



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA

**Tesis Doctoral**

**CONTENIDO DE DNA MITOCONDRIAL Y STRESS OXIDATIVO COMO BIOMARCADOR  
PRECOZ DE SUSCEPTIBILIDAD A LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR**

**Yamilée Hurtado Roca**  
**Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares**  
**(CNIC) Madrid, 2017**

*A mis padres por ser el  
principio y fin de mi vida*

*A mis hermanos porque  
sus locuras han sido  
mi estímulo*

*A Zoe que se ha convertido  
en el nódulo sinusal  
de mi vida*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mi director de tesis, Dr. Martín Laclaustra Gimeno, por su apoyo durante toda mi estancia doctoral, su paciencia, motivación, entusiasmo, y el conocimiento científico que será importante en el desarrollo de mi carrera profesional. Agradezco al Dr. Martín por darme la oportunidad de trabajar con él, y confiar en mí desde el principio, él siempre me animó con nuevos desafíos para hacerme pensar y profundizar en cada tema científico. Doy las gracias al Dr. Fernando Rodriguez Artalejo por estar siempre pendiente de mis avances académicos y por su entera disponibilidad para el mejor desempeño de mi rol como estudiante doctoral.

Así mismo, agradezco al Dr. Antonio Fernandez Ortiz por su disponibilidad y por todas las facilidades brindadas para poder realizar mi estancia doctoral en el Area de Epidemiología del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). Al Dr. Hector Bueno por su pronta y siempre oportunas sugerencias para una adecuada edición científica de los artículos publicados. También al Dr. Borja Ibañez y a cada uno de los autores del estudio PESA y estudio AWHS, cuyo apoyo ha sido fundamental para el logro de los objetivos establecidos durante el desarrollo de mi estancia doctoral.

También quiero dar un agradecimiento especial a Ricardo Ponce Sánchez. Él me guió y acogió desde que llegué al CNIC cuando estaba en un momento de transición personal, ayudándome a adaptarme a un nuevo grupo y a un nuevo país; pero sobretodo por haberme brindado su amistad y haber sido mi fortaleza durante estos años. Ricardo, como técnico de laboratorio asociado al estudio PESA, fue mi principal apoyo con sus conocimientos de técnicas de qPCR, sacando adelante los experimentos de laboratorio. No quiero dejar de agradecer a Andrés Gonzales Guerra y Cristina Del Carmen Roselló, quienes nos ayudaron con los experimentos en su laboratorio, brindándonos su valioso

tiempo y conocimientos. Un agradecimiento especial al Dr. Sergio Callejas, biólogo de la Unidad de Genómica, quien me ilustró con su experiencia y conocimientos en cuantificación de ADN y técnicas de PCR cuantitativa.

Sin duda, no puedo dejar de agradecer a Belén Oliva, que siempre ha estado pendiente de mi y me ha presentado a la más bella ciudad del mundo. Al maravilloso grupo del CNIC que se convirtió durante estos tres años y medio en mi familia, Ana G., Rebeca, Alberto, Ana D., Sergio C., Estrella, Edu, Gema y Erika, gracias por haberme hecho sentir como en casa, por todas las conversaciones culturales que hemos tenido en el grupo, las charlas durante el almuerzo, las cervezas del viernes y también la vida fuera de las puertas del CNIC.

Especialmente, quiero agradecer a mis padres que me han enseñado los valores importantes de la vida, a mi padre que me ha empoderado y me ha enseñado que el cielo es el límite, a mi madre quien con su dulzura y sus consejos me ha llenado de esperanzas cada día, a mi hermana de la que admiro su coraje y fortaleza en la vida; a mi hermano de quien he aprendido que desde las mayores catástrofes se pueden construir las mejores fortalezas. A Zoe Antonella, que con solo dos años de edad, me enseñó a enfrentar la vida con una sonrisa incluso cuando ésta es adversa. Son las personas más importantes en mi vida, nunca dudaron que este era el camino que debía escoger y me apoyaron en cada decisión confiando en mí y simplemente estando en cada momento para mí.

Finalmente, a todas las personas que se han cruzado en mi camino durante estos últimos tres años y medio porque han contribuido de alguna manera a esta tesis.

## **FONDOS**

La estancia doctoral fue financiada por el fondo académico N°088-FINCyT-BDE-2014 del Programa de Financiamiento de Ciencia y Tecnología (FINCyT) con el acuerdo 1663/OC-PE entre la República del Perú y el Banco Interamericano de Desarrollo. Los estudios de este proyecto fueron sustentados en parte por los fondos PI10/00021 y PI14/00009 del Instituto de Salud Carlos III, en colaboración con la European Regional Development Fund/European Social Fund, “Investing in your future”. El estudio PESA es co-financiado por la Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC) y el Banco Santander, Madrid, España. El estudio AWHS fue financiado por el Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (I+CS) y el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC).

## TABLA DE CONTENIDOS

|   |    |
|---|----|
| <b>AGRADECIMIENTOS</b> .....  | 3  |
| <b>FONDOS</b> .....   | 5  |
| <b>TABLA DE CONTENIDOS</b> .....  | 6  |
| <b>LISTA DE ABREVIACIONES</b> .....   | 9  |
| <b>RESUMEN</b> .....  | 11 |
| <b>CAPITULO I. INTRODUCCION GENERAL</b> .....   | 12 |
| <b>1. Estrés oxidativo</b> .....  | 13 |
| <b>2. Mitocondria y DNA mitocondrial</b> .....  | 15 |
| <b>3. Investigación Traslacional (Translational Research)</b> .....   | 19 |
| <b>CAPITULO II. COHORTES DE ESTUDIO</b> .....   | 24 |
| <b>1. Estudio “The Progression and Early detection of Subclinical Atherosclerosis study” (PESA)</b> .....                                     | 25 |
| <b>2. Estudio “Aragon Workers’ Health Study” (AWHS)</b> .....   | 26 |
| <b>CAPITULO III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b> .....  | 27 |
| <b>Hipótesis</b> .....  | 28 |
| <b>Objetivos de la investigación</b> .....  | 29 |
| <b>CAPITULO IV. Ajuste de la cuantificación del ADN mitocondrial en sangre total por recuento de plaquetas y leucocitos periféricos</b> ..... | 31 |
| <b>Resumen</b> .....  | 32 |
| <b>Introducción</b> .....   | 33 |
| <b>Materiales y Métodos</b> .....   | 35 |
| Diseño.....   | 35 |
| Muestra .....   | 35 |
| Protocolo del experimento .....   | 36 |
| Preparación de las muestras de sangre .....   | 36 |
| Recuento sanguíneo.....   | 37 |
| Extracción de ADN y ensayos de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa para ADNmt.....   | 37 |
| Estandar de PCR .....   | 39 |
| Marco de formulación.....   | 39 |
| Análisis estadístico .....  | 41 |
| <b>Resultados</b> .....   | 42 |
| <b>Discusión</b> .....  | 49 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Conclusiones</b> .....   | 53  |
| <b>CAPITULO V. LDL oxidada asociada al síndrome metabólico independientemente de la obesidad central y la resistencia a la insulina</b> .....                         | 55  |
| <b>Resumen</b> .....  | 56  |
| <b>Introducción</b> .....   | 57  |
| <b>Materiales y Métodos</b> .....   | 59  |
| Diseño de estudio y población .....   | 59  |
| Colección de datos .....  | 59  |
| Medidas de laboratorio.....   | 60  |
| Síndrome metabólico y Resistencia a la insulina .....   | 61  |
| Análisis estadístico .....  | 61  |
| <b>Resultados</b> .....   | 62  |
| <b>Discusión</b> .....  | 76  |
| <b>CAPITULO VI. Análisis de LDL oxidada plasmática como un potencial mediador entre factores de riesgo cardiovascular y aterosclerosis subclínica carotídea</b> ..... | 82  |
| <b>Resumen</b> .....  | 83  |
| <b>Introducción</b> .....   | 84  |
| <b>Materiales y Métodos</b> .....   | 86  |
| Diseño de estudio.....  | 86  |
| Colección de datos .....  | 87  |
| Factores de riesgo cardiovascular .....   | 87  |
| Aterosclerosis subclínica .....   | 87  |
| Medidas de laboratorio.....   | 88  |
| Análisis estadístico .....  | 88  |
| <b>Resultados</b> .....   | 90  |
| <b>Discusión</b> .....  | 97  |
| <b>CAPITULO VII. Asociación de ferritina y síndrome metabólico. Resultados del estudio Aragon Workers' Health Study (AWHS)</b> .....                                  | 103 |
| <b>Resumen</b> .....  | 104 |
| <b>Introducción</b> .....   | 105 |
| <b>Materiales y Métodos</b> .....   | 106 |
| Colección de los datos.....   | 106 |
| Medidas de laboratorio.....   | 107 |
| Síndrome metabólico .....   | 108 |
| Análisis estadístico .....  | 108 |
| <b>Resultados</b> .....   | 109 |
| Características basales .....   | 109 |

|  |     |
|--|-----|
| Asociación entre la concentración sérica de ferritina y el síndrome metabólico ..... | 111 |
| <b>Discusión</b> .....   | 118 |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....  | 123 |
| <b>REFERENCIAS</b> .....   | 125 |
| <b>ARTICULOS PUBLICADOS</b> .....  | 143 |
| <b>ANEXOS</b> .....  | 145 |

## LISTA DE ABREVIACIONES

|             |  |
|-------------|--|
| ADN         | Acido Desoxirribonucleico  |
| ADNmt       | ADN mitocondrial   |
| ADNn        | ADN nuclear  |
| ATP         | Adenosina trifosfato   |
| AWHS        | Aragon Workers' Health Study   |
| Cys         | Cisteina   |
| FRCV        | Factores de riesgo cardiovascular  |
| HbA1c       | Hemoglobina glicosilada  |
| HDL         | Lipoproteína de alta densidad  |
| HOMA-IR     | Modelo homeostático - resistencia a la insulina                          |
| IMC         | Índice de masa corporal  |
| IMT         | Grosor intima-media  |
| LDL         | Lipoproteína de baja densidad  |
| LDL-ox      | Lipoproteína de baja densidad oxidada                                    |
| Met         | Metionina  |
| NAFLD       | Enfermedad hepática grasa no alcohólica                                  |
| ncADNmt     | Número de copias de ADN mitocondrial                                     |
| ncADNmt(L)  | Número de copias de ADN mitocondrial en leucocitos                       |
| ncADNmt(ST) | Número de copias de ADN mitocondrial en sangre total                     |
| OXPHOS      | Sistema de fosforilación oxidativa                                       |
| PBMC        | Células mononucleares de sangre periférica                               |
| PCR         | Reacción en cadena de la polimerasa                                      |
| PESA        | The Progression and Early detection of Subclinical Atherosclerosis study |
| qPCR        | Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real                       |

|     |                                 |
|-----|---------------------------------|
| RNS | Especies reactivas de nitrógeno |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno   |
| SM  | Síndrome Metabólico             |

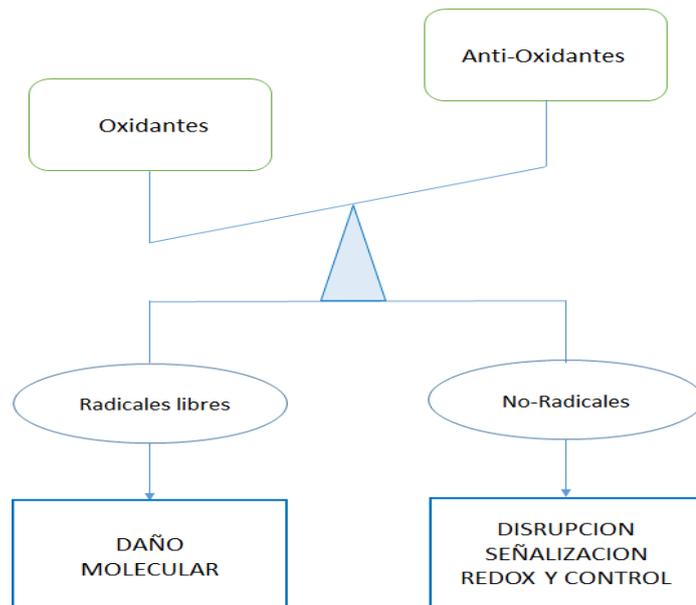
## RESUMEN

La enfermedad cardiovascular es una de las enfermedades no comunicables que va en mayor aumento a nivel mundial. Esto ha generado el desarrollo de estudios en modelos animales y humanos para lograr la comprensión de los procesos biológicos que llevan al daño a nivel celular y la posterior manifestación de la enfermedad. El estrés oxidativo y las alteraciones en la función mitocondrial son un mecanismo en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular. El aumento del estrés oxidativo está relacionado con las alteraciones mitocondriales, de tal modo que cuando hay un aumento de especies reactivas de oxígeno como consecuencia de un incremento de la oxidación, existe un deterioro de la actividad mitocondrial que conduce a alteraciones cuantitativas de su ADN. Por otro lado, el estrés oxidativo produce alteraciones a nivel del metabolismo lipídico, consecuentemente la oxidación de los lípidos de baja densidad produce metabolitos como LDL oxidada. Tanto el ADN mitocondrial como la LDL oxidada, pueden ser utilizados como marcadores tempranos de daño; los mismos que pueden ser medidos a nivel poblacional. Este trabajo busca generar una conexión entre los conocimientos básicos conocidos y su aplicabilidad o comportamiento en la población en general, aportando así a la generación de conocimientos a nivel de investigación traslacional. Para ello, este trabajo se ha enfocado en determinar el uso de ADN mitocondrial en condiciones reales en muestras poblacionales proponiendo formulaciones aplicables a la práctica. Del mismo modo, utilizando métodos estadísticos modernos, busca determinar el comportamiento del LDL oxidada en la línea causal de generación de la enfermedad cardiovascular.

## **CAPITULO I. INTRODUCCION GENERAL**

## 1. Estrés oxidativo

El término fue acuñado por primera vez por el biólogo Helmut Sies en 1985, definiéndose como “un disturbio en el balance pro oxidantes-antioxidantes en favor de los oxidantes”(1). Posteriormente en el 2007, H. Seis introdujo una definición más actualizada, describiendo el estrés oxidativo como “Un desbalance entre oxidantes y anti-oxidantes en favor de los oxidantes, llevando a una disrupción de la señalización redox y/o daño molecular”(2) (Figura 1-1).



*Figura 1-1.* Estrés oxidativo. El estrés oxidativo definido como un desbalance entre oxidantes y antioxidantes que resultan en dos mecanismos de oxidación, la primera mediante radicales libres que induce al daño molecular y la segunda sin radicales libres originando la disrupción en el control y señalización de la reacción de óxido-reducción (REDOX). Adaptado de Jones, D. P. (2008). Radical-free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 295(4), C849-868.

El estrés oxidativo se define como una formación en exceso o una eliminación insuficiente de moléculas altamente reactivas, tales como especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS)(3). Por lo tanto, el estrés oxidativo es un proceso en el que la perturbación del equilibrio entre sustancias anti-oxidantes y oxidantes

conduce a daño molecular(4,5). En situaciones de equilibrio, el efecto de las especies reactivas de oxígeno producidas en procesos metabólicos es compensado por un complejo sistema antioxidante de defensa contra el daño oxidativo(5). Dado el potencial de toxicidad de las especies reactivas de oxígeno, la mitocondria cuenta con mecanismos específicos antioxidantes, así en condiciones fisiológicas los electrones que fluyen por la cadena de transporte de electrones mitocondrial reaccionan con el oxígeno (O<sub>2</sub>), generando anión superóxido; en la matriz mitocondrial este anión superóxido puede ser convertido en peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) o por la superóxido dismutasa intermembranal o citosólica (Cu/ZnSOD); por otro lado, la glutatión peroxidasa transforma el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O(6,7).

La principal consecuencia del estrés oxidativo, es el daño a los lípidos, las bases de ácidos nucleicos y las proteínas, pudiendo inducir la producción de metabolitos, que pueden utilizarse como biomarcadores (8,9). El daño a nivel de lípidos es denominado peroxidación lipídica, este proceso es iniciado por especies de radicales libres reactivos y como consecuencia de esta peroxidación se forman metabolitos que son conocidos como productos finales primarios (LDL-ox) o productos finales secundarios (F<sub>2</sub>-isoprostanos)(10). La peroxidación de lípidos de baja densidad (LDL) afecta tanto a los componentes proteínicos (apolipoproteína B) como a los lípidos, que forman productos complejos de oxidación(11,12); esta LDL-ox contiene lípidos oxidados tóxicos, principalmente aldehídos, oxiesteroles y peróxidos lipídicos(13). Los F<sub>2</sub>-isoprostanos son un grupo de compuestos de tipo prostaglandina que aparecen a través de la peroxidación no enzimática catalizada por radicales libres de ácido araquidónico unido a fosfolípidos(14,15). Las ROS reaccionan también con casi todos los aminoácidos, aunque preferentemente con residuos de Cys, Met y Tyr, y también tienen afinidad por núcleos

reactivos como el grupo hemo o los núcleos Fe-Cu de la cadena de transporte electrónico, lo que produce una pérdida de función enzimática o estructural de las proteínas(16,17).

El estrés oxidativo puede ser la clave en el inicio de varias enfermedades crónicas, especialmente en las enfermedades cardiovasculares(18–22). Las enfermedades cardiovasculares como obesidad, síndrome metabólico y dislipidemia aparecen asociadas a LDL oxidada(23–30). Sin embargo, la relación entre los factores de riesgo cardiovascular y este biomarcador (LDL-ox) se ha estudiado modestamente en personas jóvenes(28,31).

## **2. Mitocondria y DNA mitocondrial**

Las mitocondrias son organelos intracelulares que poseen una estructura de doble membrana que diferencia tres compartimentos: citoplasma, espacio intermembrana y matriz mitocondrial; participan en la síntesis de ATP para proveer de energía a la célula(32). La síntesis de ATP en la mitocondria esta mediada por el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), esta producción de ATP dependerá de la presencia de un gradiente electroquímico generado por la cadena de transporte de electrones mitocondrial(33). Dicho gradiente puede disiparse en forma de calor, a través de las “uncoupling proteins” (UCPs)(34), o bien puede liberar electrones generando especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo(7). Las ROS pueden actuar como segundos mensajeros intracelulares(35) regulando la función celular, pero también pueden producir efectos tóxicos en la célula dependiendo de su concentración(6). Cuando la producción de ROS excede los mecanismos protectores se produce estrés oxidativo, el cual puede producir

daños en el ADN, fundamentalmente de las mitocondrias al estar más directamente expuestas a niveles elevados de ROS(36). Además, las ROS también provocan alteraciones en el DNA que pueden tener como consecuencia la mutagénesis, el cáncer y el envejecimiento(37).

El ADN mitocondrial (ADNmt) fue descubierto por Nass y Nass(38) en los años sesenta. Se ubica en la matriz citoplasmática y cuenta con su propia transcripción, traducción y maquinaria de ensamblaje de proteína; de tal modo son capaces de mantener una relativa independencia genómica del núcleo. En el humano el ADNmt es circular y está constituido por 16569 pares de bases(39). El ADNmt codifica tan solo 37 genes (incluyendo 13 de los polipéptidos del sistema OXPHOS), mientras que el resto de las proteínas y componentes mitocondriales están codificados en el ADN nuclear (ADNn) por aproximadamente 1000-1500 genes(40). El ADNmt se hereda en su totalidad de la madre, a diferencia del ADNn, una pequeña cantidad de ADNmt proveniente de las células espermáticas podrían ingresar al oocito durante la fertilización; pero estas son eliminadas mediante mecanismos dependientes de ubiquitina o autofagia(41).

El contenido de ADNmt por célula, se estima utilizando la técnica de PCR en tiempo real (qPCR) que permite medir el número de copias de un gen del ADNmt, usando como referencia un gen nuclear(42). La producción incrementada de ROS se asocia con un mayor contenido de ADNmt tanto en células en cultivo como en animales de experimentación(43). Se ha demostrado que niveles elevados de ROS inducen la expresión de los factores de síntesis de elementos mitocondriales que favorecen un aumento tanto del contenido mitocondrial como de los sistemas antioxidantes, aumentando la capacidad celular de detoxificación de ROS mitocondriales(44). El aumento en la síntesis de elementos mitocondriales podría compensar el daño oxidativo

sufrido por el ADN mitocondrial. Por tanto, ante un incremento de estrés oxidativo de origen mitocondrial, se activa tanto la síntesis de elementos mitocondriales como los sistemas de detoxificación de ROS. Varios mecanismos bioquímicos, incluyendo la producción de especies reactivas de oxígeno en condiciones oxidativas, inducen a disfunción mitocondrial(45–48) y el desarrollo de factores de riesgo cardiometabólico(49,50). Además, los factores de riesgo cardiometabólico relacionados con el estrés oxidativo modifican el contenido de ADN mitocondrial (ADNmt)(51). Por lo tanto, el contenido de ADNmt podría ser una medida indirecta de la disfunción mitocondrial y podría conducir al diagnóstico precoz de enfermedades cardiometabólicas. Algunos estudios han demostrado una asociación entre algunos factores de riesgo cardiovascular y el contenido de ADN mitocondrial(52–54). Se ha demostrado que las alteraciones en la biogénesis mitocondrial y la disfunción mitocondrial se han relacionado con el síndrome metabólico; así la reducción de la eficacia mitocondrial, la reducción de la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP) y el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden contribuir al desarrollo del síndrome metabólico(55,56). Huang y cols.(52) reportaron una disminución del contenido de ADNmt en leucocitos en pacientes con síndrome metabólico, y hallazgos similares fueron reportados por Kim y cols.(57). Por otro lado, la disfunción mitocondrial contribuye al desarrollo de la diabetes y la resistencia a la insulina(58,59). Así mismo, la diabetes es un estado de estrés oxidativo(50) que desempeña un papel fundamental en el desarrollo de los radicales libres y que produce disfunción mitocondrial(60). Adicionalmente, la capacidad oxidativa celular está asociada con la resistencia a la insulina a través de la reducción de la actividad oxidativa mitocondrial(61–63) y el aumento de la fosforilación de los receptores de insulina(64). Estudios previos han evidenciado una asociación significativa entre la disminución del contenido de ADNmt y el desarrollo de

diabetes(65), así como con la resistencia a la insulina(66–68). Sin embargo, otros autores han reportado que la diabetes y la resistencia a la insulina no se correlacionaron con el contenido de ADNmt. Así, Park y cols.(69) demostraron que la disminución del contenido de ADNmt no estaba asociada con la resistencia a la insulina en hombres jóvenes sanos. Además, Singh y cols.(70) demostraron que la disminución del contenido de ADNmt no estaba vinculada a un riesgo de desarrollar diabetes en descendientes de pacientes con diabetes de aparición temprana.

Los cambios cuantitativos del contenido de ADNmt, se han descrito también en relación a la obesidad. Así, se han reportado alteraciones en el metabolismo oxidativo y disminución del contenido de ADNmt en ratones obesos(71). En estudios en seres humanos, las funciones mitocondriales defectuosas en sujetos con aumento de la masa grasa han sido reportados(72,73). De acuerdo con estos hallazgos, se han mostrado alteraciones cuantitativas en el contenido de ADNmt; por ejemplo, Yin y cols.(74) reportaron disminución del contenido de ADNmt en el tejido adiposo de hombres obesos. Adicionalmente, el perímetro de la cintura y el IMC están relacionados con el aumento de la masa grasa; sin embargo, algunos autores como Song y cols.(66) evidenciaron una relación inversa no significativa entre el contenido de ADNmt y el perímetro de cintura. Del mismo modo, Park y cols.(75) no observaron asociación entre el contenido de ADNmt y el perímetro de la cintura y el IMC en hombres jóvenes.

El estrés oxidativo con sobreproducción de ROS(76,77,49) y las alteraciones en la función mitocondrial son un mecanismo en la patogénesis de la hipertensión. Por lo tanto podría plantearse que existen alteraciones cuantitativas del contenido del ADNmt en la hipertensión. Sin embargo, esta hipótesis teórica no ha sido evidenciada en estudios; autores como Park y cols.(75) no hallaron ningún vínculo entre el contenido de ADNmt

y la presión arterial diastólica y sistólica en hombres jóvenes sanos. Recientemente, Huang y cols.(78) y Meicen y cols.(79) encontraron una relación no significativa entre la presión arterial y el contenido de ADNmt en una población con enfermedades crónicas cardiometabólicas.

El aumento del estrés oxidativo está relacionado con las alteraciones mitocondriales y el metabolismo lipídico alterado. Cuando aumenta la oxidación de las lipoproteínas, existe un deterioro del metabolito oxidado de la actividad mitocondrial, que conduce a alteraciones cuantitativas del ADNmt. Liu y cols.(80) informaron una alteración en el contenido de ADNmt en los leucocitos, encontrando una relación positiva entre los niveles de colesterol HDL y el contenido de ADNmt. Sin embargo, Lim y cols.(81) establecieron una correlación inversa entre el contenido de ADNmt y el colesterol, el colesterol LDL y los triglicéridos en muestras de sangre periférica de mujeres sanas.

Por lo tanto, las alteraciones cuantitativas del contenido de ADNmt son un potencial marcador de la enfermedad cardiovascular, aún con resultados mixtos o poco explorados en alguno de ellos.

### **3. Investigación Traslacional (Translational Research)**

El concepto de “Translational Research” o “Traslational Medicine”, ha sido incorporado al final de la década de los noventa, y se ha visto un incremento significativo de publicaciones desde el 2005(82). Así, realizando una búsqueda en PubMed, la primera publicación data desde 1999 y la mayor cantidad de producción científica se da entre los años 2010 y 2015 (Figura 1-2).

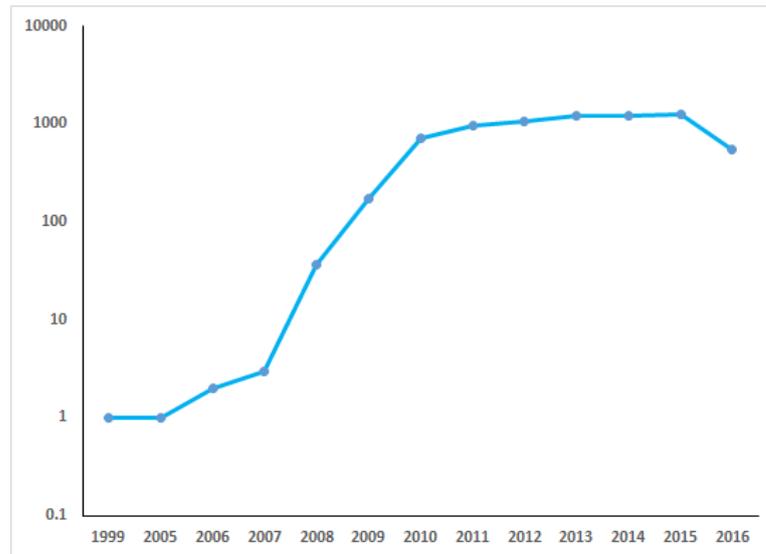


Figura 1-2. Número de publicaciones con el término “translational research”. Búsqueda de la literatura en PubMed, incluyendo el término “translational research” (mostrada en escala logarítmica), el número de publicaciones desde 1999 hasta 2016 fue de 7176.

La definición de “Translational Research”, ha evolucionado en el tiempo; inicialmente fue conceptualizada como una vía unidireccional entre los conocimientos de investigación básica aplicados a la clínica(83). Sin embargo, a inicios del 2000 este concepto asume una vía bi-direccional, en el que los hallazgos de investigación básica y los obtenidos en la aplicación clínica se retroalimentan generando nuevas hipótesis(83,84). Mas recientemente, la Asociación Europea de Medicina Traslacional define a la Investigación Traslacional como “una rama inter-disciplinaria de la investigación biomédica apoyada en tres pilares fundamentales: la investigación de ciencias básicas, la investigación clínica y la comunidad; siendo el objetivo el combinar disciplinas, recursos, experiencia y técnicas dentro de cada uno de estos pilares para promover mejoras en prevención, diagnóstico y terapia”(85).

Para un mejor entendimiento del concepto, se define a la investigación traslacional en fases dinámicas. Algunos autores describen entre 4 ó 5 fases o niveles(86–88): En la Fase 0 (T0) se encuentra la investigación biomédica básica que genera nuevos

descubrimientos o conocimientos; esta fase tiene como objetivo el entendimiento de mecanismos biológicos que subyacen alguna condición. Fase 1 (T1) es la fase en la que los conocimientos se aplican a humanos, la investigación tiene como objetivo obtener nuevas aplicaciones o conocimientos para el diagnóstico y prevención en humanos. Fase 2 (T2), es el nivel en el que los conocimientos se aplican a los pacientes, generando nuevas implicancias prácticas cuyo objetivo es analizar o identificar los efectos de una intervención o una asociación en las diferentes condiciones o enfermedades en humanos. En la Fase 3 (T3), es la fase en el que los conocimientos se trasladan a la práctica clínica, donde el objetivo es incorporar dentro de la práctica intervenciones óptimas como el desarrollo de guías clínicas o la aplicación de nuevas recomendaciones de prácticas clínicas. La Fase 4 (T4) es el nivel en el que los conocimientos se trasladan a la comunidad, generándose nuevos conocimientos que mejoren la salud global (Figura 1-3).



Figura 1-3. Fases de la Investigación Traslacional

Todos estos conceptos han sido adaptados dentro de la epidemiología por Khoury y cols.(89), quienes han acuñado el término de “Epidemiología Traslacional” y definido el aporte de la epidemiología a lo largo de estos procesos de investigación continua en la investigación traslacional. El rol de la epidemiología en la primera fase (T0) consiste en describir los patrones de salud de acuerdo al espacio geográfico, tiempo y persona; comprende además los hallazgos de determinantes de la salud con el uso de estudios observacionales. En la fase 1 (T1), la epidemiología caracteriza los descubrimientos y potencia su aplicación en estudios clínicos y poblacionales. Durante la fase 2 (T2) se determina la eficacia de las intervenciones para la mejora de la salud y prevención de enfermedades utilizando estudios observacionales y experimentales. La fase 3 (T3) es la etapa en la que los métodos epidemiológicos contribuyen a determinar la implementación y diseminación de guías dentro de la práctica clínica. Finalmente, en la fase 4 (T4) el rol de la epidemiología consiste en determinar la efectividad de las intervenciones en salud a nivel poblacional.

Por lo tanto, la epidemiología juega un rol fundamental como herramienta de investigación para trasladar los conocimientos establecidos por la ciencia básica a la población en general, obteniendo beneficios a nivel individual y poblacional para la generación de políticas de salud y conectar de este modo cada una de las fases que además se retroalimentan una a otra para la generación de nuevos conocimientos. Es así que tomando los conocimientos básicos sobre ADN mitocondrial es necesario adaptar y probar la técnica que para su uso en la investigación poblacional y conocer cuales son sus limitaciones. Por otro lado, respecto al estrés oxidativo, dadas las asociaciones descritas se han postulado varios mecanismos; pero nuestro trabajo informa sobre cuales son compatibles con los hallazgos en la población, devolviendo el flujo de conocimiento a la investigación básica que tendrá que focalizarse en los mismos, abandonando otras teorías

compatibles con los hallazgos de laboratorio pero no con la realidad clínico-epidemiológica.

## **CAPITULO II. COHORTES DE ESTUDIO**

Para este proyecto se utilizaron los datos basales de dos cohortes de estudio en poblaciones de mediana edad sin antecedentes de enfermedad cardiovascular; los detalles de los protocolos de ambos estudios han sido publicados previamente(90,91). A continuación, un breve resumen del diseño de los estudios como referencia.

### **1. Estudio “The Progression and Early detection of Subclinical Atherosclerosis study” (PESA)**

El estudio PESA es un estudio de cohorte prospectivo, observacional y longitudinal en una población de más de 4000 sujetos sanos con edades entre 40-54 años, que son trabajadores del Banco Santander con sede en Madrid (España). El reclutamiento se inició en junio del 2010 y se completó a finales del 2013. En las visitas de enrolamiento se realizaron evaluaciones de factores de riesgo cardiovascular (incluyendo estilo de vida y factores psicosociales); detección de aterosclerosis subclínica mediante ecografía 2D/3D en carótida, aorta abdominal y arterias iliofemorales, además del score calcio coronario (CACs) por tomografía computarizada; además se realizaron colecciones de muestras de sangre para la determinación de factores de riesgo cardiovascular tradicionales y para estudios en genómica; así mismo evaluar la influencia, de los factores psicosociales y estilos de vida, para el desarrollo de aterosclerosis subclínica. El estudio PESA, realizará visitas de seguimiento hasta 6 años después de la inclusión de cada sujeto, en total a cada participante se le realizará una visita de inicio, una visita de seguimiento a los 3 años y una visita final a los 6 años de su inclusión. Cada visita de estudio incluye una entrevista clínica, examen físico, tomas de muestra de sangre y orina, exámenes de imágenes (exámenes de ultrasonido y tomografía computarizada) y valoración de actividad física con un acelerómetro.

## **2. Estudio “Aragon Workers’ Health Study” (AWHS)**

Este estudio es una cohorte longitudinal que tiene como objetivo caracterizar los factores asociados a alteraciones metabólicas y aterosclerosis subclínica en una población de hombres y mujeres de mediana edad, sin enfermedad cardiovascular en España. En esta cohorte se reclutaron más de 5.000 trabajadores de una gran fábrica automotriz en Zaragoza (General Motors en Figuerelas). El estudio inició el enrolamiento en febrero del 2009 y finalizó en diciembre del 2010. El seguimiento de los sujetos incluidos en la cohorte se realizará hasta el 2020. A los sujetos incluidos en el estudio se les realizó una evaluación clínica anual y la información fue complementada a través de cuestionarios sobre factores de riesgo cardiovascular y estilos de vida junto con la colección de muestras de sangre y orina y exámenes de imagen trienal para la detección de aterosclerosis subclínica. Los trabajadores fueron excluidos de la cohorte si cursaban con alguna enfermedad cardiovascular clínicamente manifiesta, o una condición clínica importante que limitara su supervivencia a <3 años desde el inicio de su inclusión. El estudio fue aprobado por el comité central de ética institucional de Aragón (CEICA). Todos los participantes del estudio proporcionaron su consentimiento informado por escrito. La colección de datos se realizó durante el examen médico anual que el servicio médico de General Motors España ofrece a sus trabajadores, estos exámenes se llevaron a cabo por los médicos y enfermeras de este servicio, que se sometieron a programas de formación y normalización a cargo de los investigadores del estudio.

## **CAPITULO III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

## Hipótesis

1. El número de copias de ADN mitocondrial en sangre total está influenciado por el recuento de plaquetas y leucocitos. Este hecho puede dificultar su estudio en poblaciones.
2. La mayor producción de especies reactivas de oxígeno en los sujetos provoca daños en los lípidos identificables por marcadores bioquímicos de daño oxidativo como LDL oxidada.
3. El estrés oxidativo, estimado por un aumento del contenido de LDL oxidada, se asocia con una mayor presencia de síndrome metabólico y sus componentes.
4. LDL oxidada podría mediar la asociación entre obesidad central y síndrome metabólico.
5. La resistencia a la insulina podría mediar la asociación entre LDL oxidada y síndrome metabólico.
6. LDL oxidada a nivel plasmático podría estar asociado a la presencia de placas carotídeas en sujetos de mediana edad, independientemente de otros factores de riesgo cardiovascular tradicionales.
7. LDL oxidada podría mediar la asociación entre placas carotídeas y factores de riesgo cardiovascular o los factores de riesgo cardiovascular median la asociación entre LDL oxidada y la presencia de placas carotídeas.
8. Existe una asociación no lineal entre el nivel de ferritina y el síndrome metabólico.

## Objetivos de la investigación

1. Describir el efecto del recuento de plaquetas en el número de copias de ADN mitocondrial en sangre total en una muestra del estudio AWHHS, donde el contenido de ADN mitocondrial por célula fue estimado midiendo el número de copias de un gen codificado en el ADN mitocondrial por qPCR.
2. Evaluar la extensión de la sobreestimación y clasificación errónea del número de copias de ADN mitocondrial en datos epidemiológicos reales (estudio AWHHS) y proponer una fórmula de corrección para estimar el número de copias de ADN mitocondrial de los leucocitos a partir del número de copias de ADN mitocondrial de sangre total.
3. Determinar una fórmula de corrección que permitirá cuantificar el número de copias de ADN mitocondrial a partir de sangre total, que es de fácil acceso en estudios epidemiológicos.
4. Medir en los participantes del estudio PESA el efecto del estrés oxidativo sobre lípidos mediante determinación de LDL oxidada.
5. Evaluar la asociación del estrés oxidativo, utilizando LDL oxidada como un marcador, con el Síndrome metabólico y sus criterios.
6. Evaluar una relación de mediación en la línea de asociación de LDL oxidada, resistencia a la insulina, obesidad central y Síndrome metabólico.
7. Evaluar la asociación entre LDL oxidada a nivel plasmático y la presencia de placas carotídeas en sujetos de mediana edad.

8. Evaluar una relación de mediación de en la línea de asociación de LDL oxidada a nivel plasmático, placas carotideas y factores de riesgo cardiovascular.
9. Determinar la asociación no lineal entre el síndrome metabólico y la ferritina en el estudio AWHHS, siendo la ferritina un marcador del hierro, elemento que se relaciona con la producción de radicales libres y estrés oxidativo.

