

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

OXIDACIÓN E INFLAMACIÓN EN LA HIPERLIPIDEMIA
FAMILIAR COMBINADA

SERGIO MARTÍNEZ HERVÁS

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2007

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 30 de Març de 2007 davant un tribunal format per:

- D. Rafael Carmena Rodríguez
- D. Jaime Merino Sánchez
- D. Juan Rubies Prat
- D. Juan Carlos Pedro-Botet Montoya
- D. Carlos Sánchez Juan

Va ser dirigida per:

D. Juan F. Ascaso Gimilio

D. José T. Real Collado

©Copyright: Servei de Publicacions
Sergio Martínez Hervás

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-6832-9

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115



VNIVERSITAT Æ VALÈNCIA

Facultat de Medicina

Oxidación e Inflamación en la
Hiperlipidemia Familiar Combinada

TESIS DOCTORAL:

Presentada por:
Sergio Martínez Hervás

Dirigida por:
Juan F Ascaso Gimilio
José T Real Collado



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

Departament de Medicina

Juan F. Ascaso Gimilio, Doctor en medicina y CU del Departament de Medicina de la Universitat de Valencia y José T. Real Collado, Doctor en medicina y Prof. Asociado del Departament de Medicina de la Universitat de Valencia.

CERTIFICAN:

Que D. Sergio Martínez Hervás, licenciado en medicina, ha realizado bajo nuestra dirección la tesis doctoral titulada: “Oxidación e inflamación en la hiperlipidemia familiar combinada”, y que reúne todos los requisitos para ser presentada y defendida para optar al Grado de Doctor por la Universitat de Valencia.

Valencia, 16 de enero de 2007.

Fdo. Dr. Juan F. Ascaso

Fdo. Dr. José T. Real

A Sofia

A mis padres
A mi hermano

A Erick y Mise

AGRADECIMIENTOS

- Al Profesor D Rafael Carmena por la transmisión continua de sus profundos conocimientos y por su apoyo en todo momento.
- Al Profesor D Juan F Ascaso por su inestimable ayuda y apoyo en todo momento, sin los cuales no habría sido posible este trabajo.
- Al Dr José T Real por su perseverante estímulo y ayuda en todo momento, por haberme enseñado a amar la investigación y por hacer que las cosas complicadas parezcan tan sencillas.
- Al Dr Javier Chaves y al resto de integrantes del Laboratorio por su continua colaboración.
- A Geles por su amabilidad y colaboración en tantas y tantas extracciones.
- A toda la gente que ha hecho posible este trabajo.

ÍNDICE

	Página
Listado de abreviaturas utilizadas _____	5
I. Introducción _____	7
1. Arteriosclerosis y riesgo cardiovascular _____	9
2. Hiperlipidemia familiar combinada _____	9
2.1. Introducción _____	9
2.2. Criterios diagnósticos _____	12
2.3. Etiología _____	12
2.4. Patogenia _____	13
2.4.1. Sobreproducción hepática de VLDL _____	14
2.4.2. Disminución de la actividad de la LPL _____	14
2.4.3. Alteraciones de la lipasa hormonosensible _____	15
2.4.4. Alteración de la esterificación de los ácidos grasos en el tejido adiposo _____	15
2.4.5. Resistencia a la insulina y ácidos grasos libres _____	16
3. Lipemia postprandial _____	16
4. Oxidación y HFC _____	19
5. Inflamación, arteriosclerosis e insulinoresistencia _____	24
6. Figuras _____	29
II. Hipótesis y objetivos _____	35
III. Sujetos y métodos _____	39
1. Sujetos _____	41
2. Métodos _____	42
IV. Resultados _____	49
V. Discusión _____	75
1. Nivel de estrés oxidativo y factores de inflamación relacionados con la arteriosclerosis en sujetos con HFC y controles _____	77
2. Relación entre parámetros antropométricos y grado de RI con el EO y la inflamación en sujetos con HFC y controles _____	80
VI. Conclusiones _____	87
VII. Bibliografía _____	91

LISTADO DE ABREVIATURAS UTILIZADAS

ACV: accidente cerebrovascular
ADN: ácido desoxirribonucleico
AE: arteriosclerosis
AGL: ácidos grasos libres
ARN: ácido ribonucleico
ASP: proteína estimuladora de acilación
AT-1 y 2: receptor de angiotensina 1 y 2
BH₄: tetrahidrobiopterina
CAT: catalasa
cHDL: colesterol HDL
cLDL: colesterol LDL
CT: colesterol
cVLDL: colesterol VLDL
ECV: enfermedad cardiovascular
eNOS: sintetasa de óxido nítrico endotelial
EO: estrés oxidativo
ET-A: receptor de endotelina A
GPX: glutatión peroxidasa
GSH: glutatión reducido
GSR: glutatión reductasa
GSS: glutatión transferasa
GSSG: glutatión oxidado
HFC: hiperlipidemia familiar combinada
IAM: infarto agudo de miocardio
IGF-1: insulin growth factor 1
IKβ: inhibidor de κβ
IKK: inhibidor de κβ cinasa
IL-1: interleucina 1
IL-6: interleucina 6
IMC: índice de masa corporal
iNOS: sintetasa de óxido nítrico inducible
LHS: lipasa hormonosensible
LPL: lipoproteinlipasa
LPP: lipemia posprandial
MDA: malondialdehído
NAD(P)H oxidasa:
NF-κβ: nuclear factor κβ
nNOS: sintetasa de óxido nítrico neuronal
NO: óxido nítrico
O₂⁻: anión superóxido
OH·: grupo hidroxilo
8-oxo-dG: 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina
PCRs: proteína C reactiva de alta sensibilidad
PPAR: receptor activado de la proliferación de peroxisomas
QM: quilomicrones
RI: resistencia a la insulina
ROS: reactive oxygen species
SM: síndrome metabólico

SOD(s): superóxido dismutasa(s)
TG: triglicéridos
TNF α : factor de necrosis tisular α
XO: xantinoxidasa

I. Introducción

1. Arteriosclerosis y riesgo cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la primera causa de morbi-mortalidad en el mundo desarrollado, lo que supone en España aproximadamente el 40% de la mortalidad en la edad adulta¹. La arteriosclerosis (AE) es la principal causa de las ECV y afecta fundamentalmente a las arterias de mediano y gran calibre caracterizada por endurecimiento y pérdida de elasticidad de su pared, y formación de una placa aterosclerosa que conduce al estrechamiento de su lumen. En general la lesión aterosclerótica se desarrolla en tres fases, y todas vienen marcadas por depósito de lípidos y por procesos inflamatorios. Inicialmente aparecen estrías grasas, caracterizadas por la presencia de células espumosas cargadas de lípidos, que proceden de los macrófagos de la íntima arterial. Posteriormente tienen lugar la proliferación y la migración hacia la íntima de las células musculares lisas, la necrosis de células espumosas con depósito de detritus celulares, lípidos y cristales de colesterol, apareciendo la llamada placa fibrosa. Finalmente, en estadios avanzados, la AE se caracteriza por placas maduras formadas por proliferación continua de células miointimales, necrosis de células espumosas y endoteliales, hemorragia, trombosis mural y depósitos de calcio, conformando las denominadas placas complicadas².

El riesgo de desarrollar AE y su complicación clínica, la enfermedad cardiovascular, no es uniforme en toda la población y depende de numerosos factores. Por ello, las enfermedades cardiovasculares de origen arteriosclerótico son un modelo de patología multifactorial, donde confluyen tanto factores ambientales como genéticos. Uno de los principales factores de riesgo son las dislipemias. Éstas pueden ser primarias o secundarias. Dentro de las dislipemias primarias destacan, por su alto riesgo cardiovascular y prevalencia, la hiperlipidemia familiar combinada (HFC) y la hipercolesterolemia familiar.

2. Hiperlipidemia familiar combinada

2.1. Introducción

El término hiperlipidemia familiar combinada fue utilizado por primera vez en 1973 por Joseph Goldstein et al³⁻⁵ en la Universidad de Washington para designar un nuevo trastorno lipídico hereditario, caracterizado por la presencia de múltiples

fenotipos lipoproteicos, en sujetos jóvenes sobrevivientes a un infarto agudo de miocardio (IAM). Se observó que los probandos y familiares afectados podían presentar elevaciones de los triglicéridos, del colesterol total, o de ambos, reflejando incrementos plasmáticos de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) o fenotipo IV, de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) o fenotipo IIA, o de ambas, respectivamente o fenotipo IIB. Al mismo tiempo, fueron descritas familias similares por Esko Nikkilä en Helsinki⁶ y por Herbert Rose en Nueva York⁷.

Goldstein et al³ estudiaron a un grupo de 500 sobrevivientes de IAM. La mayoría eran sujetos de mediana edad (hombres menores de 40 años y mujeres menores de 50 años). El 31% de los sujetos eran hiperlipémicos, y de éstos, el 15,6% tenían un fenotipo IV, el 7,8% un fenotipo IIB, y el 7,6% un fenotipo IIA. Observaron que en el grupo de sujetos con hipertrigliceridemia (fenotipos IIB y IV) existía mayor prevalencia de obesidad, hipertensión arterial y diabetes que en los otros grupos (tanto normolipémicos como hipercolesterolémicos).

Además, posteriormente observaron que los familiares de los 176 sujetos sobrevivientes al infarto con hiperlipemia, presentaban cinco alteraciones lipídicas distintas, siendo consideradas tres de ellas, por el patrón de transmisión, trastornos monogénicos autosómicos dominantes. Una era la hipercolesterolemia familiar (sujeto índice y los familiares afectados presentaban constantemente un fenotipo IIA), otra la hipertrigliceridemia familiar (donde el probando y los familiares afectados tenían un fenotipo IV) y una nueva entidad que denominaron hiperlipidemia familiar combinada. El rasgo diferenciador más importante de esta nueva hiperlipemia era la variabilidad en el fenotipo lipoproteico que presentaban los familiares afectados, que podía ser IIA, IIB y IV, correspondiendo cada fenotipo aproximadamente a un tercio de los casos, y menos frecuentemente presentaban un fenotipo V. El registro de los valores de trigliceridemia de todos los familiares mostraba una distribución bimodal, que diferenciaba claramente entre los afectados y no afectados. En cambio, la distribución de los valores de colesterolemia aunque desplazada a la derecha, era unimodal. Estos hallazgos, y los patrones de afectación familiar (prevalencia de 45-55% en familiares de primer grado y 20-30% en los de segundo grado), hacían a esta hiperlipemia compatible con un trastorno monogénico, autosómico dominante con expresión variable⁴.

Al mismo tiempo, Nikkila et al⁶, en Finlandia, estudiaron a los familiares de 101 pacientes supervivientes a un IAM precoz y encontraron, predominantemente

una hiperlipoproteinemia familiar, siendo la forma más frecuente una “enfermedad con hiperlipemia mixta” o de fenotipo lipoproteico múltiple, observando fenotipos variables incluso dentro de la misma familia. El 50% de los sujetos integrantes de estas familias eran hiperlipémicos y los fenotipos IIA, IIB y IV representaban cada uno de ellos, aproximadamente, un tercio del total. El registro de los valores plasmáticos de triglicéridos de todos los familiares no mostraba una diferencia clara entre los afectados y no afectados; del mismo modo, la distribución de los valores de colesterol era también unimodal. Esta discordancia les hizo desestimar, como mecanismo de transmisión genética, la herencia autosómica dominante, e inclinarse a que el trastorno fuera debido a una expresión polimórfica de varios fenotipos.

Por otro lado, Rose et al⁷ estudiaron a familias con fenotipo variable, encontrando mayor frecuencia de intolerancia a la glucosa, obesidad e hiperuricemia.

Desde entonces, ha habido múltiples intentos de caracterizar y definir la enfermedad. Actualmente, la HFC es una enfermedad muy frecuente, con una prevalencia estimada del 1-3% en la población general y hasta del 20% en pacientes con cardiopatía isquémica precoz. Es la forma más común de hiperlipemia familiar, con una prevalencia en la población con hiperlipemia primaria de aproximadamente el 15%^{8,9}. Su base metabólica y genética no ha sido todavía identificada, siendo el mecanismo más probable la interacción de diferentes genes y el ambiente.

La edad de presentación es variable, aunque existe una baja penetrancia en niños y sujetos jóvenes, siendo infrecuente su aparición antes de los 20 años. Se caracteriza por presentar varios fenotipos lipoproteicos en la misma familia, e incluso en el mismo individuo, a lo largo de su evolución, generalmente por cambios en los factores exógenos (dieta, ejercicio, etc.). Habitualmente la dislipemia afecta al 50% de los familiares de primer grado, con importante predisposición a la cardiopatía isquémica precoz.

