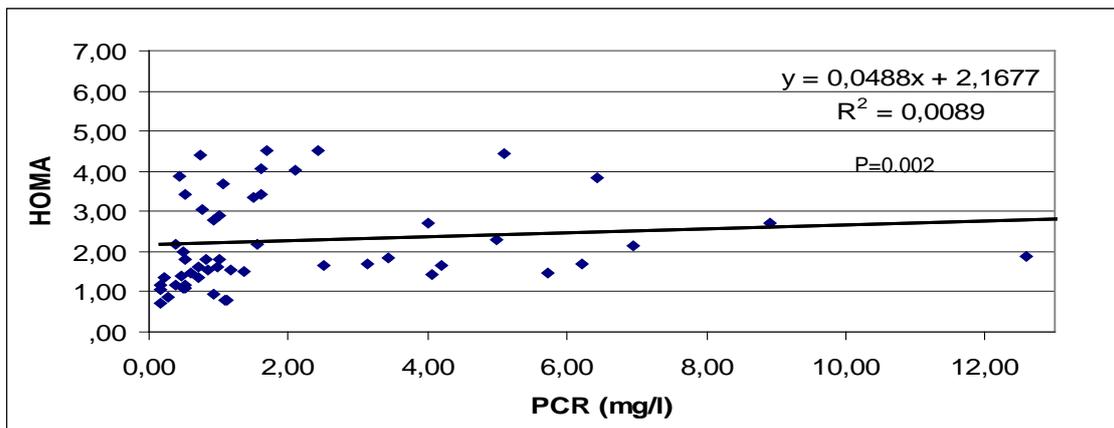
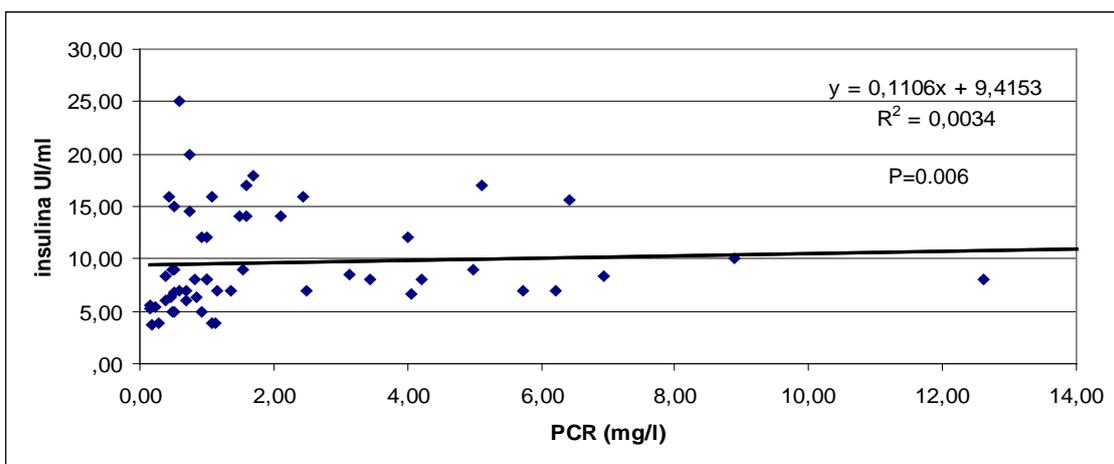
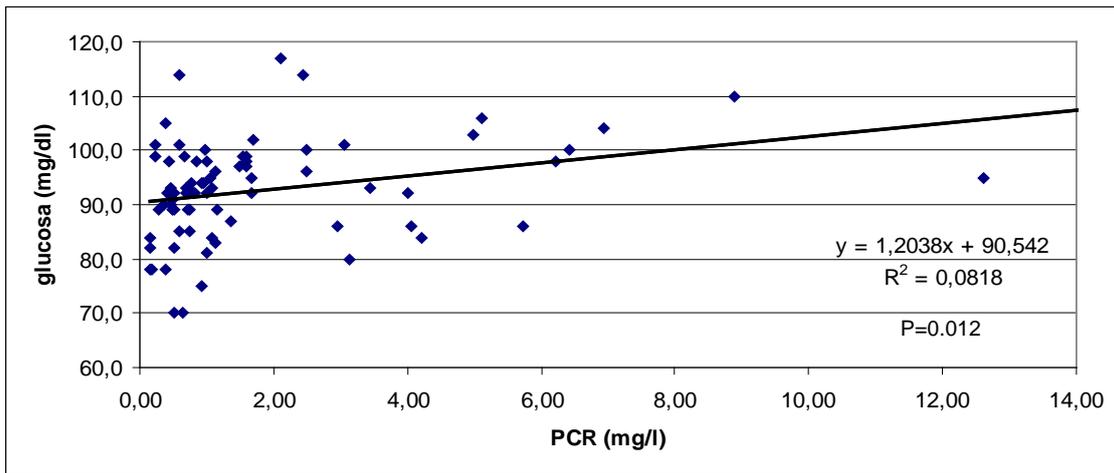


Figura 22. Relación entre la PCR y los parámetros de resistencia insulínica

## **5.G RELACIÓN ENTRE LOS PARÁMATROS INFLAMATORIOS Y LOS PARÁMETROS LIPIDICOS**

La PCR presenta una correlación positiva significativa con el IMC, cintura, colesterol total, triglicéridos, colesterol LDL, apolipoproteína B, colesterol no HDL, IAP, y correlación negativa significativa con colesterol HDL y diámetro de las LDL. La IL-6 presenta una correlación positiva significativa con el IMC, colesterol total, triglicéridos, colesterol LDL, apolipoproteína B, colesterol no HDL, IAP, y correlación negativa significativa con colesterol HDL. Estos datos corresponden a la totalidad del estudio (grupo control y grupo HFC). Los resultados se muestran en la tabla 12.

A continuación expresamos las figuras de dispersión que intervienen en la inflamación y las distintas variables antropométricas y lipídicas que presentaron significación estadística.

-Tabla 12. Correlación entre parámetros inflamatorios y parámetros lipídicos.

	CINTURA	IMC	CT	TG	HDL	LDL	APOB	COL NO HDL	IAP	IÁMETRO-LDL
PCR	r= 0,338 P= 0,025	r= 0,388 p= 0,004	r= 0,264 p= 0,005	r= 0,490 p< 0,001	r= -0,217 p= 0,023	r= 0,225 p= 0,023	r= 0,467 p<0,00 1	r= 0,367 p<0,001	r= 0,481 p< 0,001	r= -0,242 p= 0,034
IL-6	NS	r= 0,617 p= 0,025	r= 0,367 p= 0, 006	r= 0,322 p= 0,016	r= -0,305 p= 0,024	r= 0,438 p= 0,001	r= 0,404 p= 0,01	r= 0,440 p= 0,001	r= 0,329 p= 0,014	NS
TNF-α	NS	NS	rNS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

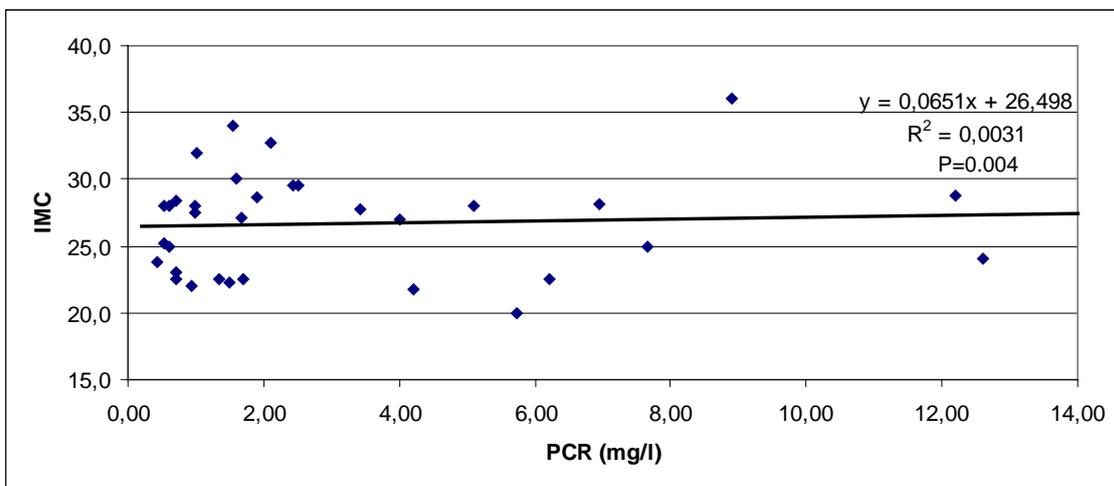
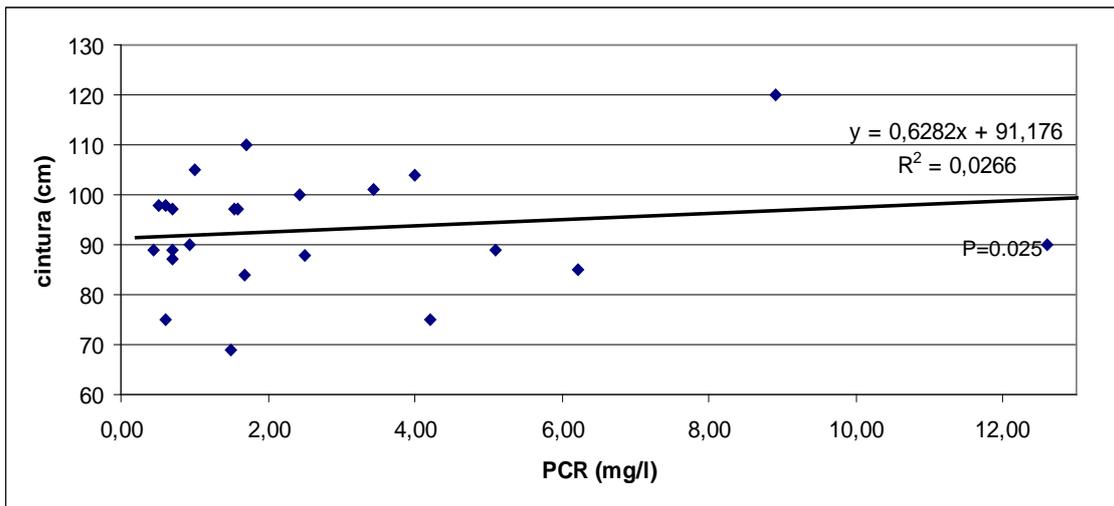


