

Laura Lacalle Aicua

Efecto de las flebotomías terapéuticas sobre la resistencia periférica a la insulina en pacientes con hiperferritinemia e hipertrigliceridemia

Departamento
Medicina, Psiquiatría y Dermatología

Director/es
Civeira Murillo, Fernando
Mateo Gállego, Rocío

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

“Efecto de las flebotomías terapéuticas sobre la resistencia periférica a la insulina en pacientes con hiperferritinemia e hipertrigliceridemia”

Memoria presentada por D^a Laura Lacalle Aicua
Licenciada en Medicina y Cirugía para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Zaragoza.

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina, Psiquiatría y Dermatología

31/10/2018

A mis padres,

Por hacerlo posible. Por serlo todo.

Gracias.

D. Fernando Civeira Murillo, catedrático del Departamento de Medicina, Psiquiatría y Dermatología de la Universidad de Zaragoza, y Dña. Rocío Mateo Gallego, doctora en Medicina y Profesora Ayudante Doctor en el Departamento de Fisiatría y Enfermería de la Universidad de Zaragoza.

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado **“Efecto de las flebotomías terapéuticas sobre la resistencia periférica a la insulina en pacientes con hiperferritinemia e hipertrigliceridemia”** realizado por D^a. Laura Lacalle Aicua bajo nuestra dirección reúne datos originales, no publicados, y de elevado interés científico. Bajo nuestro criterio, el trabajo reúne los requisitos necesarios para optar al título de doctor por la Universidad de Zaragoza por lo que se autoriza a ser presentado para su defensa.

En Zaragoza, a 31 de Octubre del 2018

Fdo: Dr. Fernando Civeira Murillo

Fdo: Dra. Rocío Mateo Gallego

A mis directores de tesis, gracias.

A Fernando, gracias por haber confiado desde el primer momento en mí, por haberme brindado la oportunidad de formar parte de tu equipo y desarrollar este apasionante proyecto. Rocío, has sido un pilar fundamental en el desarrollo de la investigación, gracias por haber compartido tu conocimiento, sin tu ayuda y dedicación no hubiera sido posible. Ha sido un privilegio trabajar con vosotros.

A Valle, gracias por ser un referente profesional y personal, por ser una buena tutora y por tu apoyo en momentos difíciles. Gracias.

A todo el equipo de investigación y en especial a Ana por el laborioso trabajo que ha acometido para que este proyecto pueda llevarse a cabo, gracias.

A todos los pacientes que han permitido que podamos desarrollar el estudio, por su colaboración y confianza, gracias.

A todos los compañeros de Hematología que han colaborado con este proyecto, y a los que me han animado a continuar trabajando día a día, gracias.

A todos los profesores y profesionales que han participado de mi formación y promovido mi desarrollo como persona y profesional, gracias.

A mi familia, en especial a mis padres, por todo el esfuerzo, dedicación y cariño que siempre han depositado en mí, y ha hecho posible que hoy sea quien soy, gracias.

Por último a mi hermana, Alicia, por ser un ejemplo brillante de superación y esfuerzo, por tu apoyo incondicional, por ser mi confidente y mi amiga, muchas gracias, no hubiera llegado aquí sin ti.

Gracias de todo corazón.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

Capítulo I. INTRODUCCIÓN	19
1.-EL HIERRO.....	21
2.- CAPTACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DEL HIERRO CORPORAL.	22
3.- METABOLISMO DEL HIERRO	25
3.1.- Absorción duodenal del hierro.....	25
3.2.- Transporte del hierro y captación celular.	29
3.3.- Penetración intracelular del hierro plasmático.	30
4.-REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DEL HIERRO.....	34
4.1.-Regulación de la absorción del hierro.....	34
4.2.- La hepcidina y su papel en el metabolismo del hierro.	36
4.3- Metabolismo mitocondrial del hierro.....	47
5.- LIPOPROTEÍNAS.....	50
5.1.- Apolipoproteínas.....	51
5.2.- Quilomicrones.	51
5.3.- Lipoproteína de muy baja densidad (VLDL).	53
5.4.- Lipoproteína de baja densidad (LDL).....	54
5.5.- Lipoproteína de alta densidad (HDL).....	55
5.6.- Lipoproteína (a).....	57
5.7.- Metabolismo de las Lipoproteínas.....	58
7.- ADIPOCITOCINAS.....	62
7.1.- Leptina.....	62

7.2.- Adiponectina.	65
7.3.- Factor de necrosis tumoral- α	70
7.4.- Interleuquina-6.....	71
7.5.- Proteína C Reactiva ultrasensible.....	72
7.6.- Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1).	74
7.7.- Resistina.	75
7.8.- Retinol-binding protein 4 (RBP4).	75
8.- TEJIDO ADIPOSO Y ESTADO INFLAMATORIO SISTÉMICO.	78
8.1.- Sistema inmunológico y tejido adiposo.	78
8.2.-Papel de MCP1 y CCR2.	80
9.- RESISTENCIA PERIFÉRICA A LA INSULINA.....	82
9.1.- Métodos de diagnóstico. Sensibilidad y especificidad.....	84
9.2.- Factores patogénicos de la resistencia a la insulina.	85
9.3.-Efectos metabólicos de la insulina en los tejidos periféricos.	88
10.- ASOCIACIÓN ENTRE METABOLISMO DEL HIERRO, LA HIPERTRIGLICERIDEMIA Y LA RESISTENCIA PERIFÉRICA A LA INSULINA.....	91
Capítulo II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	97
1.- Hipótesis.....	99
2.- Objetivos	99
2.1.- Objetivo principal	99
2.2.- Objetivos secundarios	99

Capítulo III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	103
1.- Planteamiento general.....	105
1.1.- Aspectos éticos y legales.....	106
2.- Selección de participantes.....	107
2.1.- Descripción de las intervenciones realizadas en cada grupo.....	108
2.2.- Criterios de inclusión.....	109
2.3.- Criterios de exclusión.....	109
2.4.- Aleatorización de los participantes.....	110
3.- Variables recogidas y analizadas en el estudio.....	112
3.1.- Datos socio-demográficos, estilos de vida y estado de salud.....	112
3.2.- Medidas antropométricas.....	112
3.3.- Parámetros analíticos.....	113
4.- Análisis estadístico.....	115
4.1.- Cálculo del tamaño muestral:.....	116
Capítulo IV. RESULTADOS.....	119
1.- DATOS ANTROPOMÉTRICOS, clínicos Y ANALÍTICOS DESCRIPTIVOS BASALES de los pacientes aleatorizados a cada grupo.....	122
2. RESULTADOS SOBRE LA VARIACIÓN OBSERVADA TRAS LA INTERVENCIÓN EN EL GRUPO ALEATORIZADO A RECIBIR CONSEJO DIETÉTICO.....	127
3.- RESULTADOS SOBRE LA VARIACIÓN OBSERVADA TRAS LA INTERVENCIÓN EN EL GRUPO ALEATORIZADO A RECIBIR CONSEJO DIETÉTICO y flebotomías terapéuticas.....	131
4.- RESULTADOS SOBRE LA VARIACIÓN CLÍNICA Y ANALÍTICA OBSERVADA ENTRE LOS PACIENTES DE CADA GRUPO EN LA VISITA FINAL.....	135

5. ANÁLISIS POR SUBGRUPOS	140
5.1.- ANÁLISIS POR SUBGRUPOS EN FUNCIÓN DEL NIVEL DE FERRITINA.....	141
5.2.- ANÁLISIS POR SUBGRUPOS EN FUNCIÓN DEL NIVEL DE HOMA.....	146
5.3.- ANÁLISIS POR SUBGRUPOS EN FUNCIÓN DEL NIVEL DE PCR SÉRICA.....	151
5.4.- ANÁLISIS POR SUBGRUPOS EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BASAL DE TRIGLICÉRIDOS SÉRICOS.....	156
5.4.- RESULTADOS SOBRE LA ASOCIACIÓN ENTRE LAS PRINCIPALES VARIACIONES DEL ESTUDIO Y LA DEPLECIÓN FÉRRICA.....	161
Capítulo V. DISCUSIÓN	163
Capítulo VI. CONCLUSIONES	171
Capítulo VII. BIBLIOGRAFÍA	175
Capítulo VIII. ANEXO	191
8.1.- INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE	192
8.2.- ALEATORIZACIÓN DE PACIENTES Y SECUENCIA TEMPORAL.....	193

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Recambio de hierro en el organismo.	23
Figura 2: Mecanismo de absorción del hierro hemo y no hemo por los enterocitos del duodeno.	29
Figura 3: Islote eritroblástico.	32
Figura 4: Sideroblastos en anillo, tinción de Perls.	33
Figura 5: Esquema del sistema regulador IRP.	35
Figura 6: Mecanismo funcional de la hepcidina.	36
Figura 7: Regulación de la expresión de hepcidina según la disponibilidad sistémica de hierro y estado inflamatorio.	38
Figura 8: Mecanismo regulación de hepcidina con niveles séricos de hierro descendidos.	39
Figura 9: Mecanismo regulación hepcidina en estado de sobrecarga férrica.	40
Figura 10: Vías moleculares de regulación de la Hpcidina.	41
Figura 11: Desarrollo de las células eritroides.	43
Figura 12: Factores que se requieren en contexto de estrés eritropoyético y la modulación de la síntesis de Hpcidina en el Hígado.	44
Figura 13: Mecanismos de acción de Minihepcidina e inhibidores Tmprss en la Hemocromatosis Hereditaria y Talasemia.	46
Figura 14: Sobrecarga férrica intramitocondrial como consecuencia del déficit de Frataxina en la Ataxia de Friedrich.	47
Figura 15: Metabolismo mitocondrial del hierro.	48
Figura 16: Quilomicrón.	52
Figura 17: Vía exógena del metabolismo lipídico.	60
Figura 18: Vía endógena del metabolismo lipídico.	61
Figura 19: Estructura de la Leptina.	63
Figura 20: Estructura primaria de la adiponectina humana y modelo de ensamblaje de la adiponectina humana.	66

Figura 21: Mecanismo de acción de la adiponectina sobre la sensibilidad a la insulina en el hígado y el tejido muscular esquelético.	68
Figura 22: Efectos antiaterogénicos de la adiponectina.....	69
Figura 23: Mecanismo aterogénico.	79
Figura 24: Eventos celulares que interfieren en la señalización insulínica.	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las lipoproteínas.	50
Tabla 2: Distribución por sexo de los sujetos del estudio en función del grupo al que fueron aleatorizados.	122
Tabla 3: Descripción de las características clínicas basales en función del grupo al que fueron aleatorizados los pacientes en el estudio.	123
Tabla 4: Descripción de las características bioquímicas generales basales del perfil hepático y lipídico de cada uno de los grupos incluidos en el estudio.	125
Tabla 5: Descripción de las características basales sobre el metabolismo del hierro y la hemoglobina de cada uno de los grupos incluidos en el estudio.	125
Tabla 6: Descripción de las características basales del metabolismo glucídico de cada uno de los grupos incluidos en el estudio.	126
Tabla 7: Descripción de las características basales sobre las adipoquinas y citoquinas pro-inflamatorias de cada uno de los grupos incluidos en el estudio.	126
Tabla 8: Variación en las medidas clínicas y antropométricas tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético.	127
Tabla 9: Variación del perfil lipídico tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético.	128
Tabla 10: Variación del perfil tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético.	129
Tabla 11: Variación del perfil glucídico tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético.	129
Tabla 12: Variación en el perfil hepático y tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético.	130
Tabla 13: Variación en el perfil de adipoquinas y citoquinas pro-inflamatorias tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético.	130
Tabla 14: Variación en las medidas antropométricas y clínicas tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético y flebotomías terapéuticas.	131

Tabla 15: Variación del perfil lipídico tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético y flebotomías terapéuticas.....	132
Tabla 16: Variación del perfil férrico tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético y flebotomías terapéuticas.....	132
Tabla 17: Variación del perfil glucídico tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético y flebotomías terapéuticas.....	133
Tabla 18: Variación del perfil hepático y PCR tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético y flebotomías terapéuticas.....	133
Tabla 19: Variación del perfil de adipoquinas y citoquinas pro-inflamatorias tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético y flebotomías terapéuticas.	134
Tabla 20: Diferencias observadas tras la intervención en las medidas clínicas y antropométricas entre ambos grupos del estudio	135
Tabla 21: Diferencias observadas tras la intervención en el perfil lipídico entre ambos grupos del estudio.	136
Tabla 22: Diferencias observadas tras la intervención en el perfil férrico y el hemograma entre ambos grupos del estudio.....	137
Tabla 23: Diferencias observadas tras la intervención en el perfil glucídico entre ambos grupos del estudio	137
Tabla 24: Diferencias observadas tras la intervención en el perfil hepático y PCR entre ambos grupos del estudio.....	138
Tabla 25: Diferencias observadas tras la intervención en el perfil de citoquinas pro-inflamatorias entre ambos grupos del estudio.....	139
Tabla 26: Variaciones observadas sobre las variables clínicas y analíticas en el grupo aleatorizado a flebotomías, en función de los niveles basales de ferritina	142
Tabla 27: Comparación de las variaciones en parámetros clínicos y bioquímicos entre los grupos a estudio tras la intervención, seleccionando aquellos sujetos con concentración basal de ferritina >547,1mg/dl.	145
Tabla 28: Variaciones observadas sobre las variables clínicas y analíticas en el grupo aleatorizado a flebotomías, en función de los niveles basales de índice HOMA.	147

Tabla 29: Comparación de las variaciones en parámetros clínicos y bioquímicos entre los grupos a estudio tras la intervención, seleccionando aquellos sujetos con índice HOMA >2,59.	150
Tabla 30: Variaciones observadas sobre las variables clínicas y analíticas en el grupo aleatorizado a flebotomías, en función de los niveles basales de PCR sérica.....	152
Tabla 31: Comparación de las variaciones en parámetros clínicos y bioquímicos entre los grupos a estudio tras la intervención, seleccionando aquellos sujetos con concentración basal de PCR sérica >0,21 mg/dL	155
Tabla 32: Variaciones observadas sobre las variables clínicas y analíticas en el grupo aleatorizado a flebotomías, en función de los niveles basales de triglicéridos séricos .	157
Tabla 33: Comparación de las variaciones en parámetros clínicos y bioquímicos entre los grupos a estudio tras la intervención, seleccionando aquellos sujetos con concentración basal de triglicéridos séricos >260 mg/dl.	160
Tabla 34: Asociación entre las variaciones de los principales parámetros a estudio tras la intervención en el grupo asignado a flebotomías y la variación de ferritina obtenida tras la intervención.	161

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Distribución de los pacientes respecto a su hábito tóxico con el tabaco en función de los grupos a los que fueron aleatorizados.....	124
Gráfico 2: Diagrama sobre la aleatorización de los pacientes en los dos grupos a estudio.	193
Gráfico 3: Diagrama sobre los tiempos de intervención sobre cada grupo.	194

Capítulo I. INTRODUCCIÓN

1.-EL HIERRO

El hierro es un metal que forma parte, como elemento químico, de la tabla periódica, y que se halla de forma muy abundante sobre la corteza terrestre. El hierro se encuentra en baja proporción en los organismos y, sin embargo, resulta vital para el desarrollo de la vida. Su capacidad para transferir electrones en las reacciones celulares de oxidación/reducción, lo convierte en un elemento esencial para el desarrollo, la diferenciación y la proliferación celular. Ello hace de vital importancia la homeostasis del hierro, que es fisiológicamente regulada a nivel del epitelio intestinal y mediante el control de las reservas corporales, gracias a un laborioso sistema coordinado en el que intervienen fundamentalmente varios compartimentos de distribución y tres proteínas de gran importancia funcional: transferrina (transporte), ferritina (reserva) y receptor de la transferrina (utilización del hierro). Además de ellas, la hepcidina que es un péptido de síntesis hepática, ha sido recientemente identificada como hormona reguladora del hierro, que es capaz de exportar el hierro citoplasmático y regular la concentración plasmática de hierro, a través de su receptor, la ferroportina.

Una sobrecarga de hierro puede producir toxicidad celular, por ello es elemental una estrecha regulación del metabolismo férrico. El hierro en forma libre actúa como elemento oxidativo, capaz de dañar macromoléculas, como ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. Por ello, existen proteínas transportadoras y de unión, que lo reclutan para que no se disponga en forma libre, evitando de esta manera una toxicidad que pueda comprometer órganos vitales como corazón, hígado o páncreas. La alteración del balance del hierro en el organismo tiene dos consecuencias, o bien existe una sobrecarga como previamente se ha comentado, o mucho más frecuentemente lo que se produce es un déficit de hierro, que conlleva un agotamiento de los depósitos y se traduce clínicamente en una anemia microcítica e hipocroma.

2.- CAPTACIÓN Y DISTRIBUCIÓN DEL HIERRO CORPORAL.

La cantidad total de hierro del organismo se estima alrededor de 3,5g. y una dieta normal aporta entre 1 y 1,5 mg de hierro al día. Los requerimientos fisiológicos diarios de hierro necesarios para la eritropoyesis varían en función de la edad y el sexo. Existen también otros eventos como el crecimiento, la menstruación, el embarazo y la lactancia, en los que los requerimientos férricos se ven aumentados.

Existe una pequeña pérdida de hierro diaria, entre 0,6 y 2mg, secundaria a la descamación cutánea, caída de cabello, recambio ungueal, sudoración, saliva y bilis, por lo que es imprescindible un mínimo aporte diario para compensarlo y evitar una disminución progresiva de los depósitos (Figura 1).

El principal papel del hierro en los mamíferos es proveer un sitio de unión al oxígeno en el grupo hemo de la hemoglobina, por este motivo, el compartimento con mayor contenido en hierro es el funcional (hemoglobina eritrocitaria y mioglobina del tejido muscular) y el de reserva (apoferritina y hemosiderina). Del total del hierro corporal (3,5gr), el grupo hemo precisa 2,3 gr (65%), la apoferritina 0,8gr (22%) y la hemosiderina 0,3gr (10%). Los 0,1 gr restantes se hallan unidos a la transferrina (Tf) y otras proteínas como citocromos, enzimas hemínicas (citocromo oxidasa, oxidasa homogentísica, peroxidasa, catalasas) y enzimas no hemínicas (ribonucleótido reductasa, flavoproteínas o proteínas sulfuradas).

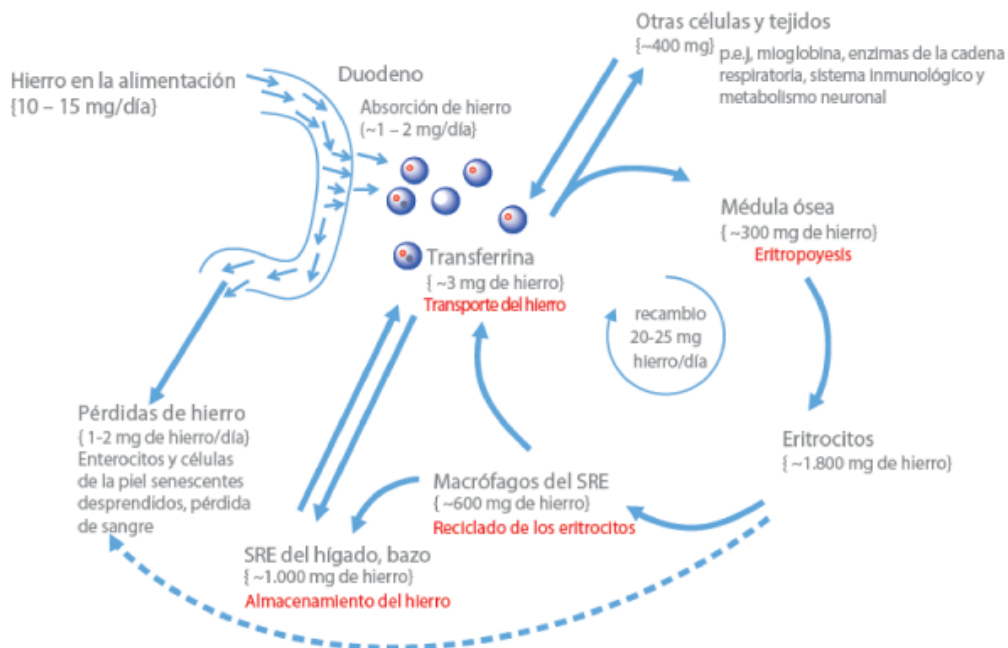


Figura 1: Recambio de hierro en el organismo. Imagen obtenida de CardioTeca.

La molécula de hierro es de gran tamaño y tiene propiedades electroquímicas que precisan de transportadores transmembrana que medien su entrada y salida de los hepatocitos, células de la mucosa intestinal y macrófagos. Los eritrocitos sólo son capaces de incorporar el hierro a su citoplasma, y no lo pierden hasta su degradación en los macrófagos.

Diariamente se movilizan alrededor de unos 21 mg de hierro desde los depósitos de reserva hasta la médula ósea, y gracias a la reutilización del hierro proveniente de la destrucción eritrocitaria, se obtiene la misma cantidad para llenar los depósitos en el sistema mononuclear fagocítico.

La mayoría del hierro transportado por la transferrina se une al receptor de la transferrina (receptor específico de la membrana de los eritroblastos) y se utiliza para el desarrollo de los precursores eritrocitarios en médula ósea. Una vez en su interior se libera para unirse a otras proteínas, como la apoferritina, para formar la ferritina.

Aunque el hierro circulante, el que se halla unido a la transferrina, sea tan sólo el 1% del total, es el más dinámico y por lo tanto de gran importancia para el balance del hierro. El hierro se transporta desde los macrófagos, que actúan como depósitos, hasta los eritroblastos, donde tendrá lugar la síntesis de hemoglobina. Durante la hematopoyesis normal se producen aproximadamente 10^{10} glóbulos rojos por hora para mantener el nivel de hemoglobina dentro de los límites fisiológicos.

La ferritina es la principal proteína encargada del almacenamiento férrico. Gracias a sus complejos multiméricos tiene capacidad para secuestrar y movilizar la molécula de hierro en detrimento de las necesidades celulares del organismo. Por lo tanto, los niveles de ferritina sérica se correlacionan con los niveles de depósito de hierro, sin embargo, existen situaciones inflamatorias o de daño celular en las que puede evidenciarse un aumento de los niveles de ferritina, actuando en estos casos como reactante de fase aguda.

La hemosiderina por el contrario es una proteína con una baja biodisponibilidad férrica, cuyo aumento suele estar correlacionado con un aumento patológico de los depósitos de hierro.

Que exista un equilibrio en la homeostasis del hierro es imprescindible para que no se precipite un agotamiento de las reservas o una sobrecarga de hierro tóxica para el organismo. Por ello es fundamental que se mantenga un flujo diario equilibrado entre las ganancias y las pérdidas en función de las necesidades orgánicas.

3.- METABOLISMO DEL HIERRO

La homeostasis del hierro requiere la acción coordinada de cinco procesos diferentes: absorción, transporte, penetración intracelular, utilización y reserva.

3.1.- Absorción duodenal del hierro

El hierro procedente de la dieta se absorbe en el intestino delgado, especialmente en duodeno y primera porción de yeyuno. Una dieta variada de 2.000 Kcal. diarias contiene entre 12 y 20 mg de hierro. De esta cantidad sólo se absorbe entre el 5 y el 15% (se calcula una media de 1,5mg), por lo que se deduce que el hierro aportado diariamente es prácticamente igual al que se pierde de forma fisiológica. Si bien es cierto que en caso de que las reservas férricas se encuentren muy disminuidas, pueden llegar a absorberse hasta 4 mg, y en caso de una situación patológica como el caso de la hemocromatosis puede absorberse hasta 30 mg al día y en otras patologías como en la anemia hemolítica o la talasemia, puede verse incrementado hasta en un 40% respecto a la absorción normal. (1)

Se conocen dos vías de absorción intestinal: una por difusión pasiva y otra regulada en función de los depósitos, la actividad eritropoyética y el grado de hipoxia tisular.

3.1.1.-Hierro hemínico.

El hierro que cruza la membrana plasmática de forma pasiva es el hierro hemínico, procedente de alimentos cárnicos, el cual es muy soluble y se absorbe fácilmente.

Los mediadores de la absorción del hierro heme, y especialmente a nivel de absorción intestinal están sin clarificar. Por el momento no hay evidencia de si la absorción intestinal se lleva a cabo totalmente mediante transportadores de membrana o si también se realiza mediante endocitosis.

Recientemente se ha identificado el transportador de membrana importador de heme o “heme-response gene-1” (HRG-1), homólogo al transportador heme hallado en *Caenorhabditis elegans*(2,3). La HRG-1 cuya localización se encuentra en los fagolisosomas y en los macrófagos, parece tener un papel importante en el reciclaje del hierro heme proveniente de eritrocitos senescentes.

Prácticamente la totalidad del hierro del grupo heme será liberado de forma intracitoplasmática gracias a la enzima hemoxigenasa, la cual rompe la protoporfirina IX y libera el hierro. Este hierro se unirá a la apoferritina para más tarde formar la ferritina o se exportará a través de la ferroportina (FPN).

3.1.2.-Hierro no hemínico.

El hierro no hemínico procedente de alimentos vegetales, legumbres, hortalizas o frutos secos, se absorbe en forma ferrosa (Fe^{2+}). Hay componentes con propiedades reductoras, como son el ácido ascórbico, el piruvato, succinato, fructosa o sorbitol que favorecen la absorción. También enzimas como la pepsina o la gastroferrina, presentes en el jugo gástrico y la motilidad intestinal, son imprescindibles para una buena absorción del hierro.

La forma férrica (Fe^{3+}) tiene menor capacidad de absorción dado que interacciona con otras sustancias (calcio, fitatos, café, oxalatos) formando complejos insolubles. Los elementos que disminuyen la absorción de hierro son la fibra, las proteínas vegetales, bebidas carbonatadas e incluso algún los antiácidos, la DOPA y las tetraciclinas. En definitiva, pese a encontrar alto contenido en hierro en alimentos de origen vegetal, su absorción es muy escasa.

3.1.3.- Etapas de la absorción intestinal del hierro.

La absorción del hierro comporta tres aspectos, el paso del hierro a través de la membrana apical del enterocito, el paso del hierro al plasma a través de la membrana basolateral, y la regulación global de estos procesos.

3.1.3.1.- Paso del hierro a través de la membrana apical del enterocito.

El hierro en su estado ferroso es capaz de ser absorbido por el organismo. A nivel de la membrana en cepillo duodenal, se encuentra una oxidorreductasa férrica o citocromo b duodenal (Dcytb), cuya función es reducir el hierro de su forma férrica (oxidada) a su forma ferrosa (reducida). En segundo lugar, el hierro ferroso se cotransporta a través de la membrana apical hasta internalizarse en el enterocito, gracias a una proteína transportadora de metales divalentes (DMT1)(4) o de resistencia natural asociada a macrófagos (Nramp2). Una vez en su interior, una parte del hierro se quedará intracitoplasmático en forma de ferritina y el resto será transportado hacia el plasma a través de la membrana basolateral gracias a la ferroportina transmembrana exportadora de hierro.

La DMT1 es la encargada del transporte activo de no solo el hierro (Fe^{++}), sino cualquier catión metálico bivalente (Zn, Mn, Co, Cd, Cu, Ni y Pb). La concentración del DMT1 depende de la concentración del hierro de reserva, de la actividad eritropoyética y del grado de hipoxia celular; en función de estos parámetros, se regula la actividad de la región génica IRE (*iron responsive elements*) y se transcribe el factor de hipoxia-inducible 2α (HIF 2α), que inducirá cambios en la transcripción del DMT1 y de la ferroportina. La DMT1 también se encuentra en la membrana de los eritroblastos, donde es encargada de transportar el hierro al citoplasma, previa unión del hierro al complejo Transferrina-Receptor de la transferrina (Fe-Tf-RTf).

3.1.3.2.- Paso del hierro a través de la membrana basal (Exportación).

Una vez el hierro, en su forma ferrosa, se encuentra en el citoplasma del enterocito, puede permanecer intracelular en forma de ferritina o bien es exportado hacia el plasma por la membrana basolateral.

La proteína encargada de dicha función es la ferroportina (único exportador de hierro conocido en los mamíferos)(5,6), y se expresa en la membrana basolateral del enterocito duodenal, macrófagos y hepatocitos(7), células encargadas de exportar hierro al plasma.

La ferroportina, a su vez, es dependiente de dos cuproproteínas ferroxidasas: la ceruloplasmina y la hefaestina (esta última de localización exclusivamente intestinal).

La ceruloplasmina es la responsable de oxidar el hierro ferroso (Fe^{+2}) en su forma férrica (Fe^{+3}); este paso resulta imprescindible para que el hierro pueda unirse a la transferrina una vez en el plasma.

La hefaestina es una ferroxidasa análoga a la ceruloplasmina pero de localización exclusivamente intestinal, cuya función es pasar el hierro ferroso a su estado férrico, para que de esta forma pueda unirse a la Ferroportina 1 (Iref1, SLC11A3 o MTP1), proteína integral de la membrana basal del enterocito, que como se ha descrito previamente, será a su vez la encargada de transportar el hierro férrico al plasma para unirse con la transferrina.

La hefaestina es fundamental y se encuentra ligada al cromosoma X. Tanto la hefaestina como la ferroportina poseen regiones IRE en posición 5' de su RNAm, que son reguladas por la concentración del hierro del organismo. La deficiencia de estas ferroxidasas conlleva la incapacidad para exportar el hierro fuera de la célula, y se produce una acumulación anómala y tóxica de hierro intracelular(7).

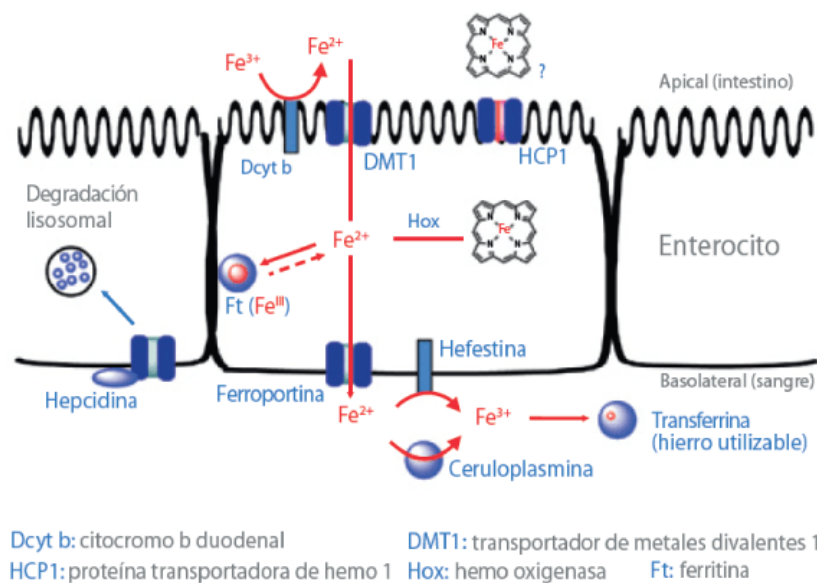


Figura 2: Mecanismo de absorción del hierro hemo y no hemo por los enterocitos del duodeno. *Imagen obtenida de cadioteca.com.*

3.2.- Transporte del hierro y captación celular.

Una vez finalizada la fase de absorción, el hierro entra en el torrente sanguíneo para unirse a la transferrina (Tf), una betaglobulina plasmática de 79 kDa. que posee dos fragmentos glucídicos con un ácido siálico (glucoproteína). Se codifica por un gen situado en el cromosoma 3, muy próximo al del receptor de la transferrina (RTf).

El órgano principal productor de la Tf es el hígado, aunque también puede sintetizarse en glándula mamaria, testículo, sistema nervioso central, linfocitos y macrófagos. Su vida media es de 8 días, y su síntesis parece estar regulada por la concentración de hierro intracelular, de tal forma que cuando éste disminuye se favorece su síntesis. Así pues, en situaciones de anemia ferropénica se observará un aumento de transferrina y de su capacidad de saturación(8).

La transferrina es capaz de fijar dos átomos de hierro en su forma férrica (Fe^{+3}), por ello, es imprescindible que previamente la ceruloplasmina (ferroxidasa plasmática), oxide los átomos de hierro para que se produzca la unión. La transferrina

circulante no se halla saturada por hierro, sino que existe una proporción variable de moléculas libres (apotransferrina), con una molécula (monotransferrina) o con dos moléculas (ditransferrina). La proporción de las mismas depende directamente con la cantidad de hierro presente en el organismo, en casos de ferropenia aumentará la apotransferrina y en estados de sobrecarga férrica predominará la ditransferrina.

La transferrinemia oscila entre 250 y 450 mg/dl. En la práctica clínica viene referida como capacidad de saturación de la transferrina (CST) (la capacidad de fijar hierro en plasma). El hierro se fija a la transferrina en plasma en su totalidad; en el individuo normal los niveles de hierro oscilan entre 50 y 140 mg/dl, y tan sólo entre 30 y el 35% de la transferrina circulante se halla saturada por hierro.

El índice de saturación de la transferrina por hierro, constituye un factor que regula la intensidad de la eritropoyesis. En la eritropoyesis ferropénica la CST disminuye drásticamente (inferior al 16%) y en el caso de la hemosiderosis hepática aumenta (por encima del 90%). Existe una situación excepcional: el déficit congénito de transferrina (atransferrinemia). El hierro que se absorbe se deposita y acumula en el parénquima (hepático, cardiaco, pancreático), pero no alcanza la médula ósea, por lo que se observa una hemosiderosis junto con una anemia microcítica e hipocrómica(9). También existe otra vía de escasa relevancia de transporte de hierro independiente a la transferrina, que puede ser importante en casos de sobrecarga férrica. El plasma normal contiene entre 2 y 5 mg/ml de receptor soluble de la transferrina. Estos niveles son un reflejo de la intensidad de eritropoyesis y por lo tanto un indicador muy sensible del estado ferropénico, incluso en ausencia de anemia(10).

3.3.- Penetración intracelular del hierro plasmático.

El hierro penetra en el interior del citoplasma celular previa unión de la Tf al receptor de la transferrina (RTf) presente, prácticamente, en todas las células del organismo. Las células con mayor número de receptor de Tf son las que requieren un mayor consumo de hierro, como los eritroblastos y reticulocitos, o las que intervienen activamente en su mecanismo de reutilización como, por ejemplo, los hepatocitos.

El RTf es una glicoproteína integral compuesta por dos subunidades de peso molecular de 94 KDa cada una, unidas por un puente disulfuro. Cada subunidad puede fijar una única molécula de transferrina, es decir dos moléculas de Tf por unidad de RTf.

La síntesis de RTf se halla íntimamente ligada a la síntesis de ferritina por un mecanismo de regulación genética común (cromosoma 3) que se activa ante estados de ferropenia y se inhibe ante la presencia del grupo hemo(10). La afinidad del RTf por la Tf depende del grado de saturación de ésta, de forma que es mínima para la apotransferrina y máxima para ditransferrina.

Recientemente, se ha demostrado la presencia de otro receptor: el receptor de la transferrina tipo 2 (TfR2), que posee gran homología con el anterior receptor. El TfR2 se encuentra sobre todo en el hígado y en los eritroblastos, y es capaz de unirse a la Tf, aunque con menor afinidad, y a diferencia del receptor clásico, no posee regiones IRE. Su función en el metabolismo férrico es poco conocida, aunque sus alteraciones pueden ser causa de hemocromatosis.

La penetración del hierro en el interior de las células (del eritroblasto, por ejemplo) se realiza en cuatro etapas, caracterizadas por un proceso de endocitosis reversible:

- **Primera etapa:** formación del complejo transferrina saturada receptor de transferrina (Tf-Fe-RTf) en la superficie de la célula.
- **Segunda etapa:** internalización del complejo Tf-Fe-RTf, muy probablemente unido a la proteína HFE mediante endocitosis, con formación de una vesícula o siderosoma. La endocitosis de la Tf por los eritroblastos presenta una actividad inversamente relacionada con la síntesis del hemo, de manera que cuando disminuye (ferropenia), aumenta la entrada de hierro en los eritroblastos, y viceversa.
- **Tercera etapa:** la liberación del hierro de la Tf por acidificación del siderosoma (pH 5,3) y transporte del mismo hacia el citoplasma por

acción de la proteína DMT1. El hierro liberado formará parte del compartimento lábil intracelular que se usará en los diferentes procesos metabólicos (formación del heme y grupos Fe-S en la mitocondria, almacenamiento en la ferritina, y otros).

- **Cuarta etapa:** desplazamiento de la vesícula ferritínica (libre de hierro) hacia la superficie de la célula y liberación de la apoferritina hacia el plasma por exocitosis, con reconstitución de los receptores de transferrina que pueden ser reutilizados.

El estudio de la médula ósea mediante microscopía electrónica de transmisión, ha demostrado que existe un mecanismo directo de entrada de hierro desde los macrófagos a los eritroblastos. Se realiza a través de una unidad funcional denominada “islote eritroblástico”, constituido por un macrófago y eritroblastos a los que, mediante un proceso de invaginación-endocitosis (rofecitosis), se va transfiriendo el hierro desde el macrófago a los eritroblastos circundantes. Figura 3.

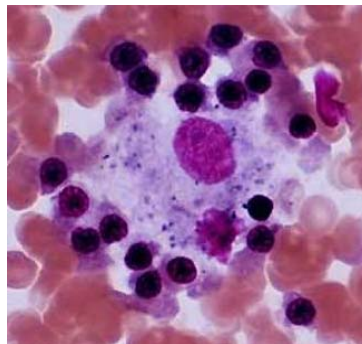


Figura 3: Islote eritroblástico. Esta agrupación consiste en eritroblastos jóvenes a los que el fagocito transfiere ferritina en un proceso conocido como rofecitosis. *Imagen obtenida del atlas de Hematología del instituto químico biológico.*

Una vez en el interior del eritroblasto, el hierro en su mayor parte (80%) es utilizado para la síntesis de hemoglobina, y el resto (20%), se deposita en el citoplasma en forma de ferritina y hemosiderina, donde puede visualizarse mediante la reacción de azul de Prusia (tinción de Perls).

Los eritroblastos que presentan hierro plasmático (hemosiderina) demostrable mediante la tinción de Perls se denominan sideroblastos, y su proporción normal oscila entre el 20 y el 60%. Según su contenido en gránulos de hemosiderina, existen varios tipos de sideroblastos y aquellos en los que está elevado se observa una imagen de gránulos redondeando la práctica totalidad del núcleo, se denominan “sideroblastos en anillo”. Los sideroblastos en anillo son característicos de la existencia de sideroacresia o hierro intramitocondrial. Figura 4.

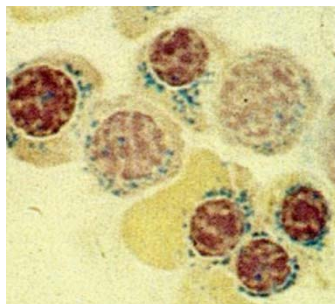


Figura 4: Sideroblastos en anillo, tinción de Perls. *Atlas Citología Hematológica. Woessner.*

4.-REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DEL HIERRO.

4.1.-Regulación de la absorción del hierro.

Dado que la sobrecarga férrica se comporta como un agente tóxico celular, el organismo posee mecanismos de defensa basados en la regulación coordinada de diversas proteínas involucradas en la homeostasis del hierro.

La homeostasis del hierro requiere una coordinada regulación de la absorción, excreción y almacenamiento, donde el principal sistema regulador es la propia concentración férrica. En definitiva, la concentración de hierro constituye una “señal reguladora”, que induce las variaciones necesarias en las proteínas para aumentar o disminuir la absorción. Así, el descenso del hierro intracelular aumentaría la síntesis del Receptor de transferrina, DMT1, ferroportina y hephaestina y disminuiría la de ferritina y δ -ALAS. El control de la absorción intestinal es el mecanismo primario para conseguir un buen balance férrico, dado que no existen suficientes mecanismos fisiológicos para la excreción del hierro en el cuerpo humano.

La coordinación de estos procesos corre a cargo de una proteína reguladora del hierro conocida con el nombre de IRP (*Iron Regulatory Protein*). La función de la IRP sería unirse de forma específica a determinadas zonas del RNA, conocidas como IRE (*Iron Responsive Elements*) favoreciendo o dificultando, según el caso, la traducción del RNAm de las proteínas que intervienen en la homeostasis del hierro(11–13). En el cuerpo humano existen dos formas moleculares de proteína IRP (tipo 1 o IRP-1 y tipo 2 o IRP-2), sin embargo, es IRP-1 la que interviene mayoritariamente en la regulación de la homeostasis del hierro. Debido a ello al IRP-1 se le conoce también como “factor regulador del hierro” o IRF (*Iron Regulation Factor*).

El conocimiento de este delicado sistema regulador ha sido favorecido por el hallazgo de una mutación en el IRE del RNAm de la L-ferritina causante del llamado síndrome de hiperferritinemia hereditaria asociada a cataratas (HHCS)(14,15) y en líneas generales se rige de la manera siguiente:

Cuando disminuye la concentración del hierro de los depósitos (ferropenia), el IPR-1, desprovisto de hierro, presenta gran afinidad por los IRE presentes en RNAm de la ferritina y δ -ALAS, bloqueando la traducción. De forma simultánea estabiliza el RNAm del RTf, DMT1, ferroportina y hefaestina, favoreciendo su traducción. Por el contrario, cuando la concentración del hierro de los depósitos es elevada (sobrecarga) se produce una saturación del IRP-1 por el hierro, con lo que adquiere actividad aconitasa (enzima que cataliza la conversión de citrato a isocitrato), y pierde afinidad por los IRE. Como consecuencia se desbloquea su síntesis y se degrada el RNAm de las proteínas RTf, DMT1, ferroportina 1 y hefaestina disminuyendo su síntesis. Figura 5.