El diagnóstico se basa en el estudio familiar y la expresión fenotípica variable con elevación de la apolipoproteína B (apo B) plasmática e historia positiva de enfermedad cardiovascular prematura. Otras anormalidades frecuentemente asociadas son bajos niveles de colesterol HDL, alteraciones en la composición de las lipoproteínas, con presencia de LDL pequeñas y densas, y aumento de los ácidos grasos libres (AGL)^{8,9}.

2.2. Criterios diagnósticos

Actualmente, no existe ningún marcador clínico, metabólico o genético específico para el diagnóstico de la HFC, lo que supone una dificultad tanto en su definición como en su diagnóstico. Para diagnosticar a estos pacientes se siguen los criterios propuestos por Bredie et al¹⁰ en 1997. Sin embargo, basar el diagnóstico de la enfermedad en estos criterios puede dar lugar a errores.

Diversos autores han demostrado, que los criterios más consistentes para el diagnóstico, y que mejor diferencian los sujetos afectados de los familiares no afectados son la presencia de valores plasmáticos elevados de apo B y de LDL pequeñas y densas,^{8,11,12} por lo que se ha propuesto la necesidad de modificar los criterios diagnósticos iniciales¹³.

1 Criterios mayores de diagnóstico
○ Presencia de una hiperlipemia múltiple en familiares de primer grado, incluyendo: hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e hiperlipemia combinada, definidas por concentraciones plasmáticas en ayunas de colesterol y/o triglicéridos > percentil 90 de acuerdo a edad y sexo
○ Herencia de la hiperlipemia con una transmisión autosómica dominante
○ Presencia de arteriosclerosis prematura (antes de los 60 años) en familiares de primer grado
2 Criterios de exclusión
○ Presencia de xantomas en la infancia
○ Presencia de causas secundarias de hiperlipemia en familiares afectados
○ Presencia de genotipo de apo E E2/E2 en sujetos afectados
3 Criterios de inclusión adicionales
○ Concentración elevada de apo B en plasma
○ Presencia de un patrón de LDL predominando las partículas pequeñas y densas
○ Presencia de hiperlipemia en la infancia
<i>Diagnóstico: tres criterios mayores de inclusión y exclusión; o criterios mayores de inclusión 1 y 2, o criterios de exclusión y al menos un criterio de inclusión adicional. Tomada de Bredie SJH, Demacker PNM, Stalenhoef AFH. Metabolic and genetic aspects of familial combined hyperlipidemia with emphasis on low-density lipoprotein heterogeneity. Eur J Clin Invest 1997;27:802-811.</i>

2.3. Etiología

Desde hace tiempo se intenta localizar un gen responsable de la enfermedad, ya que en los primeros estudios y en la mayoría de trabajos posteriores, aproximadamente el 50% de los familiares de primer grado de estos pacientes tenía concentraciones de colesterol o triglicéridos superiores al percentil 90, lo cual hacía

suponer una herencia autosómica dominante. Sin embargo, el reanálisis de las primeras series de familias estudiadas y los estudios posteriores han excluido que la enfermedad sea de naturaleza monogénica, y todavía no se ha podido establecer su base genética, a pesar de haber estudiado múltiples genes.

Inicialmente el gen de la apo B, en el cromosoma 2, parecía ser el principal candidato, dada la sobreproducción de VLDL, la elevación de las concentraciones de apo B y las LDL pequeñas y densas características de estos pacientes, pero no se alcanzaron resultados concluyentes^{14,15}. También se pensó en el gen de la lipoproteinlipasa (LPL), localizado en el cromosoma 8, después de que se describiese un defecto funcional de la LPL en un grupo de sujetos con HFC. Se han descrito más de 50 mutaciones asociadas a dicho gen y ninguna de éstas está presente en la mayoría de los sujetos afectados^{16,17}. Estudios recientes han sugerido la participación de un gen en el cromosoma 1¹⁸, ya que se ha descrito en población fina una alteración en dicho cromosoma (1q21-q23) que se asocia con sobreproducción de VLDL. También ha sido descrito en familias canadienses con HFC y con diabetes tipo 2 una alteración en este cromosoma que parece ser juega un papel en la insulinoresistencia asociada a la HFC¹⁹. También se ha descrito una alteración en el cromosoma 11 (11q23-24), el denominado cluster de Apo AI-CIII-AIV, asociado con la dislipemia en siete familias con HFC²⁰. No obstante, ninguno de estos hallazgos es un marcador genético específico para la HFC²¹.

Así, actualmente se considera la HFC como una enfermedad genéticamente heterogénea, en cuya etiopatogenia interviene un número desconocido de genes mayores junto a otros genes modificadores de la expresión de la misma, además del importante papel que desempeñan los factores ambientales. Por ello, Ribalta et al²² hablan que la búsqueda de marcadores genéticos podría orientarse a un fenotipo más amplio que denominan “déficit de gestión de ácidos grasos libres”, haciendo referencia a una situación en la que existen múltiples causas potenciales para que se produzca la HFC, y lo que ocurriría es que cada uno de ellos padecería la enfermedad por un error genético distinto.

2.4. Patogenia

Los mecanismos patogénicos implicados en la HFC son muy heterogéneos y no totalmente conocidos. Se consideran fundamentalmente los siguientes: hiperproducción hepática de VLDL, defecto en la actividad de la LPL, alteraciones

en la esterificación de los ácidos grasos en el tejido adiposo y la presencia de resistencia a la insulina (RI) (figuras 1 y 2).

2.4.1. Sobreproducción hepática de VLDL

La principal característica de la HFC es la hiperproducción hepática de VLDL^{8,11,22,23}, que viene determinada por el aumento de la síntesis de TG por el adipocito, aumentando de forma secundaria la síntesis de apo B, ya que se produce un acúmulo de partículas ricas en TG, que contienen apo B. Si bien el aumento de ésta es un hecho bien establecido en la HFC, su causa no es conocida, aunque se considera que el mecanismo patogénico es la concentración elevada de AGL en plasma, que sobrecarga el hígado, y que ésta se debe a una cierta disminución de la capacidad lipolítica, pero sobre todo, a una reducción de la capacidad del tejido adiposo (y tal vez del músculo) para captar los AGL procedentes de la lipólisis de los triglicéridos²².

2.4.2. Disminución de la actividad de la LPL

Los triglicéridos son transportados por las denominadas “partículas ricas en triglicéridos”: los quilomicrones y quilomicrones residuales (que transportan los triglicéridos de origen intestinal o exógeno), y las VLDL e IDL (los de origen endógeno). El nivel plasmático de triglicéridos es un fiel reflejo del balance entre la producción (intestinal o hepática) y el catabolismo de estas partículas. Este último se debe fundamentalmente a la activación de la LPL. Puesto que los mecanismos fisiológicos del aclaramiento son saturables, cabe la posibilidad de que un aumento extremo de producción hepática de VLDL llegue a saturar la capacidad de la LPL y, este déficit funcional de la enzima lleve al aumento de las VLDL y también de los quilomicrones, induciendo una alteración del catabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos. Babirak et al^{24,25} fueron los primeros en proponer que hasta en un tercio de los sujetos con HFC habría un defecto de la LPL, al demostrar en sujetos con fenotipos IIB y IV una disminución de la actividad LPL post-heparina. Esta alteración en la actividad de la LPL supone una disminución de la hidrólisis de los TG, con disminución del catabolismo de las VLDL y QM, menor recaptación hepática de VLDL y mayor liberación de éstas al plasma. La consecuencia final es un aumento en la producción y en el tiempo de permanencia de las lipoproteínas

ricas en triglicéridos en el plasma y una alteración del intercambio con las HDL y en la transformación en LDL.

2.4.3. Alteración de la lipasa hormonosensible (LHS)

Junto a lo anterior, existe una disminución de la actividad de la LHS. Esta disminución se ha descrito in vitro en pacientes de Suecia con HFC, pero no en fineses ni daneses²⁶⁻²⁸. La LHS, en condiciones fisiológicas, está inhibida en la etapa postprandial por la acción de la insulina. Durante el ayuno, al disminuir la acción insulínica y aumentar las hormonas contrainsulares, fundamentalmente las catecolaminas, se produce un estímulo de la LHS del tejido adiposo, produciéndose la lipólisis con liberación de ácidos grasos libres que, unidos a la albúmina, son captados por el hígado, el músculo cardíaco y el esquelético²⁹.

Dado el estado de resistencia insulínica asociado a la HFC, se pierde esta inhibición de la lipólisis del tejido adiposo en situación postprandial, que conlleva una elevación plasmática de AGL, por falta de incorporación al adipocito, aumentando la oferta de AGL al hígado, contribuyendo así a la hiperproducción hepática de VLDL y apo B, explicando esta situación, al menos en parte, el aumento de los AGL en situación basal y postprandial donde estimulan la producción de VLDL.

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

Se cree que la esterificación y movilización de los AGL en el adipocito se halla profundamente alterada y que la actividad de la ASP (proteína estimuladora de la acilación) está descendida en los pacientes con HFC, por lo que se reduce significativamente la incorporación de los AGL al adipocito. Esta activación parece debida a una interacción defectuosa entre la ASP y su receptor. La ASP es estructuralmente idéntica a un producto de la degradación del factor C3 del complemento (C3adesArg). Se ha observado que en el estado postprandial existen elevaciones de C3, probablemente debidas a alteraciones en la activación del factor C3, y esto se ha relacionado con el aumento del flujo de AGL al hígado característico de la HFC y con su ineficiente aclaramiento de remanentes aterogénicos postprandiales²².

Por tanto, actualmente se baraja la hipótesis de la existencia de un defecto combinado en la lipogénesis y en la lipólisis en el tejido adiposo por alteraciones en

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

2.4.5. Resistencia a la insulina y ácidos grasos libres

Dado que los hallazgos presentes en la RI son también característicos de la HFC, y estudios previos han demostrado que los sujetos HFC tienen RI²³, la presencia de RI puede ser un importante factor modulador de los fenotipos de HFC.

Recientemente, han sido revisados los mecanismos que relacionan la insulinoresistencia y la dislipemia. El aumento de la liberación de AGL por el tejido adiposo y del flujo de AGL al hígado elevan la síntesis y liberación de VLDL y facilitan la aparición de partículas LDL pequeñas y densas²⁹. Por otro lado, el aumento plasmático de AGL produce una disminución de la captación muscular de glucosa y hepática de insulina. Se cree que la RI y los AGL desempeñan un papel importante en el desarrollo de las alteraciones metabólicas de la HFC y que hay una relación directa entre AGL, hiperproducción hepática de VLDL y apo B, y las concentraciones circulantes de triglicéridos, aunque no queda claro si la RI es la causa o una consecuencia de las alteraciones lipídicas observadas en la HFC.

Muchos mecanismos fisiopatológicos pueden contribuir a la RI en HFC, como el incremento de grasa visceral³⁰ (independientemente de la existencia de obesidad), descenso de la vasodilatación inducida por la insulina en músculo esquelético, o alteración del metabolismo postprandial de los AG. Otro mecanismo potencial que contribuye a la RI es la activación del factor de necrosis tumoral (TNF) y su receptor. Además, el incremento de la concentración de leptina que se ha visto en la HFC también pueden ocasionar RI debido al efecto que la leptina tiene en la secreción pancreática de insulina y en la sensibilidad periférica a la insulina³¹.

3. Lipemia postprandial (LPP)

La LPP se refiere al acúmulo en plasma de lipoproteínas ricas en TG (QM, VLDL y sus remanentes) aproximadamente entre 6 y 10 horas tras la ingesta de una comida grasa^{32,33}. Se ha objetivado que los sujetos con HFC tienen alterada la

LPP³². Esta alteración podría deberse a diferentes causas. En primer lugar, a la RI, un aspecto central de la patogenia de la HFC, que como ya se ha comentado, es un hallazgo muy común en estos sujetos, y que condiciona un mayor riesgo cardiovascular. Como consecuencia de la RI en situación postprandial, se produce un incremento en el flujo de remanentes de quilomicrones y VLDL ricos en TG al hígado, que se vería sobrecargado, con lo que aumentaría la producción endógena de VLDL, lo cual contribuiría a una mayor LPP. En segundo lugar, en sujetos con HFC se ha demostrado una falta de captación periférica en el tejido adiposo de los AGL en situación postprandial mediada por la RI y por una probable resistencia a la acción de la ASP (proteína que estimula la acilación). Además, la fracción C3 del complemento, que es un precursor de ASP, se reduce en las primeras horas tras una sobrecarga oral grasa en sujetos con HFC, lo que implicaría un descenso postprandial de ASP y, por tanto, de la captación de AGL en tejidos periféricos. Por este motivo, en situación postprandial los AGL no se aclararían de forma fisiológica por el tejido adiposo y sobrecargaría al hígado. Esta situación metabólica de incremento del flujo de AGL al hígado lleva a la sobreproducción de VLDL, con lo que se genera un círculo vicioso que perpetúa la hiperlipidemia postprandial^{23,34} (figura 3).