Figura 23. Relación entre la PCR y las variables antropométricas

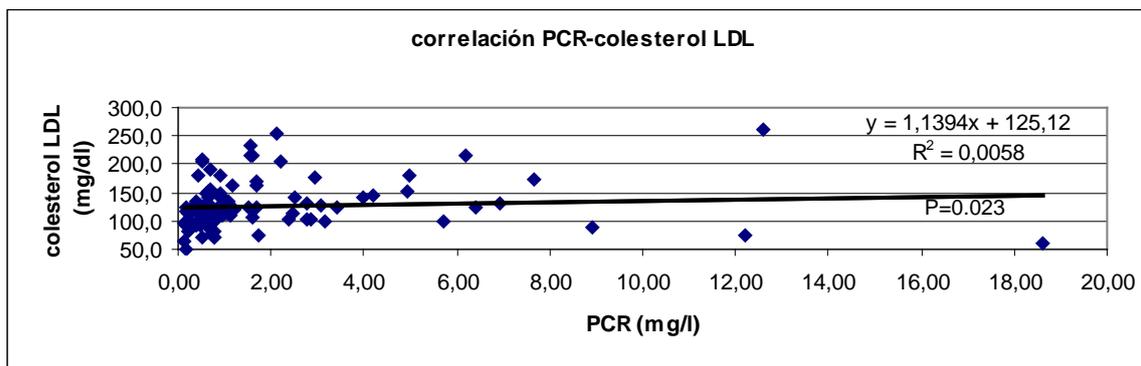
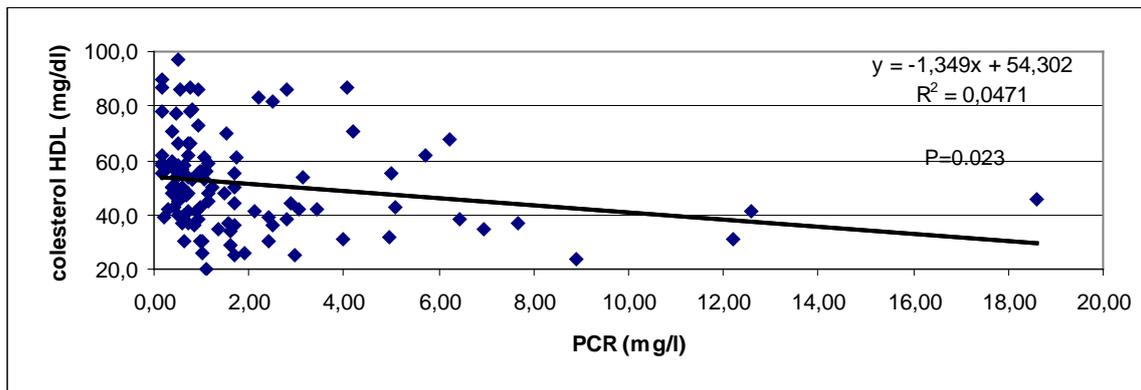
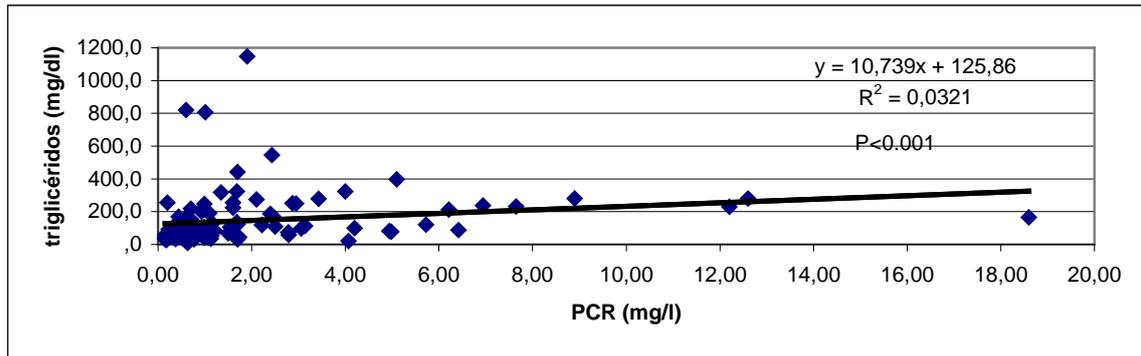
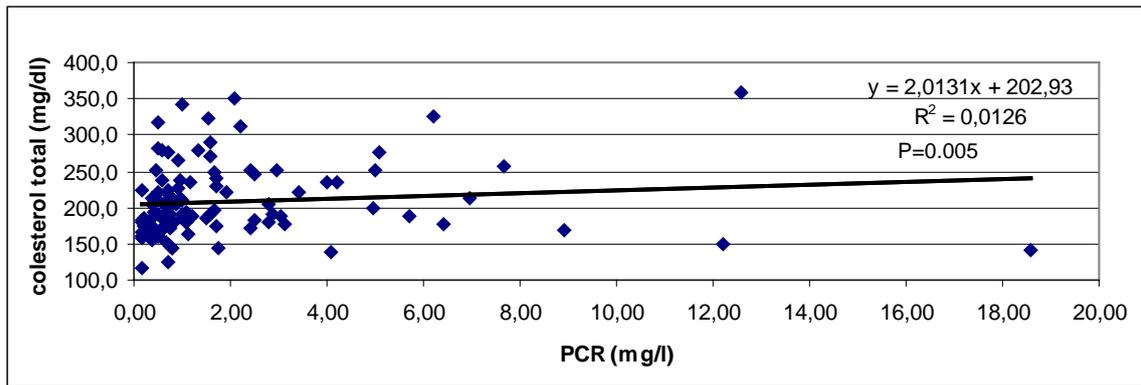


Figura 24. Relación entre PCR y las variables lipídicas

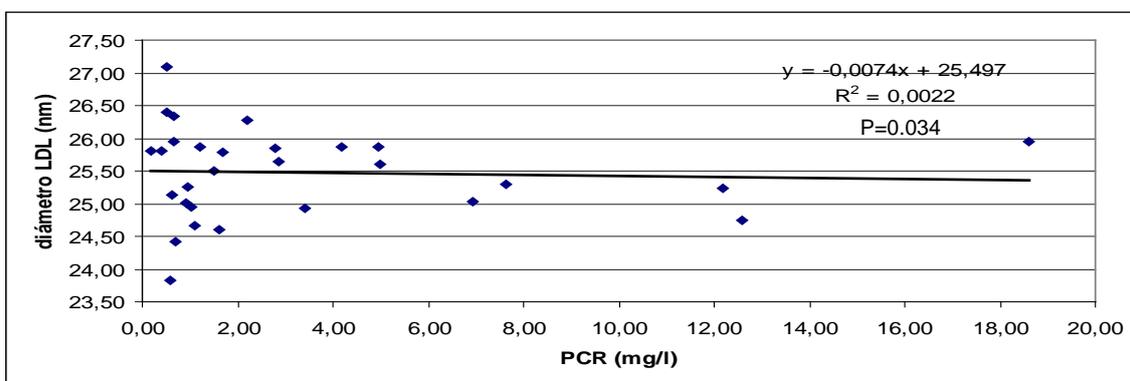
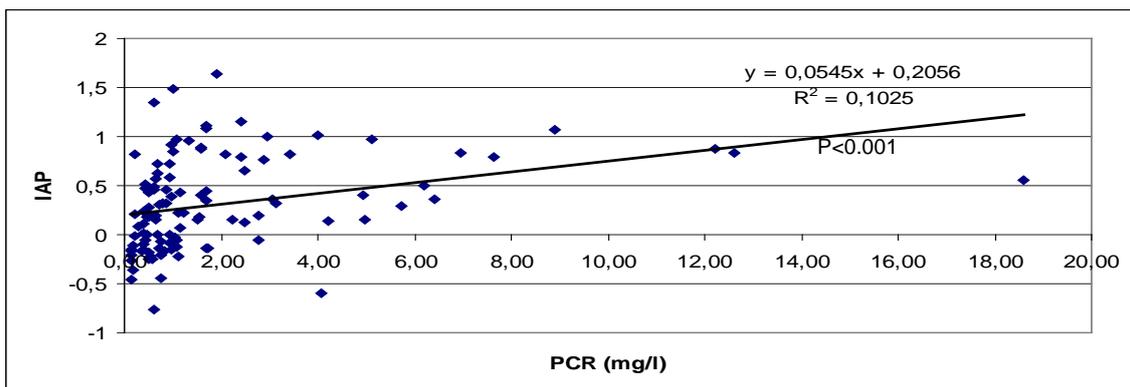
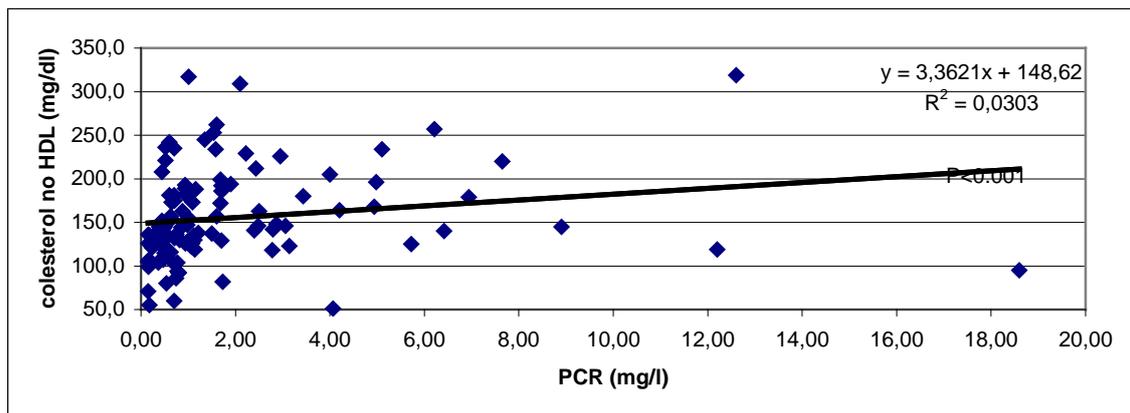
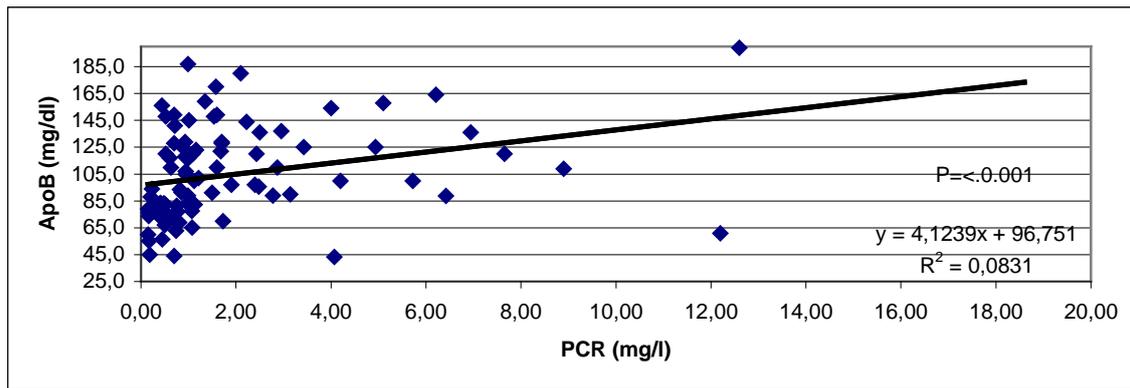