**CAPITULO IV. Ajuste de la cuantificación del ADN  
mitocondrial en sangre total por recuento de plaquetas  
y leucocitos periféricos**

## Resumen

Las alteraciones del número de copias del ADN mitocondrial (ncADNmt) en la sangre (proporción ADN mitocondrial/ADN nuclear) aparecen asociadas con varias enfermedades sistémicas, incluyendo trastornos mitocondriales primarios, carcinogénesis y enfermedades hematológicas. Medir el ncADNmt en el ADN extraído de sangre total (ST) en lugar de las células mononucleares de sangre periférica o de la capa leucocitaria puede producir diferentes resultados debido al ADN mitocondrial presente en las plaquetas. El objetivo de este trabajo es cuantificar la contribución de las plaquetas al ncADNmt en sangre total y proponer una fórmula de corrección para estimar el número de copias de ADNmt de los leucocitos [ncADNmt(L)] a partir del ncADNmt(ST). Las muestras de sangre de 10 adultos sanos se combinaron con plasma enriquecido con plaquetas y solución salina para producir preparaciones de sangre artificial. Se combinaron alícuotas de cada muestra con cinco concentraciones de plaquetas diferentes. En 46 de estos preparados sanguíneos, el ncADNmt se midió por qPCR. El ncADNmt(ST) aumentó 1,07 (IC del 95%: 0,86, 1,29;  $p < 0,001$ ) por 1000 plaquetas presentes en la preparación. Hemos demostrado que el recuento leucocitario también debe tenerse en cuenta dado que el ncADNmt(ST) se asoció inversamente con éstos. El ncADNmt(ST) incrementó 1,10 (IC 95% 0,95, 1,25,  $p < 0,001$ ) por unidad de aumento de la relación plaquetas/leucocitos. Si las mediciones hematológicas están disponibles, restando  $1.10(\text{plaquetas/leucocitos})$  de ncADNmt(ST) puede servir como una estimación para el ncADNmt (L). Tanto el recuento de plaquetas como el de leucocitos en la muestra son fuentes importantes de variación si se compara ADNmt entre grupos de pacientes cuando se mide ADNmt en ADN extraído de sangre total. No tomar en cuenta la relación

plaquetaria/leucocitos en las mediciones de sangre total, puede conducir a sobrestimación y clasificación errónea si se interpreta como ncADNmt de leucocitos.

## Introducción

Las mitocondrias son organelas intracelulares involucradas en la producción de energía a través del proceso de fosforilación oxidativa (OXPHOS) que tienen su propio genoma (ADNmt), distinto al del núcleo celular (ADNn). Aunque la masa mitocondrial por célula varía con el tipo celular y el estado metabólico, cada tipo de célula individual contiene típicamente una cantidad bastante constante de mitocondrias y, en consecuencia, el número de copias del genoma mitocondrial es también constante, ya que está unido a la masa mitocondrial(92). Cada mitocondria contiene entre 2 y 10 copias de su genoma(39). Las células que requieren alta energía, como el músculo y las neuronas, contienen un gran número de copias de ADNmt, mientras que las células de bajo consumo de energía, como el bazo y las células endoteliales, contienen menos copias(93–95). La cantidad de ADNmt por célula, o número de copias de ADNmt (ncADNmt), se puede expresar como una relación de copias de ADNmt/ADNn, es decir, utilizando ADNn como referencia, suponiendo que todas las células cuantificadas están nucleadas y diploides(96). Hoy en día, la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) es un método adecuado para cuantificar ncADNmt(97–99).

La reducción o el aumento de la biogénesis o la disponibilidad de las mitocondrias en las células pueden ser marcadores de la patología mitocondrial primaria o de la patología sistémica que afecta a la biología mitocondrial. Aunque ncADNmt se puede estudiar en cualquier tejido, la sangre es uno de los más comúnmente utilizados, ya que las muestras pueden ser fácilmente obtenidas. Las alteraciones de ncADNmt en la sangre pueden estar asociadas a trastornos mitocondriales primarios(100,101), que a veces se

asocian a mutaciones genéticas primarias(102,103), pero también se han relacionado con la disfunción cardíaca(104), la carcinogénesis y la progresión del cáncer(105,106), infección de VIH (107,108), y diabetes(66,109).

Para el estudio de ncADNmt, el ADN se obtiene generalmente a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC). En tales muestras, la contaminación plaquetaria puede conducir a una sobreestimación de las mediciones de ncADNmt(110) ya que una plaqueta contiene aproximadamente 1,6 moléculas de ADNmt en promedio, pero no hay ADN nuclear(111). Timmermans y cols.(108) reportaron que las plaquetas contaminantes no influyeron en los resultados si su número total es inferior a 5 veces el número de PBMC. La mayoría de los estudios epidemiológicos a gran escala tienen muestras de ADN disponibles, pero en muchos casos se han extraído de sangre total y no de PBMC(112–114). Los sujetos sanos suelen tener 14-90 veces más plaquetas que leucocitos en sangre periférica(115). Por lo tanto, un grupo de ADNmt provenientes de PBMCs', granulocitos, y plaquetas está presente en esas muestras, lo que podría afectar a la cuantificación ncADNmt. De hecho, se han realizado muchos estudios utilizando datos de ncADNmt medidos en sangre total, y aunque fueron capaces de establecer asociaciones con procesos mórbidos como el cáncer(105,106), linfoma non-Hodgkin(116,117), enfermedad de Huntington's(118), y diabetes(66,109), considerando el efecto de las plaquetas podrían mejorar estos hallazgos.

Los objetivos de este trabajo son describir el efecto del recuento de plaquetas en ncADNmt en sangre total, evaluar la extensión de la sobreestimación y clasificación errónea de ncADNmt en datos epidemiológicos reales y proponer una fórmula de corrección para estimar el ncADNmt(L) de los leucocitos a partir de ncADNmt(ST) de sangre total, si las mediciones hematológicas de la muestra original están disponibles.

## **Materiales y Métodos**

### **Diseño**

El ncADNmt se midió en varias preparaciones de sangre artificial que fueron combinaciones experimentales de muestras de sangre con plasma enriquecido con plaquetas y solución salina de modo que cada muestra se combinó con cinco concentraciones de plaquetas diferentes. Los coeficientes que relacionan los parámetros hematológicos con ncADNmt, de acuerdo con un marco de formulación teórica, se estimaron estadísticamente. Posteriormente, los datos de ncADNmt de un estudio observacional se utilizaron para describir las diferencias en el valor y la clasificación de sujetos entre las mediciones crudas de ncADNmt en sangre completa y los valores corregidos a ncADNmt(L) aproximado utilizando los coeficientes previamente estimados.

### **Muestra**

Se utilizaron muestras de sangre entera en ayunas de 10 participantes aleatoriamente seleccionados (8 hombres y 2 mujeres) del estudio Aragon Workers' Health Study(90), cuyo recuento sanguíneo completo estaba dentro de rangos saludables para producir los preparados de sangre artificial para los experimentos. Las muestras se recogieron en tubos EDTA-K2 de 6 ml (BD Vacutainer). El estudio Aragon Workers' Health Study, AWHs, es un estudio longitudinal de trabajadores sanos de mediana edad en una gran fábrica de automóviles en España, y se utilizó datos de toda la cohorte con ncADNmt disponible (N=3389) para comparar ncADNmt(ST) y ncADNmt(L) calculado. Todos los participantes del AWHs fueron informados sobre los potenciales usos de sus

muestras en las investigaciones y firmaron un consentimiento informado por escrito aprobado por el Comité de Ética en Investigación Clínica de Aragón (CEICA).

## **Protocolo del experimento**

Después de medir el recuento de células sanguíneas, se procesó la muestra de cada participante para obtener 5 preparaciones derivadas de sangre artificial, de manera que cada una contenía una proporción diferente de leucocitos y plaquetas. El ADN se extrajo a continuación de las muestras originales y de las preparaciones derivadas, y se midió ADNmt en el ADN extraído.

## **Preparación de las muestras de sangre**

Para cada participante, seis alícuotas de 50µl de sangre total fueron preparadas y reservadas. Del resto de la muestra de sangre se aislaron plaquetas para obtener plasma enriquecido con plaquetas. En resumen, se centrifugó la sangre a 100 x g durante 15 min a temperatura ambiente. La capa superior se transfirió a un tubo nuevo y se centrifugó una vez más a 200 x g durante 10 min a temperatura ambiente. Este sobrenadante, que contenía las plaquetas (plasma enriquecido con plaquetas, PEP), se guardó para ser combinado en diferentes proporciones con solución salina (Tabla 4-1) y se añadió a cinco alícuotas reservadas de sangre entera. Los recuentos sanguíneos se obtuvieron de las preparaciones. Las muestras y preparaciones se mantuvieron a -80°C hasta que se produjera la extracción de ADN.

Tabla 4-1. *Proporciones para los preparados de muestras de sangre*

|   | Número de preparaciones |       |     |     |     |
|---|-------------------------|-------|-----|-----|-----|
|   | P1                      | P2    | P3  | P4  | P5  |
| Sangre ( $\mu$ l)                                 | 50                      | 50    | 50  | 50  | 50  |
| Solución salina ( $\mu$ l)                        | 400                     | 387.5 | 350 | 200 | 0   |
| Plasma enriquecido con plaquetas (PEP) ( $\mu$ l) | 0                       | 12.5  | 50  | 200 | 400 |
| Proporción de volumen de PEP con respecto a P2    | -                       | 1x    | 4x  | 16x | 32x |

## Recuento sanguíneo

Las muestras de sangre y las preparaciones se analizaron en un analizador COULTER ACT 5diff (Beckman Coulter) para determinar los recuentos de plaquetas y leucocitos. Se realizaron controles de calidad internos de tres niveles antes del trabajo diario. Un control de calidad externo de la Asociación Española de Analistas Farmacéuticos (AEFA) se procesó cada 4 meses.

## Extracción de ADN y ensayos de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa para ADNmt

Para la parte experimental, el ADN se extrajo manualmente de las muestras de sangre y preparados sanguíneos con fenol-cloroformo, de acuerdo con el protocolo descrito por Marcuello y cols.(119). La concentración y pureza del ADN se midieron con un espectrofotómetro Nanovue (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) y se prepararon diluciones de ADN a 2 ng/ $\mu$ l para los análisis. Para las muestras de la cohorte AWHs, el ADN se extrajo con el extractor AutoGenFlex 3000, utilizando el kit FlexiGene DNA (Qiagen), que se basa en precipitación alcohólica. De forma similar, se prepararon diluciones de ADN a 2 ng/ $\mu$ l para la posterior medición de ncADNmt. La cuantificación de ncADNmt se basó en las reacciones en cadena de la polimerasa a tiempo real(qPCR) sobre la base de ensayos SYBR green y realizado en un ABI PRISM® 7900 Real Time PCR System (Applied BioSystems). En una sola placa de reacción de

384 pocillos, se realizaron dos conjuntos de reacciones de 10 µl en pocillos de reacción separados, uno para el gen mitocondrial de citocromo oxidasa II (MT-CO2) y otro para el gen nuclear para la subunidad A de succinato deshidrogenasa (SDHA), produciendo amplicones de 69 y 72 pb, respectivamente. Cada reacción contenía 5 ng de ADN y 400 nM de cada primer. Las secuencias y posiciones de los primers se indican en la Tabla 4-2.

Tabla 4-2. *Secuencia de primers de la qPCR.*

| Gen            | Hebra      | Posición      | Longitud (bp) | Secuencia                     | Longitud del amplicon (bp) |
|----------------|------------|---------------|---------------|-------------------------------|----------------------------|
| SDHA           | Plus/Plus  | 223475-223495 | 21            | 5'-TCTCCAGTGGCCAACAGTGTT-3'   |                            |
| (NC_000005.10) | Plus/Minus | 223546-223527 | 20            | 5'-GCCCTCTTGTTCCCATCAAC-3'    | 72                         |
| MT-CO2         | Plus/Plus  | 7858-7877     | 20            | 5'-CGATCCCTCCCTTACCATCA-3'    |                            |
| (NC_012920.1)  | Plus/Minus | 7926-7904     | 23            | 5'-CCGTAGTCGGTGTACTCGTAGGT-3' | 69                         |
|                | Plus/Minus | 8081-8062     | 20            | 5'-GGACAGCTCATGAGTGCAAG-3'    | 224                        |

Las muestras, así como un control negativo y una curva de dilución de 1:10 de 7 puntos de un patrón (descrito más adelante) se analizaron por triplicado. Las condiciones utilizadas para la amplificación fueron las siguientes: un ciclo de 50°C durante 2min, un ciclo de 95°C durante 10min, 40 ciclos de 95°C durante 1s. Y 60°C durante 20s, un ciclo de 60°C durante 15s y 1 ciclo de 95°C durante 15s. Para acomodar todas las mediciones en una sola placa de reacción, se midieron sólo 46 de las 50 preparaciones (se omitieron cuatro preparaciones de P3).

La curva estándar, que contenía un número igual de copias para ambos amplicones (véase más adelante), se utilizó como referencia para la cuantificación absoluta de cada gen utilizando el método del umbral de número de ciclos(Cq). Los umbrales se obtuvieron por defecto por el método de segunda derivada en ABI PRISM (Sequence Detection System, SDS 2.4 software). La proporción de la cantidad absoluta de MT-CO2 a la de SDHA (número de copia de ADNmt - ncADNmt) se utilizó como medida de la mitad del número de copias de ADNmt en leucocitos. Utilizamos el término ncADNmt(ST) para referirnos a las mediciones directas (no corregidas) realizadas en muestras de sangre total o preparaciones sanguíneas en contraste con ncADNmt(L) que se obtendrían de la medición en leucocitos o derivados con nuestra fórmula de corrección (véase más adelante)

## **Estandar de PCR**

Se creó un estándar de PCR ligando una copia del amplicón para MT-CO2 y una copia del amplicón para SDHA(120). Se utilizó un amplicón más largo (224 pb) para el gen MT-CO2 (Tabla 3-2), que incluía la región utilizada para la determinación de qPCR, para permitir una discriminación adecuada de los productos de ligación correctos después de la amplificación por PCR. La secuencia del estándar de PCR se verificó mediante secuenciación de Sanger. El estandar se preparó realizando seis diluciones de 10 veces a partir de una concentración inicial de 0,1 ng/μl.

## **Marco de formulación**

En la sangre entera, el número de copias de ADNmt ( $n_{ADNmt}$ ) es la suma del número de copias de ADNmt por leucocito ( $ADNmt_L$ ) multiplicado por el recuento de

leucocitos ( $n_L$ ) más el número de copias de ADNmt por plaquetas ( $ADNmt_P$ ) multiplicado por el recuento de plaquetas ( $n_P$ ).

$$n_{ADNmt} = ADNmt_L \cdot n_L + ADNmt_P \cdot n_P$$

De forma similar, el número de copias de ADNn ( $n_{ADNn}$ ) es el número de copias de ADNn por leucocito ( $n_{ADN_L}$ ), asumiendo 2 en células diploides ( $n_{ADN_L} = 2$ ), multiplicado por el recuento de leucocitos ( $n_L$ ).

$$n_{ADNn} = n_{ADN_L} \cdot n_L$$

El ratio de ADNmt ( $ncADNmt$ ) se calcula dividiendo el número de copias de ADNmt ( $n_{ADNmt}$ ) por el número de copias de ADNn ( $n_{ADNn}$ ). Dado que,

$$ncADNmt = \frac{n_{ADNmt}}{n_{ADNn}} \quad \text{y} \quad n_{ADN_L} = 2 \quad ,$$

en sangre completa,

$$ncADNmt(ST) = \frac{ADNmt_L \cdot n_L}{2 \cdot n_L} + \frac{ADNmt_P \cdot n_P}{2 \cdot n_L} \quad ,$$

mientras que, en leucocitos,

$$ncADNmt(L) = \frac{ADNmt_L}{2} \quad .$$

Reemplazando  $ncADNmt(L)$  apropiadamente, obtenemos:

$$ncADNmt(ST) = ncADNmt(L) + \frac{ADNmt_P}{2} \cdot \frac{n_P}{n_L}$$

$$ncADNmt(ST) = ncADNmt(L) + K \cdot \frac{n_P}{n_L}$$

El término  $\frac{ADNmt_P}{2} = K$  representa el factor que multiplica la relación entre las plaquetas y el recuentos de leucocitos para calcular el exceso de  $ncADNmt(ST)$  con respecto a  $ncADNmt(L)$ . Se estimó el factor (K) por medio de un modelo estadístico:

$$ncADNmt(ST) \sim \beta_0 + \beta_1 \cdot \frac{n_P}{n_L}$$

En la que la estimación de  $\beta_0$  proporcionará una estimación para  $ncADNmt(L)$ , asumida constante para nuestras muestras, y estimar  $\beta_1$  proporcionará una estimación para  $K = \frac{mtDNA_P}{2}$ .

Así, la fórmula que proponemos para corregir  $mtDNA_{cn}(WB)$  es:

$$ncADNmt(L) = ncADNmt(ST) - K \cdot \frac{n_P}{n_L}$$

## Análisis estadístico

Los datos se presentan como media y desviación estándar (DE). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico R (versión 3.0.2)(121). Los coeficientes para la asociación entre leucocitos y plaquetas con  $ncADNmt(ST)$  se determinaron mediante análisis de regresión lineal. Para determinar el efecto de las plaquetas y el recuento de leucocitos en el  $ncADNmt(ST)$ , hemos construido modelos de regresión multivariante. Primero modelamos la asociación entre  $ncADNmt(ST)$  y el recuento de plaquetas, luego realizamos modelos para determinar hasta qué punto el recuento inverso de leucocitos era un factor de confusión o un modificador de efecto, para verificar si los datos empíricos coincidían con nuestro marco de formulación. Dado que nuestras 46 preparaciones se originaron a partir de 10 muestras verificamos nuestra estimación utilizando modelos de efectos mixtos multinivel: un modelo con pendiente

común y términos de intercepción aleatoria (modelo 1), uno con intercepción aleatoria correlacionada y pendiente (modelo 2) y uno con Intercepción aleatoria no correlacionada y pendiente (modelo 3). El umbral de significación estadística se estableció en  $p < 0,05$ .

Se calculó el ncADNmt(L) a partir del ncADNmt(ST) de los participantes del estudio AWHs utilizando nuestra fórmula de corrección. Describimos la media, la desviación estándar y los percentiles, así como la clasificación cruzada de los participantes en los quintiles de ambos valores. Se reporta el porcentaje de participantes que fueron clasificados en un quintil diferente por cada valor.

## Resultados

Los valores hematológicos de las muestras primarias utilizadas para el experimento estuvieron dentro de los límites normales (Tabla 4-3). En ellos, la media (desviación estándar) de ncADNmt(ST) fue de 97,22 (28,24).

Tabla 4-3. *Resultados hematológicos de muestras de sangre primaria (n = 10) que se utilizaron para las preparaciones*

|  | <b>Media</b> | <b>Desviación estándar (DE)</b> | <b>Valor mínimo</b> | <b>Valor máximo</b> |
|--|--------------|---------------------------------|---------------------|---------------------|
| <b>Leucocitos (<math>10^3/\mu\text{L}</math>)</b>            | 7.56         | 1.76                            | 5.3                 | 10.8                |
| <b>Glóbulos rojos (<math>10^6/\mu\text{L}</math>)</b>        | 4.72         | 0.38                            | 4.02                | 5.4                 |
| <b>Hemoglobina (g/dL)</b>                                    | 14.82        | 1.16                            | 13                  | 17                  |
| <b>Hematocrito (%)</b>                                       | 43.98        | 3.47                            | 38.2                | 50.3                |
| <b>Volumen celular medio (fL)</b>                            | 93.2         | 3.58                            | 88                  | 100                 |
| <b>Promedio de Células de Hemoglobina (pg)</b>               | 31.46        | 1.02                            | 29.7                | 33.3                |
| <b>Concentración de hemoglobina corpuscular media (g/dL)</b> | 33.71        | 0.27                            | 33.2                | 34                  |
| <b>Intervalo de Distribución de Eritrocitos (%)</b>          | 12.61        | 0.58                            | 11.7                | 13.4                |

ncADNmt(ST): número de copias de DNA mitocondrial en sangre total

Tabla 4-3. *Resultados hematológicos de muestras de sangre primaria (n = 10) que se utilizaron para las preparaciones (continuación)*

|   | <b>Media</b> | <b>Desviación estándar (DE)</b> | <b>Valor mínimo</b> | <b>Valor máximo</b> |
|---|--------------|---------------------------------|---------------------|---------------------|
| <b>Recuento de Plaquetas (10<sup>3</sup>/μL)</b>            | 234.1        | 38.23                           | 190                 | 295                 |
| <b>Volumen Plaquetario Medio (fL)</b>                       | 9.25         | 0.37                            | 8.6                 | 9.9                 |
| <b>Amplitud de distribución del tamaño plaquetario (fl)</b> | 15.59        | 1.2                             | 13                  | 16.5                |
| <b>Neutrófilos (%)</b>                                      | 50.22        | 5.28                            | 42.3                | 59.3                |
| <b>Linfocitos (%)</b>                                       | 39.72        | 5.08                            | 33.1                | 48.9                |
| <b>Monocitos (%)</b>  | 6.68         | 1.19                            | 4.8                 | 8.2                 |
| <b>Eosinófilos (%)</b>                                      | 2.49         | 0.59                            | 1.2                 | 3.2                 |
| <b>Basófilos (%)</b>  | 0.89         | 0.32                            | 0.6                 | 1.5                 |
| <b>Linfocitos anormales (%)</b>                             | 1.09         | 0.44                            | 0.5                 | 2                   |
| <b>Células inmaduras (%)</b>                                | 0.69         | 0.18                            | 0.4                 | 1                   |
| <b>ncADNmt(ST)</b>  | 97.22        | 28.24                           | 54.29               | 149.6               |

ncADNmt(ST): número de copias de DNA mitocondrial en sangre total

En los preparados sanguíneos suplementados con diferentes cantidades de plasma enriquecido con plaquetas (46 puntos de datos), el ncADNmt aumentó 1,01 (IC del 95%: 0,84, 1,17; p <0,001) por μl de plasma enriquecido con plaquetas (Fig. 4-1).

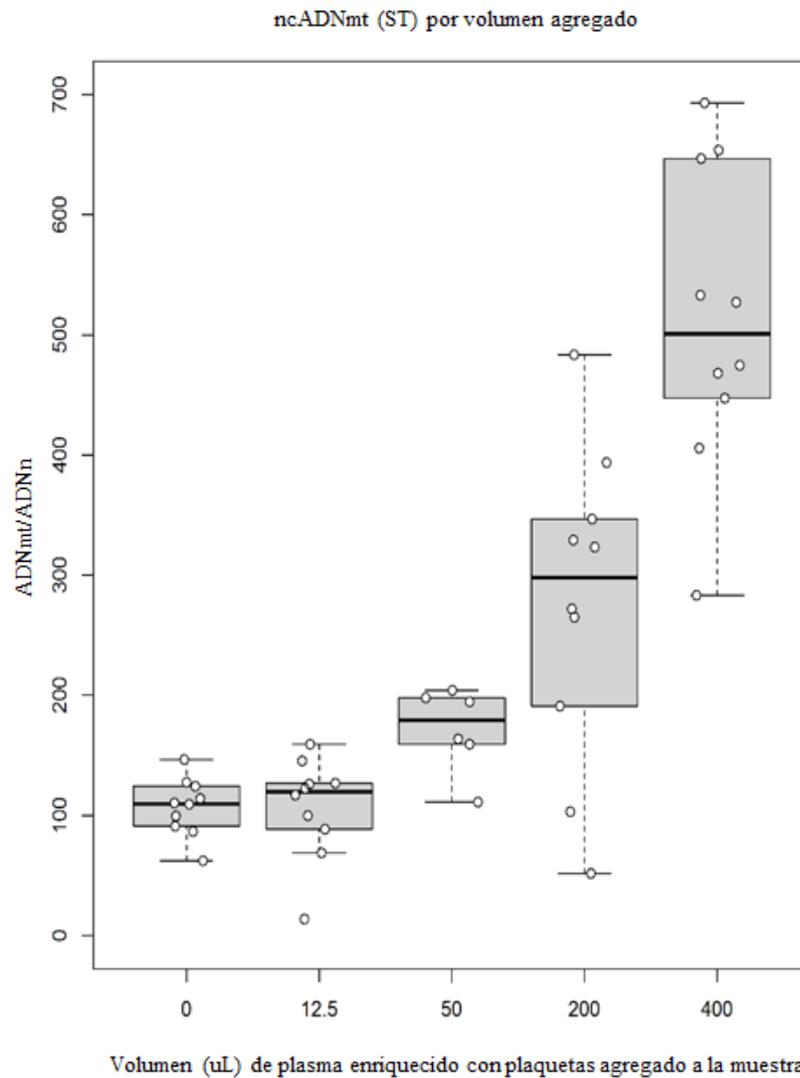


Fig 4-1. NcADNmt (ST) de preparados sanguíneos suplementados con diferentes cantidades de plasma enriquecido con plaquetas y solución salina. Todas las preparaciones combinaron 50 μl de sangre, más plasma enriquecido con plaquetas y solución salina adicional para alcanzar un volumen de 450 μl. Cada caja corresponde a una combinación diferente (p1 - p5, ver Tabla 1) y resume datos de 10 preparaciones (una de cada muestra de sangre original) excepto en p3 (50 μl de plasma enriquecido con plaquetas), que sólo resume 6 preparaciones. En total, se muestran datos de 46 preparaciones. El ncADNmt individual (ST) para cada preparación se representan como círculos blancos.

El ncADNmt (ST) aumentó 1,07 (95% IC 0,86, 1,29;  $p < 0,001$ ) por 103 plaquetas y también mostró una asociación inversa con el recuento de leucocitos (Tabla 4-4).

Tabla 4-4. *Coefficientes de modelos de regresión multivariante para ncADNmt(ST) medidas en las preparaciones de sangre (n=46)*

|  | Modelo 1 | Modelo 2 | Modelo 3 | Modelo 4 | Modelo 5 | Modelo 6 |
|--|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <b>Plaquetas<br/>(cambio por 10<sup>3</sup> plaquetas)</b>       | 1.07*    |          | 1.14*    | 1.15*    | -0.76    |          |
| <b>Leucocitos<br/>(cambio por 10<sup>3</sup> leucocitos)</b>     |          | -132.8   | -283.00* |          |          |          |
| <b>1/Leucocitos<br/>(cambio por 1/10<sup>3</sup> leucocitos)</b> |          |          |          | 225.08*  | 21.02    |          |
| <b>Plaquetas/Leucocitos<br/>(cambio por unidad de ratio)</b>     |          |          |          |          | 1.79*    | 1.10*    |

Las celdas de la tabla muestran los coeficientes de los predictores de la columna izquierda. \* p <0,001, de lo contrario p > 0,05

Modelo 1: ncADNmt(ST) modelado a partir del recuento de plaquetas

Modelo 2: ncADNmt(ST) modelado a partir del recuento de leucocitos

Modelo 3: ncADNmt(ST) modelado a partir del recuento plaquetas y leucocitos

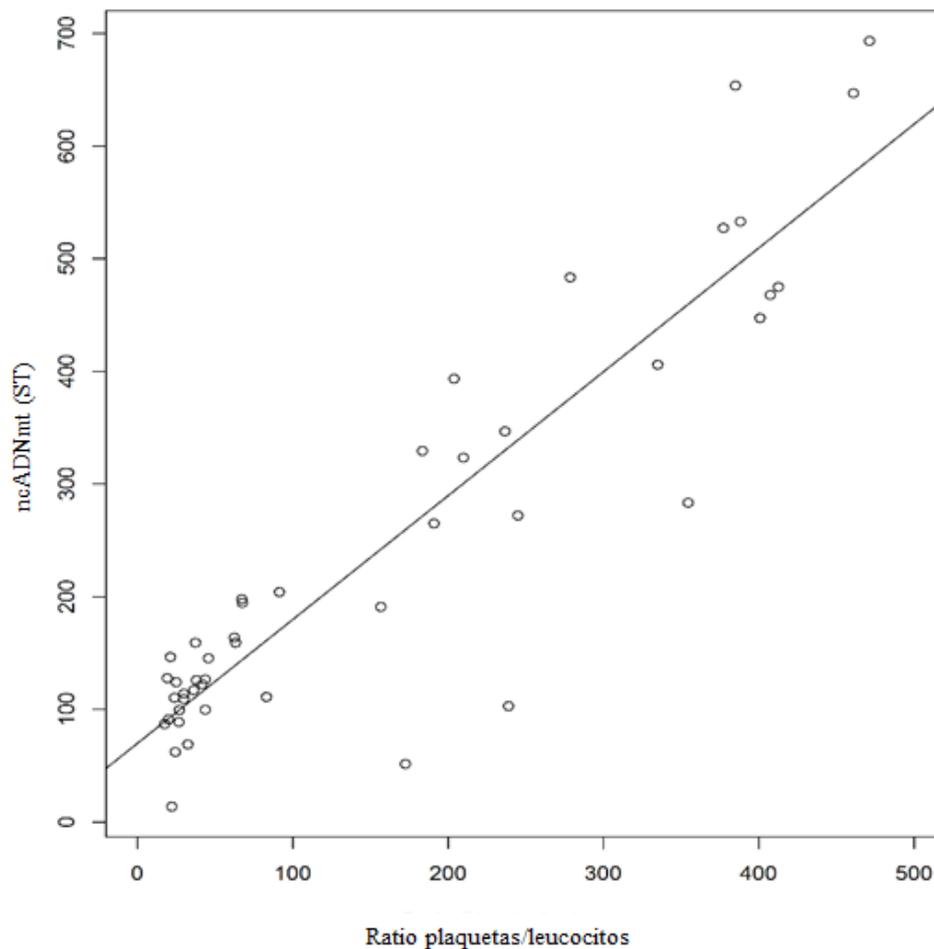
Modelo 4: ncADNmt(ST) modelado a partir del recuento plaquetas y 1/leucocitos

Modelo 5: ncADNmt(ST) modelado a partir del recuento plaquetas, 1/leucocitos y su interacción (que coincide con el término de corrección del marco de formulación)

Modelo 6: ncADNmt(ST) modelado a partir de plaquetas/leucocitos (término de corrección del marco de formulación)

ncADNmt: número de copias de ADN mitocondrial, ST: sangre total

Hemos construido modelos de regresión multivariante para evaluar la influencia de las plaquetas y leucocitos en el ncADNmt(ST), y encontramos una interacción significativa entre plaquetas y 1/leucocitos que fue el único término estadísticamente significativo en los modelos para ncADNmt(ST) (Tabla 4-4), en consonancia con el término de corrección que nuestra formulación identificó como determinante del ncADNmt(ST) (Ver marco de formulación). De acuerdo con nuestro marco de formulación, con un modelo de regresión simple (Tabla 4-3, Modelo 6) estimamos que ncADNmt(ST) cambió 1,10 (95% IC 0,95, 1,25, p <0,001) por unidad de aumento de la relación plaquetas/leucocitos (Fig. 4-2).



*Fig 4-2.* Gráfico de dispersión del cambio de ncADNmt (ST) por unidad de aumento de la relación plaquetas/leucocitos. Este diagrama de dispersión muestra el cambio de ncADNmt (ST) por unidad de aumento de la relación plaquetas/leucocitos. Se muestran datos de 46 preparaciones. El ncADNmt individual (ST) para cada preparación se representan como círculos blancos. La línea representa el ajuste de un modelo lineal (ver Tabla 3, Modelo 6). El ncADNmt (ST): número de copias del ADN mitocondrial medido en sangre total.

También estimamos esta influencia con modelos multinivel, tomando en cuenta la estructura de nuestro experimento (preparaciones derivadas de 10 muestras diferentes), y todos los modelos produjeron coeficientes similares (Tabla 4-5).

Table 4-5. Modelos multinivel de efectos mixtos para  $ncADNmt(ST)$  medidos en preparados sanguíneos ( $n=46$ ).

|   | MODELO 1          | MODELO 2          | MODELO 3          |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Criterio de información de Akaike (AIC)</b>  | 528.10            | 523.32            | 522.49            |
| <b>Cambio en el <math>ncADNmt(ST)</math> por unidad de cambio en Plaquetas/Leucocitos</b> | 1.10 (0.97, 1.22) | 1.07 (0.91, 1.23) | 1.07 (0.89, 1.25) |

MODELO 1: Pendientes común e intercepto (por muestra)

MODELO 2: Intercepto correlacionado y pendiente (por muestra)

MODELO 3: Intercepto no correlacionado y pendiente (por muestra)

$ncADNmt$ : número de copias de ADN mitocondrial, ST: sangre total

En el estudio AWHS ( $n=3389$ ), el  $ncADNmt (ST)$  fue 68,25 (SD: 15,37) siendo mayor en mujeres que en hombres y la relación plaquetas/leucocitos 33,08 (SD: 9,94) (Tabla 4-4). Después de aplicar la fórmula de corrección con un factor K de 1,1, calculado a partir del análisis anterior, el  $ncADNmt(L)$  corregido fue de 31,86 (SD: 17,6) (Tabla 4-6).

Tabla 4-6. *Distribución del recuento de Plaquetas, Leucocitos y ncADNmt(ST) en los sujetos del estudio AWHC cohort study (n=3389)*

|   | Todos (n=3389) |       |       |       |       | Hombres (n=3136) |       |        |        |        | Mujeres (n=252) |       |        |        |        |
|---|----------------|-------|-------|-------|-------|------------------|-------|--------|--------|--------|-----------------|-------|--------|--------|--------|
|   | Media          | DE    | P5    | P50   | P95   | Media            | DE    | P5     | P50    | P95    | Media           | DE    | P5     | P50    | P95    |
| <b>Recuento de Plaquetas (<math>10^3/\mu\text{L}</math>)</b>  | 231.16         | 54.68 | 152   | 227   | 324   | 229.72           | 53.9  | 152.00 | 224.00 | 322.00 | 248.97          | 61.04 | 152.40 | 247.50 | 354.00 |
| <b>Recuento de Leucocitos (<math>10^3/\mu\text{L}</math>)</b> | 7.34           | 1.96  | 4.74  | 7.00  | 11.00 | 7.37             | 1.95  | 4.80   | 7.10   | 11.00  | 7.05            | 2.03  | 4.40   | 6.80   | 11.10  |
| <b>Plaquetas/Leucocitos</b>                                   | 33.08          | 9.94  | 19.20 | 31.88 | 51.55 | 32.74            | 9.75  | 19.17  | 31.62  | 50.63  | 37.32           | 11.21 | 20.55  | 36.85  | 57.24  |
| <b>ncADNmt(ST)</b>  | 68.25          | 15.37 | 46.54 | 66.43 | 95.54 | 67.97            | 15.35 | 46.50  | 66.14  | 95.16  | 71.68           | 15.32 | 47.46  | 71.48  | 99.54  |
| <b>ncADNmt(L)</b>   | 31.86          | 17.6  | 5.37  | 31.06 | 60.84 | 31.96            | 17.59 | 5.37   | 31.06  | 60.86  | 30.63           | 17.75 | 5.35   | 30.73  | 59.64  |

ncADNmt: número de copias de ADN mitocondrial, ST: sangre total, L: leucocitos, DE: desviación estandar, P5: percentil 5, P50: percentil 50, P95: percentil 95

Además, el quintil del ncADNmt de cada participante es diferente dependiendo de si se usa el valor ST o L (Tabla 4-7).

Tabla 4-7. Reclasificación de los participantes del estudio de cohorte AWHs ( $n=3389$ ) entre quintiles ncADNmt(ST) y quintiles ncADNmt(L).

| Quintiles<br>ncADNmt(ST)  | Quintiles ncADNmt(L)     |                      |                      |                      |                              |
|---------------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|------------------------------|
|                           | (Inferior,17.6]<br>n=678 | (17.6,27.2]<br>n=678 | (27.2,35.2]<br>n=677 | (35.2,45.4]<br>n=678 | (45.4,<br>Superior]<br>n=678 |
| (Inferior,55.6]<br>n=678  | 375                      | 221                  | 72                   | 10                   | 0                            |
| (55.6,62.9]<br>n=678      | 175                      | 220                  | 189                  | 93                   | 1                            |
| (62.9,70.3]<br>n=677      | 89                       | 130                  | 230                  | 188                  | 40                           |
| (70.3,79.7]<br>n=678      | 31                       | 80                   | 140                  | 258                  | 169                          |
| (79.7, Superior]<br>n=678 | 8                        | 27                   | 46                   | 129                  | 468                          |

De hecho, el 54% de los participantes se clasifican en un quintil diferente por cada medida (aunque sólo el 15% se clasifican en quintiles más alejados que el vecino), sugiriendo que cada parámetro transmite información diferente y, dado el procedimiento utilizado para calcular ncADNmt(L), suponemos que esta medida será menos dependiente de los parámetros hematológicos.

## Discusión

En nuestro estudio, el ncADNmt se midió en sangre entera como la relación entre ADNmt y ADNn utilizando reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) para estudiar la influencia del recuento de plaquetas en el ncADNmt. Se compararon cinco conjuntos de preparaciones de sangre artificial con diferentes concentraciones plaquetarias y se observó que el ADNmt no dependía solamente del recuento de plaquetas sino también de la relación plaquetas/leucocitos.

Se encontró una influencia significativa de la cantidad de plaquetas en la cuantificación del ncADNmt. De forma similar, Banas y cols.(122) y Andreu y cols.(123) encontraron valores significativamente diferentes cuando se midió el ncADNmt en sangre total con respecto a las mediciones realizadas en PBMCs y capa leucocitaria. Urata y cols.(111) mostraron que la contaminación plaquetaria, una limitación técnica de la separación de PBMCs, causó grandes errores de sobreestimación y actuó como una fuente de variación: el promedio  $\pm$  SD del ncADNmt medido en 11 muestras de PBMC disminuyó de  $269 \pm 51$  a  $146 \pm 14$  después de la depleción de plaquetas.