Recientemente ha quedado establecida la importancia de la concentración plasmática de TG en ayunas como otro factor de riesgo cardiovascular independiente. Por tanto, es probable que la LPP alterada sea también un factor importante de riesgo cardiovascular, ya que pasamos la mayor parte del día en situación postprandial³⁵. Ya en la década de los 70, se describió la AE como un proceso postprandial³⁶, y son varios los estudios epidemiológicos que relacionan el papel de las lipoproteínas postprandiales con el inicio y el desarrollo de arteriosclerosis prematura³⁷. Se ha demostrado que los remanentes de quilomicrones procedentes de la dieta pueden atravesar el endotelio vascular donde son fagocitados por los macrófagos e inducirán la formación de células espumosas sin presentar ninguna modificación previa, a diferencia de lo que ocurre con las partículas LDL, que antes deben modificarse^{32,34}.

Por tanto, la pared de los vasos de los pacientes con HFC está expuesta a concentraciones elevadas de estas lipoproteínas aterogénicas a lo largo del día. La consecuencia es una alteración de la función vascular y un incremento del acúmulo subendotelial de remanentes, que conducen a la formación de la placa de ateroma.

Además, la hiperlipemia postprandial produce de manera indirecta una cascada de procesos inflamatorios que favorecen el desarrollo de la arteriosclerosis. Entre ellos, destaca la activación de leucocitos por las lipoproteínas ricas en triglicéridos y sus remanentes y la activación de la célula endotelial, con mayor adherencia a células inflamatorias. Esto deberá producir un mayor estrés oxidativo y producción de citoquinas, perpetuando el daño endotelial³⁸.

Así, la LPP podría explicar la heterogeneidad en el riesgo coronario observado entre distintos pacientes con HFC, puesto que puede ser un factor de riesgo cardiovascular encubierto y precoz, aún en ausencia de hipertrigliceridemia en ayunas^{32,35}. Son varios los estudios epidemiológicos que relacionan el papel de las lipoproteínas postprandiales con el inicio y desarrollo de arteriosclerosis prematura. Se han aportado datos sobre la existencia de RI y una alteración en el metabolismo postprandial de lipoproteínas ricas en triglicéridos en sujetos con HFC.

En este sentido, nuestros estudios³⁹ han mostrado que los sujetos con HFC tienen alterada la LPP, evaluado con el perfil diurno de triglicéridos respecto a sujetos control. Además, estas diferencias se mantienen cuando se introducen variables conocidas que influyen en la LPP, como son la edad, el IMC y el perímetro de la cintura. Este resultado demuestra la importancia de los factores genéticos, probablemente responsables de la HFC, en la regulación postprandial de los TG. Similares resultados a los nuestros se han observado en población holandesa utilizando el mismo método^{40,41}.

Nuestro grupo ha mostrado que la insulinoresistencia es muy común en sujetos con HFC⁴² e independiente de la presencia o no de obesidad abdominal⁴³ y del fenotipo lipoproteico⁴⁴. Además, condiciona mayor riesgo cardiovascular en sujetos con HFC⁴⁵, de tal modo que dichos sujetos presentaron de forma estadísticamente significativa mayores valores de insulinemia y HOMA en ayunas como expresión de una mayor insulinoresistencia, que a su vez contribuye a una mayor LPP.

Además, Halkes et al⁴⁶ demostraron una relación positiva entre el grado de insulinoresistencia y la LPP en sujetos con sobrepeso y valores normales de TG en ayuno, y que las diferencias encontradas entre sexos, en la LPP desaparecen por el efecto de la obesidad⁴⁷. En nuestro grupo, también hemos visto que la LPP se relaciona positivamente con el perímetro de la cintura en controles y con el perímetro de la cintura y el IMC en sujetos con HFC, y en éstos, probablemente

también la situación de insulinoresistencia empeore con una mayor obesidad abdominal que condiciona mayor LPP.

Por tanto, la HFC es un modelo genético de hiperlipidemia postprandial, y la obesidad y el depósito de grasa abdominal se relacionan con la LPP, probablemente mediado por la RI, si bien son necesarios estudios prospectivos y de intervención para conocer la importancia de la hiperlipidemia postprandial en la prevención cardiovascular.

4. Oxidación y HFC

La HFC presenta elevado riesgo cardiovascular, que se debe al desarrollo de AE. Sin embargo, el daño orgánico y el inicio y desarrollo de la enfermedad cardiovascular es heterogéneo en este grupo de pacientes, lo que indica que necesariamente deben existir otros factores de riesgo, además de la dislipemia, que justifiquen esta variabilidad. En este sentido, un factor poco estudiado y emergente es el nivel de estrés oxidativo (EO) y la inflamación^{48,49}.

El EO y numerosos productos a los que da lugar se han relacionado con la enfermedad cardiovascular y el inicio y desarrollo de AE^{50,51}. Diferentes modelos animales de EO apoyan la idea de que los productos de éste tienen un efecto causal en la AE. Por tanto, en sujetos con HFC, como modelos de dislipemia primaria con AE precoz, el EO podría explicar parte de la variabilidad en la incidencia y prevalencia de la enfermedad cardiovascular que desarrollan los afectados. Además, el fenotipo lipoproteico expresado y el grado de RI podría relacionarse con el EO.

En condiciones normales existe un equilibrio entre la producción y degradación de radicales libres, principalmente derivados de oxígeno, funcionando incluso como señales celulares imprescindibles para el correcto funcionamiento celular^{52,53}. Cuando existe un exceso moderado de productos de estas moléculas frente a su degradación se produce el EO que origina una serie de daños celulares a varios niveles^{52,54-56} (se pueden dañar los lípidos de membranas, el ADN y las proteínas), así como una serie de reacciones de oxidación de diferentes componentes sanguíneos (oxidación de lipoproteínas, eliminación del NO circulante, etc.). El propio EO y las moléculas oxidadas que origina tienen como consecuencia, a nivel celular, una serie de respuestas mediadas por diferentes factores y moléculas que suponen la

activación o represión de numerosos genes^{50,56}, algunos de los cuales, se pueden agrupar en varias unidades funcionales, como podrían ser :

- Enzimas que intervienen en la producción de óxido nítrico (principalmente eNOS, iNOS y nNOS), sistemas implicados en los niveles de EO mediante la producción (NADH oxidasa y xantinaoxidasa) o eliminación de radicales libres (catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y sistema glutatión (GSS, GSR y GPX))^{50,57-60}.

- Sistemas que eliminan productos de la reacción entre radicales y macromoléculas, previenen su oxidación o la eliminan (sistema glutatión, principalmente las glutatión transferasas y otros)⁵⁷⁻⁵⁹.

- Genes implicados en la transmisión de señales originadas por estrés oxidativo o que lo inducen. Dentro de este grupo entrarían numerosos factores y hormonas (angiotensina, endotelina, “insulin growth factor”, etc) y sus receptores (AT-1 y 2, IGF-1 y 2, ET-A, etc) y que intervienen en cascadas de transmisión de señales.

- Genes implicados en el metabolismo energético, dado que pueden inducir un aumento o disminución en la producción de radicales libres, como los PPARs, IGF-1 y 2, enzimas oxidativos, etc.

- Factores de transcripción que pueden activar o reprimir la expresión de genes como respuesta al EO, como:

- NF- κ B, que es un factor de transcripción en la respuesta a EO⁵³ (ver después)⁶¹⁻⁶⁵.

- AP-1 (c-Fos y c-Jun), que junto con NF- κ B controla la señalización del estado redox en linfocitos⁶⁶, y en general⁶⁷ se activa bajo diferentes condiciones de EO^{68,69}.

- AP-2, implicado en la regulación de la expresión de diferentes genes relacionados con la eliminación y producción de EO^{70,71}.

- Nrf-1 y Nrf-2 factores que se une a elementos o secuencias de respuesta antioxidante, regulando la expresión de muchos genes implicados en la eliminación de la toxicidad y la atenuación del EO⁷² y en los niveles de GSH⁷³. Su actividad puede ser regulada por fosforilación mediante kinasa C⁷⁴. Por otro lado, la activación de los elementos de respuesta antioxidante es reprimida por el factor de transcripción Mafk⁷⁵.

- Sp-1 “binding protein” (SP1BP) y la proteína similar a SP1BP, factores que regulan la expresión de numerosos genes implicados en la eliminación de

radicales libres como son SOD 1 y 3^{76,77} y otras proteínas que están relacionadas con el metabolismo, principalmente lipídico, como son el LDLR, LAL, etc; por lo que podría estar implicada en algunas alteraciones metabólicas de las enfermedades que se van a estudiar.

- Erg-1, que se ha relacionado con un control negativo de genes implicados en la eliminación de especies reactivas^{71,76,77}.

- PPARS (α , β y γ), cuya expresión está regulada por EO y ellos mismos regulan la expresión de numerosos genes, varios de los cuales pueden tener importancia en la generación de EO y el metabolismo energético⁴⁷. Polimorfismos en estos genes se han relacionado con enfermedad cardiovascular⁷⁸ diferentes enfermedades⁷⁹, sensibilidad a la insulina⁸⁰ y con la nutrición⁸¹.

- “CAAT-enhancer binding-protein” (C-EBP α , β , γ y ϵ), cuya activación (β y γ) se ha descrito cuando existe EO⁸², y se conoce que estas proteínas regulan la expresión de numerosas proteínas y el elemento de regulación al que se unen se encuentra en numerosos promotores relacionados con EO, metabolismo energético y en otros que en principio no están relacionados.

Dentro de estas unidades funcionales implicadas en el EO, destacan por su papel en la AE los sistemas implicados en la producción y eliminación de radicales libres, y diversos factores de transcripción que pueden activar o reprimir la expresión de genes como respuesta al EO.

Los principales agentes oxidantes implicados en la AE son los denominados “reactive oxygen species” (ROS)^{83,84} que son una familia de moléculas que se producen en todas las células aerobias, muchas de las cuales tienen electrones desapareados y se comportan como radicales libres. Estas moléculas además, interaccionan con los mecanismos de señalización vascular, lo cual parece tener un papel fundamental en el control de la función endotelial. Dentro de los ROS se incluyen moléculas tales como el anión superóxido (O_2^-), el grupo hidroxilo (OH), óxido nítrico (NO) y radicales lipídicos. Otros ROS, como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peroxinitritos ($ONOO^-$) y ácido hipocloroso no son radicales libres per se, pero tienen efecto oxidativo que también contribuye al EO⁵⁶⁻⁶⁰.

Existen numerosos sistemas enzimáticos que potencialmente pueden producir ROS en la pared vascular, pero tres parecen predominar sobre los demás: XO, NADH/NADPH oxidasa y NO sintasa^{56,57}. La actividad de la NADH/NADPH oxidasa representa una de las principales fuentes de ROS en los vasos sanguíneos.

Está presente en los fagocitos, en los fibroblastos de la adventicia, en las células musculares lisas de los vasos sanguíneos y en las células endoteliales. Genera O_2^- , y puede conducir a la disfunción endotelial por reducción de la biodisponibilidad de NO ^{50,56,59,60,85}. El segundo sistema enzimático implicado es XO, un enzima presente a elevadas concentraciones en las células endoteliales que participa en el metabolismo de las purinas. Es una fuente importante de O_2^- , y al igual que el anterior, la producción de O_2^- por XO supone una alteración de la biodisponibilidad de NO ^{50,56,59,60}. Por último, NOS, particularmente eNOS (sintetasa endotelial de NO), pueden ser fuentes potenciales de O_2^- bajo determinadas situaciones fisiopatológicas. En condiciones normales, estos enzimas transfieren electrones a L-arginina para formar L-citrulina y NO, sirviendo como cofactor en este proceso la tetrahidrobiopterina (BH4). Sin embargo, si la biodisponibilidad de BH4 o de L-arginina desciende, eNOS se transforma desde un estado acoplado (generador de NO) a un estado desacoplado (generador de O_2^-). Este último estado, en el endotelio puede llevar a EO y disfunción endotelial por tres mecanismos. Por un lado, porque la producción enzimática de NO está disminuida. En segundo lugar, porque el enzima comienza a producir O_2^- , contribuyendo al EO. Finalmente, porque eNOS puede quedar sólo parcialmente desacoplada, de forma que O_2^- y NO se producen simultáneamente, y se generan peroxinitritos, contribuyendo también al incremento de EO^{50,56,86}.