Figura 25. Relación entre PCR y las variables lipídicas

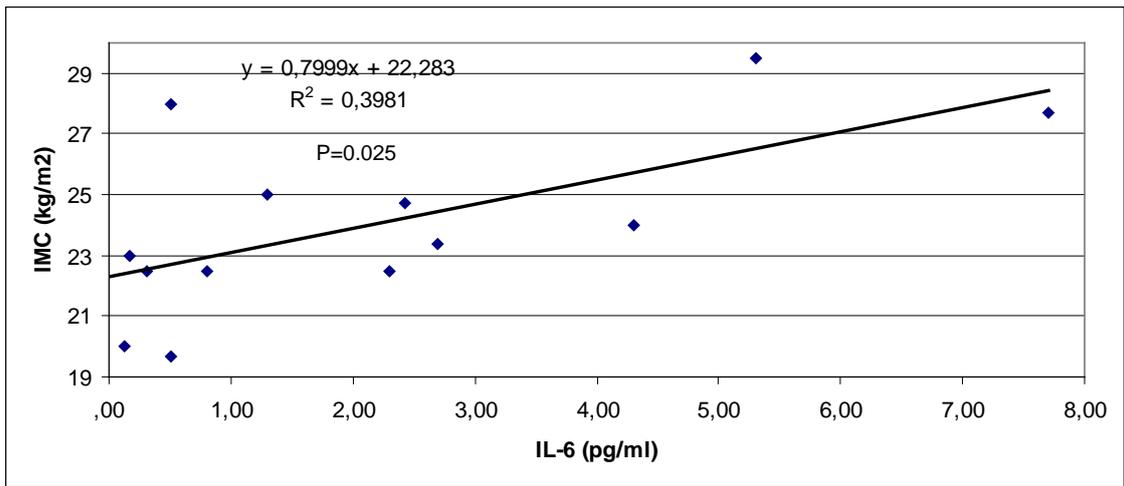


Figura 26. Relación de la IL-6 con la variable antropométrica IMC

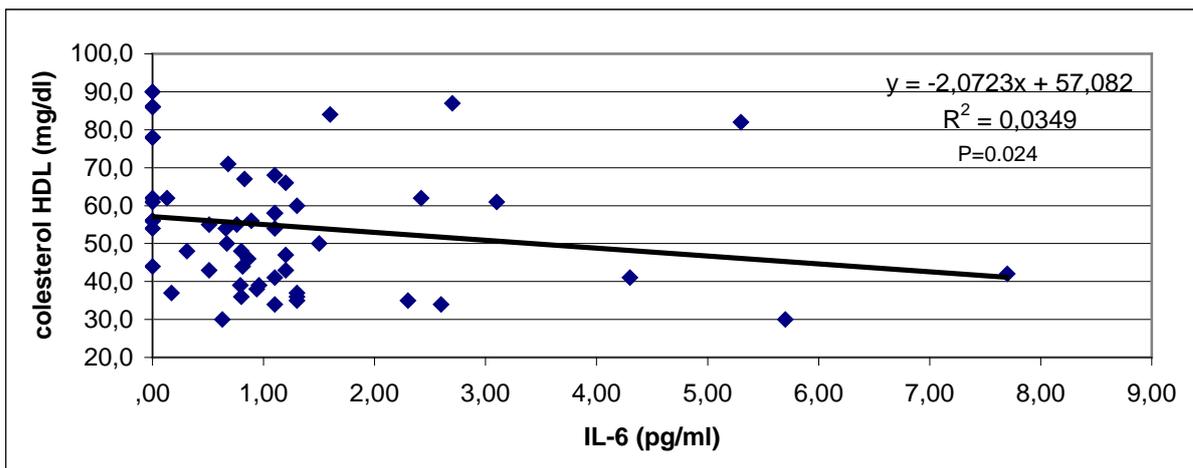
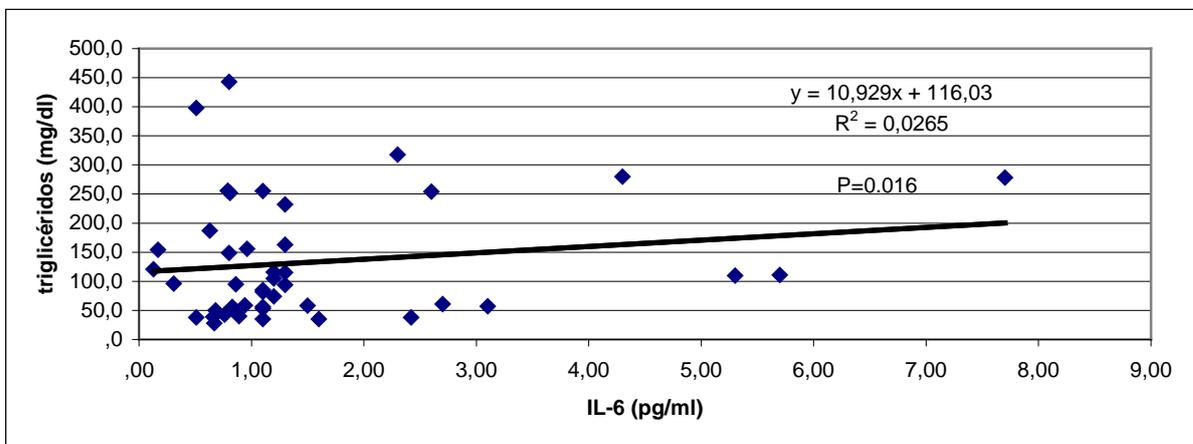
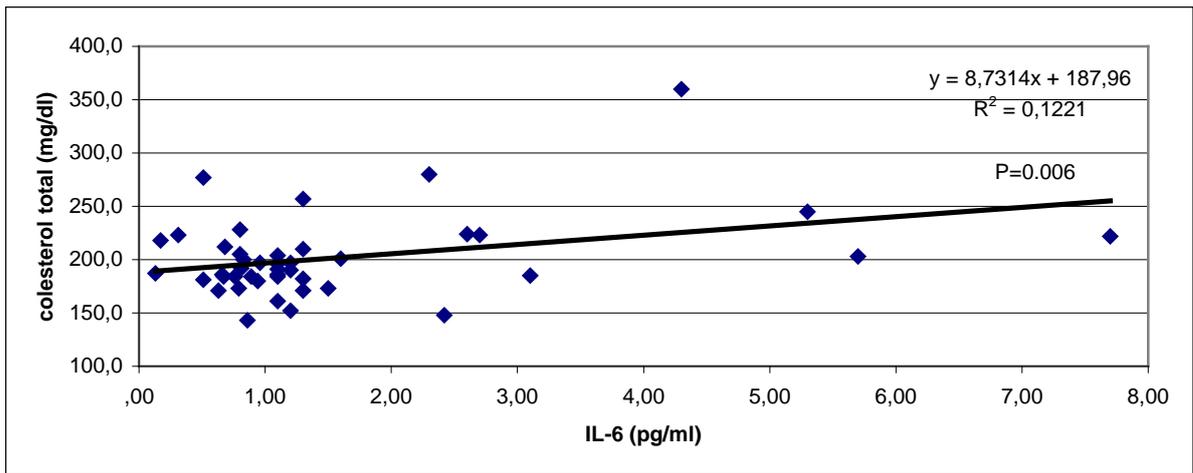


Figura 27. Relación de la IL-6 con las variables lipídicas

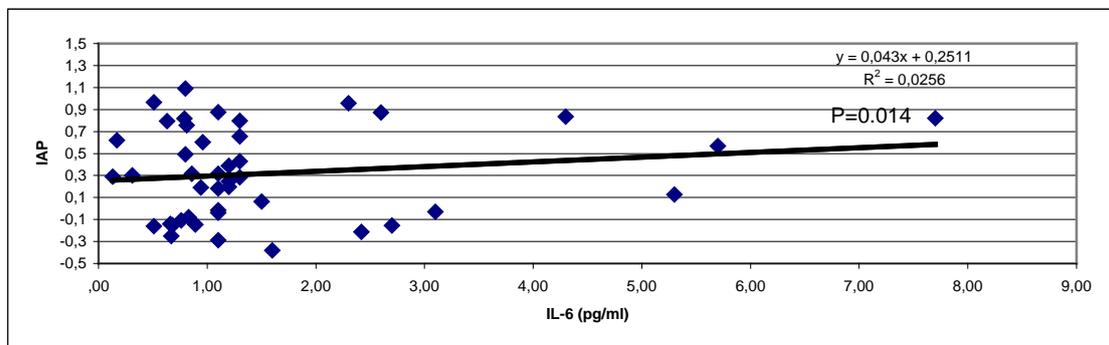
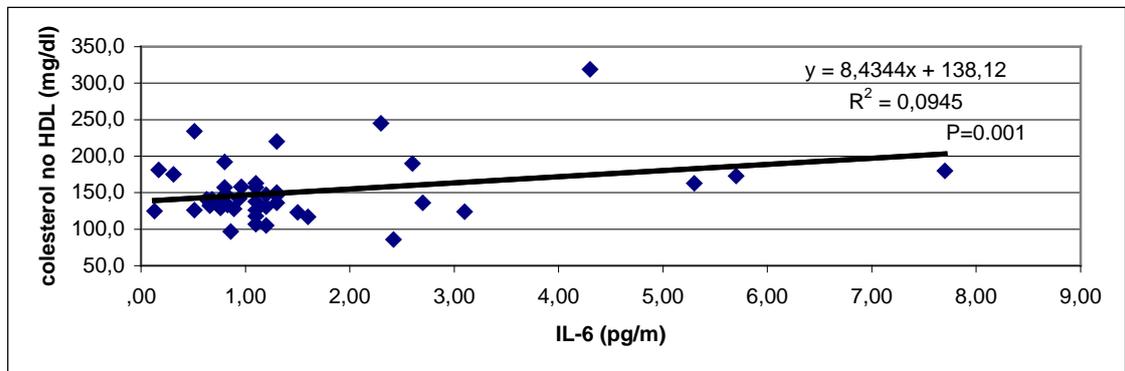
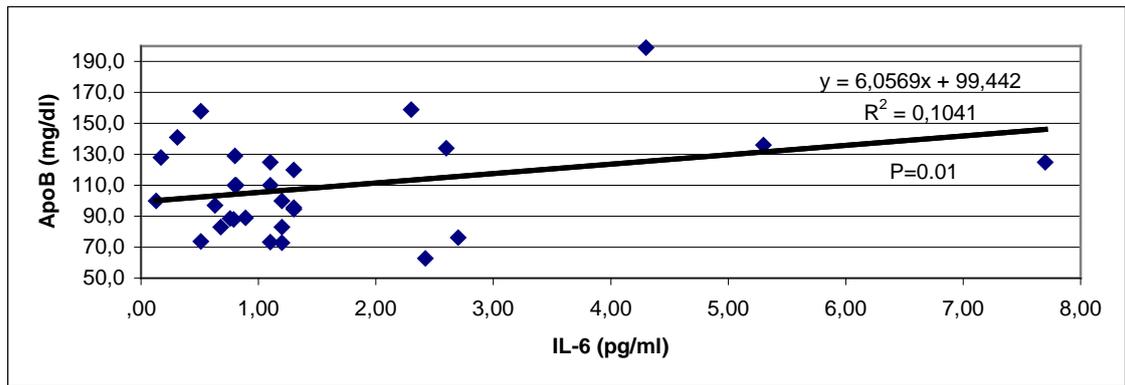
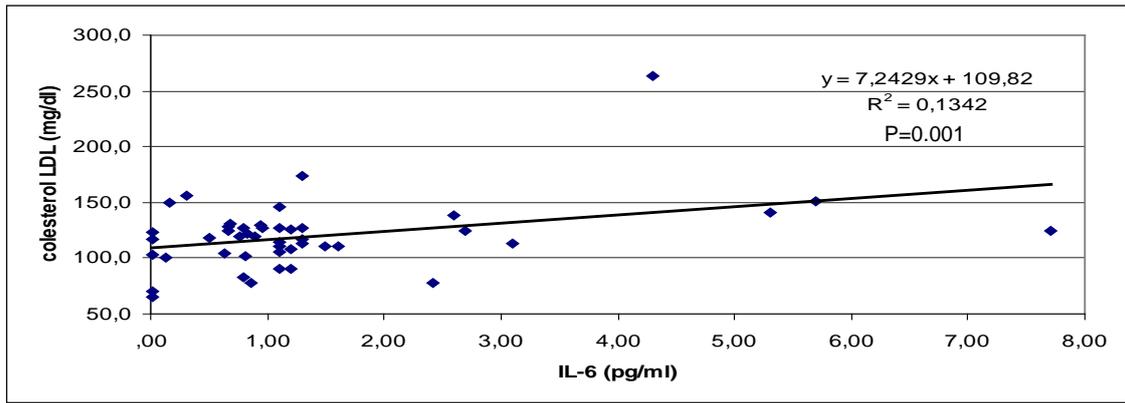