La principal fortaleza en nuestro estudio con respecto a enfoques anteriores (110,111,122,123) y a los problemas derivados de la presencia de plaquetas en sangre total es que nosotros introdujimos el recuento de leucocitos como un factor esencial para tener en cuenta para la determinación del ncADNmt en sangre total. Respecto a la contaminación de las muestras de PBMC con plaquetas, Timmermans y cols. (108) destacaron que cuando el número de plaquetas contaminantes supera cinco veces el número de células en la muestra, el ncADNmt medido difiere de la lectura en las muestras puras de PBMC. El experimento añadió plaquetas a PBMC en relaciones fijas y siguió la descripción de un umbral razonable para la contaminación. El enfoque enfatizó que el recuento de leucocitos desempeña un papel en el sesgo introducido por las plaquetas. Ese umbral para ignorar la influencia de las plaquetas no es una opción para las mediciones basadas en sangre total donde las plaquetas son generalmente 30 veces el número de leucocitos. Por tanto, se necesita una fórmula de corrección para el sesgo producido por las plaquetas en las mediciones del ncADNmt de sangre total.

Knez y cols. (124) midieron el ncADNmt en capa leucocitaria en una muestra poblacional para describir las correlaciones con las variables clínicas. Este estudio

encontró que después de ajustar por edad y sexo, las variables clínicas más destacadas que se correlacionaron con el ncADNmt fueron el recuento de plaquetas y leucocitos, este último con una relación inversa. Los autores concluyeron que los futuros estudios epidemiológicos deberían ajustarse a estas variables. No obstante, en ese estudio el recuento de leucocitos se interpretó como una medida de la inflamación sistémica que en consecuencia abrió preguntas sobre la asociación de la inflamación con ncADNmt. Esto justifica la necesidad urgente de aclarar la naturaleza de ncADNmt(ST) versus la de ncADNmt(L) y proporcionar medios para factorizar las asociaciones que surgen puramente de la composición sanguínea, como nuestra fórmula propuesta.

El ncADNmt se ha analizado en sangre total en varias situaciones clínicas: las enfermedades crónicas como el cáncer de mama, la diabetes mellitus o la enfermedad de Huntington se asociaron con la disminución del ADNmt(106,118,125), mientras que otros como los linfomas no Hodgkin se asociaron con el aumento del ADNmt(116,117). Es esencial discriminar si las asociaciones clínicas encontradas en estudios realizados en sangre total dependen de verdaderas modificaciones del ADNmt(L) o de las modificaciones hematológicas que pueden estar asociadas con cada enfermedad. Dado que en los estudios epidemiológicos una de las muestras más disponibles es la de sangre total, hemos propuesto una fórmula de corrección con el fin de estimar el ncADNmt(L) a partir del ncADNmt(ST). Aplicamos esta corrección a los datos del estudio AWHS, mostrando que el ncADNmt(ST) es hasta el doble del ncADNmt(L) calculado. Esta relación de diferencias es similar a la reportada por Andreu y cols.(123) y Urata y cols.(111). Este último también describió una disminución en la variabilidad del ncADNmt, que no observamos, pero el estudio de Urata se basó en 11 muestras mientras que nuestra corrección fue aplicada en el estudio AWHS con más de 3 mil sujetos. Por

otra parte, varios estudios reportaron diferencias en el número de copias de ADNmt entre mujeres y hombres. Lee y cols.(126) mostraron mayor número de copias de ADNmt en sangre periférica en mujeres jóvenes sanas en comparación con hombres. Recientemente, Knez y cols.(124) reportaron la misma diferencia entre ambos sexos en la población general usando capa leucocitaria sin depleción plaquetaria. De acuerdo con nuestros hallazgos, estas diferencias podrían explicarse en parte por las diferencias hematológicas por sexo, como por ejemplo las mujeres tienen un mayor número de plaquetas(127) y futuros análisis de estas diferencias por sexo en el ADNmt podrían ser aclarados teniendo en cuenta las variables hematológicas.

Además de esta fórmula que permite la corrección de la presencia de plaquetas en la muestra original, hay varios aspectos que todavía necesitan ser estandarizados en la técnica de medición de ncADNmt. Actualmente, los métodos para la cuantificación del ncADNmt varían según los laboratorios y existen varios factores preanalíticos y analíticos que pueden afectar la medición final: conservación de la muestra antes de la extracción de ADN, tiempo entre extracción de sangre y separación celular, anticoagulante usado, y método de cuantificación del ADN(123). Hasta que se logre la estandarización de estas variables, se deben establecer valores de referencia para cada protocolo de medición y los resultados del estudio deben compararse y combinarse únicamente con extrema precaución.

El diseño experimental permitió comparar varias concentraciones de plaquetas en preparaciones derivadas de sangre del mismo sujeto factorizando la variabilidad biológica en gran medida. Por lo tanto, la mayor parte de la variación observada podría considerarse variación técnica. Así mismo, el tamaño de la muestra es 46, con datos para 5 condiciones experimentales con 10 réplicas (preparaciones) para casi cada condición. Estos resultados

son un punto de partida para ampliar aún más este conocimiento que requerirá medir también la variación natural en las plaquetas y los recuentos de leucocitos y ncADNmt. Esas mediciones necesitarán la evaluación de una muestra más grande, así como mediciones dobles de ncADNmt en leucocitos y/o PBMCs y sangre total. Este trabajo tiene también algunas limitaciones: nuestra fórmula estima ncADNmt en los leucocitos de sangre como un todo, que incluyen PBMCs y granulocitos y debido a que las estimaciones no pueden interpretarse como un reemplazo directo de ncADNmt derivadas de PBMCs. No se realizó la extracción paralela de leucocitos y/o PBMCs, lo que habría proporcionado más detalles a este respecto. Además, la extracción de ADN se realizó a partir de las preparaciones, que no eran sangre regular, sino 1/9 diluciones (Tabla 4-1), pero es poco probable que haya afectado los resultados ya que el ADN se normalizó después de la extracción. La gama de plaquetas/leucocitos en las preparaciones artificiales se extendió de 20 a 450, mientras que el rango fisiológico normal de esta proporción sólo incluye la cola inferior de ese intervalo. Finalmente, el estudio de AWHs no extrajo muestras de leucocitos y/o PBMCs de modo que sólo pudimos estimar el beneficio potencial en la corrección del sesgo usando nuestra fórmula propuesta, pero no verificamos la fórmula misma.

## **Conclusiones**

En conclusión, los recuentos de plaquetas y leucocitos de la muestra son importantes para comparar el contenido de ADNmt entre diferentes pacientes cuando el número de copias de ADNmt se estima a partir de sangre total. El hecho de no tener en cuenta la relación plaquetaria/leucocitos puede conducir a una sobreestimación del contenido de ADNmt provenientes de leucocitos y la clasificación errónea, lo que puede ocultar el significado de su variación, ya que el valor no corregido depende de las

diferencias hematológicas hasta un grado no ignorable. Proponemos una fórmula de corrección que se puede utilizar para mitigar este problema. Los coeficientes de esta fórmula no son definitivos y la investigación futura ayudará a refinarlos y validarlos.

**CAPITULO V. LDL oxidada asociada al síndrome metabólico independientemente de la obesidad central y la resistencia a la insulina**

## Resumen

Este estudio evalúa si el estrés oxidativo, que utiliza LDL oxidada (LDL-ox) como proxy, se asocia con el síndrome metabólico (SM), o si la LDL-ox media la asociación entre la obesidad central y el SM o si la resistencia a la insulina media la asociación entre LDL-ox y SM. Se examinaron los datos de 3987 sujetos no diabéticos pertenecientes al estudio Progression of Early Subclinical Atherosclerosis (PESA). Los resultados mostraron, que para el 2º, 3º y 4º cuartil de LDL-ox versus el 1º, las odds ratios (intervalo de confianza del 95%) para SM fueron 0,84 (0,52, 1,36), 1,47 (0,95, 2,32) y 2,57 (1,66, 4,04) ( $p < 0,001$  para la tendencia) ajustado por edad, sexo, tabaquismo, colesterol LDL, índice de masa corporal, perímetro de cintura y resistencia a insulina. Se encontraron resultados que muestran la misma tendencia para todos los componentes de SM excepto la concentración de glucosa. Se evidenció que LDL-ox media el 13,9% de la asociación del perímetro de cintura con los triglicéridos y sólo 1-3% de la asociación con HDL-colesterol, la presión arterial, y la concentración de insulina. HOMA-IR no media la asociación entre LDL-ox y los componentes SM. En este estudio, las concentraciones de LDL-ox más altas se asociaron con SM y sus componentes independientemente de la obesidad central y la resistencia a la insulina. LDL-ox puede reflejar mecanismos básicos a través de los cuales los componentes del SM se desarrollan y progresan en paralelo con la resistencia a la insulina y podrían ser un predictor clínicamente relevante del desarrollo de SM.

## Introducción

El aumento del estrés oxidativo es la consecuencia de un desequilibrio entre los agentes biológicos oxidantes y antioxidantes y puede provocar daños en las biomoléculas, incluidas las proteínas, los ácidos nucleicos y los lípidos. Algunas de estas biomoléculas dañadas se han utilizado como biomarcadores de estrés oxidativo, tales como las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL-ox)(8), que pueden medirse a partir de una muestra sanguínea regular.

Se ha descrito que el estrés oxidativo está implicado en la fisiopatología de varias enfermedades crónicas(30,128) y se ha relacionado con el síndrome metabólico(SM), definido como un grupo de factores de riesgo para la enfermedad cardiovascular que incluye obesidad central, presión arterial elevada, glucosa en ayunas elevada y dislipidemia(23,28,129,130). Una característica común de la dislipidemia asociada al SM es la elevación de las partículas pequeñas y densas de lipoproteínas de baja densidad (LDL), que se oxidan fácilmente(131). Además, altos niveles de LDL-ox están asociados con resistencia a la insulina(67), que está estrechamente ligada a la patogénesis del SM(132). La resistencia a la insulina puede surgir de la activación por estrés oxidativo de las cascadas de señalización de quinasa que fosforilan los receptores de insulina, afectando la acción de la insulina(133); pero también se relaciona con la correlación entre la glucosa plasmática y la susceptibilidad de LDL a la oxidación(134). De hecho, altas concentraciones de glucosa pueden incluso inducir oxidación de LDL(135,136). Además, la obesidad es el principal origen del SM y está involucrado en la inducción del estrés oxidativo(137), que a su vez puede contribuir al desarrollo del SM(138).

Sin embargo, ningún estudio previo ha analizado con detalle qué elementos median las asociaciones entre la obesidad, el estrés oxidativo, la resistencia a la insulina

y SM en humanos. Usando los datos del estudio “Progression of Early Subclinical Atherosclerosis (PESA) study”(91), que cuenta con un tamaño de muestra lo suficientemente grande como para tratar asociaciones sutiles, este estudio tiene como objetivo evaluar 1) si el estrés oxidativo, utilizando LDL-ox como un proxy, se asocia con SM, 2) si LDL-ox media la asociación entre obesidad central y SM, y 3) si la resistencia a la insulina media la asociación entre LDL-ox y SM (Figura 5-1).

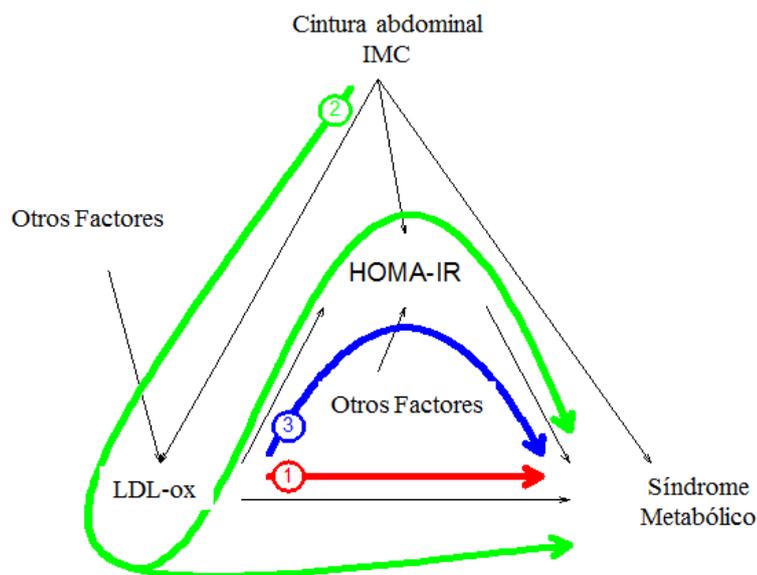


Figura 5-1. Marco causal e hipótesis de estudio. Gráfico acíclico dirigido que muestra las posibles vías causales que unen obesidad, LDL-ox, resistencia a la insulina y síndrome metabólico. Las flechas negras indican posibles relaciones directas basadas en teorías anteriores. Las líneas numeradas y coloreadas indican las vías hipotéticas y probadas en cada objetivo del presente estudio. Línea roja (Hipótesis # 1) Asociación de LDL-ox con síndrome metabólico independientemente de la obesidad y la resistencia a la insulina. Línea verde (Hipótesis # 2) LDL-ox como mediador de la asociación entre la obesidad y el síndrome metabólico. Línea azul (Hipótesis # 3) Resistencia a la insulina como mediador de la asociación entre LDL-ox y síndrome metabólico.

## **Materiales y Métodos**

### **Diseño de estudio y población**

Utilizamos los datos basales del estudio PESA(91), un estudio de cohorte prospectivo destinado a evaluar los factores de riesgo cardiovasculares tradicionales y novedosos y la aterosclerosis en los territorios carotídeo, aórtico, coronario e iliofemoral utilizando técnicas de imágenes no invasivas accesibles(139) en mujeres y hombres asintomáticos (40-54 años) del Banco Santander de Madrid (España) que no presentaban aterosclerosis clínica al ser incluidos en el estudio. Todos los participantes fueron reclutados entre los años 2010 y 2013. El estudio PESA fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Salud Carlos III de Madrid, el protocolo del estudio se llevó a cabo de acuerdo con las directrices de la Declaración de Helsinki y todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito. De una muestra inicial de 4117 participantes, se excluyeron 82 con diabetes, 2 con datos de LDL-ox faltantes y 46 sin registro de tabaquismo. Los datos fueron completos para todas las otras variables relevantes. La muestra analítica final incluyó 3987 individuos.

### **Colección de datos**

Los datos se obtuvieron a partir de entrevistas clínicas estructuradas y cuestionarios, un examen físico y una muestra de sangre en ayunas. Con el paciente de pie, se midió el perímetro de cintura abdominal a la altura de un punto medio entre la cresta ilíaca y el borde costal. El peso se midió sin zapatos y con ropa ligera con aproximación a 0,1 kg. La altura se midió con una aproximación de 0,1 cm, sin zapatos y con los participantes de pie de espaldas al estadiómetro. El índice de masa corporal (IMC) se calculó como el peso dividido por la altura al cuadrado ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ); el sobrepeso se definió

como IMC entre 25 y 30, y la obesidad como  $IMC \geq 30$ (140). La presión sanguínea se calculó como la media de tres mediciones consecutivas realizadas con un esfigmomanómetro OMRON HEM-907 (OMRON Healthcare Co. Ltd., Kyoto, Japón) oscilométrico automático, que ha sido validado de acuerdo con los protocolos internacionales(141); los participantes se sentaron durante 5 minutos antes de que se hicieran las mediciones, y se hicieron lecturas de presión sanguínea a intervalos de 1 minuto. Todos los procedimientos fueron certificados (ISO-9001).

### **Medidas de laboratorio**

Se colectó sangre venosa periférica después de un ayuno de 8 horas. Para medir los niveles plasmáticos de LDL-ox y se utilizó el test de ELISA basado en anticuerpos monoclonales 4E6 (MercoDIA AB, Suecia). El anticuerpo monoclonal 4E6 está dirigido contra un epítipo conformacional en la apoB-100 del LDL que se genera como consecuencia de la sustitución de residuos de lisina de apoB-100 por aldehídos. La hemoglobina glicada (HbA1c) en sangre total se midió mediante cromatografía de intercambio catiónico de fase inversa y cuantificación colorimétrica de doble longitud de onda (BIORAD D-10, Sistema de Prueba de Hemoglobina D-10™). Los triglicéridos, el colesterol total, el colesterol HDL y la glucosa se midieron en suero con ensayos espectrofotométricos en el analizador Architect-Ci8200, utilizando los kits del fabricante (Laboratorio de Instrumentación). La insulina se determinó en el mismo analizador por inmunoensayo de quimioluminiscencia. El colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-colesterol) se calculó a partir de la ecuación de Friedewald(142)

## **Síndrome metabólico y Resistencia a la insulina**

Según la definición de armonización de 2009(143), el SM se diagnosticó cuando los participantes cumplían al menos 3 de los 5 criterios siguientes: perímetro de cintura abdominal elevada ( $\geq 102$  cm en hombres y  $\geq 88$  cm en mujeres), triglicéridos elevados ( $\geq 1,7$  mmol/L, es decir, 150 mg/dL), bajos niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL-colesterol) ( $< 1,0$  mmol/L, es decir,  $< 40$  mg/dL en hombres y  $< 1,3$  mmol/L, es decir  $< 50$  mg/dL en mujeres), presión arterial alta ( $\geq 130/85$  mmHg o tratamiento con medicación antihipertensiva) y glucosa en ayunas elevada ( $\geq 5,6$  mmol/L, es decir,  $\geq 100$  mg/dl, o tratamiento farmacológico para glucosa elevada). HOMA-IR (modelo homeostático - resistencia a la insulina) se calculó como glucosa (mg/dL) multiplicada por insulina ( $\mu\text{U/mL}$ ) y dividida por 405(144). Resistencia a la insulina fue definida como HOMA-IR  $\geq 2.6$ (145).

### **Análisis estadístico**

Las diferencias de medias ajustadas en las variables metabólicas a través de los cuartiles de LDL-ox se calcularon mediante análisis de regresión lineal. Se estimaron los odds ratios (OR) y su intervalo de confianza (IC) del 95% con modelos lineales generalizados para cuantificar la asociación de cuartiles de LDL-ox con la presencia de SM, sus componentes, resistencia a la insulina y clusters metabólicos. Se utilizó el primer cuartil de LDL-ox como grupo de referencia. El modelo básico se ajustó por edad (continua), sexo, tabaquismo y colesterol LDL (continuo); decidimos incluir el colesterol LDL en el modelo básico de ajuste porque está fuertemente asociado con LDL-ox. El modelo completo fue ajustado por las variables del modelo básico más HOMA-IR (transformado a logaritmo), IMC (continuo), y perímetro de cintura abdominal (continua). Modelos incluyendo LDL-ox como una variable continua se utilizaron para

evaluar tendencia lineal y para realizar un análisis de mediación con técnicas de reentrada. Como el modelo completo incluyó el perímetro de cintura abdominal (una de las variables utilizadas en la definición de SM), también evaluamos la asociación de LDL-ox con grupos de componentes no antropométricos del SM:  $\geq 2$  ó  $\geq 3$  criterios para SM distinta del perímetro de cintura elevada. Se utilizó un análisis de mediación para analizar hasta qué punto la LDL-ox explica la asociación de la obesidad central (medida por perímetro de cintura) con los componentes del SM y el grado en que HOMA-IR media el efecto de LDL-ox en los valores de los componentes de SM. El efecto directo medio, el efecto medio de mediación causal y la proporción de efecto mediada con respecto al efecto total se estimaron mediante un bootstrap no paramétrico con 1000 reentradas e intervalos de confianza basados en percentiles(146).

Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con  $p < 0,05$ . Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico R(versión 3.1)(121) y el paquete de mediación(146).

## Resultados

Los participantes del estudio PESA incluidos en estos análisis ( $n = 3987$ ) tuvieron una edad media de 45,7 (4,2) y el 62,4% fueron hombres. En total, el 9,9% de los participantes tenían SM, el 8,2% tenían resistencia a la insulina, el 44,3% tenían sobrepeso y el 14,0% eran obesos (Tabla 5-1). La concentración media LDL-ox fue 51,8 (17,0) U/L. Casi la mitad de los individuos con SM eran resistentes a la insulina, en comparación con menos del 5% de los que fueron clasificados como sin SM (Tabla 5-1).

Tabla 5-1. *Características de los participantes del estudio.*

|                                       | <b>Total</b> | <b>Con Síndrome Metabólico</b> | <b>Sin Síndrome Metabólico</b> | <b>Valor p</b> |
|---------------------------------------|--------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------|
|                                       | N=3987       | N=393<br>9.9%                  | N=3594<br>90.1%                |                |
| Masculino                             | 62.4 [2488]  | 85.5 [336]                     | 59.9 [2152]                    | <0.001         |
| Edad (años)                           | 45.7 (4.2)   | 47.6 (4.1)                     | 45.5 (4.2)                     | <0.001         |
| IMC (kg/m <sup>2</sup> )              | 26.1 (3.8)   | 30.9 (3.5)                     | 25.5 (3.4)                     | <0.001         |
| Circunferencia cintura abdominal (cm) | 89.1 (11.9)  | 104.5 (9.3)                    | 87.4 (10.9)                    | <0.001         |
| Triglicéridos (mg/dL)                 | 93.4 (54.5)  | 157.4 (79.7)                   | 86.4 (45.9)                    | <0.001         |
| HDL-c (mg/dL)                         | 49.2 (12.2)  | 38.5 (7.3)                     | 50.4 (12.0)                    | <0.001         |
| Colesterol Total (mg/dL)              | 200.7 (33.0) | 209.8 (36.1)                   | 199.7 (32.5)                   | <0.001         |
| LDL-c (mg/dL)                         | 132.6 (29.6) | 139.6 (31.4)                   | 131.9 (29.3)                   | <0.001         |
| Presión sistólica (mmHg)              | 116.0 (12.4) | 129.1 (13.0)                   | 114.6 (11.5)                   | <0.001         |
| Presión diastólica (mmHg)             | 72.4 (9.4)   | 82.7 (9.4)                     | 71.2 (8.7)                     | <0.001         |
| Glucosa en ayunas (mg/dL)             | 89.4 (8.7)   | 99.7 (9.1)                     | 88.3 (7.9)                     | <0.001         |
| Insulina (pmol/L)                     | 5.9 (3.5)    | 10.9 (4.9)                     | 5.4 (2.9)                      | <0.001         |
| HOMA-IR                               | 1.3 (0.9)    | 2.7 (1.3)                      | 1.2 (0.7)                      | <0.001         |
| Hemoglobina A1c (%)                   | 5.4 (0.4)    | 5.6 (0.4)                      | 5.4 (0.4)                      | <0.001         |
| LDL-ox (U/L)                          | 51.8 (17.0)  | 61.4 (19.5)                    | 50.7 (16.3)                    | <0.001         |
| Resistencia a Insulina                | 8.2 [328]    | 44.5 [175]                     | 4.3 [153]                      | <0.001         |
| Obesidad                              | 14.0 [560]   | 56.2 [221]                     | 9.4 [339]                      | <0.001         |
| Sobrepeso                             | 44.3 [1765]  | 39.4 [155]                     | 44.8 [1610]                    | 0.048          |
| Tabaquismo                            | 28.2 [1123]  | 30.5 [120]                     | 27.9 [1003]                    | 0.298          |

Los datos se presentan como media (desviación estándar) o porcentaje [recuento]. IMC: Índice de masa corporal. HDL-c: Colesterol de Lipoproteína de Alta Densidad. LDL-c: Colesterol de Lipoproteína de Baja Densidad. HOMA-IR: Valoración del Modelo Homeostático-Resistencia a la Insulina. LDL-ox: Lipoproteína de Baja Densidad Oxidada. La hemoglobina A1c media fue de 36 mmol/mol para toda la muestra y para el grupo de sin síndrome metabólico, y de 38 mmol/mol para las personas con síndrome metabólico, todas las desviaciones estándar fueron 4,4 mmol/mol.

Después de ajustar por edad, sexo, tabaquismo y colesterol LDL, la LDL-ox se asoció con un mayor IMC y perímetro de la cintura abdominal, triglicéridos, colesterol total, presión arterial, insulina, HOMA-IR y HbA1c y con menores valores de colesterol HDL. Además, estas asociaciones siguieron siendo significativas después de ajustar adicionalmente por HOMA-IR, IMC y perímetro de cintura abdominal (Tabla 5-2). Después del ajuste por perímetro de cintura, no hubo asociación positiva entre el LDL-ox y el IMC (Tabla 5-2 y Tabla 5-3, modelos 4 y 6). De manera similar, después de ajustar las variables antropométricas, la asociación entre LDL-ox y HOMA-IR disminuyó sustancialmente, llegando incluso a ser no significativa (Tabla 5-2 y Tabla 5-3, modelos 3, 4 y 7).

Tabla 5-2. Medias y diferencias ajustadas (intervalo de confianza del 95%) en los parámetros relacionados con el síndrome metabólico (comparación de los tres cuartiles de LDL-ox más altos con el primer cuartil)

|  | Cuartiles de LDL-ox, U/L |              |              |                  | Valor p de tendencia |
|--|--------------------------|--------------|--------------|------------------|----------------------|
|  | [Inferior,39.9]          | (39.9,49.4]  | (49.4,60.8]  | (60.8, Superior] |                      |
| N  | 997                      | 997          | 996          | 997              |                      |
| <b>Media LDL-ox, U/L</b>                         | 33.06                    | 44.72        | 54.69        | 74.64            |                      |
| <b>Índice de masa corporal, kg/m<sup>2</sup></b> | <b>24.93</b>             | <b>25.58</b> | <b>26.41</b> | <b>27.37</b>     |                      |
| Modelo básico                                    | 0.00                     | 0.23         | 0.61         | 1.03             | <0.001               |
|  | (Referencia)             | (-0.07,0.53) | (0.29,0.93)  | (0.68,1.39)      |                      |
| Modelo completo *                                | 0.00                     | -0.02        | -0.04        | -0.20            | 0.02                 |
|  | (Referencia)             | (-0.17,0.14) | (-0.20,0.13) | (-0.38,-0.02)    |                      |
| <b>Perímetro cintura abdominal, cm</b>           | <b>84.72</b>             | <b>87.15</b> | <b>90.20</b> | <b>94.20</b>     |                      |
| Modelo básico                                    | 0.00                     | 0.86         | 2.12         | 3.91             | <0.001               |
|  | (Referencia)             | (0.04,1.68)  | (1.25,2.99)  | (2.94,4.87)      |                      |
| Modelo completo *                                | 0.00                     | 0.42         | 0.76         | 1.43             | <0.001               |
|  | (Referencia)             | (0.01,0.82)  | (0.33,1.19)  | (0.95,1.91)      |                      |

Las líneas en negrita son las medias no ajustadas. Las diferencias se estimaron a partir de modelos de regresión lineal ajustados por edad, sexo, tabaquismo y colesterol LDL (modelo básico), y además por HOMA-IR (log), índice de masa corporal y perímetro de cintura (modelo completo). \* En estas regresiones se excluyó la variable resultado de las variables de ajuste. La hemoglobina A1c media fue de 34,6, 35,2, 35,9 y 36,1 mmol/mol para los cuartiles 1 ° a 4 ° de LDL-ox, respectivamente. Las diferencias expresadas en mmol/mol fueron aproximadamente 10 veces las cifras de la tabla.

Tabla 5-2. *Medias y diferencias ajustadas (intervalo de confianza del 95%) en los parámetros relacionados con el síndrome metabólico (comparación de los tres cuartiles de LDL-ox más altos con el primer cuartil) (continuación)*

|                                 | Cuartiles de LDL-ox, U/L |               |               |                  | Valor p de tendencia |
|---------------------------------|--------------------------|---------------|---------------|------------------|----------------------|
|                                 | [Inferior,39.9]          | (39.9,49.4]   | (49.4,60.8]   | (60.8, Superior] |                      |
| <b>Triglicéridos, mg/dL</b>     | <b>71.87</b>             | <b>82.64</b>  | <b>95.22</b>  | <b>123.97</b>    |                      |
| Modelo básico                   | 0.00                     | 8.41          | 17.48         | 42.47            | <0.001               |
|                                 | (Referencia)             | (4.06,12.76)  | (12.87,22.08) | (37.36,47.59)    |                      |
| Modelo completo *               | 0.00                     | 8.99          | 16.47         | 38.20            | <0.001               |
|                                 | (Referencia)             | (4.91,13.07)  | (12.14,20.80) | (33.37,43.03)    |                      |
| <b>HDL-colesterol, mg/dL</b>    | <b>52.17</b>             | <b>50.46</b>  | <b>48.74</b>  | <b>45.56</b>     |                      |
| Modelo básico                   | 0.00                     | -1.08         | -1.78         | -3.75            | <0.001               |
|                                 | (Referencia)             | (-2.04,-0.13) | (-2.80,-0.77) | (-4.88,-2.63)    |                      |
| Modelo completo *               | 0.00                     | -1.04         | -1.31         | -2.55            | <0.001               |
|                                 | (Referencia)             | (-1.94,-0.13) | (-2.28,-0.35) | (-3.62,-1.47)    |                      |
| <b>Colesterol Total, mg/dL</b>  | <b>178.75</b>            | <b>191.46</b> | <b>206.37</b> | <b>226.16</b>    |                      |
| Modelo básico                   | 0.00                     | 0.59          | 1.71          | 4.75             | <0.001               |
|                                 | (Referencia)             | (-0.51,1.70)  | (0.54,2.89)   | (3.44,6.05)      |                      |
| Modelo completo *               | 0.00                     | 0.76          | 1.98          | 5.10             | <0.001               |
|                                 | (Referencia)             | (-0.35,1.86)  | (0.80,3.15)   | (3.79,6.41)      |                      |
| <b>LDL-colesterol, mg/dL</b>    | <b>112.05</b>            | <b>124.34</b> | <b>138.44</b> | <b>155.65</b>    |                      |
| Modelo básico                   | 0.00                     | 11.64         | 25.18         | 41.83            | <0.001               |
|                                 | (Referencia)             | (9.48,13.81)  | (22.99,27.37) | (39.59,44.06)    |                      |
| Modelo completo *               | 0.00                     | 11.65         | 24.84         | 40.93            | <0.001               |
|                                 | (Referencia)             | (9.49,13.81)  | (22.65,27.03) | (38.67,43.19)    |                      |
| <b>Presión Sistólica, mmHg</b>  | <b>112.80</b>            | <b>114.50</b> | <b>117.16</b> | <b>119.72</b>    |                      |
| Modelo básico                   | 0.00                     | 0.40          | 1.72          | 2.57             | <0.001               |
|                                 | (Referencia)             | (-0.56,1.36)  | (0.70,2.74)   | (1.45,3.70)      |                      |
| Modelo completo                 | 0.00                     | 0.27          | 1.20          | 1.50             | <0.001               |
|                                 | (Referencia)             | (-0.64,1.19)  | (0.23,2.17)   | (0.41,2.58)      |                      |
| <b>Presión Diastólica, mmHg</b> | <b>69.95</b>             | <b>71.25</b>  | <b>73.15</b>  | <b>75.09</b>     |                      |
| Modelo básico                   | 0.00                     | 0.37          | 1.39          | 2.27             | <0.001               |
|                                 | (Referencia)             | (-0.40,1.15)  | (0.57,2.21)   | (1.36,3.18)      |                      |
| Modelo completo                 | 0.00                     | 0.22          | 0.81          | 1.08             | 0.001                |
|                                 | (Referencia)             | (-0.49,0.93)  | (0.05,1.57)   | (0.23,1.92)      |                      |

Las líneas en negrita son las medias no ajustadas. Las diferencias se estimaron a partir de modelos de regresión lineal ajustados por edad, sexo, tabaquismo y colesterol LDL (modelo básico), y además por HOMA-IR (log), índice de masa corporal y perímetro de cintura (modelo completo). \* En estas regresiones se excluyó la variable resultado de las variables de ajuste. La hemoglobina A1c media fue de 34,6, 35,2, 35,9 y 36,1 mmol/mol para los cuartiles 1 ° a 4 ° de LDL-ox, respectivamente. Las diferencias expresadas en mmol/mol fueron aproximadamente 10 veces las cifras de la tabla.

Tabla 5-2. Medias y diferencias ajustadas (intervalo de confianza del 95%) en los parámetros relacionados con el síndrome metabólico (comparación de los tres cuartiles de LDL-ox más altos con el primer cuartil) (continuación)

|                                 | Cuartiles de LDL-ox, U/L |                        |                        |                       | Valor p de tendencia |
|---------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|
|                                 | [Inferior,39.9]          | (39.9,49.4]            | (49.4,60.8]            | (60.8, Superior]      |                      |
| <b>Glucosa en ayunas, mg/dL</b> | <b>87.94</b>             | <b>88.47</b>           | <b>90.10</b>           | <b>91.28</b>          |                      |
| Modelo básico                   | 0.00<br>(Referencia)     | -0.42<br>(-1.13,0.29)  | 0.22<br>(-0.52,0.97)   | 0.25<br>(-0.58,1.08)  | 0.06                 |
| Modelo completo                 | 0.00<br>(Referencia)     | -0.23<br>(-0.84,0.37)  | 0.06<br>(-0.58,0.71)   | -0.65<br>(-1.37,0.06) | 0.27                 |
| <b>Insulina, pmol/L</b>         | <b>5.26</b>              | <b>5.39</b>            | <b>5.99</b>            | <b>7.15</b>           |                      |
| Modelo básico                   | 0.00<br>(Referencia)     | -0.14<br>(-0.44,0.17)  | 0.18<br>(-0.14,0.50)   | 1.00<br>(0.64,1.35)   | <0.001               |
| Modelo completo                 | 0.00<br>(Referencia)     | 0.00<br>(-0.12,0.13)   | 0.06<br>(-0.07,0.19)   | 0.31<br>(0.16,0.46)   | <0.001               |
| <b>HOMA-IR, log</b>             | <b>-0.01</b>             | <b>0.02</b>            | <b>0.13</b>            | <b>0.31</b>           |                      |
| Modelo básico                   | 0.00<br>(Referencia)     | -0.03<br>(-0.08,0.02)  | 0.01<br>(-0.04,0.07)   | 0.12<br>(0.06,0.18)   | <0.001               |
| Modelo completo*                | 0.00<br>(Referencia)     | -0.06<br>(-0.10,-0.01) | -0.05<br>(-0.10,-0.01) | 0.00<br>(-0.06,0.05)  | 0.21                 |
| <b>Hemoglobina A1c, %</b>       | <b>5.31</b>              | <b>5.38</b>            | <b>5.44</b>            | <b>5.46</b>           |                      |
| Modelo básico                   | 0.00<br>(Referencia)     | 0.04<br>(0.01,0.07)    | 0.07<br>(0.04,0.10)    | 0.07<br>(0.03,0.10)   | 0.007                |
| Modelo completo                 | 0.00<br>(Referencia)     | 0.05<br>(0.01,0.08)    | 0.07<br>(0.04,0.10)    | 0.06<br>(0.02,0.09)   | 0.04                 |

Las líneas en negrita son las medias no ajustadas. Las diferencias se estimaron a partir de modelos de regresión lineal ajustados por edad, sexo, tabaquismo y colesterol LDL (modelo básico), y además por HOMA-IR (log), índice de masa corporal y perímetro de cintura (modelo completo). \* En estas regresiones se excluyó la variable resultado de las variables de ajuste. La hemoglobina A1c media fue de 34,6, 35,2, 35,9 y 36,1 mmol/mol para los cuartiles 1 ° a 4 ° de LDL-ox, respectivamente. Las diferencias expresadas en mmol/mol fueron aproximadamente 10 veces las cifras de la tabla.