Los ROS pueden producir daño celular a diferentes niveles, entre ellos el ADN. Así, durante los procesos de oxidación se produce 8-oxo-7,8-dihidrodeoxiguanosina trifosfato (8-oxo-dGTP) que modifica las bases en el ADN y genera 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxo-dG), que se considera un substrato mutagénico importante para la replicación del ADN. Además, este producto es un marcador de EO^{87,88}.

Otro marcador de EO, es el MDA, un cetoaldehído fisiológico producido por descomposición peroxidativa de lípidos insaturados como producto del metabolismo del araquidonato. El exceso de MDA producido como resultado del daño tisular puede combinarse con grupos amino libres de las proteínas, generando modificaciones en dichas proteínas, que parecen alterar sus propiedades biológicas, de forma que pueden resultar inmunogénicas, por lo que se generan autoanticuerpos frente a ellas, que en algunos estudios se han asociado con procesos arterioscleróticos⁸⁹.

Frente a los anteriores, existen una serie de enzimas antioxidantes vasculares que limitan el acúmulo intra y extracelular de ROS producidos de forma basal. Estos sistemas antioxidantes incluyen: SOD, que convierte O_2^- en H_2O_2 , para prevenir la reacción de O_2^- con NO, evitando así la formación de peroxinitritos; CAT, que reduce H_2O_2 a agua, directamente; glutathion peroxidasa (GPX), que reduce H_2O_2 a agua, y peróxidos lipídicos a alcoholes lipídicos, mediante la oxidación de otros substratos; glutathion reductasa (GSR), que reduce glutathion; y glutathion-s-transferasa (GSS), que detoxifica oxidantes⁵⁷⁻⁶⁰.

Una vez generado el O_2^- por los distintos sistemas enzimáticos, es transformado en H_2O_2 por la actividad de la familia de SODs. En los mamíferos existen tres tipos de SOD: Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, y SOD extracelular (EC-SOD)⁸⁴. Cu/Zn-SOD está presente prácticamente en todas las células, sobre todo a nivel citoplasmático, con alguna actividad en lisosomas, peroxisomas, núcleo y el espacio intermembrana mitocondrial. MnSOD se encuentra ampliamente distribuida a nivel mitocondrial, y contribuye al 10% de la actividad celular total. EC-SOD, se localiza en el espacio extracelular, es sintetizada por las células musculares lisas vasculares, y es útil para minimizar la inactivación endotelial superóxidodependiente debida a NO^{50,58,59,84}.

El H_2O_2 que resulta de la acción de SODs (o acción de otras oxidasas tales como XO) es reducido a agua por la CAT y la GPX. CAT, existe como un tetrámero constituido por 4 monómeros idénticos, que contienen un grupo heme en el lugar activo, y se restringe prácticamente a los peroxisomas. La degradación de H_2O_2 es conseguida directamente por CAT, a diferencia de las GPS, una familia de enzimas tetraméricos, que requieren moléculas tales como el glutathion reducido (GSH) para reducir H_2O_2 y peróxidos lipídicos, a sus correspondientes alcoholes, junto con la producción de glutathion oxidado (GSSG)^{57,59}. Hasta el momento, se han descrito 4 isoformas de GPX: GPX-1 (GPX celular), que es ubicuitaria, y reduce H_2O_2 así como peróxidos de ácidos grasos libres, pero no peróxidos de lípidos esterificados, ya que éstos son reducidos por GPX-4, que se localiza en la membrana; GPX-2 (GPX gastrointestinal) localizada en las células del epitelio gastrointestinal, donde es útil para reducir los peróxidos de la dieta; y GPX-3 (GPX extracelular), que es el único miembro de la familia de GPX, que reside en el compartimento extracelular, y se cree que es el enzima antioxidante extracelular más importante en los mamíferos^{57-59,84}(figuras 4 y 5).

Así pues, cuando existe un desequilibrio entre los agentes oxidantes y antioxidantes comentados, se generan una serie de metabolitos, así como la activación e inhibición de una serie de genes. Si pudiéramos medirlos podríamos conocer el grado de EO, ya que son estas modificaciones oxidativas en la pared arterial las que pueden iniciar o contribuir a la aterogénesis.

Además, se ha propuesto que el EO sería el mecanismo patogénico que relacionaría la presencia de RI con la disfunción de la célula β , pudiendo conducir posteriormente, a la presencia de DM2⁵⁵.

5. Inflamación, arteriosclerosis e insulinoresistencia

Al igual que el EO, la inflamación es un elemento fundamental de la patogenia de la AE^{49,56,90}, ya que ésta es una enfermedad inflamatoria lentamente progresiva. Además en todas las etapas de la aterogénesis se evidencian procesos inflamatorios.

Inicialmente, la respuesta inflamatoria es un intento de resolver la alteración y daño producidos por la modificación de las LDL. Esta respuesta inflamatoria se perpetúa y desencadena una situación inflamatoria crónica, que contribuye a la progresión de la placa arteriosclerótica. Numerosas proteínas como las interleucinas (IL-1, IL-6), factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) y proteína C reactiva (PCR) han sido relacionadas etiológicamente en diferentes estudios tanto epidemiológicos, como clínicos y experimentales con la AE⁴⁹, ya que estos factores regulan el recambio y diferenciación de células a nivel vascular, y pueden influir en el desarrollo de la placa.

El factor de transcripción NF- $\kappa\beta$ es un factor clave en la regulación de la inflamación. Este factor es crucial, ya que desempeña un papel importante en la patogenia del proceso arteriosclerótico como regulador del balance entre genes pro y antiinflamatorios, y como regulador de la supervivencia y proliferación celular. NF- $\kappa\beta$ controla la transcripción de múltiples genes con un papel establecido en la patogenia de la arteriosclerosis. Así, por ejemplo este factor induce la expresión de sustancias como las citoquinas (IL-1, IL-6), las quimiocinas, las moléculas de adhesión (VCAM, ICAM...) y proteínas de fase aguda (TNF- α , PCR) que intervienen en el inicio y desarrollo de la arteriosclerosis⁶¹⁻⁶⁵. Además, NF- $\kappa\beta$ es un factor de transcripción que parece mediar en las primeras fases de la respuesta a EO⁶¹. Como hemos comentado, este factor de transcripción activa la expresión de

genes que pueden mediar en el daño vascular⁹¹, pero también su presencia es necesaria para la expresión de otras proteínas importantes para la protección frente a EO, como la MnSOD⁹² y frente a la apoptosis.

NF- κ B es un dímero constituido por 2 subunidades, p50 y p65, que en situación basal se mantiene inactivo por una proteína inhibidora a la que se encuentra unida en el citoplasma, el inhibidor de κ B (I κ B), del que existen diversas isoformas, siendo la principal I κ B α . Diversos agentes pueden inducir la activación de diferentes cascadas de transducción de señales, por múltiples vías, que producen la activación del complejo denominado I κ B cinasa (IKK), que media la fosforilación de I κ B, siendo éste un paso esencial en la activación de la cascada de activación de NF- κ B. El complejo IKK está compuesto por tres subunidades, dos de ellas catalíticas, con actividad cinasa, que son IKK1 (IKK α) e IKK2 (IKK β), y una reguladora, conocida como el modulador esencial de NF- κ B (NEMO/IKK γ) sin actividad cinasa, pero necesaria para la formación de NF- κ B⁶¹⁻⁶⁵. Esta fosforilación de I κ B por el complejo IKK es un paso esencial en la cascada de activación de NF- κ B, y activa NF- κ B que penetra en el núcleo celular, y se une a secuencias específicas en los promotores de los genes diana, antes comentados, activando su transcripción (figuras 6 y 7).

La activación de NF- κ B puede ser iniciada por un amplio grupo de estímulos, entre los que se incluyen agentes inmunológicos, factores de crecimiento, procesos relacionados con el EO y diversas citoquinas (TNF- α , IL-1, IL-6), que se han implicado directa o indirectamente en la patogenia de la AE^{62,64,65}.

TNF α , producida principalmente por macrófagos, es una de las citoquinas proinflamatorias e inmunomoduladoras más importantes. Es liberada en el lugar de la inflamación y juega un papel principal en el reclutamiento y activación de células inflamatorias, ya que regula moléculas de adhesión, activa células endoteliales, induce la producción de interleucinas e incrementa la permeabilidad vascular^{65,93}. Sus efectos biológicos son alcanzados por activación de cascadas de señalización que desarrollan un programa de expresión genética específico, siendo una de las principales vías implicadas NF- κ B^{65,94}. Se ha especulado que TNF- α es proaterogénica basado en su actividad inflamatoria, y su posible papel en la AE procede de los resultados de distintos estudios realizados en animales. Así, se ha observado que la inhibición de TNF- α en ratones apoE $^{-/-}$ mediante la

administración crónica de receptor de TNF- α soluble supone una importante reducción del tamaño de la lesión⁹⁵, y que la deficiencia de TNF- α en ratones se asoció específicamente con menor presencia de lesiones avanzadas⁹⁶.

IL-1 es también una citoquina proinflamatoria. Su relación con la patogenia de la AE se ha estudiado en ratones con deficiencia de IL-1 o ausencia de receptor de IL-1. Se ha visto, que la ausencia de IL-1 en ratones apo E-/- reduce la presencia de AE aproximadamente en un 30%⁹⁷, y que la ausencia de receptor de IL-1 ha mostrado recientemente un importante descenso en el desarrollo de AE en ratones apoE-/-⁹⁸.

Por lo que respecta a IL-6, se trata también de una importante citoquina inflamatoria asociada con AE y otras enfermedades inflamatorias, que es expresada de forma abundante en las lesiones arterioscleróticas⁹⁹. IL-6 estimula la expresión de factor tisular, de receptores de LDL a nivel macrofágico, de PCR y fibrinógeno, y la agregación plaquetaria. Además, regula la expresión de otras citoquinas inflamatorias tales como IL-1 y TNF- α . IL-6 es el mediador central en la respuesta de fase aguda, y es el principal inductor de la producción hepática de PCR, que junto con IL-1 y TNF- α , se ha asociado con riesgo de patología arterial coronaria en numerosos estudios^{100,101}. Por último, se ha demostrado que la administración de concentraciones suprafisiológicas exógenas de IL-6 en ratones ApoE -/- exacerba la formación de lesiones arterioscleróticas¹⁰², aunque también existen estudios que sugieren un papel protector de esta última^{103,104}.

Otro importante marcador de inflamación y daño tisular es la PCR, que es uno de los principales reactantes de fase aguda. Activa la vía clásica del complemento, media la fagocitosis, regula la inflamación, y es un marcador poco específico, pero muy sensible de infección e inflamación tisular. Su secreción está bajo control de transcripción por IL-6. Sin embargo, IL-1 y TNF- α también contribuyen a la síntesis de PCR, que a su vez, induce la secreción de IL-1 y TNF- α ^{95,105}.

La PCR es proaterogénica y protrombótica. En las células endoteliales induce descenso de eNOS y prostaciclina, e incremento de endotelina 1, moléculas de adhesión celular, IL-8 y PAI 1. En las células del sistema monocito-macrófago induce la secreción de factor tisular, el incremento de ROS, la liberación de citoquinas proinflamatorias, y promueve la quimiotaxis y adhesión de monocitos y el incremento de la captación de de LDL oxidadas. Además, también se ha demostrado que la PCR incrementa la activación de NF- $\kappa\beta$ ⁹⁴.

Por tanto, la AE es una enfermedad inflamatoria, en la que participan múltiples citoquinas inflamatorias que producen la activación de NF- κ B, que es la encargada de regular la transcripción de distintos genes involucrados, a su vez, en una gran variedad de procesos. La activación de NF- κ B está sujeta a múltiples mecanismos de control. El primero de ellos a través de I κ B que mantiene inactiva a NF- κ B, pero a la vez, I κ B está regulada transcripcionalmente por NF- κ B, mediante un mecanismo de feed back⁶².

En segundo lugar, los genes activados por NF- κ B incluyen los que codifican los mismos factores responsables de su activación, es decir, que activa la transcripción de los genes que codifican para citoquinas como IL-1 y TNF- α . Ambas producen la activación de NF- κ B, generando un estado de inflamación, en el que a su vez aumentan tanto los niveles plasmáticos como la expresión de ARNm de IL-1, IL-6 y TNF- α . Es decir, estas citoquinas son activadores de NF- κ B, pero a la vez son regulados por ella. Por tanto, estas citoquinas pueden participar en la AE por regulación de otros muchos genes dependientes de NF- κ B y por amplificación de la respuesta inflamatoria^{62,64,65}.