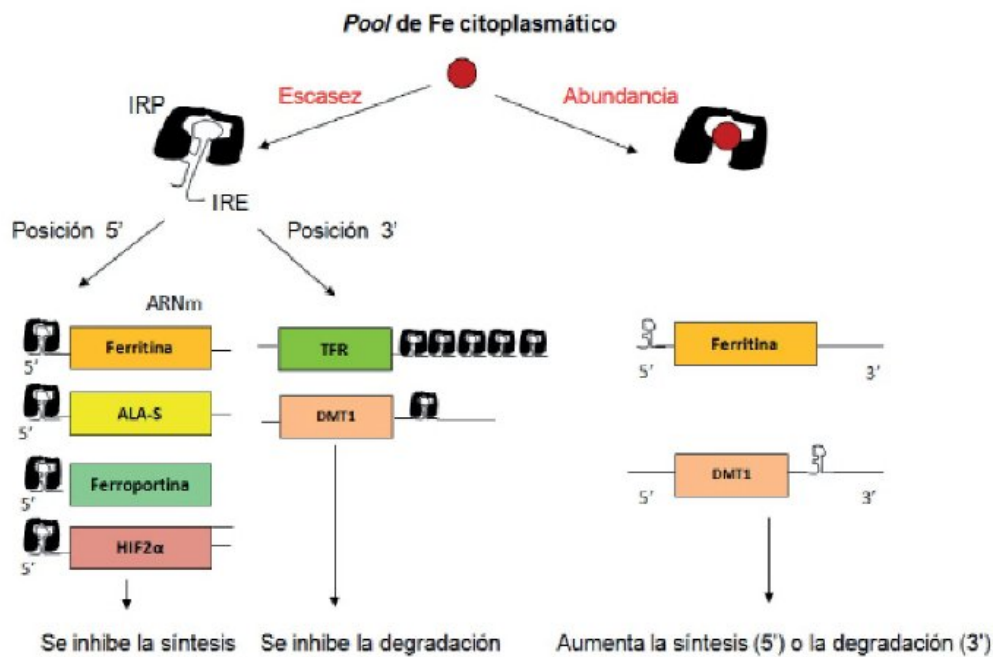


Figura 5: Esquema del sistema regulador IRP. *Anemia de la inflamación/ infección. An Pediatr Contin. 2012;10:273-81 - Vol. 10 Núm.5*

Esta acción bidireccional permite al organismo responder siempre de la forma más apropiada a su contenido en hierro y evitar, en cualquier caso, la sobrecarga o la intoxicación, de consecuencias muy nocivas para diversos tejidos vitales (2).

4.2.- La hepcidina y su papel en el metabolismo del hierro.

La hepcidina es una hormona fundamental que regula de forma primaria la absorción de hierro. La hepcidina contiene 25 aminoácidos y es sintetizada en el hígado y filtrada por la orina (su acrónimo proviene de los términos en inglés proteína hepática bactericida), que se produce como respuesta a estímulos inflamatorios, hipoxia (anemia) y concentración de hierro unido a la transferrina.

Esta hormona actúa como un regulador negativo, actuando sobre la ferroportina, encargada de exportar hierro desde el citoplasma, por lo que tiene capacidad de limitar la cantidad de hierro en plasma. Figura 6.

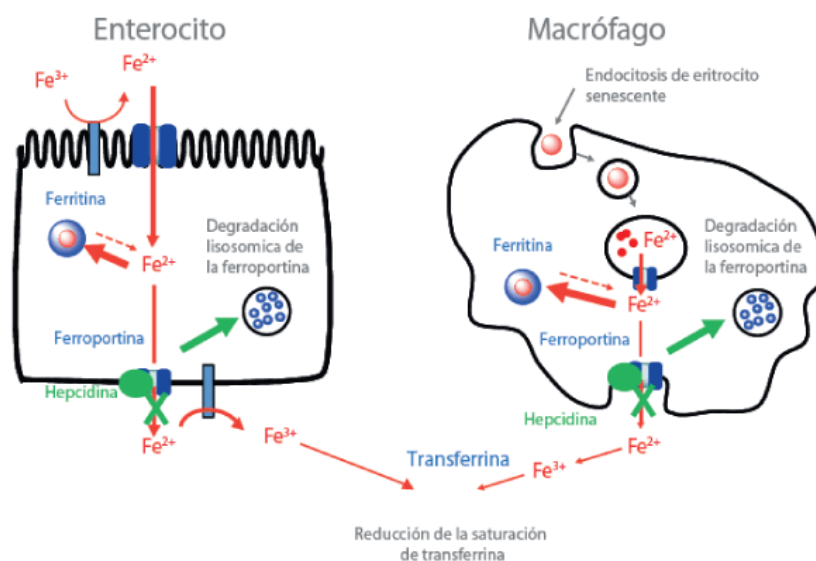


Figura 6: Mecanismo funcional de la hepcidina.

La hepcidina provoca la degradación de ferroportina y por tanto evita la exportación de hierro de los enterocitos y macrófagos a la circulación. *Imagen obtenida de cardioteca.*

Todo ello implica que el descenso de los niveles de concentración de hepcidina, provoque un aumento de la absorción intestinal de hierro y de liberación férrica por parte de los macrófagos, lo que conllevaría un aumento de los niveles de hierro en plasma y en los depósitos tisulares.

Clínicamente, la concentración plasmática de hepcidina se modula gracias a varias vías “reguladoras”(16). Los niveles de hepcidina aumentan tanto con el aumento de los depósitos de hierro como con los procesos inflamatorios y disminuye por la hipoxia, el aumento de la eritropoyesis y la testosterona(17). De todas ellas, el regulador predominante de la expresión de hepcidina es la actividad eritropoyética (regulador negativo) (ej. talasemia no transfusión-dependiente).

La regulación fisiológica de la hepcidina está controlada por una compleja red, que es el resultado de la transcripción e interacción de múltiples proteínas y cascadas que se reflejan en la figura 7.

La expresión de la hepcidina en respuesta a la disponibilidad de hierro está regulada por los niveles de transferrina diférrica y la proteína 6 de la médula ósea (BMP6) y afecta a las proteínas de membrana HFE, hemojuvelina (HJV) y receptor de transferrina2 (TfR2). El aumento de la expresión de hepcidina en condiciones inflamatorias está desencadenada por la interleucina-6 (IL6), que activa la cinasa Janus(JAK)/Janus (JAK)/transductor de señales y activador de la vía de señalización de la transcripción 3 (STAT3).

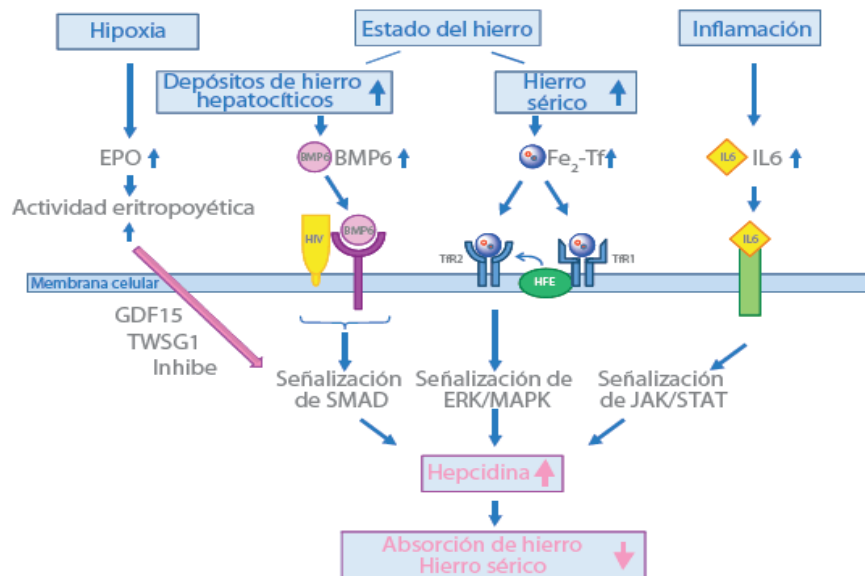


Figura 7: Regulación de la expresión de hepcidina según la disponibilidad sistémica de hierro y estado inflamatorio. *Imagen obtenida de cardioteca.*

4.2.1.-Mecanismos de regulación de la hepcidina en función de los niveles de hierro.

El hierro en estado férrico que llega al lumen intestinal, en donde en primer lugar se reduce a su estado ferroso mediante el citocromo b duodenal (DYTb), para permitir su paso a través del transportador metal divalente (DMT1) hacia el citoplasma del enterocito. Estas dos últimas proteínas, se regulan por el factor inducible por hipoxia-2 (HIF-2 α), que estimula su producción en estado de hipoxia metabólica.

Para que el hierro llegue al plasma sanguíneo precisa de la ferroportina en cooperación con la hefaestina, que se encuentran en la membrana basolateral del enterocito y permite su salida al plasma. Una vez en el plasma, el hierro vuelve a su estado férrico, y se une a la transferrina, proteína encargada de su transporte.

La principal regulación de los niveles séricos de hierro se lleva a cabo en los hepatocitos, los cuales producen la hepcidina, y cuya función es regular de forma negativa la absorción intestinal de hierro e inhibir la pérdida de hierro por parte de los macrófagos que proviene del reciclaje eritrocitario.

Tanto en el hepatocito como en el macrófago, la ferroportina precisa de la ceruloplasmina para exportar el hierro al plasma. En caso de encontrarnos ante un estado de ferropenia se inhibirá la producción de hepcidina y en caso de sobrecarga férrica se incrementará su producción, y posteriormente se encargará de bloquear la ferroportina, aumentando de esta forma los depósitos de hierro (figuras 8 y 9).

Del mismo modo que se conoce un factor inducible por hipoxia que regula la CYTB y la MDT1, también se ha propuesto que el HIF-1 produzca una inhibición de la hepcidina.

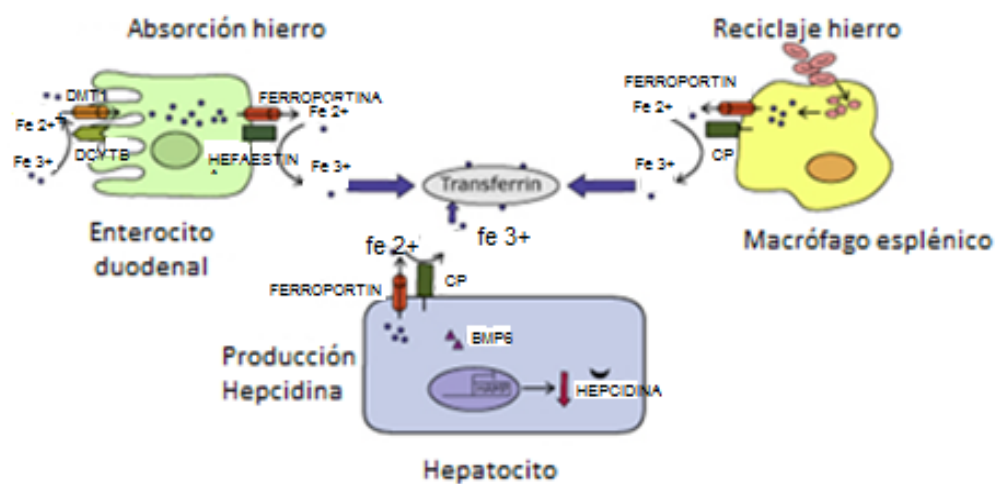


Figura 8: Mecanismo regulación de hepcidina con niveles séricos de hierro descendidos. Imagen adaptada de UptoDate.

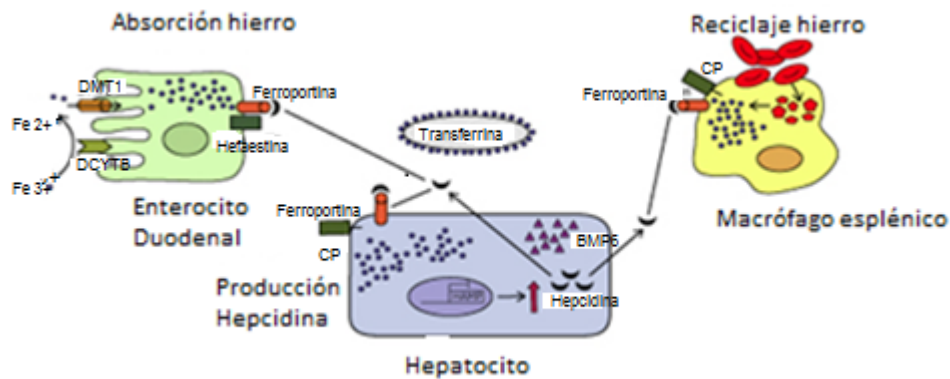


Figura 9: Mecanismo regulación hepcidina en estado de sobrecarga férrica. Imagen adaptada de UptoDate.

4.2.2.- Vías moleculares de regulación de la Hepcidina.

Gracias a los estudios realizados sobre la disregulación de la hepcidina tanto en enfermedades humanas como en modelos murinos, ha habido grandes avances en el conocimiento del mecanismo de control molecular de la expresión de la hepcidina, sin embargo, persisten vías y mecanismos pendientes de elucidar.

La regulación de la hepcidina llevada a cabo por los depósitos de hierro y la sideremia está mediada por la proteína morfogénica ósea (BMP), la cual inhibe la vía decapentaplégica (SMAD).

En estados de saturación férrica, el BMP6 se une a su receptor (BMPR) y su co-receptor la hemojuvelina (HJV) (proteína del gen HFE2 responsable de la hemocromatosis juvenil), lo cual activa una señal de cascada SMAD-dependiente, que aumenta la transcripción de hepcidina en los hepatocitos. No queda claro cuál es el sensor capaz de detectar la saturación de hierro en depósitos tisulares y plasma, pero parece estar relacionado con las interacciones entre el complejo BMPR/HJV, HFE y el receptor 2 de la transferrina (TRT2)(18). La escisión de HJV por la proteasa matrisa-2 asociada a la membrana y codificada por TMPRSS6, puede intervenir inhibiendo la activación de la vía BMP/SMAD(19). Figura 10.

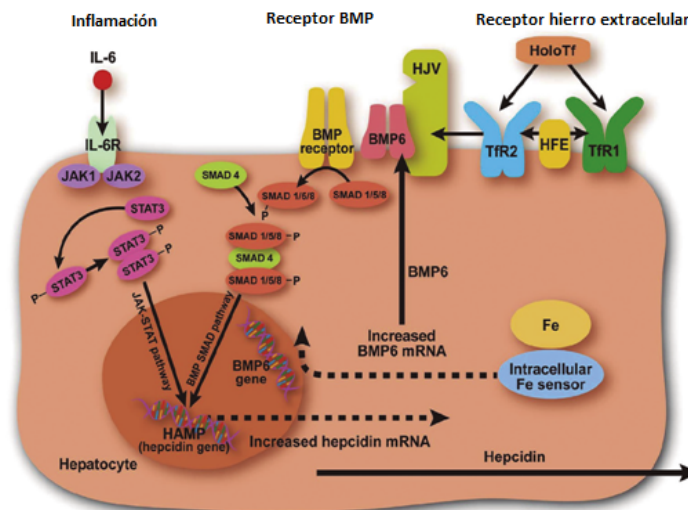


Figura 10: Vías moleculares de regulación de la Hepcidina.

Las vías de señales principales conocidas, que regulan la producción de hepcidina en el hepatocito son BMP-SMAD e IL6-JAK-STAT. El hierro extracelular está unido a la transferrina y cuando se une al receptor de la transferrina 1 (TfR1), HFE-TfR2 envía una señal al complejo receptor BMP, que conjuntamente con hemojuvelina (HjV) potencia el señalamiento de BMP-SMAD, siendo esta la vía fisiológica principal. Durante los procesos inflamatorios la producción de IL-6 activa la vía JAK-STAT3 a través de su unión a su receptor, provocando una serie de fenómenos de fosforilación de STAT3, que desencadenan el estímulo del gen de la hepcidina y su producción.

BMP, *bone morphogenic protein*; SMAD, *sons of mothers against decapentaplegic*. Tomada de Cangat N *et al.*12

En el caso de regulación de hepcidina secundaria a un proceso inflamatorio, no depende de BMP6 y HJV, sino que está mediado por citoquinas, en especial la IL-6, la cual se une a su receptor y activa la vía JAK2 y la fosforilación de STAT-3(20). La vía de regulación inflamatoria precisa la integridad de la vía BMP-SMAD (en particular SMAD4) para que se active la hepcidina por completo(21).

La citoquina Activina B también induce la señalización de SMAD y actúa sinérgicamente con IL-6 JAK2/STAT-3 para favorecer la expresión de hepcidina(19).

La producción de hepcidina se encuentra claramente disminuida en situaciones de hipoxia, anemia y actividad eritropoyética ineficaz; sin embargo, por el momento no se ha identificado el mediador ni su mecanismo molecular. La hipótesis más aceptada es que BMP produce un mediador supresor de la hepcidina en respuesta a la eritropoyetina fisiológica o eritropoyesis ineficaz.

En la talasemia se han postulado como supresores de la hepcidina el factor de crecimiento de diferenciación (GDF15) y el twisted-gastrulation 1(TWSG1), ambos pertenecientes a la familia BMP(22,23), aunque su contribución no queda del todo clara(24). Recientemente se ha descrito una nueva proteína supresora de hepcidina en el contexto del incremento eritropoyético o de la eritropoyesis ineficaz, y se ha denominado Eritroferrona (ERFE)(25).

4.2.3.-Hepcidina y eritropoyesis.

La eritropoyesis es un proceso dinámico en el que los progenitores eritropoyéticos proliferan y se diferencian a eritrocitos. La hormona clave en este proceso es la eritropoyetina (EPO). El macrófago que se encuentra en la médula ósea estimula el desarrollo de los precursores de las células eritroides a reticulocitos, principalmente regulado por la eritropoyetina. Entre las fases de proeritroblasto o eritroblasto, las células sufren mitosis, produciendo de 8 a 32 reticulocitos a partir de cada proeritroblasto. Figura 11.

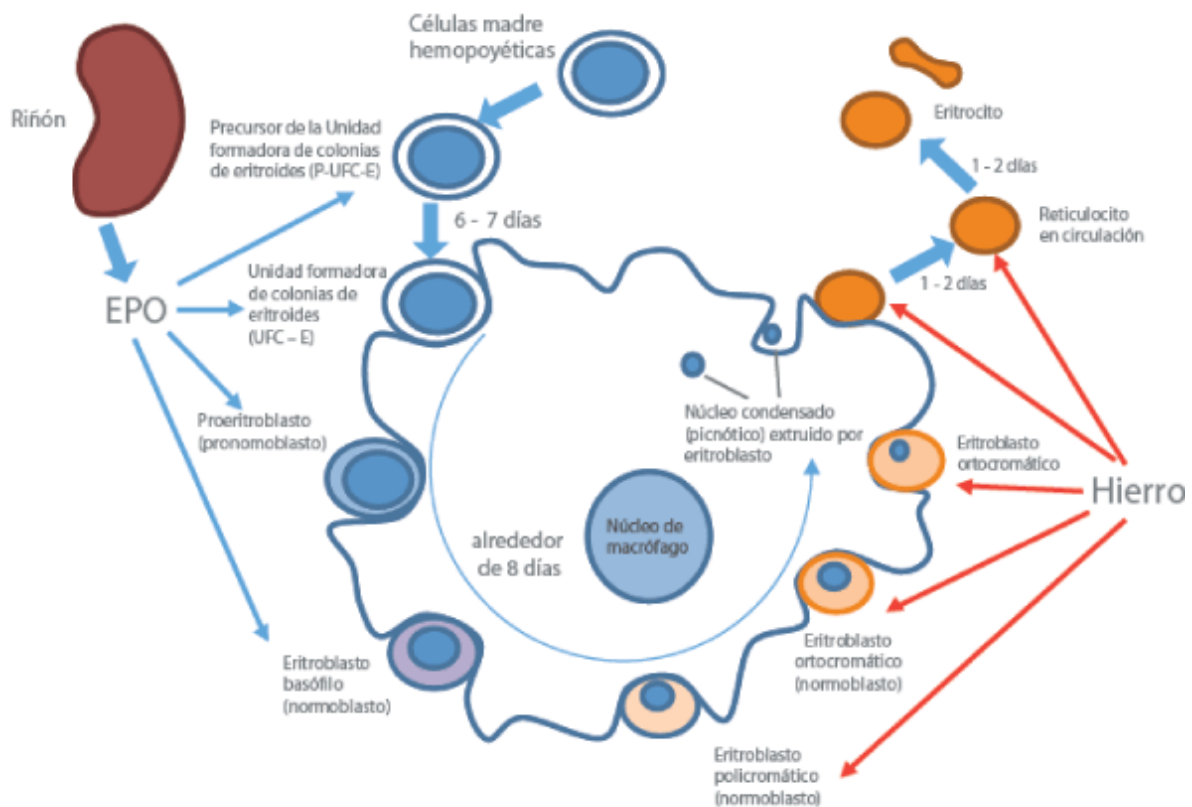


Figura 11: Desarrollo de las células eritroides. *Imagen obtenida de adaptado de Ingleby et al. 2004. cardioteca.*

A nivel molecular, una vez la eritropoyetina se une a su receptor (EPOR), favorece la activación de la JAK2 (26). La fosforilación de JAK2 activa STAT5 que se transloca hasta el núcleo activando los genes involucrados en la diferenciación, proliferación y mantenimiento de los progenitores eritroides(26).

En situaciones de hipoxia celular la regulación de la síntesis de EPO para la eritropoyesis está mediada por el factor 2alfa inducible por hipoxia (HIF2 α). Cuando hay una baja oxigenación tisular, la actividad eritropoyética aumenta de forma significativa, llegando incluso a producirse eritropoyesis extramedular en hígado o/y bazo. En estas ocasiones, en las que se precisa una sobreproducción eritropoyética, son indispensables varios factores como el aumento de la síntesis de EPO y el aumento de la absorción de hierro.

En ratones, se ha observado que en situaciones de estrés eritroide, el aumento de la absorción intestinal de hierro se encuentra mediado por la eritroferrona (ERFE), que a su vez está segregada por los progenitores eritroides medulares y suprime la hepcidina en el hígado(18). Consecutivamente, conforme se incrementa el número total de precursores eritroides, la producción de eritroferrona crecerá y la de hepcidina disminuirá. Figura 12.

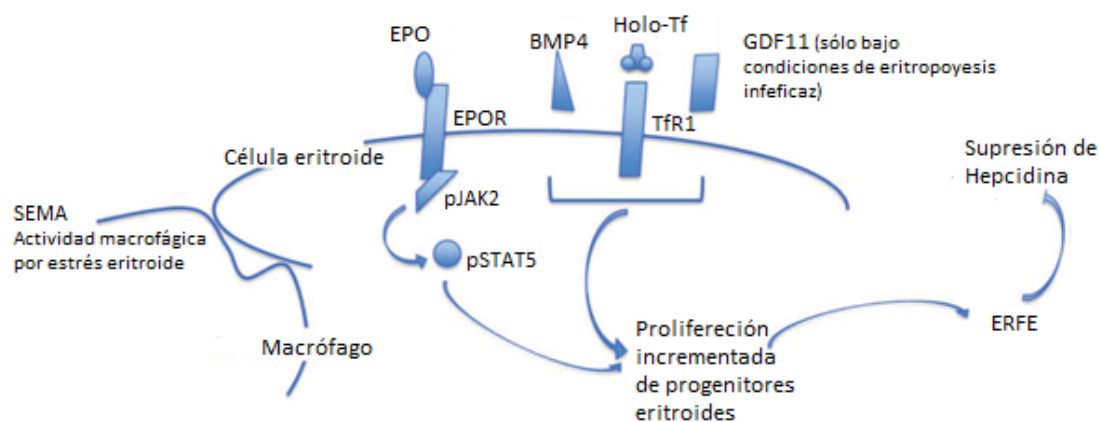


Figura 12: Factores que se requieren en contexto de estrés eritropoyético y la modulación de la síntesis de hepcidina en el Hígado. Se ha asociado GDF11 (factor de crecimiento de diferenciación) con la proliferación aumentada y baja diferenciación que se observa en la eritropoyesis ineficaz.

Imagen adaptada de Iron age: novel targets for iron overload. Carla Casu and Stefano Rivella. Weill Medical College, Cornell University, New York, NY.

La expresión de hepcidina se ve alterada en varias enfermedades tanto hereditarias como adquiridas. En los procesos inflamatorios crónicos donde se ha demostrado un importante aumento de la síntesis de hepcidina, este péptido no sólo sería el regulador fisiológico de la cinética del hierro sino que contribuirían los mecanismos fisiopatológicos de la anemia asociada a procesos inflamatorios crónicos o anemia inflamatoria(27). Por el contrario, niveles disminuidos de hepcidina nos indicarían un exceso de niveles de hierro, que de forma hereditaria lo observaríamos en

la hemocromatosis, y de forma secundaria en la anemia secundaria a una eritropoyesis ineficaz.

Otra proteína que también interviene de alguna manera en la absorción del hierro es la HFE codificada por el gen HFE (acrónimo en inglés entre el HLA-H o complejo mayor de histocompatibilidad y FE como símbolo del hierro). Esta proteína se halla implicada en la hemocromatosis hereditaria HH, se une a la β_2 microglobulina(β_2 MG) que se expresa en la superficie de las células parietales del intestino delgado (duodeno principalmente) e interviene directamente en el proceso de la absorción del hierro no hemínico (28).

Estudios experimentales avalan que la HFE presenta una afinidad por la RTf similar al de la propia Tf, por lo que compite con ella en su unión al mismo(29,30).

Asimismo, los modelos murinos basados en la desactivación genética (knock-out) del HFE y β_2 microglobulina producen cuadros de sobrecarga de Fe con aumento de la absorción intestinal similares a los de la HH. Ello hace suponer que la mutación C282Y, presente en la mayoría de casos de HH, al impedir la unión entre la proteína HFE y la β_2 MG, disminuiría su expresión en la membrana de la célula parietal y el hierro penetraría sin control hacia el interior del organismo.

Otras posibilidades son que la proteína HFE actúe directamente sobre los sensores del hierro a nivel de las criptas de las vellosidades intestinales o sobre la concentración de DMT-1.

Todas las hipótesis referente a la actividad de la HFE en la absorción del hierro se basan exclusivamente en estudio experimentales, y algunas de ellas no se corresponden con lo que sucede realmente en el organismo humano(26).

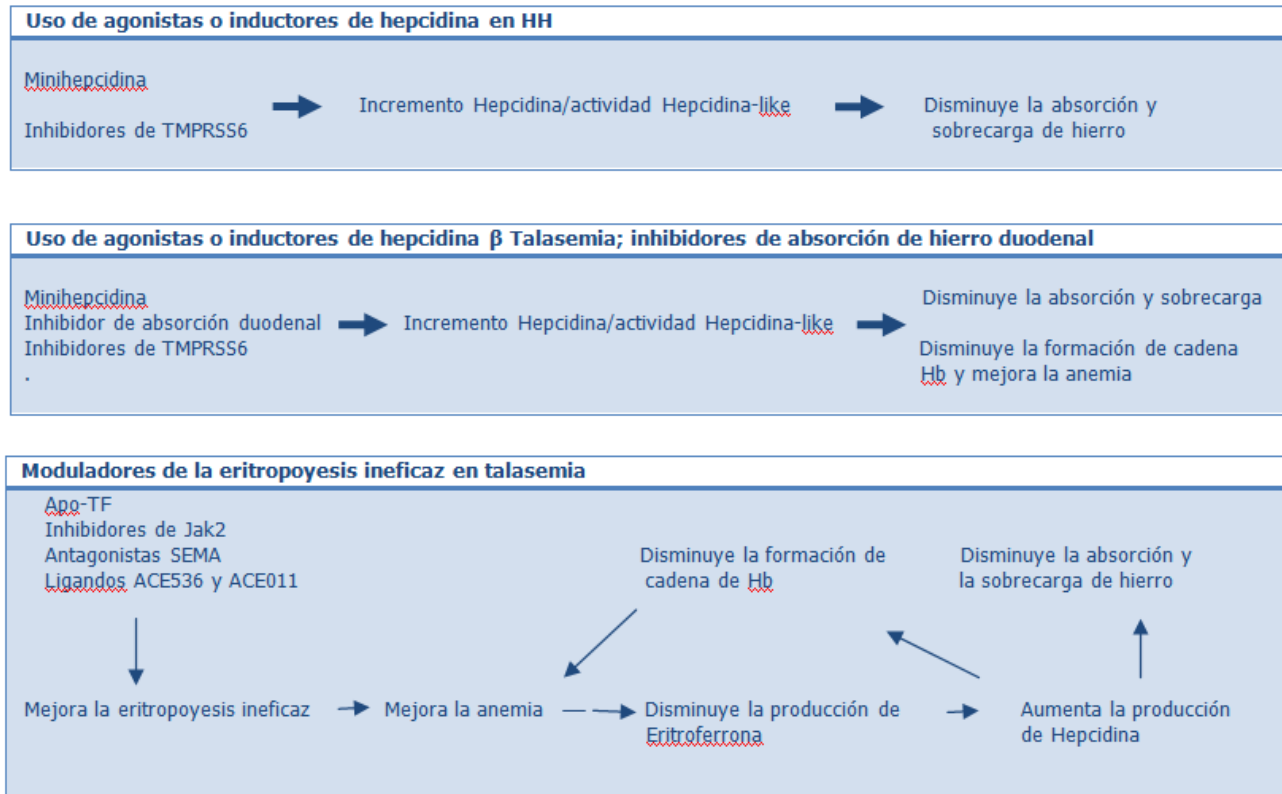


Figura 13: Mecanismos de acción de Minihepcidina e inhibidores TMPRSS en la Hemocromatosis Hereditaria y Talasemia.

(a) Descripción de los potenciales mecanismos de acción y beneficios en el uso de inhibidores TMPRSS6 o minihepcidinas en HH.

(b) Descripción de los potenciales mecanismos de acción y los beneficios del uso de inhibidores TMPRSS6 o minihepcidina en Talasemia.

(c) Descripción de los potenciales mecanismos de acción y beneficios del uso de moduladores en la eritropoyesis ineficaz en la talasemia. La línea discontinua indica una correlación que no se ha demostrado todavía.

Imagen adaptada de Iron age: novel targets for iron overload. Carla Casu and Stefano Rivella. Weill Medical College, Cornell University, New York, NY.

4.3- Metabolismo mitocondrial del hierro.

En el interior de la célula, el hierro es almacenado en forma de ferritina o bien es incorporado a las hemoproteínas (hemoglobina, mioglobina y citocromos) o a enzimas que poseen grupo Fe-S (aconitasa, entre ellas) u otro grupo Fe-Ni, dando lugar al denominado ciclo mitocondrial del hierro.

En el ciclo mitocondrial del hierro hay dos vías importantes: la formación de hemo, que es regulada por la enzima delta-aminolevulínico sintentasa (ALAS), cuyos defectos originan depósitos de hierro en la mitocondria (anemia sideroblástica congénita), y del grupo Fe-S, que es regulada por la Frataxina (FRDA). Los defectos de esta enzima provocan el acúmulo de hierro y un ataque de radicales libres contra las enzimas respiratorias que conforman el cuadro clínico de la ataxia de Friedrich.

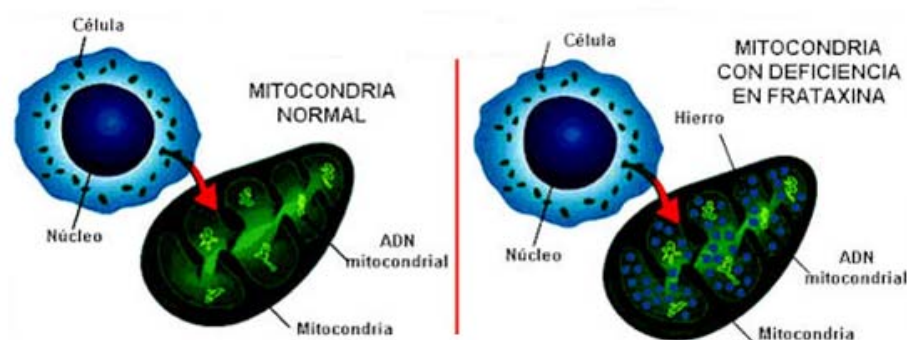


Figura 14: Sobrecarga férrica intramitocondrial como consecuencia del déficit de Frataxina en la Ataxia de Friedrich.

Imagen obtenida de: La comprensión del equilibrio del hierro es vital para tratar la Ataxia de Friedreich. Federación de Ataxia de España.

Recientemente, se ha descrito varias proteínas mitocondriales que transportan hierro en la membrana mitocondrial (pertenecen al grupo de proteínas transportadoras ABC), y cuyo defecto puede condicionar enfermedades mixtas (anemia sideroblástica con ataxia por defectos de la proteína de transporte mitocondrial ABC7).

Una característica de estas proteínas es su síntesis nuclear en forma de precursores citoplasmáticos (p-ALAS, p-FRDA) que han de madurar (proteólisis) para poder acceder a la mitocondria. Se han descrito varias alteraciones durante este proceso de maduración(31) (Figura 15).

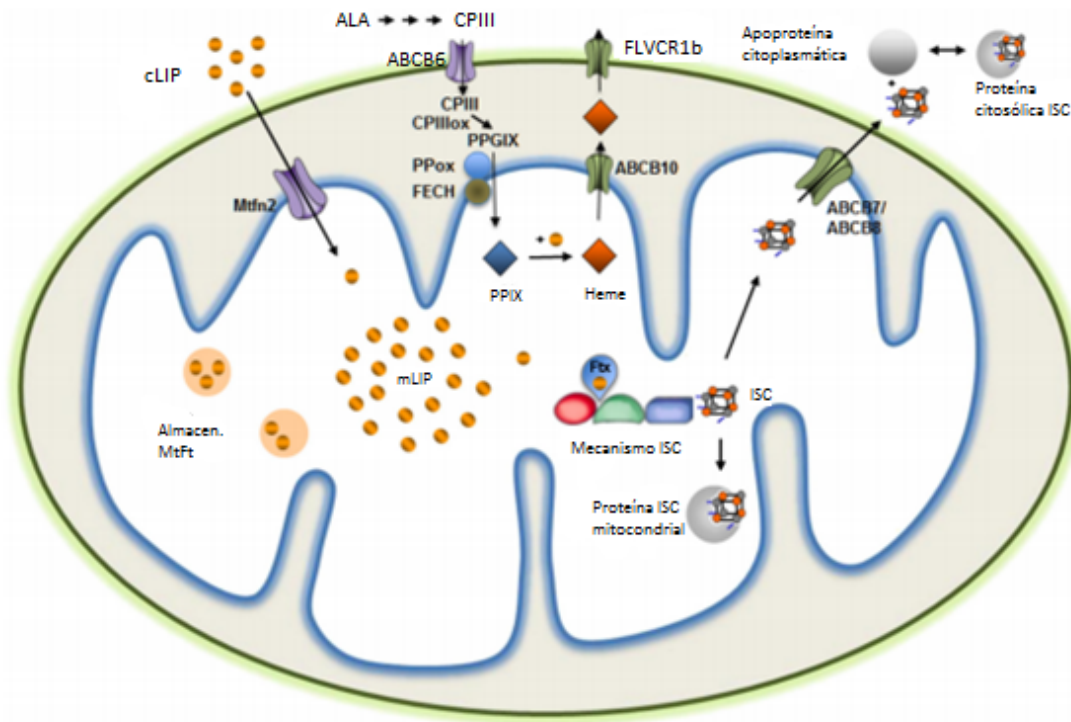


Figura 15: Metabolismo mitocondrial del hierro.

El hierro ferroso del pool férrico intracitoplasmático (cLIP) se introduce en las mitocondrias a través del transportador Mitoferrina (Mtf2n) y pasa a formar parte del pool férrico citosólico mitocondrial (mLIP)(31).

En la matriz mitocondrial, el hierro puede:

- 1) Ser almacenado en la ferritina mitocondrial (FtMt).
- 2) Unirse a la Frataxina (Ftx), una chaperona que favorece la adición del hierro al *Cluster Hierro-Azufre* (Iron-Sulfur Cluster o ISC).
- 3) Se unen a protoporfirina IX para formar hemo.

Imagen adaptada de mitochondrial iron homeostasis and its dysfunctions in neurodegenerative disorders, mitochondrion, volume 21, march 2015, pages 92-105.

Los ISC recién formados, o bien se incorporan como cofactores a las apoproteínas mitocondriales, (por ejemplo a las proteínas encargadas de la cadena transportadora de electrones), o bien son transportados por las proteínas ABCB7 y ABCB8 al citoplasma, (donde se incorporarán a las apoproteínas que requieren ISC).

El primer paso en la biosíntesis del grupo hemo ocurre en la matriz mitocondrial con la formación de ácido D-aminolevulínico (ALA), cuyo mecanismo de transporte al citoplasma es desconocido. En el citoplasma, ALA se convierte mediante una serie de reacciones bioquímicas en la coproporfirina III (CPIII) que es transportada al espacio intermembrana por el transportador ABCB6. La enzima CPIII oxidasa cataliza la descarboxilación de CPIII, para producir protoporfirinógeno IX (PPGIX), que se convierte, gracias a la protoporfirinógeno oxidasa (PPox) (enzima localizada en la membrana mitocondrial interna), en protoporfirina IX (PPIX). Por último, el grupo hemo se forma una vez se añade el Fe^{2+} a la protoporfirina IX, una reacción que es catalizada por la ferroquelatasa (FECH), que también se encuentra en la membrana mitocondrial interna. Tras su síntesis, el grupo heme se transporta al espacio intermembrana, probablemente a través de la ABCB10, y al citoplasma a través de la proteína FLVCR1b.

5.- LIPOPROTEÍNAS

El colesterol (Col) y los triglicéridos (TG) son lípidos insolubles en plasma y dependen de la unión a las lipoproteínas, para poder circular en el torrente sanguíneo y transportarse hacia los diferentes tejidos. Las lipoproteínas participan en la absorción de lípidos dietéticos, necesarios para la producción de hormonas esteroideas, el depósito lipídico y la formación de ácidos biliares.

Las lipoproteínas tienen una estructura compleja compuesta de un núcleo lipídico hidrofóbico y una membrana hidrófila compuesta en su mayoría por fosfolípidos y proteínas. En función de sus características fisicoquímicas, se han clasificado en función de su tamaño y su concentración(32).

Tabla 1. Clasificación de las lipoproteínas.

LIPOPROTEINAS	
Quilomicrones	Son partículas de gran tamaño con una gran cantidad de lípidos, que se asocian con una amplia variedad de apolipoproteínas: A-I, A-II, A-IV, B-48, C-I, C-II, C-III, y E.
Lipoproteína de muy baja densidad (VLDL)	Las VLDL transportan triglicéridos endógenos y en menor grado colesterol. Las principales apolipoproteínas a las que se asocian son B-100, C-I, C-II, C-III, y E.
Lipoproteína de densidad intermedia (IDL)	Las partículas IDL llevan ésteres de colesterol y triglicéridos. Se asocian con las apolipoproteínas B-100, C-III y E.
Lipoproteína de baja densidad (LDL)	Las partículas de LDL transportan ésteres de colesterol y se asocian con las apolipoproteínas B-100y C-III.
Lipoproteína de alta densidad (HDL)	Las partículas HDL transportan esteres de colesterol. Se asocian con las apolipoproteínas (apo) A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, D y E. Las partículas de HDL se subcategorizan en varias subclases en función de sus propiedades fisicoquímicas, se han identificado hasta 47 subclases por espectroscopía(33).

Se ha demostrado que existe una asociación entre un metabolismo de las lipoproteínas disfuncionantes con la aparición prematura de la aterosclerosis, además, se estima que hasta un 70% de los pacientes con enfermedad coronaria presentan dislipemia.

5.1.- Apolipoproteínas.

Las apolipoproteínas son proteínas que se asocian a las lipoproteínas para participar de sus funciones y a su vez funcionar como ligandos para receptores celulares y/o inductores enzimáticos. Es necesario conocer las principales funciones de las apolipoproteínas, dado que un defecto en el metabolismo lipoproteico se traducirá en un diferente manejo clínico de estos pacientes(34).

El ensamblaje y la secreción de las lipoproteínas que contienen apolipoproteína B en el hígado y los intestinos depende de la proteína transportadora de triglicéridos microsomales, la cual se encarga de transferir los lípidos a la apolipoproteína B.

Hay un estudio que ha demostrado que los genes de la apolipoproteína B y de la proteína transportadora microsomal se expresan en el corazón humano, sugiriendo de esta manera que el propio corazón sintetiza y secreta la apolipoproteína B(35). Esto puede representar una vía de “transporte inverso de triglicéridos” mediante la cual los miocitos cardiacos pueden descargar los ácidos grasos excedentes que no se requieran como fuente de energía.

5.2.- Quilomicrones.

5.2.1.- Síntesis y secreción de quilomicrones.

La formación de quilomicrones es un complejo proceso semejante a la formación hepática de VLDL, pero a diferencia de éste, tiene lugar en el intestino delgado(36).

Tras la ingesta, los enterocitos absorben los ácidos grasos lumbinales y a través de la acción de enzimas como la diacilglicerolacil-transferasa1 (DGAT1), son esterificados a triglicéridos. Por otro lado, el colesterol es capturado a través de la proteína transportadora NPC1L1 y es transformado a colesterol esterificado (CE) a través de la enzima acilcolesterol aciltransferasa1 (ACAT1)(37).