Figura 28. Relación de la IL-6 con las variables lipídicas

## 5.H PARÁMETROS DE RESISTENCIA INSULÍNICA Y FENOTIPO DE LAS LDL

Se distribuyeron los porcentajes del fenotipo de las LDL pequeñas y densas en terciles de parámetros de resistencia insulínica (HOMA e insulina), representadas en las figuras 29 y 30.

El predominio del fenotipo B aumenta cuanto mayor es la presencia de resistencia insulínica.

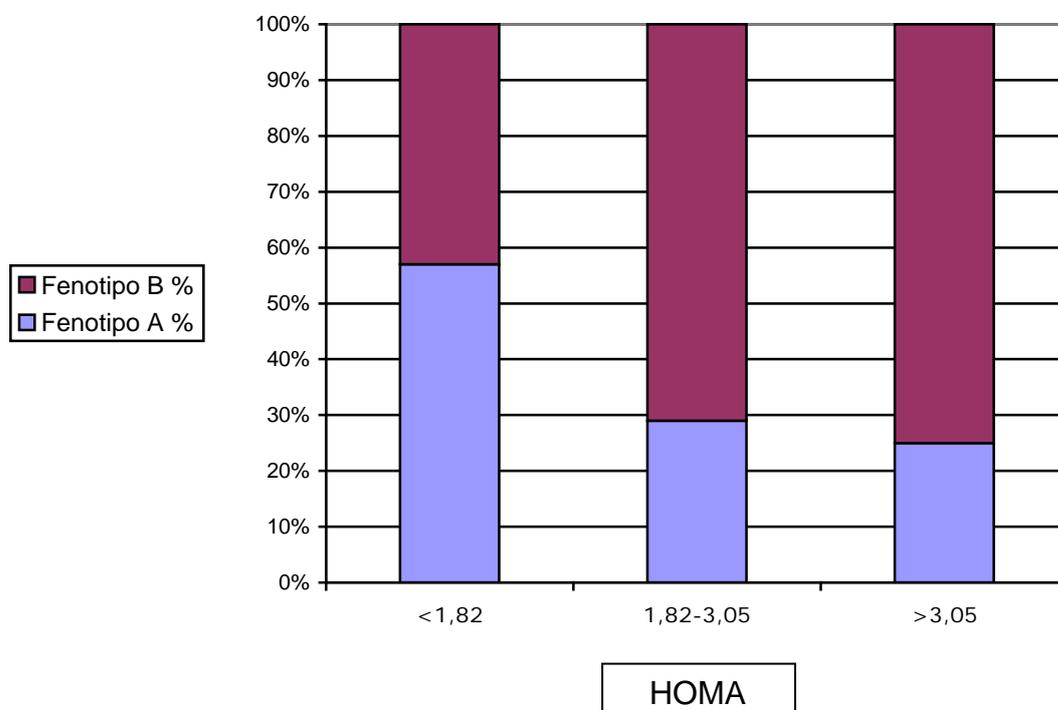


Figura 29. Terciles del porcentaje del fenotipo A y B por terciles de HOMA.

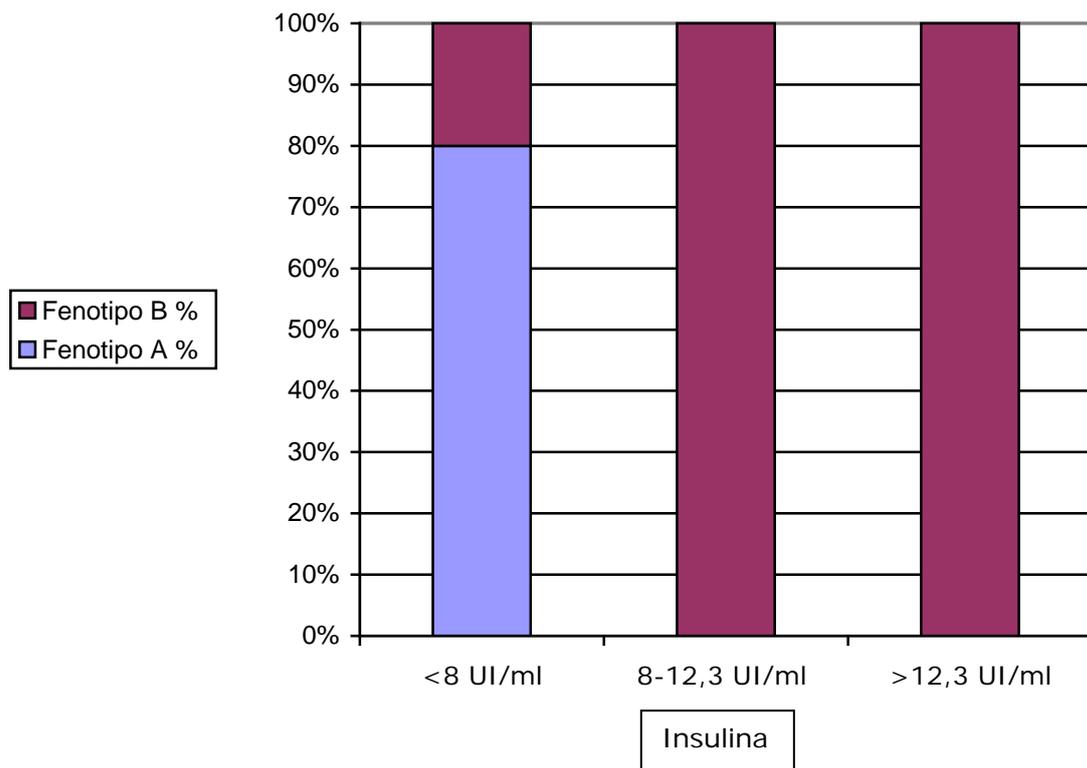


Figura 30. Terciles del porcentaje del fenotipo A y B por terciles de insulina.

## 5.1 PARÁMETROS INFLAMATORIOS Y FENOTIPO DE LAS LDL

Se distribuyeron los porcentajes del fenotipo de las LDL pequeñas y densas en terciles de parámetros de inflamatorios (PCR-u e IL- 6).

Encontramos un comportamiento similar, hay una mayor presencia de fenotipo B a medida que aumenta la inflamación. Podemos observarlo en las figuras 31 y 32.