Por otro lado, productos de EO pueden producir translocación de NF- κ B, mientras que los agentes antioxidantes pueden bloquear la fosforilación de I κ B⁶².

La importancia de NF- κ B en el desarrollo de RI se ha observado al estudiar el tejido adiposo. Este tejido secreta un elevado número de hormonas con múltiples acciones biológicas, entre ellas TNF- α , que juega un papel importante en la estimulación de la producción de leptina, junto con IL-6 y otros mediadores inflamatorios, cuya expresión está incrementada durante la ganancia de peso y reducida con la pérdida del mismo. TNF- α estimula la lipólisis, y su presencia se asocia con hiperinsulinemia y RI, de tal forma que su neutralización en ratones obesos ha demostrado mejorar la insulinosensibilidad. Por otro lado, la obesidad se asocia con bajos niveles de adiponectina (que se asocia con las manifestaciones del síndrome metabólico, como son la RI y la diabetes tipo 2), mientras que la pérdida de peso produce un incremento de ésta. Además, se ha demostrado que TNF- α estimula la activación de NF- κ B, induciendo un aumento en la producción de citoquinas y moléculas de adhesión, junto con un incremento de EO, mientras que la adiponectina inhibe la activación de NF- κ B, y promueve un perfil metabólico protector¹⁰⁶.

Además, NF- κ B también ha sido relacionada con RI. Recientemente, en un modelo de animal transgénico con ausencia de IKK β , que, como ya se ha comentado, es el regulador principal y central de la respuesta inflamatoria por activación de NF- κ B, se ha probado la relación de estos factores con la RI¹⁰⁷. También, en otro modelo de ratón transgénico con expresión selectiva de IKK β en hepatocitos, se ha demostrado la relación entre activación hepática de NF- κ B y cascada inflamatoria (citoquinas como TNF α , IL-1 e IL-6) con el desarrollo de RI y diabetes. Similares resultados se obtuvieron en animales no transgénicos alimentados con una dieta rica en grasa¹⁰⁸. En estos modelos la RI mejoró con la neutralización de IL-6 o con la inhibición de IKK β .

Estos estudios indican la importante relación entre los distintos factores inflamatorios, mediados por NF- κ B, y la RI, que es la base fisiopatológica de la diabetes tipo 2 y del síndrome metabólico (figuras 8 y 9).

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

Nuestros resultados podrían en parte explicar la relación entre la inflamación y el EO, y la dislipemia mixta con RI. Además, podrían explicar el alto riesgo cardiovascular de estos sujetos y, por tanto, el papel que juegan estos procesos moleculares de inflamación y EO en la arteriosclerosis humana precoz.

6. Figuras

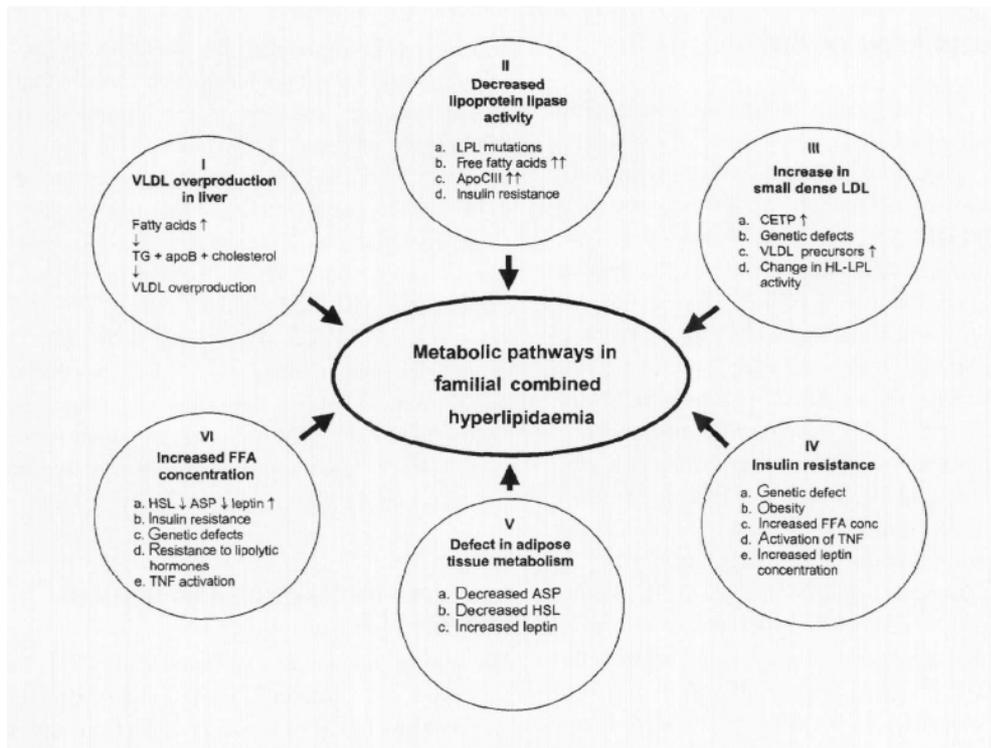


Figura 1: Diferentes procesos metabólicos en la HFC. Tomada de de Graaf J, Veerkamp MJ, Stalenhoef AFH. *Metabolic pathogenesis of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on insulin resistance, adipose tissue metabolism and free fatty acids.* J R Soc Med 2002;95:46-53.

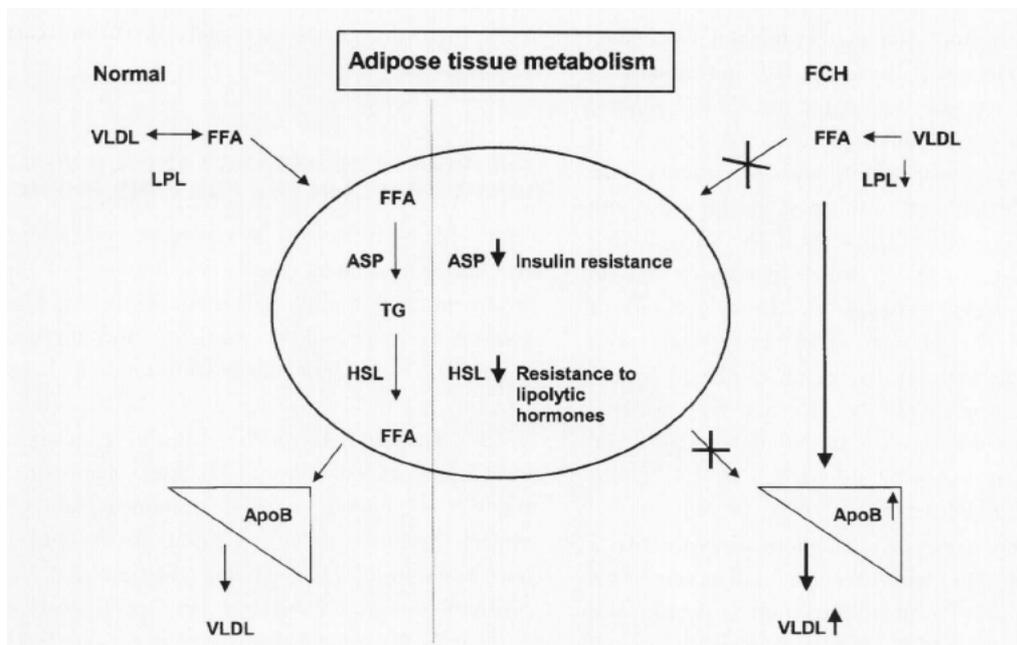


Figura 2: Alteraciones del tejido adiposo en la HFC. Tomada de de Graaf J, Veerkamp MJ, Stalenhoef AFH. *Metabolic pathogenesis of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on insulin resistance, adipose tissue metabolism and free fatty acids.* J R Soc Med 2002;95:46-53.

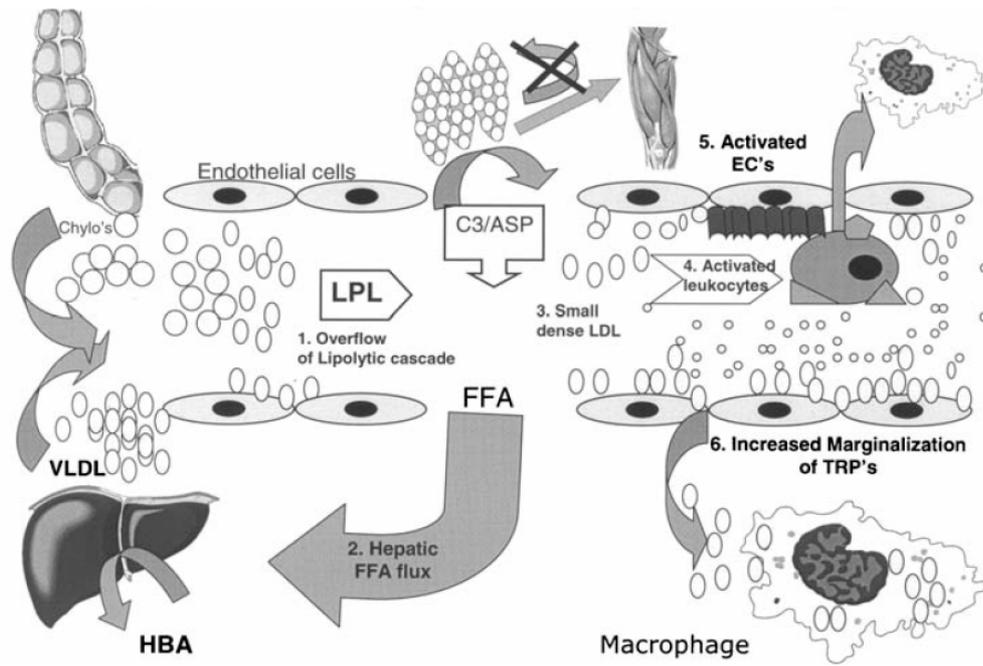


Figura 3: Lipemia posprandial en HFC. Tomada de Castro Cabezas M. Postprandial lipaemia in familial combined hyperlipidaemia. *Biochemical Society Transactions*2003;31:1090-1093

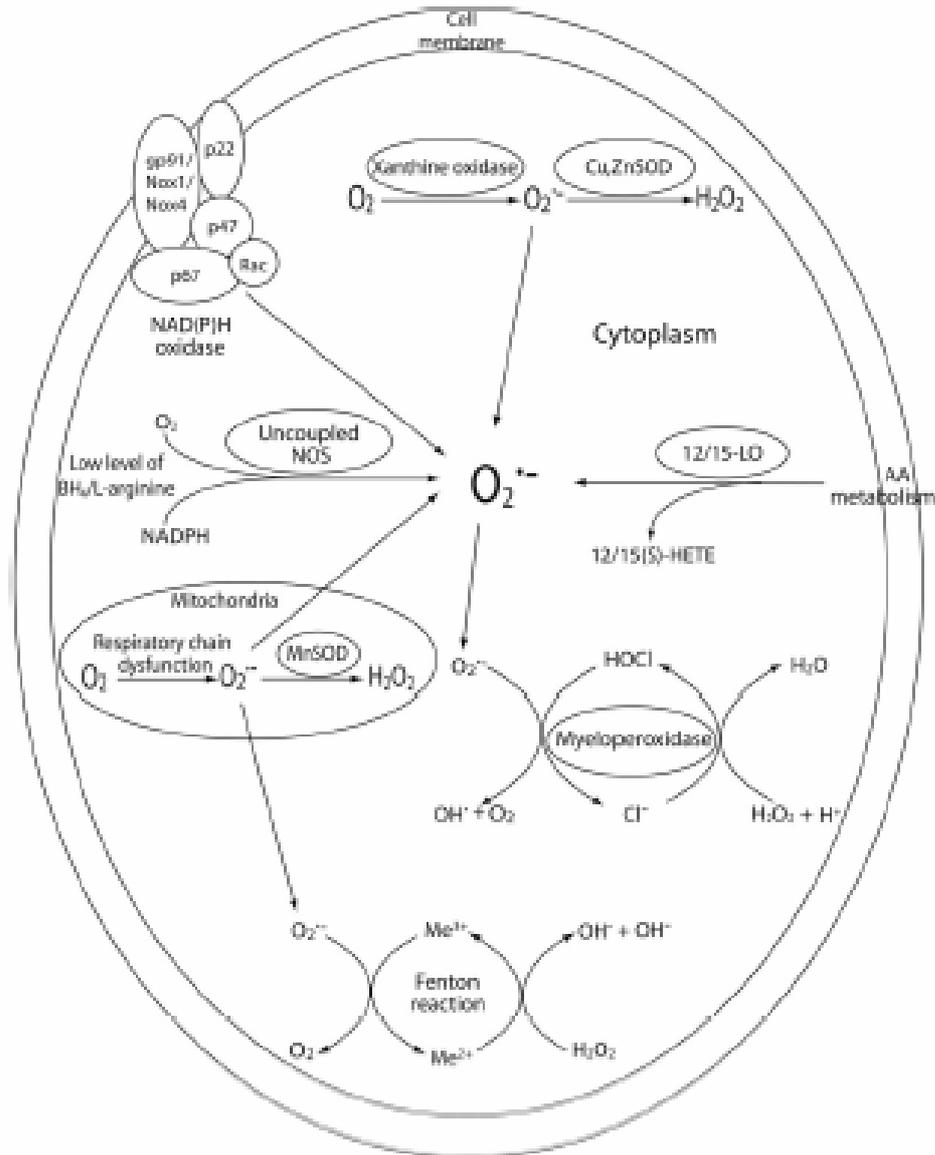


Figura 4. Fuentes de ROS en las células vasculares. Tomada de Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. *Oxidative stress and vascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:29-38.