Por otro lado, el enterocito sintetiza la apolipoproteína B48, (isoforma de la apolipoproteína B100 que contiene sólo el 48% de la secuencia de apo B100, excluyendo el extremo amino terminal correspondiente a la región de unión al receptor LDL), e irá aceptando lípidos complejos, como fosfolípidos, colesterol esterificado y sobre todo triglicéridos que serán transferidos por la acción de la MTP (*Microsomal Transference Protein*; proteína de transferencia microsomal)(38). Finalmente, el quilomicrón madurará en el aparato de Golgi y será transferido por exocitosis a la linfa mesentérica(39).

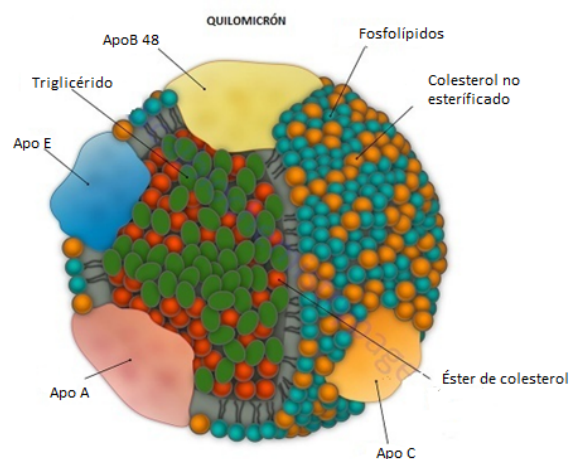


Figura 16: Quilomicrón. *Imagen adaptada de The Medical biochemistry Page.*

5.2.2.- Catabolismo de los quilomicrones.

Los quilomicrones en circulación periférica adquieren apolipoproteínas E (Apo E), CII (Apo CII) y CIII (Apo CIII), esenciales para su destino metabólico, a la vez que se desprenden de apolipoproteína AIV (Apo AIV) y fosfolípidos. Estas partículas maduras son capaces de interactuar con los proteoglicanos del endotelio(40).

La Apo CII de superficie activa la lipoproteín-lipasa a nivel endotelial, iniciándose así su cascada lipolítica que permite la cesión de ácidos grasos a los tejidos periféricos, fundamentalmente a músculo y tejido adiposo.

Los quilomicrones parcialmente deslipidados interaccionan nuevamente con las HDL intercambiando fosfolípidos y triglicéridos por ésteres de colesterol gracias a la acción de los enzimas PLTP (*Phospholipid Transfer Protein*; proteína de transferencia de fosfolípidos) y CETP (*Cholesteryl Ester Transfer Protein*; proteína de transferencia de ésteres de colesterol) respectivamente.

La hidrólisis de los triglicéridos, tiene como resultado la obtención de quilomicrones remanentes. Estas partículas contienen menos triglicéridos, fosfolípidos, más colesterol esterificado, y mantienen la apoB-48 y otras apolipoproteínas como la apoE.

La apoE se une al receptor LDL y a otros como el receptor relacionado con la lipoproteína de baja densidad LRP1 en el hígado, permitiendo su salida de forma rápida de la circulación.

Una vez en el hígado, los quilomicrones remanentes van a los lisosomas para su degradación por la lipasa ácida liposomal (LAL), generándose ácidos grasos y colesterol no esterificado.

El nivel sanguíneo de triglicéridos permanece estable tras la ingesta gracias a la capacidad de regulación del sistema para manejar una gran carga lipídica. En las personas con una actividad LPL normal los quilomicrones están presentes en la circulación tras la ingesta, desapareciendo tras un ayuno de cuatro a ocho horas.

5.3.- Lipoproteína de muy baja densidad (VLDL).

La VLDL es la lipoproteína de muy baja densidad, sintetizada en el hepatocito y que participa de forma muy importante en el metabolismo de las lipoproteínas. Su síntesis se realiza de forma más activa en situaciones de ayuno, en donde los adipocitos son los encargados de suministrar los ácidos grasos para dicho proceso.

Durante el ayuno, los niveles de insulina disminuyen y da paso a la activación de las vías de la lipólisis que favorecen la hidrólisis de los triglicéridos del tejido adiposo y posterior liberación de los ácidos grasos. Los ácidos grasos se transportan hasta el hígado por proteínas como la albúmina.

La VLDL se secreta a la circulación periférica y se transporta hasta los tejidos, en especial al músculo esquelético, donde se hidroliza por la lipoproteína lipasa (LPL) y libera ácidos grasos. Tras la lipólisis de la VLDL se genera una nueva partícula, la VLDL remanente o también conocida como lipoproteína de densidad intermedia (IDL), que a su vez, adquiere la apolipoproteína E. Gracias a la apoE podrá posteriormente unirse al receptor de la LDL, entre otros, para volver al hepatocito.

Estas partículas, que contienen apoB-100, son convertidas por la lipasa hepática en LDL. Durante el proceso los triglicéridos se hidrolizan y las apolipoproteínas se transfieren a otras lipoproteínas.

5.4.- Lipoproteína de baja densidad (LDL).

Las partículas de LDL contienen un núcleo de ésteres de colesterol, triglicéridos en menor cantidad y están enriquecidas en apolipoproteína B-100, que a su vez es el ligando para la unión al receptor de apo B/E. Es la lipoproteína con mayor carga de colesterol del organismo y transporta más de la mitad del colesterol del plasma.

La LDL puede internalizarse en diferentes tejidos. El colesterol LDL hepático (70%) una vez endocitado mediante el receptor apo B/E (LDL), puede convertirse en ácidos biliares que posteriormente serán secretados a la luz intestinal. El colesterol LDL no hepático se utilizará para la producción de hormonas, la síntesis de membranas celulares o bien se almacenará en su forma esterificada.

La internalización del LDL se regula mediante los requerimientos de colesterol celular a través de un sistema de retroalimentación negativa de la expresión del receptor de apo LDL(41). Aquellas células que tengan un balance positivo de colesterol suprimirán el receptor LDL. Por otro lado, aquellas que tengan una actividad disminuida de la HMG coA reductasa (enzima encargada de controlar la síntesis *de novo* de colesterol celular), conduce secuencialmente a niveles bajos de colesterol intracelular, a un aumento de la expresión de los receptores de LDL, al posterior incremento en la captación de colesterol de la circulación y a una reducción de la concentración de colesterol en plasma.

Por otro lado, las LDL químicamente modificadas, como las LDL oxidadas, pueden penetrar en los macrófagos y otros tejidos a través de receptores de eliminación. Esta vía produce una acumulación excesiva de colesterol intracelular, que favorece la formación de células espumosas, y que a su vez contribuyen a la formación de placas ateroma.

La importancia del receptor de LDL en la regulación del metabolismo del colesterol ha sido demostrada tanto en animales experimentales como en seres humanos. Se han empleado ratones transgénicos *Knock-out* para el receptor de la LDL, en los que se ha observado una elevación sustancial en los niveles de colesterol total, defecto que se revierte al restaurar el gen del receptor LDL(42). En los seres humanos, la hipercolesterolemia familiar puede asociarse también con un defecto en el receptor de LDL(43). Es bien conocido que las partículas de LDL, elevan el riesgo de padecer eventos cardiovasculares, por ello se ha convertido en la actualidad una de las principales dianas terapéuticas para prevenir estas enfermedades.

5.5.- Lipoproteína de alta densidad (HDL).

La HDL es la lipoproteína con mayor densidad, dado que contiene una menor cantidad de lípidos y mayor proporción de proteínas. La HDL está constituida por

diferentes proteínas, siendo la más abundante la apo A-I (70%), que se sintetiza en el intestino y en el hígado. La segunda proteína más frecuente es la apo A-II (20%).

Las lipoproteínas de alta densidad, tienen un papel protector frente al desarrollo de la arteriosclerosis y la aparición de los eventos clínicos producidos por esta patología. El mecanismo mayoritariamente responsable de este efecto protector es la participación de la HDL en el transporte reverso de colesterol, mecanismo mediante el cual se transporta el exceso de colesterol desde los tejidos periféricos hacia el hígado, donde es almacenado o excretado en forma de sales biliares por la secreción biliar. Aparte de este papel antiaterogénico fundamental, en la última década se han descrito nuevos mecanismos antiaterogénicos de las HDL que pueden tener tanta relevancia como el transporte reverso (Figura 17)(44). Estos mecanismos son principalmente dos; su capacidad para prevenir la oxidación de las lipoproteínas de alta densidad (LDL) y de su actividad antiinflamatoria(45).

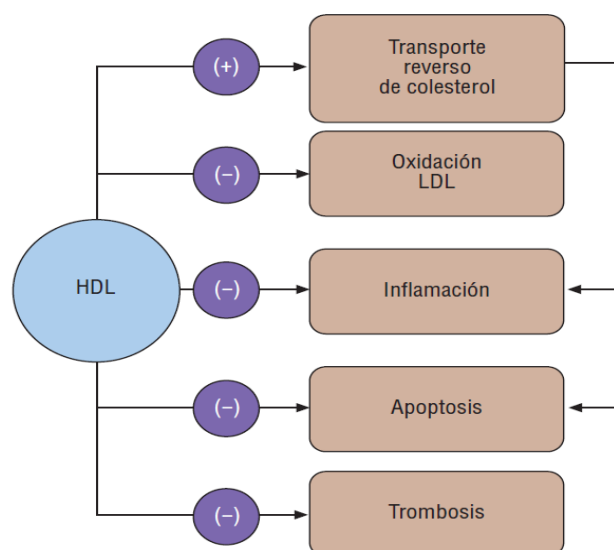


Figura 17: Principales funciones antiaterogénicas de las lipoproteínas de alta densidad (HDL).

Imagen obtenida de *Propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de las lipoproteínas de alta densidad*. J.L. Sánchez Quesada y J. Ordóñez Llanos. *Clínica e investigación en Aterosclerosis*.

El metabolismo de las partículas de HDL es un fenómeno complejo que incluye varios pasos(46).

- 1- La HDL nace de la síntesis hepática e intestinal de pequeñas partículas compuestas de fosfolípidos y apolipoproteínas.
- 2- Progresivamente adquieren componentes de superficie (fosfolípidos, colesterol y apolipoproteínas) a partir de quilomicrones deplecionados de triglicéridos y remanentes de VLDL
- 3- Adquieren colesterol libre (no esterificado) de los tejidos (como el hígado y los macrófagos de la pared arterial) y otras lipoproteínas. Las partículas primarias de HDL contienen relativamente poco colesterol.

5.6.- Lipoproteína (a).

La lipoproteína(a) o Lp(a) es una forma especializada de LDL que se forma extracelularmente a partir de apolipoproteína (a) y LDL. Apo(a) se une a la apolipoproteína B-100 en la superficie de LDL por puentes disulfuro. Además, la formación de los complejos apo(a): apo B requiere una partícula LDL de cierta morfología y composición. LCAT es la encargada de modular la integridad estructural de LDL, y participa en la formación de Lp(a)(47).

La cadena de apo(a) contiene cinco dominios, de los cuales cuatro tienen regiones que son homólogas a los dominios de unión de fibrina al plasminógeno. A través de esta similitud estructural con el plasminógeno, la Lp(a) interfiere en la fibrinólisis al competir en la unión del plasminógeno con sus receptores de plasminógeno, fibrinógeno y fibrina. El efecto neto es una alteración de la activación del plasminógeno y la generación de plasmina en la superficie del trombo, lo que conlleva una disminución de la trombolisis(48,49).

La Lp(a) puede unirse a los macrófagos por un receptor de alta afinidad, favoreciendo la formación de células espumosas y la producción de placas de ateroma(50).

5.7.- Metabolismo de las Lipoproteínas.

El tejido adiposo es el órgano encargado del almacenaje lipídico, proveniente de los quilomicrones de la dieta y las VLDL hepáticas.

El metabolismo de las lipoproteínas puede dividirse en dos vías principales: la exógena y la endógena.

5.7.1.- Vía exógena.

La vía exógena comienza con la absorción intestinal de colesterol y ácidos grasos en la dieta. Una vez en el organismo, estos lípidos se emulsifican mediante las sales biliares, las cuales favorecen la formación de micelas compuestas de TG.

Posteriormente, la lipasa pancreática será la encargada de convertir estos triglicéridos en monoglicéridos, diglicéridos, ácidos grasos libres y glicerol, que serán absorbidos por el intestino delgado y se empaquetarán para formar los quilomicrones.

Hasta el momento no se ha clarificado con exactitud cuál es el mecanismo regulador que marca la cantidad de lípidos que se absorbe. Si bien se conoce que en casos de Sitosterolemia (enfermedad recesiva rara, asociada a una hiperabsorción intestinal de colesterol y esteroides vegetales)(51), existen genes que se expresan en hígado e intestino, que se sobre-expresan (“*Up-regulation*”) en función de una mayor absorción intestinal. Por ello podríamos pensar que puedan también colaborar en la limitación de la absorción fisiológica de los esteroides en el intestino(52).

Una vez dentro del enterocito, los ácidos grasos libres se combinan con glicerol para formar triglicéridos, y el colesterol es esterificado por acil-coenzima A colesterol aciltransferasa (ACAT) para formar los ésteres de colesterol.

La importancia de esta enzima se estableció en un modelo animal, en el que se observó que una deficiencia de ACAT se traduciría en una total resistencia a la

hipercolesterolemia inducida por dieta, debido a la falta de síntesis de ésteres de colesterol y su incapacidad para absorber el propio colesterol(53).

A raíz de este descubrimiento se iniciaron ensayos clínicos, cuyos resultados indicaban sin embargo, que los inhibidores de ACAT podían empeorar la aterosclerosis(54,55)

Los triglicéridos y el colesterol se ensamblan intracelularmente en forma de quilomicrón. La principal apolipoproteína es la B-48, pero C-II y E se van adquiriendo conforme el quilomicrón entra en la circulación. La apo B-48 permite su unión al quilomicrón, sin embargo, no lo hace al receptor LDL, impidiendo así la eliminación prematura de quilomicrones de la circulación, antes de que la lipoproteína lipasa (LPL) pueda actuar sobre ellos, liberando los ácidos grasos libres y el glicerol.

La apo C-II es un cofactor de la LPL que favorece que el quilomicrón se haga progresivamente más pequeño; mediante la hidrolización del núcleo de triglicéridos y liberando los ácidos grasos libres. Estos ácidos grasos libres se utilizarán como fuente de energía, se transformarán en triglicéridos o se almacenarán en el tejido adiposo.

El producto final del metabolismo del quilomicrón son los remanentes de quilomicrón que son eliminados de la circulación a través del receptor hepático de remanentes de quilomicrón; receptor para el cual la apoE es un ligando con una alta afinidad.

Los remanentes de quilomicrón contienen un núcleo lipídico más pequeño envuelto por una superficie con varios componentes, los cuales después serán necesarios para formar las HDL

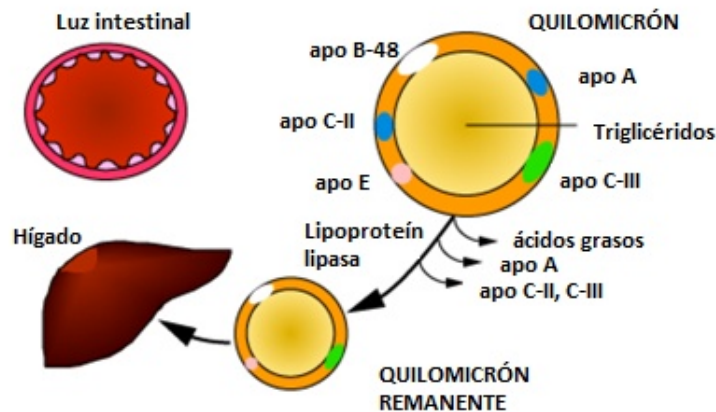


Figura 17: Vía exógena del metabolismo lipídico. Imagen adaptada de UptoDate.

5.7.2.- Vía endógena.

La vía endógena del metabolismo lipídico tiene su origen en la síntesis hepática de VLDL (figura 19), a partir de lípidos, colesterol endógeno y remanentes de quilomicrones. Las partículas de VLDL contienen un núcleo rico en triglicéridos (hasta el 60%) y ésteres de colesterol (20%).

Los triglicéridos que provienen de las partículas de VLDL son hidrolizados por la lipoproteína lipasa. Durante la lipólisis, el núcleo de la VLDL se va reduciendo, generando remanentes de VLDL (conocidos también como IDL o lipoproteína de densidad intermedia), que son deplecionadas de triglicéridos a través de un proceso similar al de la generación de quilomicrones remanentes. Algunos de los componentes superficiales de la partícula remanente, incluyendo fosfolípidos, colesterol no esterificado y apolipoproteínas A, C y E, se transfieren a lipoproteínas de alta densidad (HDL).

Para llevar a cabo todo este proceso es importante la proteína transportadora de triglicéridos microsomal (MTP), la cual se encuentra intracelular en el retículo endoplasmático. Esta proteína es esencial para el transporte de los triglicéridos y otros lípidos hasta la apolipoproteína (apo) B100 en el hígado(56). Recordemos que en la superficie de la VLDL se encuentra el cofactor de la lipoproteína lipasa apo C-II, la apo C-

III que inhibe dicha enzima y la apo B-100 y apo E que son ligandos para el receptor LDL(34). Existe una enfermedad genética rara que implica la ausencia de la MTP y que conlleva la incapacidad de secretar la VLDL a la circulación; dicha enfermedad se conoce como abetalipoproteinemia.

Los remanentes de VLDL se eliminan de la circulación, bien por el receptor LDL o por los receptores remanentes, o bien pueden formar partículas de LDL mediante la acción de la lipasa hepática.

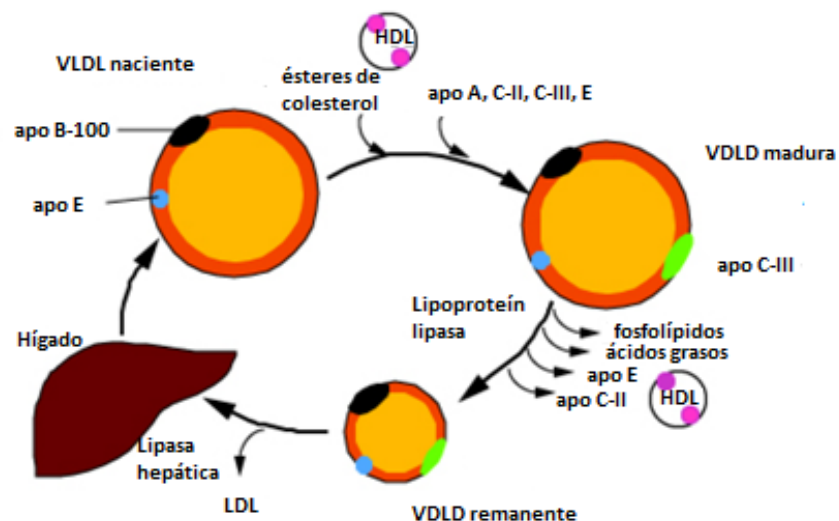


Figura 18: Vía endógena del metabolismo lipídico. Imagen adaptada de UptoDate.

7.- ADIPOCITOCINAS

Además de su importante función en el almacenamiento de grasas, el tejido adiposo es considerado en la actualidad un órgano endocrino, con alta actividad, que expresa y secreta una gran variedad de moléculas con actividad biológica. Estas moléculas actúan localmente, de forma autocrina y paracrina y a nivel sistémico, con efecto endocrino. Su actividad se lleva a cabo en diversos órganos como cerebro, hígado, músculo, gónadas, órganos linfoides y vasculatura sistémica, entre otros.

Así mismo el tejido adiposo también presenta numerosos receptores que le permiten recibir señales aferentes de hormonas endocrinas como la insulina, el glucagón y la angiotensina II y provenientes del sistema nervioso central como citocinas y catecolaminas(57).

7.1.- Leptina.

La leptina se produce en el adipocito y se secreta de forma proporcional a la masa adipocitaria. La leptina es una hormona de 146 aminoácidos que se produce a partir de un precursor de 167 aminoácidos con una “secuencia señal” de 21 aminoácidos que se escinde antes de que pase al torrente circulatorio. Presenta una estructura terciaria y es codificada por el gen *ob* que se encuentra en la zona cromosómica 7q31.3. Es sintetizada y segregada por el adipocito, y en menor medida por los miocardiocitos, hepatocitos y las células endoteliales(58).

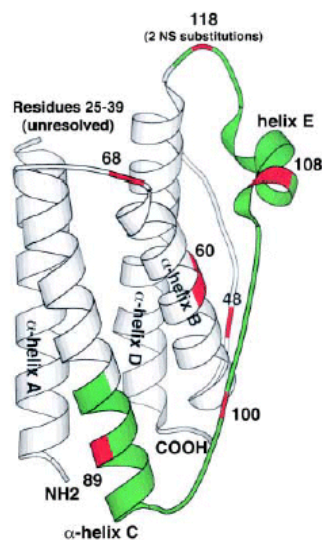


Figura 19: Estructura de la Leptina.

La secreción de la proteína *ob* se produce principalmente a nivel del tejido adiposo blanco, y específicamente en el humano adulto en los depósitos subcutáneos, lo que permitió proponer a la leptina circulante como señal del tamaño del tejido adiposo y como factor saciante a nivel de sistema nervioso central(59). Las concentraciones de leptina en el organismo se ven modificadas por el sexo, la edad, la ingesta calórica y el IMC(60,61)

Para un mismo IMC la concentración sérica de leptina es de dos a tres veces superior en la mujer que en el hombre(62), debido a la mayor proporción de grasa subcutánea y a los estrógenos(63). Los estrógenos, glucocorticoides e insulina son reguladores positivos de la leptina, mientras que los ácidos grasos de cadena larga, los andrógenos y las catecolaminas inhiben su síntesis(62).

Se la considera la hormona más importante en la fisiopatología de la obesidad, si bien la mayoría de casos de obesidad se debe a un modelo de leptino-resistencia y no a alteraciones de la leptina. Desde su descubrimiento hasta la actualidad, se ha confirmado que está implicada en importantes funciones fisiológicas, tanto a nivel del sistema nervioso central como de órganos periféricos. Una vez secretada a la circulación sistémica, la leptina puede atravesar la barrera hematoencefálica y desencadenar

procesos relacionados con el incremento del gasto energético, la disminución de la ingesta, y procesos metabólicos y neuroendocrinos.

La función principal de esta hormona es la de controlar la saciedad a través de una señalización hipotalámica, cuya intensidad se verá modificada en función de la masa grasa corporal. En humanos la deficiencia de leptina o la resistencia a la misma está asociada de forma directa con la obesidad y la resistencia a la insulina.

La leptina tiene otras acciones biológicas sobre tejidos periféricos como el páncreas, además de su efecto sobre el sistema nervioso central(64).

Existen estudios preliminares sobre modelos murinos “*knock out*” (KO) para el gen del receptor pancreático específico de leptina. En dicho estudio, se comparó estos ratones con otros “control” y se les expuso a una dieta normal y otra con alto contenido en grasa. La ausencia de señalización del receptor de la leptina en los ratones KO alimentados de forma equilibrada, produjo una mayor tolerancia a la insulina en comparación con los ratones control. La administración de la dieta en alto contenido graso hizo aumentar de peso y la resistencia a la insulina en ambos grupos.

Los resultados de dicho estudio demostraron que los ratones control desarrollaron una hiperplasia de los islotes pancreáticos para compensar la resistencia periférica a la insulina y los ratones KO presentaron un rápido deterioro de la respuesta de la insulina a la glucemia y un pobre crecimiento de los islotes pancreáticos. Estos resultados sugieren un papel importante de la leptina sobre la presencia de resistencia a la insulina en función de la dieta.

Sin embargo, serán precisos estudios adicionales para determinar el valor de la leptina en la regulación de la masa celular beta pancreática, y si la señalización anormal de la leptina sobre su receptor en los islotes juega un papel en la patogénesis de la obesidad vinculada con la diabetes tipo 2 (DM2).

Hay evidencia de que la leptina aumenta en la obesidad, la DM2, hipertensión y SM. Numerosas publicaciones en adultos sugieren la leptina como un biomarcador para la obesidad, la RI y SM(65).

7.2.- Adiponectina.

La adiponectina es una adipocitocina secretada por los adipocitos que regula el metabolismo energético del organismo, ya que estimula la oxidación de ácidos grasos, reduce los triglicéridos plasmáticos y mejora el metabolismo de la glucosa mediante un aumento de la sensibilidad a la insulina. Además, la adiponectina inhibe las fases iniciales de la aterosclerosis, ya que reduce la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, la transformación de macrófagos en células espumosas, la expresión del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la proliferación de células de tejido muscular liso. Diferentes estados de resistencia a la insulina, como la obesidad y la DM2, o el desarrollo de enfermedades cardiovasculares se han asociado con una reducción de los valores de adiponectina plasmática.

7.2.1.- Estructura y síntesis de la adiponectina.

La adiponectina es una hormona proteica que fue identificada entre 1995 y 1996 por distintos grupos de investigadores, por ello es conocida con diferentes nombres aunque la de origen humano se conoce como apM1 y GPB287(66).

Estructuralmente, la adiponectina es una proteína con un peso molecular de aproximadamente 30 kDa, constituida por 244 aminoácidos. El locus del gen que codifica para la adiponectina se localiza en el cromosoma 3, concretamente en el locus 3q27.

La *apM1* consta de 2 intrones y 3 exones que codifican para una proteína de 244 aminoácidos que consiste en 4 dominios (fig. 21)(67): un péptido señal de 20 aminoácidos, una región N-terminal variable sin homología conocida, una región colágena y un dominio globular C-terminal(68,69).

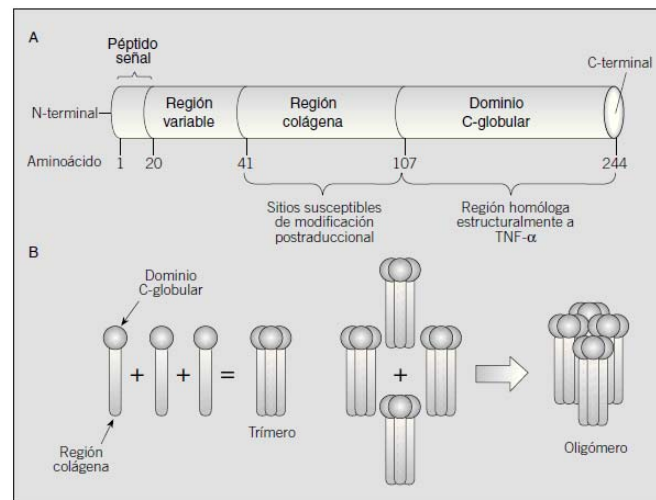


Figura 20: Estructura primaria de la adiponectina humana y modelo de ensamblaje de la adiponectina humana.

Imagen obtenida de *Adiponectin: a new link between obesity, insulin resistance and cardiovascular disease*. Xavier Palomer, Antonio Pérez, Francisco Blanco-Vaca. Vol. 124. Núm. 10. Marzo 2005 páginas 0-400

La unidad estructural básica de la adiponectina es un trímero fuertemente asociado, formado por la unión de 3 monómeros mediante el dominio globular. Los trímeros de adiponectina pueden asociarse, a su vez, en grupos de 4 a 6 unidades mediante el dominio colágeno, formando oligómeros altamente estructurados.

Un factor determinante para la función de la adiponectina es su oligomerización. El dominio globular participa en la estimulación de la oxidación de ácidos grasos en el tejido esquelético (Receptor AdipoR1)(70), mientras que los hexámeros y oligómeros activan la señalización a través del factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B) (Receptor AdipoR2) de predominio hepático.

La unión de la adiponectina con su receptor celular aumenta la actividad proteín-quinasa de AMP, ello desencadena una cascada metabólica cuyo resultado es el aumento de la beta oxidación de los ácidos grasos, el incremento de la entrada de glucosa en los tejidos y mejora la sensibilidad a insulina.

7.2.3.- Regulación de la adiponectina.

La adiponectina es una proteína presente en el plasma, que constituye aproximadamente el 0,01% del total de las proteínas plasmáticas humanas(71). Se encuentra en concentraciones entre 5-30 µg/ml, y en condiciones fisiológicas se expresa en los adipocitos. Su concentración en el plasma depende del sexo, (menor en los varones que en las mujeres), de la edad o la etnia.

Se han realizado estudios *in vitro* que han demostrado que la insulina y el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) estimulan la expresión génica de la adiponectina y favorece a su vez su secreción en los adipocitos cultivados. Por otro lado, también están involucrados en la regulación de la síntesis de adiponectina los receptores activadores de la proliferación peroxisomal (PPAR). De tal forma que se ha demostrado en modelos animales que los agonistas de PPAR α (fibratos) reducen la expresión de adiponectina, mientras que los agonistas de PPAR γ (tiazolidinedionas o TZD) inducen su expresión(72). Es importante tener en cuenta que la adiponectina presenta ritmo circadiano, presentando el mayor pico a primera hora de la mañana y una disminución de sus niveles en horario nocturno.

7.2.3.- Acciones metabólicas de la adiponectina.

La adiponectina es una hormona secretada por el tejido adiposo, que produce un efecto beneficioso sobre el metabolismo lipídico, dado que reduce la cantidad de ácidos grasos libres en sangre y se ha asociado con una mejoría del perfil lipídico, de la glucemia y del proceso inflamatorio del paciente diabético.

1.- *Acciones antidiabéticas:* Hay estudios en los que se han realizado múltiples observaciones en las que se sugiere que la deficiencia de adiponectina, juega un papel esencial en el desarrollo de la resistencia a la insulina y DM2.

Se ha observado que los niveles disminuidos de adiponectina se correlacionan de forma estrecha con la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia en comparación con la adiposidad o la intolerancia a la glucosa(73).

Existen diversos estudios realizados con ratones lipoatróficos u obesos, en los que la administración de adiponectina disminuye el grado de resistencia a la insulina(72), y otros en los que se observa cómo incrementan las concentraciones plasmáticas y adipocitarias de TNF α , al suprimir el gen de la adiponectina, lo cual se ha correlacionado con un aumento de la resistencia a la insulina severa.

Tanto la adiponectina como sus receptores, podrían ser dianas importantes en el manejo de la diabetes. Su fuerte asociación con la diabetes, ha hecho que se desarrollen estudios en los que se propone la adiponectina como un valor predictivo de la progresión de dicha enfermedad(74).

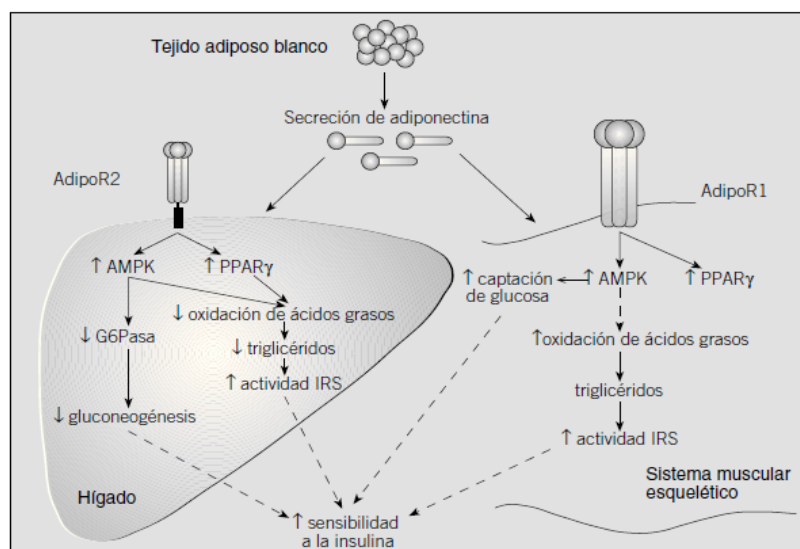


Figura 21: Mecanismo de acción de la adiponectina sobre la sensibilidad a la insulina en el hígado y el tejido muscular esquelético.

AMPK: 5'-AMP cinasa; G6Pasa: glucosa 6-fosfatasa; IRS: sustrato receptor estimulado por insulina; PPAR: receptores activados del peroxisoma proliferador.

Imagen obtenida de Adiponectin: a new link between obesity, insulin resistance and cardiovascular disease. Xavier Palomer, Antonio Pérez, Francisco Blanco-VacaVol. 124. Núm. 10.Marzo 2005 páginas 0-400

2.- *Acciones antiaterogénicas:* Se han realizado estudios clínicos en los que se ha demostrado que aquellos pacientes con disfunción endotelial, presentan concentraciones disminuidas de adiponectina(75). En un estudio realizado con pacientes con enfermedad renal terminal, se ha podido constatar el papel antiaterogénico de la adiponectina, ya que se han observado concentraciones disminuidas de adiponectina. Se ha propuesto como un marcador de valor predictivo para eventos cardiovasculares(76), ya que los estudios muestran que la adiponectina tiene un papel antiaterogénico, gracias a que impide la formación de la placa de ateroma en varias de sus etapas.

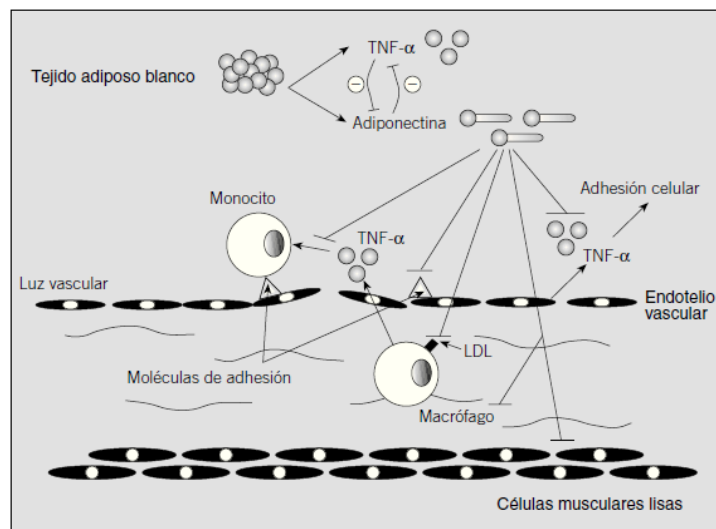


Figura 22: Efectos antiaterogénicos de la adiponectina.

Imagen obtenida de *Adiponectin: a new link between obesity, insulin resistance and cardiovascular disease*. Xavier Palomer, Antonio Pérez, Francisco Blanco-Vaca. Vol. 124. Núm. 10. Marzo 2005 páginas 0-400

La adiponectina reduce el proceso aterogénico principalmente porque:

- Inhibe la expresión de moléculas de adhesión y evita la adhesión de monocitos.
- Impide la captación y acumulación de lipoproteínas de baja densidad modificadas en macrófagos por inhibición del receptor SR-A1.
- Reduce la capacidad proliferativa de células musculares lisas y macrófagos.

3.-*Acciones antiinflamatorias*: La adiponectina ejerce un efecto antiinflamatorio sobre el sistema macrofágico, mediante la supresión de citoquinas proinflamatorias y el favorecimiento en la producción de citoquinas antiinflamatorias(77,78). El efecto antiinflamatorio se traduce en la inhibición de producción del factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) en el hígado.

7.3.- Factor de necrosis tumoral- α .

El TNF- α es una citoquina proinflamatoria sintetizada como una proteína transmembrana no glicosilada de 26 kDa que contiene una secuencia hidrofóbica.

La enzima metaloproteasa TACE (*TNF-alpha converting enzyme*), realiza la proteólisis que produce un fragmento de 14 kDa y un fragmento de 17 kDa; éste último es el que circula como homotrímero.

El TNF- α lo secretan los monocitos, macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, células NK y los leucocitos polimorfonucleares. Además, también puede ser secretado por otros tipos celulares como los adipocitos(79,80).

Entre los efectos biológicos del TNF α se incluyen la activación y diferenciación de monocitos, el aumento de la actividad parasitocida y bactericida de los macrófagos, mediante la inducción de las vías del superóxido y del óxido nítrico, favorece la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales encargadas de la migración local de leucocitos, la inducción de apoptosis, la citotoxicidad de células tumorales, favorece la respuesta proliferativa a IL-2 aumentando el receptor de IL-2 en linfocitos T y por consiguiente, aumento de la respuesta de los linfocitos B estimulados. Por otro lado, el TNF- α tiene efectos fisiopatológicos al ser secretado en grandes cantidades en enfermedades agudas y crónicas, sepsis, infecciones crónicas, inflamaciones crónicas y cáncer. Hotamisligil y cols. publicaron el primer estudio que relacionó la obesidad con el TNF- α . Se conoce que la expresión de TNF- α está incrementada en los adipocitos de los sujetos obesos y con resistencia a la insulina.

El TNF- α tiene dos tipos de receptores biológicamente activos, tipo 1 y tipo 2, que son expresados en muchas células(81,82). Hay estudios que correlacionan de forma

directa el IMC y el índice cintura/cadera con la sobreexpresión del receptor 2(83,84). Por tanto, se ha descrito que en sujetos obesos los niveles séricos de TNF- α son mayores, y que la pérdida de peso reduce los niveles séricos(85) y la expresión del mRNA del TNF- α en tejido adiposo(86). También se ha demostrado una actividad paralela entre la elevación de TNF- α con la presencia de resistencia a la insulina, así como su relación con las alteraciones lipídicas dentro del SM, estimulando la síntesis de triglicéridos (TG) y de VLDL(87). En cuanto a su relación con la hipertensión arterial, se ha comprobado también un paralelismo entre las cifras sistólicas y los niveles de TNF- α (88).

En definitiva, se considera el TNF α un mediador proinflamatorio, proaterogénico, favorecedor de resistencia a la insulina y dislipemia, alterando la función adipocitaria y su poder de expansión(89,90).

7.4.- Interleuquina-6.

La IL-6 es una citoquina intermediaria en procesos inflamatorios. Una tercera parte de su concentración la producen los adipocitos de la grasa visceral del tejido adiposo.

Una de las funciones de la IL-6 es reducir la expresión de lipoproteína lipasa (LPL), acción que se ve asociada con la concentración de triglicéridos, VLDL y ácidos grasos libres postprandiales. De esta forma, se considera que la IL-6 tiene una importante relación con la dislipemia, debido a su papel en la regulación de la captación de ácidos grasos libres (AGL) por el tejido adiposo(91), y se considera que tiene capacidad predictiva del riesgo de desarrollo de DM2(92).

También, se correlaciona de forma significativa con el IMC, la hipertensión y alteraciones de la coagulación, mediante la inducción de la síntesis de fibrinógeno(93).

7.5.- Proteína C Reactiva ultrasensible.

La PCR es una proteína reactante de fase aguda descrita en 1930, que ha sido considerada clásicamente como marcador de inflamación.

La PCR es una globulina con una masa molecular de aproximadamente 118 KDa compuesta por 5 subunidades globulares cíclicas idénticas, clasificada como un miembro de la superfamilia de las pentraxinas.

La PCR es sintetizada y secretada principalmente por los hepatocitos(93) en respuesta a citoquinas tales como las interleuquinas 1 y 6 (IL-1, IL-6) y el factor de necrosis tisular alfa (TNF- α) y por otro lado, su producción se ve disminuida por efecto de la insulina.

En condiciones normales la síntesis hepática corresponde a niveles menores de 1 mg/L, que en general pueden elevarse en el plasma en procesos infecciosos, condiciones inflamatorias y en la enfermedad cardiovascular (ECV); se induce un marcado incremento en su síntesis hepática cuando hay inflamación aguda o daño tisular y sus niveles séricos pueden elevarse hasta 100 veces dentro de las primeras 24 a 48 horas(94).

7.5.1.- Funciones biológicas de la PCR.

La PCR juega un papel importante en la defensa de los organismos, papel que cumple induciendo la activación del complemento, la opsonización y la fagocitosis de microorganismos patógenos.

Los niveles elevados de la PCR continúan siendo un marcador importante tanto en las enfermedades inflamatorias no infecciosas (por ejemplo, en las enfermedades autoinmunes y la aterogénesis), como en las infecciosas.

1) Activación del complemento.

La PCR participa en la activación y el daño tisular mediado por el complemento(95). La unión de la PCR a un ligando que contiene fosfocolina o a

cualquier otro ligando, activa el complemento por la vía clásica por unión al factor C1q del complemento y al factor H.

También se ha descrito que la PCR, al unirse a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas y degradadas, puede llevar a la activación del complemento(86).

2) Actividad fagocítica.

La PCR forma parte de la inmunidad natural funcionando como opsonina en el proceso de fagocitosis, debido a sus características de unión al ligando. Por ejemplo, participa en la remodelación de las membranas y fagocita el material nuclear de las células necróticas. Algunos estudios han demostrado que la PCR puede unirse a los receptores para la fracción Fc de la IgG. Según estudios in vitro se ha visto que la PCR incrementa la fagocitosis de varias especies bacterianas por parte de los leucocitos polimorfonucleares de sangre periférica en un medio sin suero(96).

3) Expresión de moléculas de adhesión.

La PCR induce la expresión de moléculas de adhesión por las células endoteliales. Hay estudios que han visto que existe un aumento de la expresión de VCAM-1, ICAM-1 y de selectina E en las células endoteliales de la vena umbilical y de la arteria coronaria; y un incremento en la secreción de la proteína quimioatrayente del monocito-1 (MCP-1) por parte de las células endoteliales de la vena umbilical.

Se ha postulado que la modulación de la expresión de las moléculas de adhesión (VCAM-1, ICAM-1) y de MCP-1 por la PCR puede inducir y sostener la aterogénesis(94).