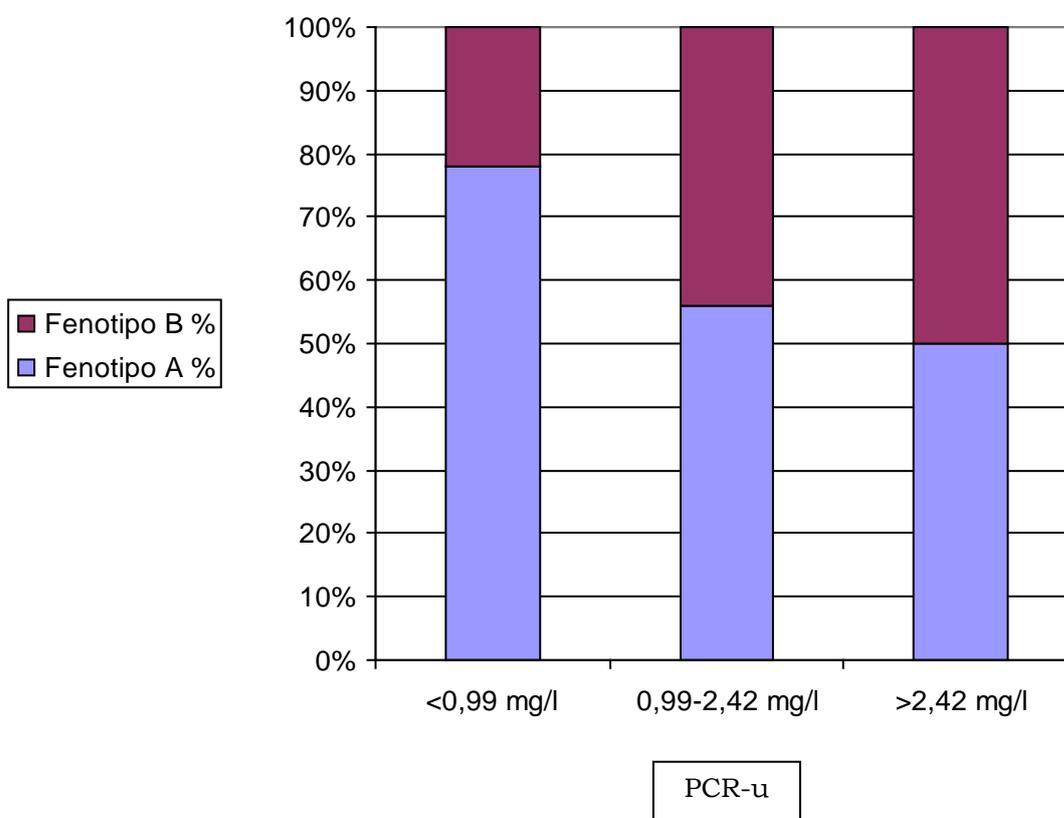


Figura 31. Terciles del porcentaje del fenotipo A y B por terciles de PCR-u

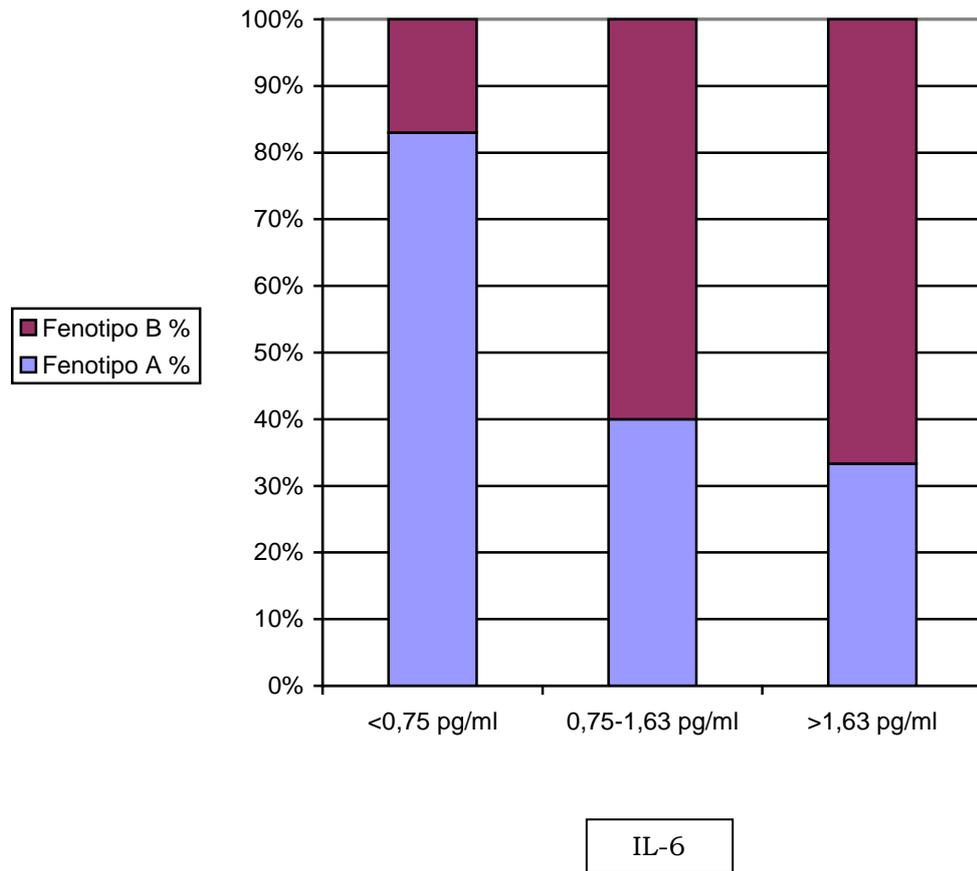


Figura 32. Terciles del porcentaje del fenotipo A y B por terciles de IL-6

## **DISCUSIÓN**

## **6.-DISCUSIÓN**

En este trabajo hemos hecho un estudio del metabolismo hidrocarbonado, del metabolismo lipídico y de la presencia de inflamación y obesidad abdominal en la Hiperlipemia Familiar Combinada, que es la hiperlipemia genética con mayor riesgo de desarrollo arterioesclerótico precoz.

El comienzo de la lesión ateromatosa se produce casi siempre al inicio de la vida en los primeros años y sucede de forma muy lenta y sin clínica asociada, es por tanto muy importante diagnosticar lo antes posible esta enfermedad para evitar la aparición del episodio cardiovascular.

Para este diagnóstico se utilizan los criterios de Bredie y Cols que atienden a variables lipídicas (hipertrigliceridemia, hiperapobetalipoproteinemia, hipercolesterolemia, presencia de LDL pequeñas y densas) y factores familiares (herencia autosómica dominante, presencia de arteriosclerosis prematura). El conocimiento de los síndromes asociados a esta enfermedad como son la obesidad, el síndrome metabólico, la presencia de resistencia a la insulina, o diabetes mellitus tipo 2 han hecho que se hayan estudiado en los últimos años procesos como la inflamación que al estar presentes en todos ellos podrían ser la base fisiopatológica de esta enfermedad<sup>112</sup>. En múltiples estudios en obesos, diabéticos, estados de insulinoresistencia incluso en población aparentemente sana, aparecen aumentados distintos parámetros inflamatorios actuando además como factores de predicción de eventos cardiovasculares futuros<sup>113, 114, 61, 112</sup>

La arteriosclerosis responsable de los episodios cardiovasculares en estos enfermos es en si misma una lesión inflamatoria, desde la aparición de la lesión arteriosclerótica y durante todo el proceso de desarrollo de esta, como hemos dicho, desde la estría grasa en la que aparecen células inflamatorias como monocitos/macrófagos y durante todo el desarrollo de la misma las moléculas inflamatorias como la PCR, citoquinas inflamatorias, moléculas de adhesión y selectinas son parte activa del proceso participando en él y perpetuándolo.

Así pues en nuestro trabajo hemos estudiado el metabolismo hidrocarbonado y resistencia insulínica, metabolismo lipídico y LDL pequeñas y densas, junto con la presencia de obesidad y de inflamación (mediante los parámetros PCR-u, citoquinas inflamatorias (IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ), moléculas de adhesión (VCAM, ICAM) y selectinas (p-selectina, e-selectina), en la HFC ya que es una enfermedad con gran riesgo de desarrollar arteriosclerosis y que esta es una lesión inflamatoria; Además hemos comparado los parámetros citados con una población sana.

### **1.-VARIABLES ANTROPOMÉTRICAS**

Hemos seleccionado pacientes de ambos sexos ya que la enfermedad se desarrolla en ambos. Tenemos un 60% de mujeres y un 30% de hombres con edades media de 41 años. Según la literatura la HFC se manifiesta en la edad media de la vida, lo cual coincide con la edad media de nuestros pacientes.

El índice de masa corporal tiene una media de 26,9, presentando sobrepeso un alto porcentaje de los pacientes (49%). Estos datos expresan una alteración en el metabolismo de las grasas en nuestros pacientes de HFC. En concordancia con la literatura.

El tejido adiposo es un tejido metabólico que secreta citoquinas como IL-6, TNF- $\alpha$ , leptina, etc. Se sugiere que la obesidad es una enfermedad inflamatoria en la que dichas citoquinas (denominadas adipoquinas) serían responsables de promover un estado inflamatorio que participa del desarrollo de la arteriosclerosis. El tejido adiposo presenta una infiltración de macrófagos en sus primeras etapas, junto con las adipoquinas ya mencionadas, al avanzar la obesidad aumenta el tamaño de los adipocitos y la liberación de ácidos grasos libres a la circulación, característica fundamental en la etiopatogenia de la enfermedad. Los macrófagos maduros secretan citoquinas inflamatorias que aumentan la permeabilidad vascular al actuar sobre el endotelio, con infiltración de monocitos macrófagos y secreción de moléculas de adhesión que perpetúan el proceso inflamatorio de bajo grado de estos pacientes.

Un hallazgo interesante en nuestros pacientes HFC es el alto porcentaje de mujeres que presentan una cintura  $\geq 88\text{cm}$ , criterio diagnóstico para el síndrome metabólico (según NCEP-ATPIII<sup>4</sup>) característico de esta patología.

El 28% de los pacientes de nuestro estudio presentan hipertensión arterial, que junto con la presencia de resistencia insulínica, sobrepeso y obesidad forman parte de los factores de riesgo que conforman el síndrome metabólico. Como apuntan los criterios establecidos por la OMS, European Group of Study of the Resistance to the Insulin (EGIR<sup>115</sup>) y NCEP-ATPIII<sup>4</sup>

## **2.-PARÁMETROS HIDROCARBONADOS**

Nuestros pacientes HFC tienen aumentados los niveles de parámetros hidrocarbonados (glucosa, insulina y HOMA), respecto del grupo control. Presentan por tanto una tolerancia hidrocarbonada alterada así como resistencia insulínica, son hallazgos que están en concordancia con muchos estudios<sup>116, 117, 118</sup>.

Además hemos encontrado una relación significativa entre los parámetros hidrocarbonados y los lipídicos de nuestros pacientes, a través de la glucosa, insulina y HOMA (expresión de la resistencia insulínica) y los triglicéridos, colesterol HDL, colesterol no HDL, diámetro de las LDL (expresión de la alteración del metabolismo lipídico y aterosclerótico), IAP, cintura e IMC (expresión de la obesidad y del síndrome metabólico característico de la HFC).

El estado de resistencia a la insulina está relacionado con el fenotipo de la HFC<sup>119</sup>. Presentan mayor grado de RI los hipertriglicéridémicos y mixtos frente a los hipercolesterolémicos, lo cual se entiende dentro del contexto de HFC ya que es más característico de la HFC la hipertriglicéridemia que la hipercolesterolemia. Y si hay cambios en la expresión fenotípica con el tiempo estos se asocian a cambios en el grado de RI, de hecho los pacientes que varían de ser hipercolesterolémicos a ser hipertriglicéridémicos o mixtos su grado de insulinoresistencia y su IMC varía en gran medida. Por tanto, los niveles de lípidos, así como los de LDL pequeñas y densas están modulados

por la presencia de resistencia a la insulina y por la obesidad<sup>46, 66</sup> y estos a su vez por la inflamación.

En algunos estudios como el de Pihlajamäk (2000) se asocia la presencia de RI a la hipertrigliceridemia ya que sólo los pacientes hipertrigliceridémicos (o con hiperlipemia combinada) presentan esta RI<sup>66</sup>.

Como ya sabemos por distintos estudios la insulina y la inflamación se relacionan entre sí<sup>120</sup> modulándose recíprocamente, la insulina regula los niveles de moléculas inflamatorias como la IL-6, haciendo que la cascada de la inflamación finalice con normalidad. Por tanto un estado de resistencia insulínica favorece la instauración de una inflamación crónica. Cuando disminuye la inflamación crónica mejora a su vez el grado de RI<sup>45</sup>. Las citoquinas inflamatorias y la insulina modulan su acción entre sí a través de cascadas de señalización<sup>93, 94</sup>. Estableciéndose una clara relación entre la RI y la inflamación. Diversos estudios establecen una asociación entre marcadores inflamatorios y la sensibilidad a la insulina como el Estudio IRAS<sup>67</sup>

No queda claro que se produce primero si la RI o la inflamación, hay estudios que indican que la inflamación crónica disminuye la sensibilidad de la insulina en distintos órganos y esto aumenta los niveles de inflamación, reduciéndose la sensibilidad a la insulina a su vez, creándose un círculo vicioso<sup>121</sup>.