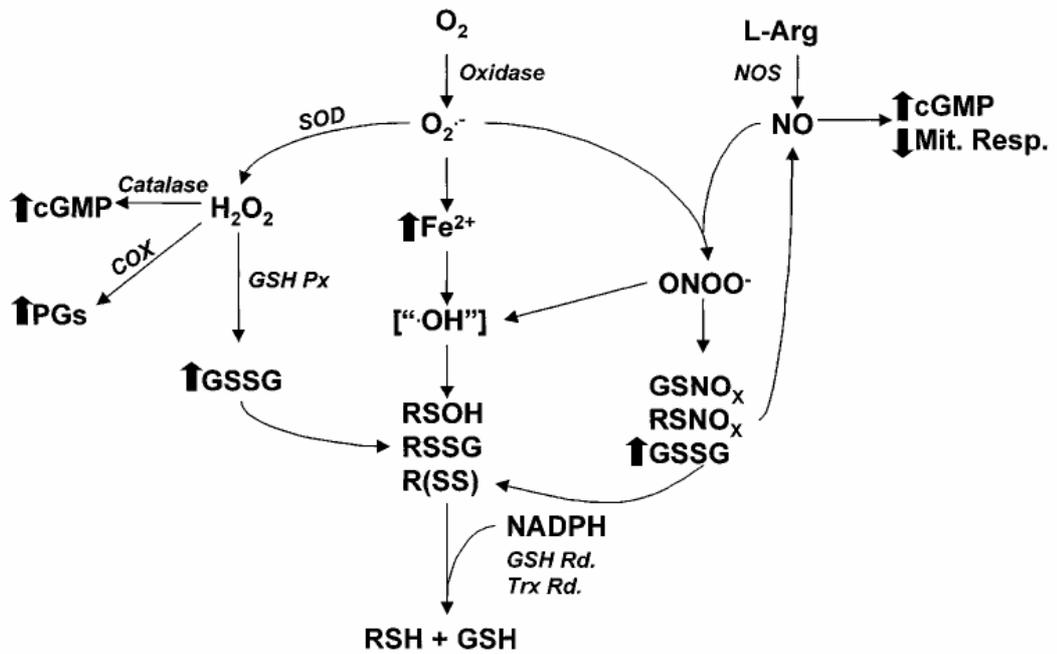


Figura 5. Origen de ROS potencialmente involucrados en los mecanismos de señalización vascular. Tomada de Wolin MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000;20:1430-42.

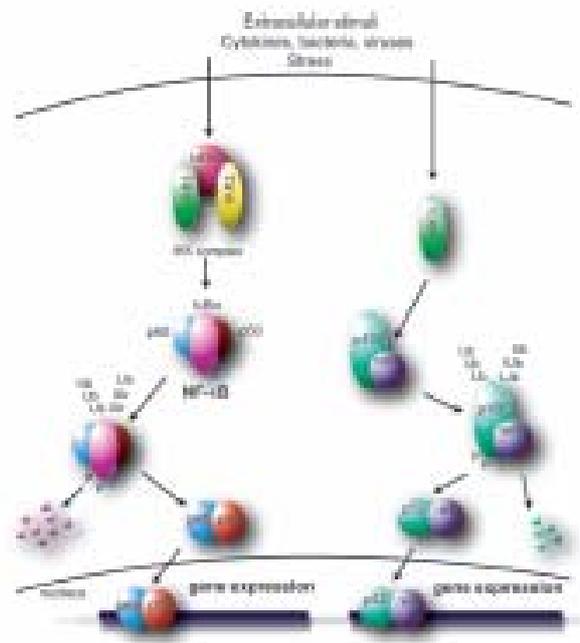


Figura 6. Activación de NF-κβ. Tomada de de Winther M, Kanters E, Kraal G, Hofker MH. Nuclear factor κB signaling in atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005;25:904-14.

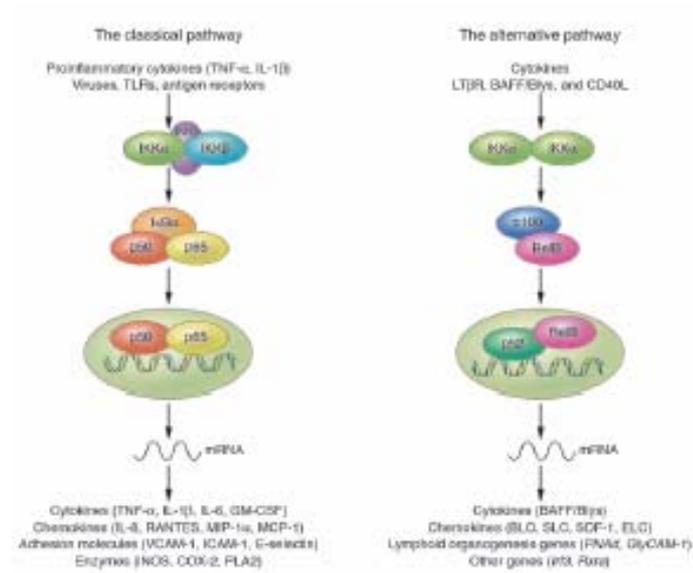


Figura 7. Vías de señalización de IKK/ NF- κ B. Tomada de Luo J-L, Kamata H, Karin M. *IKK/NF- κ B signaling: balancing life and death-a new approach to cancer therapy. J Clin Invest 2005;115:2625-32.*

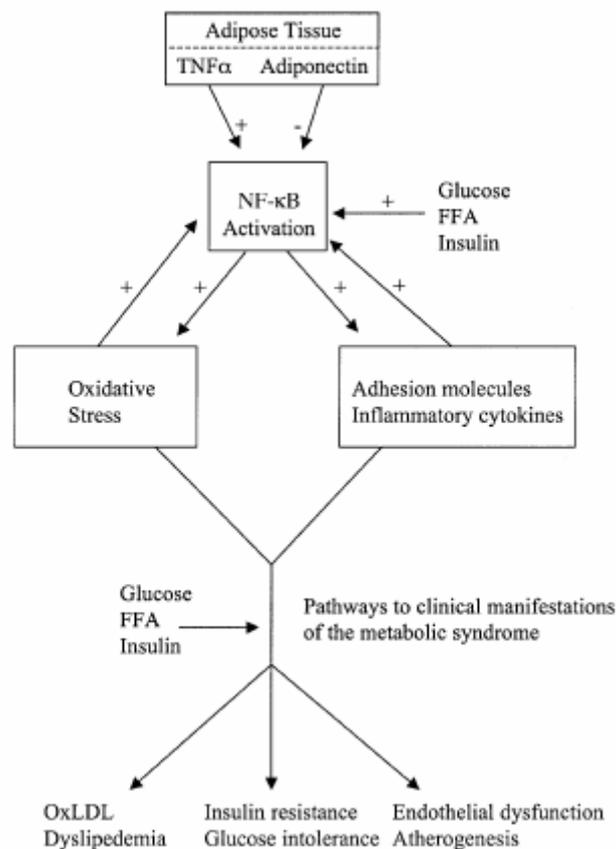


Figura 8. Papel de los productos secretados por el tejido adiposo y NF- κ B en los procesos que llevan a las manifestaciones clínicas del síndrome metabólico. Tomada de Sonnenberg GE, Krakower GR, Kissebah AH. *A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome. Obesity Research 2004;12:180-6.*

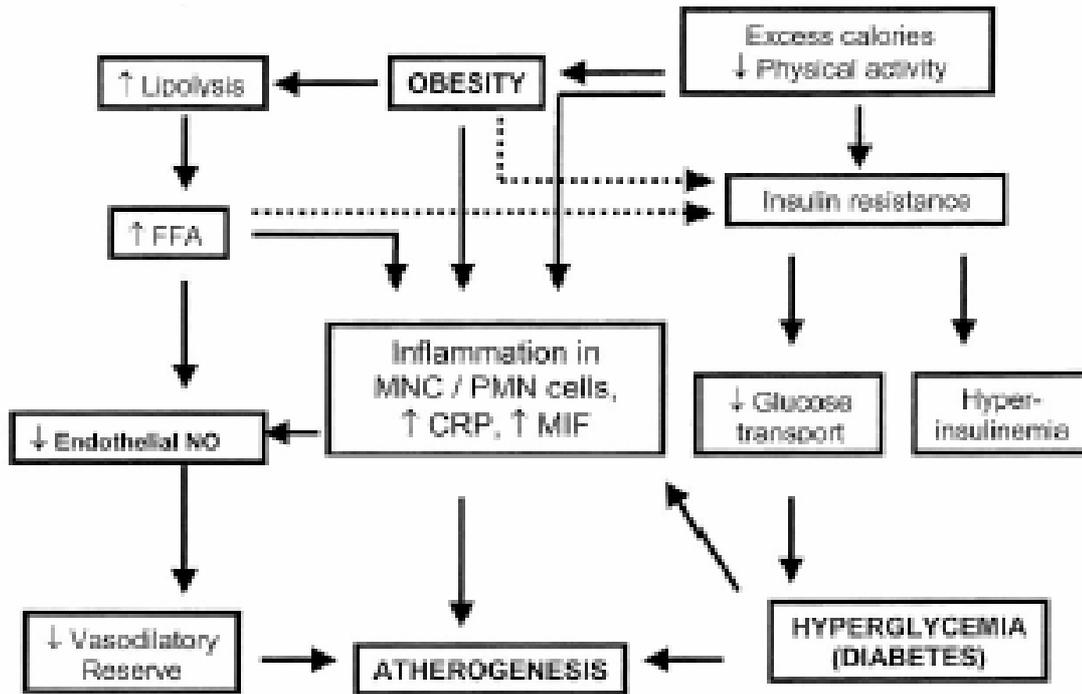


Figura 9. Patogenia de la resistencia insulínica e inflamación en la obesidad y relación con aterogénesis y DM2. Tomada de Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Bandyopadhyay A. *The potential influence of inflammation and insulin resistance on the pathogenesis and treatment of atherosclerosis-related complications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

II. Hipótesis y Objetivos

La arteriosclerosis (AE) es un proceso inflamatorio crónico con acumulación de monocitos y macrófagos en la pared arterial con producción de numerosas señales que perpetúan y complican la placa de ateroma. NF- κ B, así como el estrés oxidativo (EO), se han relacionado con el inicio y desarrollo de la AE en modelos animales. En modelos humanos de dislipemia primaria y arteriosclerosis precoz como es la hiperlipidemia familiar combinada (HFC), todavía no se ha estudiado la relación entre parámetros antropométricos, grado de resistencia a la insulina (RI) y fenotipo lipoproteico con la expresión de factores de EO y de inflamación como NF- κ B, relacionados con el inicio y desarrollo de AE. En modelos animales de RI y en sujetos con diabetes tipo 2 o RI se ha mostrado una relación de ésta con la inflamación y oxidación.

La HFC es un modelo genético de hiperlipidemia mixta con RI, alteración de la lipemia postprandial y aterosclerosis precoz.

En este sentido, la **hipótesis de trabajo** es:

En la HFC debe existir estrés oxidativo y activación de factores inflamatorios implicados en el inicio y desarrollo de la AE que estarán relacionados con el grado de RI y sus determinantes clínicos.