Tabla 5-3. Las diferencias (intervalo de confianza del 95%) en los parámetros relacionados con el síndrome metabólico por unidad de aumento en la LDL oxidada, ajustada por varias combinaciones de factores de confusión/mediadores

| <b>Cambio por incremento de la unidad de LDL-ox</b> | <b>Modelo 1 (básico)</b><br><br>(edad, sexo, tabaquismo, LDL) | <b>Modelo 2</b><br><br>(1)+ (log-HOMA) | <b>Modelo 3</b><br><br>(1)+ (IMC) | <b>Modelo 4</b><br><br>(1)+ (perímetro cintura) | <b>Modelo 5</b><br><br>(1)+ (log-HOMA, IMC) | <b>Modelo 6</b><br><br>(1)+ (log-HOMA, perímetro cintura) | <b>Modelo 7</b><br><br>(1)+ (IMC, perímetro cintura) | <b>Modelo 8 (completo)</b><br><br>(1)+ (log-HOMA, IMC, perímetro cintura) |
|---|---|--|-----------------------------------|---|---|---|--|---|
| <b>Índice de masa corporal, kg/m<sup>2</sup></b>    | 0.024<br>(0.017,0.032)  | 0.014<br>(0.007,0.020)                 | -<br>-                            | -0.004<br>(-0.008,-0.001)                       | -<br>-                                      | -0.005<br>(-0.009,-0.001)                                 | -<br>-   | -<br>-  |
| <b>Perímetro de cintura abdominal, cm</b>           | 0.090<br>(0.069,0.111)  | 0.060<br>(0.043,0.078)                 | 0.033<br>(0.023,0.044)            | -<br>-  | 0.031<br>(0.020,0.041)                      | -<br>-  | -<br>-   | -<br>-  |
| <b>Triglicéridos, mg/dL</b>                         | 1.063<br>(0.953,1.172)  | 0.960<br>(0.857,1.063)                 | 0.989<br>(0.882,1.097)            | 0.958<br>(0.850,1.065)                          | 0.950<br>(0.846,1.053)                      | 0.943<br>(0.839,1.046)                                    | 0.963<br>(0.855,1.071)                               | 0.944<br>(0.841,1.048)  |
| <b>HDL-colesterol, mg/dL</b>                        | -0.074<br>(-0.099,-0.050)                                     | -0.055<br>(-0.078,-0.031)              | -0.055<br>(-0.078,-0.031)         | -0.045<br>(-0.069,-0.021)                       | -0.048<br>(-0.072,-0.025)                   | -0.043<br>(-0.066,-0.020)                                 | -0.046<br>(-0.069,-0.022)                            | -0.043<br>(-0.066,-0.020)   |
| <b>Colesterol Total, mg/dL</b>                      | 0.139<br>(0.111,0.167)  | 0.138<br>(0.110,0.166)                 | 0.144<br>(0.116,0.172)            | 0.147<br>(0.119,0.175)                          | 0.142<br>(0.114,0.170)                      | 0.146<br>(0.118,0.174)                                    | 0.147<br>(0.119,0.175)                               | 0.146<br>(0.118,0.174)  |
| <b>LDL-colesterol, mg/dL*</b>                       | 0.966<br>(0.920,1.012)  | 0.946<br>(0.900,0.992)                 | 0.952<br>(0.906,0.998)            | 0.952<br>(0.906,0.999)                          | 0.943<br>(0.897,0.990)                      | 0.946<br>(0.899,0.992)                                    | 0.953<br>(0.907,1.000)                               | 0.947<br>(0.900,0.993)  |

\*no ajustados por LDL-colesterol

Tabla 5-3. Las diferencias (intervalo de confianza del 95%) en los parámetros relacionados con el síndrome metabólico por unidad de aumento en la LDL oxidada, ajustada por varias combinaciones de factores de confusión/mediadores (continuación)

| <b>Cambio por incremento de la unidad de LDL-ox</b> | <b>Modelo 1 (básico)</b><br>(edad, sexo, tabaquismo, LDL) | <b>Modelo 2</b><br>(1)+ (log-HOMA) | <b>Modelo 3</b><br>(1)+ (IMC) | <b>Modelo 4</b><br>(1)+ (perímetro cintura) | <b>Modelo 5</b><br>(1)+ (log-HOMA, IMC) | <b>Modelo 6</b><br>(1)+ (log-HOMA, perímetro cintura) | <b>Modelo 7</b><br>(1)+ (IMC, perímetro cintura) | <b>Modelo 8 (completo)</b><br>(1)+ (log-HOMA, IMC, perímetro cintura) |
|---|---|------------------------------------|-------------------------------|---|---|---|--|---|
| <b>Presión Sistólica, mmHg</b>                      | 0.074<br>(0.050,0.099)                                    | 0.059<br>(0.035,0.083)             | 0.052<br>(0.029,0.075)        | 0.046<br>(0.022,0.070)                      | 0.049<br>(0.026,0.072)                  | 0.045<br>(0.021,0.068)                                | 0.049<br>(0.026,0.073)                           | 0.048<br>(0.024,0.071)  |
| <b>Presión Diastólica, mmHg</b>                     | 0.060<br>(0.040,0.079)                                    | 0.044<br>(0.025,0.063)             | 0.037<br>(0.019,0.056)        | 0.029<br>(0.011,0.048)                      | 0.034<br>(0.016,0.052)                  | 0.028<br>(0.010,0.047)                                | 0.032<br>(0.013,0.050)                           | 0.030<br>(0.012,0.049)  |
| <b>Glucosa en ayunas, mg/dL</b>                     | 0.018<br>(0.000,0.036)                                    | -                                  | 0.001<br>(-0.016,0.018)       | -0.005<br>(-0.023,0.012)                    | -                                       | -   | -0.004<br>(-0.021,0.013)                         | -   |
| <b>Insulina, pmol/L</b>                             | 0.029<br>(0.021,0.037)                                    | -                                  | 0.017<br>(0.010,0.023)        | 0.012<br>(0.005,0.018)                      | -                                       | -   | 0.013<br>(0.006,0.019)                           | -   |
| <b>HOMA-IR, log</b>                                 | 0.004<br>(0.002,0.005)                                    | -                                  | 0.001<br>(0.000,0.003)        | 0.001<br>(-0.001,0.002)                     | -                                       | -   | 0.001<br>(0.000,0.002)                           | -   |
| <b>Hemoglobina A1c, %</b>                           | 0.001<br>(0.000,0.002)                                    | 0.001<br>(0.000,0.002)             | 0.001<br>(0.000,0.002)        | 0.001<br>(0.000,0.002)                      | 0.001<br>(0.000,0.002)                  | 0.001<br>(0.000,0.002)                                | 0.001<br>(0.000,0.002)                           | 0.001<br>(0.000,0.002)  |

\*no ajustados por LDL-colesterol

La frecuencia de la SM y sus componentes aumentó en los cuartiles de LDL-ox. Con la excepción de glucosa en ayunas elevada, las asociaciones con los componentes de SM fueron independientes de HOMA-IR y las medidas antropométricas (Tabla 5-4, modelo completo). El componente MS con la asociación más fuerte fue la concentración de triglicéridos altos. LDL-ox se asoció significativamente con la resistencia a la insulina independientemente del IMC y el perímetro de cintura abdominal. Los OR (intervalo de confianza del 95%) para la SM en el 2°, 3° y 4° cuartil de LDL-ox versus el 1° fueron 0,84 (0,52, 1,36), 1,47 (0,95, 2,32) y 2,57 (1,66, 4,04) independientemente de HOMA-IR, IMC y perímetro de la cintura (Tabla 5-4, modelo completo,  $p < 0,001$  para la tendencia). Los OR para el segundo, el tercero y el cuarto frente al primer cuartil de LDL-ox para el grupo de tres componentes no antropométricos de SM fueron 1,52 (0,76, 3,13), 2,55 (1,36, 4,99) y 5,27 (2,88, 10,20) también independientemente de la sensibilidad a insulina y de medidas antropométricas (Tabla 4-4, modelo completo,  $p < 0,001$  para la tendencia).

Tabla 5-4. Porcentajes y odds ratios ajustados (intervalo de confianza del 95%) para el síndrome metabólico y sus componentes (comparación de los tres cuartiles de LDL-ox más altos con el primer cuartil)

|   | Cuartiles de LDL-ox, U/L  |              |              |                           | Valor p de tendencia |
|---|---------------------------|--------------|--------------|---------------------------|----------------------|
|   | [Niveles más bajos, 39.9] | (39.9, 49.4] | (49.4, 60.8] | (60.8, Niveles más altos] |                      |
| <b>N</b>                                      | 997                       | 997          | 996          | 997                       |                      |
| <b>Promedio LDL-ox</b>                        | 33.06                     | 44.72        | 54.69        | 74.64                     |                      |
| <b>Perímetro de cintura abdominal elevado</b> | <b>13.7</b>               | <b>17.4</b>  | <b>21.4</b>  | <b>30.2</b>               |                      |
| Modelo básico                                 | 1.00                      | 1.21         | 1.48         | 2.24                      | <0.001               |
|   | (Referencia)              | (0.95, 1.55) | (1.15, 1.90) | (1.71, 2.93)              |                      |
| Modelo completo*                              | 1.00                      | 1.04         | 1.23         | 1.70                      | 0.008                |
|   | (Referencia)              | (0.71, 1.54) | (0.84, 1.81) | (1.13, 2.55)              |                      |

Las líneas en negrita son porcentajes no ajustados. Los odds ratio se estiman a partir de modelos de regresión logística con ajuste para edad, sexo, tabaquismo y colesterol LDL (modelo básico), y además para HOMA-IR (log), índice de masa corporal y perímetro de cintura (modelo completo). \* En estas regresiones se excluyó la variable utilizada en la definición de la variable resultado (perímetro de cintura o HOMA-IR) de las variables de ajuste.

Tabla 5-4. Porcentajes y odds ratios ajustados (intervalo de confianza del 95%) para el síndrome metabólico y sus componentes (comparación de los tres cuartiles de LDL-ox más altos con el primer cuartil) (continuación)

|   | Cuartiles de LDL-ox, U/L |             |             |                           | Valor p de tendencia |
|---|--------------------------|-------------|-------------|---------------------------|----------------------|
|   | [Niveles más bajos,39.9] | (39.9,49.4] | (49.4,60.8] | (60.8, Niveles más altos] |                      |
| <b>Triglicéridos elevados</b>               | <b>3.7</b>               | <b>5.5</b>  | <b>9.0</b>  | <b>24.5</b>               |                      |
| Modelo básico                               | 1.00                     | 1.39        | 2.12        | 6.38                      | <0.001               |
|   | (Referencia)             | (0.90,2.16) | (1.41,3.23) | (4.30,9.66)               |                      |
| Modelo completo                             | 1.00                     | 1.52        | 2.08        | 5.83                      | <0.001               |
|   | (Referencia)             | (0.98,2.40) | (1.37,3.21) | (3.89,8.92)               |                      |
| <b>Bajos niveles de HDL-colesterol</b>      | <b>26.9</b>              | <b>31.3</b> | <b>31.9</b> | <b>39.6</b>               |                      |
| Modelo básico                               | 1.00                     | 1.28        | 1.33        | 1.94                      | <0.001               |
|   | (Referencia)             | (1.05,1.56) | (1.08,1.64) | (1.55,2.44)               |                      |
| Modelo completo                             | 1.00                     | 1.30        | 1.26        | 1.66                      | 0.001                |
|   | (Referencia)             | (1.06,1.60) | (1.01,1.56) | (1.31,2.11)               |                      |
| <b>Presión arterial elevada</b>             | <b>13.4</b>              | <b>14.7</b> | <b>21.8</b> | <b>27.9</b>               |                      |
| Modelo básico                               | 1.00                     | 0.95        | 1.44        | 1.82                      | <0.001               |
|   | (Referencia)             | (0.73,1.24) | (1.11,1.87) | (1.38,2.41)               |                      |
| Modelo completo                             | 1.00                     | 0.93        | 1.33        | 1.47                      | 0.002                |
|   | (Referencia)             | (0.71,1.23) | (1.02,1.75) | (1.10,1.96)               |                      |
| <b>Glucosa en ayunas elevada</b>            | <b>8.3</b>               | <b>9.2</b>  | <b>12.7</b> | <b>17.5</b>               |                      |
| Modelo básico                               | 1.00                     | 0.89        | 1.06        | 1.27                      | 0.006                |
|   | (Referencia)             | (0.64,1.23) | (0.77,1.46) | (0.91,1.77)               |                      |
| Modelo completo                             | 1.00                     | 0.95        | 0.97        | 0.90                      | 0.88                 |
|   | (Referencia)             | (0.67,1.35) | (0.69,1.38) | (0.63,1.29)               |                      |
| <b>Síndrome metabólico</b>                  | <b>5.4</b>               | <b>5.1</b>  | <b>9.8</b>  | <b>19.1</b>               |                      |
| Modelo básico                               | 1.00                     | 0.83        | 1.61        | 3.36                      | <0.001               |
|   | (Referencia)             | (0.56,1.25) | (1.12,2.34) | (2.33,4.91)               |                      |
| Modelo completo                             | 1.00                     | 0.84        | 1.47        | 2.57                      | <0.001               |
|   | (Referencia)             | (0.52,1.36) | (0.95,2.32) | (1.66,4.04)               |                      |
| <b>Resistencia a la insulina</b>            | <b>4.7</b>               | <b>5.2</b>  | <b>8.1</b>  | <b>14.8</b>               |                      |
| Modelo básico                               | 1.00                     | 0.95        | 1.36        | 2.32                      | <0.001               |
|   | (Referencia)             | (0.63,1.44) | (0.92,2.02) | (1.57,3.47)               |                      |
| Modelo completo*                            | 1.00                     | 0.89        | 1.10        | 1.65                      | <0.001               |
|   | (Referencia)             | (0.56,1.39) | (0.72,1.70) | (1.08,2.56)               |                      |
| <b>2-o-más criterios no antropométricos</b> | <b>10.3</b>              | <b>11.1</b> | <b>18.6</b> | <b>31.2</b>               |                      |
| Modelo básico                               | 1.00                     | 0.95        | 1.59        | 2.95                      | <0.001               |
|   | (Referencia)             | (0.71,1.27) | (1.20,2.11) | (2.21,3.96)               |                      |
| Modelo completo                             | 1.00                     | 0.97        | 1.51        | 2.42                      | <0.001               |
|   | (Referencia)             | (0.70,1.34) | (1.11,2.07) | (1.76,3.34)               |                      |

Las líneas en negrita son porcentajes no ajustados. Los odds ratio se estiman a partir de modelos de regresión logística con ajuste para edad, sexo, tabaquismo y colesterol LDL (modelo básico), y además para HOMA-IR (log), índice de masa corporal y perímetro de cintura (modelo completo). \* En estas regresiones se excluyó la variable utilizada en la definición de la variable resultado (perímetro de cintura o HOMA-IR) de las variables de ajuste.

Tabla 5-4. Porcentajes y odds ratios ajustados (intervalo de confianza del 95%) para el síndrome metabólico y sus componentes (comparación de los tres cuartiles de LDL-ox más altos con el primer cuartil) (continuación)

|   | Cuartiles de LDL-ox, U/L |             |             |                           | Valor p de tendencia |
|---|--------------------------|-------------|-------------|---------------------------|----------------------|
|   | [Niveles más bajos,39.9] | (39.9,49.4] | (49.4,60.8] | (60.8, Niveles más altos] |                      |
| <b>3-o-más criterios no antropométricos</b> | <b>1.6</b>               | <b>2.2</b>  | <b>4.4</b>  | <b>10.5</b>               |                      |
| Modelo básico                               | 1.00                     | 1.26        | 2.51        | 6.32                      | <0.001               |
|   | (Referencia)             | (0.65,2.47) | (1.39,4.73) | (3.57,11.82)              |                      |
| Modelo completo                             | 1.00                     | 1.52        | 2.55        | 5.27                      | <0.001               |
|   | (Referencia)             | (0.76,3.13) | (1.36,4.99) | (2.88,10.20)              |                      |

Las líneas en negrita son porcentajes no ajustados. Los odds ratio se estiman a partir de modelos de regresión logística con ajuste por edad, sexo, tabaquismo y colesterol LDL (modelo básico), y además para HOMA-IR (log), índice de masa corporal y perímetro de cintura (modelo completo). \* En estas regresiones se excluyó la variable utilizada en la definición de la variable resultado (perímetro de cintura o HOMA-IR) de las variables de ajuste.

El análisis de la mediación de LDL-ox sobre la asociación entre el perímetro de cintura y las variables relacionadas con el SM mostró que el LDL-ox estimaba el 13,9% de la asociación entre el perímetro de cintura y la concentración de triglicéridos y del 1 al 3% de la asociación con colesterol HDL, presión arterial e insulina (Tabla 5-5).

Tabla 5-5. Efecto de mediación de LDL-ox sobre la asociación de perímetro de cintura abdominal con los parámetros relacionados con el síndrome metabólico

| Variable resultado (por cm perímetro de cintura) | Efecto Total                            | Efecto directo                          | Efecto mediado                          | Proporción Mediada %             |
|--|---|---|---|----------------------------------|
| <b>Índice de masa corporal, kg/m<sup>2</sup></b> | 0.3163<br>(0.3094,0.3234)<br>p<0.001    | 0.3172<br>(0.3104,0.3243)<br>p<0.001    | -0.0009<br>(-0.0017,-0.0001)<br>p=0.02  | -                                |
| <b>Triglicéridos, mg/dL</b>                      | 1.3557<br>(1.1851,1.5279)<br>p<0.001    | 1.1671<br>(0.9944,1.3415)<br>p<0.001    | 0.1886<br>(0.1358,0.2497)<br>p<0.001    | 13.9%<br>(10.1,18.5)%<br>p<0.001 |
| <b>HDL-colesterol, mg/dL</b>                     | -0.3364<br>(-0.3714,-0.3023)<br>p<0.001 | -0.3276<br>(-0.3623,-0.2921)<br>p<0.001 | -0.0088<br>(-0.0139,-0.0042)<br>p<0.001 | 2.6%<br>(1.2,4.2)%<br>p<0.001    |

Las columnas muestran el efecto total, el efecto directo y el efecto mediado por LDL-ox del perímetro de cintura en cada parámetro relacionado con el síndrome metabólico, y la proporción del efecto total del perímetro de cintura mediada por LDL-ox. Las cifras entre paréntesis muestran el intervalo de confianza del 95% calculado por bootstrap no paramétrico. Se utilizó el modelo básico ajustado (edad, sexo, tabaquismo y colesterol LDL).

Tabla 5-5. Efecto de mediación de LDL-ox sobre la asociación de perímetro de cintura abdominal con los parámetros relacionados con el síndrome metabólico (continuación)

| <b>Variable resultado<br/>(por cm perímetro de<br/>cintura)</b> | <b>Efecto Total</b>                     | <b>Efecto directo</b>                   | <b>Efecto mediado</b>                 | <b>Proporción<br/>Mediada %</b> |
|---|---|---|---------------------------------------|---------------------------------|
| <b>Colesterol Total,<br/>mg/dL</b>                              | -0.0648<br>(-0.1042,-0.0210)<br>p=0.006 | -0.0938<br>(-0.1334,-0.0480)<br>p<0.001 | 0.0290<br>(0.0193,0.0394)<br>p<0.001  | -                               |
| <b>Presión Sistólica,<br/>mmHg</b>                              | 0.3233<br>(0.2876,0.3595)<br>p<0.001    | 0.3143<br>(0.2771,0.3515)<br>p<0.001    | 0.0091<br>(0.0041,0.0147)<br>p<0.001  | 2.8%<br>(1.3,4.6)%<br>p<0.001   |
| <b>Presión Diastólica,<br/>mmHg</b>                             | 0.3410<br>(0.3122,0.3702)<br>p<0.001    | 0.3352<br>(0.3058,0.3657)<br>p<0.001    | 0.0058<br>(0.0020,0.0095)<br>p<0.001  | 1.7%<br>(0.6,2.8)%<br>p<0.001   |
| <b>Glucosa en ayunas,<br/>mg/dL</b>                             | 0.2540<br>(0.2281,0.2788)<br>p<0.001    | 0.2551<br>(0.2286,0.2798)<br>p<0.001    | -0.0011<br>(-0.0047,0.0025)<br>p=0.52 | -                               |
| <b>Insulina, pmol/L</b>   | 0.1946<br>(0.1834,0.2075)<br>p<0.001    | 0.1923<br>(0.1808,0.2051)<br>p<0.001    | 0.0023<br>(0.0007,0.0040)<br>p=0.008  | 1.2%<br>(0.4,2.1)%<br>p=0.008   |
| <b>HOMA-IR, log</b>   | 0.0329<br>(0.0312,0.0346)<br>p<0.001    | 0.0328<br>(0.0311,0.0344)<br>p<0.001    | 0.0001<br>(-0.0001,0.0003)<br>p=0.29  | 0.3%<br>(-0.3,1.0)%<br>p=0.29   |
| <b>Hemoglobina<br/>A1c, %</b>                                   | 0.0031<br>(0.0018,0.0042)<br>p<0.001    | 0.0029<br>(0.0016,0.0041)<br>p<0.001    | 0.0002<br>(0.0000,0.0003)<br>p=0.05   | 5.3%<br>(-0.1,13.7)%<br>p=0.05  |

Las columnas muestran el efecto total, el efecto directo y el efecto mediado por LDL-ox del perímetro de cintura en cada parámetro relacionado con el síndrome metabólico, y la proporción del efecto total del perímetro de cintura mediada por LDL-ox. Las cifras entre paréntesis muestran el intervalo de confianza del 95% calculado por bootstrap no paramétrico. Se utilizó el modelo básico ajustado (edad, sexo, tabaquismo y colesterol LDL).

HOMA-IR no medió ninguna de las asociaciones entre LDL-ox y SM (Tabla 5-6); este hallazgo es consistente con la falta de asociación entre LDL-ox y HOMA-IR después de ajustar por las variables antropométricas.

Tabla 5-6. *Efecto de mediación de HOMA-IR de la asociación entre LDL-ox y parámetros del síndrome metabólico*

| <b>Variable Resultado (por U/L de LDL-ox)</b> | <b>Efecto Total</b>                     | <b>Efecto Directo</b>                   | <b>Efecto Mediado</b>                 | <b>Proporción Mediada %</b>    |
|---|---|---|---------------------------------------|--------------------------------|
| <b>Triglicéridos, mg/dL</b>                   | 0.9630<br>(0.8024,1.1437)<br>p<0.001    | 0.9443<br>(0.7894,1.1201)<br>p<0.001    | 0.0188<br>(-0.0112,0.0502)<br>p=0.22  | 1.9%<br>(-1.2,4.9)%<br>p=0.22  |
| <b>HDL-colesterol, mg/dL</b>                  | -0.0459<br>(-0.0685,-0.0233)<br>p=0.002 | -0.0432<br>(-0.0656,-0.0215)<br>p=0.002 | -0.0027<br>(-0.0072,0.0015)<br>p=0.21 | 5.9%<br>(-3.7,17.8)%<br>p=0.21 |
| <b>Colesterol Total, mg/dL</b>                | 0.1472<br>(0.1135,0.1816)<br>p<0.001    | 0.1461<br>(0.1127,0.1799)<br>p<0.001    | 0.0010<br>(-0.0005,0.0032)<br>p=0.21  | 0.7%<br>(-0.4,2.2)%<br>p=0.21  |
| <b>Presión Sistólica, mmHg</b>                | 0.0493<br>(0.0256,0.0738)<br>p<0.001    | 0.0478<br>(0.0244,0.0727)<br>p<0.001    | 0.0014<br>(-0.0008,0.0038)<br>p=0.23  | 2.9%<br>(-1.8,8.7)%<br>p=0.23  |
| <b>Presión Diastólica, mmHg</b>               | 0.0318<br>(0.0133,0.0494)<br>p<0.001    | 0.0305<br>(0.0123,0.0481)<br>p<0.001    | 0.0013<br>(-0.0007,0.0035)<br>p=0.21  | 4.2%<br>(-2.6,15.2)%<br>p=0.21 |
| <b>Hemoglobina A1c, %</b>                     | 0.0009<br>(0.0001,0.0018)<br>p=0.02     | 0.0008<br>(0.0000,0.0017)<br>p=0.03     | 0.0001<br>(0.0000,0.0002)<br>p=0.21   | 6.9%<br>(-6.1,41.1)%<br>p=0.22 |

Las columnas muestran el efecto total, el efecto directo y el efecto mediado por HOMA-IR en la asociación de LDL-ox con cada parámetro relacionado con el síndrome metabólico, y la proporción del efecto total de LDL-ox mediada por HOMA-IR. Las cifras entre paréntesis muestran el intervalo de confianza del 95% calculado por bootstrap no paramétrico. El modelo ajustado utilizado incluía edad, sexo, tabaquismo, colesterol LDL, índice de masa corporal y perímetro de cintura abdominal.

En contraste, la mayoría de las asociaciones del perímetro de cintura con los componentes del SM fueron parcialmente mediados por el aumento de HOMA-IR, particularmente para los triglicéridos y la presión arterial sistólica (Tabla 5-7).

Tabla 5-7. Efecto de mediación de HOMA-IR de la asociación entre perímetro de cintura abdominal y los criterios del síndrome metabólico

| <b>Variable Resultado<br/>(por cm de<br/>perímetro de<br/>cintura)</b> | <b>Efecto Total</b>                     | <b>Efecto Directo</b>                   | <b>Efecto Mediado</b>                   | <b>Proporción<br/>Mediada %</b>   |
|--|---|---|---|-----------------------------------|
| <b>Triglicéridos,<br/>mg/dL</b>  | 0.7776<br>(0.4825,1.0986)<br>p<0.001    | 0.1780<br>(-0.1488,0.4856)<br>p=0.28    | 0.5995<br>(0.4848,0.7215)<br>p<0.001    | 77.1%<br>(53.9,130.0)%<br>p<0.001 |
| <b>HDL-colesterol,<br/>mg/dL</b>                                       | -0.2572<br>(-0.3229,-0.1882)<br>p<0.001 | -0.1701<br>(-0.2357,-0.0995)<br>p<0.001 | -0.0871<br>(-0.1090,-0.0696)<br>p<0.001 | 33.9%<br>(25.0,48.3)%<br>p<0.001  |
| <b>Colesterol Total,<br/>mg/dL</b>                                     | -0.1016<br>(-0.1862,-0.0154)<br>p=0.01  | -0.1346<br>(-0.2212,-0.0472)<br>p=0.006 | 0.0330<br>(0.0119,0.0549)<br>p=0.002    | -                                 |
| <b>Presión Sistólica,<br/>mmHg</b>                                     | 0.0838<br>(0.0171,0.1528)<br>p=0.02     | 0.0382<br>(-0.0279,0.1100)<br>p=0.26    | 0.0455<br>(0.0312,0.0618)<br>p<0.001    | 54.4%<br>(23.8,182.3)%<br>p=0.02  |
| <b>Presión Diastólica,<br/>mmHg</b>                                    | 0.1610<br>(0.1091,0.2158)<br>p<0.001    | 0.1181<br>(0.0656,0.1746)<br>p<0.001    | 0.0429<br>(0.0304,0.0560)<br>p<0.001    | 26.6%<br>(16.9,41.7)%<br>p<0.001  |
| <b>Hemoglobina A1c, %</b>  | -0.0009<br>(-0.0032,0.0013)<br>p=0.43   | -0.0028<br>(-0.0053,-0.0006)<br>p=0.02  | 0.0019<br>(0.0014,0.0026)<br>p<0.001    | -                                 |

Las columnas muestran el efecto total, el efecto directo y el efecto mediado por HOMA-IR del perímetro de cintura en cada parámetro relacionado con el síndrome metabólico, y la proporción del efecto total del perímetro de cintura mediada por HOMA-IR. Las cifras entre paréntesis muestran el intervalo de confianza del 95% calculado por bootstrap no paramétrico. El modelo ajustado utilizado incluía edad, sexo, tabaquismo, LDL-colesterol, índice de masa corporal y LDL-ox.

También observamos que los cuartiles más altos de colesterol LDL sólo se asociaron débilmente con el SM y que la asociación desapareció, e incluso se invirtió, una vez ajustado para LDL-ox (Tabla 5-8).

Tabla 5-8. Porcentajes y odds ratios ajustados (intervalo de confianza del 95%) para el síndrome metabólico (comparación de los tres cuartiles de LDL-ox más altos con el primer cuartil y los tres cuartiles de LDL-colesterol más altos con el primer cuartil).

|  | Cuartiles de LDL-ox, U/L           |                     |                     |                     | Valor p de tendencia |
|--|------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
|  | [Inferior,39.9]                    | (39.9,49.4]         | (49.4,60.8]         | (60.8, Superior]    |                      |
| <b>N</b>                                   | 997                                | 997                 | 996                 | 997                 |                      |
| <b>Promedio LDL-ox</b>                     | 33.06                              | 44.72               | 54.69               | 74.64               |                      |
| <b>Síndrome Metabólico</b>                 | <b>5.4</b>                         | <b>5.1</b>          | <b>9.8</b>          | <b>19.1</b>         |                      |
| Ajustado por edad, sexo, y tabaquismo      | 1.00<br>(Referencia)               | 0.80<br>(0.53,1.19) | 1.44<br>(1.02,2.06) | 2.80<br>(2.03,3.91) | <0.001               |
| Adicionalmente ajustado por LDL-colesterol | 1.00<br>(Referencia)               | 0.83<br>(0.56,1.25) | 1.61<br>(1.12,2.34) | 3.36<br>(2.33,4.91) | <0.001               |
|  | Cuartiles de LDL-colesterol, mg/dL |                     |                     |                     | Valor p de tendencia |
|  | [Inferior,112]                     | (112,131]           | (131,152]           | (152, Superior]     |                      |
| <b>N</b>                                   | 998                                | 997                 | 995                 | 997                 |                      |
| <b>Promedio colesterol LDL</b>             | 96.93                              | 121.63              | 140.73              | 171.24              |                      |
| <b>Síndrome Metabólico</b>                 | <b>7.5</b>                         | <b>7.8</b>          | <b>10.4</b>         | <b>13.7</b>         |                      |
| Ajustado por edad, sexo, y tabaquismo      | 1.00<br>(Referencia)               | 0.86<br>(0.61,1.21) | 1.09<br>(0.79,1.50) | 1.36<br>(1.00,1.85) | 0.02                 |
| Adicionalmente ajustado por LDL-ox         | 1.00<br>(Referencia)               | 0.65<br>(0.46,0.92) | 0.70<br>(0.50,0.99) | 0.64<br>(0.45,0.92) | 0.007                |

Las líneas en negrita son proporciones no ajustadas. Los odds ratios se estimaron a partir de modelos de regresión logística ajustados por edad, sexo y tabaquismo (modelos superiores), y adicionalmente ajustados por LDL-colesterol o LDL-ox (modelos inferiores).

Como análisis de sensibilidad, se ajustó aún más las estimaciones de la asociación de LDL-ox con cada criterio de SM para el resto de los criterios de SM, y estas asociaciones aún se mantienen para el perímetro de cintura elevada, triglicéridos altos y presión arterial alta (Tabla 5-9).

Tabla 5-9. Porcentajes y odds ratios ajustados (intervalo de confianza del 95%) para los criterios del síndrome metabólico (comparación de los tres cuartiles de LDL-ox más altos con el primer cuartil después de ajustar adicionalmente los modelos completos por las variables que definen los otros criterios del síndrome metabólico).

|   | Cuartiles de LDL-ox, U/L |             |             |                  | Valor p de tendencia |
|---|--------------------------|-------------|-------------|------------------|----------------------|
|   | [Inferior,39.9]          | (39.9,49.4] | (49.4,60.8] | (60.8, Superior] |                      |
| <b>N</b>                                | 997                      | 997         | 996         | 997              |                      |
| <b>Promedio LDL-ox</b>                  | 33.06                    | 44.72       | 54.69       | 74.64            |                      |
| <b>Perímetro de cintura elevado</b>     | <b>13.7</b>              | <b>17.4</b> | <b>21.4</b> | <b>30.2</b>      |                      |
| Modelo completo + variables metabólicas | 1.00                     | 1.03        | 1.23        | 1.74             | 0.006                |
|   | (Referencia)             | (0.69,1.52) | (0.83,1.82) | (1.14,2.65)      |                      |
| <b>Triglicéridos elevados</b>           | <b>3.7</b>               | <b>5.5</b>  | <b>9.0</b>  | <b>24.5</b>      |                      |
| Modelo completo                         | 1.00                     | 1.47        | 1.96        | 5.39             | <0.001               |
|   | (Referencia)             | (0.94,2.34) | (1.28,3.04) | (3.57,8.31)      |                      |
| <b>Niveles bajos de HDL-colesterol</b>  | <b>26.9</b>              | <b>31.3</b> | <b>31.9</b> | <b>39.6</b>      |                      |
| Modelo completo                         | 1.00                     | 1.22        | 1.13        | 1.24             | 0.57                 |
|   | (Referencia)             | (0.99,1.51) | (0.90,1.40) | (0.97,1.59)      |                      |
| <b>Presión arterial elevada</b>         | <b>13.4</b>              | <b>14.7</b> | <b>21.8</b> | <b>27.9</b>      |                      |
| Modelo completo                         | 1.00                     | 0.93        | 1.31        | 1.42             | 0.008                |
|   | (Referencia)             | (0.70,1.23) | (1.00,1.72) | (1.06,1.92)      |                      |
| <b>Glucosa en ayunas elevada</b>        | <b>8.3</b>               | <b>9.2</b>  | <b>12.7</b> | <b>17.5</b>      |                      |
| Modelo completo                         | 1.00                     | 0.95        | 0.96        | 0.88             | 0.74                 |
|   | (Referencia)             | (0.67,1.35) | (0.67,1.36) | (0.61,1.28)      |                      |

Las líneas en negrita son proporciones no ajustadas. Las odds ratios se calcularon a partir de modelos de regresión logística ajustadas por edad, sexo, tabaquismo, LDL-colesterol, HOMA-IR (log), índice de masa corporal, perímetro de cintura, triglicéridos, colesterol HDL, presión arterial sistólica y glucosa en ayunas. En cada regresión la variable utilizada en la definición directa de la variable resultado se excluyó de las variables de ajuste.

## Discusión

En este estudio de 3987 participantes no diabéticos, LDL-ox se asoció fuertemente con el SM y sus componentes independientemente de la obesidad central y la resistencia a la insulina. A pesar de la asociación entre LDL-ox y el perímetro de cintura, la relación entre la obesidad central y los componentes de SM no fue mediada en forma significativa por LD-ox. Además, a pesar de que se propuso que el estrés oxidativo puede actuar como

una causa de la resistencia a la insulina(147,148), nuestras observaciones sugieren que la asociación de LDL-ox con SM no está mediada por la resistencia a la insulina. Nuestro análisis muestra que la variación de LDL-ox, presumiblemente causada por factores distintos de la obesidad central, se asocia con cambios en los parámetros metabólicos. Por lo tanto, nuestros hallazgos sugieren que LDL-ox podría ser un útil marcador predictivo precoz de anomalías cardiometabólicas antes de la aparición de la resistencia a la insulina.

Varios estudios han descrito una asociación entre LDL-ox y SM. Holvoet y cols.(149) reportaron que sujetos de edad avanzada con SM eran más propensos a tener altos niveles circulantes de LDL-ox. Además, Lapointe y cols.(150) observaron que concentraciones más altas de LDL-ox se asociaron con SM en mujeres posmenopáusicas. Por otra parte, Ueba y cols.(151) describieron que el SM, definida según los criterios japoneses, era dos veces más probable entre los individuos con niveles más altos de LDL-ox. Además, en el estudio sobre el desarrollo del riesgo coronario en adultos jóvenes (CARDIA), un mayor nivel de LDL-ox se asoció con una mayor incidencia de SM(129). De hecho, la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GSH-Px), antioxidantes naturales, se reducen en el SM(152), probablemente por el aumento del estrés oxidativo. Los estudios en animales muestran que esto ocurre en el SM inducido por la dieta como consecuencia de la sobreactivación de la NADPH oxidasa (153). Por lo tanto, el estrés oxidativo se consideró que desempeña un papel en la iniciación y la progresión de los trastornos metabólico(128). Sin embargo, este papel no ha sido abordado previamente con los métodos de análisis de mediación en los estudios en humanos, como lo hace nuestro análisis.

Interesantemente, el estrés oxidativo está siendo contemplado como consecuencia de la hiperglucemia crónica y la obesidad (128,154). En estos trastornos, se cree que las

especies de peroxidación promueven el desarrollo del SM(23,129,130,155,156), y se propuso el estrés oxidativo como un mediador entre la obesidad y el SM(138). Un mecanismo para tal proceso podría ser la resistencia a la insulina inducida por el estrés oxidativo, que se considera un trastorno clave en la progresión del SM(133,148). En la intersección entre la obesidad, la diabetes y el estrés oxidativo, es difícil determinar cuál de sus vías actúa primero(128). En nuestra muestra de individuos no diabéticos, con un IMC medio de 26,1 kg/m<sup>2</sup> y sólo el 14% de los participantes obesos, pudimos abordar los primeros pasos en el desarrollo del SM. En esta población, el LDL-ox se asoció con el SM independientemente de la obesidad central y la resistencia a la insulina, y se asoció adicionalmente con los criterios lipídicos y de presión arterial del SM, así como su agrupación.

La adiposidad parece desempeñar un papel importante en el estrés oxidativo(157–161). El tejido adiposo es metabólicamente activo, y expresa citoquinas inflamatorias; a su vez, la inflamación aumenta las especies reactivas de oxígeno(162), que altera las adipocitoquinas y, por lo tanto, podría estar implicado en la patogénesis del SM, como se demostró en estudios en animales y en humanos(128,163,164). No obstante, en las primeras etapas del SM que son el foco del presente estudio, el aumento de la LDL-ox relacionado a perímetro de cintura elevada podría no ser una vía intermedia esencial que conecte la obesidad y el SM. De hecho, la LDL-ox sólo explicó el 15% de la asociación del perímetro de cintura con los triglicéridos, y muy pequeñas proporciones de la asociación con otros componentes del SM.

El estrés oxidativo activa cascadas de señalización que perjudican la función de la insulina, mediante modificación y modulación del receptor de insulina y del sustrato receptor de insulina(64,133,148). Esto podría ser considerado como un mecanismo

compensatorio para proteger a las células de una oxidación aún mayor al limitar la ingesta de sustrato(147). El estrés oxidativo también inhibe la acción de la insulina al desencadenar señales que conducen a la adipogénesis (hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos) y a la inflamación(165). La resistencia a la insulina es un factor clave del SM(50), proporcionando una vía plausible que explicaría cómo el SM puede ser en parte una consecuencia del estrés oxidativo. Sin embargo, nuestros datos muestran que LDL-ox se asocia con el SM independientemente de la resistencia a la insulina, lo que implica que la asociación no se produce a través de la resistencia a la insulina, al menos en las primeras etapas del desarrollo del SM. Nuestros resultados sugieren que LDL-ox está directamente asociado con el desarrollo de factores de riesgo cardiometabólico y su agrupación (MS), actuando inicialmente en paralelo con la resistencia a la insulina.

Una posible interpretación de nuestros hallazgos es que el principal cambio fisiopatológico que desencadena el SM es el cambio en los metabolitos utilizados para producir energía(132), conduciendo a trastornos lipídicos y hemodinámicos, inflamación y aterosclerosis, con estrés oxidativo y resistencia a la insulina (que conduce a la diabetes) que aparecen como consecuencias secundarias. El uso preferencial de ácidos grasos en la fosforilación oxidativa produce niveles más altos de especies reactivas de oxígeno que la oxidación de los carbohidratos. La oxidación de ácidos grasos requiere una gran cantidad de oxígeno que, en condiciones de hipoxia relativa debida a la disminución del suministro de sangre, podría agravar la situación(166–169): la hipoxia favorece el daño tisular, la infiltración de macrófagos y el aumento de la producción de adipocitoquinas, aumentando en última instancia los mediadores proinflamatorios, la proteína C reactiva y el inhibidor-1 del activador del plasminógeno. Los triglicéridos transportados en lipoproteínas se elevan en contextos de superávit energético. Además del cambio de sustrato energético,

la lipoproteína lipasa y la lipasa triglicérida hepática metabolizan las partículas hasta una forma final de LDL pequeña y densa, que es particularmente susceptible a la oxidación. En consecuencia, la asociación entre LDL-ox y triglicéridos, que es la más fuerte que encontramos entre los componentes del SM, puede deberse en parte a su participación común en las vías de los lípidos, más allá de la participación de los triglicéridos en el SM. En paralelo, los ácidos grasos libres, que están altamente disponibles en situaciones que conducen al SM, inducen resistencia a la insulina inhibiendo la captación de glucosa mediada por insulina. En esta interpretación, el estrés oxidativo y la resistencia a la insulina serían marcadores independientes del cambio metabólico que se produce. En consecuencia, el LDL-ox podría ser utilizado como un indicador de las primeras etapas del riesgo cardiometabólico, incluso antes de la aparición de la resistencia a la insulina. LDL-ox también contribuye al desarrollo de la aterosclerosis y las enfermedades cardiovasculares(170,171,138,172,50), los cuales están asociados al SM.