La insulina ejerce un efecto antiinflamatorio a nivel molecular; reduce la producción de radicales de oxígeno libres por células mononucleares, suprime la expresión de la NADPH oxidasa, reduce también la unión del NF-κB y disminuye las concentraciones de moléculas de adhesión (ICAM-1), y de proteínas quimiotácticas de monocitos (MCP-1)<sup>122, 123</sup>.

En el estudio también hemos encontrado en nuestros pacientes HFC la presencia de RI junto con un estado inflamatorio, con los parámetros de inflamación aumentados (PCR-u, IL-6, IL-8, TNF-α, ICAM, p-selectina, e-selectina). Pero no relación significativa entre parámetros hidrocarbonados e inflamatorios.

### **3.-PARÁMETROS LIPÍDICOS**

Hemos encontrado aumentados todos los parámetros lipídicos en el grupo HFC, colesterol total, triglicéridos, colesterol LDL, colesterol noHDL, colesterol VLDL, Apo B, IAP. Están disminuidos el colesterol-HDL, la apoA. Hallazgos concordantes con la bibliografía<sup>9-11, 13, 14, 124</sup>. Todos son estadísticamente significativos respecto del grupo control.

En el estudio nuestros pacientes presentan un porcentaje significativamente mayor de patrón B de las LDL frente al grupo control, en el grupo control el porcentaje de patrón A es muy superior al de patrón B; al igual que ocurre en muchos estudios como el de McNeely<sup>46</sup>, Ayyobi<sup>43</sup> o Demacker<sup>125</sup>.

Las LDL pequeñas y densas se están proponiendo como uno de los criterios principales para el diagnóstico de la HFC y como método más utilizado el gel en gradiente<sup>126</sup> ya que es un factor independiente de la presencia de Síndrome Metabólico<sup>127</sup> tan presente en pacientes de HFC y que aumenta tanto en hipertrigliceridémicos como en normotrigliceridémicos<sup>43</sup>

El metabolismo lipídico de los pacientes de HFC lleva estudiándose décadas, Tanto el colesterol total, triglicéridos, colesterol-HDL, colesterol-LDL, colesterol-VLDL y apoproteína A, presentan una gran variabilidad en su concentración en estos pacientes. Los parámetros que menos variabilidad presentan son la ApoB y las LDL pequeñas y densas. McNeely presentó un seguimiento de 20 años de familias con HFC y mostró que un tercio de los familiares cambiaron de fenotipo y un 17% de los pacientes eran normolipémicos tras el seguimiento<sup>46</sup>. Al estudiar 5 años a 32 familias de HFC se vio que la ApoB y las LDL pequeñas y densas diferenciaban entre los pacientes normolipémicos de los familiares no afectados<sup>9</sup>. Ha sido el estudio de Delawi<sup>128</sup> que demostró que el colesterol y triglicéridos de la fracción VLDL es la que confiere la variabilidad en el mismo paciente en el tiempo.

Según los criterios de la "European Society for Clinical Investigation" para el diagnóstico de la HFC es característica la presencia de hipertrigliceridemia (TG > 130 mg/dL) e hiperapobetalipoproteinemia (apoB > 120 mg/dL), y la mayoría de sociedades científicas aceptan la hipertrigliceridemia como factor

independiente y significativo de riesgo cardiovascular<sup>129</sup>. Comenzando a considerar como riesgo los valores superiores a 150 mg/dl<sup>130</sup>. En el Registro Español de Hipertrigliceridemias de la Sociedad Española de Arteriosclerosis (SEA) el grupo mayoritario dentro de las hipertrigliceridemias severas corresponde a pacientes con HFC<sup>131</sup>.

La hipercolesterolemia, aunque puede estar presente, no se considera una condición imprescindible para el diagnóstico.

En la HFC parece que coexiste una alteración de las distintas enzimas<sup>41</sup> que intervienen en el metabolismo de los triglicéridos y AGL y que hace que, junto a una disminución de su captación por el tejido adiposo y músculo esquelético, aumenten los niveles de VLDL y por tanto de TG y ApoB.

La disminución de la actividad de LPL<sup>132</sup> (disminuye la hidrólisis de TG), alteración de la LHS (no está inhibida debido a la falta de acción de la insulina y por tanto hidroliza los TG liberando AGL a la circulación) y de la ASP (disminuye la esterificación de ácidos grasos libres) hacen que haya un aumento en la concentración de los AGL en plasma y un aporte mayor al hígado aumentando la producción de VLDL y apoB.

De esta forma el estado de RI provoca un aumento de TG, apoB, VLDL y aumento de los niveles de LDL pequeñas y densas. Todos estos hallazgos compatibles con una dislipemia aterógena han sido encontrados en nuestro trabajo.

Hemos comparado la distribución de los porcentajes del fenotipo de las LDL pequeñas y densas en terciles de HOMA y de insulina. El aumento del predominio de las LDL pequeñas y densas (fenotipo B) se asocia con concentraciones más elevadas de HOMA y de insulina. Estamos expresando de esta manera cómo la magnitud de la resistencia insulínica va acompañada de la alteración del metabolismo lipídico.

#### **4.-PARÁMETROS INFLAMATORIOS**

También hemos encontrado aumentados significativamente los niveles de los distintos marcadores inflamatorios en el grupo HFC frente al grupo control: PCR-u, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , ICAM, p-selectina, e-selectina. VCAM también con niveles aumentados pero no significativamente.

La PCR es una proteína inflamatoria reactante de fase aguda cuya participación en la inflamación presente en estos pacientes queda demostrada por sus niveles aumentados respecto de controles sanos en nuestro trabajo.

La PCR está aumentada en episodios cardiovasculares agudos como lo demuestran numerosos estudios anteriormente mencionados<sup>72-78, 82-84</sup> y es un predictor de episodios cardiovasculares futuros en enfermos y en aparentemente sanos, con y sin aumento de los niveles de lípidos.

Diferentes citoquinas inflamatorias como IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$  inducen la producción de PCR por el hígado y a su vez la PCR estimula la expresión de ICAM y VCAM por el endotelio, o la MCP-1 para la producción de monocitos<sup>133</sup>

También están aumentados los niveles de citoquinas inflamatorias, la IL-6 principal estímulo de la producción de PCR y también de la producción de TNF- $\alpha$  y de otras citoquinas.

Están aumentados también los niveles del resto de marcadores inflamatorios que hemos estudiado, IL-8, TNF- $\alpha$ , moléculas de adhesión ICAM, VCAM así como de p-selectina y e-selectina.

En la literatura encontramos estudios como el de Pauciullo et al<sup>134</sup> en el que los niveles de PCR, IL-6, TNF- $\alpha$ , y VCAM en población HFC están aumentados respecto de población control. Y el de Karásek<sup>95</sup> en el que encuentra niveles aumentados de ICAM en hiperlipémicos HFC frente a hiperlipémicos control. La VCAM no presenta diferencias en sus niveles tanto entre hiperlipémicos como en normolipémicos.

Todos estos marcadores nos están expresando la presencia de una inflamación de bajo grado en los pacientes de HFC. La PCR y la IL-6, presentan una relación significativa con los parámetros lipídicos y con el IMC y perímetro de la cintura y por tanto con la obesidad abdominal, expresión clínica que acompaña a la HFC.

Existe un estado inflamatorio crónico en los pacientes de HFC, que podría inducir el desarrollo de arteriosclerosis que tiene lugar en la mayoría de estos pacientes. Los datos bibliográficos apoyan el supuesto de que la inflamación que tiene lugar en esta enfermedad es parte de la base de dicha enfermedad cardiovascular, y su relación con las alteraciones metabólicas que en ella suceden<sup>112</sup>.

Hemos comparado la distribución de los porcentajes del fenotipo de las LDL pequeñas y densas en terciles de PCR e IL-6. El aumento del predominio de las LDL pequeñas y densas (fenotipo B) se asocia con concentraciones más elevadas de IL-6 y PCR. Estamos expresando de esta manera cómo la magnitud de la inflamación va acompañada de la alteración del metabolismo lipídico.

## **CONCLUSIONES**

## 7. CONCLUSIONES

1. Los pacientes con hiperlipemia familiar combinada presentan alteraciones del metabolismo hidrocarbonado, fundamentalmente intolerancia hidrocarbonada y resistencia insulínica.
2. Los pacientes con hiperlipemia familiar combinada tienen alterado el metabolismo lipídico mostrando una dislipemia aterógena caracterizada por un déficit de colesterol HDL, exceso de triglicéridos, aumento de síntesis de Apo B, además de un incremento del patrón B de LDL pequeña y densa.
3. Los pacientes con hiperlipemia familiar combinada presentan asociación entre la resistencia insulínica y la dislipemia valorada a través del HOMA con los triglicéridos, colesterol HDL, diámetro de las LDL, IAP. Así mismo, la resistencia insulínica se relaciona con la obesidad abdominal expresada esta con el perímetro de la cintura.
4. Los pacientes con hiperlipemia familiar combinada presentan un estado inflamatorio de bajo grado con incremento de: PCR ultrasensible, IL-6, IL-8, moléculas de adhesión VCAM, ICAM, y selectinas p-selectina y e-selectina.
5. El grado de inflamación se relaciona con la resistencia insulínica comprobada a través de la correlación significativa entre PCR y el HOMA.
6. El grado de inflamación se relaciona con la dislipemia, a través de la correlación positiva entre las variables inflamatorias (PCR e IL-6) y las variables constitutivas de la dislipemia aterogénica. Igualmente existe una estrecha relación significativa entre la inflamación y el grado de obesidad (IMC y perímetro abdominal).

En resumen, hemos demostrado en nuestros pacientes con hiperlipemia familiar combinada la presencia de resistencia a la insulina asociada a obesidad abdominal, a dislipemia aterogénica y a inflamación de bajo grado, lo que constituye un claro exponente del riesgo cardiovascular que presentan estos pacientes.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---

## 8. BIBLIOGRAFÍA

---

1 Fielding C, Fielding P. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. *J Lipid Res.* 1995;36:211-28.

2 Allender S, Scarborough P, Peto V, Rayner M, Leal J, Luengo-Fernández R, et al. *European cardiovascular disease statistics 2008.* Brussels: European Heart Network; 2008.

3 Rader DJ, Hobbs HH. *Principles of Internal Medicine.* 18th ed. Nueva York: Mc Graw Hill Interamericana. 2012. pp 3145-61.

4 Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolix syndrome among US adults: findings from the third national Health and nutrition examination survey. *JAMA.* 2002;287:356-9.

5 Meseguer C, Galan I, Herruzo R, Rodríguez-Artalejo F. Trends in leisure time and occupational activity in the Madrid region 1995-2008. *Rev Esp Cardiol.* 2011;64:21-7.