7.5.2.- PCR y obesidad.

Existen estudios en los que se ha demostrado que la PCR interacciona de forma directa con la leptina, bloqueándola e incrementando la resistencia a la misma. Por ello se considera que existe correlatividad entre la obesidad y la PCR(97).

Así mismo, se ha relacionado con el perfil lipídico aterogénico(98) y con otros factores de riesgo cardiovascular(99) entre los que se cuentan la RI y las cifras de tensión arterial sistólica.

Muchos estudios prospectivos han comprobado que concentraciones elevadas de PCR se correlacionan de forma independiente con componentes del SM, y que es un factor de riesgo de eventos cardiovasculares en diabéticos.

7.6.- Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1).

El inhibidor del activador del plasminógeno es una glicoproteína de cadena simple, de 45 kDa, que contiene entre 379 y 381 aminoácidos. Pertenece a la familia de las serpinas, y su secreción tiene lugar principalmente en los hepatocitos y en los adipocitos. Es un inhibidor de las serin-proteasas y su principal función es la regulación de la cascada de la coagulación con propiedades antifibrinolíticas.

La secreción del PAI-1 es mayor en la grasa visceral del tejido adiposo y actúa favoreciendo la producción de fenómenos trombóticos(100). Se ha demostrado que en pacientes con niveles aumentados de PAI-1, existe un mayor riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular (ECV) de origen trombótico(101).

El PAI-1 también se considera un reactante de fase aguda, cuya producción se ve estimulada como respuesta a niveles elevados de TNF- α , PCR, insulina, glucosa o ácidos grasos libres(102).

Por otro lado también podemos correlacionarla con la diabetes, dado que la hiperinsulinemia estimula la producción de PAI-1 y ello favorece que sean pacientes de mayor riesgo cardiovascular(103).

7.7.- Resistina.

La resistina es una proteína de 12,5 kDa rica en residuos de cisteína (Cys) que es secretada específicamente por los adipocitos, muy abundante en el tejido adiposo blanco, y en menor cantidad en el pardo.

La expresión de su gen es inducida durante la diferenciación de los adipocitos, de tal forma que se la considera una proteína reguladora de la adipogénesis, ya que su expresión se induce durante la conversión de preadipocitos a adipocitos maduros(104).

Además, pese a existir controversia y no conocer los mecanismos de acción, se sabe que ejerce una acción paracrina junto al TNF alfa, atenuando los efectos anabólicos de la insulina.

Se ha comprobado que durante el ayuno su expresión es muy baja en el tejido adiposo, y que aumenta sustancialmente tras la ingesta o tras la administración de insulina(105).

7.8.- Retinol-binding protein 4 (RBP4).

La RBP4 es un transportador específico para el retinol en sangre (vitamina A), y que pertenece a la familia de la lipocalina. En plasma se forma el complejo RBP-retinol que interactúa con la transtirretina y puede transportarse desde el hígado, donde se almacena, hasta el tejido periférico(106).

La proteína de unión al retinol 4 (RBP4), otra proteína liberada de los adipocitos, se correlaciona con el grado de resistencia a la insulina en pacientes con obesidad, intolerancia a la glucosa o diabetes tipo 2; así como en sujetos no obesos(107) con o sin historial familiar de DM2 (108).

En modelos murinos, se ha demostrado que los ratones carentes del transportador de glucosa 4 (GLUT4) en los adipocitos, presentan un aumento de los niveles de RBP4. Posteriormente esto ha demostrado que RBP4 causa resistencia a la insulina a nivel hepático y muscular en el ratón(109).

En humanos se ha demostrado que existe una relación inversa entre la cantidad de GLUT4 expresado en los adipocitos, con los niveles séricos de RBP4(107). Queda por determinar si RBP4 en seres humanos es causa o está correlacionada con la resistencia a la insulina. El ejercicio físico ha demostrado mejorar los niveles de RBP4 en aquellos pacientes con resistencia a la insulina.

Por otro lado se han realizado estudios(110) que han demostrado que la relación entre RPB4 y las lipoproteínas que contienen apoB se ve atenuada en aquellos pacientes con niveles séricos altos de triglicéridos. El diseño del estudio se hizo con 46 pacientes con sobrepeso y con hipertrigliceridemia, de los cuales a 20 se sometieron a una dieta hipocalórica baja en grasa durante 3 meses. Los resultados concluyeron que los niveles de RBP4 se correlacionan de forma positiva con los niveles séricos de triglicéridos en el subgrupo de pacientes con TG<200 mg/dl($r=0,453$, $p=0,039$) y de una forma negativa con aquellos con TG ≥ 200 mg/dl($r=-0.487$, $p=0,019$). En el subgrupo de los pacientes con TG<200 mg/dl, los sujetos que presentaban niveles de RBP4 por encima de la media, tenían mayores niveles de colesterol IDL, LDL y apoB, mientras que estas diferencias no se observaron en los pacientes con TG ≥ 200 mg/dl.

Por otro lado, se observó una asociación positiva entre los cambios porcentuales entre los niveles de RBP4 circulantes con los del colesterol LDL, VLDL y apoB, en los pacientes con TG<200 mg/dl, sometidos a la dieta hipocalórica tanto después del primer y del tercer mes tras finalizar la dieta. Estas correlaciones no se constataron en los pacientes con triglicéridos superiores a 200 mg/dl. En definitiva, la asociación positiva entre RBP4 circulante y las lipoproteínas que contienen apoB, parece estar atenuada en pacientes con triglicéridos altos.

En obesidad y DM2 (109), la expresión del transportador de glucosa GLUT4 disminuye de forma selectiva en los adipocitos. En ratones *knockout* para los GLUT4 específicos de los adipocitos (también conocido como Slc2a4), muestran resistencia a la insulina secundaria en músculo e hígado. Se ha visto que los niveles de RBP4 se elevan en ratones con resistencia a la insulina y en los pacientes obesos y con diabetes, y que se normalizan con Rosiglitazona, un fármaco sensibilizador de insulina.

Se ha comprobado que la sobreexpresión transgénica de RBP4 humana o la inyección de RBP4 recombinante en ratones normales provoca resistencia a la insulina. Por el contrario, la delección genética de RBP4 aumenta la sensibilidad a la insulina.

Por este motivo se ha desarrollado la Fenretinida, un retinoide sintético que aumenta la excreción de RBP4, normaliza los niveles séricos de RBP4 y mejora la resistencia a la insulina y la intolerancia a la glucosa en ratones con obesidad inducida por una dieta rica en grasas.

También se demostró que el aumento de la RBP4 en suero induce la expresión hepática de la enzima gluconeogénica Fosfoenol piruvato carboxykinasa (PEPCK) y altera la señalización de insulina en el músculo. La reducción de RBP4 podría ser una nueva estrategia para el tratamiento de la DM2.

8.- TEJIDO ADIPOSO Y ESTADO INFLAMATORIO SISTÉMICO.

8.1.- Sistema inmunológico y tejido adiposo.

El tejido adiposo juega un papel en el desarrollo del estado inflamatorio sistémico que contribuye a los riesgos cardiovasculares y a la vasculopatía asociados con obesidad, gracias a la capacidad adipocitaria de responder frente a señales inflamatorias, mediante la secreción de reactantes de fase aguda, mediadores y moduladores de la inflamación, los cuales se han nombrado anteriormente(111).

El tejido adiposo, además de los adipocitos, contiene fibroblastos, preadipocitos, macrófagos y constituyentes vasculares. Los macrófagos son células cruciales en el proceso inflamatorio sistémico general, y se ha demostrado su implicación en el desarrollo del estado inflamatorio producido por la obesidad. Se produce una coordinación entre las vías inflamatorias y metabólicas, en las que los macrófagos secretan moléculas proinflamatorias que también se producen en tejido adiposo. Por tanto, la expresión genética de ambas células es en ocasiones similar: los macrófagos expresan proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABP- α P2) y el PPAR γ , mientras que los adipocitos pueden expresar proteínas de genes proinflamatorios de macrófagos, tales como TNF- α , IL6 y metaloproteinasas de la matriz (MMP).

Estas similitudes en la producción de dichas moléculas, también conlleva una habilidad funcional superpuesta, por lo que los macrófagos pueden atraer, englobar y almacenar lípidos para convertirse en células espumosas ateroscleróticas. Por otro lado, los preadipocitos bajo ciertas circunstancias pueden presentar propiedades fagocíticas y antimicrobianas, y pueden tener la capacidad de diferenciarse en macrófagos en un medio ambiente propicio, lo que sugiere un papel inmunológico potencial de estos preadipocitos(112).

Más aún, se han descrito hallazgos que indican que el tejido adiposo excesivo se caracteriza por una acumulación de macrófagos, lo que avala la fuerte relación entre el proceso inflamatorio y la obesidad. Dado que macrófagos y adipocitos contribuyen a la producción de mediadores inflamatorios, nos sugiere que están en estrecha correlación con el desarrollo de resistencia a la insulina en los pacientes obesos.

Gracias a estudios inmunohistoquímicos, se ha documentado la presencia de células endoteliales, células del estroma, células sanguíneas y macrófagos en tejido adiposo visceral de humano(113). Los macrófagos tisulares ejercen varias funciones como protección contra microorganismos, actividades citotóxicas contra células tumorales y regulan la homeostasis local a través de la producción de factores de crecimiento y citocinas. Estos macrófagos, también se acumulan en las placas ateroscleróticas y son responsables de la acumulación nociva intracelular de lípidos, la formación de células espumosas y la modulación de la función del crecimiento vascular y celular(114).

La infiltración de los monocitos en los tejidos es un fenómeno complejo con varios pasos que incluyen la activación del endotelio capilar, la expresión aumentada de las moléculas de adhesión, la adhesión seguida de su trasmigración a través del endotelio y su diferenciación en macrófagos. Los adipocitos humanos, mediante la producción de factores solubles, estimula la diapédesis de los monocitos sanguíneos. La diapédesis de los monocitos activa las células endoteliales capilares del tejido adiposo y favorece la expresión de la ICAM1 (*Intercellular Adhesion Molecule-1*) y PECAM1.

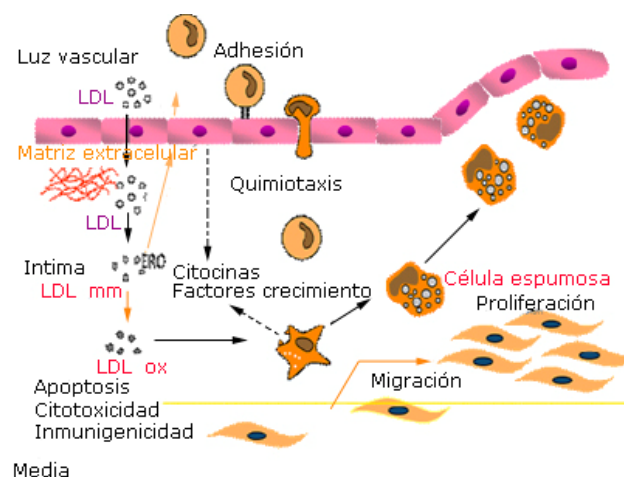


Figura 23: Mecanismo aterogénico.

Imagen obtenida de Molecular mechanisms involved in atherothrombotic cardiovascular disease. Lic. Judith Borrero Sánche. Facultad de Ciencias Médicas "General Calixto García".

Se ha comprobado que en pacientes con obesidad, se detectan concentraciones elevadas de las moléculas de adhesión solubles (E-selectin, VCAM1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), ICAM1 y factor de von Willebrand), sugiriendo que el incremento de la masa grasa corporal se asocia con una activación endotelial sistémica temprana(115,116).

8.2.-Papel de MCP1 y CCR2.

Las proteínas quimioatrayentes de monocitos (MCP) y sus receptores son cruciales en el desarrollo de la respuesta inflamatoria y en el reclutamiento de células inmunes a los sitios de inflamación. En los pacientes obesos, se ha observado que la expresión de la MCP1 (*Monocyte Chemo attractant Protein-1*), (ligando 2 de quimiocina del motif C-C (CCL2 o MCP1)), está incrementada en el tejido adiposo en proporción directa al grado de adiposidad.

Existen estudios que han implicado al MCP1 y a su receptor CCR2 en la regulación de la función de los adipocitos. Se trata de estudios en roedores en los que se concluye que la MCP1 del tejido adiposo inhibe la captación de glucosa estimulada por insulina, así como la expresión de genes como Glut4, PPAR γ y FABP4.

Se ha demostrado en modelos murinos con aterosclerosis la importancia del receptor de MCP (CCR2) para el reclutamiento de monocitos/macrófagos(117).

Actualmente la MCP1 ha sido agregada a la creciente lista de adipocitocinas, y su principal función es la de reclutar monocitos, leucocitos y otras células inflamatorias en respuesta a un estímulo inflamatorio. Se ha evidenciado que es producida por macrófagos y células endoteliales a través de la activación del factor de transcripción nuclear $\kappa\beta$. Además, se ha comprobado en modelos murinos que la concentración de la MCP1 se incrementa en animales con obesidad (*ratones ob/ob*) y que su concentración disminuye tras una pérdida de peso.

En humanos, la MCP1 está incrementada en los pacientes con DM2 y se ha correlacionado con el riesgo cardiovascular. Además, se ha correlacionado

directamente los niveles de mRNA de la MCP1 en el tejido adiposo humano con el grado de adiposidad, y su descenso tras la pérdida de peso en sujetos con obesidad severa(118).

En estudios con ratones knock-out del gen de la apoE (ApoE -/-), propensos al desarrollo de enfermedad cardiovascular, se ha visto que tras el bloqueo de la expresión génica de MCP1, la progresión a aterosclerosis disminuye. Por lo anterior, en ratones con doble eliminación (knock-out) de los genes MCP1 y ApoE existe protección para el establecimiento de la placa ateromatosa, favorecida por la ausencia en la expresión de MCP1(119).

Por tanto, todo parece indicar que un aumento progresivo en la masa grasa corporal da lugar al reclutamiento de células inmunes hacia el tejido adiposo, gracias a que la MCP1, producida en tejido adiposo, es un potente quimioatrayente para los monocitos. Por otro lado, la expresión del receptor específico para MCP1 denominado CCR2, regula el reclutamiento de macrófagos y monocitos y es indispensable que tanto su funcionalidad como su expresión sea completa para una respuesta inflamatoria dependiente de macrófagos apropiada y, consecuentemente, para que pueda iniciarse el desarrollo de aterosclerosis. Por ello, al eliminar genéticamente la expresión de CCR2 se observa una protección parcial en el desarrollo de resistencia a la insulina y en la expresión de genes proinflamatorios(120).

En definitiva, estos hallazgos sugieren que el CCR2 influye en el desarrollo de la obesidad, la inflamación del tejido adiposo y la resistencia a la insulina sistémica asociada, desempeñando también un papel clave en mantener a los macrófagos en el tejido adiposo y la resistencia a la insulina local a nivel del adipocito.

9.- RESISTENCIA PERIFÉRICA A LA INSULINA.

La insulina es una hormona anabólica secretada por las células β del páncreas en respuesta a diversos estímulos, siendo la glucosa el más importante(121). Su principal función es mantener la homeostasis glicémica, por lo que después de cada ingesta suprime la liberación de ácidos grasos libres mientras que favorece la síntesis de triglicéridos en el tejido adiposo.

Por otra parte, la insulina inhibe la producción hepática de glucosa, mientras que promueve la captación de glucosa por el tejido muscular esquelético y adiposo.

Con todo ello, la sociedad española de diabetes define la resistencia a la insulina (RI) como la disminución de la capacidad de la insulina para ejercer sus acciones biológicas en tejidos diana típicos, como el músculo esquelético, el hígado o el tejido adiposo (tabla 2). Es decir, en un estado de RI se produce una hiperinsulinemia para mantener la homeostasis glicémica, dado que la acción de esta hormona a nivel celular está reducida(122).

Es posible que el concepto de RI pueda extenderse a las demás acciones de esta hormona, como la captación y transporte transcelular de aminoácidos, la síntesis de proteínas, la regulación de la función endotelial, la estimulación del crecimiento y la proliferación celular o la expresión de numerosos genes reguladores de estas diferentes funciones.

Tabla 2: Efectos metabólicos de la insulina en los tejidos periféricos.

	Músculo esquelético	Tejido adiposo	Hígado
Glucosa			
↑ Captación y transporte	SI	SI	SI
↑ Glucólisis	SI	SI	SI
↑ Glucogenogénesis	SI	NO	SI
↓ Gluconeogénesis	NO	NO	SI
Grasas			
↑ Lipogénesis	NO	SI	SI
↓ Lipólisis	NO	SI	NO
Proteínas			
↑ Captación y transporte de aminoácidos	SI	NO	SI
↑ Síntesis proteica	SI	NO	SI
↓ Catabolismo proteico	SI	NO	SI

Hoy día se considera que la hiperinsulinemia compensatoria que se desarrolla en la RI crónica es el rasgo común de numerosas enfermedades metabólicas y no metabólicas, como la DM2, la obesidad, la hipertensión arterial (HTA), las dislipemias, la enfermedad cardiovascular, la esteatohepatitis no alcohólica, el síndrome obstructivo de apnea del sueño y la enfermedad de ovarios poliquísticos.

La resistencia a la insulina se acompaña de otras alteraciones como elevación de marcadores proinflamatorios como la proteína C reactiva, la IL6, el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1), TNF- α y la cuenta total de leucocitos en sangre.

9.1.- Métodos de diagnóstico. Sensibilidad y especificidad.

9.1.1.- Evaluación de la resistencia insulínica.

La técnica del pinzamiento (clamp en la terminología anglosajona) euglucémico hiperinsulinémico (CEH) es considerada el «patrón» de los métodos que cuantifican la sensibilidad a la insulina *in vivo*.

Esta técnica consiste en infundir insulina a una tasa fija, mientras se administra glucosa a una tasa variable con el objeto de fijar (clamp) la glicemia a un nivel dado, usualmente 90 mg/dl.

La medida básica del CEH es el denominado valor M, que no es otro que el promedio de glucosa infundida al sujeto en los últimos 20 minutos de la prueba una vez alcanzado el estado estacionario. El valor M representa la sensibilidad a la insulina.

La aplicación de este método es compleja, laboriosa y costosa, lo cual ha incentivado el desarrollo de otros métodos para evaluar la RI fundamentalmente basadas en estimaciones de la glicemia e insulinemia en ayuno o en respuesta a una dosis oral estándar de glucosa(123).

El método más utilizado por su simplicidad y buena correlación con mediciones más complejas de sensibilidad a la insulina es el *Homeostasis model assessment* (HOMA). Se trata de una técnica basada en un modelo matemático:

$$\text{HOMA-IR} = \text{glicemia de ayuno (mg/dl)} \times \text{insulinemia basal (uU/mL)} / 405$$

El HOMA, proporciona una medida semicuantitativa de la sensibilidad a la insulina y de la función de la célula beta. El punto de corte para definir resistencia insulínica de acuerdo a este índice fue primero definido por Bonora et al. como el límite inferior del mayor quintil de HOMA-IR en 225 adultos con tolerancia normal a la glucosa e IMC < 25 kg/m², pertenecientes al estudio Bruneck. Este valor correspondió a 2,77.

9.2.- Factores patogénicos de la resistencia a la insulina.

9.2.1.- Resistencia insulínica mediada por inflamación.

La inflamación es uno de los mecanismos fisiopatológicos por los cuales se puede condicionar la RI.

Se ha asociado la obesidad con un estado inflamatorio crónico leve-moderado, el cual se manifiesta sistémicamente por el incremento de los factores inflamatorios y de los leucocitos circulantes. En los tejidos, y de forma particular en el adiposo, se produce una infiltración celular inmunológica, y se desarrolla a nivel molecular una mayor unión de factores de transcripción pro-inflamatorios (por ejemplo el factor nuclear kappa Beta o NFκB) a elementos de respuesta nuclear(124), en diversos tipos celulares como adipocitos, células endoteliales, leucocitos, células hepáticas, células β pancreáticas o neuronas.

Se conocen varias vías de señalización, en las que en condiciones pro-inflamatorias, los mediadores inflamatorios se unen a los receptores de las membranas celulares, lo cual desencadena la migración del factor de transcripción NFκB desde el citosol al núcleo para la síntesis de nuevos mediadores inflamatorios.

En estado basal, este factor de transcripción está inactivo en el citosol y unido a su inhibidor IκB, lo que le impide migrar al núcleo. En respuesta a una señal externa pro-inflamatoria (ej. TNFα), la proteína IKK induce la degradación de IκB, dejando a NFκB libre para migrar al núcleo y transmitir así la señal inflamatoria.

Sin embargo, la proteína IKK también fosforila el sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1).

En condiciones fisiológicas, IRS1 se activa cuando está fosforilado en residuos de tirosina; sin embargo, la fosforilación llevada a cabo por IKK se desarrolla en residuo de serina.

Como consecuencia, hay una inhibición de la transducción de la señal insulínica, determinando una menor translocación del transportador de glucosa 4 (GLUT4) desde el citosol a la membrana celular, disminuyendo así la captación de la glucosa sanguínea (Figura 27). Como respuesta compensatoria, ocurre una hipersecreción de insulina, lo

cual explica la típica hiperinsulinemia de los individuos con RI(125). De esta manera, una célula expuesta a un entorno inflamatorio es una célula resistente a insulina.

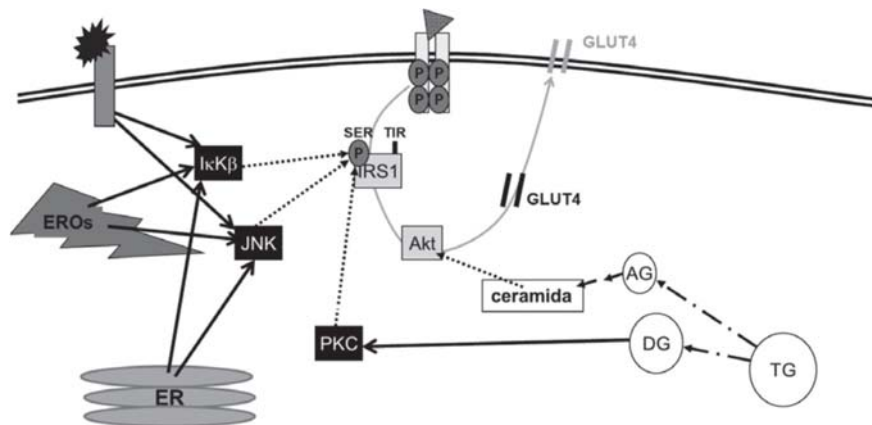


Figura 24: Eventos celulares que interfieren en la señalización insulínica.

La insulina (triángulo) se une a su receptor de membrana, desencadenando la fosforilación del mismo receptor y proteínas post-receptor. Esto determina la migración del transportador de glucosa 4 (GLUT4) a la membrana, lo que facilita la captación de glucosa. En un proceso inflamatorio, los mediadores inflamatorios se unen a su receptor de membrana activando a proteínas quinasas (ej. IKK y JNK). Estas proteínas inhiben a IRS1 reduciendo la señalización insulínica. Asimismo, las especies reactivas del oxígeno (EROs) y el estrés del retículo endoplásmico (ER) estimulan a IKK y JNK. Lípidos específicos también interfieren en la señalización insulínica al activar la proteína quinasa C (por diglicéridos), la cual inhibe a IRS1, o reducir la actividad de Akt (por ceramidas).(126)

Imagen obtenida en *Insulin resistance syndrome: diagnosis and management. Rev. med. clin. condes - 2013; 24(5) 827-837*.

9.2.2.- Resistencia insulínica mediada por lípidos.

La RI está comúnmente asociada a desórdenes del metabolismo lipídico que incluye la acumulación tisular ectópica de lípidos, entre ellos en el músculo esquelético(134,135). Esta relación no es sólo asociativa, sino que existe evidencia concluyente, que los lípidos pueden inducir RI.

Para comprender cómo se relacionan los lípidos con la RI, hay que tener en cuenta dos aspectos fundamentales: la acumulación lipídica en tejidos ectópicos y qué especies lipídicas son las que inducen la RI.

Sobre la acumulación lipídica en los tejidos ectópicos, se considera que debe existir un desequilibrio entre la captación y la oxidación de ácidos grasos que permita su acumulación.

En sujetos con RI la captación de ácidos grasos no se encuentra elevada(136), y por lo general se caracteriza por una menor densidad mitocondrial y síntesis de ATP en músculo esquelético(137).

Basado en esta evidencia, algunos autores, como *Samuel VT* y *Shulman GI*, han propuesto la existencia de una disfunción mitocondrial en músculo esquelético de individuos con RI, lo cual determina una menor capacidad oxidativa de ácidos grasos y, en consecuencia, su acumulación intracelular(138).

Sin embargo, esta hipótesis resulta controvertida ya que existen estudios que indican que una menor densidad mitocondrial no necesariamente conlleva una menor oxidación de lípidos. Por otra parte, la síntesis de ATP se produce en función de las necesidades del organismo, por lo que una menor síntesis de ATP puede también ser interpretada como un estado de menor demanda energética muscular(137,139). En definitiva, quedan por explorar una amplia área de estudio sobre los determinantes de la acumulación ectópica de lípidos.

Por otro lado, los triglicéridos acumulados en músculo esquelético no interfieren con la actividad de las proteínas musculoesqueléticas, lo que nos sugiere que existen otras especies lipídicas como diglicéridos o las ceramidas, que pueden ser las responsables de la inhibición de la señal insulínica. Se ha demostrado que existen niveles aumentados de estas dos especies en el músculo esquelético de los sujetos con RI(140,141).

Se ha demostrado que los diglicéridos son capaces de influenciar la actividad de proteínas específicas, entre ellas, la proteína quinasa $C\Theta$ (139). Esta proteína posee actividad serin-quinasa (fosforila proteínas en sus residuos de serina). El IRS1 es un sustrato para la acción de proteína quinasa $C\Theta$, lo cual determina una atenuación de la actividad de la señal insulínica, de manera análoga a lo que ocurre en una condición proinflamatoria.

La RI mediada por lípidos también posee un nexo con la inflamación. Los ácidos grasos libres circulantes constituyen un estímulo pro-inflamatorio, dada su capacidad de unión a los receptores de membrana TLRs (Toll-like receptors)(131). Estos receptores median la respuesta inmune innata y la activación de TLRs activa al NFκB, con la consiguiente liberación de citoquinas pro-inflamatorias.

9.3.-Efectos metabólicos de la insulina en los tejidos periféricos.

El defecto en la acción de la insulina es especialmente relevante en tres órganos diferentes: hígado, tejido adiposo y músculo esquelético (142).

9.3.1.- Tejido adiposo y resistencia insulínica.

El principal tipo celular que compone el tejido adiposo es el adipocito, célula capaz de almacenar triglicéridos (TG) en su citoplasma sin ver afectada su fisiología. El tamaño de la gota lipídica del citoplasma está regulado por múltiples mecanismos, que en general incluyen la lipogénesis (formación de TG) y lipólisis (degradación de TG con salida de ácidos grasos libres a la circulación)(143).

En presencia de una sensibilidad normal, la insulina ejerce un efecto lipogénico en el tejido adiposo favoreciendo su acumulación por dos mecanismos: inhibiendo la lipasa sensible a hormonas, una enzima lipolítica de triglicéridos inducida por catecolaminas; y favoreciendo la entrada de glucosa y la formación de ácidos grasos. En presencia de resistencia a la insulina el efecto lipolítico es mayor y la liberación de ácidos grasos desde el tejido adiposo visceral favorece su llegada al hígado.

En condiciones de balance energético positivo crónico, el adipocito puede expandir su volumen hasta 1000 veces. El adipocito hipertrófico tiene una mayor tasa lipolítica, lo cual condiciona una mayor liberación de ácidos grasos no esterificados a la circulación, por lo tanto, mayor riesgo de acumulación ectópica de lípidos.

Por otra parte, los adipocitos de gran tamaño poseen una mayor síntesis y liberación de productos de secreción del tejido adiposo (adipoquinas) que pueden

deteriorar el metabolismo lipídico y glucídico, tener efectos pro-inflamatorios o pro-trombóticos, además de inhibir la diferenciación de pre-adipocitos en adipocitos(144).

Existen múltiples adipoquinas nocivas cuya secreción está aumentada en los adipocitos hipertróficos, entre las que destacan la leptina, resistina, angiotensina, y citoquinas pro-inflamatorias (145),y secretan menor cantidad de adiponectina.

Producto de este ambiente auto/paracrino pro-inflamatorio, el tejido adiposo es infiltrado por macrófagos, que a su vez secretan moléculas pro-inflamatorias, alterando aún más el perfil secretor del tejido, lo que perpetúa el fenómeno(146). Todo ello sustenta que el tamaño del adipocito del tejido adiposo abdominal subcutáneo se relacione de manera directa con la resistencia a la insulina, siendo también un factor de riesgo de DM2 (147).

9.3.2.- Resistencia hepática a la insulina

La insulina en el hígado reduce la gluconeogénesis al disminuir la expresión fundamentalmente de la glucosa-6-fosfatasa y de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, de este modo disminuye la liberación de glucosa a la sangre. Además, la insulina activa la expresión de SREBP-1c (sterol response element binding protein), que estimula la expresión de genes inductores de la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos, y por tanto aumenta toda la lipogénesis hepática especialmente de partículas VLDL. El aumento de la síntesis *de novo* de ácidos grasos, así como su aumento procedente del tejido adiposo, favorece la síntesis de VLDL, la oxidación de ácidos grasos, su acumulación hepática, la neoglucoogénesis y el aumento de citoquinas proinflamatorias favoreciendo un estado proinflamatorio sistémico. A su vez la acumulación de ácidos grasos a nivel hepático favorece una cada vez mayor resistencia a la insulina hepática y mayor producción de glucosa.

9.3.3.- Resistencia a la insulina del músculo esquelético

El incremento en sangre de ácidos grasos libres impide la normal captación de glucosa por el músculo esquelético favoreciendo el desarrollo de hiperglucemia. Los depósitos de grasa musculares también favorecen el desarrollo de una mayor resistencia a la insulina a través de la activación de varios factores de transcripción incluido PKCε.

10.- ASOCIACIÓN ENTRE METABOLISMO DEL HIERRO, LA HIPERTRIGLICERIDEMIA Y LA RESISTENCIA PERIFÉRICA A LA INSULINA.

La ferritina es una proteína encargada de la homeostasis férrica, y representa la reserva de hierro corporal. Sin embargo, en las últimas décadas varios estudios epidemiológicos han evidenciado que los niveles elevados de dicha proteína en suero tienen un impacto nocivo sobre el organismo.

Se han realizado múltiples meta-análisis en los que se ha demostrado la correlación positiva que existe entre los niveles de ferritina con la hipertensión, la DM2, la grasa abdominal, la dislipemia, la hipertrigliceridemia primaria(149), resistencia periférica a la insulina (IRS) y el síndrome metabólico(150,151).

En definitiva, la homeostasis del hierro participa posiblemente en la patogenia, siendo por tanto un factor de riesgo los niveles séricos elevados, de desarrollar enfermedad cardiovascular y endocrinopatías. Sin embargo, todavía no hay estudios que expliquen cuál es el mecanismo fisiopatológico y las consecuencias directas de desarrollar hiperferritinemia con la resistencia periférica a la insulina(152).

Al igual que se demostró la evidente asociación de la hiperferritinemia con el síndrome metabólico, se ha demostrado que la sobrecarga hepática de hierro también se relaciona con la resistencia a la insulina. Su incidencia se ha visto incrementada de una forma importante en los países occidentales, y existen estudios poblacionales con más de 10.000 pacientes que certifican la correlación positiva de la hiperferritinemia con alteraciones del perfil glucídico (153).

Aquí en España, y más específicamente en Aragón, se publicaron datos similares que corroboraron esta asociación, y concluían que los niveles séricos de ferritina estaban relacionados directamente con el síndrome metabólico (de forma más específica con la obesidad central y la hipertrigliceridemia), y con la resistencia periférica a la insulina, calculado a través del índice HOMA. Los resultados de este estudio

sugerían que la ferritina sérica podría usarse como un marcador de daño metabólico temprano, que antecediera al desarrollo del síndrome metabólico (154).

Esta relación queda todavía más patente en aquellos pacientes con hemocromatosis hereditaria o politransfundidos. Por otro lado, los pacientes con daño hepático por esteatohepatitis no alcohólica (NASH) también se caracterizan por mayor prevalencia de resistencia a la insulina, lo que nos sugiere que en el caso de los pacientes con sobrecarga férrica esta condición es causa del desarrollo de la resistencia insulínica.

Desde la década de los 80, se conoce que la insulina estimula la captación de transferrina diférrica en adipocitos y hepatocitos(155). Esto concuerda con los hallazgos encontrados en los que al igual que se ha demostrado que la hiperferritinemia predice el desarrollo de resistencia a la insulina a nivel hepático, también hay otros estudios que han asociado su impacto sobre el tejido adiposo.

Un estudio cross-sectional reciente, ha demostrado que la sobrecarga férrica tiene impacto sobre el tejido adiposo en asociación con la resistencia a la insulina. Se ha analizado mediante 3 cohortes independientes, la expresión en el tejido adiposo de ferroportina, el receptor de la transferrina y ferritina. Los resultados de este estudio avocaron que los niveles de ferritina y su mRNA en el tejido adiposo humano, descendieron paralelamente con la obesidad y la resistencia a la insulina en las tres cohortes. También fue positiva la asociación del mRNA adipogénico y la acción de la insulina. Además, se demostró que la pérdida de peso conllevaba un descenso de receptor de la transferrina, la ferroportina y ferritina, en el tejido adiposo subcutáneo, evidenciando mejoría paralela en la acción insulínica(156).

La fuerte asociación entre la transferrina y los genes adipogénicos, sugiere que la transferrina es un importante componente que se asocia con la expansión del tejido adiposo, probablemente creando adicionalmente un impacto sobre el metabolismo de la glucosa. Por otro lado, la asociación de la ferroportina con los marcadores inflamatorios y de estrés oxidativo (TNF α) coloca la sobrecarga de hierro como un

importante contribuyente para la obesidad-disfunción del tejido adiposo e inflamación(157). Es más, la pérdida importante de peso induce una mejor sensibilidad de la insulina y produce cambios de forma paralela con la expresión génica de los factores involucrados en el metabolismo del hierro.

Estos resultados concuerdan con los publicados en murinos, en los que se comprobó cómo la reducción de los niveles de hierro con Deferoxamina, quelante del hierro, inhibía el desarrollo de la hipertrofia del adipocito al reducir la capacidad de infiltración del macrófago en el tejido adiposo(158).

Además se observó que la reducción del estrés oxidativo y de la producción de citoquinas inflamatorias, conllevaba una mejora en el metabolismo de la glucosa al favorecer la señalización para la insulina en el tejido adiposo y en el músculo esquelético.

A nivel analítico se han realizado múltiples estudios en los que se ha relacionado claramente niveles elevados de PCR y de ferritina en aquellos pacientes con síndrome metabólico o resistencia periférica a la insulina. Se considera que estos marcadores (reactantes de fase aguda) revelan el grado de inflamación, que se traduce de una forma o de otra en el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y/o diabetes. Por este motivo se han propuesto estos dos marcadores como útiles en la evaluación evolutiva de los pacientes que se someten a tratamiento.

Desde el punto de vista inflamatorio, el tejido adiposo, es un órgano endocrino que segrega citoquinas con actividad proinflamatorias, que pueden desregular las funciones metabólicas(159). Estas proteínas están ligadas a la obesidad y reacciones inmunológicas e inflamatorias. Las más destacadas, como se ha detallado a lo largo de la introducción son la leptina, adiponectina, TNF alfa, IL6, el activador del plasminógeno 1, entre otras.

Se ha investigado el efecto del hierro sobre la adiponectina, que es una adipocitina sensible a la insulina cuyos niveles están descendidos en los pacientes

diabéticos. Estudios han demostrado que los pacientes con DM2 o síndrome metabólico, la ferritina se encuentra incrementada y la adiponectina disminuida. El hierro ejerce una regulación negativa de la transcripción de la adiponectina mediado por la vía FOXO1(160). Además, el exceso de hierro daña la función de las células β pancreáticas y produce su apoptosis.

Estudios en ratones, han comprobado que la pérdida de canal exportador de hierro en el adipocito, la ferroportina, conllevan una sobrecarga de hierro, una disminución de la adiponectina y resistencia periférica a la insulina. Este hecho se ha visto corroborado por estudios en pacientes con hemocromatosis hereditaria, en los que al realizar depleciones férricas se ha observado un descenso del hierro a nivel adipocitario, un aumento de la adiponectina, una mejoría de la tolerancia a la glucosa y un aumento de la sensibilidad a la insulina.

Por otro lado, ya hemos comentado que el hierro almacenado en los hepatocitos interfiere de una manera directa con las vías metabólicas de la insulina. También se ha demostrado en modelos murinos que la expresión génica de la adiponectina está descendida y relacionada con la resistencia insulínica.

Las flebotomías en humanos con mala tolerancia a la glucosa y con valores de ferritina en el rango superior del cuartil de normalidad, incrementa la adiponectina y mejora la tolerancia a la glucosa(161). Esos hallazgos podrían justificar el papel causal del hierro como un factor de riesgo para el síndrome metabólico y juega un papel en los adipocitos modulando su metabolismo a través de la adiponectina en respuesta a los niveles de depósito de hierro(160).

El retinol binding protein 4 secretada por el tejido adiposo, se ha relacionado con la obesidad, resistencia a la insulina, diabetes y síndrome metabólico(107). En estudios muy recientes en los que se ha relacionado esta proteína con la hipertrigliceridemia, la resistencia a la insulina y sus consecuentes implicaciones con la enfermedad cardiovascular(162). La IL6 (163) o en NF-kB (164) también son conocidos como

mediadores de procesos inflamatorios, y se encuentra elevados en pacientes obesos(163).

En definitiva, queda patente que existe una clara relación entre el metabolismo del hierro, el glucídico y el lipídico. La evidencia clínica lo correlaciona y ello sugiere que existan mecanismos fisiopatológicos comunes entre la elevación de los niveles de hierro, triglicéridos y la resistencia a la insulina.

Por tanto, puesto que comparten mecanismos fisiopatogénicos comunes, aquellos pacientes con elevación de los niveles de hierro podrían beneficiarse de flebotomías, tanto para descender los niveles férricos, como para mejorar la resistencia periférica a la insulina y la hipertrigliceridemia.

Esto concordaría con lo que se observa en pacientes hemocromatósicos, que tienen predisposición a desarrollar hipertrigliceridemia primaria(149), y la respuesta favorable de ambos parámetros al tratamiento con flebotomías terapéuticas. Por otro lado, en los pacientes con hemocromatosis se ha demostrado la asociación entre el daño hepático por sobrecarga férrica con la alteración de la sensibilidad a la insulina hepática y con la disfunción pancreática, que mejoran tras las flebotomías terapéuticas. Si bien sugiere que hay mejoría del metabolismo glucídico al mejorar el daño hepático, en pacientes con esteatosis alcohólica y con hiperferritinemia no hay tanta evidencia de que realmente haya una mejoría de la resistencia periférica a la insulina tras realizar flebotomías terapéuticas (165), por lo tanto, queda mucho por estudiar para comprender la relación causal existe entre estas alteraciones metabólicas.

Capítulo II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1.- HIPÓTESIS

La hipótesis del estudio es que la depleción del hierro corporal mediante flebotomías terapéuticas en sujetos con sobrecarga de hierro e hipertrigliceridemia disminuye la resistencia periférica a la insulina.

2.- OBJETIVOS

Este estudio pretende valorar si mediante la depleción de hierro corporal a través de flebotomías seriadas (en total 3 sesiones de 400 ml/sesión realizada cada 2 semanas), en pacientes con hiperferritinemia e hipertrigliceridemia, alcanzan los siguientes objetivos:

2.1.- Objetivo principal

El propósito del estudio es evaluar si el grupo aleatorizado a recibir tratamiento con consejo dietético y flebotomías terapéuticas, presenta una mejoría significativa sobre la resistencia periférica a la insulina, estimada a través del índice HOMA, respecto al grupo aleatorizado a recibir tratamiento sólo con consejo dietético.

2.2.- Objetivos secundarios

1. Evaluar el efecto de la realización de flebotomías terapéuticas y recibir consejo dietético, en comparación con sólo recibir consejo dietético, sobre el metabolismo glucídico, lipídico, férrico y la respuesta inflamatoria.
2. Determinar el efecto de la depleción de hierro corporal a través de flebotomías seriadas sobre la concentración de triglicéridos, en comparación con el grupo asignado a consejos dietéticos

3. Determinar el efecto de la depleción de hierro corporal a través de flebotomías seriadas sobre el metabolismo férrico, incluyendo como parámetro fundamental la hepcidina, y otros como la ferritina, en comparación con el grupo asignado a consejos dietéticos.
4. Determinar el efecto de la depleción de hierro corporal a través de flebotomías seriadas sobre el metabolismo glucídico, incluyendo como parámetro fundamental el índice HOMA, y otros como la glucosa sérica, la insulina sérica y la hemoglobina glicada, en comparación con el grupo asignado a consejos dietéticos.
5. Determinar el efecto de la depleción de hierro corporal a través de flebotomías seriadas sobre el metabolismo lipídico a través de la medición de la variación de la concentración de colesterol total, HDL-colesterol, no HDL-colesterol, lipoproteína (a), apolipoproteína A1 y B, en comparación con el grupo asignado a consejos dietéticos.
6. Determinar el efecto de la depleción de hierro corporal a través de flebotomías seriadas sobre la concentración de citoquinas inflamatorias, como la adiponectina, leptina, resistina, IL-6, TNF- α y RBP4, en comparación con el grupo asignado a consejos dietéticos.
7. Determinar el efecto de la depleción de hierro corporal a través de flebotomías seriadas sobre la concentración plasmática de proteína C reactiva (PCR).
8. Determinar si los niveles basales de ferritina influyen sobre el efecto que produce la depleción férrica sobre el perfil inflamatorio, glucídico, lipídico y férrico, y compararlo con el grupo asignado a consejos dietéticos.
9. Determinar si los niveles basales de triglicéridos influyen sobre el efecto que produce la depleción férrica sobre el perfil inflamatorio, glucídico, lipídico y férrico, y compararlo con el grupo asignado a consejos dietéticos.