Los objetivos son:

3.1. Objetivo general

1. Conocer el nivel de EO y factores de inflamación relacionados con la AE en sujetos con HFC y controles.

2. Analizar la relación entre parámetros antropométricos y grado de RI con el EO y la inflamación en sujetos con HFC y controles.

3.2. Objetivos específicos

1. Estudiar el grado de EO en sujetos con HFC y controles.

1.1. Determinación en plasma de los niveles de 8-oxo-dG, MDA, GSH, GSSG y actividades enzimáticas antioxidantes (SOD, CAT y GPX).

1.2. Conocer la activación de sistemas que controlan la inflamación sistémica y la respuesta a EO. Para ello se estudiará la actividad del factor de transcripción NF- κ B.

2. Conocer el grado de inflamación sistémica relacionada con AE, mediante la determinación de PCRas, IL1, IL6 y adiponectina en sujetos con HFC y controles.

3. Analizar la relación de los parámetros de EO e inflamación comentados con determinantes clínicos de RI (tipo y grado de obesidad) y HOMA en sujetos con HFC y en controles.

III. Sujetos y Métodos

1. Sujetos

1.1. Pacientes con HFC

Hemos estudiado 42 pacientes (15 mujeres y 27 varones) diagnosticados de HFC, procedentes de la Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínico Universitario de Valencia. El rango de edad de los pacientes estudiados fue de 31 a 62 años y un IMC entre 18,78 y 34,74 kg/m². Ninguno de ellos había presentado ningún episodio cardiovascular.

La selección de los pacientes se realizó por muestreo consecutivo.

1.1.1 Criterios de inclusión:

- Edad: 18-65 años.
- El diagnóstico de HFC se basó en los siguientes criterios:
 - Historia familiar con patrón autosómico dominante de una dislipemia con fenotipo lipoproteico múltiple (IIa, IIb o IV).
 - Dislipemia: colesterol y triglicéridos mayores del percentil 90 (CT \geq 200 mg/dl y/o TG \geq 150 mg/dl) con apo-B \geq 120 mg/dl.

1.1.2 Criterios de exclusión:

- Ingesta de alcohol \geq 30 g/día.
- Hábito tabáquico (si es exfumador, al menos un año).
- TSH $>$ 10 mU/ml.
- Enfermedad hepática avanzada (con insuficiencia hepática).
- Colestasis, definida por valores de γ glutamil transpeptidasa (GGT) $>$ 32 mU/ml, bilirrubina directa $>$ 0,2 mg/dl y fosfatasas alcalinas $>$ 250 mU/ml; valores máximos de nuestro laboratorio.
- Creatinina sérica $>$ 2 mg/dl o insuficiencia renal terminal en diálisis.
- Obesidad grave con IMC \geq 35 kg/m².
- Fluctuaciones ponderales mayores al 10% del peso corporal en los últimos tres meses.
- Seguimiento de dietas hipocalóricas para la reducción de peso.
- Medicación hipolipemiente o cualquier fármaco que modifique el perfil lipídico o situación de EO e inflamación y no pueda ser retirado 6 semanas antes de iniciar el estudio.

- Embarazo o lactancia en los 3 últimos meses.
- Enfermedad neoplásica metastásica.
- Pacientes en prevención secundaria (infarto agudo de miocardio, angioplastia transluminal, by-pass aorto-coronario, angor pectoris con test de esfuerzo positivo, ACV).
- Diabetes mellitus.
- Hipertensión arterial.
- Cualquier infección sufrida en las seis semanas previas al estudio.

1.2. Grupo control

Fueron estudiados 24 voluntarios sanos (9 mujeres y 15 varones) sanos normolipidémicos, con un rango de edad de 23 a 64 años y un IMC entre 20,09 y 30,59 kg/m², procedentes del personal del Hospital Clínico Universitario y familiares no afectados de los casos índice.

1.2.1. Criterios de inclusión:

- Edad: 18-65 años.
- CT < 200 mg/dl con TG < 150 mg/dl.
- Ausencia de antecedentes personales o familiares de dislipemia.

1.2.2. Criterios de exclusión:

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

2. Métodos

Se ha diseñado un estudio de casos-contrroles. Todas las mediciones fueron realizadas por el mismo investigador. En ambos grupos se ha aplicado el siguiente protocolo de estudio, recogiendo:

- Parámetros clínicos.
- Parámetros antropométricos.
- Parámetros bioquímicos y genéticos.

2.1. Parámetros clínicos

Se realizó una anamnesis detallada con especial énfasis en:

- Registro del hábito tabáquico con recogida de nº de cigarrillos/día. En caso de ser exfumador se registra el nº de cigarrillos/día fumados, el nº de años en que se mantuvo el hábito y el año en que se abandona el consumo.
- Consumo de alcohol con registro de gramos/día.
- Ejercicio físico, reflejando los minutos por semana.
- Fármacos de consumo habitual u ocasional que coincidan con el periodo de estudio.
- En los casos, años de evolución de la dislipemia y episodios cardiovasculares presentados hasta la fecha de inclusión en el estudio.
- Determinación de la presión arterial tras 10 minutos de reposo en decúbito supino, utilizando el valor medio de 3 mediciones separadas 5 minutos realizadas con un esfigmomanómetro de mercurio.

2.2. Parámetros antropométricos

Se determinaron los datos siguientes:

- Peso en kilogramos (kg) mediante una báscula romana, la talla en metros (m) y el índice de masa corporal (IMC) en kg/m².
- Circunferencia de la cintura: se mide en el punto medio entre la espina iliaca anterosuperior y el margen costal inferior. La medida se obtiene con una cinta métrica graduada en centímetros (cm) estando el sujeto en bipedestación y los brazos en posición anatómica¹⁰⁹.

2.3. Parámetros bioquímicos y genéticos

Se realizaron las siguientes pruebas:

- Estudio del metabolismo lipídico basal, tras 12 horas de ayuno nocturno y sin medicación hipolipemiente (periodo de lavado de 6 semanas) con determinaciones de CT, TG, cHDL, cLDL, cVLDL, remanentes y apolipoproteína B. El procesado de las muestras se realizó en el Laboratorio de Endocrinología del Hospital Clínico Universitario de Valencia.
- Determinación de insulina basal.
- Obtención de ADN para estudio genético y determinación del genotipo de apo E.
- Determinación de parámetros de estrés oxidativo.

- Determinación de la actividad de factores de transcripción, como es NF- κ B.

2.3.1. Perfil lipídico

Las muestras de sangre se obtuvieron tras 12 horas de ayuno nocturno y sin medicación hipolipemiente (periodo de lavado de 6 semanas), se depositaron en tubos con EDTA, y una vez en el laboratorio, se separó inmediatamente el plasma mediante centrifugación refrigerada a 2500-3000 rpm durante 10 minutos. Las muestras de plasma fueron procesadas inmediatamente o se congelaron a -20°C y procesadas en la semana siguiente.

- Colesterol total (CT): Se determinó por un método enzimático colorimétrico¹¹⁰, con reactivos comerciales de Bayer Diagnósticos para sistema Technicon®. El método está basado en la oxidación del colesterol, catalizada por la enzima colesterol oxidasa, donde se genera peróxido de hidrógeno que participa en la oxidación de un cromógeno (4-aminofenazona y 4-clorofenol), formando una quinoamonoimina con un pigmento rojo. La variación en la absorbancia de este color permite cuantificarlo en un espectrofotómetro.
- Triglicéridos (TG): Cuantificado por un método enzimático colorimétrico¹¹¹, con reactivos comerciales de Bayer Diagnósticos. La técnica se basa en la determinación del glicerol contenido en las moléculas de TG tras su hidrólisis mediante lipasas, para eliminar los ácidos grasos. El glicerol, por la acción de la glicerol quinasa y en presencia de ATP, produce glicerol-fosfato, compuesto que reacciona con el oxígeno a través de una oxidasa, generando peróxido de hidrógeno, que participa en una reacción donde se genera una quinona de pigmento rojo que es medida en un espectrofotómetro.
- Colesterol HDL (cHDL): Para separar las HDL se utiliza la precipitación con ácido fosfotúngstico-cloruro de magnesio¹¹². Se utilizaron reactivos comerciales de Boehringer Mannheim. Este método está basado en la propiedad de los polianiones como el ácido fosfotúngstico, de precipitar las lipoproteínas más grandes y menos densas en presencia de cationes divalentes como el cloruro de magnesio, quedando las HDL en el sobrenadante. Posteriormente, son cuantificadas por un método enzimático colorimétrico.
- Colesterol LDL (cLDL): Se calculó por sustracción aplicando la fórmula:
$$\text{cLDL} = \text{CT} - (\text{cHDL} + \text{cVLDL}).$$

- Colesterol VLDL (cVLDL): Se calculó aplicando la fórmula:
$$cVLDL = TG/5.$$
- Remanentes: se calcularon aplicando la fórmula:
$$\text{Remanentes} = cVLDL/ApoB$$
- Apolipoproteína B (apoB): Se determinó por inmunturbimetría¹¹³.

2.3.2. Determinaciones de glucosa e insulina

2.3.2.1. Glucosa

Se determinó por el método de la glucosa oxidasa¹¹⁴ (método enzimático colorimétrico), con reactivos comerciales Glu-Cinet de Bayer Diagnósticos, en un analizador Technicon® RaTM-1000.

2.3.2.2. Insulina

Se determinó por ELISA.

2.3.2.3. Cálculo del índice HOMA

El índice HOMA (Homeostasis model assessment) se calculó según la fórmula descrita por Matthews et al¹¹⁵.

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

Este índice es considerado como un índice indirecto de insulinoresistencia¹¹⁶. Estudios recientes de Ascaso y colaboradores han demostrado que un índice HOMA de 2,6, que corresponde al percentil 75 en sujetos de la Comunidad Valenciana, define la situación de insulinoresistencia^{117,118}.

2.3.3. Determinación del genotipo de la apo E

Se determinó por PCR y posterior digestión enzimática.

2.3.4. Determinación de parámetros de estrés oxidativo

La sangre se recogió en tubos heparinizados y se conservó en frío (4°C) para su inmediato procesamiento que varió según el análisis a realizar.

La determinación de la actividad antioxidante total del plasma se llevó a cabo mediante Kits comerciales de la casa Randox según protocolo.

Las actividades de enzimas antioxidantes, SOD (Cu/Zn y Mn), catalasa (CAT), GPX y GSH se llevó a cabo según la metodología descrita en Handbook of Methods for Oxygen Radical Research¹¹⁹, con ligeras modificaciones.

La relación GSSG/GSH se determinó mediante cromatografía de alta presión (HPLC) y detección UV, haciendo uso de patrones apropiados y siguiendo la metodología descrita por Asensi et al¹²⁰.

La cuantificación de la base mutagénica 8-oxo-dG se realizó por cromatografía de alta eficacia y detección electroquímica (HPLC-EC) en conexión en serie con detector UV para establecer la relación 8-oxo-dG/dG, a partir de DNA genómico extraído de los linfocitos y sus mitocondrias siguiendo las condiciones descritas por Frenkel et al¹²¹.

2.3.5 Determinación de la actividad de los factores de transcripción (NF- κ B)

Se extrajeron proteínas totales de los linfo-monocitos purificados anteriormente y se determinó la actividad de los factores de transcripción mediante geles de retardo, para los cuales se utilizaron kits comerciales y oligos con las secuencias específicas del factor de transcripción. Mediante ELISA se determinó la cantidad total.

2.3.6 Determinación de adiponectina e interleucinas

Se determinaron por ELISA

2.4. Métodos estadísticos

El tamaño muestral para el estudio transversal en ayunas se calculó teniendo en cuenta un error alfa estándar del 5 %, un error beta del 20 %, y para detectar diferencias clínicamente relevantes entre proporciones superiores al 20% y modificaciones de las variables críticas de EO superiores al 20% entre controles y sujetos con HFC. La muestra comprenderá un mínimo de 40 controles sanos, y 40 sujetos con HFC apareados por edad, IMC y perímetro de cintura.

El muestreo de los casos y controles fue consecutivo. La población diana de casos son los pacientes afectados de HFC controlados en nuestro centro. Y la de los controles, sujetos sanos normolipidémicos no diabéticos proceden del personal del Hospital Clínico Universitario y familiares no afectados de los casos. Finalmente, se reclutaron 26 controles y 42 sujetos con HFC, lo que supone 2 casos para cada control. Al no alcanzar el número suficiente de controles no se han realizado los análisis estadísticos en este subgrupo.