Este estudio se basó en una muestra de individuos bien caracterizados y profundamente fenotipados utilizando procedimientos de control de calidad de vanguardia. Un tamaño de muestra de casi 4000 individuos y métodos estadísticos modernos han permitido describir algunos procesos biológicos que median la agrupación de los factores de riesgo en el SM y han planteado dudas acerca de la relevancia de algunos caminos previamente sugeridos. Sin embargo, el diseño del estudio es transversal, lo que limita la capacidad de establecer que el vínculo entre el estrés oxidativo y el SM es causal. Además, la LDL-ox es uno de los marcadores del estrés oxidativo y los estudios utilizando un marcador diferente pueden mostrar aspectos complementarios del proceso que vincula la obesidad y el SM. Además, las regresiones se ajustaron por los principales factores de confusión potenciales, pero es posible que todavía existan

confusiones residuales debido a factores de confusión no medidos o desconocidos. Los análisis se ajustaron para HOMA-IR como una variable continua, que refleja una gama de sensibilidad a la insulina entre los individuos no diabéticos. En las primeras etapas de los trastornos metabólicos estudiados en nuestro trabajo, HOMA-IR se asoció significativamente con otras variables metabólicas, pero no medió ni confundió las asociaciones observadas. Sin embargo, entre los pacientes diabéticos, HOMA-IR alcanza valores más altos y nuestros resultados deben ser confirmados con investigaciones futuras.

En conclusión, este estudio muestra que concentraciones elevadas de LDL-ox están asociados con el SM y sus componentes independientemente de la obesidad central y la resistencia a la insulina. Por lo tanto, los niveles de LDL-ox pueden reflejar los mecanismos básicos a través de los cuales los componentes del SM se desarrollan y progresan en paralelo con la resistencia a la insulina y podrían ser un signo temprano del desarrollo del SM.

**CAPITULO VI. Análisis de LDL oxidada plasmática  
como un potencial mediador entre factores de riesgo  
cardiovascular y aterosclerosis subclínica carotídea**

## Resumen

La asociación de LDL-ox circulante con aterosclerosis en estadio tardío es bien conocida, pero aún no se ha demostrado su asociación con aterosclerosis carotídea temprana. LDL-ox se ha propuesto como paso intermedio entre los factores de riesgo cardiovascular (FRCV) y la aterosclerosis, pero también como una causa de los FRCV. El objetivo es estudiar la asociación y mediación entre LDL-ox y FRCV con aterosclerosis carotídea subclínica. Para estimar la relación de LDL-ox y FRCV con la presencia de placas carotídeas se utilizaron modelos lineales generalizados multivariados ajustados por edad, sexo y LDL-colesterol (logístico y probit) y análisis de mediación. La frecuencia de las placas carotídeas aumentó en los cuartiles de LDL-ox (mayor frente al menor cuartil OR: 1,31; IC del 95%: 1,05, 1,65), ajustada por edad, sexo y colesterol LDL. Las probabilidades de que las placas carotídeas aumentaran fue de 1,06 (IC del 95%: 1,01, 1,12;  $p = 0,02$ ) por cada 10 unidades/L de LDL-ox después de ajustar por presión arterial sistólica, glucosa en ayunas, colesterol HDL y tabaquismo. La presión arterial sistólica medió el 9,3% ( $p < 0,001$ ) del efecto LDL-ox sobre la presencia de placas carotídeas y el colesterol HDL medió el 8,4% ( $p = 0,02$ ). Teniendo en cuenta la posibilidad de vías en la dirección inversa, la LDL-ox contribuyó a una fracción de los efectos de los factores de riesgo en las placas carotídeas (37,2% para el colesterol LDL,  $p < 0,001$ , 7,5% para la presión arterial sistólica  $p = 0,002$ ; HDL-colesterol,  $p = 0,008$  y 4,46% para tabaquismo,  $p = 0,006$ ). El LDL-ox plasmático se asocia con aterosclerosis carotídea subclínica temprana independientemente de los FRCV tradicionales. Las trayectorias causales entre LDL-ox y FRCV hacia la aterosclerosis son mutuamente dependientes. LDL-ox podría ser utilizado como un marcador potencial de aterosclerosis

carotídea subclínica que complementa la información proporcionada por el colesterol LDL.

## **Introducción**

La aterosclerosis subyace a varias condiciones que son las causas principales de mortalidad y morbilidad en la mayoría de los países a nivel mundial(173). Múltiples mecanismos interrelacionados conducen a la formación de placa aterosclerótica: las teorías inflamatorias(174), lipídica(175) y oxidativa(176) ayudan a explicar la etiopatogenia de la lesión aterosclerótica. Con respecto a este último, la histología, la imagen y los estudios funcionales identifican un papel fisiopatológico importante para la lipoproteína de baja densidad oxidada (LDL-ox) localizada en las placas(177,178). Por lo tanto, la modificación oxidativa de las lipoproteínas de baja densidad es uno de los procesos clave descritos en la formación de la placa(179). Curiosamente, la LDL oxidada también se puede encontrar en sangre periférica(180), ya sea como consecuencia de la oxidación directa de las partículas de LDL en situaciones con mayor estrés oxidativo sistémico(181) o liberadas de placas rotas en episodios avanzados de complicación de aterosclerosis(182).

El LDL-ox plasmático se correlaciona con la presencia de factores de riesgo cardiovasculares (hipertensión, deterioro de la glucemia en ayunas, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y obesidad)(183–185) y también con aterosclerosis subclínica(186). En consecuencia, el estrés oxidativo se ha interpretado como un factor intermedio en el inicio de las enfermedades cardiovasculares(187). La misma asociación común se puede interpretar en sentido inverso. De hecho, el estrés oxidativo también se ha propuesto como el origen y el facilitador de varios factores de riesgo, como la hipertensión(188), la

diabetes(189) y el síndrome metabólico(190). Además, las partículas de LDL-ox tienen por sí mismas propiedades tóxicas e inflamatorias(191), que son mecanismos que pueden hacer progresar la aterosclerosis incluso sin provocar otros factores de riesgo. En conjunto, el estrés oxidativo y la LDL-ox plasmática (como un proxy) se han propuesto tanto causa como consecuencia de los factores de riesgo cardiovasculares tradicionales en el camino causal hacia la aterosclerosis (Figura 6-1). Los estudios experimentales de investigación básica han sido la principal fuente de información para aclarar esta cadena causal; sin embargo, existen escasos estudios observacionales clínicos que aborden la direccionalidad de esta asociación y trasladen los conocimientos básicos a la clínica.

La mayoría de los estudios que investigaron la asociación entre el LDL-ox plasmático y la aterosclerosis subclínica se centraron en el grosor íntima-media (IMT)(186,192–196), y los que evaluaron la presencia de placa se realizaron principalmente en adultos mayores(186,193,195,197) o estuvieron restringidos sólo a hombres (186,195), con excepción del estudio ASKLEPIOS(198). Aunque el LDL-ox plasmático tiene valor en la aterosclerosis tardía, ya que predice el infarto de miocardio(199) y la muerte cardiovascular(200), caracterizar la asociación de LDL-ox con estadios tempranos en el desarrollo de aterosclerosis, puede ser valiosa para entender los mecanismos iniciales y diseñar posibles intervenciones.

En este artículo se pretende describir la asociación entre LDL oxidada a nivel plasmático y la presencia de placas carotídeas en sujetos de mediana edad, independientemente de otros factores de riesgo cardiovascular tradicionales (Figura 6-1, Hipótesis 1). Por otro lado, se analiza si, además de esa asociación independiente, la LDL-ox está asociada con placas ateroscleróticas también a través de factores de riesgo

cardiovascular (Figura 6-1, Hipótesis 2), o de manera opuesta si los factores de riesgo cardiovascular se asocian con la aterosclerosis carotídea subclínica a través de LDL oxidada (Figura 6-1, Hipótesis 3). Para ello, utilizamos datos del estudio PESA, una cohorte de trabajadores asintomáticos de mediana edad, a los que se les realizó imágenes con técnicas no invasivas para la detección de aterosclerosis subclínica.

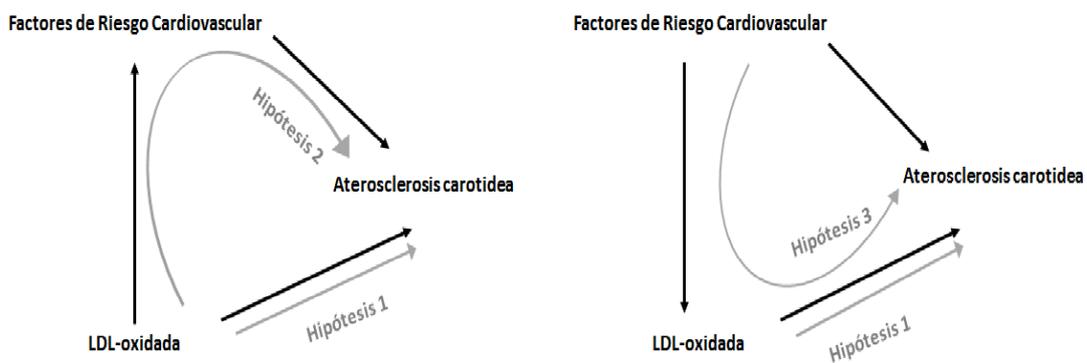


Figura 6-1. Gráficos acíclicos dirigidos que muestran posibles vías causales que unen ox-LDL, factores de riesgo cardiovascular y aterosclerosis carotídea. Las flechas negras indican posibles relaciones directas basadas en teorías anteriores. Las líneas con flechas grises indican rutas hipotéticas y probadas en cada objetivo del presente estudio. Hipótesis 1: LDL-ox se asocia con placas carotídeas independientemente de los factores de riesgo cardiovascular. Hipótesis 2: LDL-ox se asocia con placas también a través de factores de riesgo cardiovascular. Hipótesis 3: Los factores de riesgo cardiovascular se asocian con aterosclerosis carotídea subclínica a través de LDL-ox, al menos en parte de su efecto

## Materiales y Métodos

### Diseño de estudio

Se utilizaron datos basales del estudio PESA. Todos los detalles del diseño del estudio y los métodos han sido descritos previamente(91). De una muestra inicial de 4184 participantes, se excluyeron aquellos con datos de laboratorio faltantes (n = 14), datos de LDL-colesterol no disponible (n = 17), datos de LDL-ox no disponible (n = 2) y datos incompletos de imagen (n = 37). Así, la muestra analítica incluyó 4069 individuos.

## **Colección de datos**

Los datos clínicos y bioquímicos se obtuvieron durante la visita de enrolamiento que incluyó entrevistas clínicas estructuradas, cuestionarios, examen físico y extracción de sangre en ayunas. La presión arterial se calculó como la media de tres mediciones consecutivas realizadas con un esfigmomanómetro oscilométrico automático OMRON HEM-907 (OMRON Healthcare Co. Ltd., Kyoto, Japón), que fue validado de acuerdo con protocolos internacionales(141). Todos los procedimientos fueron certificados bajo las normas de calidad ISO-9001.

## **Factores de riesgo cardiovascular**

Se consideraron las siguientes variables continuas para representar los principales factores de riesgo cardiovascular tradicionales: colesterol LDL, colesterol HDL, presión arterial sistólica y diastólica y glucosa en ayunas. También definimos el hábito de fumar como el antecedente de haber fumado en los últimos 30 días.

## **Aterosclerosis subclínica**

Los participantes se sometieron a un protocolo de ultrasonido vascular 2D(201) para buscar activamente placas ateroscleróticas en la arteria carótida. Se utilizó una estación de ultrasonido Philips iU22 (Philips Healthcare, Bothell, WA), con un transductor de 3-9 MHz(91). Se definió una placa como una protrusión focal en el lumen arterial de espesor  $> 0,5$  mm ó  $> 50\%$  del grosor íntima-media circundante, o un espesor difuso  $> 1,5$  mm medido entre las interfaces medio-adventicia e íntima-lumen(202). Los estudios de ultrasonidos se analizaron con QLab9 (Philips Healthcare, Bothel, WA, EE.UU.) en el laboratorio central de imágenes del CNIC.

## **Medidas de laboratorio**

Se colectó sangre venosa periférica después de un ayuno de 8 horas. Se utilizó un anticuerpo monoclonal basado en anticuerpos 4E6 ELISA (Mercodia AB, Suecia) para medir la concentración en plasma de LDL-ox. El anticuerpo monoclonal 4E6 se dirige contra un epítipo conformacional en el resto de la apoB-100 de LDL que se genera como consecuencia de la sustitución de residuos de lisina de apoB-100 por aldehídos(203). Los triglicéridos, el colesterol total, el colesterol HDL y la glucosa se midieron en suero con métodos de espectrofotométricos en el analizador Architect-Ci8200, utilizando los kits del fabricante (Laboratorio de Instrumentación). El colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-colesterol) se calculó utilizando la ecuación de Friedewald(142). Todos los ensayos bioquímicos se procesaron en el laboratorio CQS (Madrid, España).

## **Análisis estadístico**

Se calcularon los odds ratios entre cuartiles (OR) con modelos lineales generalizados multivariados para cuantificar la asociación de LDL-ox y factores de riesgo cardiovascular con aterosclerosis carotídea subclínica. Para evaluar la asociación independiente de LDL-ox con placas carotídeas se realizó un modelo básico ajustado por edad, sexo y LDL-colesterol, modelos intermedios ajustados adicionalmente para cada factor de riesgo cardiovascular y un modelo completo ajustado para todos los factores simultáneamente; pero no se ajustó por presión arterial diastólica para evitar colinealidad. LDL-ox está fuertemente asociado con el colesterol LDL, que es la razón por la que se incluye en todos los ajustes. Se utilizaron modelos incluyendo LDL-ox como una variable continua para evaluar la tendencia lineal. Se aplicó un análisis de mediación sobre los

resultados del modelo de tendencia a cada uno de los modelos intermedios para describir el efecto del LDL-ox sobre las placas carotídeas mediado por cada factor de riesgo.

De manera similar, para evaluar la mediación potencial de LDL-ox sobre la relación entre factores de riesgo cardiovascular y placas carotídeas, se comparó un modelo del efecto de cada factor de riesgo ajustado por edad, sexo y colesterol LDL con un modelo ajustado adicionalmente por LDL-ox. Cada factor de riesgo fue considerado uno por uno y no ajustado por los otros factores de riesgo porque este análisis tiene como objetivo identificar la mediación LDL-ox, no el efecto independiente de cada factor de riesgo tradicional. Se utilizaron modelos que incluían cada factor de riesgo como una variable continua para evaluar las tendencias lineales. Se aplicó un análisis de mediación sobre los resultados de estos modelos.

Los análisis de mediación usaron regresión probit para modelar el aumento de probabilidad de placa asociado con cada incremento unitario de LDL-ox o de cada factor de riesgo, y cuánto cambia este aumento después de ajustar el mediador potencial. Estas regresiones fueron ajustadas por edad, sexo y colesterol LDL. Se estimó el efecto directo medio, el efecto medio de mediación causal y la proporción mediada en el efecto total usando bootstrap no paramétrico con 1000 re-entradas e intervalos de confianza basados en percentiles(146).

Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ . Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico R (versión 3.1)(121) y el paquete de mediación(146).

## Resultados

En los participantes del PESA (n = 4069) la media de la edad fue de 45,8 (4,3) años, y el 62,9% fueron hombres. La media de concentración plasmática de LDL-ox fue de 51,7 (16,9) U/L. En total, el 30,33% de los participantes presentaron placas en carótida, 42,4% dislipidemia, 1,9%, diabetes, 11,6%, hipertensión y 28,2% antecedentes de tabaquismo (Tabla 6-1).

Tabla 6-1. *Características de los participantes del estudio.*

|   | <b>Total</b><br><b>N= 4069</b> | <b>Sin placa</b><br><b>carotídea</b><br><b>N= 2835</b> | <b>Con placa</b><br><b>carotídea</b><br><b>N= 1234</b> | <b>Valor p</b> |
|---|--------------------------------|--|--|----------------|
| Varones   | 62.9 [2560]                    | 59.2 [1677]  | 71.6 [883]   | <0.001         |
| Edad (años)                                     | 45.8 (4.3)                     | 45.3 (4.2)   | 47.0 (4.3)   | <0.001         |
| IMC (kg/m <sup>2</sup> )                        | 26.1 (3.8)                     | 25.9 (3.8)   | 26.6 (3.8)   | <0.001         |
| Presión arterial sistólica (mmHg)               | 116.3 (12.6)                   | 115.2 (12.4)   | 118.8 (12.8)   | <0.001         |
| Presión arterial diastólica (mmHg)              | 72.5 (9.4)                     | 71.8 (9.3)   | 74.0 (9.5)   | <0.001         |
| Colesterol Total (mg/dL)                        | 200.4 (33.0)                   | 198.1 (32.5)   | 205.7 (33.7)   | <0.001         |
| LDL-c (mg/dL)                                   | 132.5 (29.6)                   | 130.1 (29.0)   | 138.0 (30.2)   | <0.001         |
| HDL-c (mg/dL)                                   | 49.1 (12.2)                    | 49.9 (12.3)  | 47.3 (11.9)  | <0.001         |
| Triglycerides (mg/dL)                           | 93.1 (49.2)                    | 89.7 (46.1)  | 100.9 (54.8)   | <0.001         |
| Glucosa en ayunas (mg/dL)                       | 90.4 (12.9)                    | 89.7 (13.1)  | 92.0 (12.3)  | <0.001         |
| Hemoglobina A1c (%)                             | 5.4 (0.5)                      | 5.4 (0.5)  | 5.5 (0.5)  | <0.001         |
| LDL-ox (U/L)                                    | 51.7 (16.9)                    | 50.3 (16.1)  | 55.0 (18.1)  | <0.001         |
| <b><i>Factores de Riesgo Cardiovascular</i></b> |                                |  |  |                |
| Dislipidemia                                    | 42.4 [1724]                    | 39.4 [1117]  | 49.2 [607]   | <0.001         |
| Colesterol Total ≥ 240 mg/dL                    | 11.4 [465]                     | 9.9 [282]  | 14.8 [183]   | <0.001         |
| LDL-c ≥ 160 mg/dL                               | 17.0 [691]                     | 14.6 [414]   | 22.4 [277]   | <0.001         |
| HDL-c < 40 mg/dL (men) or <50 mg/dL (women)     | 32.6 [1328]                    | 30.9 [877]   | 36.5 [451]   | 0.001          |
| Diabetes  | 1.9 [78]                       | 1.6 [45]   | 2.7 [33]   | 0.028          |
| Hipertensión                                    | 11.6 [473]                     | 9.9 [280]  | 15.6 [193]   | <0.001         |
| Tabaquismo                                      | 28.2 [1149]                    | 26.3 [745]   | 32.7 [404]   | <0.001         |

Se indican la media (desviación estándar) o el porcentaje [recuento]. P calculados a partir de las pruebas t o Chi-cuadrado. IMC: Índice de masa corporal. HDL-c: HDL colesterol. LDL-c: LDL colesterol. LDL-ox: LDL oxidada

La frecuencia de placas carotídeas aumentó a través de los cuartiles de LDL-ox (Tabla 6-2). En el modelo ajustado por edad y sexo, el OR para las placas carotídeas en el cuarto cuartil de LDL-ox en comparación con el primero fue de 1.60 (intervalo de confianza del 95% 1.31, 1.95). Esta relación se confunde en parte con el efecto del colesterol LDL, pero sigue siendo significativa después del ajuste: 1.31 (1.05, 1.65). Además, este OR permaneció similar y significativo después de un ajuste adicional por cada factor de riesgo cardiovascular (presión arterial, glucosa en ayunas, colesterol HDL y tabaquismo): por encima de 1,27 (Tabla 6-2). Incluso si la asociación entre las placas carotídeas y LDL-ox en todos los modelos ajustados por colesterol LDL no fuese estrictamente lineal, con un mínimo en el 2º cuartil, las probabilidades de presentar placas carotídeas aumentaron linealmente con una relación de incremento de 1,06 (1,01, 1,12) por cada 10 unidades de LDL-ox ( $p = 0,02$  para la tendencia), después del ajuste con todos los factores de riesgo cardiovascular simultáneamente, lo que implica que la asociación es independiente de todos los demás factores de riesgo cardiovascular (Tabla 6-2).

Suponiendo una cadena causal en la que el LDL-ox causa factores de riesgo cardiovascular y, a través de ellos, la aterosclerosis carotídea ocurre, el efecto LDL-ox total sería OR 1,13 por 10 unidades de LDL-ox y el efecto directo (no mediado por cada uno de los factores de riesgo cardiovascular) OR 1,08 por 10 unidades de LDL-ox (Tabla 6-2).

Table 6-2. Frecuencia y odds ratio (intervalo de confianza del 95%) para las placas carotídeas comparando los tres cuartiles más altos con el primer cuartil de LDL oxidada ajustado para otros factores de riesgo cardiovascular.

|                                      | Cuartiles de LDL-ox (U/L) |                     |                     |                     | OR por<br>10<br>unidades<br>de LDL-<br>ox (U/L) | p<br>tendencia |
|--------------------------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---|----------------|
|                                      | (Inferior,<br>39,9]       | (39,9,49,4]         | (49,4,60,8]         | (60,8,<br>Superior] |   |                |
| <b>N</b>                             | 1019                      | 1016                | 1017                | 1017                |   |                |
| <b>Promedio LDL-ox (U/L)</b>         | 33.06                     | 44.70               | 54.68               | 74.55               |   |                |
| <b>Frecuencia de placas (%)</b>      | 24.7                      | 25.8                | 31.3                | 39.5                |   |                |
| Modelo mínimo (adj. por edad y sexo) | 1<br>(Referencia)         | 0.96<br>(0.78,1.17) | 1.18<br>(0.96,1.44) | 1.60<br>(1.31,1.95) | 1.13<br>(1.08,1.18)                             | <0.001         |
| Modelo Básico                        | 1<br>(Referencia)         | 0.91<br>(0.74,1.11) | 1.05<br>(0.85,1.29) | 1.31<br>(1.05,1.65) | 1.08<br>(1.03,1.14)                             | 0.001          |
| Modelo Básico y presión sistólica    | 1<br>(Referencia)         | 0.90<br>(0.73,1.11) | 1.03<br>(0.83,1.27) | 1.28<br>(1.02,1.61) | 1.08<br>(1.02,1.13)                             | 0.004          |
| Modelo Básico y presión diastólica   | 1<br>(Referencia)         | 0.90<br>(0.73,1.11) | 1.04<br>(0.84,1.28) | 1.29<br>(1.03,1.63) | 1.08<br>(1.03,1.13)                             | 0.002          |
| Modelo Básico y glucosa              | 1<br>(Referencia)         | 0.91<br>(0.74,1.12) | 1.04<br>(0.85,1.29) | 1.31<br>(1.04,1.65) | 1.08<br>(1.03,1.14)                             | 0.002          |
| Modelo Básico y HDL-colesterol       | 1<br>(Referencia)         | 0.90<br>(0.73,1.10) | 1.03<br>(0.83,1.27) | 1.27<br>(1.01,1.60) | 1.08<br>(1.02,1.13)                             | 0.003          |
| Modelo Básico y tabaquismo           | 1<br>(Referencia)         | 0.90<br>(0.73,1.11) | 1.02<br>(0.82,1.26) | 1.27<br>(1.01,1.60) | 1.08<br>(1.03,1.13)                             | 0.003          |
| Modelo completo                      | 1<br>(Referencia)         | 0.89<br>(0.72,1.10) | 0.99<br>(0.80,1.22) | 1.20<br>(0.96,1.52) | 1.06<br>(1.01,1.12)                             | 0.02           |

Los odds ratios se estiman a partir de modelos de regresión logística ajustados por edad, sexo y colesterol LDL (modelo básico). El modelo completo se ajusta para todos los factores mostrados, excepto para la presión arterial diastólica, que se excluyó para evitar la colinealidad.

El análisis de mediación de los diferentes factores de riesgo cardiovascular sobre la asociación entre las placas carotídeas y LDL-ox, mostró que la presión arterial sistólica medió el 9,27% de esta asociación y el colesterol HDL el 8,39% (Tabla 6-3, Figura 6-2).

Tabla 6-3. Efecto ajustado marginalmente del aumento de 10 U/L de LDL-ox plasmático en la proporción de placas carotídeas (medida como aumento de probabilidad) que está mediada por diferentes factores de riesgo cardiovascular.

| <b>Probabilidad de incremento (por 10 U/L de LDL-ox)</b> | <b>Total</b>                         | <b>Efecto Directo (promedio)</b>     | <b>Efecto Mediado (promedio)</b>     | <b>Proporción mediada</b>         |
|--|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Presión sistólica (mediado por)</b>                   | 0.0141<br>(0.0057,0.0202)<br>p<0.001 | 0.0128<br>(0.0040,0.0192)<br>p<0.001 | 0.0013<br>(0.0005,0.0023)<br>p<0.001 | 9.27%<br>(3.33,27.57)%<br>p<0.001 |
| <b>Presión diastólica (mediado por)</b>                  | 0.0141<br>(0.0060,0.0206)<br>p<0.001 | 0.0134<br>(0.0055,0.0200)<br>p<0.001 | 0.0006<br>(-0.0002,0.0015)<br>p=0.11 | 4.58%<br>(-1.45,15.15)%<br>p=0.11 |
| <b>Glucosa (mediado por)</b>                             | 0.0141<br>(0.0062,0.0208)<br>p<0.001 | 0.0139<br>(0.0059,0.0205)<br>p<0.001 | 0.0002<br>(-0.0001,0.0008)<br>p=0.20 | 1.49%<br>(-0.76,7.53)%<br>p=0.20  |
| <b>HDL-colesterol (mediado por)</b>                      | 0.0141<br>(0.0059,0.0204)<br>p=0.004 | 0.0129<br>(0.0046,0.0193)<br>p=0.006 | 0.0012<br>(0.0003,0.0022)<br>p=0.01  | 8.39%<br>(1.67,23.77)%<br>p=0.02  |

Las cifras muestran el efecto total, efecto directo y efecto mediado (por cada factor de riesgo cardiovascular) de LDL-ox como el aumento en la probabilidad de que el sujeto tenga una placa en la carótida y la proporción del efecto total de LDL-ox que está mediada por cada factor de riesgo. Las cifras entre paréntesis muestran el intervalo de confianza del 95% basado en bootstrap no paramétrico con 1000 repeticiones). Se usaron regresiones de Probit para modelar la probabilidad de placa. Los modelos fueron ajustados por edad, sexo y colesterol LDL.

Como era de esperar, la proporción de placas carotídeas se asoció con los factores de riesgo cardiovascular tradicionales (Tabla 6-4). El ajuste por LDL-ox disminuyó la OR estimada para algunos factores de riesgo sólo modestamente, excepto para el colesterol LDL, para el cual fue sustancial. Suponiendo una cadena causal en la que cada factor de riesgo aumenta el estrés oxidativo, y esto provoca aterosclerosis, los OR antes del ajuste por el efecto de LDL-ox representarían el efecto total y después del ajuste por LDL-ox el efecto directo.

Tabla 6-4. Frecuencia y odds ratio (intervalo de confianza del 95%) por 10 unidades para las placas carotídeas comparando los tres cuartiles más altos con el primer cuartil de cada factor de riesgo, o la presencia vs ausencia, ajustada para LDL-ox.

|  | Cuartiles (unidades) |                     |                     |                     | OR por<br>10<br>unidades | p<br>tendencia |
|--|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|----------------|
|  | (Inferior,112]       | (112,131]           | (131,151]           | (151,Superior]      |                          |                |
| <b>LDL-colesterol</b>                    |                      |                     |                     |                     |                          |                |
| N  | 1019                 | 1027                | 1006                | 1017                |                          |                |
| Promedio (mg/dL)                         | 96.81                | 121.53              | 140.64              | 171.23              |                          |                |
| Frecuencia de placas (%)                 | 23.3                 | 28.8                | 30.3                | 38.9                |                          |                |
| Total (adj. por edad y sexo)             | 1<br>(Referencia)    | 1.22<br>(0.99,1.49) | 1.24<br>(1.01,1.52) | 1.73<br>(1.42,2.11) | 1.07<br>(1.05,1.10)      | <0.001         |
| Directo (adicionalmente adj. por LDL-ox) | 1<br>(Referencia)    | 1.14<br>(0.92,1.40) | 1.11<br>(0.89,1.37) | 1.42<br>(1.13,1.78) | 1.04<br>(1.01,1.07)      | 0.003          |
| <b>Presión sistólica</b>                 |                      |                     |                     |                     |                          |                |
| N  | 1081                 | 998                 | 1058                | 932                 |                          |                |
| Promedio (mmHg)                          | 101.75               | 112.13              | 119.82              | 133.5               |                          |                |
| Frecuencia de placas (%)                 | 21.9                 | 28.4                | 33.6                | 38.4                |                          |                |
| Total (adj. por edad, sexo y LDL-c)      | 1<br>(Referencia)    | 1.17<br>(0.94,1.44) | 1.34<br>(1.08,1.67) | 1.49<br>(1.19,1.86) | 1.12<br>(1.05,1.19)      | <0.001         |
| Directo (adicionalmente adj. por LDL-ox) | 1<br>(Referencia)    | 1.17<br>(0.94,1.44) | 1.32<br>(1.06,1.64) | 1.45<br>(1.16,1.82) | 1.11<br>(1.04,1.18)      | 0.001          |
| <b>Presión diastólica</b>                |                      |                     |                     |                     |                          |                |
| N  | 1109                 | 1048                | 923                 | 989                 |                          |                |
| Promedio (mmHg)                          | 61.66                | 69.49               | 75.29               | 85.12               |                          |                |
| Frecuencia de placas (%)                 | 23.6                 | 30                  | 31.7                | 36.9                |                          |                |
| Total (adj. por edad, sexo y LDL-c)      | 1<br>(Referencia)    | 1.19<br>(0.97,1.45) | 1.11<br>(0.90,1.36) | 1.26<br>(1.03,1.54) | 1.08<br>(1.00,1.16)      | 0.06           |
| Directo (adicionalmente adj. por LDL-ox) | 1<br>(Referencia)    | 1.19<br>(0.98,1.45) | 1.09<br>(0.89,1.34) | 1.23<br>(1.00,1.51) | 1.06<br>(0.98,1.15)      | 0.12           |
| <b>Glucosa</b>                           |                      |                     |                     |                     |                          |                |
| N  | 1200                 | 944                 | 934                 | 991                 |                          |                |
| Promedio (mmHg)                          | 79.89                | 87.05               | 92.45               | 104.35              |                          |                |
| Frecuencia de placas (%)                 | 25.1                 | 28.2                | 32.2                | 36.9                |                          |                |
| Total (adj. por edad, sexo y LDL-c)      | 1<br>(Referencia)    | 1<br>(0.82,1.23)    | 1.08<br>(0.89,1.32) | 1.16<br>(0.95,1.42) | 1.04<br>(0.98,1.10)      | 0.17           |
| Directo (adicionalmente adj. por LDL-ox) | 1<br>(Referencia)    | 1.01<br>(0.82,1.23) | 1.09<br>(0.89,1.33) | 1.14<br>(0.93,1.39) | 1.03<br>(0.98,1.09)      | 0.22           |

Los odds ratios, por 10 unidades, se calculan a partir de modelos de regresión logística ajustados por edad, sexo y colesterol LDL (modelo de efecto total). El modelo ajustado adicionalmente para ox-LDL muestra el odds ratio después de restar una mediación potencial de ox-LDL (modelo de efecto directo)

Tabla 6-4. Frecuencia y odds ratio (intervalo de confianza del 95%) por 10 unidades para las placas carotídeas comparando los tres cuartiles más altos con el primer cuartil de cada factor de riesgo, o la presencia vs ausencia, ajustada para LDL-ox. (continuación)

|  | Cuartiles (unidades) |                     |                     |                     | OR por<br>10<br>unidades | p<br>tendencia |
|--|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|----------------|
|  | (Inferior,40.4]      | (40.4,47.5]         | (47.5,56.5]         | (56.5,Superior]     |                          |                |
| <b>HDL-colesterol</b>                    |                      |                     |                     |                     |                          |                |
| N  | 1030                 | 1008                | 1019                | 1012                |                          |                |
| Promedio (mmHg)                          | 35.22                | 44.02               | 51.74               | 65.76               |                          |                |
| Frecuencia de placas (%)                 | 36.6                 | 32.5                | 27.6                | 24.5                |                          |                |
| Total (adj. por edad, sexo y LDL-c)      | 1<br>(Referencia)    | 0.87<br>(0.72,1.05) | 0.78<br>(0.64,0.95) | 0.73<br>(0.58,0.90) | 0.91<br>(0.85,0.97)      | 0.003          |
| Directo (adicionalmente adj. por LDL-ox) | 1<br>(Referencia)    | 0.88<br>(0.73,1.06) | 0.8<br>(0.65,0.97)  | 0.75<br>(0.60,0.93) | 0.92<br>(0.86,0.98)      | 0.007          |
| <b>Tabaquismo</b>                        |                      |                     |                     |                     |                          |                |
| N  | <b>No</b><br>2920    |                     | <b>Si</b><br>1149   |                     |                          |                |
| Frecuencia de placas (%)                 | 28.4                 |                     | 35.2                |                     |                          |                |
| Total (adj. por edad, sexo y LDL-c)      | 1<br>(Referencia)    |                     | 1.39<br>(1.20,1.62) |                     |                          | <0.001         |
| Directo (adicionalmente adj. por LDL-ox) | 1<br>(Referencia)    |                     | 1.37<br>(1.18,1.59) |                     |                          | <0.001         |

Los odds ratios, por 10 unidades, se calculan a partir de modelos de regresión logística ajustados por edad, sexo y colesterol LDL (modelo de efecto total). El modelo ajustado adicionalmente para ox-LDL muestra el odds ratio después de restar una mediación potencial de ox-LDL (modelo de efecto directo)

Así, el LDL-ox medió una cantidad estadísticamente significativa de la asociación de factores de riesgo con placas carotídeas. Específicamente: 37,18% para el colesterol LDL, 7,48% para la presión arterial sistólica, 9,34% para el colesterol HDL y 4,46% para el tabaco (Tabla 6-5, Figura 6-2).

Tabla 6-5. Efecto ajustado marginalmente de 10 unidades de aumento en cada factor de riesgo en la proporción de placas carotídeas (medido como el aumento de la probabilidad) que está mediada por LDL-ox.

| <b>Probabilidad de incremento (por 10 unidades de factor de riesgo)</b> | <b>Total</b>                            | <b>Efecto Directo (promedio)</b>       | <b>Efecto Mediado (promedio)</b>        | <b>Proporción Mediada</b>            |
|---|---|--|---|--------------------------------------|
| <b>LDL-colesterol (por 10 mg/dL)</b>                                    | 0.0093<br>(0.0072,0.0104)<br>p<0.001    | 0.0059<br>(0.0022,0.0085)<br>p=0.006   | 0.0035<br>(0.0013,0.0059)<br>p<0.001    | 37.18%<br>(13.38,71.14)%<br>p<0.001  |
| <b>Presión Sistólica (por 10 mmHg)</b>                                  | 0.0119<br>(0.0082,0.0124)<br>p<0.001    | 0.0110<br>(0.0065,0.0118)<br>p<0.001   | 0.0009<br>(0.0002,0.0019)<br>p=0.002    | 7.48%<br>(2.09,19.12)%<br>p=0.002    |
| <b>Presión Diastólica (por 10 mmHg)</b>                                 | 0.0121<br>(-0.0003,0.0190)<br>p=0.06    | 0.0103<br>(-0.0025,0.0176)<br>p=0.11   | 0.0018<br>(0.0005,0.0033)<br>p=0.006    | 15.18%<br>(-21.71,103.23)%<br>p=0.06 |
| <b>Glucosa (por 10 mg/dL)</b>   | 0.0066<br>(-0.0037,0.0146)<br>p=0.19    | 0.0060<br>(-0.0042,0.0139)<br>p=0.23   | 0.0006<br>(0.0001,0.0016)<br>p=0.02     | 9.63%<br>(-57.30,81.50)%<br>p=0.19   |
| <b>HDL-colesterol (por 10 mg/dL)</b>                                    | -0.0211<br>(-0.0367,-0.0071)<br>p=0.006 | -0.0191<br>(-0.0352,-0.0053)<br>p=0.01 | -0.0020<br>(-0.0035,-0.0006)<br>p=0.002 | 9.34%<br>(2.72,28.57)%<br>p=0.008    |
| <b>Tabaquismo (si)</b>  | 0.0674<br>(0.0356,0.0989)<br>p<0.001    | 0.0644<br>(0.0329,0.0960)<br>p<0.001   | 0.0030<br>(0.0008,0.0058)<br>p=0.006    | 4.46%<br>(1.10,10.72)%<br>p=0.006    |

Las cifras muestran el efecto total, el efecto directo y el efecto mediado (por ox-LDL) de cada factor de riesgo cardiovascular como el aumento en la probabilidad de que el sujeto tenga una placa en la carótida y la proporción del efecto total de cada factor de riesgo que está mediada por ox-LDL. Las cifras entre paréntesis muestran el intervalo de confianza del 95% basado en bootstrap no paramétrico con 1000 repeticiones). Se usaron regresiones de Probit para modelar la probabilidad de placa. Los modelos fueron ajustados por edad, sexo y colesterol LDL.