10. Determinar si los niveles basales de índice HOMA influyen sobre el efecto que produce la depleción férrica sobre el perfil inflamatorio, glucídico, lipídico y férrico, y compararlo con el grupo asignado a consejos dietéticos.

11. Determinar si los niveles basales de PCR sérica influyen sobre el efecto que produce la depleción férrica sobre el perfil inflamatorio, glucídico, lipídico y férrico, y compararlo con el grupo asignado a consejos dietéticos.

Capítulo III. MATERIAL Y MÉTODOS

1.- PLANTEAMIENTO GENERAL

El estudio realizado es prospectivo, aleatorizado y controlado, llevado a cabo con adultos, en rango de edad comprendido entre los 18 años y los 70 años. Todos los pacientes pertenecen a un único centro hospitalario (H. Universitario Miguel Servet de Zaragoza), y han sido remitidos o bien desde la consulta de eritropatología del servicio de Hematología y Hemoterapia, o bien de la consulta de la unidad de lípidos del servicio de Medicina Interna.

Tras incluir a los pacientes en el estudio, se aleatorizaron en dos grupos. Todos ellos (en ambos grupos) recibieron educación nutricional y a todos los integrantes de uno de los dos grupos se les realizó flebotomías terapéuticas seriadas.

El reclutamiento de los pacientes se realizó entre abril del 2013 y diciembre del 2015. Todos los pacientes tenían hipertrigliceridemia e hiperferritinemia y cumplían los mismos criterios de inclusión y exclusión. Como se ha descrito previamente (ver introducción, apartado 10), hay evidencia científica de la relación en el mecanismo fisiopatogénico de la hiperferritinemia con el desarrollo de hipertrigliceridemia y resistencia periférica a la insulina, sin embargo, no quedan claros cuales son dichos mecanismos. No queda claro si la sobrecarga férrica *per se* juega un papel causal en el desarrollo de hipertrigliceridemia o si bien comparten mecanismos etiopatogénicos comunes que hacen que aumenten de forma paralela.

Como parte del estudio, se ha realizado un estudio nutricional y una evaluación antropométrica a todos los pacientes en las dos visitas y se ha evaluado la adherencia y la respuesta a la dieta cardiosaludable adaptada a las recomendaciones establecidas para hipertrigliceridemia propuesta a todos los participantes del estudio, complementado con la evaluación analítica.

1.1.- Aspectos éticos y legales

Este estudio se ha realizado en todo momento de acuerdo con las directrices establecidas en la Declaración de Helsinki y todos los procedimientos en seres humanos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón (CEICA). La participación en el estudio fue totalmente voluntaria y los sujetos participantes rellenaron un consentimiento informado y firmado.

2.- SELECCIÓN DE PARTICIPANTES

Todos los pacientes integrantes del estudio, han sido valorados en la Unidad de de Lípidos del centro, por facultativos expertos en dicho campo de estudio. Una vez atendido el paciente en la consulta (visita de *screening*), y tras ser considerado apto para poder participar en el estudio, se le ofreció detallada información (tanto oral como escrita) sobre la posibilidad de participar, y tras su consentimiento por su escrito, se dispuso a incluirlo en el ensayo.

Tras esa primera visita de reclutamiento, todos los participantes fueron recibidos en al menos dos ocasiones en la consulta de lípidos con un intervalo de unos 3 meses. En dichas consultas se valoró tanto clínica como analíticamente a cada uno de los pacientes, antes y después de la intervención.

Todos los adultos que participaron en el estudio, se aleatorizaron mediante un software informático de libre disposición en dos grupos, y posteriormente fueron atendidos en la consulta especializada de lípidos, donde se realizó una exhaustiva historia clínica, y se procedió a la toma de medidas antropométricas y la extracción de muestras de sangre para el estudio analítico.

Todas las medidas (medida de presión arterial, perímetro de cintura, peso y talla) se llevaron a cabo en la consulta especializada de lípidos por personal cualificado y entrenado; con ello se pretendió evitar el coeficiente de variación inter-observador.

Del mismo modo, este personal fue el encargado, bajo condiciones asépticas, de obtener todas las muestras de sangre para su posterior análisis en el laboratorio.

Todos los sujetos recibieron por parte de nutricionistas especializadas en alteraciones del metabolismo lipídico, instrucciones sobre hábitos de ejercicio físico y sobre una dieta cardiosaludable adaptada a la hipertrigliceridemia.

Por otro lado, a los pacientes antes de ser aleatorizados se les explicó detalladamente en qué consistía dicho procedimiento, la frecuencia con la que iba a procederse su realización y las posibles reacciones adversas (ver apartado 8.1).

Las flebotomías se llevaron a cabo en el servicio de Hematología, por personal altamente capacitado en aféresis y donación de componentes sanguíneos.

Todos los pacientes fueron citados y registrados en la sala de aféresis del H. Miguel Servet. Previamente a su realización se confirmó que todos presentaban niveles de hemoglobina superiores a 12 g/dl y que las constantes vitales eran adecuadas para llevar a cabo el procedimiento de forma segura de acuerdo a protocolos previamente estandarizados

Una vez se realizaron las tres flebotomías se reevaluó a todos los pacientes en la visita final de estudio, que se programó 2 semanas después de la última sangría.

2.1.- Descripción de las intervenciones realizadas en cada grupo.

2.1.1.- Consejos cardiosaludables adaptados a las recomendaciones para hipertrigliceridemia.

Todos pacientes que se incluyeron en el estudio, independientemente del grupo al que fueron aleatorizados, recibieron consejos cardiosaludables adaptados a las recomendaciones en hipertrigliceridemia.

Estas recomendaciones se hicieron basadas en el patrón de dieta mediterránea, que ayuda a mantener una vida sana y mantener el peso adecuado.

La principal recomendación es el mantener una dieta equilibrada, realizando varias ingestas de cuantía moderada varias veces al día. También se recomienda que a la hora de consumir productos ricos en grasa, ésta proceda de aceite de oliva.

Además, se hizo especial hincapié en el consumo reducido de alimentos con alto contenido en azúcares simples, carbohidratos refinados y procesados. Además, se desaconsejó el consumo de alcohol y el tabaquismo.

Por otro lado, se instó a los pacientes a realizar ejercicio físico de forma regular, varios días a la semana.

2.1.2.- Flebotomía terapéutica.

La flebotomía terapéutica consiste en una venopunción, normalmente en antebrazo (de la vena cefálica, basílica o cubital media) y se extraen alrededor de 400 ml de sangre total. Tras la extracción se comprobó de nuevo las constantes vitales y se les ofreció una bebida, antes de abandonar la sala.

Dado que los pacientes se encontraban bajo ensayo clínico y por tanto en ningún caso fue una donación altruista, (la intención de la intervención era obtener un beneficio del mismo), toda la sangre extraída fue desechada.

Por otro lado, como con cualquier paciente, antes de comenzar la extracción, se explicó detalladamente cuáles eran los posibles efectos secundarios de la flebotomía y en caso de intolerancia (anemia, hipotensión o aprensión) se procedió a su inmediata suspensión, pese no haber alcanzado los objetivos establecidos.

2.2.- Criterios de inclusión

- Hombres y mujeres mayores de 18 años y menores de 70 años.
- Ferritina sérica >300 ng/ml en hombres y >200 ng/ml en mujeres.
- Trigliceridemia >200 mg/dl con al menos diez horas de ayuno y en dos ocasiones diferentes después de una dieta hipolipemiente.

Todos los pacientes habían presentado cifras elevadas de triglicéridos en los tres meses previos al estudio, y en caso de que estuvieran en tratamiento hipolipemiente se les retiró durante 6 semanas antes de incluirlos en el estudio.

2.3.- Criterios de exclusión

- Contraindicaciones clínicas para realizar flebotomías seriadas: malos accesos venosos, intolerancia previa (hipotensión o aprensión), cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca con grado superior a II de la clasificación de NYHA o anemia.

- Consumo de alcohol > 30 gr al día en hombres o > 25gr al día en mujeres.
- Sujetos que sufren alguna enfermedad aguda o crónica, como hepatopatía (GOT y/o GPT > 2,5 por encima del valor normal), hemocromatosis, diabetes mal controlada con hemoglobina glicosilada > 8%, enfermedades renales (creatinina >2 mg/dl), cáncer y enfermedades tiroideas no controladas.
- Concentración de PCR > 10 mg/L como marcador de enfermedad inflamatoria.
- Pacientes gestantes.

2.4.- Aleatorización de los participantes

En total se incluyeron en el estudio en el estudio un total de 83 pacientes (ver sección 4.1, tamaño muestral), los cuales se aleatorizaron a dos grupos a razón de 1:1.

Tabla 3: Intervención por grupos.

GRUPOS	Experimental	Control
INTERVENCIÓN ASIGNADA	Flebotomías 400 ml/3 semanas. Consejo dietético y de estilo de vida saludable.	Consejo dietético y de estilo de vida saludable.

2.4.1.- Grupo Experimental

Los sujetos aleatorizados en el grupo experimental recibieron en primer lugar por escrito y verbalmente los consejos sobre la dieta hipocalórica que iban a llevar a cabo durante los siguientes 3 meses, además de otras recomendaciones higiénico-dietéticas y hábitos de vida saludables.

Además de ello, se les citó de forma programada para realizar un total de 3 flebotomías terapéuticas, realizadas cada 21 días, consistentes en la extracción por venopunción periférica alrededor de 400 ml de sangre total.

2.4.2.- Grupo Control

El grupo control recibe de forma equivalente al grupo experimental los consejos sobre la dieta hipocalórica que iban a llevar a cabo durante los siguientes 3 meses (tanto de forma oral como escrita), además de otras recomendaciones higiénico-dietéticas y hábitos de vida saludables (ver anexo).

3.- VARIABLES RECOGIDAS Y ANALIZADAS EN EL ESTUDIO.

3.1.- Datos socio-demográficos, estilos de vida y estado de salud.

- **Datos socio-demográficos:** Se recopiló información sobre la edad del paciente.
- **Estado de salud:** Se pidió información sobre la presencia de enfermedades crónicas (diabetes, hipertensión, insuficiencia cardiaca...) y si se seguía algún tratamiento.
- **Hábitos no saludables:** Se recogió información sobre el consumo de tabaco (fumador activo, no fumador o ex-fumador), sobre el consumo de alcohol, y en qué cantidad (criterio de exclusión), y otros tóxicos.

3.2- Medidas antropométricas.

Las medidas antropométricas fueron tomadas en el transcurso de la entrevista en la primera visita y al finalizar el estudio (a los 3 meses): peso, talla, perímetro de cintura, tensión arterial sistólica (TAS) y tensión arterial diastólica (TAD). A partir de estas medidas se calculó otro indicador antropométrico, el índice de masa corporal (IMC = peso (kg)/talla (m²)).

- **Peso corporal:** se realizó con el sujeto descalzo y en ropa ligera, utilizando una báscula portátil digital, con una precisión de 100 g.
- **Talla:** Su medición se realizó utilizando un tallímetro con la cabeza del sujeto en el plano de Frankfurt y con una precisión milimétrica.
- **Perímetro de cintura:** El perímetro se midió con una cinta métrica no extensible y con una precisión de 0,1 cm Para realizar esta medida se pidió a los sujetos que se mantuvieran derechos, en posición relajada y con los pies juntos. El perímetro de cintura se midió como la menor circunferencia horizontal entre los márgenes costales y la cresta ilíaca, y en espiración.
- **Índice de Masa Corporal (IMC):** Se calculó empleando el peso y la talla (Kg/m²) para cada individuo. La interpretación de los valores de IMC obtenidos para

adultos fue de acuerdo con la prevalencia de peso normal: $<25 \text{ kg/m}^2$; Sobrepeso: ≥ 25 a $<30 \text{ kg/m}^2$; Obesidad: $\geq 30 \text{ kg/m}^2$.

- **Tensión arterial:** La tensión arterial se midió automáticamente con una precisión de 1 mmHg. La medida se realizó en el brazo izquierdo con los sujetos sentados y con la palma de la mano hacia arriba, tras haber permanecido al menos 2 minutos en situación de reposo.

3.3.- Parámetros analíticos.

Todos los participantes del estudio fueron citados a primera hora de la mañana tras unas 12 horas de ayuno. La extracción analítica se realizó en la misma consulta, por parte de enfermería, bajo condiciones asépticas en la vena antecubital.

Se obtuvo al menos un tubo de EDTA para realizar el hemograma y otro tubo de suero para el resto de determinaciones bioquímicas. Las muestras de sangre fueron obtenidas en todos los participantes del estudio antes y después de la intervención.

La determinación de los parámetros analíticos se llevó a cabo como se especifica a continuación:

- **La ferritina** determinada con el *Ferritin Kit*, basado en reacción antígeno-anticuerpo detectado por turbidimetría el analizador AU5400 (Beckman Coulter, Kraemer Bld. Brea, CA 92821, USA).
- **Triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL, glucosa, aspartato aminotransferasa (AST) y alanin aminotransferasa (ALT)** se calcularon mediante el analizador de espectrofotometría automático AU5400 (Kit Beckman Coulter).
- La **insulina sérica** se ha cuantificado mediante inmunofijación de micropartículas quimioluminiscentes, con un kit ultrasensible automático Architect (Abbott, Park Road, Illinois).
- La concentración de **PCR** se determinó por inmunofijación turbidimétrica automática en el analizador AU5400 (Beckman Coulter, CA, USA) con el kit comercial de alta sensibilidad.

- El **HOMA-IR (Modelo homeostático de resistencia a la insulina)** se ha calculado a través de la siguiente fórmula matemática:

$$(\text{Glucosa (mg/dl)} \times \text{Insulina (mU/L)}) / 405.$$

- El perfil de adipocinas se determinó según el protocolo MILLIPLEX® MAP Kits (Cat.#.HADK1MAG-61K, HADK2MAG-61K, HKI6MAG-99K, Millipore).
- Se ha cuantificado la **Adiponectina y la Resistina** con el Human Adipokine Magnetic Bead Panel 1.
- **La Leptina, IL-6 y TNF- α** se cuantificaron a través del Human Adipokine Magnetic Bead Panel 2.
- El **Retinol Binding Protein 4** se determinó con el kit Human Kidney Injury Magnetic Bead Panel 6.

Las placas se corrieron en un LABSCAN100 (Luminex) y los datos se recogieron y analizaron usando el software Luminex xPONENT®.

- La concentración del péptido bioactivo de **Hepcidina-25** se determinó usando el kit ELISA sensible (Cat.#. EIA-5782, Hepcidin 25 (bioactive) HS ELISA, DRG Germany).

Los análisis se realizaron por duplicado según las instrucciones del fabricante con 20 μ L de plasma sin dilución.

4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los pacientes que completaron el estudio se incluyeron en la base de datos, independientemente de si habían llevado a cabo de forma adecuada lo indicado en la intervención asignada (flebotomías o dieta), dado que se trata de un estudio que pretende realizar un análisis por intención de tratar. El primer paso para la realización del análisis estadístico es la creación de una base de datos numérica, que posteriormente se ha analizado mediante el programa IBM SPSS Statistics versión 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

Con el fin de realizar las comparaciones de los diferentes parámetros analizados con el procedimiento más correcto posible, se ha comprobado en primer lugar los supuestos de normalidad. Para ello, se ha aplicado para cada variable cuantitativa continua el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov.

El ajuste de las variables basales se realizó mediante el análisis de la covarianza con la transformación logarítmica de la variable dependiente, en caso de serlo necesario.

Por otro lado, se realizaron comparaciones intragrupalas de las muestras obtenidas previa y posteriormente a la intervención, mediante una prueba t para muestras relacionadas o el test de Wilcoxon.

Las variables continuas con una distribución normal se han expresado como la media ± 2 desviaciones estándares (DS) y las que no siguen una distribución normal con la mediana y su percentil [25-75].

Las variables iniciales y de final de estudio se compararon en ambos grupos mediante los análisis estadísticos pertinentes como pruebas t de Student y Mann-Whitney, Kruskal-Wallis o mediante la prueba de Chi cuadrado y exacta de Fisher.

El análisis por subgrupos se realizó tras la estratificación de los grupos en función de los niveles de ferritina sérica, índice HOMA, PCR sérica y triglicéridos basales, y por el cambio absoluto y relativo en los niveles de ferritina a los 3 meses. Estos análisis estadísticos se realizaron con las pruebas pertinentes como t de student para muestras pareadas o el Test de Wilcoxon.

Por último, se ha realizado el estudio de la influencia de la variación de la ferritina sobre la variación de los diferentes parámetros bioquímicos (parámetros del metabolismo de la glucosa, triglicéridos, GGT y GPT y RBP4), el cual se llevó a cabo mediante regresión lineal múltiple.

Las variables independientes introducidas en el modelo fueron: variación de ferritina y variación de peso. En el caso de que este modelo resultara significativo, se realizó un nuevo modelo introduciendo como variables independientes las concentraciones basales de ferritina, triglicéridos, PCR y HOMA.

Se consideró estadísticamente significativo un valor de p de 0,05.

4.1.- Cálculo del tamaño muestral:

El tamaño muestral que se calculó para llevar a cabo el estudio fue de 83 individuos adultos reclutados a lo largo de dos años y medio y divididos de forma aleatoria en dos grupos homogéneos.

Respecto a la muestra, este número de individuos ha permitido estimar los acontecimientos considerando un error tipo I = 0.05, un error tipo II = 0.01 y una precisión del 5%.

Los sujetos de la muestra final fueron estratificados por sexo y edad; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en estas variables en los grupos a estudio finales.

Para realizar el cálculo del tamaño muestral, se ha considerado el estudio unilateral y se ha estimado una potencia estadística del 90% y un intervalo de confianza del 90%, y un error de $\pm 95\%$. Se ha calculado el tamaño muestral a través de estimación

de proporciones, asumiendo que el grupo placebo tendría un 5% de descenso en los niveles de triglicéridos y el grupo intervención un 25%.

Se ha asumido un 15% de pérdidas potenciales.

Capítulo IV. RESULTADOS

Los datos analizados sobre el estudio realizado, revelaron que se seleccionaron en una primera visita basal 127 pacientes para el *pre-screening*. De todos ellos, 31 no cumplieron los criterios de inclusión y 10 pacientes no quisieron participar en el estudio. Con todo ello, 86 pacientes voluntarios y dando su consentimiento informado, entraron a participar en el ensayo. Todos ellos recibieron los consejos dietéticos cardiosaludables ajustados a hipertrigliceridemia, y 46 fueron aleatorizados a recibir flebotomías terapéuticas y 40 pacientes no recibieron otros tratamientos.

Del grupo asignado a flebotomías de 46 pacientes voluntarios, 1 fue perdido a lo largo del seguimiento. Del grupo de 40 voluntarios asignados a recibir sólo los consejos dietéticos, 2 pacientes se perdieron en el seguimiento. Por tanto, en la visita final se recibió a un total de 83 pacientes (45 del grupo flebotomías y 38 del grupo dieta) (ver gráfico 2, en el apartado anexo).

Respecto a las flebotomías terapéuticas, la práctica mayoría de los pacientes toleraron sin ninguna incidencia el procedimiento; tan sólo un paciente presentó un cuadro vasovagal autolimitado que recuperó con medidas posturales. Ninguno de los pacientes se anemizó.

1.- DATOS ANTROPOMÉTRICOS, CLÍNICOS Y ANALÍTICOS DESCRIPTIVOS BASALES DE LOS PACIENTES ALEATORIZADOS A CADA GRUPO.

En un primer lugar se observó que la muestra no es representativa de la población general dada la alta proporción de varones incluidos en el estudio (más del 95%), que es lógico y consistente con que la hiperferritinemia sea de mayor prevalencia en el sexo masculino (las mujeres presentan pérdidas férricas naturales y por tanto no suelen presentar hiperferritinemia).

Si bien no es representativa de la población general, sí podemos decir que la muestra es representativa de la población característica seleccionada para este estudio, siendo sujetos hipertriglicéridémicos y con hiperferritinemia, y que la distribución de los grupos fue homogénea.

Tabla 2: Distribución por sexo de los sujetos del estudio en función del grupo al que fueron aleatorizados¹.

	Flebotomías + consejo dietético (n=46)	Consejo dietético (n=40)	p ²
Varón	44 (95,7%)	39 (97,5%)	-
Mujer	2 (4,3%)	1 (2,5%)	-
Total	46 (100%)	40 (100%)	1,000

¹Los valores están expresados en número de sujetos (%).

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test de Chi-cuadrado(o Fisher), según se aplique.

A continuación, se expone en la tabla 3 las características clínicas basales de ambos grupos.

Tabla 3: Descripción de las características clínicas basales en función del grupo al que fueron aleatorizados los pacientes en el estudio¹.

	Flebotomías + consejo dietético N=46	Consejo dietético N=40	p ²
Años, edad	53,0±10,4	52,1±12,2	0,695
Sexo (varón), n (%)	44 [95,7]	39 [97,5]	1,000
Peso, Kg	85,4±11,4	88,2±10,4	0,239
IMC, kg/m²	29,2±3,27	29,5±2,96	0,668
Perímetro abdominal, cm	103±9,90	103±7,71	0,666
PA sistólica, mmHg	136±17,0	139±17,6	0,459
PA diastólica, mmHg	84,3±10,8	86,8±9,81	0,263

¹Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test de t de Student (o Mann-Whitney), Chi-cuadrado (o Fisher), según se aplique.

En la tabla 3 se describen las características clínicas basales de ambos grupos, sin que se observen diferencias significativas.

La práctica totalidad de los pacientes incluidos en el estudio eran varones (más del 95%), con una media de edad que levemente superior a los 50 años, y con un índice de masa corporal en su mayoría compatible con sobrepeso (IMC 29 Kg/m²). Además, en ambos grupos el perímetro abdominal superaba de media los 102 cm, resultado que coincide con la presencia de pacientes afectos de síndrome metabólico.

Otra variable que se estudió en relación a los hábitos tóxicos de los pacientes fue el tabaquismo. En el gráfico número 1 se revela el número de no fumadores, fumadores y ex-fumadores de cada grupo. Tampoco se observaron diferencias significativas entre ambos grupos.

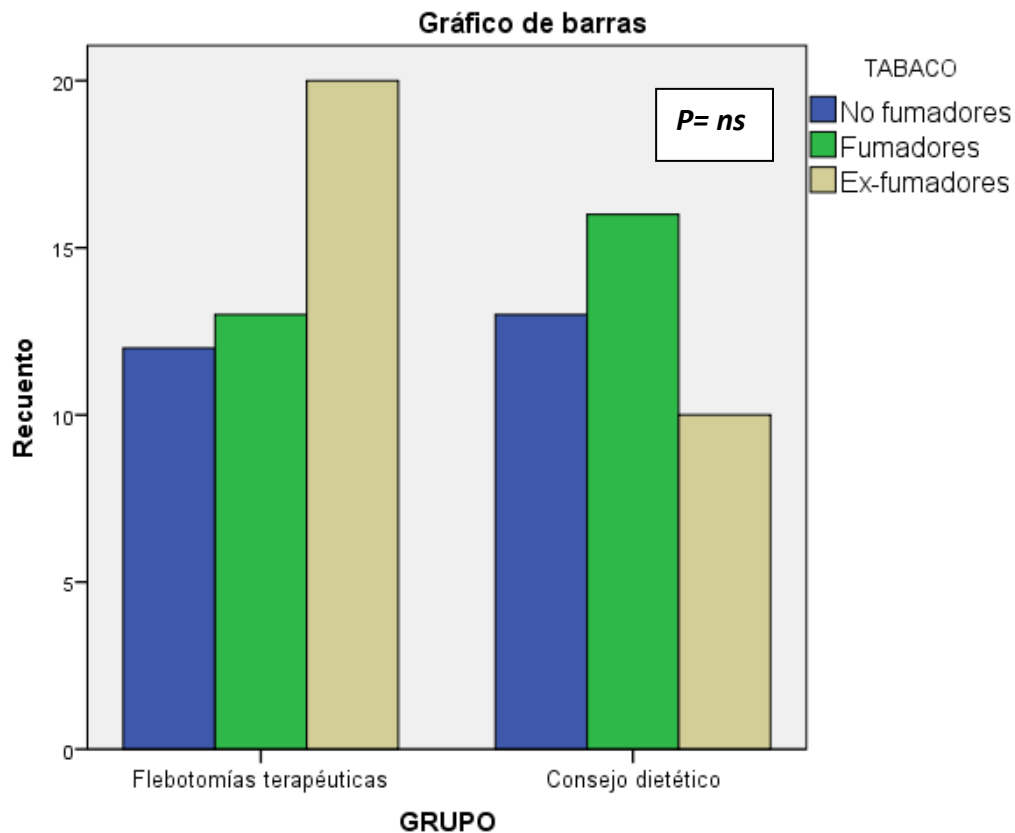


Gráfico 1: Distribución de los pacientes respecto a su hábito tóxico con el tabaco en función de los grupos a los que fueron aleatorizados.

El valor de p se refiere a diferencias estadísticas entre el las diferentes categorías de hábito tabáquico dentro de cada grupo a estudio.

Entre las características basales del perfil lipídico, tal y como se observa en la tabla 4, la p estadística no es significativa ($p > 0,05$) en ninguno de los parámetros calculados: colesterol total y HDL, apoB y triglicéridos.

Además, también se ha incluido el perfil hepático que de la misma manera no existen diferencias significativas entre ambos grupos.

Tabla 4: Descripción de las características bioquímicas generales basales del perfil hepático y lipídico de cada uno de los grupos incluidos en el estudio¹.

	Flebotomías + consejo dietético N=46	Consejo dietético N=40	p ²
Colesterol Total, mg/dl	246±48,0	243±53,3	0,767
Colesterol HDL, mg/dl	43,5±8,17	41,5±8,37	0,289
Triglicéridos, mg/dl	270 [190-437]	249 [185-335]	0,594
Apolipoproteína B, mg/dl	136±29,7	134±28,8	0,759
GGT, UI/L	35,0 [24,0-56,0]	45,0 [26,0-66,0]	0,347
ALT, UI/L	30,8±15,9	30,2±13,1	0,845
PCR, mg/L	2,0 [1,0-3,5]	2,4 [1,4-3,7]	0,181

¹Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test de Student, Mann-Whitney.

Otro perfil elemental en nuestro estudio es el férrico. En la tabla 5 podemos ver cómo no existen diferencias significativas entre ambos grupos en los valores basales de ferritina, hepcidina o hemoglobina.

Tabla 5: Descripción de las características basales sobre el metabolismo del hierro y la hemoglobina de cada uno de los grupos incluidos en el estudio¹.

	Flebotomías + consejo dietético N=46	Consejo dietético N=40	p ²
Ferritina, ng/mL	579±185	515±180	0,113
Hepcidina, ng/mL	33,3±13,5	34,0±15,5	0,849
Hemoglobina, g/dl	15,2±1,06	15,4±0,97	0,438

¹Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test de Student, Mann-Whitney y Chi-cuadrado.

En la tabla 6 se reseña, que no existen diferencias significativas entre el grupo aleatorizado a dieta y el aleatorizado a flebotomías, en ninguno de los parámetros en relación con el metabolismo glucémico, la glucosa, la insulina, el índice HOMA o la hemoglobina glicosilada.

Tabla 6: Descripción de las características basales del metabolismo glucídico de cada uno de los grupos incluidos en el estudio¹.

	Flebotomías + consejo dietético N=46	Consejo dietético N=40	p ²
Glucosa, mg/dl	94,5 [82,0-105]	95,0 [88,0-111]	0,312
Insulina, μ UI/mL	9,20 [6,20-17,0]	12,1 [8,97-15,1]	0,169
HOMA-IR	4,31 \pm 10,5	3,33 \pm 1,80	0,569
HbA1c, %	5,40 [5,20-5,70]	5,50 [5,30-5,90]	0,166

¹Los valores se expresan como media \pm desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test de Student, Mann-Whitney y Chi-cuadrado.

Respecto al perfil inflamatorio, todas las citoquinas proinflamatorias calculadas resultaron ser equivalentes en ambos grupos. No se encontraron diferencias significativas. En la tabla 7 se especifican dichos valores:

Tabla 7: Descripción de las características basales sobre las adipocinas y citoquinas pro-inflamatorias de cada uno de los grupos incluidos en el estudio¹.

	Flebotomías + consejo dietético N=46	Consejo dietético N=40	p ²
Leptina, pg/mL ³	4,24 [2,83-7,21]	7,48 [4,95-13,3]	0,909
Adiponectina, pg/mL ³	1,09 [0,73-1,69]	0,91 [0,63-1,44]	0,297
Resistina, pg/mL ³	2,65 \pm 1,17	3,01 \pm 1,15	0,187
RBP4, ng/mL ³	4,05 \pm 1,45	3,46 \pm 1,15	0,052
IL-6, pg/mL	1,90 [0,79-3,56]	1,54 [0,57-2,66]	0,255
TNF- α , pg/mL	3,97 \pm 1,32	4,01 \pm 1,52	0,893

¹Los valores se expresan como media \pm desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test de Student, Mann-Whitney y Chi-cuadrado.

³Los valores de la leptina están expresados como 10³, la adiponectina como 10⁷ y la resistina y la RBP4 como 10⁴.

2. RESULTADOS SOBRE LA VARIACIÓN OBSERVADA TRAS LA INTERVENCIÓN EN EL GRUPO ALEATORIZADO A RECIBIR CONSEJO DIETÉTICO.

A continuación, se expone las variaciones a nivel clínico y analítico donde se observó que el grupo aleatorizado a recibir consejos dietéticos cardiosaludables. En todas las tablas (8-13) se muestra los datos basales de este grupo y los observados a los 3 meses de la intervención, junto con la *p* estadística de significación.

Sobre el análisis de las variables clínicas, se observó que este grupo perdió peso de una forma significativa, reflejado además en el índice de masa corporal (IMC), así como en el perímetro abdominal.

No se encontraron diferencias significativas en las medidas de presión arterial (PA) sistólica y diastólica. Tabla 8.

Tabla 8: Variación en las medidas clínicas y antropométricas tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético¹.

	Basal (N=40)	Visita final (N=38)	Δ%	<i>p</i> ²
Peso, Kg	88,2±10,4	86,3±9,96	-2,63±3,06	<0,001
IMC, kg/m²	29,5±2,96	28,7±2,89	-2,63±3,06	<0,001
Perímetro abdominal, cm	103±7,71	101±7,93	-2,44±3,31	<0,001
PA sistólica, mmHg	139±17,6	136±19,3	-1,31±11,0	0,334
PA diastólica, mmHg	86,8±9,81	85,4±9,16	-1,40±8,17	0,174

¹Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La *P* corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test *t* de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

Respecto al perfil lipídico, no hubo hallazgos muy relevantes en este grupo. Tras realizar la dieta, sólo encontramos diferencias significativas a los tres meses en los niveles de colesterol total. Tabla 9.

Tabla 9: Variación del perfil lipídico tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético¹.

	Basal (N=40)	Visita final (N=38)	$\Delta\%$	p^2
Colesterol total, mg/dl	243±53,3	228±53,7	-4,66±15,2	0,032
Colesterol HDL, mg/dl	41,5±8,37	40,1±7,11	-1,16±15,7	0,271
Triglicéridos, mg/dl	270 [190-437]	230 [162-386]	-3,77±39,2	0,497
Colesterol LDL, mg/dl	138±40,96	132±39,1	-4,76±26,9	0,257
Apolipoproteína B, mg/dl	136±29,7	130±31,5	-1,44±17,2	0,534

¹Los valores se expresan como media \pm desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

Se observó (tabla 10) que los niveles de ferritina mejoraron de forma significativa tras la intervención dietética. Esto implica que esta medida mejora la sobrecarga de hierro y por tanto podemos deducir que también mejoraría el estado proinflamatorio.

Por otro lado, también se observaron diferencias significativas en los niveles de plaquetas. La trombocitosis también está relacionada con los procesos inflamatorios, por tanto, podríamos relacionar este hallazgo como una mejoría del proceso inflamatorio sistémico, aunque significativa, la diferencia fue pequeña.

Tabla 10: Variación del perfil tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético¹.

	Basal (N=40)	Visita final (N=38)	Δ%	p ²
Hierro, μg/dl	91,4±32,5	88,7±29,8	3,06±41,3	0,500
Ferritina, ng/mL	579±185	453±163	-11,6±18,0	0,001
Sat. transferrina, %	26,47±11,6	27,9±10,2	5,12±41,3	0,899
Hemoglobina, g/dl	15,2±1,06	15,5 [14,6-16,4]	-0,45 [-1,75-0,53]	0,150
VCM, fL	92,8[85,3-103]	90,7 [88,4-95,4]	-0,65±2,09	0,112
Plaquetas, 10 ³ /μL	221±44,0	210±44,2	-4,63±12,5	0,019
Leucocitos, 10 ³ /μL	8,1 [3,9-17,7]	7,95 [7,38-8,85]	0 [-9,09-11,3]	0,943

¹Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

También a nivel del metabolismo glucídico se encontraron diferencias significativas tras seguir los consejos dietéticos, en los niveles de glucosa, insulina y en la resistencia periférica a la insulina. Sin embargo, no se observaron hallazgos significativos en los valores de hemoglobina glicosilada. Ver Tabla 11.

Tabla 11: Variación del perfil glucídico tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético¹.

	Basal (N=40)	Visita final (N=38)	Δ%	p ²
Glucosa, mg/dl	95,0 [88,0-111]	95,5 [84,5-105]	-3,67±10,5	0,038
Insulina, μUI/mL	12,1 [8,97-15,1]	10,1 [7,40-14,7]	-9,47 [-26,7-5,77]	0,029
HOMA-IR	3,33±1,80	2,74±1,28	-5,97±37,7	0,037
HbA1c, %	5,50 [5,30-5,90]	5,50 [5,40-5,80]	0 [-3,54-1,81]	0,127

¹Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

A nivel hepático, en la tabla 12, se muestran los valores de las enzimas hepáticas cuya variación resultó significativa tras los 3 meses de dieta. La PCR, indicador de proceso inflamatorio no obtuvo diferencias significativas después de la intervención.

Tabla 12: Variación en el perfil hepático y tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético¹.

	Basal (N=40)	Visita final (N=38)	Δ%	p ²
GGT, U/L	45,0 [26,0-66,0]	32,5 [24,8-51,3]	-8,51±39,8	0,002
ALT, U/L	30,2±13,1	22,5 [19,0-30,3]	-8,69±25,9	0,027
Ácido úrico, mg/dl	7,21±1,52	7,09±1,40	-1,67±12,9	0,181
PCR, g/L	0,24 [0,14-0,37]	0,27 [0,15-0,45]	-11,8 [-29,4-61,1]	0,777

¹Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

Respecto las citoquinas proinflamatorias, se encontraron diferencias significativas tan sólo en los niveles de leptina. Esta hormona se secreta en el tejido adiposo y sus niveles se correlacionan con el IMC. Dado que en este grupo se vio un descenso significativo del peso y del IMC, estos hallazgos son congruentes.

Tabla 13: Variación en el perfil de adipoquinas y citoquinas pro-inflamatorias tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético¹.

	Basal (N=40)	Visita final (N=38)	Δ%	p ²
Leptina, pg/mL³	7,48 [4,95-13,3]	6,06 [3,91-10,8]	-12,7±32,0	0,016
Adiponectina, pg/mL³	0,91 [0,63-1,44]	1,02 [0,63-1,57]	3,76±27,4	0,437
Resistina, pg/mL³	3,01±1,15	2,91 [2,11-4,65]	2,43 [-12,1-36,6]	0,189
RBP4, ng/mL³	3,46±1,15	3,52±1,27	3,93±27,9	0,751
IL-6, pg/mL	1,54 [0,57-2,66]	1,41 [0,54-2,37]	-12,6 [-65,1-62,5]	0,822
TNF-α, pg/mL	4,01±1,52	3,90±1,48	0 [-8,67-7,48]	0,336
Hepcidina, ng/mL	34,0±15,5	29,2 [23,5-44,5]	3,30 [-22,5-27,3]	0,831

¹Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

³Los valores de la leptina están expresados como 10³, la adiponectina como 10⁷ y la resistina y la RBP4 como 10⁴.

3.- RESULTADOS SOBRE LA VARIACIÓN OBSERVADA TRAS LA INTERVENCIÓN EN EL GRUPO ALEATORIZADO A RECIBIR CONSEJO DIETÉTICO Y FLEBOTOMÍAS TERAPÉUTICAS.

A continuación, en las siguientes tablas (14-19) se exponen las variaciones clínicas y analíticas del grupo aleatorizado a flebotomías terapéuticas junto con los consejos dietéticos. Se resumen los datos basales de este grupo y los observados a los 3 meses de la intervención, junto con la *p* estadística de significación.

Comenzando por el análisis de las variables clínicas, se observó una reducción de una forma significativa en el perímetro abdominal.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la reducción del peso y el índice de masa corporal, así como en las medidas de presión arterial (PA) sistólica y diastólica. Tabla 14.

Tabla 14: Variación en las medidas antropométricas y clínicas tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético y flebotomías terapéuticas¹.

	Basal (N=46)	Visita final (N=45)	Δ%	<i>p</i> ²
Peso, Kg	85,4±11,4	85,1±11,4	-0,59±2,55	0,085
IMC, kg/m²	29,2±3,27	29,0±3,23	-0,59±2,55	0,088
Perímetro abdominal, cm	103±9,90	101±10,1	-0,58±2,55	0,002
PA sistólica, mmHg	136±17,0	134±15,6	-0,75±9,23	0,355
PA diastólica, mmHg	84,3±10,8	83,8±9,14	-0,16±10,0	0,560

¹Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La *P* corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test *t* de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

A nivel de perfil lipídico, no se encontró ninguna diferencia significativa en ninguno de los parámetros medidos. Los niveles de triglicéridos son los que mayor mejoría presentaron, pero no han llegado a la significación estadística.

Tabla 15: Variación del perfil lipídico tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético y flebotomías terapéuticas¹.

	Basal (N=46)	Visita final (N=45)	Δ%	p ²
Colesterol total, mg/dl	246±48,0	240±54,8	-2,62±11,6	0,162
Colesterol HDL, mg/dl	43,5±8,17	43,1±7,80	-0,96±12,1	0,601
Triglicéridos, mg/dl	270 [190-437]	243 [156-406]	-6,72±35,6	0,070
Colesterol LDL, mg/dl	149,3±53,5	144±48,2	-3,68±11,2	0,153
Apolipoproteína B, mg/dl	136±29,7	137±35,5	0,50±11,7	0,698

¹Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

Como cabía esperar, donde más variaciones significativas se encontraron en este grupo fue a nivel del metabolismo férrico (tabla 16). Se observó una clara disminución en los niveles de ferritina, sideremia, índice de saturación de la transferrina tras realizar las flebotomías terapéuticas.

También se encontraron diferencias en los niveles de hemoglobina, aunque los pacientes no alcanzaron cifras tan bajas de hemoglobina como para considerar que se hubieran anemizado de una forma significativa.

Tabla 16: Variación del perfil férrico tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético y flebotomías terapéuticas¹.

	Basal (N=46)	Visita final (N=45)	Δ%	p ²
Hierro, µg/dl	104,15±51,6	84,4±31,8	-23,4±26,6	<0,001
Ferritina, ng/mL	579±185	367±164	-37,3±18,1	<0,001
Saturación transferrina, %	30,26±16,9	23,9±10,5	-26,6±30,7	<0,001
Hemoglobina, g/dl	15,2±1,06	14,3 [13,8-15,0]	0,42 [-0,94-1,24]	<0,001
VCM, fL	94,9[85,3-102]	95,4 [91,7-98,0]	-0,87±8,99	0,199
Plaquetas, 10³/µL	200,1±36,1	217±53,0	7,78±13,2	<0,001
Leucocitos, 10³/µL	7,79[7,12-7,9]	7,30 [6,30-8,10]	-6,75 [-13,0-2,50]	0,030

¹Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

Respecto al perfil glucémico (tabla 17), se observó una mejoría significativa en los niveles de hemoglobina glicosilada. Esta mejoría en la hemoglobina glicosilada no es real, dado que al ajustarla por los niveles de hemoglobina (disminuidos tras las flebotomías), los resultados no fueron significativos. Además, no se detectaron diferencias significativas tras las flebotomías en ninguno del resto de los parámetros: glucemia, insulinemia y resistencia periférica a la insulina.

Tabla 17: Variación del perfil glucídico tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético y flebotomías terapéuticas¹.

	Basal (N=46)	Visita final (N=45)	Δ%	p ²
Glucosa, mg/dl	94,5 [82,0-105]	92,0 [85,0-104]	0,19±11,2	0,894
Insulina, μUI/mL	9,20 [6,20-17,0]	9,92 [6,98-13,4]	-9,99 [-29,2-25,0]	0,212
HOMA-IR	4,31±10,5	3,82±8,53	3,52±49,0	0,171
HbA1c, %	5,40 [5,20-5,70]	5,20 [5,00-5,40]	-4,35 [-6,16-(-1,85)]	<0,001

¹Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

Respecto al perfil hepático (tabla 18), las enzimas hepáticas experimentaron una mejoría significativa tras la realización de flebotomías. Esto va en concordancia con la reducción de la sobrecarga férrica, tras la intervención.