6 Reiner Z, Catapano AL, De Bacher G, Graham I, Taskinene M-R, Wiklund O, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *European Heart Journal.* 2011;32:1769-818

7 Cunningham KS, Gottlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest.* 2005;85:9-23

8 Brooks AR, Lelkes PI, Rubanyi GM. Gene expression profiling of vascular endothelial cells exposed to fluid mechanical forces: Relevance for focal susceptibility to Atherosclerosis. *Endothelium.* 2004;11:45-57

---

9 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; 52:1533-43.

10 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; 52:1544-68.

11 Hazzard WR, Goldstein JL, Schrott HG, Motulsky AG, Bierman EL. Hyperlipidemia in coronary heart disease III. Evaluation of lipoprotein phenotypes of 156 genetically defined survivors of myocardial infarction. *J Clin Invest.* 1973; 52:1569-77.

12 Porkka KV, Nuotio I, Pajukanta P, Ehnholm C, Suurinkeroinen L, Syvanne M, et al. Phenotype expression in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis.* 1997; 133: 245-53.

13 Rose HG, Kranz P, Weinstock M, Juliano J, Jaft JI. Inheritance of combined hyperlipoproteinemia: evidence for a new lipoprotein phenotype. *Am J Med.* 1973;54:148-60.

14 Nikkila EA, Aro A. Family study of serum lipids and lipoproteins in coronary heart disease. *Lancet.* 1973;1:954-8.

15 Gaddi A, Cicero AF, Odofo FO, Poli AA, Paoletti R. Practical guidelines for familial combined hyperlipidemia diagnosis: An up-date; *Atherosclerosis and Metabolic Diseases Study Group.* *Vasc Health Risk Manag.* 2007; 3: 877 – 86

16 Esteban Salán M, Aguilar Doreste JA, Palacios Sarrasqueta M. Recomendaciones para el diagnóstico de la hiperlipemia familiar combinada. *Química Clínica.* 2007;26 (5) 252-5

---

17 Skoumas I, Masoura C, Pitsavos C, Tousoulis D, Papadimitriou L, Aznaouridis K, et al. Evidence that non-lipid cardiovascular risk factors are associated with high prevalence of coronary artery disease in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia or familial combined hyperlipidemia. *Int J Cardiol.* 2007; 121: 178 – 83.

18 Hopkins PN, Heiss G, Ellison RC, Province MA, Pankow JS, Eckfeldt JH. Hypertriglyceridemia: A case-control comparison from the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Circulation.* 2003; 108:519 – 23.

19 Wiesbauer F, Blessberger H, Azar D, Province MA, Pankow JS, Eckfeldt JH, et al. Familial-combined hyperlipidaemia in very young myocardial infarction survivors (< or =40 years of age). *Eur Heart J.* 2009; 30: 1073 – 79.

20 Skoumas J, Papadimitriou L, Pitsavos C, Masoura C, Giotsas N, Chrysohoou C, et al. Metabolic syndrome prevalence and characteristics in Greek adults with familial combined hyperlipidemia. *Metabolism.* 2007; 56: 135 – 41

21 Franz Wiesbauer, Hermann Blessberger, Danyel Azar, Georg Goliassch, Oswald Wagner, Lukas Gerhold. Familial-combined hyperlipidaemia in very young myocardial infarction survivors (40 years of age). *European Heart Journal.* 2009; 30: 1073–79.

22 López Ruiz et al. Genes implicados en La Hiperlipemia familiar combinada. *Clin Invest Arterioscl.* 2006;18(2):63-7

23 Pajukanta P, Terwilliger JD, Perola M, Hiekkalinna T, Nuotio I, Ellonen P. Genomewide scan for familial combined hyperlipidemia genes in Finnish families, suggesting multiple susceptibility loci influencing triglyceride, cholesterol, and apolipoprotein B levels. *Am J Hum Genet.* 1999; 64:1453-63

---

24 Pajukanta P, Nuotio I, Terwilliger JD, Porkka KV, Ylitalo K, Pihlajamaki J et al.. Linkage of familial combined hyperlipidaemia to chromosome 1q21-q23. *Nat Genet.* 1998;18:369-73.

25 Pei W, Baron H, Muller-Myhsok B, Knoblauch H, Al-Yahyaee SA, Hui R et al. Support for linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q21-q23 in Chinese and German families. *Clin Genet.* 2000;57:29-34.

26 Huertas A, Aguilar C, Lusic AJ, Cantor RM, Canizales S, Lee JC, et al. Familial combined Hyperlipidemia in Mexicans: association with upstream transcription factor 1 and linkage on chromosome 16q24.1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;5:1985-91.

27 Pajukanta P, Lilja HE, Sinsheimer JS, Cantor RM, Lusic AJ, Gentile M, et.al. Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1). *Nat Genet.* 2004; 36: 371-76

28 Naoumova RP, Bonney SA, Eichenbaum-Voline S, Patel HN, Jones B, Jones EL, et. al. Confirmed locus on chromosome 11p and candidate loci on 6q and 8p for the triglyceride and cholesterol traits of combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 2070-77

29 Huertas-Vázquez A, Aguilar-Salinas C, Lusic AJ, Cantor RM, Canizales-Quinteros S, Lee JC, Mariana-Nunez L, et.al. Familial Combined Hyperlipidemia in Mexicans Association with Upstream Transcription Factor 1 and Linkage on Chromosome 16q24.1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25:1985-91

30 Campagna AM, Baroni M, Maria A, Ricci G, Antonini R, Verna R, et al. Common variants in the lipoprotein lipase gene, but not those in the insulin receptor substrate[ndash ]1, the [beta]-adrenergic receptor, and the intestinal fatty acid binding protein-2 genes, influence the lipid phenotypic expression in familial combined hyperlipidemia. *Metabolism.* 2002; 51: 1298-1305

---

31 López Ruiz A, Jarabo Bueno MM, Martínez Triguero ML, Morales Suárez Varela M, Solá E, Bañuls C, et al. Small and dense LDL in familial combined hyperlipidemia and N291S polymorphism of the lipoprotein lipase gene. *Lipids Health Dis.* 2009; 31(8):12

32 Allayee H, Dominguez KM, Aouizerat BE, Krauss RM, Rotter JI, Lu J, et al. Contribution of the hepatic lipase gene to the atherogenic lipoprotein phenotype in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res.* 2000; 41: 245-52

33 Takata M, Inazu A, Katsuda S, Miwa K, Kawashiri MA, Nohara A, et al. CETP (cholesteryl ester transfer protein) promoter -1337 C>T polymorphism protects against coronary atherosclerosis in Japanese patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Clin Sci.* 2006;111:325-31.

34 Coon H, Myers RH, Borecki IB, Arnett DK, Hunt SC, Province MA et al. Replication of linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q with additional heterogeneous effect of apolipoprotein A-I/C-III/A-IV locus. The NHLBI Family Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:2275-80.

35 Naukkarinen J, Ehnholm C, Peltonen L. Genetics of familial combined hyperlipidemia. *Curr Opin Lipidol.* 2006;17:285-90.

36 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;43:930-5

37 Bredie SJH, Demacker PN, Stalenhoef AFH. Metabolic and genetic aspects of familial combined hyperlipidemia with emphasis on low-density lipoprotein heterogeneity. *Eur J Clin Invest.* 1997; 27:802-11

---

38 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;22:274-82.

39 Grundy SM. Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia and the metabolic syndrome. *Am J of Cardiol.* 1998; 81: 18-25

40 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;17:834-40.

41 de Graaf J, Veerkamp MJ, Stalenhoef AFH, Metabolic pathogenesis of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on insulin resistance, adipose tissue and fatty free acids. *J R Soc Med.* 2002;22:272-82

42 Aitman TJ, Goldsland 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;17:748-54.

43 Ayyobi AF, Mc Gladdery 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. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:1289-94.

44 Brunzell JD, Hazzard WR, Motulsky AG, Bierman EL. Evidence for diabetes mellitus and genetic forms of hypertriglyceridemia as independent entities. *Metabolism.* 1975;24:1115-21

---

45 Fredrickson DS, Levy RI, Lees RS. Fat transport in lipoprotein. An integrated approach to mechanisms and disorders. *N Engl J Med.* 1967;276:32-44;94-103,148-56.

46 McNeely MJ, Edwards KL, Marco vina SM, Brunzell JD, Mottulsky AG, Austin MA. Lipoprotein and apolipoprotein abnormalities in familial combined hyperlipidemia: a 20-years prospective study. *Atherosclerosis.* 2001;159:471-81

47 Halkes CJM, Van Dijk H, Verseyden C, De Jaegere PPT, Plokker HWM,, Meijssen et. al. Gender differences in postprandial ketone bodies in normolipidemic subjects and in untreated patients with familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1875-80.

48 Ayyobi AF, Brunzell JD. Lipoprotein distribution in the metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and familial combined hyperlipidemia. *Am J Cardiol.* 2003;92:27-33.

49 Castro Cabezas M, De Bruin TWA, Jansen H, Kock LAW, Kortlant W, Erkelens DW,. Impaired chylomicron remnant clearance in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:804-14

50 Verseyden C, Meijssen S, Castro Cabezas M, Postprandial changes of apoB100 and apoB48 in familial combined hyperlipidemia. *J Lipid Res.* 2002; 43:274-80

51 Sung Woo Kwon, Se-Jung Yoon, Tae Soo Kang, Hyuck Moon Kwon, Jeong-Ho Kim, Jihyuk Rhee, et al. Significance of small dense low-density lipoprotein as a risk factor for coronary artery disease and acute coronary syndrome. *Yonsei Medical Journal.* 2006; 47:405-414.

52 Skalen K, Gustafsson M, Rydberg E. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature.* 2002; 417: 750-4.

---

53 Kzhyshkowska J, Neyen C, Gordon S. Role of macrophage scavenger receptors in atherosclerosis. *Immunobiology*. 2012; 217(5):492-502

54 El Harchaoui K, van der Steeg WA, Stroes ES, Kuivenhoven JA, Otvos JD, Wareham NJ, et al. Value of low-density lipoprotein particle number and size as predictors of coronary artery disease in apparently healthy men and women. The EPIC-Norfolk prospective population study. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:547–553

55 Taskinen MR. Diabetic dyslipidemia. *Atheroscler*. 2002;3:47-51

56 Austin MA, King MC, Vranizan KM, Krauss RM, Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation*. 1990;82:495-506

57 Mamo JCL, Elsegood C, Gennat HC, Yu KCW, Degradation of chylomicron-remnants by macrophages occurs via phagocytosis. *Biochemistry*. 1996;35:10210-214.

58 Steinberg D, Parthesarathy S, Carew TE, KhooJC, Witztumm JL, Beyond cholesterol: modification of low density lipoprotein that's increase its therogenicity. *N Engl J Med*. 1989;320:915-24

59 Randle P, Hales C, Garland P, Newsholme E. The glucose fatty acids cycle and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*. 1963; 785-789

60 Aljada, A.et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibits insulin-induced increase in endothelial nitric oxide synthasa and reduces insulina receptor content and phosphorylation in human aortic endothelial cells. *Metabolism*. 2002;51:487-91

61 Senn, J.J. et al. Interleukin-6 induce cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes*. 2002;51:3391-99

---

62 Senn, J.J. et al. Suppressor of cytokines signaling-3 (SOCS), a potential mediator of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:13740-46

63 Solinas G, Karin M. JNK1 and IKK $\beta$ : molecular link between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J.* 2010; 24:2596-2611.