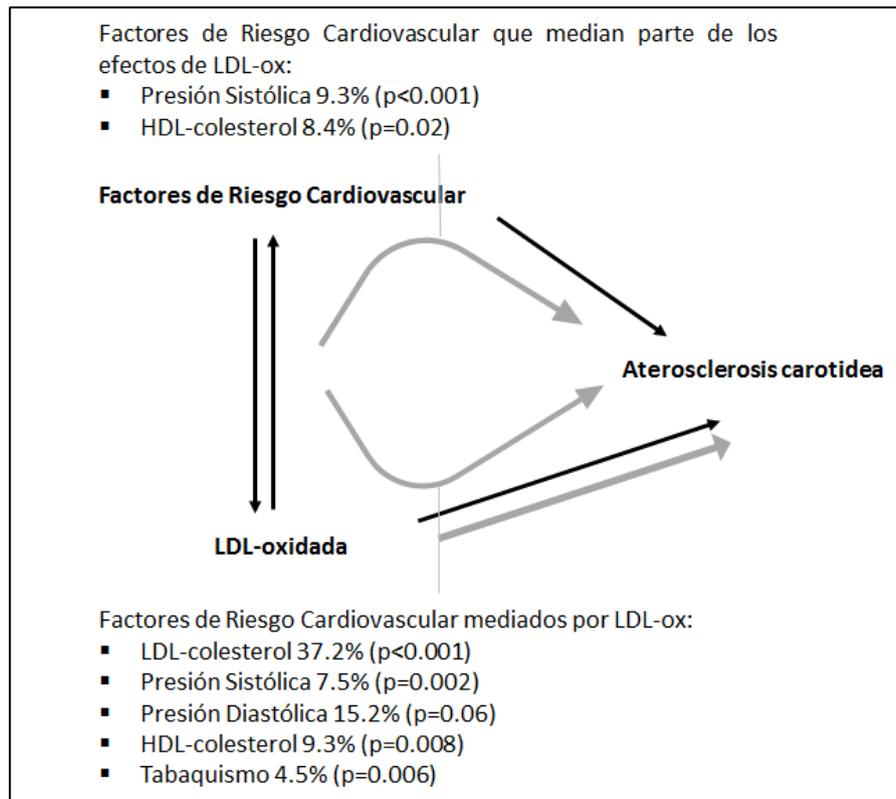


Figura 6-2. Resumen de resultados en la representación gráfica.

## Discusión

En este estudio con 4069 participantes del estudio PESA con edades entre 40 y 55 años, el LDL-ox se asoció con la presencia de placas carotídeas independientemente de los factores de riesgo cardiovascular tradicionales. Una fracción adicional de un supuesto efecto del estrés oxidativo, representado por el LDL-ox, sobre la aterosclerosis carotídea está mediada por la presión sanguínea incrementada y niveles bajos de HDL-colesterol. Curiosamente, una fracción modesta de la asociación de placas carotídeas con presión arterial sistólica, HDL-colesterol y tabaquismo, también fue a su vez mediada por LDL-ox, lo que sugiere una compleja red bidireccional causal. A pesar de ello, más de un tercio de la asociación de LDL-colesterol con aterosclerosis carotídea depende de estar acompañado de aumentos en LDL-ox. Por lo tanto, el LDL-ox plasmático podría

complementar de manera importante la información sobre el colesterol LDL como un marcador de alto riesgo cardiovascular para la presencia de placas carotídeas.

La oxidación completa de LDL ocurre principalmente en el espacio subendotelial de las arterias(181). Sin embargo, la primera modificación oxidativa tiene lugar en la sangre periférica; produciéndose la oxidación de lípidos de LDL mientras que la ApoB permanece solamente mínimamente alterada(204). Estas partículas de LDL modificadas contribuyen a la adhesión de los monocitos y la activación de los macrófagos(204). La siguiente etapa de oxidación de la LDL ocurre en la íntima, donde los LDL-ox son capturados por los macrófagos a través de receptores “scavenger”, convirtiéndose finalmente en células espuma(181). La modificación oxidativa del LDL es el paso inicial de la aterogénesis, teniendo un rol fundamental en las etapas posteriores de la evolución de la placa aterosclerótica(179), incluso desempeñando un papel en la ruptura de la placa(205). El LDL-ox plasmático detectado en la etapa tardía de la aterosclerosis, podría representar una liberación de LDL-ox a la sangre periférica como consecuencia de la ruptura de placas. Eso explicaría el aumento de LDL-ox en sujetos con eventos cardiovasculares agudos(182). En las personas jóvenes, antes de la evolución de la aterosclerosis, el LDL-ox circulante puede reflejar el nivel de estrés oxidativo(31) y, como tal, estudiarla proporciona una visión de la fisiopatología de los factores de riesgo y cómo producen la aterosclerosis.

Varios estudios longitudinales han reportado sobre la relación entre el LDL-ox plasmática con estadios tardíos de aterosclerosis y muerte cardiaca, aunque no todos apoyan la asociación encontrada(206). La relación entre el LDL-ox con aterosclerosis temprana también ha sido estudiada(186,192–195,197,198), aunque esta etapa

usualmente se ha estudiado a través de análisis transversales. Sólo Hulthe J. y cols.(195) y Wallenfeldt K y cols.(186) proporcionaron datos longitudinales con cambios en el grosor íntima-media. Casi todos los estudios describen una asociación independiente entre LDL-ox y aterosclerosis después de ajustar por colesterol LDL y otros factores de riesgo cardiovascular. Sin embargo, la mayoría de ellos se centraron en sujetos entre la sexta y octava década de la vida, y sólo algunos de ellos incluyeron sujetos más jóvenes como parte de su muestra, a partir de los 40 años de edad(193,197), pero no realizaron análisis estratificados específicos en sus participantes más jóvenes. Por el contrario, el estudio ASKLEPIOS, con 2524 sujetos entre 35 y 55 años, es el único cuyo límite de edad superior coincide con el nuestro. Este estudio encontró asociación de LDL-ox con placas carotídeas en análisis univariados pero la asociación no alcanzó significancia estadística después de ajustar por los principales factores de riesgo cardiovascular(198). En nuestro estudio, con 4069 sujetos entre 40 y 55 años de edad, demostramos asociación independiente entre el LDL-ox y la aterosclerosis carotídea subclínica, lo que confirma, a partir de datos clínicos humanos de estudios carotídeos, las teorías originadas en laboratorio que postulan que el LDL-ox está involucrado en las primeras etapas de la aterosclerosis.

El aumento del LDL-ox se produce en asociación con los factores de riesgo cardiovascular tradicionales(207). En la diabetes, el estrés oxidativo causado por la enfermedad se ha propuesto como promotor de las lesiones cardiovasculares(208). El tabaquismo aumenta el estrés oxidativo y LDL-ox(209) con un aumento en la expresión de CD36 inducido por la nicotina que promueve la captación de LDL-ox(210). También la obesidad y el síndrome metabólico son condiciones con altos niveles de estrés oxidativo(190). Curiosamente, además de su papel como mediador entre los factores de

riesgo y las enfermedades cardiovasculares, el estrés oxidativo también se ha propuesto como promotor de factores de riesgo cardiovascular. De hecho, se ha atribuido un papel notable en el desarrollo de la hipertensión(211). Nuestro análisis de mediación muestra que las vías que entrelazan los factores de riesgo cardiovascular, LDL-ox y aterosclerosis son de hecho intrincadas y confirman ambas direcciones previamente propuestas (Figura 6-2). Una fracción del efecto aterosclerótico del LDL-ox puede explicarse por un aumento de la presión arterial y, a su vez, parte del efecto de los trastornos lipídicos (colesterol LDL alto y colesterol HDL bajo), hipertensión y tabaquismo dependen de un aumento de LDL-ox. La glucosa en ayunas, que se utilizó como indicador de los factores de riesgo relacionados con la diabetes, no se asoció principalmente con la aterosclerosis carotídea en este rango de edad, en la cual hubo un porcentaje muy pequeño de participantes diabéticos, lo que impidió evaluar la mediación porque no hubo un efecto total significativo. Inspirados en la teoría oxidativa de la aterosclerosis, varios ensayos clínicos de prevención primaria han probado vitaminas antioxidantes con el objetivo de inhibir la oxidación de LDL y posteriormente limitar la aterosclerosis(212). Sus resultados decepcionantes pueden estar relacionados con la bidireccionalidad que encontramos y la modesta magnitud de los efectos compartidos entre los factores de riesgo cardiovascular y LDL-ox, que fueron inferiores al 10%.

Las herramientas clínicas para la evaluación de riesgos siempre son necesarias para la toma de decisiones en la prevención primaria. Varios estudios prospectivos han reportado sobre el papel de LDL-ox plasmático como marcador predictivo de enfermedades cardiovasculares agudas(200,213). Se observó que el 37,2% de la asociación del colesterol LDL con aterosclerosis carotídea depende de la presencia de partículas de LDL-ox. El LDL-colesterol es el factor de riesgo, entre los probados, más

asociado con la aterosclerosis carotídea con odds ratio de 1,73 entre el cuartil más alto y el más bajo. El colesterol LDL se utiliza ampliamente para el cribado del riesgo cardiovascular, así como un objetivo terapéutico. En nuestro estudio hemos observado que el efecto de LDL colesterol depende de hasta un tercio del efecto de LDL-ox, haciendo de LDL-ox un buen candidato para ser añadido a los protocolos de perfil de riesgo basados en lípidos, en particular cuando la imagen para identificar realmente la enfermedad subclínica puede no ser factible. La importancia de este parámetro será posiblemente confirmada cuando los datos prospectivos estén disponibles en la cohorte PESA.

Este estudio cuenta con técnicas estrictas de recopilación de datos y de imágenes utilizando procedimientos de control de calidad de vanguardia. Un tamaño de muestra de aproximadamente 4000 sujetos españoles de mediana edad asintomáticos y métodos estadísticos modernos ha permitido enmarcar el papel del LDL-ox plasmático en la aterosclerosis carotídea temprana en relación con los factores de riesgo cardiovascular tradicionales. No obstante, el diseño del estudio es transversal, lo que limita la capacidad de establecer que el vínculo independiente entre el estrés oxidativo y la aterosclerosis carotídea subclínica es causal. Además, nuestros hallazgos sugieren bidireccionalidad en la cadena causal de aterosclerosis (LDL-ox a hipertensión o hipertensión a LDL-ox) pero la transversalidad no permite determinar cuál inicia el proceso, en particular en la existencia implícita de mecanismos más complejos y simultáneos. Los análisis de mediación involucran métodos que utilizan modelos lineales(214), los cuales, en este estudio, aplicamos a la presencia de placas carotídeas. Sin embargo, los análisis preliminares en otros territorios produjeron relaciones no lineales más complejas. Para los modelos no lineales, la complejidad del análisis de la mediación crece y los métodos están todavía en etapa de desarrollo(215), por lo que excluimos esos territorios de

nuestros objetivos. Las regresiones se ajustaron para los principales factores de confusión potenciales, pero es posible que todavía existan confusiones residuales debido a factores de confusión no medidos o desconocidos. El LDL-ox en el plasma es uno de los marcadores del estrés oxidativo y los estudios que utilizan un marcador diferente pueden mostrar aspectos complementarios del proceso que vincula el estrés oxidativo y la aterosclerosis. No sólo la selección de marcadores puede ser relevante, el método de medición de LDL-ox, incluyendo los procesos de congelación de la muestra(216), pueden influir en los resultados finales, y estas diferencias de métodos tendrán que ser consideradas al resumir y comparar estudios. En cualquier caso, se utilizó un ensayo basado en el anticuerpo monoclonal murino, mAb-4E6(203), el mismo que la mayoría de los estudios clínicos previos sobre LDL-ox han utilizado.

En conclusión, este estudio muestra que una mayor concentración plasmática de LDL-ox se asocia con aterosclerosis carotídea subclínica temprana independientemente de los factores de riesgo cardiovascular y, en particular, de la concentración de colesterol LDL. Las trayectorias causales entre el LDL-ox y los factores de riesgo cardiovascular hacia la aterosclerosis son complejas y mutuamente dependientes. Nuestros hallazgos contribuyen a la evidencia de que el LDL-ox refleja el primer paso de la modificación oxidativa de LDL en la sangre y podría ser un marcador temprano de aterosclerosis subclínica en territorio carotídeo.

**CAPITULO VII. Asociación de ferritina y síndrome metabólico. Resultados del estudio Aragon Workers' Health Study (AWHS)**

## Resumen

La concentración de ferritina está asociada con el síndrome metabólico, pero la posibilidad de una asociación no lineal no ha sido explorada. El objetivo del estudio es analizar la relación entre los niveles séricos de ferritina y el síndrome metabólico en varones adultos españoles. Se realizó un análisis transversal de los datos del estudio Aragon Workers' Health Study (AWHS). Los participantes fueron 3386 varones adultos españoles entre 19-65 años de edad. Se excluyeron los participantes con ferritina > 500 µg/L, ferritina <12 µg/L o proteína C-reactiva > 10 mg/L. El síndrome metabólico se definió de acuerdo con la definición de consenso del 2009 del IDF-TFEP, NHLBI, AHA, WHF, IAS y IASO. La prevalencia del síndrome metabólico fue del 27,1%. Se encontró una asociación positiva entre las reservas de hierro elevadas, medidas como la concentración de ferritina sérica, y el síndrome metabólico y sus criterios. Los participantes dentro del quintil más alto de ferritina sérica tuvieron un riesgo mayor que aquellos en el quintil más bajo para la obesidad central (OR = 1,88, IC del 95%: 1,46, 2,42), hipertrigliceridemia (OR = 2,15, IC del 95%: 1,69, 2,74) y síndrome metabólico (OR = 1,92, IC del 95%: 1,48, 2,49). La asociación fue no lineal y se produjo a concentraciones séricas de ferritina por encima de 100 µg/L (aproximadamente el percentil 33). La ferritina también se asoció con resistencia a la insulina, medida por HOMA-IR (p tendencia <0,001). Nuestros resultados indican que la ferritina sérica se asocia significativamente con el síndrome metabólico y sus criterios (especialmente la obesidad central y la hipertrigliceridemia), lo que sugiere que la ferritina podría ser un marcador temprano de daño metabólico en el desarrollo del síndrome metabólico.

## Introducción

El hierro es esencial para múltiples procesos biológicos, entre los más importantes son el transporte de oxígeno y la inflamación. El papel del hierro en la inflamación está relacionado con la producción de radicales libres y estrés oxidativo. Por otra parte, la inflamación crónica y el estrés oxidativo son importantes en la patogénesis y el progreso del síndrome metabólico, y el hierro puede estar involucrado en este proceso. En los seres humanos, la concentración sérica de ferritina se correlaciona con las reservas de hierro corporal, lo que da una medida más exacta de las reservas que la cuantificación directa del hierro en el suero.

Estudios transversales han demostrado asociaciones de concentraciones elevadas de ferritina sérica con síndrome metabólico(217–219), hipertensión, dislipidemia, insulina en ayunas elevada, glucosa alta en sangre y adiposidad central(220). El aumento de las concentraciones séricas de ferritina también se asocia con la resistencia a la insulina, la diabetes mellitus tipo 2 y el síndrome metabólico en los hombres(221,222). Estudios previos sólo han estudiado la asociación lineal entre las reservas de hierro elevadas y el síndrome metabólico, y hay poca información sobre el nivel de ferritina en el que esta asociación comienza a aparecer, bajo la hipótesis de que la asociación es no lineal.

Se realizó un análisis transversal de la asociación de ferritina sérica y el síndrome metabólico en varones adultos españoles participantes en el Aragon Workers' Health Study, utilizando métodos para detectar una relación no lineal.

## **Materiales y Métodos**

AWHS es un estudio de cohorte longitudinal que estudia los factores de riesgo cardiovascular y aterosclerosis subclínica(90) entre trabajadores de la fábrica General Motors de Figueruelas (Zaragoza), España. Todos los trabajadores fueron invitados a participar, y 5456 participantes fueron reclutados al momento del análisis. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito y el estudio fue aprobado por el Comité de Ética para la Investigación Clínica (CEICA) del Gobierno Regional de Aragón. Nuestro análisis se restringió a los participantes varones (N=5104). La edad de los participantes fluctuaba entre 19 y 65 años. Un total de 1417 participantes fueron excluidos por falta de datos: 436 para la ferritina; 212 para los criterios necesarios para el diagnóstico del síndrome metabólico (perímetro de la cintura, triglicéridos, colesterol HDL, presión arterial y glucosa en ayunas); y 769 para las covariables relevantes (índice de masa corporal, insulina, proteína C reactiva, hierro sérico e información sobre la donación de sangre). Se excluyeron los participantes con proteína C-reativa > 10 mg/L (N=127) dado que la ferritina se eleva en los procesos inflamatorios agudos. También se descartaron participantes con hierro sérico > 190 µg/dL o ferritina > 500 µg/L (N=144) debido a hemocromatosis probable y aquellos con ferritina <12 µg/L (N=30). El tamaño final de la muestra fue 3386.

### **Colección de los datos**

La información sobre género, edad, antecedentes de donación de sangre, ingesta de alcohol y uso de medicamentos se basó en entrevistas clínicas, cuestionarios y autoinforme. La presión arterial se estimó como la media de tres mediciones consecutivas realizadas con un esfigmomanómetro oscilométrico automático OMRON M10-IT

(OMRON Healthcare Co. Ltd., Japón), después de 5 minutos de descanso. El examen físico incluyó altura, peso y perímetro de la cintura, que se midió con el participante de pie, en un plano en el punto medio entre el ilio y el borde costal.

### **Medidas de laboratorio**

Se recogieron muestras de sangre venosa periférica después de un ayuno de 8 horas. Todos los ensayos bioquímicos se midieron en suero. La ferritina se midió utilizando el kit Quantex Ferritin (BIOKIT, España), que se basa en una reacción antígeno-anticuerpo detectada por turbidimetría en un analizador ILAB650 (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, EUA). Se midieron triglicéridos, colesterol HDL, colesterol total, glucosa en ayunas, aspartato aminotransferasa (TGO) y alanina aminotransferasa (TGP) mediante ensayos espectrofotométricos en el analizador ILAB650, utilizando los kits del fabricante. La concentración de insulina se midió mediante inmunoensayo en muestras congeladas en un analizador Access 2 (Beckman Coulter, CA, EE.UU.) usando el kit ultrasensible del fabricante. La concentración de proteína C reactiva se midió mediante inmunoensayo turbidimétrico en un analizador Beckman Coulter Image (CA, EE.UU.) utilizando el kit de alta sensibilidad del fabricante. El colesterol LDL se estimó a partir de la fórmula de Friedewald(142), y HOMA-IR (valoración del modelo homeostático - Resistencia a la insulina) se calculó como glucosa (mg/dL) multiplicada por insulina (mU/L) dividida por 405(123). La extracción de sangre y las mediciones antropométricas y bioquímicas en este estudio fueron certificadas (ISO 9001: 2008).

## **Síndrome metabólico**

Los individuos fueron diagnosticados con síndrome metabólico de acuerdo con la definición de consenso en la declaración provisional conjunta del 2009 del IDF-TFEP, NHLBI, AHA, WHF, IAS y IASO(143). El síndrome metabólico se diagnosticó cuando los sujetos cumplían al menos 3 de los 5 siguientes criterios del síndrome metabólico: perímetro de la cintura  $\geq 102$  cm, triglicéridos  $\geq 1,7$  mmol/L ( $\geq 150$  mg/dL) o tratamiento farmacológico para los niveles elevados de triglicéridos, colesterol HDL  $< 1,03$  mmol/L ( $< 40$  mg/dL) o tratamiento farmacológico para niveles bajos de colesterol HDL, presión arterial elevada (presión sistólica  $\geq 130$  mmHg, presión diastólica  $\geq 85$  mmHg, o tratamiento antihipertensivo en un paciente con antecedentes de hipertensión), e hiperglucemia (glucosa  $\geq 5,6$  mmol/L [ $\geq 100$  mg/dL] o tratamiento farmacológico para la glucosa elevada). A partir de aquí se denotan estas variables con el sufijo MSC (criterio de síndrome metabólico) para distinguirlas de situaciones clínicas generales con el mismo nombre.

## **Análisis estadístico**

Los participantes se dividieron en quintiles de concentración de ferritina basándose en la distribución de la muestra. Las transaminasas (TGO y TGP) se clasificaron según los valores de referencia (normal:  $< 40$  U/L, alto normal: 40-100 U/L, y alto:  $> 100$  U/L). HOMA-IR se transformó a logaritmo. Las diferencias de medias ajustadas entre el quintil de concentración de ferritina más bajo y cada uno de los otros quintiles se calcularon usando una regresión lineal multivariable. Para las variables dicotómicas, las relaciones de odds ratio entre quintiles se calcularon mediante regresión logística multivariable. Los modelos fueron ajustados por edad (continua), historia de donación de sangre (como variable dicotómica), actividad transaminasa (categorizada) y

consumo diario de alcohol (continua) (Modelo 1). Los modelos se ajustaron adicionalmente para los parámetros del síndrome metabólico continuo (perímetro de la cintura, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica, glucosa en ayunas, triglicéridos y colesterol HDL) omitiendo algunos de ellos en el caso de introducir colinealidad (Modelo 2). Para explorar más a fondo la forma de la relación entre los niveles de ferritina y el síndrome metabólico, se utilizaron splines cúbicos restringidos con nudos en los percentiles de concentración de ferritina 5, 27,5, 50, 72,5 y 95 en un modelo logístico ajustado de la misma manera que el modelo 1. Los cambios observados en la pendiente se confirmaron con una spline lineal con nudos a 100 y 300  $\mu\text{g/L}$  (percentiles 27,7 y 86,3). Para evaluar la importancia potencial de la inflamación como factor de confusión de la relación entre la ferritina y el síndrome metabólico, se realizó un análisis de sensibilidad ajustando nuestros modelos por proteína C reactiva. Todos los análisis estadísticos se realizaron con STATA (versión 11.1).

## **Resultados**

### **Características basales**

La prevalencia del síndrome metabólico en esta muestra fue del 27,1%. La concentración media de ferritina (desviación estándar) fue de 201,4 (114,2)  $\mu\text{g/L}$  entre los participantes del estudio con síndrome metabólico y 163,8 (101,6)  $\mu\text{g/L}$  entre los que no lo tenían. Los participantes con síndrome metabólico tenían más probabilidades de ser mayores (Tabla 7-1).

Tabla 7-1. Características de la población estudiada y subpoblaciones con y sin síndrome metabólico

|  | <b>Total</b>  | <b>Sin Síndrome Metabólico</b> | <b>Con Síndrome Metabólico</b> | <b>Valor p</b> |
|--|---------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------|
| <b>N</b>                                       | 3386          | 2469                           | 917                            |                |
| <b>Edad (años)</b>                             | 48.9 (8.7)    | 47.6 (9.4)                     | 52.2 (5.2)                     | <0.001         |
| <b>Ferritina (µg/L)</b>                        | 174.0 (106.4) | 163.8 (101.6)                  | 201.4 (114.2)                  | <0.001         |
| <b>Índice masa corporal (kg/m<sup>2</sup>)</b> | 27.6 (3.6)    | 26.6 (3.0)                     | 30.3 (3.6)                     | <0.001         |
| <b>Perímetro de cintura (cm)</b>               | 96.9 (9.7)    | 94.0 (8.4)                     | 104.8 (8.8)                    | <0.001         |
| <b>Colesterol Total (mg/dL)</b>                | 212.0 (37.6)  | 209.7 (37.2)                   | 218.2 (38.1)                   | <0.001         |
| <b>Triglicéridos (mg/dL)</b>                   | 142.9 (92.1)  | 120.8 (71.2)                   | 202.5 (113.1)                  | <0.001         |
| <b>Colesterol HDL (mg/dL)</b>                  | 52.7 (10.9)   | 54.5 (10.7)                    | 47.8 (10.0)                    | <0.001         |
| <b>Colesterol LDL (mg/dL)*</b>                 | 131.4 (31.9)  | 131.2 (31.9)                   | 132.0 (32.0)                   | 0.503          |
| <b>Presión arterial sistólica (mmHg)</b>       | 126.4 (14.4)  | 123.7 (13.2)                   | 133.9 (15.1)                   | <0.001         |
| <b>Presión arterial diastólica (mmHg)</b>      | 83.4 (9.8)    | 81.1 (9.2)                     | 89.4 (8.9)                     | <0.001         |
| <b>Glucosa en ayunas (mg/dL)</b>               | 98.0 (18.0)   | 94.2 (14.1)                    | 108.3 (22.6)                   | <0.001         |
| <b>HOMA-IR</b>                                 | 1.7 (1.5)     | 1.4 (1.0)                      | 2.6 (2.1)                      | <0.001         |
| <b>TGO (U/L)</b>                               | 24.8 (10.6)   | 24.5 (11.6)                    | 25.6 (7.3)                     | 0.006          |
| <b>TGP (U/L)</b>                               | 27.8 (12.8)   | 26.0 (11.8)                    | 32.4 (14.3)                    | <0.001         |
| <b>Ingesta diaria de alcohol (g/semana)</b>    | 65.2 (59.8)   | 61.9 (57.8)                    | 74.0 (63.9)                    | <0.001         |
| <b>Antecedente de donación de sangre (%)</b>   | 17.9          | 18.4                           | 16.4                           | 0.162          |

Los datos se muestran como medias (desviación estándar) para los parámetros clínicos, físicos y bioquímicos. Para antecedente de donación de sangre, porcentaje de donantes. Los valores de p se calcularon a partir de pruebas t no ajustadas. \*N=3313 debido a valores faltantes.

## Asociación entre la concentración sérica de ferritina y el síndrome metabólico

La concentración de ferritina aumentó junto con la edad, el índice de masa corporal, el perímetro de cintura, el colesterol total, los triglicéridos, la presión arterial sistólica y diastólica, la glucosa en suero y el log-HOMA-IR y disminuyó con el aumento del colesterol HDL. La asociación fue estadísticamente significativa después de ajustar por edad, transaminasas, antecedente de donación de sangre e ingesta de alcohol (Modelo 1).

Tabla 7-2. Medias crudas y diferencias ajustadas (IC del 95%) entre el quintil de ferritina más bajo (Q1) y los otros cuatro quintiles para los parámetros fisiológicos relacionados con el síndrome metabólico

|  | Quintil de concentración de ferritina (intervalos en µg/L) |               |               |               |               | Valor p<br>tendencia |
|--|--|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------------|
|  | Q1<br><83  | Q2<br>83-127  | Q3<br>128-180 | Q4<br>181-261 | Q5<br>>261    |                      |
| <b>N</b>                                       | 681  | 680           | 672           | 677           | 676           |                      |
| <b>Edad (años)</b>                             | 49.0   | 47.7          | 48.5          | 48.8          | 50.3          |                      |
| <b>Ferritina (µg/L)</b>                        | 51.4   | 104.8         | 152.6         | 217.6         | 344.7         |                      |
| <b>Índice masa corporal (kg/m<sup>2</sup>)</b> | 27.01  | 27.08         | 27.42         | 27.72         | 28.69         |                      |
| <b>Diferencia ajustada</b>                     | 0.00   | 0.34          | 0.62          | 0.77          | 1.52          | <0.001               |
|  | (Referencia)   | (-0.02, 0.70) | (0.25, 0.98)  | (0.40, 1.13)  | (1.15, 1.89)  |                      |
| <b>Perímetro de cintura (cm)</b>               | 95.24  | 95.46         | 96.51         | 97.42         | 99.87         |                      |
| <b>Diferencia ajustada</b>                     | 0.00   | 0.86          | 1.63          | 2.11          | 3.86          | <0.001               |
|  | (Referencia)   | (-0.10, 1.83) | (0.65, 2.61)  | (1.12, 3.09)  | (2.86, 4.85)  |                      |
| <b>Colesterol Total (mg/dL)</b>                | 208.22   | 209.22        | 211.88        | 214.00        | 216.66        |                      |
| <b>Diferencia ajustada</b>                     | 0.00   | 3.19          | 5.15          | 6.44          | 7.17          | <0.001               |
|  | (Referencia)   | (-0.68, 7.06) | (1.23, 9.07)  | (2.50, 10.38) | (3.19, 11.14) |                      |

La primera línea de cada celda muestra la media cruda. La segunda y tercera líneas muestran las diferencias ajustadas y su intervalo de confianza del 95% calculado a partir de un modelo lineal ajustado por edad, antecedente de donación de sangre, transaminasas y consumo de alcohol (Modelo 1). Los valores de tendencia de p se calcularon a partir de un modelo que introduce los quintiles de ferritina como una variable ordinal. \*N=3313 debido a valores faltantes.

Tabla 7-2. Medias crudas y diferencias ajustadas (IC del 95%) entre el quintil de ferritina más bajo (Q1) y los otros cuatro quintiles para los parámetros fisiológicos relacionados con el síndrome metabólico (continuación)

|   | Quintil de concentración de ferritina (intervalos en µg/L) |                |               |                |                | Valor p<br>tendencia |
|---|--|----------------|---------------|----------------|----------------|----------------------|
|   | Q1<br><83  | Q2<br>83-127   | Q3<br>128-180 | Q4<br>181-261  | Q5<br>>261     |                      |
| <b>Triglicéridos (mg/dL)</b>              | 124.70   | 128.69         | 140.17        | 155.07         | 166.26         |                      |
| <b>Diferencia ajustada</b>                | 0.00   | 3.81           | 14.07         | 26.51          | 34.65          | <0.001               |
|   | (Referencia)   | (-5.85, 13.48) | (4.27, 23.87) | (16.66, 36.37) | (24.73, 44.58) |                      |
| <b>Colesterol HDL(mg/dL)</b>              | 53.78  | 53.18          | 52.78         | 51.44          | 52.29          |                      |
| <b>Diferencia ajustada</b>                | 0.00   | -0.45          | -0.78         | -2.04          | -1.33          | 0.002                |
|   | (Referencia)   | (-1.62, 0.73)  | (-1.97, 0.42) | (-3.24, -0.84) | (-2.53, -0.12) |                      |
| <b>Colesterol LDL(mg/dL)*</b>             | 129.97   | 130.51         | 131.83        | 132.38         | 132.48         |                      |
| <b>Diferencia ajustada</b>                | 0.00   | 2.62           | 3.45          | 3.39           | 2.08           | 0.226                |
|   | (Referencia)   | (-0.72, 5.95)  | (0.06, 6.85)  | (-0.02, 6.81)  | (-1.37, 5.53)  |                      |
| <b>Presión arterial sistólica (mmHg)</b>  | 124.95   | 125.70         | 126.57        | 126.76         | 128.17         |                      |
| <b>Diferencia ajustada</b>                | 0.00   | 1.04           | 1.55          | 1.41           | 2.03           | 0.013                |
|   | (Referencia)   | (-0.47, 2.55)  | (0.03, 3.08)  | (-0.12, 2.95)  | (0.48, 3.58)   |                      |
| <b>Presión arterial diastólica (mmHg)</b> | 82.24  | 82.60          | 83.36         | 83.65          | 85.03          |                      |
| <b>Diferencia ajustada</b>                | 0.00   | 0.77           | 1.20          | 1.17           | 1.84           | <0.001               |
|   | (Referencia)   | (-0.21, 1.75)  | (0.20, 2.19)  | (0.16, 2.17)   | (0.83, 2.85)   |                      |
| <b>Glucosa en ayunas (mg/dL)</b>          | 96.54  | 96.80          | 98.26         | 98.18          | 100.37         |                      |
| <b>Diferencia ajustada</b>                | 0.00   | 0.40           | 1.31          | 0.77           | 2.09           | 0.040                |
|   | (Referencia)   | (-1.48, 2.28)  | (-0.60, 3.21) | (-1.14, 2.69)  | (0.15, 4.02)   |                      |
| <b>Log-HOMA-IR</b>                        | 0.22   | 0.25           | 0.28          | 0.37           | 0.48           |                      |
| <b>Diferencia ajustada</b>                | 0.00   | 0.03           | 0.05          | 0.11           | 0.19           | <0.001               |
|   | (Referencia)   | (-0.04, 0.10)  | (-0.02, 0.12) | (0.04, 0.17)   | (0.12, 0.26)   |                      |

La primera línea de cada celda muestra la media cruda. La segunda y tercera líneas muestran las diferencias ajustadas y su intervalo de confianza del 95% calculado a partir de un modelo lineal ajustado por edad, antecedente de donación de sangre, transaminasas y consumo de alcohol (Modelo 1). Los valores de tendencia de p se calcularon a partir de un modelo que introduce los quintiles de ferritina como una variable ordinal. \*N=3313 debido a valores faltantes.

Para investigar una asociación independiente de ferritina con determinados criterios del síndrome metabólico, se ajustó para cada criterio del síndrome metabólico por los otros criterios del síndrome metabólico (Modelo 2). Las diferencias ajustadas (IC del 95%) fueron estadísticamente significativas para perímetro de la cintura [3,01 (2,06, 3,95) cm] y para los triglicéridos [ 27,84 (17,97, 37,70) mg/dl] (Tabla 7-3).

Tabla 7-3. Las diferencias ajustadas (IC del 95%) entre el quintil de ferritina más bajo (Q1) y los otros cuatro quintiles para las variables continuas utilizadas en la definición del síndrome metabólico, ajustadas para las otras variables asociadas con el síndrome

|  | Quintil de concentración de ferritina (intervalo en µg/L) |                        |                        |                         |                         | Valor p<br>tendencia |
|--|---|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|
|  | Q1<br><83   | Q2<br>83-127           | Q3<br>128-180          | Q4<br>181-261           | Q5<br>>261              |                      |
| <b>Perímetro de cintura (cm)*</b>            | 0.00<br>(Referencia)                                      | 0.61<br>(-0.30, 1.52)  | 1.15<br>(0.22, 2.08)   | 1.40<br>(0.47, 2.33)    | 3.01<br>(2.06, 3.95)    | <0.001               |
| <b>Triglicéridos (mg/dL)**</b>               | 0.00<br>(Referencia)                                      | 2.09<br>(-7.44, 11.61) | 10.88<br>(1.21, 20.55) | 22.78<br>(13.05, 32.50) | 27.84<br>(17.97, 37.70) | <0.001               |
| <b>Colesterol HDL (mg/dL)**</b>              | 0.00<br>(Referencia)                                      | -0.23<br>(-1.37, 0.92) | -0.34<br>(-1.50, 0.83) | -1.49<br>(-2.67, -0.32) | -0.29<br>(-1.48, 0.90)  | 0.174                |
| <b>Presión arterial sistólica (mmHg)***</b>  | 0.00<br>(Referencia)                                      | 0.82<br>(-0.66, 2.30)  | 1.02<br>(-0.48, 2.52)  | 0.81<br>(-0.70, 2.33)   | 0.82<br>(-0.71, 2.36)   | 0.368                |
| <b>Presión arterial diastólica (mmHg)***</b> | 0.00<br>(Referencia)                                      | 0.53<br>(-0.41, 1.48)  | 0.65<br>(-0.31, 1.61)  | 0.48<br>(-0.49, 1.44)   | 0.57<br>(-0.41, 1.55)   | 0.349                |
| <b>Glucosa en ayunas (mg/dL)*</b>            | 0.00<br>(Referencia)                                      | 0.06<br>(-1.79, 1.91)  | 0.71<br>(-1.17, 2.60)  | -0.00<br>(-1.90, 1.90)  | 0.98<br>(-0.95, 2.91)   | 0.392                |

Las celdas muestran las diferencias ajustadas y su intervalo de confianza del 95% calculado a partir de un modelo lineal ajustado por edad, antecedentes de donación de sangre, transaminasas y consumo de alcohol para todas las variables y ajustado para el resto de parámetros; \*\* Perímetro de cintura, presión arterial sistólica, presión arterial diastólica y glucosa en ayunas; o \*\*\* Perímetro de cintura, Triglicéridos, HDL-colesterol y glucosa en ayunas (Modelo 2). Los valores de tendencia de p se calcularon a partir de un modelo que introduce los quintiles de ferritina como una variable ordinal.

También se calcularon las odds ratios para el síndrome metabólico y cada uno de sus criterios para los quintiles de ferritina a través de un modelo logístico ajustado de la misma manera que el modelo 1. El OR ajustado (IC del 95%) para el síndrome metabólico comparando individuos en el quintil sérico de ferritina más alto con las de menor valoración fueron 1,92 (1,48, 2,49) (Tabla 7-4). El modelo multivariable mostró una relación significativa entre la concentración sérica de ferritina y los criterios individuales del síndrome metabólico (Tabla 7-4). El riesgo de todos los criterios individuales del síndrome metabólico aumentó con el incremento del quintil sérico de ferritina; sin embargo, la significación estadística del criterio HDL-colesterol estuvo en el límite (Tabla 7-4).