Tabla 18: Variación del perfil hepático y PCR tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético y flebotomías terapéuticas¹.

	Basal (N=46)	Visita final (N=45)	Δ%	p ²
GGT, U/L	35,0 [24,0-56,0]	30,0 [22,0-46,5]	-10,1±21,6	0,007
ALT, U/L	30,8±15,9	24,0 [18,0-29,0]	-8,98±26,7	0,003
Ácido úrico, mg/dl	6,2±0,84	6,62±1,24	0,60±14,1	0,914
PCR, g/L	0,20 [0,11-0,35]	0,19 [0,09-0,37]	-17,1 [-52,1-47,9]	0,504

¹Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

Respecto al perfil de citoquinas inflamatorias (tabla 19), se observó un descenso significativo en los niveles de RBP4 y la hepcidina.

Tabla 19: Variación del perfil de adipoquinas y citoquinas pro-inflamatorias tras la intervención en el grupo aleatorizado a consejo dietético y flebotomías terapéuticas¹.

	Basal (N=46)	Visita final (N=45)	Δ%	p ²
Leptina, pg/mL ³	4,24 [2,83-7,21]	8,50 [4,14-16,9]	6,95±43,4	0,496
Adiponectina, pg/mL ³	1,09 [0,73-1,69]	1,11 [0,70-1,57]	-2,45±29,3	0,811
Resistina, pg/mL ³	2,65±1,17	2,34 [1,78-3,11]	-3,70 [-20,7-16,6]	0,185
RBP4, ng/mL ³	4,05±1,45	3,53±1,21	-9,98±21,7	0,004
IL-6, pg/mL	1,90 [0,79-3,56]	1,72 [0,92-3,11]	-21,1 [-50,0-114]	0,701
TNF-α, pg/mL	3,97±1,32	4,16±1,64	0,67 [-15,9-12,6]	0,396
Hepcidina, ng/mL	33,3±13,5	14,1 [9,53-23,4]	-56,7 [-66,7-(-36,2)]	<0,001

¹Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

³Los valores de la leptina están expresados como 10³, la adiponectina como 10⁷ y la resistina y la RBP4 como 10⁴.

4.- RESULTADOS SOBRE LA VARIACIÓN CLÍNICA Y ANALÍTICA OBSERVADA ENTRE LOS PACIENTES DE CADA GRUPO EN LA VISITA FINAL.

En las siguientes tablas (20-26) se exponen los resultados que surgen de comparar el grupo aleatorizado a consejo dietético únicamente y el grupo de las flebotomías tras haber finalizado la intervención correspondiente.

Los datos que se ofrecen es la comparación de la frecuencia de variación intergrupo respecto la frecuencia de variación del grupo contrario y la con la p estadística de significación.

En la tabla 20, se observa que hubo diferencias significativas entre ambos grupos en peso, IMC y perímetro abdominal. Se encontró que estas medidas clínicas mejoraron en el grupo aleatorizado a consejo dietético. No hubo significación en los datos de variación de la presión arterial.

Tabla 20: Diferencias observadas tras la intervención en las medidas clínicas y antropométricas entre ambos grupos del estudio¹.

	$\Delta\%$ Grupo flebotomías + consejo dietético tras intervención (N=45)	$\Delta\%$ Consejo dietético tras intervención (N=38)	Diferencia entre ambos grupos	p^2
Peso, Kg	-0,59 \pm 2,55	-2,63 \pm 3,06	1,98 [0,75-3,21]	0,001
IMC, kg/m²	-0,59 \pm 2,55	-2,63 \pm 3,06	1,79 [0,50-3,07]	0,005
Perímetro abdominal, cm	-0,58 \pm 2,55	-2,44 \pm 3,31	1,79 [0,50-3,07]	0,005
PA sistólica, mmHg	-0,75 \pm 9,23	-1,31 \pm 11,0	0,57 [-0,89-5,03]	0,779
PA diastólica, mHg	-0,16 \pm 10,0	-1,40 \pm 8,17	1,04 [-3,03-5,11]	0,544

¹Los valores se expresan como media \pm desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de Student o Mann-Whitney, según se aplique.

Respecto al perfil lipídico, se observó (tabla 21), que no hubo ninguna diferencia significativa en ninguno de los parámetros analíticos relacionados con el metabolismo lipídico entre los dos grupos a estudio.

Tabla 21: Diferencias observadas tras la intervención en el perfil lipídico entre ambos grupos del estudio¹.

	$\Delta\%$ Grupo flebotomías + consejo dietético tras intervención (N=45)	$\Delta\%$ Consejo dietético tras intervención (N=38)	Diferencia entre ambos grupos	p^2
Colesterol total, mg/dl	-2,62±11,6	-4,66±15,2	1,25 [-4,42-6,93]	0,491
Colesterol HDL, mg/dl	-0,96±12,1	-1,16±15,7	0,96 [-5,19-7,10]	0,730
Triglicéridos, mg/dl	-6,72±35,6	-3,77±39,2	-4,68 [-20,8-11,4]	0,721
Colesterol LDL, mg/dl	-3,68±11,2	-4,76±26,9	1,08 [-10,9-13,1]	0,857
Apolipoproteína B, mg/dl	0,50±11,7	-1,44±17,2	1,25 [-5,04-7,55]	0,548

¹Los valores se expresan como media \pm desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de Student o Mann-Whitney, según se aplique.

Los cambios de variación en el metabolismo férrico y en los parámetros del hemograma fueron significativos. Se encontró una disminución significativa entre ambos grupos en los niveles de ferritina, sideremia índice de saturación de la transferrina, hemoglobina y plaquetas (tabla 22).

Las variaciones encontradas respecto al perfil glucídico no fueron significativas. No se encontraron diferencias entre los dos grupos tras la intervención ni en los niveles de glucosa, insulina, hemoglobina glicosilada ni el índice HOMA (tabla 23).

Tabla 22: Diferencias observadas tras la intervención en el perfil férrico y el hemograma entre ambos grupos del estudio¹.

	$\Delta\%$ Grupo flebotomías + consejo dietético tras intervención (N=45)	$\Delta\%$ Consejo dietético tras intervención (N=38)	Diferencia entre ambos grupos	p^2
Hierro, $\mu\text{g/dl}$	-23,4 \pm 26,6	3,06 \pm 41,3	-21,3 [-34,8-(-7,70)]	0,001
Ferritina, ng/mL	-37,3 \pm 18,1	-11,6 \pm 18,0	-24,6 [-32,4-(-16,8)]	<0,001
Saturación transferrina, %	-26,6 \pm 30,7	5,12 \pm 41,3	-23,7 [-39,1-(-8,35)]	0,001
Hemoglobina, g/dl	0,42 [-0,94-1,24]	-0,45 [-1,75-0,53]	-0,35 [-3,48-2,79]	0,038
VCM, fL	-0,87 \pm 8,99	-0,65 \pm 2,09	-0,35 [-3,48-2,79]	0,888
Plaquetas, $10^3/\mu\text{L}$	7,78 \pm 13,2	-4,63 \pm 12,5	12,9 [6,98-18,8]	<0,001
Leucocitos, $10^3/\mu\text{L}$	-6,75 [-13,0-2,50]	0 [-9,09-11,3]	-6,20 [-15,8-3,36]	0,095

¹Los valores se expresan como media \pm desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de Student o Mann-Whitney, según se aplique.

Tabla 23: Diferencias observadas tras la intervención en el perfil glucídico entre ambos grupos del estudio¹.

	$\Delta\%$ Grupo flebotomías + consejo dietético tras intervención (N=45)	$\Delta\%$ Consejo dietético tras intervención (N=38)	Diferencia entre ambos grupos	p^2
Glucosa, mg/dl	0,19 \pm 11,2	-3,67 \pm 10,5	3,97 [-0,87-8,80]	0,113
Insulina, $\mu\text{UI/mL}$	-9,99 [-29,2-25,0]	-9,47 [-26,7-5,77]	7,70 [-11,0-26,4]	0,742
HOMA-IR	3,52 \pm 49,0	-5,97 \pm 37,7	8,36 [-12,1-28,8]	0,356
HbA1c, %	-4,35 [-6,16-(-1,85)]	0 [-3,54-1,81]	-2,42 [-5,02-0,18]	0,866

¹Los valores se expresan como media \pm desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de Student o Mann-Whitney, según se aplique.

Tras comparar los resultados de frecuencia de variación sobre las determinaciones de enzimas hepáticas, ácido úrico y PCR, los resultados indicaron que no existían diferencias significativas entre ambos grupos en ninguna de ellas.

Tabla 24: Diferencias observadas tras la intervención en el perfil hepático y PCR entre ambos grupos del estudio¹.

	$\Delta\%$ Grupo flebotomías + consejo dietético tras intervención (N=45)	$\Delta\%$ Consejo dietético tras intervención (N=38)	Diferencia entre ambos grupos	p^2
GGT, U/L	-10,1±21,6	-8,51±39,8	-2,04 [-15,9-11,8]	0,812
ALT, U/L	-8,98±26,7	-8,69±25,9	-0,59 [-12,3-11,1]	0,960
Ácido úrico, mg/dl	0,60±14,1	-1,67±12,9	1,86 [-4,08-7,80]	0,448
PCR, g/L	-17,1 [-52,1-47,9]	-11,8 [-29,4-61,1]	-31,8 [-173-110]	0,193

¹Los valores se expresan como media \pm desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de Student o Mann-Whitney, según se aplique.

Respecto a la determinación de citoquinas proinflamatorias (tabla 25), los resultados avocaron una diferencia estadísticamente significativa a favor del grupo aleatorizado a consejo dietético únicamente, con un claro descenso de los niveles séricos de leptina.

Por otro lado, en el grupo de las flebotomías, el parámetro dónde se evidenció una mejoría significativa respecto a las citoquinas inflamatorias, fue en la determinación de la RBP4 y como cabría de esperar, en la determinación de los niveles séricos de hepcidina.

El resto de citoquinas proinflamatorias (adiponectina, resistina, IL-6, TNF- α), no obtuvieron diferencias significativas entre ambos grupos.

Tabla 25: Diferencias observadas tras la intervención en el perfil de citoquinas pro-inflamatorias entre ambos grupos del estudio¹.

	$\Delta\%$ Grupo flebotomías + consejo dietético tras intervención (N=45)	$\Delta\%$ Consejo dietético tras intervención (N=38)	Diferencia entre ambos grupos	p^2
Leptina, pg/mL³	6,95±43,4	-12,7±32,0	18,7 [0,56-36,9]	0,031
Adiponectina, pg/mL³	-2,45±29,3	3,76±27,4	-7,56 [-21,3-6,13]	0,350
Resistina, pg/mL³	-3,70 [-20,7-16,6]	2,43 [-12,1-36,6]	-23,3 [-44,0-(-2,59)]	0,116
RBP4, ng/mL³	-9,98±21,7	3,93±27,9	-14,2 [-25,8-(-2,73)]	0,017
IL-6, pg/mL	-21,1 [-50,0-114]	-12,6 [-65,1-62,5]	2,65 [-82,5-87,9]	0,478
TNF-α, pg/mL	0,67 [-15,9-12,6]	0 [-8,67-7,48]	7,03 [-5,12-19,2]	0,684
Hepcidina, ng/mL	-56,7 [-66,7-(-36,2)]	3,30 [-22,5-27,3]	-59,6 [-81,9-(-37,4)]	<0,001

¹Los valores se expresan como media \pm desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de Student o Mann-Whitney, según se aplique.

³Los valores de la leptina están expresados como 10^3 , la adiponectina como 10^7 y la resistina y la RBP4 como 10^4 .

5. ANÁLISIS POR SUBGRUPOS

A continuación, se exponen los datos obtenidos tras realizar el estudio por subgrupos en función de cuatro variables principales: ferritina, índice HOMA, triglicéridos y PCR. Se han subdividido los grupos en dos en función del cálculo de la media para cada variable, para conseguir grupos homogéneos.

En las siguientes tablas(26-34) se exponen en una primera parte los resultados que comparan las principales variables en su determinación basal, a los 3 meses tras realizar la flebotomía y la p de significación estadística, obtenida tras haber realizado un estudio de t de student para muestras emparejadas o test de U de Mann-Whitney (muestras no paramétricas). Además, se ha adjuntado en la tabla el porcentaje de variación que se experimentó entre los datos basales y a los 3 meses.

En una segunda parte, se seleccionaron a los pacientes con cifras más elevadas de cada una de las variables, y se comparó el porcentaje de variación del grupo de flebotomías versus el grupo dieta, y especificando su p de significación.

5.1.- ANÁLISIS POR SUBGRUPOS EN FUNCIÓN DEL NIVEL DE FERRITINA.

El primer análisis por subgrupo que se realizó fue en función de los niveles basales de ferritina. Se dividió toda la muestra en dos grupos, quedando aquellos pacientes con cifras inferiores a 547,1 ng/ml en el primer grupo y todos aquellos con cifras superiores a esta cifra en un segundo grupo.

Los resultados en el grupo de las flebotomías fue relevante, dado que los pacientes con cifras superiores de ferritina, experimentaron una mejoría significativa tanto en el perfil glucídico, lipídico como hepático; que a su vez no se observó en aquellos pacientes con niveles más bajos de ferritina.

Las variables que presentaron una reducción significativa en el subgrupo con cifras altas de ferritina fueron: niveles de insulina sérica, hemoglobina glicada ajustada a cifras de hemoglobina, colesterol total, colesterol HDL, triglicéridos, GGT y GPT. Sin embargo, en los pacientes con niveles inferiores de ferritina sólo se observó mejoría en los niveles de hemoglobina glicada ajustada a hemoglobina y en la GPT.

Respecto los datos antropométricos en ambos subgrupos hubo una disminución significativa en el perímetro abdominal. Respecto al perfil férrico, tanto la ferritina como la hepcidina disminuyeron de forma significativa con las flebotomías, siendo este descenso ligeramente superior en aquellos con cifras iniciales más elevadas.

Respecto al perfil de citoquinas inflamatorias, el único dato llamativo fue una reducción significativa en los niveles de RBP4, en los pacientes con cifras elevadas de ferritina.

En la tabla 27, en la que se compara los porcentajes de variación entre aquellos pacientes que al inicio del estudio presentaban mayores niveles de ferritina, asignados a dieta o a flebotomías, se observó una mejoría significativa en aquellos que recibieron tratamiento con flebotomías en los niveles de resistina y RBP4.

Tabla 26: Variaciones observadas sobre las variables clínicas y analíticas en el grupo aleatorizado a flebotomías, en función de los niveles basales de ferritina¹.

Grupo flebotomías terapéuticas y consejo dietético								
	Ferritina (<547 ng/mL) (n=25)				Ferritina (>547,1 ng/mL) (n=19)			
	Basal (n=25)	Tras la intervención (n=22)	Δ%	p ²	Basal (n=19)	Tras la intervención (n=18)	Δ%	p ²
Peso, Kg	85,3±10,6	85,0±11,0	-0,78±1,88	0,069	86,0±12,8	85,5±12,4	-0,49±3,27	0,367
IMC, kg/m ²	29,0±3,1	28,9±3,0	-0,78±1,88	0,052	29,5±3,7	29,3±3,6	-0,48±3,26	0,410
Perímetro abdominal, cm	101,0±8,8	99,7±9,4	-0,78±1,88	0,021	105,4±10,5	103,8±10,4	-0,48±3,26	0,041
PA sistólica, mmHg	135,8±19,3	134,6±16,0	-0,62±9,18	0,473	135,2±14,8	133,6±15,9	-0,91±9,79	0,588
PA diastólica, mmHg	85,9±12,2	85,2±8,2	-0,73±11,0	0,410	82,2±9,2	81,8±10,3	0,12±8,95	0,953
Ferritina, ng/ml	455,3±62,6	286,1±94,2	-35,3[-50,7-(-30,2)]	<0,001	748,6±159,3	485,5±159,6	-36,4[-44,2-(-29,5)]	<0,001
Hepcidina, ng/ml	27,3[21,6-41,2]	11,5[9,1-20,4]	-57,7[-66,8-(-34,5)]	<0,001	37,1[25,6-43,7]	17,6[13,8-34,5]	-54,1[-62,5-(-29,5)]	0,001

¹Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

Grupo flebotomías terapéuticas y consejo dietético

	Ferritina (<547 ng/mL) (n=25)				Ferritina (>547,1 ng/mL) (n=19)			
	Basal (n=25)	Tras la intervención (n=22)	Δ%	p ²	Basal (n=19)	Tras la intervención (n=18)	Δ%	p ²
Glucosa, mg/dl	93,0[80,8-114,0]	97,0[84,0-109,0]	0,00[-4,92-12,7]	0,626	94,0[82,0-98,0]	90,0[85,5-97,5]	-1,72[-6,38-6,45]	0,305
Insulina, μUI/mL	9,9[7,6-14,9]	10,5[7,2-13,8]	2,68[-21,0-45,7]	0,904	9,1[6,2-17,1]	9,4[4,6-13,4]	-19,3[-36,3-0,00]	0,037
HOMA-IR	2,8±1,7	2,6±1,4	13,9±46,8	0,870	6,3±15,7	5,1±12,3	-9,75±49,9	0,139
HbA1c, % ³	5,60[5,47-5,70]	5,32[5,23-5,34]	-3,10[-3,14-(-3,03)]	<0,001	5,54[5,4-5,6]	5,3[5,3-5,3]	-3,16[-3,20-(-3,10)]	0,001
Colesterol Total, mg/dl	262,3±37,4	260,1±40,1	-0,55±11,3	0,648	223,6±53,8	208,3±56,3	-7,17±10,1	<0,001
Colesterol HDL, mg/dl	46,1±8,1	46,4±8,2	0,91±12,3	1,000	39,8±7,1	38,6±4,6	-1,65±12,2	0,365
Apo B, mg/dl	143,9±27,2	147,9±30,4	2,99±10,6	0,266	125,0±30,9	120,3±34,8	-4,21±10,1	0,194
Triglicéridos mg/dl	312[223,3-468,5]	264,0[162,0-419,0]	-4,69[-31,2-13,7]	0,300	205,0[180,0-326,0]	179,0[144,0-353,0]	-18,5[-27,3-0,52]	0,035
GGT, UI/L	41,5[27,8-63,8]	36,0[24,5-64,0]	-4,35[-24,8-13,5]	0,235	29,0[22,0-44,0]	23,0[19,0-32,0]	-20,0[-32,8-(-4,17)]	0,001
ALT, UI/L	30,0[23,8-37,0]	24,0[19,5-34,5]	-9,86[-29,5-7,90]	0,036	22,0[17,0-33,0]	21,0[17,0-27,0]	-13,5[-25,0-0,00]	0,023

¹Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

³Los estudios realizados sobre la hemoglobina glicosilada se han ajustado al nivel de hemoglobina.

Grupo flebotomías terapéuticas y consejo dietético								
	Ferritina (<547 ng/mL) (n=25)				Ferritina (>547,1 ng/mL) (n=19)			
	Basal (n=25)	Tras la intervención (n=22)	Δ%	p ²	Basal (n=19)	Tras la intervención (n=18)	Δ%	p ²
PCR, mg/L	0,20[0,09-0,31]	0,19[0,10-0,39]	0,00[-42,6-51,8]	0,796	0,22[0,13-0,60]	0,18[0,09-0,39]	-42,9[-76,7-50,0]	0,356
Leptina, pg/mL ⁴	6,64[4,3-15,5]	8,50[4,4-15,4]	4,48[-15,1-27,9]	0,372	8,53[4,0-14,3]	4,95[3,6-18,0]	-16,6[-36,5-26,4]	0,811
Adiponectina, pg/mL ⁴	1,30[0,7-1,7]	1,30[0,7-1,6]	-1,10[-28,1-16,4]	0,527	1,05[0,8-19,7]	1,17[0,7-21,0]	-1,05[-22,2-22,2]	0,983
Resistina, pg/mL ⁴	2,57 [1,7-2,9]	2,24 [1,7-2,7]	-7,15[-18,4-23,0]	0,339	2,74 [2,1-3,3]	2,44[1,8-3,6]	-1,00[-26,3-16,2]	0,570
RBP4, ng/mL ⁴	4,0±1,1	3,7±1,3	-5,79±23,0	0,190	4,0±1,7	3,2±1,1	-15,5±20,5	0,010
IL-6, pg/mL	1,48[0,6-3,4]	1,59[1,1-2,5]	1,96[-39,5-188,7]	0,538	2,60[0,9-3,6]	2,01[0,9-4,0]	-18,2[-63,9-115,4]	0,616
TNF-α, pg/mL	4,19±1,39	4,39±1,87	6,98±37,4	0,543	3,79±1,28	3,97±1,31	5,36±26,5	0,410

⁴Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

⁴Los valores de la leptina están expresados como 10³, la adiponectina como 10⁷ y la resistina y la RBP4 como 10⁴.

Tabla 27: Comparación de las variaciones en parámetros clínicos y bioquímicos entre los grupos a estudio tras la intervención, seleccionando aquellos sujetos con concentración basal de ferritina >547,1mg/dl”.

	Flebotomías + consejo dietético	Consejo dietético		Flebotomías + consejo dietético	Consejo dietético		
	$\Delta\%$ Ferritina (n=19)	$\Delta\%$ Ferritina (n=15)	p $\Delta\%^2$		$\Delta\%$ Ferritina (n=19)	$\Delta\%$ Ferritina (n=15)	p $\Delta\%^2$
Peso	-0,49±3,27	-2,53±2,48	0,066	Colesterol HDL	-1,65±12,2	-2,55±11,2	0,834
IMC	-0,48±3,26	-2,54±2,47	0,089	Apo B	-4,21±10,1	-3,52±20,0	0,898
Perímetro abdominal, cm	-0,48±3,26	-2,54±2,47	0,064	Triglicéridos	-18,5[-27,3-0,52]	-10,6[-25,3-17,9]	0,347
PA sistólica	-0,91±9,79	6,19±13,1	0,089	GGT	-20,0[-32,8-(-4,17)]	-11,4[-19,6-7,89]	0,250
PA diastólica	0,12±8,95	0,47±9,50	0,917	ALT	-13,5[-25,0-0,00]	0,00[-19,3-16,7]	0,167
Ferritina	-36,4[-44,2-(-29,5)]	-13,8[-27,0-0,67]	0,001	PCR	-42,9[-76,7-50,0]	-0,00[-27,5-49,6]	0,071
Hepcidina	-54,1[-62,5-(-29,5)]	6,37[-21,5-25,1]	0,001	Leptina ⁴	-16,6[-36,5-26,4]	-17,3[-27,4-7,04]	0,935
Glucosa	-1,72[-6,38-6,45]	-5,56[-13,9-2,11]	0,227	Adiponectina ⁴	-1,05[-22,2-22,2]	20,6[4,07-33,7]	0,063
Insulina	-19,3[-36,3-0,00]	-6,41[-32,4-14,1]	0,351	Resistina ⁴	-1,00[-26,3-16,2]	20,4[-0,30-40,9]	0,031
HOMA-IR	-9,75±49,9	1,55±39,4	0,581	RBP4 ⁴	-15,5±20,5	9,33±27,1	0,007
HbA1c ³	-3,16[-3,20-(-3,10)]	-3,09[-3,17-(-3,02)]	0,069	IL-6	-18,2[-63,9-115,4]	-1,32[-50,8-70,3]	0,685
Colesterol Total	-7,17±10,1	-5,34±15,6	0,667	TNF- α	5,36±26,5	-4,90±18,6	0,174

¹Los valores se expresan como media \pm desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

³Los estudios realizados sobre la hemoglobina glicosilada se han ajustado al nivel de hemoglobina.

⁴Los valores de la leptina están expresados como 10^3 , la adiponectina como 10^7 y la resistina y la RBP4 como 10^4 .

5.2.- ANÁLISIS POR SUBGRUPOS EN FUNCIÓN DEL NIVEL DE HOMA.

El siguiente análisis por subgrupos se realizó en función de los niveles basales del índice HOMA. Se dividió toda la muestra en dos grupos, quedando aquellos pacientes con cifras inferiores a 3,8 en el primer grupo y todos aquellos con cifras superiores a esta cifra en un segundo grupo.

Los resultados en el grupo de las flebotomías han sido relevantes, dado que los pacientes con cifras superiores de HOMA, experimentaron una mejoría significativa tanto en el perfil glucídico, lipídico como hepático.

Las variables que presentaron una reducción significativa en el subgrupo con un índice HOMA alto han sido: los niveles de insulina sérica, hemoglobina glicada ajustada a cifras de hemoglobina, colesterol total y GPT. Sin embargo, en los pacientes con niveles inferiores de HOMA sólo se observó mejoría en los niveles de hemoglobina glicada ajustada a hemoglobina y en la GGT y GPT.

Respecto al perfil glucídico aquellos pacientes con niveles más elevados de índice HOMA experimentaron una mejoría reflejada en el porcentaje de variación respecto aquellos que presentaban niveles más bajos al inicio del estudio, si bien este hallazgo no resultó estadísticamente significativo.

Respecto al perfil férrico en ambos subgrupos descendió de forma significativa la cifra de ferritina y hepcidina tras las flebotomías terapéuticas.

Respecto al perfil de citoquinas inflamatorias, se observó en el subgrupo con mayores niveles de HOMA una reducción significativa en los niveles de RBP4.

En el análisis en el que se compararon los porcentajes de variación de los pacientes con cifras elevadas de HOMA (tabla 29), se puede apreciar que aquellos pacientes que fueron asignados a flebotomías experimentaron un descenso significativo de los niveles de RPB4, hepcidina y ferritina. Por otro lado, los que fueron asignados a dieta, presentaron una mejoría significativa en datos antropométricos como el peso corporal y el perímetro abdominal.

Tabla 28: Variaciones observadas sobre las variables clínicas y analíticas en el grupo aleatorizado a flebotomías, en función de los niveles basales de índice HOMA¹.

Grupo flebotomías terapéuticas y consejo dietético								
	HOMA <2,59 (n=24)				HOMA >2,59 (n=20)			
	Basal (n=24)	Tras la intervención (n=23)	Δ%	p ²	Basal (n=20)	Tras la intervención (n=19)	Δ%	p ²
Peso, Kg	85,7±10,8	85,3±10,4	-0,45±3,19	0,361	87,6±12,6	86,9±13,0	-0,77±1,60	0,089
IMC, kg/m ²	30,0±3,16	28,8±2,96	-0,44±3,19	0,387	30,2±3,33	29,9±3,38	-0,95±1,47	0,062
Perímetro abdominal, cm	104±9,86	102±9,78	-0,44±3,19	0,020	104±10,0	103±10,2	-0,78±1,61	0,052
PA sistólica, mmHg	134±14,0	132±13,1	-0,95±9,20	0,481	137±17,1	136±16,1	-0,76±9,83	0,58
PA diastólica, mmHg	82,4±11,5	82,3±10,6	0,54±10,0	0,96	86,6±8,38	84,8±7,89	-1,69±7,80	0,287
Ferritina, ng/ml	565±129	361±124	-34,6[-49,9-(-29,3)]	<0,001	639,5±240	400±211	-38,8[-47,7-(-20,8)]	<0,001
Hepcidina, ng/ml	37,1[24,5-49,6]	15,2[9,35-23,2]	-59,1[-71,3-(-36,2)]	<0,001	27,8[24,2-32,9]	13,8[9,55-17,6]	-54,1[-33,9-(-5,42)]	0,004

¹Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

Grupo flebotomías terapéuticas y consejo dietético

	HOMA <2,59(n=24)				HOMA>2,59(n=20)			
	Basal (n=24)	Tras la intervención (n=23)	Δ%	p ²	Basal (n=20)	Tras la intervención (n=19)	Δ%	p ²
Glucosa, mg/dl	85,0[79,0-94,5]	88,0[84,0-94,5]	2,47[-5,34-11,8]	0,136	104 [93,0-121]	100[90,0-115]	-1,72[-6,77-5,50]	0,244
Insulina, μUI/ml	8,00[5,85-9,05]	7,30[4,60-8,97]	-0,60[-27,9-34,2]	0,945	17,1 [12,7-22,1]	15,0[11,6-18,6]	-19,0[-38,1-13,6]	0,044
HOMA-IR	1,54±0,47	1,69±0,81	7,66[-27,9-44,2]	0,329	8,30±16,1	6,67±12,7	-10,9±39,3	0,101
HbA1c, % ³	5,54[5,43-5,67]	5,33[5,32-5,37]	-3,14[-3,17-(-3,05)]	<0,001	5,60[5,51-5,68]	5,32[5,26-5,33]	-3,11[-3,22-(-3,05)]	0,001
Colesterol Total, mg/dl	253±56,5	248±58,0	-1,53±32,4	0,454	237±40,9	224±50,1	-5,97±10,5	0,045
Colesterol HDL, mg/dl	44,1±9,36	42,8±6,53	-1,31±11,9	0,317	41,4±5,01	41,4±4,46	0,61±11,3	0,960
Apo B, mg/dl	139±32,2	144±36,3	2,99±9,11	0,126	130±31,1	127±33,8	-3,06±11,9	0,272
Triglicéridos	238[188-427]	211[151-420]	-8,47[-26,3-14,1]	0,265	226[180-494]	256[157-430]	-5,51[-27,3-2,64]	0,134
GGT, UI/L	37,0[23,5-47,5]	28,0[22,0-43,5]	-17,3[-28,8-3,57]	0,013	29,0[23,0-63,0]	27,0[22,0-48,0]	-7,14[-27,6-3,34]	0,123
ALT, UI/L	23,0[16,5-41,0]	19,0[16,5-32,5]	-12,1[-29,1-5,36]	0,021	28,0[22,0-32,0]	24,0[19,0-27,0]	-13,5[-30,7-11,8]	0,047

¹Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

³Los estudios realizados sobre la hemoglobina glicosilada se han ajustado al nivel de hemoglobina.

Grupo flebotomías terapéuticas y consejo dietético								
	HOMA <2,59 (n=24)				HOMA>2,59 (n=20)			
	Basal (n=24)	Tras la intervención (n=23)	Δ%	p ²	Basal (n=20)	Tras la intervención (n=19)	Δ%	p ²
PCR, mg/L	0,21[0,14-0,32]	0,17[0,10-0,30]	-35,7[-56,4-17,4]	0,224	0,26[0,12-0,59]	0,29[0,09-0,67]	0,00[-45,0-67,3]	0,842
Leptina, pg/mL ⁴	6,30[3,66-11,8]	4,44[2,89-15,1]	10,4[-23,4-34,6]	0,168	1,24[0,61-3,26]	0,88[0,42-1,92]	-13,7[-33,6-11,8]	0,469
Adiponectina, pg/mL ⁴	1,15[0,82-1,81]	1,13[0,89-1,74]	1,30[-23,0-21,6]	0,931	9,01[0,66-1,35]	9,06[0,59-1,35]	0,54[-18,8-16,5]	0,687
Resistina, pg/mL ⁴	2,78[1,75+3,66]	2,61[1,99-3,59]	-6,13[-28,5-29,7]	0,305	2,44[1,57-2,80]	2,28[1,57-2,52]	-3,14[-13,9-37,2]	0,421
RBP4, ng/mL ⁴	4,17±1,35	3,76±1,27	-7,02±23,3	0,106	3,74±1,50	3,02±1,04	-16,8±18,7	0,007
IL-6, pg/ml	1,66[0,53-3,90]	2,13[1,07-2,79]	-27,7[-54,5-187,4]	0,490	2,13[1,30-3,72]	1,92[0,87-6,61]	0,00[-55,0-165]	0,326
TNF-α, pg/ml	4,14±1,34	4,28±1,91	3,71±33,8	0,678	3,84±1,35	4,16±1,21	13,7±31,8	0,327

⁴Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

⁴Los valores de la leptina están expresados como 10³, la adiponectina como 10⁷ y la resistina y la RBP4 como 10⁴.

Tabla 29: Comparación de las variaciones en parámetros clínicos y bioquímicos entre los grupos a estudio tras la intervención, seleccionando aquellos sujetos con índice HOMA >2,59¹.

	Flebotomías + consejo dietético	Consejo dietético		Flebotomías + consejo dietético	Consejo dietético		
	$\Delta\%$ HOMA (n=19)	$\Delta\%$ HOMA (n=21)	p $\Delta\%$		$\Delta\%$ HOMA (n=19)	$\Delta\%$ HOMA (n=21)	p $\Delta\%$
Peso	-0,77±1,60	-2,95±2,63	0,004	Colesterol HDL	0,61±11,3	0,40±15,9	0,964
IMC	-0,95±1,47	-2,63±3,25	0,056	Apo B	-3,06±11,9	-4,60±20,5	0,785
Perímetro abdominal, cm	-0,78±1,61	-2,63±3,25	0,034	Triglicéridos	-5,51[-27,3-2,64]	-12,3[-36,9-11,5]	0,895
PA sistólica	-0,76±9,83	-1,88±10,3	0,730	GGT	-7,14[-27,6-3,34]	-12,8[-38,2-3,95]	0,419
PA diastólica	-1,69±7,80	-1,54±9,00	0,956	ALT	-13,5[-30,7-11,8]	-14,7[-31,3-1,85]	0,906
Ferritina	-38,8[-47,7-(-20,8)]	-13,2[-21,5-(-5,09)]	<0,001	PCR	0,00[-45,0-67,3]	-15,9[-32,4-7,30]	0,378
Hepcidina	-54,1[-33,9-(-5,42)]	-3,63[-21,6-13,1]	0,001	Leptina⁴	-13,7[-33,6-11,8]	-8,45[-30,9-3,77]	0,692
Glucosa	-1,72[-6,77-5,50]	-4,05[-14,8-0,98]	0,150	Adiponectina⁴	0,54[-18,8-16,5]	2,08[-11,5-22,5]	0,558
Insulina	-19,0[-38,1-13,6]	-16,6[-32,3-2,32]	0,912	Resistina⁴	-3,14[-13,9-37,2]	-6,42[-18,2-24,6]	0,646
HOMA-IR	-10,9±39,3	-17,8±37,6	0,601	RBP4⁴	-16,8±18,7	3,84±26,6	0,012
HbA1c³	-3,11[-3,22-(-3,05)]	-3,09[-3,12-(-3,01)]	0,131	IL-6	0,00[-55,0-165]	-6,29[-63,4-79,7]	0,401
Colesterol Total	-5,97±10,5	-6,18±18,9	0,967	TNF-α	13,7±31,8	-3,02±16,3	0,053

¹Los valores se expresan como media \pm desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

³Los estudios realizados sobre la hemoglobina glicosilada se han ajustado al nivel de hemoglobina.

⁴Los valores de la leptina están expresados como 10^3 , la adiponectina como 10^7 y la resistina y la RBP4 como 10^4 .

5.3.- ANÁLISIS POR SUBGRUPOS EN FUNCIÓN DEL NIVEL DE PCR SÉRICA.

A continuación, se exponen los resultados de análisis por subgrupos que se ha realizado en función de los niveles basales PCR sérica. Se dividió toda la muestra en dos grupos, quedando aquellos pacientes con cifras inferiores a 0,2 mg/dl en el primer grupo y todos aquellos con cifras superiores a esta cifra en un segundo grupo.

En los pacientes sometidos a flebotomías y que presentaron mayores niveles de PCR sérica al inicio del estudio, se encontró una mejoría significativa en el perfil hepático tanto la GGT y la GPT, que no se encontró en aquellos con niveles más bajos de PCR.

Respecto al perfil glucídico en ambos grupos se observó una mejoría significativa en la cifra de hemoglobina glicosilada, ajustada a la hemoglobina, siendo el porcentaje de variación ligeramente superior en aquellos con niveles más bajos de PCR.

Respecto al perfil férrico en ambos subgrupos descendió de forma significativa la cifra de ferritina y hepcidina tras las flebotomías terapéuticas.

Respecto al perfil de citoquinas inflamatorias, en el subgrupo con cifras elevadas de PCR sérica, se observó una reducción significativa de RBP4, de resistina y de PCR sérica. El porcentaje de variación de las cifras de PCR fue muy superior en el subgrupo que presentaba al inicio de estudio cifras más elevadas.

Entre los resultados que compararon los pacientes de ambos grupos con niveles elevados de PCR (tabla 31), se observó que en el grupo de flebotomías hubo una mejoría en la RPB4, además de la ferritina y la hepcidina. Por otro lado los pacientes asignados a dieta, presentaron un porcentaje de variación significativamente mayor en la pérdida de peso y de perímetro abdominal.

Tabla 30: Variaciones observadas sobre las variables clínicas y analíticas en el grupo aleatorizado a flebotomías, en función de los niveles basales de PCR sérica¹.

Grupo flebotomías terapéuticas y consejo dietético								
	PCR <0,2 mg/dl (n=24)				PCR >0,21 mg/dl (n=21)			
	Basal (n=23)	Tras la intervención (n=18)	Δ%	p ²	Basal (n=21)	Tras la intervención (n=20)	Δ%	p ²
Peso, Kg	84,0±10,2	83,8±10,0	-0,60±3,07	0,246	87,4±12,7	86,8±13,0	-0,71±1,88	0,127
IMC, kg/m ²	28,7±3,2	28,6±3,1	-0,59±3,06	0,283	29,8±3,4	29,5±3,4	-0,72±1,89	0,112
Perímetro abdominal, cm	100,8±8,6	98,0±8,1	-0,59±3,06	0,006	104,6±10,4	105,0±10,5	-0,72±1,89	0,096
PA sistólica, mmHg	135,6±16,4	133,0±16,4	-2,03±9,18	0,206	135,5±18,4	135,5±15,3	0,65±9,53	1,000
PA diastólica, mmHg	84,2±12,0	83,5±7,4	-0,11±10,9	0,573	83,6±9,6	82,9±11,0	-0,64±9,33	0,678
Ferritina, ng/ml	556±202	375±187	-34,2[-41,4-(-17,8)]	<0,001	613±163	369±128	-38,8[-48,9-(-32,6)]	<0,001
Hepcidina, ng/ml	32,1[22,1-40,4]	14,0[9,28-25,5]	-48,6[-66,3-(-18,9)]	<0,001	32,4[25,0-49,1]	15,2[9,60-22,4]	-58,7[-65,0-(-45,4)]	<0,001

¹Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

Grupo flebotomías terapéuticas y consejo dietético								
	PCR <0,2 mg/dl(n=24)				PCR>0,21 mg/dl (n=21)			
	Basal (n=23)	Tras la intervención (n=18)	Δ%	p ²	Basal (n=21)	Tras la intervención (n=20)	Δ%	p ²
Glucosa, mg/dl	94,5[81,3-105]	91,0[84,0-100]	-5,26[-7,22-7,78]	0,308	93,0[83,0-106]	96,5[86,5-110]	2,30[-1,47-9,07]	0,206
Insulina, μUI/ml	9,10[5,56-16,6]	8,40[6,60-13,2]	-0,60[-28,9-42,7]	0,623	10,5[7,80-17,1]	10,8[7,20-14,2]	-19,3[-31,6-11,8]	0,110
HOMA-IR	2,7±1,8	2,3±1,3	7,92±58,6	0,389	6,0±14,9	5,2±11,7	-2,36±40,2	0,255
HbA1c, % ³	5,62[5,50-5,72]	5,33[5,31-5,39]	-3,15[-3,24-(-3,06)]	<0,001	5,56[5,42-5,63]	5,32[5,27-5,34]	-3,12[-3,16-(-3,03)]	<0,001
Colesterol Total, mg/dl	240,8±56,1	227,7±56,8	-5,04±11,0	0,043	251,8±38,5	248,8±49,4	-1,61±9,73	0,568
Colesterol HDL, mg/dl	44,0±9,3	43,5±10,1	-1,19±12,0	0,348	42,7±7,1	42,5±4,5	0,89±12,6	0,849
Apo B, mg/dl	126,9±29,9	122,6±30,9	-2,28±10,1	0,565	146,2±27,3	149,5±34,2	2,01±11,5	0,259
Triglicéridos, mg/dl	312[176-562]	247[143-397]	-16,7[-50,9-12,9]	0,107	235[199-393]	211[166-433]	-6,72[-23,4-4,39]	0,145
GGT, UI/L	29,0[22,0-43,0]	26,0[21,0-43,0]	-7,14[-27,1-4,76]	0,082	37,0[29,0-55,0]	32,0[23,5-47,0]	-20,0[-27,2-(-036)]	0,018
ALT, UI/L	28,0[18,0-35,5]	24,0[17,0-28,0]	-3,85[-28,6-9,38]	0,135	28,0[19,5-41,0]	24,0[18,0-32,0]	-14,3[-28,3-(-5,13)]	0,005

¹Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

³Los estudios realizados sobre la hemoglobina glicosilada se han ajustado al nivel de hemoglobina.