64 Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanism in obesity. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29:415-45.

65 M. J. Veerkamp, J. de Graaf, A.F.H. Stalenhoef. Role of insulin resistance in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1026-1031

66 Jussi Pihlajamäki, Leena Karjalainen, pauli Karhapää, ilkka vauhkonen, Markku Laakso. 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.

67 Festa A, D'Agostino R Jr, Howard G, Mykkänen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation.* 2000;102(1):42-7.

68 Veilleux A1, Grenier E, Marceau P, Carpentier AC, Richard D, Levy E. Intestinal lipid handling: evidence and implication of insulin signaling abnormalities in human obese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(3):644-53.

69 Cunningham KS, Gotlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest.* 2005;85:9-23

---

70 Brooks AR, Lelkes PI, Rubanyi GM. Gene expression profiling of vascular endothelial cells exposed to fluid mechanical forces: Relevance for focal susceptibility to atherosclerosis. *Endothelium –J Endothelial Cell Res.* 2004;11:45-57

71 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

72 Yeh ET. CRP as a mediator of disease. *Circulation.* 2004;109:11-14.

73 Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuffi 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: 417-24.

74 Ferreiro ER, Boissonet CP, Pizarro R, Merletti PK, Corrado G, Cagide A, Bazzino OO, Independent prognostic value of elevated C-reactive protein in unstable angina. *Circulation .* 1999;100: 1958-63.

75 Morrow DA, Antman EM, Weiner DL, McCabe CH, Cannon CP, Braunwald E. C-reactive protein is a potent predictor of mortality independently and in combination with troponin T in acute coronary syndrome: a TIMI 11A substudy. *J Am Coll Cardiol .* 1998; 31: 1460-5.

76 De Winter RJ, Bholasingh R, Lijmer RG, Koster RW, Gorgels JP, Schouten Y et al. Independent prognostic value C-reactive protein and troponin I in patient with unstable angina or non Q-wave myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 1999;42: 240-5.

77 Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina.

---

European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectories Study Group. Lancet . 1997; 349: 462-6

78 Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks FM, Moye LA, Goldman S et al. Inflammation, pravastatin and the risk of coronary events after myocardial infarction in patient with average cholesterol levels. Cholesterol And Recurrents Events (CARE) Investigators. Circulation. 1998; 98: 839-44.

79 Kannel WB. Range of serum cholesterol values in the population developing coronary artery disease. Am J Cardiol. 1995; 76: 69C-77C.

80 Kuller RH, Tracey RP, Shaten J, Meishahn EN, Relation of C-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study. Multiple Risk Factor Intervention Trial. Am J Epidemiol . 1996; 144: 537-47.

81 Koenig W, Sund M, Frohlich M, Fischer HG, Lowel H, Doring A, et al. C-reactive protein, a sensitive marker of inflammation predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-age men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. Circulation. 1999;99:237-42.

82 Tracy RP, Lemaitre RN, Psaty BM, Ives DG, Evens RW, Cushman M, et al. Relationship of C-reactive protein to risk of cardiovascular disease in elderly. Result from the Cardiovascular Health Study and the Rural Health Promotion Project. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997;17:1121-7.

83 Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and others markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. N Engl J Med. 2000;342:836-43

---

84 Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med.* 1997;336:973-9.

85 Biasucci LM, Liuzzo G, Grillo RL, et al. Elevated levels of C-reactive protein at discharge predict recurrent instability in patients with unstable angina. *Circulation.* 1999;99:855-60.

86 Rodríguez G y cols. Role of inflammation in atherogenesis. *Invest Clin.* 2009; 50: 109 - 129

87 Mizia-Stec K: Cytokines and adhesive molecules in detection of endothelial dysfunction. *Pharmacol Rep.* 2006;58:21-32.

88 Van de Stolpe A, van der Saag PT: Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med.* 1996;74:13-33.

89 Tsakadze NL, Sen U, Zhao Z, Situ SD, English WR, D'Souza SE: Signals mediating cleavage of intercellular adhesion molecule-1. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;87: 55-63.

90 Springer TA: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leucocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell,* 1994, 76, 301-314.

91 M.S. Kluger, Vascular endothelial cell adhesion and signaling during leukocyte recruitment. *Advances in Dermatology.* 2004;20:163-201.

92 J. D. van Buul, C. Boermans V. van den Berg, et al., Migration of human hematopoietic progenitor cell across bone marrow endothelium is regulated by vascular endothelial cadherin. *Journal of Immunology.* 2002; 168: 588-96.

---

93 Jaap D. van Buul, Jos van Rijssel, Floris P. J. van Alphen, Anna-Marieke van Stalborch, Erik P. J. Mul, and Peter L. Hordijk . ICAM-1 Clustering on Endothelial Cells Recruits VCAM-1. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010

94 Glowinska B, Urban M, Pecynska J, Florys B. Soluble adhesion molecules (sICAM-1, sVCAM-1) and selectins (sE selectin, sP selectin, sL selectin) levels in children and adolescents with obesity, hypertension, and diabetes. *Metabolism*. 2005;54:1020-6.

95 Karasek D, Vaverkova H, Halenka M. Soluble cell adhesion molecules S-CAM and S-ICAM in subjects with familial combined hyperlipidemias. *Biomed Papers*. 2005; 149(1): 101-108

96 Gearing AJ, Newman W: Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today*. 1993; 14: 506-512

97 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.

98 Standards of Medical Care in Diabetes-2014. *Diabetes Care*. 2014; 37:81-90.

99 Jensen MD, Ryan DH, Apovian CM, Loria CM, Ard JD, Millen BE, et al. AHA/ACC/TOS Guideline for the Management of Overweight and Obesity in Adults: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society *J Am Coll Cardiol*. 2013; 63: 3029-30

100 Standards of Medical Care in Diabetes-2013. American Diabetes Association . *Diabetes Care*. 2013; 36.

---

101 Hernández Mijares A, Riera Fortuny C, Solá Izquierdo E, Oliver Oliver MJ, Martínez Triguero ML, et.al. Prevalencia del síndrome metabólico entre pacientes con cardiopatía isquémica. Med Clín. 2003;121: 204-8

102 Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redón J, Zanchetti A, Böhm M, et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). J Hypertens. 2013; 31:1281-357.

103 Kadish, A. H., Little, R. L., Sternberg, J. C., "A New and Rapid Method for the Determination of Glucose by Measurement of Rate Oxygen Consumption", Clin. Chem. 1968;144:116 .

104 Radziuk J. Insulin sensitivity and its measurement: structural commonalities among the methods. J Clin Endocrinol Metab. 2000;85:4426-33

105 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;28:412-9

106 Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clin Chem. 1974;20:470-5.

107 Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. Clin Chem. 1973;19:476-82.

108 Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clin Chem. 1974: 20;470-5.

---

109 Nichols AV, Krauss RM, Musliner TA. Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 1986; 128: 417-433.

110 Hirano T, Ito Y, Yopshino G. Measurement of small dense low-density lipoprotein particles. *J Atheroscl Thromb* 2005; 12: 67-72.

111 Austin MA, Hokanson JE, Brunzell JD. Characterization of low-density lipoprotein subclasses : methodologic approaches and clinical relevance. *Curr Opin Lipidol* 1994; 14: 1687-1694.

112 Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: link between insulina resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 2004; 25:4-7.

113 Hotamisligil G.S, et al. Adipose expresión of tumor necrosis factor- $\alpha$ : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259:87-91.

114 Kern p.A, et al. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity , weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J.Clin.Inves.* 1995; 95:2111-19.

115 Balkau B, Charles MA; Drivsholm T, Borch-Jonhnsen K, Wareham N, Yudkin JS, et. Al. European Group for Study of Insulin Resistance (EGIR). Fruency for the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. *Diabetes Metab.* 2002;28:364-76.

116 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.

117 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.

---

118 Ascaso JF, Real JT, Merchante A, Rodrigo A, Carmena R. Lipoprotein phenotype and insulin resistance in familial combined hyperlipidemia. *Metabolism*. 2000;49:1627-1631.

119 Veerkamp MJ, De Graaf J, Stalenhoef AF. Role of insulin resistance in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1026-1031.

120 Ake Sjöholm, Thomas Nyström. Endothelial inflammation in insulin resistance. *Lancet*. 2005;365:610-12.

121 Fernández-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev*. 2003; 24:278-301.

122 Dandona, P et al. Insulin inhibits intranuclear nuclear factor  $\kappa\beta$  and stimulates I $\kappa\beta$  in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86: 3257-3265.

123 Aljada, A. et al Insulin inhibits the pro-inflammatory transcription factor early growth response gene 1 (Egr-1) expression in mononuclear cells (MNC) and reduces plasma tissue factor (TF) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentration. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87:1419-1422

124 Sniderman AD, Castro CM, Ribalta J, Carmena R, de Bruin TW, de Graaf J, et al. A proposal to redefine familial combined hyperlipidaemia -- third workshop on CHL 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;32:71-3.

125 Demacker PN, Veerkamp MJ, Bredeie SJ, et al. Comparison of the measurement of lipids and lipoproteins versus assay of apolipoprotein B for estimation of coronary heart disease risk: A study in familial combined hyperlipidemia. *Atherosclerosis*. 2000; 153:483-90.

126 Rizzo M, Berneis K. Low density lipoproteína size and cardiovascular risk assessment. *QJM* 2006; 99:1-14.

---

127 Pauciullo P, Gentile M, Marotta G. Small dense low-lipoprotein in familial combined hyperlipidemias: Independent of metabolic syndrome and related to history of cardiovascular events. *Atherosclerosis*. 2009; 203:320-24.

128 Delawi D, Meijssen S, Castro Cabezas M. Intra individual variations of fasting lipids, apolipoproteins and postprandial lipidemia in familial combined hyperlipidemia compared to controls. *Clin Chim Acta*. 2003;328:139-45.

129 Sarwar N, et al. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation*. 2007; 115:450-8.

130 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur Heart J*. 2012; 33:1635-701.

131 Pedragosa A, Merino J, Aranda JL, Galiana J, Godoy D, Panisello JM, Ascaso JF. Perfil clínico de los pacientes con hipertrigliceridemia muy severa del Registro de Hipertrigliceridemias de la Sociedad Española de Arteriosclerosis. *Clin Invest Arterioscler*. 2013;25:8-15.

132 Babirak SP, Brown BG, Brunzell JD. Familial combined hyperlipidemia and abnormal lipoprotein lipase. *Arterioscler Thromb*. 1992;12:1176-1183.

133 Pasceri V, Chang Js, Willerson JT, et al. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation*. 2001; 103:2531-34.

134 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.