Tabla 7-4. Razones de odds ajustadas (IC del 95%) para la asociación de la ferritina sérica con el síndrome metabólico y sus criterios (SMC), comparando el quintil de ferritina más bajo (Q1) con los otros cuatro quintiles.

|  | Quintil de concentración de ferritina (intervalo en µg/L) |                      |                      |                      |                      | Valor p<br>tendencia |
|--|---|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|  | Q1<br><83   | Q2<br>83-127         | Q3<br>128-180        | Q4<br>181-261        | Q5<br>>261           |                      |
| <b>Obesidad central<br/>SMC*</b>                 | 1.00<br>(Referencia)                                      | 1.12<br>(0.87, 1.45) | 1.23<br>(0.95, 1.59) | 1.37<br>(1.06, 1.77) | 1.88<br>(1.46, 2.42) | <0.001               |
| <b>Hipertrigliceridemia<br/>SMC *</b>            | 1.00<br>(Referencia)                                      | 1.09<br>(0.85, 1.40) | 1.23<br>(0.96, 1.58) | 1.86<br>(1.46, 2.37) | 2.15<br>(1.69, 2.74) | <0.001               |
| <b>Niveles bajos de<br/>colesterol HDL SMC *</b> | 1.00<br>(Referencia)                                      | 0.90<br>(0.66, 1.22) | 0.90<br>(0.67, 1.23) | 1.20<br>(0.90, 1.61) | 1.18<br>(0.88, 1.58) | 0.054                |
| <b>Hipertensión SMC</b>                          | 1.00<br>(Referencia)                                      | 1.12<br>(0.89, 1.41) | 1.22<br>(0.96, 1.54) | 1.22<br>(0.97, 1.55) | 1.41<br>(1.11, 1.79) | 0.004                |
| <b>Hiperglicemia SMC</b>                         | 1.00<br>(Referencia)                                      | 1.10<br>(0.87, 1.40) | 1.12<br>(0.88, 1.42) | 1.29<br>(1.01, 1.64) | 1.49<br>(1.17, 1.89) | <0.001               |
| <b>Síndrome metabólico*</b>                      | 1.00<br>(Referencia)                                      | 0.91<br>(0.69, 1.20) | 1.11<br>(0.84, 1.45) | 1.52<br>(1.17, 1.98) | 1.92<br>(1.48, 2.49) | <0.001               |

Las celdas muestran las odds ratios ajustadas y su intervalo de confianza del 95% calculado a partir de un modelo logístico ajustado por edad, antecedentes de donación de sangre, transaminasas y consumo de alcohol (Modelo 1). Los valores de tendencia de p se calcularon a partir de un modelo que introduce los quintiles de ferritina como una variable ordinal. \*N = 3382 en estos modelos todas las observaciones (4) con niveles de TGO muy alto fueron eliminados dado que todos fueron positivos para el criterio probado.

El modelo de spline cúbico mostró una tendencia a la disminución del OR para síndrome metabólico en el tercio inferior de la distribución de ferritina, mientras que se observó un aumento pronunciado a niveles más altos de ferritina (Figura 7-1 y 7-2).

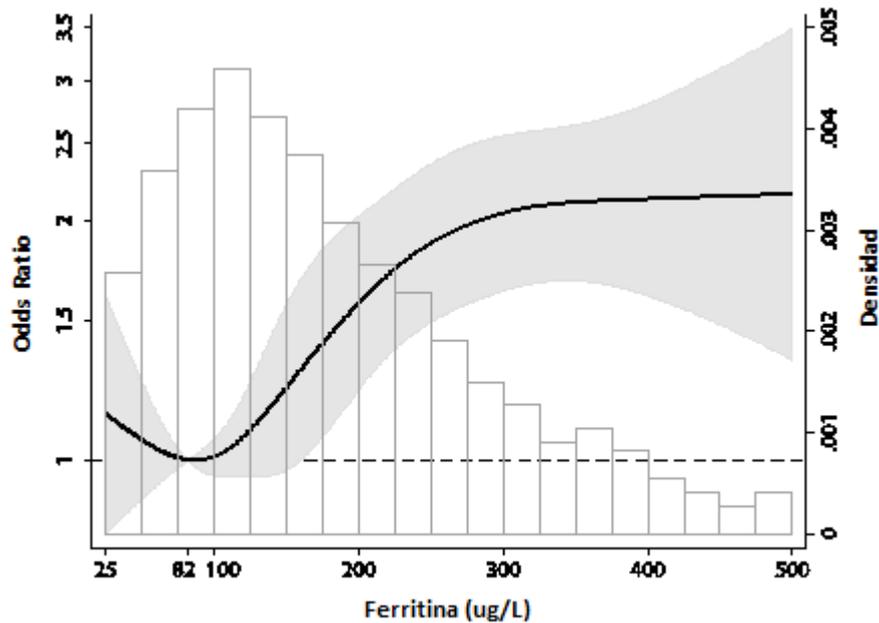


Figura 7-1. Razón de odds ajustados (IC del 95%) para la asociación del síndrome metabólico con la concentración de ferritina. La ferritina se modeló como splines cúbicas restringidas con nudos en los percentiles 5, 27, 50, 72, 95 de su distribución. El modelo de regresión logística multivariable fue ajustado por edad, antecedentes de donación de sangre, transaminasas y consumo de alcohol (Modelo 1). Las probabilidades de síndrome metabólico en el percentil 20 (82  $\mu\text{g/L}$ ) de la distribución de ferritina fueron utilizados como referencia. El histograma muestra la distribución de las concentraciones de ferritina en la muestra del estudio.

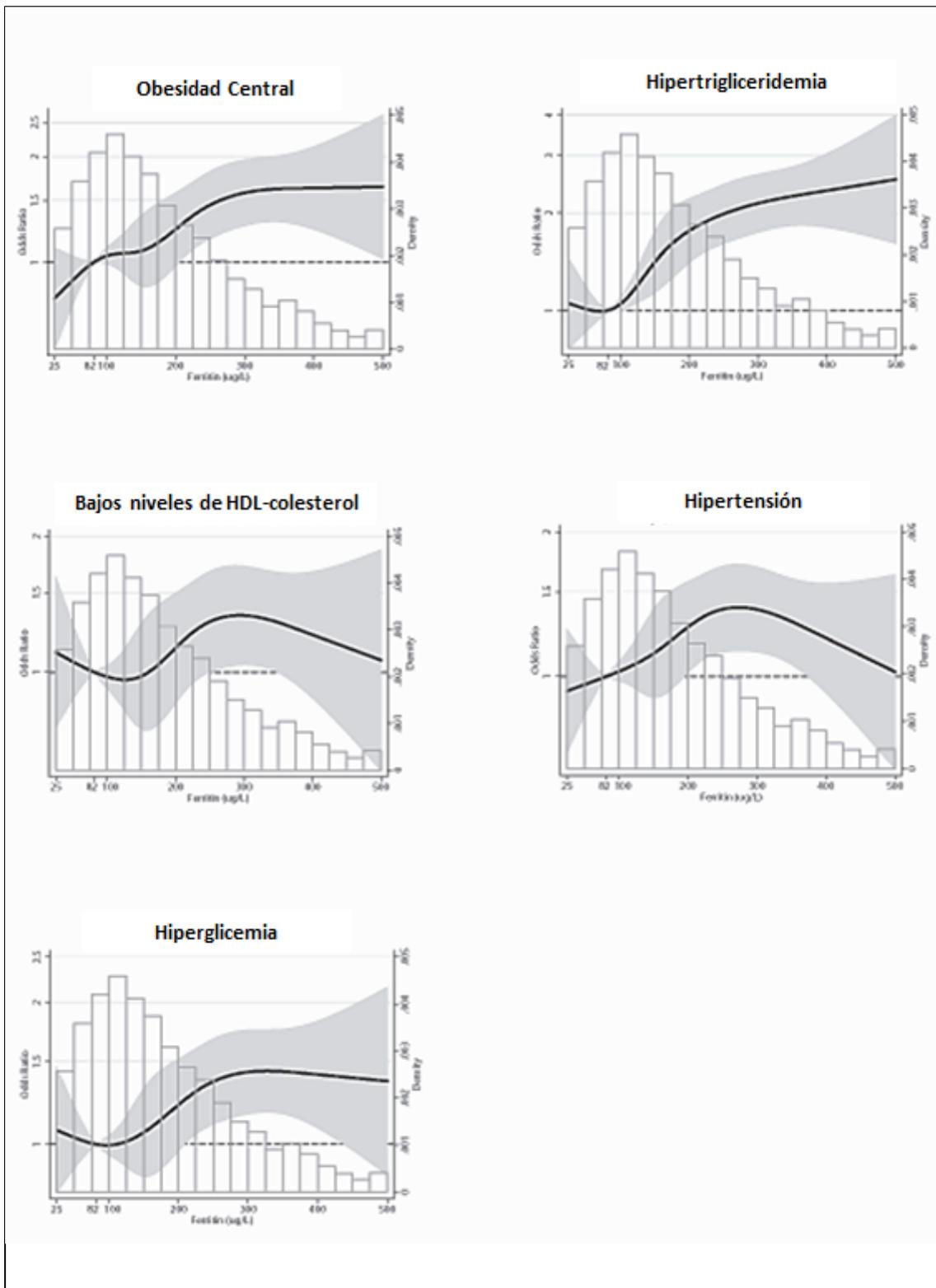


Figura 7-2. Razón de odds ajustadas (IC del 95%) para la asociación de criterios del síndrome metabólico con la concentración de ferritina. La ferritina se modeló como splines cúbicos restringidos con nudos en los percentiles 5, 27, 50, 72, 5 y 95 de su distribución. El modelo de regresión logística multivariable fue ajustado por edad, antecedentes de donación de sangre, transaminasas y consumo de alcohol (Modelo 1). Las probabilidades de síndrome metabólico en el percentil 20 (82 µg/L) de la distribución de ferritina se utilizaron como referencia. El histograma muestra la distribución de las concentraciones de ferritina en la muestra del estudio.

Basándonos en las observaciones en el modelo de spline cúbico, decidimos aplicar una función spline lineal, con nudos a 100 y 300  $\mu\text{g/L}$  de ferritina sérica. La inclinación de probabilidades para el síndrome metabólico cambió significativamente a 100  $\mu\text{g/L}$  ( $p=0,048$ ). La asociación con concentraciones de ferritina inferiores a 100  $\mu\text{g/L}$  no fue estadísticamente significativa ( $p=0,525$ ), mientras que a valores de ferritina entre 100 y 300  $\mu\text{g/L}$  las probabilidades de síndrome metabólico aumentaron a una tasa de 1,23 por 50  $\mu\text{g/L}$  de ferritina ( $p < 0,001$ ) (Figura 7-3 y Tabla 7-5). El ajuste de nuestros modelos por proteína C reactiva no cambió sustancialmente las asociaciones encontradas.

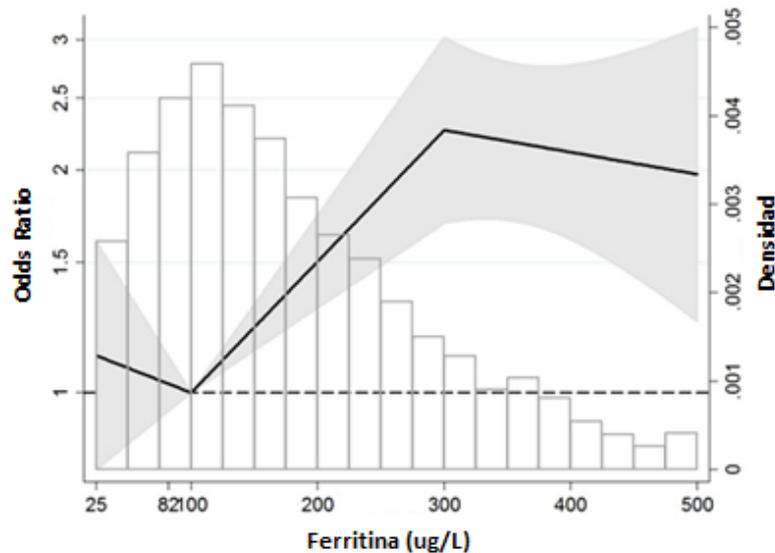


Figura 7-3. Regresión logística de spline lineal para Síndrome metabólico y concentración de ferritina.

Tabla 7-5. Regresión logística de spline lineal para Síndrome metabólico y concentración de ferritina

| Niveles de Ferritina                             | <100 $\mu\text{g/L}$ | 100-300 $\mu\text{g/L}$ | >300 $\mu\text{g/L}$ |
|--|----------------------|-------------------------|----------------------|
| N  | 939                  | 1984                    | 463                  |
| Slope (OR por incremento de 50 $\mu\text{g/L}$ ) | 0.93<br>(0.73, 1.17) | 1.23<br>(1.14, 1.32)    | 0.97<br>(0.84, 1.11) |
| Valor p  | 0.525                | <0.001                  | 0.618                |

| <b>Niveles de Ferritina</b> | <b>&lt;100 µg/L vs<br/>100-300 µg/L</b> | <b>100-300 µg/L vs<br/>&gt;300 µg/L</b> |
|-----------------------------|---|---|
| p para diferencias en slope | 0.048                                   | 0.011                                   |

## Discusión

En este estudio, encontramos una asociación positiva entre las reservas de hierro elevadas y el síndrome metabólico. Nuestros resultados muestran que la obesidad central y la hipertrigliceridemia son los principales criterios independientes asociados con la ferritina elevada y también muestran que la asociación tiene un umbral potencial, con una importante asociación con síndrome metabólico detectada cuando los niveles de ferritina sérica están entre 100 y 300 µg/L.

Ha habido un interés considerable en la posibilidad de que el exceso de reservas de hierro contribuya a la patogénesis del síndrome metabólico. Los niveles elevados de ferritina sérica se han relacionado con diferentes condiciones de salud, como la hipertensión(223), obesidad central(224), valores más altos de triglicéridos séricos y niveles más bajos de colesterol HDL(220,225). La sobrecarga de hierro es un predictor del metabolismo anormal de la glucosa, la obesidad y la resistencia a la insulina(221,226). El hierro se acumula en el tejido adiposo humano y allí, el metabolismo del hierro se asocia con las vías de la insulina(227). Además, la sobrecarga de hierro adipocitario disminuye la expresión génica de la adiponectina en asociación con la resistencia a la insulina en ratones(228), y la donación de sangre disminuye la HbA1c y mejora la resistencia a la insulina en sujetos con alta ferritina y diabetes(229).

La mayoría de los estudios previos, reportaron asociaciones entre las reservas de hierro y el síndrome metabólico. Jehn y cols.(218) evidenciaron una asociación en entre ferritina y criterios de síndrome metabólico en una población masculina, especialmente hiperglucemia SMC e hipertrigliceridemia SMC. Yoo y cols.(230) encontraron una asociación con hiperglucemia SMC sólo en hombres y con triglicéridos SMC y bajo HDL colesterol SMC sólo en mujeres. Lee y cols.(231) encontraron una asociación entre el aumento de la ferritina y la hiperglucemia SMC y la hipertrigliceridemia SMC sólo en los hombres. Nuestros resultados muestran asociaciones similares con hipertensión SMC, obesidad central SMC, hipertrigliceridemia SMC e hiperglicemia SMC, con asociaciones más pronunciadas a niveles de ferritina sérica por encima de 100 µg/L. Esta asociación fue independiente de la edad, antecedentes de donación de sangre, transaminasas y consumo de alcohol. La ferritina también se asoció con resistencia a la insulina (medida como HOMA-IR).

Los estudios longitudinales prospectivos, relacionaron la concentración de ferritina con la incidencia de síndrome metabólico en hombres y mujeres franceses(232). Del mismo modo, un estudio de seguimiento de cinco años en hombres coreanos encontró una asociación fuerte y significativa de ferritina con el desarrollo del síndrome metabólico(233). Estos estudios y nuestros hallazgos sugieren que los altos niveles de ferritina sérica o el metabolismo del hierro pueden jugar un papel causal en el desarrollo del síndrome metabólico; sin embargo, la ferritina sérica elevada podría ser causa o consecuencia del síndrome metabólico, ya que el hierro interfiere con la acción de la insulina en el hígado y la insulina estimula la absorción de hierro por los adipocitos y los hepatocitos(234).

La ferritina, una proteína intracelular, es un biomarcador establecido de las reservas de hierro corporal(235). El hierro y su homeostasis están asociados con la respuesta inflamatoria(236). En la hemocromatosis, la lesión hepática se asocia con alteración de la sensibilidad a la insulina en el hígado y la disfunción pancreática(237–239). En modelos animales, el hierro participa en la formación de radicales hidroxilo, y un exceso de hierro puede conducir al estrés oxidativo celular, que puede disminuir la capacidad de secreción de insulina(240). Varios estudios han demostrado que la sobrecarga hepática de hierro induce daño hepático a través de la producción de malonildaldehído en la peroxidación lipídica en la NAFLD (enfermedad hepática grasa no alcohólica). Este metabolito puede activar las células estrelladas hepáticas, los principales factores que contribuyen a la fibrogenesis(241,242). Nuestras observaciones muestran que, por encima de un umbral, los aumentos de ferritina están asociados con el deterioro metabólico, lo que sugiere que el trastorno metabólico en la hemocromatosis podría ser parte de un continuo progresivo a partir de niveles más bajos de hierro. Las únicas variables del síndrome metabólico continuo asociadas independientemente con la ferritina fueron el perímetro de cintura y los triglicéridos. La ferritina se asocia con triglicéridos incluso en ausencia de síndrome metabólico(243), y los triglicéridos disminuyen después de la flebotomía terapéutica, independientemente de la glucosa basal(244). Estas observaciones sugieren que la obesidad podría ser un factor adicional que induce cambios funcionales hepáticos asociados con un aumento en el hierro y los depósitos de triglicéridos hepáticos. Los individuos en estadios avanzados de obesidad y síndrome metabólico desarrollan NAFLD, que puede elevar aún más los niveles de transaminasas(241,242). La ferritina también está elevada en la hepatitis aguda y crónica, como consecuencia del daño hepático(245,246). Hemos ajustado nuestro análisis por transaminasas con el fin de evitar la confusión con otras causas de daño hepático.

Nuestros datos sugieren que la ferritina tiene potencial como marcador temprano del daño parenquimatoso en la obesidad y el síndrome metabólico. Si aceptamos que el hierro predispone al síndrome metabólico, la confirmación futura del umbral de 100 µg/L puede ayudar a identificar a los pacientes que se beneficiarían de las intervenciones dirigidas al hierro. Esto requeriría el desarrollo de terapias capaces de modular el hierro corporal a este nivel casi normal. Incluso en los casos en que el hierro se eleva como consecuencia del daño hepático causado por lesiones relacionadas con el síndrome metabólico intenso, la restricción de la asociación con el rango más alto de ferritina puede sugerir que la presencia de esta elevación señala un daño más intenso derivado de alteraciones del metabolismo, y esto podría contribuir a las decisiones sobre si aumentar la intensidad de la terapia para el síndrome metabólico en estas circunstancias en particular. Teniendo en cuenta que dos tercios de nuestra muestra tenían ferritina por encima de 100 µg/L, estos resultados sugieren la necesidad de estudios para definir mejor el nivel óptimo de hierro tisular entre el amplio rango de valores normales y la viabilidad de manipular el hierro corporal.

La ferritina es un reactivo de fase aguda, entre otros como la proteína C reactiva. En nuestro análisis, se excluyeron los participantes con niveles elevados de proteína C-reactiva, descartando así los que tienen respuestas de fase aguda. Sin embargo, el síndrome metabólico y la obesidad se asocian con el desarrollo de inflamación crónica. De hecho, los niveles de proteína C reactiva son ligeramente elevados en el síndrome metabólico(247). El tejido adiposo libera mediadores proinflamatorios(132) que inducen la producción hepática de proteína C reactiva(248). Sin embargo, nuestro análisis de sensibilidad de ajuste por la proteína C reactiva indicó que esta vía de la inflamación sólo tiene una influencia menor en las asociaciones descritas.

Los puntos fuertes de este estudio incluyen el uso de datos de una cohorte que ha sido estudiado usando procedimientos estrictos, tanto en la recolección de datos como en muestras biológicas, que cumplen los criterios de certificación de calidad ISO. Las limitaciones incluyen no haber realizado la identificación de una causa genética subyacente a altas concentraciones de ferritina y la restricción del estudio a los hombres. Además, el estudio tiene un diseño transversal que hace imposible inferir la causalidad. Las diferencias en la edad, las transaminasas y la ingesta de alcohol entre las personas con síndrome metabólico y sin ella podría actuar como posibles factores de confusión para la asociación. Sin embargo, el ajuste de nuestro análisis para estas variables proporcionó diferencias y odds ratios que muestran asociaciones independientes de la edad, la citolisis hepática y la ingesta de alcohol. Diseñamos los nudos spline lineales basados únicamente en la inspección visual de los spline cúbicos.

Nuestros resultados muestran que la ferritina sérica se asocia con síndrome metabólico, mostrando asociación independiente para los criterios diagnósticos de obesidad central SMC e hipertrigliceridemia SMC. La asociación con el riesgo de síndrome metabólico se ve sólo por encima de una concentración de ferritina de aproximadamente 100 µg/L (percentil 27,7). Se deben considerar futuros estudios para demostrar el potencial de la ferritina sérica como marcador temprano del daño metabólico asociado con el desarrollo del síndrome metabólico. La ferritina sérica podría ser un marcador particularmente valioso cuando los niveles están entre 100 y 300 µg/L.

## CONCLUSIONES

1. Los recuentos de plaquetas y leucocitos de una muestra son importantes para comparar el contenido de ADNmt entre diferentes pacientes cuando el número de copias de ADNmt se estima a partir de sangre total.
2. El no tener en cuenta la relación plaquetaria/leucocitos puede conducir a una sobreestimación del contenido de ADNmt provenientes de leucocitos y la clasificación errónea, lo que puede ocultar el significado de su variación, ya que el valor no corregido depende sustancialmente de las diferencias hematológicas. Una fórmula derivada de nuestro trabajo puede utilizarse para corregir sus valores.
3. Las concentraciones elevadas de LDL-ox están asociados con el SM y sus componentes independientemente de la obesidad central y la resistencia a la insulina.
4. Los niveles de LDL-ox pueden reflejar los mecanismos básicos a través de los cuales los componentes del SM se desarrollan y progresan en paralelo con la resistencia a la insulina y podrían ser un signo temprano del desarrollo del SM
5. Mayor concentración plasmática de LDL-ox se asocia con aterosclerosis carotídea subclínica temprana independientemente de los factores de riesgo cardiovascular y, en particular, de la concentración de colesterol LDL.
6. Las trayectorias causales entre el LDL-ox y los factores de riesgo cardiovascular hacia la aterosclerosis son complejas y mutuamente dependientes. Nuestros hallazgos contribuyen a la evidencia de que el LDL-ox refleja el primer paso de la modificación oxidativa de LDL en la sangre y podría ser un marcador temprano de aterosclerosis subclínica en territorio carotídeo.

7. La ferritina sérica se asocia con síndrome metabólico, mostrando asociación independiente para los criterios diagnósticos de obesidad central e hipertrigliceridemia.
8. La ferritina sérica podría ser un marcador particularmente valioso cuando los niveles están entre 100 y 300  $\mu\text{g/L}$ .

## REFERENCIAS

1. H. Sies. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. Ed. London: Academic Press Limited; 1985. 1-507 p.
2. H. Sies DJ. Oxidative stress. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier; 2007. 45-48 p. (Encyclopedia of Stress).
3. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* noviembre de 2007;35(Pt 5):1147-50.
4. Davies KJ. An overview of oxidative stress. *IUBMB Life.* noviembre de 2000;50(4-5):241-4.
5. Sies H, Jones D. Oxidative Stress\*. En: *Encyclopedia of Stress* [Internet]. Elsevier; 2007 [citado 14 de julio de 2015]. p. 45-8. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123739476002853>
6. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 1 de octubre de 2003;552(2):335-44.
7. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J.* 1 de enero de 2009;417(Pt 1):1-13.
8. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.* abril de 2006;52(4):601-23.
9. Tsukahara H. Biomarkers for oxidative stress: clinical application in pediatric medicine. *Curr Med Chem.* 2007;14(3):339-51.
10. Niki E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med.* 1 de septiembre de 2009;47(5):469-84.
11. Matsuura E, Hughes GRV, Khamashta MA. Oxidation of LDL and its clinical implication. *Autoimmun Rev.* julio de 2008;7(7):558-66.
12. Parthasarathy S, Raghavamenon A, Garelnabi MO, Santanam N. Oxidized low-density lipoprotein. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2010;610:403-17.
13. Salvayre R, Auge N, Benoist H, Negre-Salvayre A. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 30 de diciembre de 2002;1585(2-3):213-21.
14. Comporti M, Signorini C, Arezzini B, Vecchio D, Monaco B, Gardi C. F2-isoprostanes are not just markers of oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 1 de febrero de 2008;44(3):247-56.
15. Basu S. F2-isoprostanes in human health and diseases: from molecular mechanisms to clinical implications. *Antioxid Redox Signal.* agosto de 2008;10(8):1405-34.
16. Miki H, Funato Y. Regulation of intracellular signalling through cysteine oxidation by reactive oxygen species. *J Biochem (Tokyo).* marzo de 2012;151(3):255-61.

17. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. diciembre de 2003;25(3-4):207-18.
18. Mocan M, Rahaian R, Blaga SN. Inflammation and oxidative stress biomarkers as predictors of diastolic dysfunction in patients with metabolic syndrome. *Atherosclerosis*. julio de 2015;241(1):e172-3.
19. Steffes MW, Gross MD, Lee D-H, Schreiner PJ, Jacobs DR Jr. Adiponectin, visceral fat, oxidative stress, and early macrovascular disease: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study. *Obes Silver Spring Md*. febrero de 2006;14(2):319-26.
20. Zampetaki A, Dudek K, Mayr M. Oxidative stress in atherosclerosis: The role of microRNAs in arterial remodeling. *Free Radic Biol Med*. septiembre de 2013;64:69-77.
21. Pérez-Matute P, Zulet MA, Martínez JA. Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health. *Curr Opin Pharmacol*. diciembre de 2009;9(6):771-9.
22. Valdecantos MP, Pérez-Matute P, Martínez JA. [Obesity and oxidative stress: role of antioxidant supplementation]. *Rev Investig Clínica Organo Hosp Enfermedades Nutr*. abril de 2009;61(2):127-39.
23. Holvoet P. Obesity, the metabolic syndrome, and oxidized LDL. *Am J Clin Nutr*. 1 de junio de 2006;83(6):1438-1438.
24. Holvoet P, De Keyzer D, Jacobs DR. Oxidized LDL and the metabolic syndrome. *Future Lipidol*. diciembre de 2008;3(6):637-49.
25. Holvoet P. Oxidized LDL and coronary heart disease. *Acta Cardiol*. octubre de 2004;59(5):479-84.
26. Andican G, Seven A, Uncu M, Cantaşdemir M, Numan F, Burçak G. Oxidized LDL and anti-oxLDL antibody levels in peripheral atherosclerotic disease. *Scand J Clin Lab Invest*. 2008;68(6):473-8.
27. Babakr AT, Elsheikh OM, Almarzouki AA, Assiri AM, Abdalla BEE, Zaki HY, et al. Relationship between oxidized low-density lipoprotein antibodies and obesity in different glycemic situations. *Diabetes Metab Syndr Obes Targets Ther*. 2014;7:513-20.
28. Barbosa KBF, Volp ACP, Hermsdorff HHM, Navarro-Blasco I, Zulet MÁ, Martínez JA, et al. Relationship of oxidized low density lipoprotein with lipid profile and oxidative stress markers in healthy young adults: a translational study. *Lipids Health Dis*. 2011;10:61.
29. Koenig W, Karakas M, Zierer A, Herder C, Baumert J, Meisinger C, et al. Oxidized LDL and the risk of coronary heart disease: results from the MONICA/KORA Augsburg Study. *Clin Chem*. agosto de 2011;57(8):1196-200.
30. Trpkovic A, Resanovic I, Stanimirovic J, Radak D, Mousa SA, Genic-Milosevic D, et al. Oxidized low-density lipoprotein as a biomarker of cardiovascular diseases. *Crit Rev Clin Lab Sci*. abril de 2015;52(2):70-85.

31. Burgos Alves MI, Avilés Plaza F, Martínez-Tomás R, Sánchez-Campillo M, Larqué E, Pérez-Llamas F, et al. Oxidized LDL and its correlation with lipid profile and oxidative stress biomarkers in young healthy Spanish subjects. *J Physiol Biochem.* septiembre de 2010;66(3):221-7.
32. Attardi G, Schatz G. Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol.* 1988;4:289-333.
33. Cooper GM. The Mechanism of Oxidative Phosphorylation. 2000 [citado 19 de abril de 2017]; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9885/>
34. Ricquier D, Bouillaud F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol.* 15 de noviembre de 2000;529(Pt 1):3-10.
35. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* enero de 2002;82(1):47-95.
36. Shokolenko I, Venediktova N, Bochkareva A, Wilson GL, Alexeyev MF. Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* mayo de 2009;37(8):2539-48.
37. Mitochondrial Disorders - Biochemical and Molecular Analysis | Lee-Jun C. Wong | Springer [Internet]. [citado 19 de abril de 2017]. Disponible en: <http://www.springer.com/cn/book/9781617795039>
38. Nass S, Nass MMK. INTRAMITOCHONDRIAL FIBERS WITH DNA CHARACTERISTICS. *J Cell Biol.* 1 de diciembre de 1963;19(3):613-29.
39. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 9 de abril de 1981;290(5806):457-65.
40. Taanman J-W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg.* 9 de febrero de 1999;1410(2):103-23.
41. Sato M, Sato K. Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* Agosto de 2013;1833(8):1979-84.
42. Rooney J, Ryde I, Sanders L, Howlett E, Colton M, Germ K, et al. PCR Based Determination of Mitochondrial DNA Copy Number in Multiple Species. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2015;1241:23-38.
43. Moreno-Loshuertos R, Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Movilla N, Pérez-Martos A, Rodríguez de Córdoba S, et al. Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants. *Nat Genet.* noviembre de 2006;38(11):1261-8.
44. Valle I, Alvarez-Barrientos A, Arza E, Lamas S, Monsalve M. PGC-1alpha regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 1 de junio de 2005;66(3):562-73.
45. Ballinger SW, Patterson C, Yan C-N, Doan R, Burow DL, Young CG, et al. Hydrogen

Peroxide- and Peroxynitrite-Induced Mitochondrial DNA Damage and Dysfunction in Vascular Endothelial and Smooth Muscle Cells. *Circ Res.* 12 de mayo de 2000;86(9):960-6.

46. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and mitochondrial DNA damage in heart failure. *Circ J Off J Jpn Circ Soc.* 2008;72 Suppl A:A31-37.
47. Han Y, Chen JZ. Oxidative stress induces mitochondrial DNA damage and cytotoxicity through independent mechanisms in human cancer cells. *BioMed Res Int.* 2013;2013:825065.
48. Tsutsui H, Ide T, Kinugawa S. Mitochondrial oxidative stress, DNA damage, and heart failure. *Antioxid Redox Signal.* octubre de 2006;8(9-10):1737-44.
49. Harrison DG, Gongora MC. Oxidative stress and hypertension. *Med Clin North Am.* mayo de 2009;93(3):621-35.
50. Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes.* 15 de abril de 2015;6(3):456-80.
51. Liu C-S, Tsai C-S, Kuo C-L, Chen H-W, Lii C-K, Ma Y-S, et al. Oxidative stress-related alteration of the copy number of mitochondrial DNA in human leukocytes. *Free Radic Res.* diciembre de 2003;37(12):1307-17.
52. Huang C-H, Su S-L, Hsieh M-C, Cheng W-L, Chang C-C, Wu H-L, et al. Depleted leukocyte mitochondrial DNA copy number in metabolic syndrome. *J Atheroscler Thromb.* 2011;18(10):867-73.
53. Lee JE, Park H, Ju YS, Kwak M, Kim J-I, Oh HY, et al. Higher mitochondrial DNA copy number is associated with lower prevalence of microalbuminuria. *Exp Mol Med.* 30 de abril de 2009;41(4):253-8.
54. Mercer JR, Cheng K-K, Figg N, Gorenne I, Mahmoudi M, Griffin J, et al. DNA damage links mitochondrial dysfunction to atherosclerosis and the metabolic syndrome. *Circ Res.* 15 de octubre de 2010;107(8):1021-31.
55. Litvinova L, Atochin DN, Fattakhov N, Vasilenko M, Zatolokin P, Kirienkova E. Nitric oxide and mitochondria in metabolic syndrome. *Front Physiol.* 2015;6:20.
56. Ren J, Pulakat L, Whaley-Connell A, Sowers JR. Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *J Mol Med Berl Ger.* octubre de 2010;88(10):993-1001.
57. Kim J-H, Im J-A, Lee D-C. The relationship between leukocyte mitochondrial DNA contents and metabolic syndrome in postmenopausal women. *Menopause N Y N.* mayo de 2012;19(5):582-7.
58. Patti M-E, Corvera S. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* junio de 2010;31(3):364-95.
59. Szendroedi J, Phielix E, Roden M. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* febrero de 2012;8(2):92-103.
60. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 15 de abril de 2006;212(2):167-78.

61. Montgomery MK, Turner N. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. *Endocr Connect.* marzo de 2015;4(1):R1-15.
62. Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, et al. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science.* 16 de mayo de 2003;300(5622):1140-2.
63. Jeong E-M, Chung J, Liu H, Go Y, Gladstein S, Farzaneh-Far A, et al. Role of Mitochondrial Oxidative Stress in Glucose Tolerance, Insulin Resistance, and Cardiac Diastolic Dysfunction. *J Am Heart Assoc.* mayo de 2016;5(5).
64. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes.* enero de 2003;52(1):1-8.
65. Xu FX, Zhou X, Shen F, Pang R, Liu SM. Decreased peripheral blood mitochondrial DNA content is related to HbA1c, fasting plasma glucose level and age of onset in type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* julio de 2012;29(7):e47-54.
66. Song J, Oh JY, Sung YA, Pak YK, Park KS, Lee HK. Peripheral blood mitochondrial DNA content is related to insulin sensitivity in offspring of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* mayo de 2001;24(5):865-9.
67. Zheng LD, Linarelli LE, Liu L, Wall SS, Greenawald MH, Seidel RW, et al. Insulin resistance is associated with epigenetic and genetic regulation of mitochondrial DNA in obese humans. *Clin Epigenetics.* 2015;7:60.
68. Gianotti TF, Sookoian S, Dieuzeide G, García SI, Gemma C, González CD, et al. A decreased mitochondrial DNA content is related to insulin resistance in adolescents. *Obes Silver Spring Md.* julio de 2008;16(7):1591-5.
69. Park KS, Song JH, Lee KU, Choi CS, Koh JJ, Shin CS, et al. Peripheral blood mitochondrial DNA content correlates with lipid oxidation rate during euglycemic clamps in healthy young men. *Diabetes Res Clin Pract.* noviembre de 1999;46(2):149-54.
70. Singh R, Hattersley AT, Harries LW. Reduced peripheral blood mitochondrial DNA content is not a risk factor for Type 2 diabetes. *Diabet Med J Br Diabet Assoc.* julio de 2007;24(7):784-7.
71. Koh EH, Park J-Y, Park H-S, Jeon MJ, Ryu JW, Kim M, et al. Essential role of mitochondrial function in adiponectin synthesis in adipocytes. *Diabetes.* diciembre de 2007;56(12):2973-81.
72. Kraunsøe R, Boushel R, Hansen CN, Schjerling P, Qvortrup K, Støckel M, et al. Mitochondrial respiration in subcutaneous and visceral adipose tissue from patients with morbid obesity. *J Physiol.* 15 de junio de 2010;588(Pt 12):2023-32.
73. Wlodek D, Gonzales M. Decreased energy levels can cause and sustain obesity. *J Theor Biol.* 7 de noviembre de 2003;225(1):33-44.
74. Yin X, Lanza IR, Swain JM, Sarr MG, Nair KS, Jensen MD. Adipocyte mitochondrial function is reduced in human obesity independent of fat cell size. *J Clin Endocrinol Metab.* febrero de 2014;99(2):E209-216.

75. Park KS, Lee KU, Song JH, Choi CS, Shin CS, Park DJ, et al. Peripheral blood mitochondrial DNA content is inversely correlated with insulin secretion during hyperglycemic clamp studies in healthy young men. *Diabetes Res Clin Pract.* mayo de 2001;52(2):97-102.
76. Rodrigo R, González J, Paoletto F. The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens.* abril de 2011;34(4):431-40.
77. Dikalov SI, Ungvari Z. Role of mitochondrial oxidative stress in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 15 de noviembre de 2013;305(10):H1417-1427.
78. Huang J, Tan L, Shen R, Zhang L, Zuo H, Wang DW. Decreased Peripheral Mitochondrial DNA Copy Number is Associated with the Risk of Heart Failure and Long-term Outcomes. *Medicine (Baltimore).* abril de 2016;95(15):e3323.
79. Meicen Z, Lixin Z, Xiangli C, Linbo F, Xuefeng Z, Shuli H, et al. Reduced peripheral blood mitochondrial DNA (mtDNA) content is associated with impaired glucose-stimulated islet  $\beta$  cell function in a Chinese population with different degrees of glucose tolerance. *Diabetes Metab Res Rev.* 22 de abril de 2016;
80. Liu C-S, Kuo C-L, Cheng W-L, Huang C-S, Lee C-F, Wei Y-H. Alteration of the copy number of mitochondrial DNA in leukocytes of patients with hyperlipidemia. *Ann N Y Acad Sci.* mayo de 2005;1042:70-5.
81. Lim S, Kim MS, Park KS, Lee JH, An GH, Yim MJ, et al. Correlation of plasma homocysteine and mitochondrial DNA content in peripheral blood in healthy women. *Atherosclerosis.* octubre de 2001;158(2):399-405.
82. Zerhouni EA. Translational and clinical science--time for a new vision. *N Engl J Med.* 13 de octubre de 2005;353(15):1621-3.
83. Woolf SH. The meaning of translational research and why it matters. *JAMA.* 9 de enero de 2008;299(2):211-3.
84. Cohrs RJ, Martin T, Ghahramani P, Bidaut L, Higgins PJ, Shahzad A. Translational Medicine definition by the European Society for Translational Medicine. *New Horiz Transl Med.* marzo de 2015;2(3):86-8.
85. The European Society for Translational Medicine (EUSTM) [Internet]. EUSTM. [citado 24 de abril de 2017]. Disponible en: <https://eutranslationalmedicine.org/>
86. Waldman SA, Terzic A. Clinical and Translational Science: From Bench-Bedside to Global Village. *Clin Transl Sci.* 1 de octubre de 2010;3(5):254-7.
87. Gannon F. The steps from translatable to translational research. *EMBO Rep.* noviembre de 2014;15(11):1107-8.
88. Abernethy AP, Wheeler JL. True translational research: bridging the three phases of translation through data and behavior. *Transl Behav Med.* marzo de 2011;1(1):26-30.
89. Khoury MJ, Gwinn M, Ioannidis JPA. The emergence of translational epidemiology: from scientific discovery to population health impact. *Am J Epidemiol.* 1 de septiembre de 2010;172(5):517-24.