Grupo flebotomías terapéuticas y consejo dietético

	PCR <0,2 mg/dl (n=23)				PCR >0,21 mg/dl (n=21)			
	Basal (n=23)	Tras la intervención (n=18)	Δ%	p ²	Basal (n=21)	Tras la intervención (n=20)	Δ%	p ²
PCR, mg/L	0,12 [0,08-0,16]	0,10[0,06-0,47]	0,00[-35,0-294]	0,083	0,35[0,26-0,65]	0,27[0,16-0,35]	-42,9[-56,8-(-2,40)]	0,012
Leptina, pg/mL ⁴	6,64 [3,89-13,6]	7,26[3,99-12,0]	3,32[-23,3-30,6]	0,970	8,60[4,49-16,1]	8,72[0,41-22,8]	2,96[-33,6-21,9]	0,455
Adiponectina, pg/mL ⁴	1,06 [0,65-1,97]	1,15[0,59-1,43]	-3,51[-36,1-21,1]	0,469	1,15[0,90-1,76]	1,11[0,80-1,59]	0,54[-16,0-14,1]	0,931
Resistina, pg/mL ⁴	2,51[1,82-2,80]	2,27[1,90-2,71]	0,00[-17,0-29,6]	0,500	2,78[1,75-3,77]	2,44[1,70-3,54]	-11,7[-28,5-3,73]	0,048
RBP4, ng/mL ⁴	4,0±1,2	3,5±1,0	-9,47±26,6	0,095	4,0±1,6	3,5±1,4	-11,1±17,6	0,015
IL-6, pg/mL	1,24[0,60-2,31]	2,18[0,76-4,91]	54,4[-44,3-262]	0,107	3,08[1,54-3,87]	1,65[0,97-3,02]	-27,7[-59,0-39,9]	0,179
TNF-α, pg/mL	3,73±1,1	4,25±1,99	12,4±35,1	0,141	4,29±1,55	4,15±1,25	0,34±29,2	0,509

⁴Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

⁴Los valores de la leptina están expresados como 10³, la adiponectina como 10⁷ y la resistina y la RBP4 como 10⁴.

Tabla 31: Comparación de las variaciones en parámetros clínicos y bioquímicos entre los grupos a estudio tras la intervención, seleccionando aquellos sujetos con concentración basal de PCR sérica >0,21 mg/dL¹.

	Flebotomías + Consejo dietético	Consejo dietético		Flebotomías + consejo dietético	Consejo dietético		
	$\Delta\%$ PCR (n=21)	$\Delta\%$ PCR (n=18)	p $\Delta\%$		$\Delta\%$ PCR (n=21)	$\Delta\%$ PCR (n=18)	p $\Delta\%$
Peso	-0,71±1,88	-2,89±2,97	0,007	Colesterol HDL	0,89±12,6	-0,51±18,8	0,939
IMC	-0,72±1,89	-2,60±3,55	0,057	Apo B	2,01±11,5	-0,71±16,3	0,536
Perímetro abdominal, cm	-0,72±1,89	-2,60±3,55	0,038	Triglicéridos	-6,72[-23,4-4,39]	0,00[-42,2-24,1]	0,687
PA sistólica	0,65±9,53	-0,70±12,4	0,694	GGT	-20,0[-27,2-(-036)]	-11,4[-29,9-10,1]	0,651
PA diastólica	-0,64±9,33	-2,35±8,64	0,541	ALT	-14,3[-28,3-(-5,13)]	-13,6[-28,9-9,97]	0,633
Ferritina	-38,8[-48,9-(-32,6)]	-12,7[-24,4-(-3,03)]	<0,001	PCR	-42,9[-56,8-(-2,40)]	-14,2[-41,2-11,1]	0,061
Hepcidina	-58,7[-65,0-(-45,4)]	-5,42[-24,3-24,9]	<0,001	Leptina⁴	2,96[-33,6-21,9]	-17,3[-41,5-3,77]	0,124
Glucosa	2,30[-1,47-9,07]	-1,39[-9,61-6,46]	0,163	Adiponectina⁴	0,54[-16,0-14,1]	-1,73[-20,0-28,7]	0,814
Insulina	-19,3[-31,6-11,8]	-15,7[-29,8-4,41]	0,882	Resistina⁴	-11,7[-28,5-3,73]	-2,46[-10,4-22,1]	0,060
HOMA-IR	-2,36±40,2	-4,98±39,0	0,729	RBP4⁴	-11,1±17,6	10,0±25,2	0,003
HbA1c³	-3,12[-3,16-(-3,03)]	-3,10[-3,13-(-3,01)]	0,175	IL-6	-27,7[-59,0-39,9]	-21,9[-65,5-33,7]	0,725
Colesterol Total	-1,61±9,73	-3,45±16,7	0,666	TNF-α	0,34±29,2	-0,29±17,7	0,790

¹Los valores se expresan como media \pm desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

³Los estudios realizados sobre la hemoglobina glicosilada se han ajustado al nivel de hemoglobina.

⁴Los valores de la leptina están expresados como 10³, la adiponectina como 10⁷ y la resistina y la RBP4 como 10⁴.

5.4.- ANÁLISIS POR SUBGRUPOS EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BASAL DE TRIGLICÉRIDOS SÉRICOS.

Los resultados de análisis por subgrupos que se ha realizado en función de los niveles basales de triglicéridos séricos son los siguientes. Se ha dividido toda la muestra en dos grupos, quedando aquellos pacientes con cifras inferiores a 260 mg/dl en el primer grupo y todos aquellos con cifras superiores a esta cifra en un segundo grupo.

En el grupo asignado a flebotomías se ha observado que en aquellos pacientes independientemente de los niveles de triglicéridos iniciales se obtuvo un descenso significativo de las enzimas hepáticas, siendo el porcentaje de variación más importante en aquellos con los triglicéridos más altos.

Respecto al perfil glucídico en ambos subgrupos se observó una mejoría de la hemoglobina glicada.

Respecto al perfil férrico en ambos subgrupos ha descendido de forma significativa la cifra de ferritina y hepcidina tras las flebotomías terapéuticas.

Respecto al perfil de citoquinas inflamatorias, se ha observado una reducción significativa en los niveles de RBP4 en el subgrupo con niveles más elevados de triglicéridos.

En la tabla 33, en la que se comparan los pacientes con niveles más altos de triglicéridos de ambos grupos, se observa una disminución significativa en la cifra de hepcidina y ferritina, siendo no significativa para el resto de parámetros comparados. Si bien cabe destacar cierta tendencia estadística en los niveles de RPB4, con mayor porcentaje de variación en aquellos pacientes que se sometieron a flebotomías.

Tabla 32: Variaciones observadas sobre las variables clínicas y analíticas en el grupo aleatorizado a flebotomías, en función de los niveles basales de triglicéridos séricos¹.

Grupo flebotomías terapéuticas y consejo dietético								
	TG (<260mg/dl) (n=22)				TG (260,1>mg/dl) (n=23)			
	Basal (n=22)	Tras la intervención (n=21)	Δ%	p ²	Basal (n=23)	Tras la intervención (n=18)	Δ%	p ²
Peso, Kg	89,1±13,3	87,4±13,7	-0,85±1,9	0,089	82,3±8,4	82,1±7,8	0,46±3,03	0,334
IMC, kg/m ²	30,3±3,7	30,1±3,8	-0,85±2,0	0,063	28,2±2,5	28,1±2,4	-0,45±3,0	0,393
Perímetro abdominal, cm	104,8±10,9	103,8±11,1	-0,85±2,0	0,019	100,3±7,4	98,2±6,6	-0,45±3,0	0,053
PA sistólica, mmHg	132,6±15,7	130,7±13,3	-0,76±10,1	0,525	138,4±18,4	137,6±17,5	-0,76±10,1	0,526
PA diastólica, mmHg	82,3±11,7	81,4±9,8	-0,73±8,73	0,575	86,2±9,9	86,1±8,2	-0,38±10,9	0,655
Ferritina, ng/mL	610,6±200,1	402,2±186,7	-36,4[-42,9-(-30,8)]	<0,001	549,1±167,3	342,2±125,2	-34,8[-54,6-(-25,0)]	<0,001
Hepcidina, ng/mL	32,2[25,4-49,7]	14,2[10,5-27,7]	-56,7 [-63,3-(-45,4)]	<0,001	29,27[21,2-40,2]	14,3[8,88-23,1]	-51,9[-73,4-(-21,2)]	<0,001

¹Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

Grupo flebotomías terapéuticas y consejo dietético								
	TG (<260mg/dl)(n=22)				TG (260,1>mg/dl)(n=23)			
	Basal (n=22)	Tras la intervención (n=21)	Δ%	p ²	Basal (n=23)	Tras la intervención (n=18)	Δ%	p ²
Glucosa, mg/dl	95.0[84,3-105,0]	92,0[88,0-99,5]	0,19[-6,22-(9,85)]	0,673	90,0[81,0-105]	92,0[82,5-107]	-0,50[-6,27-8,05]	0,943
Insulina, μUI/mL	9,85[7,25-17,6]	10,8[5,85-14,2]	-20,7[-37,1-3,40]	0,070	9,43[6,18-14,7]	9,92 [7,13-13,0]	-5,36[-5,97-(-1,36)]	0,614
HOMA-IR	3,0±1,7	2,6±1,6	-11,6±38,5	0,158	5,9±15,3	5,0±12,0	18,7±55,9	0,384
HbA1c, % ³	5,60[5,43-5,67]	5,33[5,32-5,34]	-3,15[-3,17-(-3,08)]	<0,001	5,58[5,48-5,68]	5,31[5,18-5,41]	-3,12[-3,22-(-3,02)]	0,001
Colesterol Total, mg/dl	231,4±48,2	225,8±52,6	-2,75±8,28	0,186	259,9±45,5	249,7±53,5	-4,05±12,4	0,140
Colesterol HDL, mg/dl	42,2±7,1	41,5±6,3	-1,00±9,49	0,217	44,6±9,2	44,6±9,1	0,61±14,6	0,424
Apo B, mg/dl	135,7±34,4	135,2±36,6	-0,38±10,1	0,854	136,2±25,9	136,3±34,0	0,01±11,9	0,820
Triglicéridos mg/dl	187[167-217]	165[142-219]	-0,39[-20,0-9,79]	0,434	429[318-660]	375[228-465]	-15,7[-51,2-4,45]	0,039
GGT, UI/L	30,0[22,0-40,8]	25,5[21,3-35,3]	-5,65[-24,6-2,73]	0,030	47,0[27,0-68,0]	35,5[23,5-76,8]	-14,1[-32,5-11,1]	0,041
ALT, UI/L	24,0[16,3-29,5]	21,0[15,8-24,3]	-15,8[-25,0-(-1,69)]	0,004	32,0[22,0-52,0]	26,0[18,8-35,8]	-9,93[-30,9-10,2]	0,070

¹Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

³Los estudios realizados sobre la hemoglobina glicosilada se han ajustado al nivel de hemoglobina.

Grupo flebotomías terapéuticas y consejo dietético								
	TG (<260mg/dl) (n=22)				TG (260,1>mg/dl) (n=23)			
	Basal (n=22)	Tras la intervención (n=21)	Δ%	p ²	Basal (n=23)	Tras la intervención (n=18)	Δ%	p ²
PCR, mg/L	0,25[0,10-0,46]	0,19[0,09-0,04]	-17,5[-56,2-46,8]	0,702	0,18[0,11-0,33]	0,20[0,08-0,31]	-14,8[-50,4-64,6]	0,689
Leptina, pg/mL ⁴	1,20[0,46-1,61]	0,88[0,41-2,02]	4,70[-34,3-25,9]	0,414	0,63[0,43-1,02]	0,64[0,40-1,1]	-6,46[-28,1-29,7]	0,765
Adiponectina, pg/mL ⁴	1,08[0,90-1,63]	1,17[0,91-1,64]	2,44[-10,1-22,6]	0,332	1,31[0,56-2,24]	1,03[0,59-1,53]	-8,95[-38,5-11,8]	0,126
Resistina, pg/mL ⁴	2,7±1,4	2,4±0,9	-3,70[-23,9-2,64]	0,124	2,6±0,9	2,6±0,8	-7,15[-21,6-28,6]	0,823
RBP4, ng/mL ⁴	3,6±1,5	3,2±1,0	-8,27±20,9	0,068	4,4±1,2	3,8±1,3	-12,4±23,7	0,035
IL-6, pg/mL	1,66[0,76-3,31]	1,65[0,97-3,20]	-9,98[-39,9-117,9]	0,575	2,13[0,75-3,56]	1,99[0,83-3,11]	-29,8[-60,1-224]	0,727
TNF-α, pg/mL	3,75±1,5	3,83±1,4	5,82±28,3	0,677	4,23±1,1	4,48±1,8	6,66±36,9	0,483

¹Los valores se expresan como media ± desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

⁴Los valores de la leptina están expresados como 10³, la adiponectina como 10⁷ y la resistina y la RBP4 como 10⁴.

Tabla 33: Comparación de las variaciones en parámetros clínicos y bioquímicos entre los grupos a estudio tras la intervención, seleccionando aquellos sujetos con concentración basal de triglicéridos séricos >260 mg/dl¹.

	Flebotomías + consejo dietético	Consejo dietético		Flebotomías + consejo dietético	Consejo dietético		
	$\Delta\%$ TG (n=23)	$\Delta\%$ TG (n=18)	p $\Delta\%$ ²		$\Delta\%$ TG (n=23)	$\Delta\%$ TG (n=18)	p $\Delta\%$ ²
Peso	-0,46±3,03	-2,00±2,97	0,114	Colesterol HDL	0,61±14,6	2,55±18,0	0,708
IMC	-0,45±3,0	-1,57±3,41	0,277	Apo B	0,01±11,9	-0,49±17,0	0,913
Perímetro abdominal, cm	-0,45±3,0	-1,57±3,41	0,277	Triglicéridos	-15,7[-51,2-4,45]	-13,8[-52,4-9,15]	0,957
PA sistólica	-0,76±10,1	-2,22±10,3	0,624	GGT	-14,1[-32,5-11,1]	-9,71[-23,9-6,15]	0,724
PA diastólica	-0,38±10,9	-1,20±10,2	0,808	ALT	-9,93[-30,9-10,2]	-8,89[-17,7-7,76]	0,765
Ferritina	-34,8[-54,6-(-25,0)]	-10,7[-22,3-(-4,91)]	0,001	PCR	-14,8[-50,4-64,6]	-11,8[-26,0-38,8]	0,430
Hepcidina	-73,4[-79,9-(-21,2)]	7,92[-22,3-23,1]	0,001	Leptina⁴	-6,46[-28,1-29,7]	-5,08[-31,4-4,15]	0,484
Glucosa	-0,50[-6,27-8,05]	-1,99[-6,10-3,68]	0,644	Adiponectina⁴	-8,95[-38,5-11,8]	3,11[-16,4-23,7]	0,110
Insulina	-5,36[-5,97-(-1,36)]	-8,85[-26,5-1,55]	0,137	Resistina⁴	-7,15[-21,6-28,6]	-5,63[-16,9-13,0]	0,947
HOMA-IR	18,7±55,9	-9,06±33,1	0,085	RBP4⁴	-12,4±23,7	6,47±34,9	0,065
HbA1c ³	-3,12[-3,22-(-3,02)]	-3,07[-3,20-(-3,00)]	0,180	IL-6	-29,8[-60,1-224]	-9,96[-98,0-37,1]	0,414
Colesterol Total	-4,05±12,4	-4,43±15,7	0,932	TNF-α	6,66±36,9	-0,74±17,5	0,478

¹Los valores se expresan como media \pm desviación estándar o mediana [percentil 25-percentil 75].

²La P corresponde a la diferencia calculada de forma apropiada mediante los test t de muestras pareadas o de Wilcoxon, según se aplique.

³Los estudios realizados sobre la hemoglobina glicosilada se han ajustado al nivel de hemoglobina.

⁴Los valores de la leptina están expresados como 10³, la adiponectina como 10⁷ y la resistina y la RBP4 como 10⁴.

5.4.- RESULTADOS SOBRE LA ASOCIACIÓN ENTRE LAS PRINCIPALES VARIACIONES DEL ESTUDIO Y LA DEPLECIÓN FÉRRICA.

Por último, se ha realizado el estudio de la influencia de la variación de la ferritina sobre la variación de los diferentes parámetros bioquímicos (parámetros del metabolismo de la glucosa, triglicéridos, GGT y GPT y RBP4), el cual se llevó a cabo mediante regresión lineal múltiple.

Las variables independientes introducidas en cada uno de los modelos fueron: variación de ferritina y variación de peso. En el caso de que este modelo resultara significativo, se realizó un nuevo modelo añadiendo, además, como variables independientes las concentraciones basales de ferritina, triglicéridos, PCR y HOMA.

Tabla 34: Asociación entre las variaciones de los principales parámetros a estudio tras la intervención en el grupo asignado a flebotomías y la variación de ferritina obtenida tras la intervención¹.

	Coefficiente B	IC 95%	p	R ² corregido
Var. HOMA	-6,20	[-25,6-13,2]	0,525	0,197
Var. Insulina	-5,42	[-23,2-12,3]	0,54	0,182
Var. Glucosa	2,10	[-2,96-7,16]	0,411	0,071
Var. HbAc1	0,006	[-0,18-0,19]	0,946	-0,024
Var. Triglicéridos	-8,53	[-25,3-8,23]	0,314	0,019
Var. GGT	-7,52	[-21,9-6,88]	0,302	0,047
Var. GPT	-7,09	[-18,2-4,07]	0,21	0,155
Var. RBP4 (Crudo)	-13,52	[-25,9-(-1,12)]	0,033	0,049
Var. RBP4 (Ajustado por ferritina, triglicéridos, PCR y HOMA)	-14,73	[-28,1-(-1,32)]	0,032	0,014

¹ Resultados obtenidos tras realizar el estudio por regresión lineal múltiple, introduciendo como variable la variación de cada uno de los parámetros bioquímicos y como independientes la variación de ferritina y la de de peso. Si este modelo resultó significativo, se añadieron además las concentraciones basales de ferritina, triglicéridos, PCR y HOMA).

Los resultados indican que la variación en RBP4 se asocia de forma significativa e independiente con la flebotomía terapéutica. Además, este hecho se mantiene tras haber ajustado el estudio por los niveles de ferritina, triglicéridos, PCR y HOMA. Es decir, independientemente del nivel de ferritina, triglicéridos, PCR e índice HOMA, aquel paciente que reciba tratamiento con flebotomías terapéuticas, experimentará una variación significativa en los niveles de RBP4.

Capítulo V. DISCUSIÓN

Se ha realizado un ensayo clínico prospectivo, aleatorizado y controlado, en pacientes con hipertrigliceridemia y sobrecarga férrica, determinado por la concentración plasmática de ferritina, y sin evidencia de datos inflamatorios sistémicos. Se aleatorizaron en dos grupos y todos ellos recibieron una dieta cardiosaludable, adaptada a hipertrigliceridemia, y tan sólo uno de los grupos fue tratado con flebotomías terapéuticas. Los resultados de nuestro estudio demuestran que la depleción de hierro mediante flebotomías terapéuticas no se asoció con una mejora significativa en la concentración de triglicéridos, en comparación con la dieta solamente, ni tampoco se obtuvo un beneficio significativo sobre el metabolismo de la glucosa.

Hasta el momento, ningún ensayo controlado previo había estudiado en esta población la variación de los niveles plasmáticos de los lípidos. Nuestros resultados no respaldan las flebotomías como una estrategia terapéutica potencial para los sujetos que presentan hipertrigliceridemia. A día de hoy, la corrección del exceso de grasa con una dieta baja en grasa, generalmente corrige la hipertrigliceridemia, mejora el síndrome metabólico asociado y por tanto sigue siendo el tratamiento principal de este síndrome(166,167).

Conocemos que la hipertrigliceridemia es un fenotipo común, pero también complejo dado que es el resultado de múltiples factores predisponentes tanto genéticos como ambientales (168). La hipertrigliceridemia tiene tanta relevancia clínica, que incluso se considera un criterio mayor para el diagnóstico del síndrome metabólico(169). Es frecuente que aquellos pacientes con hipertrigliceridemia que asocian síndrome metabólico, presentan mayor incidencia de sobrepeso, obesidad, esteatosis hepática y alteraciones en el metabolismo de la glucosa (170).

En nuestro estudio el 95% de los pacientes cumplían criterios de síndrome metabólico, y nuestros resultados reflejan que realizar flebotomías terapéuticas a este grupo de pacientes no aporta una mejoría clínica o analítica, en comparación con el tratamiento habitual de la hipertrigliceridemia. En este aspecto nuestros resultados coinciden con otros ensayos clínicos realizados previamente, que no encontraron

mejoría tras las flebotomías en pacientes con esteatosis hepática no alcohólica (165) o DM2 (171).

Adams et al. realizaron un ensayo clínico aleatorizado, en el que examinaron el impacto de las flebotomías terapéuticas en 71 pacientes con esteatosis hepática no alcohólica. Los resultados concluyeron que a los 6 meses, no hubo diferencias significativas entre los grupos en la esteatosis hepática, las enzimas hepáticas o en la resistencia periférica a la insulina medida a través del índice HOMA-IR, incluso en aquellos pacientes que presentaban al inicio del estudio hiperferritinemia (165). Fernández-Real et al. realizaron un estudio pionero, en el que se asignó al azar 28 sujetos con DM2 o bien a tratamiento con flebotomías o a tratamiento habitual para dicha patología. Los resultados de este estudio no sugerían una asociación significativa entre las flebotomías y la variación en los niveles de glucosa y el perfil lipídico. Se observó un pequeño beneficio en la variación en los niveles de hemoglobina glicosilada, aunque esta diferencia no se controló por los cambios en la hemoglobina total y una mejora significativa en la sensibilidad a la insulina entre los sujetos que se sometieron a flebotomías (171).

Pese a que existen diferencias importantes entre nuestro estudio y estos dos últimos ensayos, ya que la sobrecarga de hierro no fue un criterio de inclusión en ninguno de ellos, las conclusiones de todos ellos son similares sobre la utilidad de la depleción de hierro para mejorar las alteraciones lipídicas y glucídicas, asociadas con la sobrecarga de hierro o la esteatosis hepática no alcohólica.

El hierro es un elemento necesario en múltiples reacciones metabólicas, participando como componente enzimático en reacciones catalíticas. Esta amplia variedad de funciones bioquímicas, se encuentran involucradas en la producción energética y en otros procesos metabólicos (172). Si bien es cierto, aunque el hierro sea imprescindible para el organismo, cuando entra en contacto con el oxígeno, tiene la capacidad de generar radicales libres de oxígeno, produciendo el consecuente daño celular (173).

Por lo tanto, en condiciones fisiológicas, el organismo tiene capacidad de mantener de una forma estable las concentraciones de hierro en sus hepatocitos y células macrofágicas (174).

Dentro de la homeostasis del hierro, una proteína clave en su metabolismo es la hepcidina. La hepcidina es una proteína cuya función es reducir el flujo de hierro hacia el plasma desde los depósitos corporales e inhibir la absorción de hierro proveniente de la dieta (175). Cuando en el organismo hay un proceso inflamatorio, se secreta IL-6, IL-1 y TNF- α , y ello a su vez induce la producción de hepcidina a nivel hepático, la cual promueve el secuestro de hierro dentro de los macrófagos. Por ello en condiciones de esteatosis hepática se ha demostrado que los niveles de hepcidina se incrementan (161).

Los resultados de nuestro estudio concluyeron que los niveles séricos de hepcidina se redujeron sustancialmente en el grupo intervenido con flebotomías terapéuticas en mayor medida que la concentración de ferritina sérica. Estos resultados concuerdan con lo que ya se había demostrado previamente en otros estudios, en los que se sugería que los niveles de hepcidina varían de una forma veloz y proporcionan información más precisa sobre el estado de los depósitos de hierro en el organismo tras realizar depleciones férricas(175).

Los resultados de nuestro estudio reflejan que aquellos pacientes que presentaron mayores reducciones en los niveles séricos de ferritina y hepcidina tras las flebotomías, fueron los que tuvieron una reducción significativa de los marcadores inflamatorios, así como de las enzimas hepáticas. Esto nos hace concluir que la reducción de la sobrecarga hepática de hierro puede mejorar el daño celular hepático (161,165,176).

Los resultados de nuestro estudio sugieren que la asociación entre la hipertrigliceridemia y la sobrecarga férrica, se deba a mecanismos patogénicos

comunes. Tanto es así, que en aquellos pacientes que presentaban los niveles más elevados de ferritina y se sometieron a tratamiento con depleción férrica, también experimentaron una mejoría en los niveles de triglicéridos, con un porcentaje variación más acusado. Si bien es cierto, es posible que la sobrecarga de hierro per sé no tenga un papel importante o primordial en el desarrollo de hipertrigliceridemia. Por otro lado, aquellos con niveles más elevados de triglicéridos al inicio del estudio también mejoraron de forma más relevante sus cifras tras la depleción férrica.

Pese a la reducción significativa en los niveles séricos de citoquinas inflamatorias (principalmente RBP4) y enzimas hepáticas, la ausencia de beneficio de las flebotomías terapéuticas sobre la concentración de triglicéridos, nos hace pensar que el proceso inflamatorio hepático no juega un papel sustancial en el desarrollo de hipertrigliceridemia.

Si bien es cierto nuestros resultados sugieren que los pacientes con peor estado inflamatorio basal, medido mediante la PCR, son los que más mejoran este proceso inflamatorio tras las flebotomías, acompañado de una disminución tanto de enzimas hepáticas y niveles de hepcidina. Todo ello concuerda con que la hiperferritinemia sea reflejo de un estado inflamatorio sistémico que podría mejorar de forma generalizada tras las depleciones férricas, corroborado por un porcentaje de variación más relevante y una tendencia estadística, en los pacientes que recibieron las flebotomías respecto aquellos que tan solo hicieron dieta.

Hay evidencia científica de que la disfunción del tejido adiposo participa directamente en la patogénesis de la hipertrigliceridemia del síndrome metabólico (177). En nuestro estudio no hemos podido corroborar estos resultados, dado que no obtuvimos diferencias significativas tras realizar flebotomías, en tres de las adipocinas más importantes relacionadas con el tejido adiposo (adiponectina, leptina y resistina) (159). Probablemente estos resultados concuerdan y justifican que no hayamos observado una reducción significativa en la reducción de triglicéridos.

La adipoquina que se redujo de una forma significativa en nuestro estudio fue la RBP4. RBP4 es la proteína transportadora específica del retinol en sangre. El retinol se almacena en gran medida en el hígado y se cataboliza a isómeros de ácido retinoico, que a su vez actúan como ligandos de múltiples receptores nucleares que regulan la transcripción de cientos de genes (106).

Si bien la RBP4 se considera una adipoquina, la expresión más alta de esta proteína se encuentra en el hígado, por lo tanto, quizás los resultados que hemos encontrado en nuestro estudio puedan estar relacionados con un descenso en la producción hepática tras realizar la depleción férrica. Los resultados nos indican que los pacientes que recibieron tratamiento con depleción férrica presentaron de forma independiente una reducción en los niveles de RBP4. No hemos podido correlacionar la reducción de RBP4 con otros parámetros metabólicos.

Lo que sí que se ha constatado a lo largo de todo el estudio, es la franca mejoría de los niveles de RBP4 tras la realización de flebotomías, dato que no se ha hallado en aquellos pacientes asignados a dieta. Los resultados nos indican que la mejoría de los niveles de RBP4 se asocia directamente con la depleción de hierro.

Si esta variación realmente tiene algún impacto clínico, deberían realizarse más estudios y realizar investigaciones más específicas respecto a estos resultados.

Nuestro estudio tenía algunas limitaciones dado que no determinamos directamente los depósitos de hierro corporal sino que lo hicimos mediante marcadores indirectos como la ferritina plasmática y la hepcidina. Sin embargo, en ausencia de inflamación, están muy bien correlacionados con la sobrecarga de hierro (178), por lo que creemos que nuestros resultados reflejan estrictamente los cambios de hierro inducidos por las flebotomías.

Nuestro estudio realiza una intervención breve y uniforme que pretende reducir en lugar de normalizar los depósitos de hierro. Quizás si se hubieran

conseguido respuestas más prolongadas y profundas con las flebotomías terapéuticas los resultados hubieran sido diferentes. Por otro lado, hubo una reducción sustancial en los niveles séricos de hepcidina (-56,7%), que es el regulador principal del hierro sistémico producido por los hepatocitos. El 40% de nuestros pacientes (n=18) alcanzaron concentraciones normales de ferritina tras las flebotomías, estos hallazgos no difieren con la respuesta metabólica que presenta la población general.

Cabe mencionar también, que los pacientes que fueron asignados a tratamiento exclusivamente con consejo dietético experimentaron una mayor pérdida de peso y de perímetro abdominal en comparación con los pacientes que realizaron flebotomías. Este aspecto nos sugiere que estos últimos no siguieron las recomendaciones dietéticas tan estrictamente como el primer grupo, probablemente porque se sentían suficientemente tratados con las flebotomías.

Por último, nuestro estudio incluyó principalmente hombres obesos o con sobrepeso, por lo tanto, nuestras conclusiones no podrían extrapolarse a otras poblaciones.

Capítulo VI. CONCLUSIONES

1. Los consejos dietéticos cardiosaludables orientados a la hipertrigliceridemia, junto con una depleción férrica sustancial mediante flebotomías terapéuticas en sujetos con hiperferritinemia e hipertrigliceridemia, no reduce la resistencia periférica a la insulina en comparación con una dieta hipocalórica baja en grasa.
2. La dieta baja en grasa junto con una depleción férrica sustancial mediante flebotomías terapéuticas en sujetos con hiperferritinemia e hipertrigliceridemia, no reduce la concentración de triglicéridos en comparación con una dieta hipocalórica baja en grasa.
3. Nuestros resultados apoyan que la depleción de hierro no es un tratamiento a incluir en la práctica clínica habitual en el manejo de las alteraciones lipídicas de los pacientes con hipertrigliceridemia e hiperferritinemia.
4. Aquellos pacientes con mayores reducciones de ferritina sérica y de hepcidina, han reducido de una forma significativa la citoquina inflamatorias (RBP4) y los niveles de enzimas hepáticas, pero sin hallar un beneficio real sobre el metabolismo lipídico o glucídico.
5. Las flebotomías *per sé*, disminuyen significativamente los niveles de RBP4 y por tanto, podemos considerar que este procedimiento no es perjudicial para los pacientes, en tanto que disminuye los parámetros inflamatorios, principalmente a nivel hepático.
6. Aquellos pacientes que presentan niveles más elevados de ferritina, experimentan una mejoría relevante en la reducción de triglicéridos y perfil glucídico, respecto los que tienen niveles de ferritina más bajos. Podría plantearse como terapia adyuvante el realizar tratamiento con flebotomías en este subgrupo de pacientes.

7. Aquellos pacientes que presentan determinaciones muy elevadas de triglicéridos y se sometieron a flebotomías, presentaron una reducción significativa en los niveles de triglicéridos respecto aquellos con niveles más bajos. Este subgrupo de pacientes podría beneficiarse más de las flebotomías terapéuticas.

8. La dieta baja en grasa es parte del tratamiento esencial para aquellos pacientes que presentan hiperferritinemia e hipertrigliceridemia, visto que se obtiene una respuesta favorable, disminuyendo la resistencia periférica a la insulina y mejorando el síndrome metabólico.

Capítulo VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Conrad ME, Umbreit JN. Pathways of Iron Absorption. *Blood Cells, Mol Dis* [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2018 May 3];29(3):336–55. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079979602905644>
2. Rajagopal A, Rao AU, Amigo J, Tian M, Upadhyay SK, Hall C, et al. Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. *Nature* [Internet]. 2008 Jun 16 [cited 2018 May 3];453(7198):1127–31. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature06934>
3. Delaby C, Rondeau C, Pouzet C, Willemetz A, Pilard N, Desjardins M, et al. Subcellular Localization of Iron and Heme Metabolism Related Proteins at Early Stages of Erythrophagocytosis. Moura IC, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jul 30 [cited 2018 May 3];7(7):e42199. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0042199>
4. GIRELLI D, OUVIERI O, FRANCESCHI L DE, CORROCHER R, BERGAMASCHI G, CAZZOLA M. A linkage between hereditary hyperferritinaemia not related to iron overload and autosomal dominant congenital cataract. *Br J Haematol* [Internet]. 1995 Aug 1 [cited 2018 May 3];90(4):931–4. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2141.1995.tb05218.x>
5. Krause A, Neitz S, Mägert HJ, Schulz A, Forssmann WG, Schulz-Knappe P, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* [Internet]. 2000 Sep 1 [cited 2018 May 3];480(2–3):147–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11034317>
6. Park CH, Valore E V, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Mar 16 [cited 2018 May 3];276(11):7806–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113131>
7. Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Mar 16 [cited 2018 May 3];276(11):7811–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113132>
8. Hamill RL, Woods JC, Cook BA. Congenital Atransferrinemia A Case Report and Review of the Literature. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 1991 Aug 1 [cited 2018 May 3];96(2):215–8. Available from: <https://academic.oup.com/ajcp/article-lookup/doi/10.1093/ajcp/96.2.215>
9. Beguin Y. The soluble transferrin receptor: biological aspects and clinical usefulness as quantitative measure of erythropoiesis. *Haematologica* [Internet]. 1992 [cited 2018 May 3];77(1):1–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1398274>
10. Pietrangelo A, Rocchi E, Casalgrandi G, Rigo G, Ferrari A, Perini M, et al. Regulation of transferrin, transferrin receptor, and ferritin genes in human duodenum. *Gastroenterology* [Internet]. 1992 Mar 1 [cited 2018 May 3];102(3):802–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/001650859290161Q>
11. Latunde-Dada GO, Van der Westhuizen J, Vulpe CD, Anderson GJ, Simpson RJ, McKie AT. Molecular and Functional Roles of Duodenal Cytochrome B (Dcytb) in Iron Metabolism. *Blood Cells, Mol Dis* [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2018 May 3];29(3):356–60. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079979602905747>
12. Fleming MD, Trenor CC, Su MA, Foernzler D, Beier DR, Dietrich WF, et al. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. *Nat Genet* [Internet]. 1997 Aug [cited 2018 May 3];16(4):383–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9241278>
13. Chen C, Paw BH. Cellular and mitochondrial iron homeostasis in vertebrates. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2012 Sep 1 [cited 2018 May 3];1823(9):1459–67. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488912000055>
14. Yuan X, Fleming MD, Hamza I. Heme transport and erythropoiesis. *Curr Opin Chem Biol*

- [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2018 May 3];17(2):204–11. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1367593113000203>
15. Korolnek T, Hamza I. Like iron in the blood of the people: the requirement for heme trafficking in iron metabolism. *Front Pharmacol* [Internet]. 2014 Jun 4 [cited 2018 May 3];5:126. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2014.00126/abstract>
 16. Heeney MM, Andrews NC. Iron homeostasis and inherited iron overload disorders: an overview. *Hematol Oncol Clin North Am* [Internet]. 2004 Dec 1 [cited 2018 May 3];18(6):1379–403. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889858804000814>
 17. Bachman E, Feng R, Travison T, Li M, Olbina G, Ostland V, et al. Testosterone Suppresses Hepcidin in Men: A Potential Mechanism for Testosterone-Induced Erythrocytosis. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2010 Oct 1 [cited 2018 May 3];95(10):4743–7. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2010-0864>
 18. Ganz T. Systemic Iron Homeostasis. *Physiol Rev* [Internet]. 2013 Oct [cited 2018 May 3];93(4):1721–41. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00008.2013>
 19. Besson-Fournier C, Latour C, Kautz L, Bertrand J, Ganz T, Roth M-P, et al. Induction of activin B by inflammatory stimuli up-regulates expression of the iron-regulatory peptide hepcidin through Smad1/5/8 signaling. *Blood* [Internet]. 2012 Jul 12 [cited 2018 May 3];120(2):431–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22611157>
 20. Verga Falzacappa MV, Vujic Spasic M, Kessler R, Stolte J, Hentze MW, Muckenthaler MU. STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood* [Internet]. 2007 Jan 1 [cited 2018 May 3];109(1):353–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16946298>
 21. Wang R-H, Li C, Xu X, Zheng Y, Xiao C, Zerfas P, et al. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab* [Internet]. 2005 Dec 1 [cited 2018 May 3];2(6):399–409. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413105003372>
 22. Tanno T, Bhanu N V, Oneal PA, Goh S-H, Staker P, Lee YT, et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med* [Internet]. 2007 Oct 26 [cited 2018 May 3];13(9):1096–101. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm1629>
 23. Tanno T, Porayette P, Sripichai O, Noh S-J, Byrnes C, Bhupatiraju A, et al. Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood* [Internet]. 2009 Jul 2 [cited 2018 May 3];114(1):181–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8329696>
 24. Casanovas G, Vujčić Spasic M, Casu C, Rivella S, Strelau J, Unsicker K, et al. The murine growth differentiation factor 15 is not essential for systemic iron homeostasis in phlebotomized mice. *Haematologica* [Internet]. 2013 Mar 14 [cited 2018 May 3];98(3):444–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22983584>
 25. Kautz L, Jung G, Valore E V, Rivella S, Nemeth E, Ganz T. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2018 May 3];46(7):678–84. Available from: <http://www.nature.com/articles/ng.2996>
 26. Abboud S, Haile DJ, Haile DJ, ¶. A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 Jun 30 [cited 2018 May 3];275(26):19906–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10747949>
 27. Ganz T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood* [Internet]. 2011 Apr 28 [cited 2018 May 3];117(17):4425–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21346250>
 28. Barton JC, Bertoli LF, Rothenberg BE. Peripheral blood erythrocyte parameters in hemochromatosis: Evidence for increased erythrocyte hemoglobin content. *J Lab Clin Med* [Internet]. 2000 Jan 1 [cited 2018 May 3];135(1):96–104. Available from:

- <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022214300700266>
29. Chiabrando D, Vinchi F, Fiorito V, Mercurio S, Tolosano E. Heme in pathophysiology: a matter of scavenging, metabolism and trafficking across cell membranes. *Front Pharmacol* [Internet]. 2014 Apr 8 [cited 2018 May 3];5:61. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphar.2014.00061/abstract>
 30. Korolnek T, Zhang J, Beardsley S, Scheffer GL, Hamza I. Control of Metazoan Heme Homeostasis by a Conserved Multidrug Resistance Protein. *Cell Metab* [Internet]. 2014 Jun 3 [cited 2018 May 4];19(6):1008–19. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413114001685>
 31. Mena NP, Urrutia PJ, Lourido F, Carrasco CM, Núñez MT. Mitochondrial iron homeostasis and its dysfunctions in neurodegenerative disorders. *Mitochondrion* [Internet]. 2015 Mar 1 [cited 2018 May 4];21:92–105. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567724915000227>
 32. Rosenson R, Brewer H, ... MC-C, 2011 undefined. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *clinchem.aaccjnls.org* [Internet]. [cited 2018 May 4]; Available from: <http://clinchem.aaccjnls.org/user/logout?current=node/27843>
 33. Barter P, Nicholls S, ... KR-C, 2004 undefined. Antiinflammatory properties of HDL *Am Hear Assoc* [Internet]. [cited 2018 May 4]; Available from: <http://circres.ahajournals.org/user/logout?current=node/253054>
 34. Rader D, Hoeg J, medicine HB-A of internal, 1994 undefined. Quantitation of plasma apolipoproteins in the primary and secondary prevention of coronary artery disease. *Am Coll Physicians* [Internet]. [cited 2018 May 4]; Available from: <http://annals.org/aim/fullarticle/707460>
 35. Nielsen L, Véniant M, Borén J, Raabe M, Circulation JW-, 1998 undefined. Genes for apolipoprotein B and microsomal triglyceride transfer protein are expressed in the heart: evidence that the heart has the capacity to synthesize and secrete. *Am Hear Assoc* [Internet]. [cited 2018 May 4]; Available from: <http://circ.ahajournals.org/content/98/1/13.short>
 36. Armesto R, Díaz J, Tembra M, ... RR-G, 2011 undefined. Lípidos exógenos y quilomicrones. *dialnet.unirioja.es* [Internet]. [cited 2018 May 4]; Available from: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4112352.pdf>
 37. Atherosclerosis MH-, 2000 undefined. A proposed model for the assembly of chylomicrons. *atherosclerosis-journal.com* [Internet]. [cited 2018 May 4]; Available from: [http://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150\(99\)00397-4/abstract](http://www.atherosclerosis-journal.com/article/S0021-9150(99)00397-4/abstract)
 38. Kim E, Campbell S, Schueller O, Wong E, Cole B, Kuo J, et al. A small-molecule inhibitor of enterocytic microsomal triglyceride transfer protein, SLx-4090: biochemical, pharmacodynamic, pharmacokinetic, and safety profile. *J Pharmacol Exp Ther* [Internet]. 2011 Jun 1 [cited 2018 May 5];337(3):775–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9336320>
 39. Lee M-H, Lu K, Hazard S, Yu H, Shulenin S, Hidaka H, et al. Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet* [Internet]. 2001 Jan 1 [cited 2018 May 5];27(1):79–83. Available from: http://www.nature.com/articles/ng0101_79
 40. Woollett LA, Wang Y, Buckley DD, Yao L, Chin S, Granholm N, et al. Micellar solubilisation of cholesterol is essential for absorption in humans. *Gut* [Internet]. 2006 Feb 1 [cited 2018 May 5];55(2):197–204. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16407385>
 41. Brown MS, Goldstein JL. A Receptor-Mediated Pathway for Cholesterol Homeostasis(Nobel Lecture). *Angew Chemie Int Ed English* [Internet]. 1986 Jul 1 [cited 2018 May 5];25(7):583–602. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.198605833>
 42. Ishibashi S, Brown M, ... JG-TJ of, 1993 undefined. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *Am*

- Soc Clin Investig [Internet]. [cited 2018 May 5]; Available from: <https://www.jci.org/articles/view/116663/files/pdf>
43. Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Goldstein JL. The LDL Receptor Locus in Familial Hypercholesterolemia: Mutational Analysis of a Membrane Protein. *Annu Rev Genet* [Internet]. 1990 Dec 28 [cited 2018 May 5];24(1):133–70. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ge.24.120190.001025>
 44. Sánchez Quesada JL, Ordóñez Llanos J. Propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de las lipoproteínas de alta densidad. *Clínica e Investig en Arterioscler* [Internet]. 2010 Apr 1 [cited 2018 May 7];22:17–21. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0214916810700140>
 45. Rep KC-B, 2009 undefined. Biomedical implications of high-density lipoprotein: its composition, structure, functions, and clinical applications. *Citeseer* [Internet]. [cited 2018 May 5]; Available from: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.521.2719&rep=rep1&type=pdf>
 46. Rosenson R, Brewer H, Davidson W, Circulation ZF-, 2012 undefined. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Am Hear Assoc* [Internet]. [cited 2018 May 5]; Available from: <http://circ.ahajournals.org/user/logout?current=node/4553>
 47. Steyrer E, Durovic S, Frank S, Giessauf W, Burger A, Dieplinger H, et al. The role of lecithin: cholesterol acyltransferase for lipoprotein (a) assembly. Structural integrity of low density lipoproteins is a prerequisite for Lp(a) formation in human plasma. *J Clin Invest* [Internet]. 1994 Dec 1 [cited 2018 May 5];94(6):2330–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7989589>
 48. Loscalzo J, Weinfeld M, Fless GM, Scanu AM. Lipoprotein(a), fibrin binding, and plasminogen activation. *Arteriosclerosis* [Internet]. 1990 Mar 1 [cited 2018 May 5];10(2):240–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2138452>
 49. Palabrica T, Liu A, Aronovitz M, Furie B, medicine RL-N, 1995 undefined. Antifibrinolytic activity of apolipoprotein (a) in vivo: human apolipoprotein (a) transgenic mice are resistant to tissue plasminogen activator-mediated thrombolysis. *Springer* [Internet]. [cited 2018 May 5]; Available from: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1038/nm0395-256.pdf>
 50. Zioncheck TF, Powell LM, Rice GC, Eaton DL, Lawn RM. Interaction of recombinant apolipoprotein(a) and lipoprotein(a) with macrophages. *J Clin Invest* [Internet]. 1991 Mar 1 [cited 2018 May 5];87(3):767–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1825665>
 51. Patel SB, Salen G, Hidaka H, Kwiterovich PO, Stalenhoef AF, Miettinen TA, et al. Mapping a gene involved in regulating dietary cholesterol absorption. The sitosterolemia locus is found at chromosome 2p21. *J Clin Invest* [Internet]. 1998 Sep 1 [cited 2018 May 5];102(5):1041–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9727073>
 52. Berge K, Tian H, Graf G, Yu L, ... NG-, 2000 undefined. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *science.sciencemag.org* [Internet]. [cited 2018 May 5]; Available from: <http://science.sciencemag.org/content/290/5497/1771.short>
 53. Buhman KK, Accad M, Novak S, Choi RS, Wong JS, Hamilton RL, et al. Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice. *Nat Med* [Internet]. 2000 Dec 1 [cited 2018 May 5];6(12):1341–7. Available from: http://www.nature.com/articles/nm1200_1341
 54. Fazio S, Linton M. Failure of ACAT Inhibition to Retard Atherosclerosis. *N Engl J Med* [Internet]. 2006 Mar 23 [cited 2018 May 5];354(12):1307–9. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMe068012>

55. Nissen SE, Tuzcu EM, Brewer HB, Sipahi I, Nicholls SJ, Ganz P, et al. Effect of ACAT Inhibition on the Progression of Coronary Atherosclerosis. *N Engl J Med* [Internet]. 2006 Mar 23 [cited 2018 May 5];354(12):1253–63. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa054699>
56. Raabe M, Véniant MM, Sullivan MA, Zlot CH, Björkegren J, Nielsen LB, et al. Analysis of the role of microsomal triglyceride transfer protein in the liver of tissue-specific knockout mice. *J Clin Invest* [Internet]. 1999 May 1 [cited 2018 May 5];103(9):1287–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10225972>
57. DGT... de E no, 2017 undefined. Adipose tissue as an endocrine gland. pathophysiological implications. *medigraphic.com* [Internet]. [cited 2018 May 7]; Available from: <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenl.cgi?IDARTICULO=70166>
58. Gualillo O, González-Juanatey JR, Lago F. The emerging role of adipokines as mediators of cardiovascular function: physiologic and clinical perspectives. *Trends Cardiovasc Med* [Internet]. 2007 Nov 1 [cited 2018 May 5];17(8):275–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18021938>
59. Simón E, Navarra ADB-A del sistema sanitario de, 2002 undefined. Leptina y obesidad. *recyt.fecyt.es* [Internet]. [cited 2018 May 5]; Available from: <https://recyt.fecyt.es/index.php/ASSN/article/view/5483>
60. Mantzoros CS. The Role of Leptin in Human Obesity and Disease: A Review of Current Evidence. *Ann Intern Med* [Internet]. 1999 Apr 20 [cited 2018 May 5];130(8):671. Available from: <http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-130-8-199904200-00014>
61. Sabath Silva EF. [Leptin]. *Rev Invest Clin* [Internet]. 2002 [cited 2018 May 5];54(2):161–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12053815>
62. Wauters M, Considine R V, Van Gaal LF. Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol* [Internet]. 2000 Sep 1 [cited 2018 May 5];143(3):293–311. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11022169>
63. Casabiell X, Piñeiro V, Peino R, Lage M, Camiña J, Gallego R, et al. Gender Differences in Both Spontaneous and Stimulated Leptin Secretion by Human Omental Adipose Tissue *in Vitro*: Dexamethasone and Estradiol Stimulate Leptin Release in Women, But Not in Men ¹. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1998 Jun 1 [cited 2018 May 5];83(6):2149–55. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jcem.83.6.4849>
64. Miguel AS, Campo F Del, ... MM-Q, 2006 undefined. Estructura, funciones e importancia clínica de la leptina. *researchgate.net* [Internet]. [cited 2018 May 5]; Available from: https://www.researchgate.net/profile/Francisco_Javier_Martin-Gil/publication/255991764_Structure_functions_and_clinical_importance_of_leptin/links/004635266a0f7a3a22000000/Structure-functions-and-clinical-importance-of-leptin.pdf
65. JÉQUIER E. Leptin Signaling, Adiposity, and Energy Balance. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2006 Jan 24 [cited 2018 May 5];967(1):379–88. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04293.x>
66. Maeda K. Reprint of “cDNA Cloning and Expression of a Novel Adipose Specific Collagen-like Factor, apM1 (diseost Abundant Gene Transcript 1).” *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2012 Aug [cited 2018 May 5];425(3):556–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X12015203>
67. Palomer X, Pérez A, Blanco-Vaca F. Adiponectina: un nuevo nexo entre obesidad, resistencia a la insulina y enfermedad cardiovascular. *Med Clin (Barc)* [Internet]. 2005 Mar 1 [cited 2018 May 5];124(10):388–95. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025775305717383>
68. Chandran M, Phillips SA, Ciaraldi T, Henry RR. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? *Diabetes Care* [Internet]. 2003 Aug 1 [cited 2018 May 5];26(8):2442–50. Available

- from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12882876>
69. Monitor JB-MS, 2003 undefined. Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue. *medscimonit.com* [Internet]. [cited 2018 May 5]; Available from: <https://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/4741>
 70. Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2001 Feb 13 [cited 2018 May 5];98(4):2005–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11172066>
 71. Phillips SA, Ciaraldi TP, Kong APS, Bandukwala R, Aroda V, Carter L, et al. Modulation of circulating and adipose tissue adiponectin levels by antidiabetic therapy. *Diabetes* [Internet]. 2003 Mar 1 [cited 2018 May 5];52(3):667–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12606507>
 72. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* [Internet]. 2001 Aug 1 [cited 2018 May 5];7(8):941–6. Available from: http://www.nature.com/articles/nm0801_941
 73. Gil-Campos M, Cañete RR, Gil A. Adiponectin, the missing link in insulin resistance and obesity. *Clin Nutr* [Internet]. 2004 Oct 1 [cited 2018 May 5];23(5):963–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15380884>
 74. Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, et al. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* [Internet]. 2002 Jul 6 [cited 2018 May 5];360(9326):57–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673602093352>
 75. Ouchi N, Ohishi M, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nagaretani H, et al. Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* [Internet]. 2003 Sep 1 [cited 2018 May 5];42(3):231–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12860835>
 76. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, Benedetto FA, Cutrupi S, Parlongo S, et al. Adiponectin, metabolic risk factors, and cardiovascular events among patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2002 Jan 1 [cited 2018 May 5];13(1):134–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752030>
 77. Wulster-Radcliffe MC, Ajuwon KM, Wang J, Christian JA, Spurlock ME. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2004 Apr 9 [cited 2018 May 5];316(3):924–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X04003936>
 78. Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2004 Oct 15 [cited 2018 May 5];323(2):630–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X04019126>
 79. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* [Internet]. 2003 Dec 15 [cited 2018 May 5];112(12):1796–808. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14679176>
 80. Smith U, Andersson CX, Gustafson B, Hammarstedt A, Isakson P, Wallerstedt E. Adipokines, systemic inflammation and inflamed adipose tissue in obesity and insulin resistance. *Int Congr Ser* [Internet]. 2007 Aug 1 [cited 2018 May 5];1303:31–4. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0531513107002701>
 81. Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . *J Clin Invest*

- [Internet]. 1994 Oct 1 [cited 2018 May 5];94(4):1543–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7523453>
82. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* [Internet]. 1979 Nov [cited 2018 May 5];18(24):5294–9. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00591a005>
 83. Hotamisligil GS, Arner P, Atkinson RL, Spiegelman BM. Differential regulation of the p80 tumor necrosis factor receptor in human obesity and insulin resistance. *Diabetes* [Internet]. 1997 Mar 1 [cited 2018 May 5];46(3):451–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9032102>
 84. Fernández-Real JM, Broch M, Ricart W, Casamitjana R, Gutierrez C, Vendrell J, et al. Plasma levels of the soluble fraction of tumor necrosis factor receptor 2 and insulin resistance. *Diabetes* [Internet]. 1998 Nov 1 [cited 2018 May 5];47(11):1757–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9792545>
 85. BOECK MA, CHEN C (XIN), CUNNINGHAM-RUNDLES S. Altered Immune Function in a Morbidly Obese Pediatric Population. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 1993 Oct 1 [cited 2018 May 5];699(1 Prevention an):253–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.1993.tb18856.x>
 86. Bhakdi S, Torzewski M, Klouche M, Hemmes M. Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 1999 Oct 1 [cited 2018 May 5];19(10):2348–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10521363>
 87. Feingold KR, Grunfeld C. Role of Cytokines in Inducing Hyperlipidemia. *Diabetes* [Internet]. 1992 Oct 1 [cited 2018 May 5];41(Supplement_2):97–101. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diab.41.2.S97>
 88. Zinman B, Hanley AJG, Harris SB, Kwan J, Fantus IG. Circulating Tumor Necrosis Factor- α Concentrations in a Native Canadian Population with High Rates of Type 2 Diabetes Mellitus ¹. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1999 Jan 1 [cited 2018 May 5];84(1):272–8. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jcem.84.1.5405>
 89. Cawthorn WP, Sethi JK. TNF- α and adipocyte biology. *FEBS Lett* [Internet]. 2008 Jan 9 [cited 2018 May 5];582(1):117–31. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2007.11.051>
 90. Wang B, Jenkins JR, Trayhurn P. Expression and secretion of inflammation-related adipokines by human adipocytes differentiated in culture: integrated response to TNF- α . *Am J Physiol Metab* [Internet]. 2005 Apr [cited 2018 May 5];288(4):E731–40. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.00475.2004>
 91. Páth G, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA. Interleukin-6 and the Interleukin-6 Receptor in the Human Adrenal Gland: Expression and Effects on Steroidogenesis ¹. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 1997 Jul 1 [cited 2018 May 5];82(7):2343–9. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jcem.82.7.4072>
 92. Heilbronn LK, Rood J, Janderova L, Albu JB, Kelley DE, Ravussin E, et al. Relationship between Serum Resistin Concentrations and Insulin Resistance in Nonobese, Obese, and Obese Diabetic Subjects. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2004 Apr 1 [cited 2018 May 5];89(4):1844–8. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2003-031410>
 93. Hurlimann J, Thorbecke GJ, Hochwald GM. The liver as the site of C-reactive protein formation. *J Exp Med* [Internet]. 1966 Feb 1 [cited 2018 May 5];123(2):365–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4379352>
 94. Prasad K. C-Reactive Protein and Cardiovascular Diseases. *Int J Angiol* [Internet]. 2003 Feb 1 [cited 2018 May 5];12(1):1–12. Available from: <https://www.thieme-connect.de/ejournals/abstract/10.1007/s00547-003-1018-y>
 95. Du Clos TW. Function of C-reactive protein. *Ann Med* [Internet]. 2000 Jan 8 [cited 2018 May 5];32(4):274–8. Available from:

- <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07853890009011772>
96. Kindmark CO. Stimulating effect of C-reactive protein on phagocytosis of various species of pathogenic bacteria. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 1971 Jun [cited 2018 May 5];8(6):941–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4397484>
 97. Chen K, Li F, Li J, Cai H, Strom S, Bisello A, et al. Induction of leptin resistance through direct interaction of C-reactive protein with leptin. *Nat Med* [Internet]. 2006 Apr 2 [cited 2018 May 5];12(4):425–32. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm1372>
 98. Wu D-M, Chu N-F, Shen M-H, Chang J-B. Plasma C-reactive protein levels and their relationship to anthropometric and lipid characteristics among children. *J Clin Epidemiol* [Internet]. 2003 Jan 1 [cited 2018 May 5];56(1):94–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12589876>
 99. Cook DG, Mendall MA, Whincup PH, Carey IM, Ballam L, Morris JE, et al. C-reactive protein concentration in children: relationship to adiposity and other cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis* [Internet]. 2000 Mar 1 [cited 2018 May 5];149(1):139–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10704625>
 100. Van Gaal LF, Mertens IL, De Block CE. Mechanisms linking obesity with cardiovascular disease. *Nature* [Internet]. 2006 Dec 14 [cited 2018 May 5];444(7121):875–80. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature05487>
 101. Darvall KAL, Sam RC, Silverman SH, Bradbury AW, Adam DJ. Obesity and Thrombosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* [Internet]. 2007 Feb 1 [cited 2018 May 5];33(2):223–33. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S107858840600579X>
 102. Alessi M-C, Juhan-Vague I. PAI-1 and the metabolic syndrome: links, causes, and consequences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 2006 Oct 1 [cited 2018 May 5];26(10):2200–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16931789>
 103. Alessi M-C, Poggi M, Juhan-Vague I. Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol* [Internet]. 2007 Jun [cited 2018 May 5];18(3):240–5. Available from: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00041433-200706000-00003>
 104. Kim KH, Lee K, Moon YS, Sul HS. A cysteine-rich adipose tissue-specific secretory factor inhibits adipocyte differentiation. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Apr 6 [cited 2018 May 5];276(14):11252–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11278254>
 105. Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* [Internet]. 2001 Jan 18 [cited 2018 May 5];409(6818):307–12. Available from: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/35053000>
 106. Kotnik P, Fischer-Posovszky P, Wabitsch M. RBP4: a controversial adipokine. *Eur J Endocrinol* [Internet]. 2011 Nov 1 [cited 2018 May 17];165(5):703–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21835764>
 107. Graham TE, Yang Q, Blüher M, Hammarstedt A, Ciaraldi TP, Henry RR, et al. Retinol-Binding Protein 4 and Insulin Resistance in Lean, Obese, and Diabetic Subjects. *N Engl J Med* [Internet]. 2006 Jun 15 [cited 2018 May 5];354(24):2552–63. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa054862>
 108. Gavi S, Stuart LM, Kelly P, Melendez MM, Mynarcik DC, Gelato MC, et al. Retinol-Binding Protein 4 Is Associated with Insulin Resistance and Body Fat Distribution in Nonobese Subjects without Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2007 May 1 [cited 2018 May 5];92(5):1886–90. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2006-1815>
 109. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, et al. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* [Internet]. 2005 Jul 21 [cited 2018 May 5];436(7049):356–62. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature03711>

110. Christou G, Tellis C, Elisaf M, Tselepis A, Kiortsis D. The relationship between retinol-binding protein 4 and apolipoprotein B-containing lipoproteins is attenuated in patients with very high serum triglycerides: A pilot study. *Hormones* [Internet]. 2016 Apr 15 [cited 2018 May 5];15(1):99–105. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27086684>
111. Rajala MW, Scherer PE. Minireview: The Adipocyte—At the Crossroads of Energy Homeostasis, Inflammation, and Atherosclerosis. *Endocrinology* [Internet]. 2003 Sep 1 [cited 2018 May 5];144(9):3765–73. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2003-0580>
112. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* [Internet]. 2005 May 2 [cited 2018 May 5];115(5):1111–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15864338>
113. Bornstein SR, Abu-Asab M, Glasow A, Páth G, Hauner H, Tsokos M, et al. Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes* [Internet]. 2000 Apr 1 [cited 2018 May 5];49(4):532–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10871189>
114. Takahashi K, Takeya M, Sakashita N. Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals. *Med Electron Microsc* [Internet]. 2002 Dec 1 [cited 2018 May 5];35(4):179–203. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s007950200023>
115. Kvasnicka T, Kvasnicka J, Ceska R, Grauová B, Vrablík M. Increasing plasma levels of soluble cell adhesion molecules (sE-Selectin, sP-Selectin and sICAM-1) in overweight adults with combined hyperlipidemia. *Sb Lek* [Internet]. 2001 [cited 2018 May 5];102(4):473–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12448198>
116. Sánchez J, ... EM-RC, 2012 undefined. Molecular mechanisms involved in atherothrombotic cardiovascular disease. *medigraphic.com* [Internet]. [cited 2018 May 7]; Available from: <http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenl.cgi?IDARTICULO=37903>
117. CHARO IF, PETERS W. Chemokine Receptor 2 (CCR2) in Atherosclerosis, Infectious Diseases, and Regulation of T-Cell Polarization. *Microcirculation* [Internet]. 2010 Jan 26 [cited 2018 May 5];10(3–4):259–64. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1038/sj.mn.7800191>
118. Takahashi K, Mizuarai S, Araki H, Mashiko S, Ishihara A, Kanatani A, et al. Adiposity elevates plasma MCP-1 levels leading to the increased CD11b-positive monocytes in mice. *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Nov 21 [cited 2018 May 5];278(47):46654–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13129912>
119. Inoue S, Egashira K, Ni W, Kitamoto S, Usui M, Otani K, et al. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* [Internet]. 2002 Nov 19 [cited 2018 May 5];106(21):2700–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438296>
120. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* [Internet]. 2006 Jan 4 [cited 2018 May 5];116(1):115–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16341265>
121. Itoh N, Okamoto H. Translational control of proinsulin synthesis by glucose. *Nature* [Internet]. 1980 Jan 3 [cited 2018 May 5];283(5742):100–2. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/283100a0>
122. Galgani JE, Ravussin E. Postprandial whole-body glycolysis is similar in insulin-resistant and insulin-sensitive non-diabetic humans. *Diabetologia* [Internet]. 2012 Mar 16 [cited 2018 May 5];55(3):737–42. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00125-011-2413-0>
123. Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quon MJ. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Metab* [Internet]. 2008 Jan [cited 2018 May 5];294(1):E15–26. Available from:

- <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.00645.2007>
124. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* [Internet]. 2006 Dec 14 [cited 2018 May 5];444(7121):860–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature05485>
 125. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest* [Internet]. 2008 Sep 2 [cited 2018 May 5];118(9):2992–3002. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18769626>
 126. Fernando Carrasco N, José Eduardo Galgani F, Marcela Reyes J. Síndrome de resistencia a la insulina. estudio y manejo. *Rev Médica Clínica Las Condes* [Internet]. 2013 Sep [cited 2018 May 7];24(5):827–37. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S071686401370230X>
 127. Heilbronn L, Smith SR, Ravussin E. Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *Int J Obes* [Internet]. 2004 Dec 13 [cited 2018 May 5];28(S4):S12–21. Available from: <http://www.nature.com/articles/0802853>
 128. Cristancho AG, Lazar MA. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2011 Nov 28 [cited 2018 May 5];12(11):722–34. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrm3198>
 129. Klötting N, Blüher M. Adipocyte dysfunction, inflammation and metabolic syndrome. *Rev Endocr Metab Disord* [Internet]. 2014 Dec 26 [cited 2018 May 5];15(4):277–87. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11154-014-9301-0>
 130. Tan CY, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2008 Oct 1 [cited 2018 May 5];36(Pt 5):935–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18793164>
 131. Shi H, Kokoeva M V, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest* [Internet]. 2006 Nov 1 [cited 2018 May 5];116(11):3015–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17053832>
 132. Medina-Gomez G, Gray SL, Yetukuri L, Shimomura K, Virtue S, Campbell M, et al. PPAR gamma 2 Prevents Lipotoxicity by Controlling Adipose Tissue Expandability and Peripheral Lipid Metabolism. *PLoS Genet* [Internet]. 2007 [cited 2018 May 5];3(4):e64. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.0030064>
 133. Kim J-Y, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest* [Internet]. 2007 Sep 4 [cited 2018 May 5];117(9):2621–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17717599>
 134. Samuel VT, Petersen KF, Shulman GI. Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism. *Lancet* [Internet]. 2010 Jun 26 [cited 2018 May 5];375(9733):2267–77. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673610604084>
 135. McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* [Internet]. 2002 Jan 1 [cited 2018 May 5];51(1):7–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756317>
 136. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired Mitochondrial Activity in the Insulin-Resistant Offspring of Patients with Type 2 Diabetes. *N Engl J Med* [Internet]. 2004 Feb 12 [cited 2018 May 5];350(7):664–71. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa031314>
 137. Galgani JE, Moro C, Ravussin E. Metabolic flexibility and insulin resistance. *Am J Physiol Metab* [Internet]. 2008 Nov [cited 2018 May 5];295(5):E1009–17. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.90558.2008>
 138. Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for Insulin Resistance: Common Threads and Missing Links.

- Cell [Internet]. 2012 Mar 2 [cited 2018 May 5];148(5):852–71. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867412002176>
139. Holloszy JO. Skeletal muscle “mitochondrial deficiency” does not mediate insulin resistance. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2018 May 5];89(1):463S–466S. Available from: <https://academic.oup.com/ajcn/article/89/1/463S/4598283>
140. Moro C, Galgani JE, Luu L, Pasarica M, Mairal A, Bajpeyi S, et al. Influence of Gender, Obesity, and Muscle Lipase Activity on Intramyocellular Lipids in Sedentary Individuals. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2018 May 5];94(9):3440–7. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2009-0053>
141. Galgani JE, Vasquez K, Watkins G, Dupuy A, Bertrand-Michel J, Levade T, et al. Enhanced Skeletal Muscle Lipid Oxidative Efficiency in Insulin-Resistant vs Insulin-Sensitive Nondiabetic, Nonobese Humans. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2018 May 5];98(4):E646–53. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2012-3111>
142. Cameron AJ, Magliano DJ, Zimmet PZ, Welborn TA, Colagiuri S, Tonkin AM, et al. The metabolic syndrome as a tool for predicting future diabetes: the AusDiab study. *J Intern Med* [Internet]. 2008 Aug 1 [cited 2018 May 5];264(2):177–86. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2796.2008.01935.x>
143. Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Duncan RE, Ahmadian M, Sul HS. Regulation of Triglyceride Metabolism.IV. Hormonal regulation of lipolysis in adipose tissue. *Am J Physiol Liver Physiol* [Internet]. 2007 Jul [cited 2018 May 5];293(1):G1–4. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpgi.00554.2006>
144. Smith J, Al-Amri M, Dorairaj P, Sniderman A. The adipocyte life cycle hypothesis. *Clin Sci (Lond)* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2018 May 5];110(1):1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16336200>
145. Marcela RJ. Características biológicas del tejido adiposo: el adipocito como célula endocrina. *Rev Médica Clínica Las Condes* [Internet]. 2012 Mar 1 [cited 2018 May 5];23(2):136–44. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864012702900>
146. Fain JN. Release of Interleukins and Other Inflammatory Cytokines by Human Adipose Tissue Is Enhanced in Obesity and Primarily due to the Nonfat Cells. *Vitam Horm* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2018 May 5];74:443–77. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0083672906740183>
147. Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts Type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia* [Internet]. 2000 Nov 30 [cited 2018 May 5];43(12):1498–506. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s001250051560>
148. Hutcheson R, research PR-E diabetes, 2012 undefined. The metabolic syndrome, oxidative stress, environment, and cardiovascular disease: the great exploration. *downloads.hindawi.com* [Internet]. [cited 2018 May 5]; Available from: <http://downloads.hindawi.com/journals/edr/2012/271028.pdf>
149. Solanas-Barca M, Mateo-Gallego R, Calmarza P, Jarauta E, Bea AM, Cenarro A, et al. Mutations in *HFE* Causing Hemochromatosis Are Associated with Primary Hypertriglyceridemia. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2009 Nov 1 [cited 2018 May 9];94(11):4391–7. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2009-0814>
150. Jin Y, He L, Chen Y, Fang Y, Yao Y. Association between serum ferritin levels and metabolic syndrome: an updated meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* [Internet]. 2015 [cited 2018 May 9];8(8):13317–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26550259>
151. Abril-Ulloa V, Flores-Mateo G, Solà-Alberich R, Manuel-y-Keenoy B, Arija V. Ferritin levels and risk of metabolic syndrome: meta-analysis of observational studies. *BMC Public Health* [Internet]. 2014 Dec 21 [cited 2018 May 9];14(1):483. Available from:

- <http://bmcpubhealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2458-14-483>
152. Wrede CE, Buettner R, Bollheimer LC, Schölmerich J, Palitzsch K-D, Hellerbrand C. Association between serum ferritin and the insulin resistance syndrome in a representative population. *Eur J Endocrinol* [Internet]. 2006 Feb 1 [cited 2018 May 10];154(2):333–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16452549>
 153. Kim C-H, Kim H-K, Bae SJ, Park J-Y, Lee K-U. Association of elevated serum ferritin concentration with insulin resistance and impaired glucose metabolism in Korean men and women. *Metabolism* [Internet]. 2011 Mar [cited 2018 May 10];60(3):414–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20423745>
 154. Ledesma M, Hurtado-Roca Y, Leon M, Giraldo P, Pocovi M, Civeira F, et al. Association of Ferritin Elevation and Metabolic Syndrome in Males. Results from the Aragon Workers’ Health Study (AWHS). *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2015 May [cited 2018 May 10];100(5):2081–9. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2014-4409>
 155. American Society of Biological Chemists., Rockefeller Institute for Medical Research., American Society for Biochemistry and Molecular Biology. *The Journal of biological chemistry*. [Internet]. American Society for Biochemistry and Molecular Biology; [cited 2018 May 5]. Available from: <http://www.jbc.org/content/258/16/10083.short>
 156. Moreno-Navarrete JM, Novelle MG, Catalán V, Ortega F, Moreno M, Gomez-Ambrosi J, et al. Insulin resistance modulates iron-related proteins in adipose tissue. *Diabetes Care* [Internet]. 2014 Apr 1 [cited 2018 May 10];37(4):1092–100. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24496804>
 157. Ortega FJ, Mayas D, Moreno-Navarrete JM, Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Esteve E, et al. The Gene Expression of the Main Lipogenic Enzymes is Downregulated in Visceral Adipose Tissue of Obese Subjects. *Obesity* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2018 May 10];18(1):13–20. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1038/oby.2009.202>
 158. Tajima S, Ikeda Y, Sawada K, Yamano N, Horinouchi Y, Kihira Y, et al. Iron reduction by deferoxamine leads to amelioration of adiposity via the regulation of oxidative stress and inflammation in obese and type 2 diabetes KKAy mice. *Am J Physiol Metab* [Internet]. 2012 Jan [cited 2018 May 11];302(1):E77–86. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.00033.2011>
 159. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2011 Feb 21 [cited 2018 May 11];11(2):85–97. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri2921>
 160. Gabrielsen JS, Gao Y, Simcox JA, Huang J, Thorup D, Jones D, et al. Adipocyte iron regulates adiponectin and insulin sensitivity. *J Clin Invest* [Internet]. 2012 Oct 1 [cited 2018 May 11];122(10):3529–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22996660>
 161. Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, Bugianesi E, Marchesini G, Manzini P, et al. Iron Depletion by Phlebotomy Improves Insulin Resistance in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Hyperferritinemia: Evidence from a Case-Control Study. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2007 Jun 1 [cited 2018 May 17];102(6):1251–8. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1111/j.1572-0241.2007.01192.x>
 162. Kwanbunjan K, Panprathip P, Phosat C, Chumpathat N, Wechjakwen N, Puduang S, et al. Association of retinol binding protein 4 and transthyretin with triglyceride levels and insulin resistance in rural thais with high type 2 diabetes risk. *BMC Endocr Disord* [Internet]. 2018 Dec 10 [cited 2018 May 13];18(1):26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29747616>
 163. Eder K, Baffy N, Falus A, Fulop AK. The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflamm Res* [Internet]. 2009 Nov 19 [cited 2018 May 11];58(11):727–36. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00011-009-0060-4>

164. Catrysse L, van Loo G. Inflammation and the Metabolic Syndrome: The Tissue-Specific Functions of NF- κ B. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2017 Jun [cited 2018 May 13];27(6):417–29. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892417300247>
165. Adams LA, Crawford DH, Stuart K, House MJ, St. Pierre TG, Webb M, et al. The impact of phlebotomy in nonalcoholic fatty liver disease: A prospective, randomized, controlled trial. *Hepatology* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2018 May 10];61(5):1555–64. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.27662>
166. Mateo-Gallego R, Perez-Calahorra S, Cofán M, Baila-Rueda L, Cenarro A, Ros E, et al. Serum Lipid Responses to Weight Loss Differ between Overweight Adults with Familial Hypercholesterolemia and Those with Familial Combined Hyperlipidemia. *J Nutr* [Internet]. 2014 Aug 1 [cited 2018 May 16];144(8):1219–26. Available from: <https://academic.oup.com/jn/article/144/8/1219/4571769>
167. Catapano AL, Reiner Z, De Backer G, Graham I, Taskinen 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). *Atherosclerosis* [Internet]. 2011 Jul [cited 2018 May 16];217(1):3–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21882396>
168. Brunzell JD. Hypertriglyceridemia. *N Engl J Med* [Internet]. 2007 Sep 6 [cited 2018 May 16];357(10):1009–17. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMcp070061>
169. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* [Internet]. 2002 Dec 17 [cited 2018 May 16];106(25):3143–421. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12485966>
170. Yki-Järvinen H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol* [Internet]. 2014 Nov [cited 2018 May 16];2(11):901–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24731669>
171. Fernández-Real JM, Peñarroja G, Castro A, García-Bragado F, Hernández-Aguado I, Ricart W. Blood letting in high-ferritin type 2 diabetes: effects on insulin sensitivity and beta-cell function. *Diabetes* [Internet]. 2002 Apr [cited 2018 May 16];51(4):1000–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11916918>
172. Ganz T, Nemeth E. Iron homeostasis in host defence and inflammation. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015 Aug 10 [cited 2018 May 16];15(8):500–10. Available from: <http://www.nature.com/articles/nri3863>
173. Schmidt PJ. Regulation of Iron Metabolism by Hepcidin under Conditions of Inflammation. *J Biol Chem* [Internet]. 2015 Jul 31 [cited 2018 May 16];290(31):18975–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26055723>
174. Barisani D, Pelucchi S, Mariani R, Galimberti S, Trombini P, Fumagalli D, et al. Hepcidin and iron-related gene expression in subjects with Dysmetabolic Hepatic Iron Overload. *J Hepatol* [Internet]. 2008 Jul 1 [cited 2018 May 16];49(1):123–33. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168827808002250>
175. Mast AE, Schlumpf KS, Wright DJ, Johnson B, Glynn SA, Busch MP, et al. Hepcidin level predicts hemoglobin concentration in individuals undergoing repeated phlebotomy. *Haematologica* [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2018 May 17];98(8):1324–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23445875>
176. Facchini FS, Hua NW, Stoohs RA. Effect of iron depletion in carbohydrate-intolerant patients with clinical evidence of nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2002 Apr 1 [cited 2018 May 17];122(4):931–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11910345>

-
177. Blüher M. Adipose Tissue Dysfunction in Obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* [Internet]. 2009 Apr 8 [cited 2018 May 17];117(06):241–50. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0029-1192044>
178. Mei Z, Namaste SM, Serdula M, Suchdev PS, Rohner F, Flores-Ayala R, et al. Adjusting total body iron for inflammation: Biomarkers Reflecting Inflammation and Nutritional Determinants of Anemia (BRINDA) project. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2018 May 17];106(suppl_1):383S–389S. Available from: https://academic.oup.com/ajcn/article/106/suppl_1/383S/4668572

Capítulo VIII. ANEXO

8.1.- INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE

En este estudio tratamos de averiguar si la depleción de hierro del organismo tiene también un efecto beneficioso en la concentración de triglicéridos en las personas que presentan tanto exceso de hierro como de triglicéridos en sangre.

Para obtener dicho beneficio se iniciarán unas medidas higiénico-dietéticas a todos los pacientes que entren en el estudio, consistentes en una dieta equilibrada y realizar hábitos saludables como el ejercicio. A un grupo de pacientes se le realizarán así mismo flebotomías terapéuticas (sangrías de unos 400cc de sangre).

La flebotomía terapéutica es un procedimiento sencillo de extensa utilización que consiste en la extracción de algo menos de medio litro de sangre de la vena del brazo. (El procedimiento es idéntico al de la donación de sangre convencional). Se realiza en el servicio de Hemoterapia por personal de enfermería entrenado con material estéril desechable, bajo supervisión médica.

Un día antes de la extracción se realizará una extracción analítica para comprobar que los niveles de hemoglobina son correctos, es decir, para descartar anemia. Así mismo, instantes antes de la extracción se comprobarán la normalidad de las constantes vitales (tensión arterial y pulso sanguíneo), situación necesaria para tolerar el procedimiento.

Los efectos adversos derivados de las flebotomías son infrecuentes e incluyen hematomas en la zona de venopunción, mareos, hipotensión o síncope. Para minimizar los riesgos se recomienda acudir bien desayunado o comido, y la primera vez, preferiblemente acompañado. Es recomendable disponer de una botella de medio litro de agua, para su ingestión momentos antes de la extracción.

Debe venir relajado y con tiempo suficiente, es recomendable que se quede entre media hora y una hora después del procedimiento.

En la primera visita médica se realizará una entrevista clínica y un examen físico para determinar si es apto para este tratamiento. Si lo es, se le realizarán las flebotomías cada tres semanas si la analítica y la toma de constantes nos lo permiten. Se le realizarán un mínimo de tres y un máximo de seis, siempre y cuando no presente acontecimientos adversos.

Se le realizará una nueva visita médica mensual en la que se valorará el seguimiento de la dieta y la tolerancia a las flebotomías.

8.2.- ALEATORIZACIÓN DE PACIENTES Y SECUENCIA TEMPORAL.

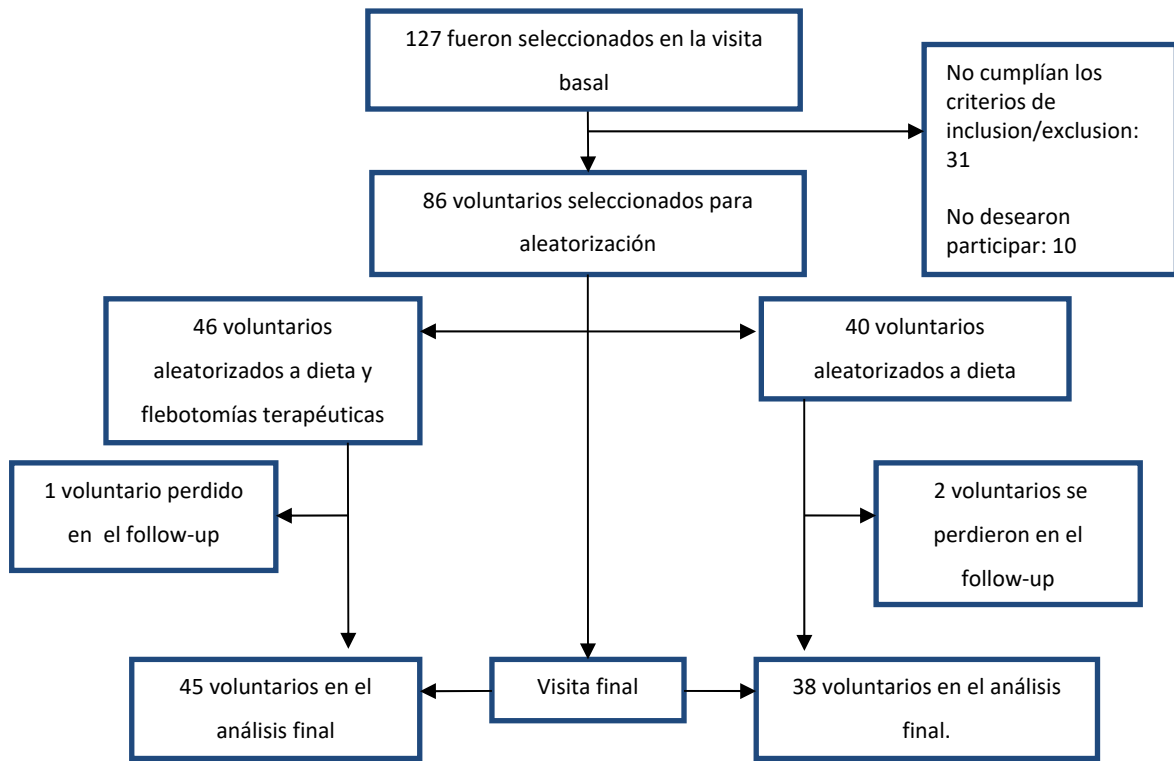


Gráfico 2: Diagrama sobre la aleatorización de los pacientes en los dos grupos a estudio.

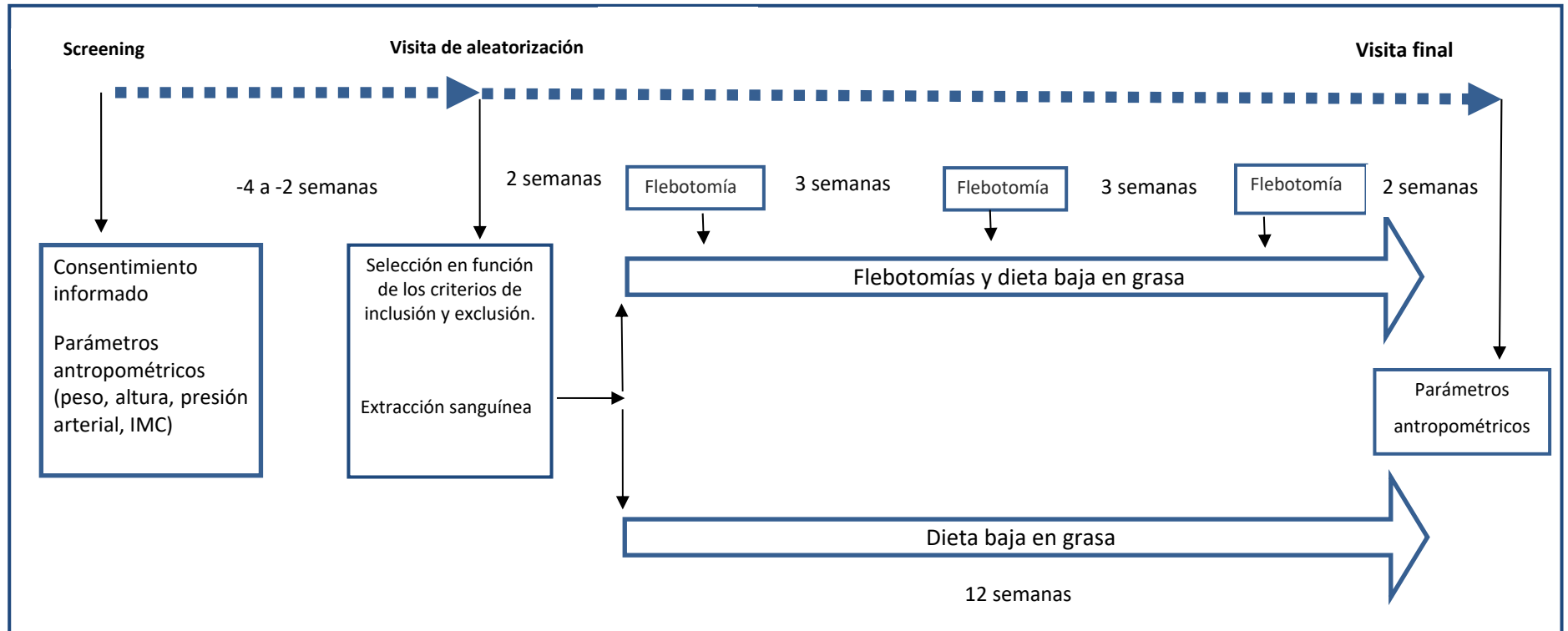


Gráfico 3: Diagrama sobre los tiempos de intervención sobre cada grupo.





Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**EFFECTO DE LAS FLEBOTOMÍAS TERAPÉUTICAS
SOBRE LA RESISTENCIA PERIFÉRICA A LA
INSULINA EN PACIENTES CON
HIPERFERRITINEMIA E HIPERTRIGLICERIDEMIA**

Autor

Laura Lacalle Aicua

Director/es

Civeira Murillo, Fernando
Mateo Gállego, Rocío

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Medicina, Psiquiatría y Dermatología

2019