90. Casasnovas JA, Alcaide V, Civeira F, Guallar E, Ibañez B, Borreguero JJ, et al. Aragon workers' health study--design and cohort description. *BMC Cardiovasc Disord.* 19 de junio de 2012;12:45.
91. Fernández-Ortiz A, Jiménez-Borreguero LJ, Peñalvo JL, Ordovás JM, Mocoroa A, Fernández-Friera L, et al. The Progression and Early detection of Subclinical Atherosclerosis (PESA) study: rationale and design. *Am Heart J.* diciembre de 2013;166(6):990-8.
92. Weissig V, Edeas M, editores. *Mitochondrial Medicine* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2015 [citado 29 de abril de 2015]. (Methods in Molecular Biology; vol. 1264). Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2257-4>
93. Beraud N, Pelloux S, Usson Y, Kuznetsov AV, Ronot X, Tourneur Y, et al. Mitochondrial dynamics in heart cells: very low amplitude high frequency fluctuations in adult cardiomyocytes and flow motion in non beating HL-1 cells. *J Bioenerg Biomembr.* abril de 2009;41(2):195-214.
94. Kurz FT, Aon MA, O'Rourke B, Armoundas AA. Spatio-temporal oscillations of individual mitochondria in cardiac myocytes reveal modulation of synchronized mitochondrial clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 10 de agosto de 2010;107(32):14315-20.
95. Pouvreau S. Superoxide flashes in mouse skeletal muscle are produced by discrete arrays of active mitochondria operating coherently. *PloS One.* 2010;5(9).
96. Phillips NR, Sprouse ML, Roby RK. Simultaneous quantification of mitochondrial DNA copy number and deletion ratio: A multiplex real-time PCR assay. *Sci Rep* [Internet]. 2014 [citado 12 de noviembre de 2015];4. Disponible en: <http://www.readcube.com/articles/10.1038%2Fsrep03887>
97. Gahan ME, Miller F, Lewin SR, Cherry CL, Hoy JF, Mijch A, et al. Quantification of mitochondrial DNA in peripheral blood mononuclear cells and subcutaneous fat using real-time polymerase chain reaction. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol.* octubre de 2001;22(3):241-7.
98. Chabi B, Mousson de Camaret B, Duborjal H, Issartel J-P, Stepien G. Quantification of mitochondrial DNA deletion, depletion, and overreplication: application to diagnosis. *Clin Chem.* agosto de 2003;49(8):1309-17.
99. Meissner C, Mohamed SA, Klueter H, Hamann K, von Wurmb N, Oehmichen M. Quantification of mitochondrial DNA in human blood cells using an automated detection system. *Forensic Sci Int.* 11 de septiembre de 2000;113(1-3):109-12.
100. Zeviani M, Antozzi C. Mitochondrial disorders. *Mol Hum Reprod.* febrero de 1997;3(2):133-48.
101. Bai R-K, Perng C-L, Hsu C-H, Wong L-JC. Quantitative PCR analysis of mitochondrial DNA content in patients with mitochondrial disease. *Ann N Y Acad Sci.* abril de 2004;1011:304-9.
102. Bornstein B, Area E, Flanigan KM, Ganesh J, Jayakar P, Swoboda KJ, et al. Mitochondrial DNA depletion syndrome due to mutations in the RRM2B gene. *Neuromuscul Disord NMD.* junio de 2008;18(6):453-9.

103. Chan SSL, Copeland WC. DNA polymerase gamma and mitochondrial disease: understanding the consequence of POLG mutations. *Biochim Biophys Acta*. mayo de 2009;1787(5):312-9.
104. Marín-García J, Akhmedov AT, Moe GW. Mitochondria in heart failure: the emerging role of mitochondrial dynamics. *Heart Fail Rev*. julio de 2013;18(4):439-56.
105. Lan Q, Lim U, Liu C-S, Weinstein SJ, Chanock S, Bonner MR, et al. A prospective study of mitochondrial DNA copy number and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 15 de noviembre de 2008;112(10):4247-9.
106. Xia P, An H-X, Dang C-X, Radpour R, Kohler C, Fokas E, et al. Decreased mitochondrial DNA content in blood samples of patients with stage I breast cancer. *BMC Cancer*. 2009;9:454.
107. Cossarizza A, Riva A, Pinti M, Ammannato S, Fedeli P, Mussini C, et al. Increased mitochondrial DNA content in peripheral blood lymphocytes from HIV-infected patients with lipodystrophy. *Antivir Ther*. agosto de 2003;8(4):315-21.
108. Timmermans EC, Tebas P, Ruiter JPN, Wanders RJA, de Ronde A, de Baar MP. Real-time nucleic acid sequence-based amplification assay to quantify changes in mitochondrial DNA concentrations in cell cultures and blood cells from HIV-infected patients receiving antiviral therapy. *Clin Chem*. junio de 2006;52(6):979-87.
109. Weng S-W, Lin T-K, Liou C-W, Chen S-D, Wei Y-H, Lee H-C, et al. Peripheral blood mitochondrial DNA content and dysregulation of glucose metabolism. *Diabetes Res Clin Pract*. enero de 2009;83(1):94-9.
110. Cossarizza A. Tests for mitochondrial function and DNA: potentials and pitfalls. *Curr Opin Infect Dis*. febrero de 2003;16(1):5-10.
111. Urata M, Koga-Wada Y, Kayamori Y, Kang D. Platelet contamination causes large variation as well as overestimation of mitochondrial DNA content of peripheral blood mononuclear cells. *Ann Clin Biochem*. septiembre de 2008;45(Pt 5):513-4.
112. Steinberg K, Beck J, Nickerson D, Garcia-Closas M, Gallagher M, Caggana M, et al. DNA banking for epidemiologic studies: a review of current practices. *Epidemiol Camb Mass*. mayo de 2002;13(3):246-54.
113. Steinberg KK, Sanderlin KC, Ou CY, Hannon WH, McQuillan GM, Sampson EJ. DNA banking in epidemiologic studies. *Epidemiol Rev*. 1997;19(1):156-62.
114. NHANES - National Health and Nutrition Examination Survey Homepage [Internet]. [citado 22 de mayo de 2015]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/nchs/nhanes.htm>
115. Frank H. Wians, Jr., PhD. Normal Laboratory Values [Internet]. In Merck manual online. Disponible en: Retrieved from <http://www.merckmanuals.com/professional/appendixes/normal-laboratory-values/blood-tests-normal-values#v8508814.html>
116. Kim C, Bassig BA, Seow WJ, Hu W, Purdue MP, Huang W-Y, et al. Mitochondrial DNA copy number and chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma risk in two prospective studies. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. enero de 2015;24(1):148-53.

117. Hosnijeh FS, Lan Q, Rothman N, San Liu C, Cheng W-L, Nieters A, et al. Mitochondrial DNA copy number and future risk of B-cell lymphoma in a nested case-control study in the prospective EPIC cohort. *Blood*. 24 de julio de 2014;124(4):530-5.
118. Petersen MH, Budtz-Jørgensen E, Sørensen SA, Nielsen JE, Hjermland LE, Vinther-Jensen T, et al. Reduction in mitochondrial DNA copy number in peripheral leukocytes after onset of Huntington's disease. *Mitochondrion*. julio de 2014;17:14-21.
119. Marcuello A, Martínez-Redondo D, Dahmani Y, Casajús JA, Ruiz-Pesini E, Montoya J, et al. Human mitochondrial variants influence on oxygen consumption. *Mitochondrion*. febrero de 2009;9(1):27-30.
120. Bernth Jensen JM, Petersen MS, Stegger M, Østergaard LJ, Møller BK. Real-time relative qPCR without reference to control samples and estimation of run-specific PCR parameters from run-internal mini-standard curves. *PloS One*. 2010;5(7):e11723.
121. R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponible en: <https://www.r-project.org/>
122. Banas B, Kost BP, Goebel FD. Platelets, a typical source of error in real-time PCR quantification of mitochondrial DNA content in human peripheral blood cells. *Eur J Med Res*. 31 de agosto de 2004;9(8):371-7.
123. Andreu AL, Martinez R, Marti R, García-Arumí E. Quantification of mitochondrial DNA copy number: pre-analytical factors. *Mitochondrion*. julio de 2009;9(4):242-6.
124. Knez J, Winckelmans E, Plusquin M, Thijs L, Cauwenberghs N, Gu Y, et al. Correlates of Peripheral Blood Mitochondrial DNA Content in a General Population. *Am J Epidemiol*. 15 de enero de 2016;183(2):138-46.
125. Lee HK, Song JH, Shin CS, Park DJ, Park KS, Lee KU, et al. Decreased mitochondrial DNA content in peripheral blood precedes the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 1998;42(3):161-7.
126. Lee J-Y, Lee D-C, Im J-A, Lee J-W. Mitochondrial DNA copy number in peripheral blood is independently associated with visceral fat accumulation in healthy young adults. *Int J Endocrinol*. 2014;2014:586017.
127. Wakeman L, Al-Ismael S, Benton A, Beddall A, Gibbs A, Hartnell S, et al. Robust, routine haematology reference ranges for healthy adults. *Int J Lab Hematol*. agosto de 2007;29(4):279-83.
128. Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UCS. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci*. 3 de febrero de 2016;
129. Holvoet P, Lee D-H, Steffes M, Gross M, Jacobs DR. Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and incidence of the metabolic syndrome. *JAMA*. 21 de mayo de 2008;299(19):2287-93.
130. Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci*. 22 de mayo de 2009;84(21-22):705-12.

131. Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res.* septiembre de 2002;43(9):1363-79.
132. Laclaustra M, Corella D, Ordovas JM. Metabolic syndrome pathophysiology: The role of adipose tissue. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* febrero de 2007;17(2):125-39.
133. Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid Redox Signal.* agosto de 2005;7(7-8):1040-52.
134. Chen NG, Azhar S, Abbasi F, Carantoni M, Reaven GM. The relationship between plasma glucose and insulin responses to oral glucose, LDL oxidation, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in healthy volunteers. *Atherosclerosis.* septiembre de 2000;152(1):203-8.
135. Kawamura M, Heinecke JW, Chait A. Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide-dependent pathway. *J Clin Invest.* agosto de 1994;94(2):771-8.
136. Liguori A, Abete P, Hayden JM, Cacciatore F, Rengo F, Ambrosio G, et al. Effect of glycaemic control and age on low-density lipoprotein susceptibility to oxidation in diabetes mellitus type 1. *Eur Heart J.* 1 de noviembre de 2001;22(22):2075-84.
137. Weinbrenner T, Schröder H, Escurriol V, Fito M, Elosua R, Vila J, et al. Circulating oxidized LDL is associated with increased waist circumference independent of body mass index in men and women. *Am J Clin Nutr.* enero de 2006;83(1):30-35; quiz 181-182.
138. Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obes Res Clin Pract.* octubre de 2013;7(5):E330-41.
139. Fernández-Friera L, Peñalvo JL, Fernández-Ortiz A, Ibañez B, López-Melgar B, Laclaustra M, et al. Prevalence, Vascular Distribution, and Multiterritorial Extent of Subclinical Atherosclerosis in a Middle-Aged Cohort: The PESA (Progression of Early Subclinical Atherosclerosis) Study. *Circulation.* 16 de junio de 2015;131(24):2104-13.
140. World Health Organization. World Health Organization Obesity and overweight. [Internet]. WHO. 2015 [citado 8 de octubre de 2015]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
141. El Assaad MA, Topouchian JA, Darné BM, Asmar RG. Validation of the Omron HEM-907 device for blood pressure measurement. *Blood Press Monit.* agosto de 2002;7(4):237-41.
142. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* junio de 1972;18(6):499-502.
143. Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 20 de octubre de 2009;120(16):1640-5.

144. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. julio de 1985;28(7):412-9.
145. Ascaso JF, Pardo S, Real JT, Lorente RI, Priego A, Carmena R. Diagnosing insulin resistance by simple quantitative methods in subjects with normal glucose metabolism. *Diabetes Care*. diciembre de 2003;26(12):3320-5.
146. Tingley, D., Yamamoto, T., Hirose, K., Imai, K. and Keele, L. mediation: R Package for Causal Mediation Analysis. *J Stat Softw* [Internet]. 2014;Vol. 59, No. 5, pp. 1-38. Disponible en: <https://www.jstatsoft.org/article/view/v059i05>
147. Ceriello A. Is Oxidative Stress the Pathogenic Mechanism Underlying Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Disease? The Common Soil Hypothesis Revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1 de mayo de 2004;24(5):816-23.
148. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev*. octubre de 2002;23(5):599-622.
149. Holvoet P, Kritchevsky SB, Tracy RP, Mertens A, Rubin SM, Butler J, et al. The Metabolic Syndrome, Circulating Oxidized LDL, and Risk of Myocardial Infarction in Well-Functioning Elderly People in the Health, Aging, and Body Composition Cohort. *Diabetes*. 1 de abril de 2004;53(4):1068-73.
150. Lapointe A, Couillard C, Piché M-È, Weisnagel SJ, Bergeron J, Nadeau A, et al. Circulating oxidized LDL is associated with parameters of the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Atherosclerosis*. Abril de 2007;191(2):362-8.
151. Ueba T, Nomura S, Nishikawa T, Kajiwara M, Yamashita K. Circulating oxidized LDL, measured with FOH1a/DLH3 antibody, is associated with metabolic syndrome and the coronary heart disease risk score in healthy Japanese. *Atherosclerosis*. marzo de 2009;203(1):243-8.
152. Abdilla N, Tormo MC, Fabia MJ, Chaves FJ, Saez G, Redon J. Impact of the components of metabolic syndrome on oxidative stress and enzymatic antioxidant activity in essential hypertension. *J Hum Hypertens*. enero de 2007;21(1):68-75.
153. Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdaie A, Vaziri ND. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. *Metabolism*. julio de 2006;55(7):928-34.
154. Ceriello A, Russo P dello, Amstad P, Cerutti P. High Glucose Induces Antioxidant Enzymes in Human Endothelial Cells in Culture: Evidence Linking Hyperglycemia and Oxidative Stress. *Diabetes*. 1 de abril de 1996;45(4):471-7.
155. Kotani K, Satoh N, Kato Y, Araki R, Koyama K, Okajima T, et al. A novel oxidized low-density lipoprotein marker, serum amyloid A-LDL, is associated with obesity and the metabolic syndrome. *Atherosclerosis*. junio de 2009;204(2):526-31.
156. Njajou OT, Kanaya AM, Holvoet P, Connelly S, Strotmeyer ES, Harris TB, et al. Association between oxidized LDL, obesity and type 2 diabetes in a population-based cohort, the Health, Aging and Body Composition Study. *Diabetes Metab Res Rev*. noviembre de 2009;25(8):733-9.

157. Castro JP, Grune T, Speckmann B. The two faces of ROS in adipocyte function and dysfunction. *Biol Chem.* 31 de marzo de 2016;
158. Boyer F, Vidot JB, Dubourg AG, Rondeau P, Essop MF, Bourdon E. Oxidative stress and adipocyte biology: focus on the role of AGEs. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:534873.
159. Netzer N, Gatterer H, Faulhaber M, Burtscher M, Pramsohler S, Pesta D. Hypoxia, Oxidative Stress and Fat. *Biomolecules.* 2015;5(2):1143-50.
160. Manna P, Jain SK. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metab Syndr Relat Disord.* diciembre de 2015;13(10):423-44.
161. Matusik P, Prokopowicz Z, Norek B, Olszanecka-Glinianowicz M, Chudek J, Malecka-Tendera E. Oxidative/Antioxidative status in obese and sport trained children: a comparative study. *BioMed Res Int.* 2015;2015:315747.
162. Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes* 2005. marzo de 2006;30(3):400-18.
163. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* diciembre de 2004;114(12):1752-61.
164. Srikanthan K, Feyh A, Visweshwar H, Shapiro JI, Sodhi K. Systematic Review of Metabolic Syndrome Biomarkers: A Panel for Early Detection, Management, and Risk Stratification in the West Virginian Population. *Int J Med Sci.* 2016;13(1):25-38.
165. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:415-45.
166. Solaini G, Baracca A, Lenaz G, Sgarbi G. Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta BBA - Bioenerg.* junio de 2010;1797(6-7):1171-7.
167. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, et al. Reactive Oxygen Species Generated at Mitochondrial Complex III Stabilize Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  during Hypoxia A MECHANISM OF O<sub>2</sub> SENSING. *J Biol Chem.* 18 de agosto de 2000;275(33):25130-8.
168. Abramov AY, Scorziello A, Duchon MR. Three Distinct Mechanisms Generate Oxygen Free Radicals in Neurons and Contribute to Cell Death during Anoxia and Reoxygenation. *J Neurosci.* 31 de enero de 2007;27(5):1129-38.
169. Dugan LL, Choi DW. Free Radicals in Hypoxia-Ischemia. 1999 [citado 1 de abril de 2016]; Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28241/>
170. Husain K, Hernandez W, Ansari RA, Ferder L. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. *World J Biol Chem.* 26 de agosto de 2015;6(3):209-17.
171. Maiolino G, Rossitto G, Caielli P, Bisogni V, Rossi GP, Calò LA. The role of oxidized low-density lipoproteins in atherosclerosis: the myths and the facts. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:714653.

172. Kawada T. Oxidative stress markers and cardiovascular disease: advantage of using these factors in combination with lifestyle factors for cardiovascular risk assessment. *Int J Cardiol.* 17 de mayo de 2012;157(1):119-20.
173. Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res.* 19 de febrero de 2016;118(4):535-46.
174. Farmer JA, Torre-Amione G. Atherosclerosis and inflammation. *Curr Atheroscler Rep.* marzo de 2002;4(2):92-8.
175. Buja LM, Nikolai N, Anitschkow and the lipid hypothesis of atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol Off J Soc Cardiovasc Pathol.* junio de 2014;23(3):183-4.
176. Salvayre R, Negre-Salvayre A, Camaré C. Oxidative theory of atherosclerosis and antioxidants. *Biochimie.* junio de 2016;125:281-96.
177. Sigala F, Kotsinas A, Savari P, Filis K, Markantonis S, Iliodromitis EK, et al. Oxidized LDL in human carotid plaques is related to symptomatic carotid disease and lesion instability. *J Vasc Surg.* septiembre de 2010;52(3):704-13.
178. Li D, Patel AR, Klivanov AL, Kramer CM, Ruiz M, Kang B-Y, et al. Molecular imaging of atherosclerotic plaques targeted to oxidized LDL receptor LOX-1 by SPECT/CT and magnetic resonance. *Circ Cardiovasc Imaging.* julio de 2010;3(4):464-72.
179. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, et al. Atherosclerosis: Basic Mechanisms. *Circulation.* 1 de mayo de 1995;91(9):2488-96.
180. Holvoet P, Mertens A, Verhamme P, Bogaerts K, Beyens G, Verhaeghe R, et al. Circulating Oxidized LDL Is a Useful Marker for Identifying Patients With Coronary Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1 de mayo de 2001;21(5):844-8.
181. Yoshida H, Kisugi R. Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 14 de diciembre de 2010;411(23-24):1875-82.
182. Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M, et al. Elevated Levels of Oxidized Low Density Lipoprotein Show a Positive Relationship With the Severity of Acute Coronary Syndromes. *Circulation.* 17 de abril de 2001;103(15):1955-60.
183. Guxens M, Fitó M, Martínez-González M-A, Salas-Salvadó J, Estruch R, Vinyoles E, et al. Hypertensive status and lipoprotein oxidation in an elderly population at high cardiovascular risk. *Am J Hypertens.* enero de 2009;22(1):68-73.
184. Kopprasch S, Pietzsch J, Kuhlisch E, Fuecker K, Temelkova-Kurktschiev T, Hanefeld M, et al. In vivo evidence for increased oxidation of circulating LDL in impaired glucose tolerance. *Diabetes.* octubre de 2002;51(10):3102-6.
185. Ramos-Arellano LE, Muñoz-Valle JF, De la Cruz-Mosso U, Salgado-Bernabé AB, Castro-Alarcón N, Parra-Rojas I. Circulating CD36 and oxLDL levels are associated with cardiovascular risk factors in young subjects. *BMC Cardiovasc Disord.* 2014;14:54.
186. Wallenfeldt K, Fagerberg B, Wikstrand J, Hulthe J. Oxidized low-density lipoprotein in plasma is a prognostic marker of subclinical atherosclerosis development in clinically healthy men. *J Intern Med.* noviembre de 2004;256(5):413-20.

187. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*. junio de 2000;18(6):655-73.
188. Harrison DG, Gongora MC, Guzik TJ, Widder J. Oxidative stress and hypertension. *J Am Soc Hypertens JASH*. febrero de 2007;1(1):30-44.
189. Drews G, Krippeit-Drews P, Düfer M. Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflugers Arch*. septiembre de 2010;460(4):703-18.
190. Hurtado-Roca Y, Bueno H, Fernandez-Ortiz A, Ordovas JM, Ibañez B, Fuster V, et al. Oxidized LDL Is Associated With Metabolic Syndrome Traits Independently of Central Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*. febrero de 2017;66(2):474-82.
191. van Tits LJH, Stienstra R, van Lent PL, Netea MG, Joosten L a. B, Stalenhoef AFH. Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: a crucial role for Krüppel-like factor 2. *Atherosclerosis*. febrero de 2011;214(2):345-9.
192. Metso S, Loimaala A, Mercuri MF, Nenonen A, Vuori I, Oja P, et al. Circulating oxidized low-density lipoprotein and common carotid artery intima-media thickness in a random sample of middle-aged men. *J Biomed Sci*. junio de 2004;11(3):356-61.
193. Calmarza P, Trejo JM, Lapresta C, López P. LDL Oxidation and Its Association With Carotid Artery Intima-Media Thickness and Other Cardiovascular Risk Factors in a Sample of Spanish General Population. *Angiology*. Abril de 2014;65(4):357-62.
194. Nyssönen K, Kurl S, Karppi J, Nurmi T, Baldassarre D, Veglia F, et al. LDL oxidative modification and carotid atherosclerosis: Results of a multicenter study. *Atherosclerosis*. noviembre de 2012;225(1):231-6.
195. Hulthe J, Fagerberg B. Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1 de julio de 2002;22(7):1162-7.
196. Salonen JT, Nyssönen K, Salonen R, Porkkala-Sarataho E, Tuomainen TP, Diczfalusy U, et al. Lipoprotein oxidation and progression of carotid atherosclerosis. *Circulation*. 18 de febrero de 1997;95(4):840-5.
197. Tsimikas S, Kiechl S, Willeit J, Mayr M, Miller ER, Kronenberg F, et al. Oxidized phospholipids predict the presence and progression of carotid and femoral atherosclerosis and symptomatic cardiovascular disease: five-year prospective results from the Bruneck study. *J Am Coll Cardiol*. 6 de junio de 2006;47(11):2219-28.
198. Langlois MR, Rietzschel ER, Buyzere MLD, Bacquer DD, Bekaert S, Blaton V, et al. Femoral Plaques Confound the Association of Circulating Oxidized Low-Density Lipoprotein With Carotid Atherosclerosis in a General Population Aged 35 to 55 Years. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1 de agosto de 2008;28(8):1563-8.
199. Meisinger C, Baumert J, Khuseyinova N, Loewel H, Koenig W. Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. *Circulation*. 2 de agosto de 2005;112(5):651-7.

200. Shimada K, Mokuno H, Matsunaga E, Miyazaki T, Sumiyoshi K, Miyauchi K, et al. Circulating oxidized low-density lipoprotein is an independent predictor for cardiac event in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. junio de 2004;174(2):343-7.
201. Baber U, Mehran R, Sartori S, Schoos MM, Sillesen H, Muntendam P, et al. Prevalence, impact, and predictive value of detecting subclinical coronary and carotid atherosclerosis in asymptomatic adults: the BioImage study. *J Am Coll Cardiol*. 24 de marzo de 2015;65(11):1065-74.
202. Touboul P-J, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, et al. Mannheim carotid intima-media thickness and plaque consensus (2004-2006-2011). An update on behalf of the advisory board of the 3rd, 4th and 5th watching the risk symposia, at the 13th, 15th and 20th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, Brussels, Belgium, 2006, and Hamburg, Germany, 2011. *Cerebrovasc Dis Basel Switz*. 2012;34(4):290-6.
203. Mercodia Oxidized LDL ELISA - Mercodia - Diagnostic immunoassay kits [Internet]. Mercodia. Disponible en: <http://www.mercodia.com/mercodia-oxidized-ldl-elisa>
204. Itabe H, Mori M, Fujimoto Y, Higashi Y, Takano T. Minimally modified LDL is an oxidized LDL enriched with oxidized phosphatidylcholines. *J Biochem (Tokyo)*. septiembre de 2003;134(3):459-65.
205. Frostegård J, Zhang Y, Sun J, Yan K, Liu A. Oxidized Low-Density Lipoprotein (OxLDL)-Treated Dendritic Cells Promote Activation of T Cells in Human Atherosclerotic Plaque and Blood, Which Is Repressed by Statins: microRNA let-7c Is Integral to the Effect. *J Am Heart Assoc*. 1 de septiembre de 2016;5(9):e003976.
206. Strobel NA, Fassett RG, Marsh SA, Coombes JS. Oxidative stress biomarkers as predictors of cardiovascular disease. *Int J Cardiol*. 3 de marzo de 2011;147(2):191-201.
207. Holvoet P, Jenny NS, Schreiner PJ, Tracy RP, Jacobs DR, Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. The relationship between oxidized LDL and other cardiovascular risk factors and subclinical CVD in different ethnic groups: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis*. septiembre de 2007;194(1):245-52.
208. Araki E, Nishikawa T. Oxidative stress: A cause and therapeutic target of diabetic complications. *J Diabetes Investig*. 1 de junio de 2010;1(3):90-6.
209. Kassi E, Dalamaga M, Faviou E, Hroussalas G, Kazanis K, Nounopoulos C, et al. Circulating oxidized LDL levels, current smoking and obesity in postmenopausal women. *Atherosclerosis*. julio de 2009;205(1):279-83.
210. Zhou M-S, Chadipiralla K, Mendez AJ, Jaimes EA, Silverstein RL, Webster K, et al. Nicotine potentiates proatherogenic effects of oxLDL by stimulating and upregulating macrophage CD36 signaling. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol*. 15 de agosto de 2013;305(4):H563-74.
211. Lassègue B, Griendling KK. Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am J Hypertens*. septiembre de 2004;17(9):852-60.
212. Galan P, Kesse-Guyot E, Czernichow S, Briançon S, Blacher J, Hercberg S, et al. Effects of B vitamins and omega 3 fatty acids on cardiovascular diseases: a

- randomised placebo controlled trial. *BMJ*. 29 de noviembre de 2010;341:c6273.
213. Tsutsui T, Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Mabuchi N, Hayashi M, et al. Plasma oxidized low-density lipoprotein as a prognostic predictor in patients with chronic congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 20 de marzo de 2002;39(6):957-62.
  214. MacKinnon DP, Fairchild AJ, Fritz MS. Mediation Analysis. *Annu Rev Psychol*. 2007;58:593.
  215. Albert JM. Mediation Analysis for Nonlinear Models with Confounding. *Epidemiol Camb Mass*. noviembre de 2012;23(6):879-88.
  216. Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, et al. Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl4 poisoning? *Free Radic Biol Med*. 15 de marzo de 2005;38(6):698-710.
  217. González AS, Guerrero DB, Soto MB, Díaz SP, Martínez-Olmos M, Vidal O. Metabolic syndrome, insulin resistance and the inflammation markers C-reactive protein and ferritin. *Eur J Clin Nutr*. junio de 2006;60(6):802-9.
  218. Jehn M, Clark JM, Guallar E. Serum ferritin and risk of the metabolic syndrome in U.S. adults. *Diabetes Care*. octubre de 2004;27(10):2422-8.
  219. Bozzini C, Girelli D, Olivieri O, Martinelli N, Bassi A, De Matteis G, et al. Prevalence of body iron excess in the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. agosto de 2005;28(8):2061-3.
  220. Halle M, König D, Berg A, Keul J, Baumstark MW. Relationship of serum ferritin concentrations with metabolic cardiovascular risk factors in men without evidence for coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 10 de febrero de 1997;128(2):235-40.
  221. 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*. marzo de 2011;60(3):414-20.
  222. Tuomainen TP, Nyyssönen K, Salonen R, Tervahauta A, Korpela H, Lakka T, et al. Body iron stores are associated with serum insulin and blood glucose concentrations. Population study in 1,013 eastern Finnish men. *Diabetes Care*. marzo de 1997;20(3):426-8.
  223. Piperno A, Trombini P, Gelosa M, Mauri V, Pecci V, Vergani A, et al. Increased serum ferritin is common in men with essential hypertension. *J Hypertens*. agosto de 2002;20(8):1513-8.
  224. Gillum RF. Association of serum ferritin and indices of body fat distribution and obesity in Mexican American men--the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes*. mayo de 2001;25(5):639-45.
  225. Williams MJA, Poulton R, Williams S. Relationship of serum ferritin with cardiovascular risk factors and inflammation in young men and women. *Atherosclerosis*. noviembre de 2002;165(1):179-84.
  226. Rajpathak SN, Crandall JP, Wylie-Rosett J, Kabat GC, Rohan TE, Hu FB. The role of

- iron in type 2 diabetes in humans. *Biochim Biophys Acta*. julio de 2009;1790(7):671-81.
227. 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*. abril de 2014;37(4):1092-100.
  228. Gabrielsen JS, Gao Y, Simcox JA, Huang J, Thorup D, Jones D, et al. Adipocyte iron regulates adiponectin and insulin sensitivity. *J Clin Invest*. 1 de octubre de 2012;122(10):3529-40.
  229. 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*. abril de 2002;51(4):1000-4.
  230. Yoo K-D, Ko S-H, Park J-E, Ahn Y-B, Yim HW, Lee W-C, et al. High serum ferritin levels are associated with metabolic risk factors in non-obese Korean young adults: Korean National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) IV. *Clin Endocrinol (Oxf)*. agosto de 2012;77(2):233-40.
  231. Lee B-K, Kim Y, Kim Y-I. Association of serum ferritin with metabolic syndrome and diabetes mellitus in the South Korean general population according to the Korean National Health and Nutrition Examination Survey 2008. *Metabolism*. octubre de 2011;60(10):1416-24.
  232. Vari IS, Balkau B, Kettaneh A, André P, Tichet J, Fumeron F, et al. Ferritin and transferrin are associated with metabolic syndrome abnormalities and their change over time in a general population: Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR). *Diabetes Care*. julio de 2007;30(7):1795-801.
  233. Park SK, Ryoo J-H, Kim M-G, Shin J-Y. Association of Serum Ferritin and the Development of Metabolic Syndrome in Middle-Aged Korean Men: A 5-year follow-up study. *Diabetes Care*. diciembre de 2012;35(12):2521-6.
  234. Davis RJ, Corvera S, Czech MP. Insulin stimulates cellular iron uptake and causes the redistribution of intracellular transferrin receptors to the plasma membrane. *J Biol Chem*. 5 de julio de 1986;261(19):8708-11.
  235. Cook JD, Lipschitz DA, Miles LE, Finch CA. Serum ferritin as a measure of iron stores in normal subjects. *Am J Clin Nutr*. julio de 1974;27(7):681-7.
  236. Wessling-Resnick M. Iron homeostasis and the inflammatory response. *Annu Rev Nutr*. 21 de agosto de 2010;30:105-22.
  237. McClain DA, Abraham D, Rogers J, Brady R, Gault P, Ajioka R, et al. High prevalence of abnormal glucose homeostasis secondary to decreased insulin secretion in individuals with hereditary haemochromatosis. *Diabetologia*. julio de 2006;49(7):1661-9.
  238. Crownover BK, Covey CJ. Hereditary hemochromatosis. *Am Fam Physician*. 1 de febrero de 2013;87(3):183-90.
  239. Wood MJ, Powell LW, Dixon JL, Ramm GA. Clinical cofactors and hepatic fibrosis in hereditary hemochromatosis: the role of diabetes mellitus. *Hepatol Baltim Md*. septiembre de 2012;56(3):904-11.

240. Cooksey RC, Jouihan HA, Ajioka RS, Hazel MW, Jones DL, Kushner JP, et al. Oxidative stress, beta-cell apoptosis, and decreased insulin secretory capacity in mouse models of hemochromatosis. *Endocrinology*. noviembre de 2004;145(11):5305-12.
241. Lee KS, Buck M, Houghlum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF alpha and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest*. noviembre de 1995;96(5):2461-8.
242. Parola M, Marra F. Adipokines and redox signaling: impact on fatty liver disease. *Antioxid Redox Signal*. 15 de julio de 2011;15(2):461-83.
243. Mateo-Gallego R, Calmarza P, Jarauta E, Burillo E, Cenarro A, Civeira F. Serum ferritin is a major determinant of lipid phenotype in familial combined hyperlipidemia and familial hypertriglyceridemia. *Metabolism*. febrero de 2010;59(2):154-8.
244. Casanova-Esteban P, Guiral N, Andrés E, Gonzalvo C, Mateo-Gallego R, Giraldo P, et al. Effect of phlebotomy on lipid metabolism in subjects with hereditary hemochromatosis. *Metabolism*. junio de 2011;60(6):830-4.
245. Wu J, Chen L, Chen Y, Yang J, Wu D. Serum ferritin concentration predicts mortality in patients with hepatitis B virus-related acute on chronic liver failure. *Arch Med Res*. abril de 2014;45(3):251-6.
246. Vagu C, Sultana C, Ruta S. Serum iron markers in patients with chronic hepatitis C infection. *Hepat Mon*. 2013;13(10):e13136.
247. Tamakoshi K, Yatsuya H, Kondo T, Hori Y, Ishikawa M, Zhang H, et al. The metabolic syndrome is associated with elevated circulating C-reactive protein in healthy reference range, a systemic low-grade inflammatory state. *Int J Obes Relat Metab Disord J Int Assoc Study Obes*. abril de 2003;27(4):443-9.
248. Kaur J. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. *Cardiol Res Pract*. 11 de marzo de 2014;2014:e943162.

## ARTICULOS PUBLICADOS

### Artículos Originales de primer autor

1. **Hurtado-Roca Y**, Bueno H, Fernandez-Ortiz A, Ordovas JM, Ibañez B, Fuster V, y cols. Oxidized LDL Is Associated With Metabolic Syndrome Traits Independently of Central Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes*. 2017 Feb;66(2):474–82.
2. **Hurtado-Roca Y**, Ledesma M, Gonzalez-Lazaro M, Moreno-Loshuertos R, Fernandez-Silva P, Enriquez JA, y cols. Adjusting ADNmt Quantification in Whole Blood for Peripheral Blood Platelet and Leukocyte Counts. *PloS One*. 2016;11(10):e0163770.

### Artículos Originales en las que participé durante mi formación doctoral

1. Laclaustra M, Casasnovas JA, Fernández-Ortiz A, Fuster V, León-Latre M, Jiménez-Borreguero LJ, Pocovi M, **Hurtado-Roca Y**, Ordovas JM, Jarauta E, Guallar E, Ibañez B, Civeira F. Femoral and Carotid Subclinical Atherosclerosis Association With Risk Factors and Coronary Calcium: The AWHs Study. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Mar 22;67(11):1263–74.
2. Laclaustra M, **Hurtado-Roca Y**, Sendin M, Leon M, Ledesma M, Andres E, y cols. Lower-normal TSH is associated with better metabolic risk factors: A cross-sectional study on Spanish men. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD*. 2015 Dec;25(12):1095–103.
3. Saravia G, Civeira F, **Hurtado-Roca Y**, Andres E, Leon M, Pocovi M, y cols. Glycated Hemoglobin, Fasting Insulin and the Metabolic Syndrome in Males.

Cross-Sectional Analyses of the Aragon Workers' Health Study Baseline. *PLoS One*. 2015;10(8): e0132244.

4. Ledesma M, **Hurtado-Roca Y**, Leon M, Giraldo P, Pocovi M, Civeira F, Guallar E, Ordoñas JM, Casasnovas JA, Laclaustra M. Association of ferritin elevation and metabolic syndrome in males. Results from the Aragon Workers' Health Study (AWHS). *J Clin Endocrinol Metab*. 2015 May;100(5):2081-9. doi: 10.1210/jc.2014-4409. Epub 2015 Feb 19.
5. Laclaustra M, Van Den Berg ELM, **Hurtado-Roca Y**, Castellote JM. Serum lipid profile in subjects with traumatic spinal cord injury. *PLoS One*. 2015;10(2): e0115522.
6. Sanchez-Torres D, Gutierrez-Bejarano D, **Hurtado-Roca Y**, Guallar-Castillon P, Muntner P, Laclaustra M. Non-linear association of periodontal pathogen antibodies with mortality. *Int J Cardiol*. 2015; 187:628–36.
7. Hajar G, Aramburu A, **Hurtado Y**, Suárez V. Rice fortification to correct micronutrient deficiency in children 6-59 months old. *Rev Panam Salud Publica Pan Am J Public Health*. 2015 Jan; 37(1):52–8.

#### **Artículos Originales de primer autor pendiente de publicación**

1. Análisis de LDL oxidada plasmática como un potencial mediador entre factores de riesgo cardiovascular y aterosclerosis subclínica carotídea.

## **ANEXOS**