Las variables cuantitativas han sido expresadas en media y desviación estándar y las cualitativas como porcentajes o número total.

Para la comparación de las variables cuantitativas entre grupos se ha utilizado el análisis de las varianzas (ANOVA) y en caso de que las variables no cumplieran criterios de normalidad o en grupos con $n < 30$ el test de Mann Whitney. Para corregir factores de confusión en algunos estudios de comparación se ha utilizado el análisis por ANCOVA. Las variables de confusión introducidas para la comparación entre grupos fueron la edad, el sexo y la cintura.

Para la comparación de las variables cuantitativas entre grupos se ha utilizado el test del Chi cuadrado o el test de Fisher cuando la n era < 5 .

Para conocer las correlaciones univariantes entre las variables analizadas hemos utilizado la prueba de Pearson.

Finalmente, se ha utilizado el análisis multivariante (regresión lineal múltiple) para conocer la independencia de diferentes variables en la predicción de la variable dependiente. En cada caso se detallará la variable dependiente y las independientes.

IV. Resultados

1 Comparación de los parámetros analizados en el grupo completo: controles frente a HFC

En las tablas y figuras que se exponen a continuación comparamos las características generales, antropométricas y bioquímicas, así como parámetros de oxidación e inflamación del grupo de controles frente al de HFC.

1.1 Características generales

En la tabla 1 se observan las características generales del grupo completo, como edad, sexo, peso, IMC y cintura. Son grupos comparables en género e IMC. Se observan diferencias estadísticamente significativas en la edad y en el perímetro de la cintura.

Tabla 1.- Características generales del grupo completo.

	Controles (n=24)	HFC (n=42)
Edad (años)	37,69(14,34)	44,92(8,55)*
Sexo Hombre/Mujer	15/9	27/15
Peso (kg)	73,19(11,79)	77,81(16,93)
IMC (kg/m ²)	27,25(4,51)	27,14(4,02)
Cintura (cm)	86,60(10,79)	93,33(13,28)*

*p<0,05.

En todos los casos, al comparar por edad y sexo, y al corregir por la cintura, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en las variables mostradas en la tabla.

1.2 Datos bioquímicos

En la tabla 2 resumimos los principales resultados bioquímicos en ayuno del grupo completo. Encontramos diferencias significativas entre ambos grupos en los valores de glucosa, insulina y HOMA. También encontramos diferencias en el CT, TG, cLDL, cVLDL, remanentes y apo B significativamente superiores en los sujetos con HFC respecto a controles, obviamente por los criterios de selección. El cHDL es menor en el grupo de HFC que en el de controles.

Tabla 2.- Datos bioquímicos en ayunas del grupo completo.

	Controles (n=24)	HFC (n=42)
Glucosa (mg/dl)	89,58(5,56)	98,82(12,09)**
Insulina (μ U/ml)	7,64(4,88)	14,86(7,54)**
HOMA	1,68(1,09)	3,60(1,87)**
CT (mg/dl)	185,91(31,63)	269,32(77,42)**
TG (mg/dl)	99,70(45,21)	307,55(281,38)**
cHDL (mg/dl)	47,00(8,52)	40,40(8,61)**
Cldl (mg/dl)	119,04(25,25)	176,25(60,15)**
cVLDL (mg/dl)	19,94(9,04)	59,18(55,89)**
Remanentes	0,23(0,09)	0,50(0,48)**
Apo-B (mg/dl)	85,12(16,32)	127,10(28,67)**

** p<0,01.

La edad y el sexo no tienen efecto sobre estas variables. Estas diferencias significativas se mantienen cuando se corrigen las variables por la cintura.

1.3 Parámetros de oxidación

En la tabla 3 quedan reflejados los valores de los parámetros biológicos de oxidación del grupo completo. Los valores de 8-oxo-dG y el cociente GSSG/GSH son significativamente superiores en los sujetos con HFC respecto a controles, mientras que GSH y GPX son significativamente inferiores en el grupo de HFC.

Tabla 3.- Parámetros biológicos de oxidación del grupo completo

	Controles (n=24)	HFC (n=42)
8-oxo-dG (8-oxo-dG/10 ⁶ dG)	4,55(1,12)	5,48(1,08)**
MDA (U/g proteína)	0,21(0,09)	0,25(0,09)
GSH (nmol/mg proteína)	22,48(4,32)	19,00(3,42)**
GSSG (nmol/mg proteína)	0,27(0,12)	0,31(0,10)
GSSG/GSH (GSSG/GSH %)	1,33(0,83)	1,73(0,66)*
SOD (U/mg proteína)	6,14(3,18)	5,62(3,78)
CAT (U/g proteína)	193,14(51,01)	170,15(50,31)
GPX (U/g proteína)	56,41(8,04)	51,44(5,41)**

*p<0,05; **p<0,01.

En las siguientes figuras (10 a 17) están representados los marcadores de oxidación de ADN mitocondrial y de estrés oxidativo. Se observa un aumento de los marcadores de daño del ADN y de los sistemas oxidantes (significativo en el caso de 8-oxo-dG, GSH/GSSG y GPX), y un descenso de los sistemas antioxidantes (significativo en el caso de GSH).

Figura 10. 8-oxo-dG

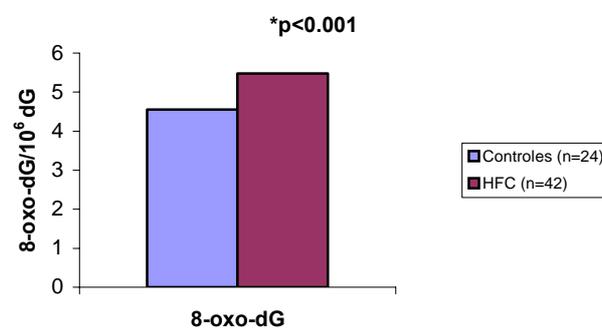


Figura 11. MDA

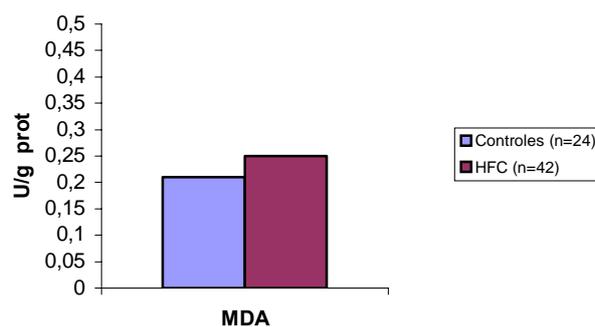


Figura 12. GSH

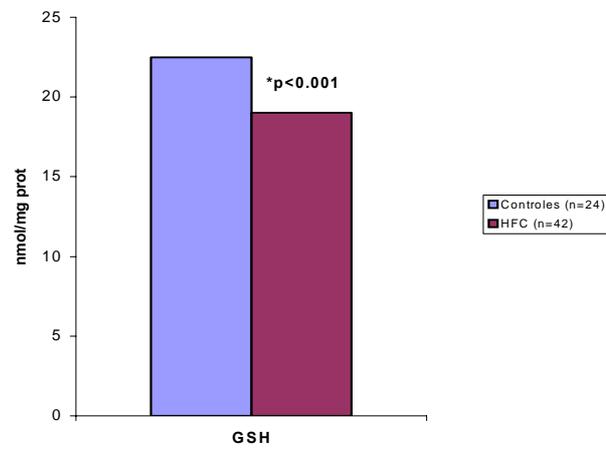


Figura 13. GSSG

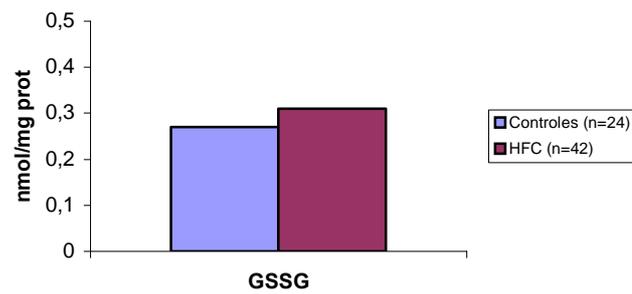


Figura 14. GSSG/GSH

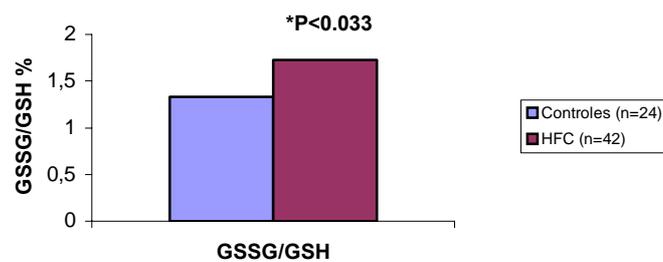


Figura 15. SOD

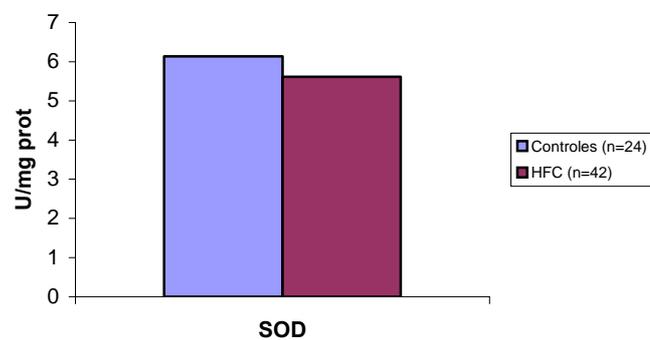


Figura 16. CAT

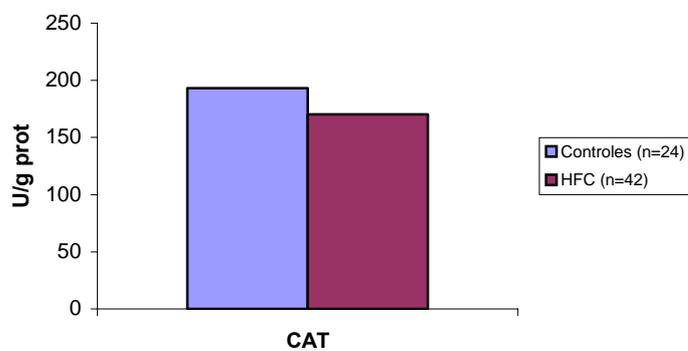
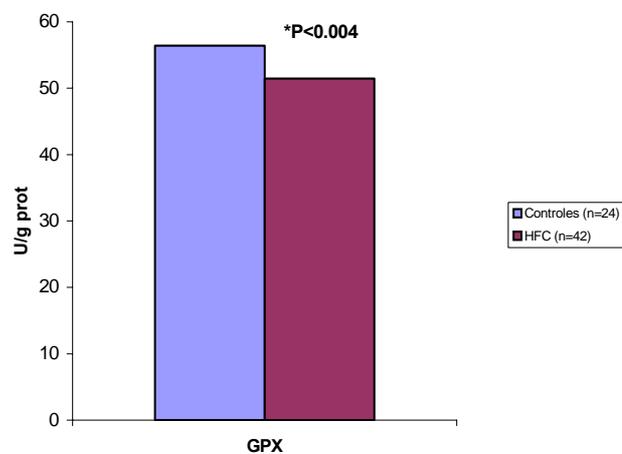


Figura 17. GPX



Estas diferencias significativas se mantienen cuando se corrigen las variables por la cintura, la edad y el sexo.

1.4 Parámetros de inflamación

En la tabla 4 quedan reflejados los valores de los parámetros de inflamación del grupo completo. Los valores de NF- κ B e IL-6 son significativamente superiores en los pacientes con HFC respecto a controles. El valor de adiponectina es significativamente menor en el grupo de HFC.

Tabla 4.- Parámetros de inflamación del grupo completo

	Controles (n=24)	HFC (n=42)
NF- κ B (unidades relativas de luminiscencia)	37,94(12,53)	90,73(43,24)**
Adiponectina (μ g/ml)	30,28(15,64)	21,71(13,49)*
IL-1 (pg/ml)	373,86(312,92)	347,72(316,95)
IL-6 (pg/ml)	60,49(13,03)	70,49(12,22)**
PCRas (mg/l)	1,18(1,23)	1,83(1,69)

*p<0,05; **p<0,01.

En las siguientes figuras (18 a 22) están representados los marcadores de inflamación. Se observa un aumento de los marcadores inflamatorios (significativo en el caso de NF- κ B e IL-6), y un descenso de los marcadores antiinflamatorios (significativo en el caso de adiponectina).

Figura 18. NF- κ B

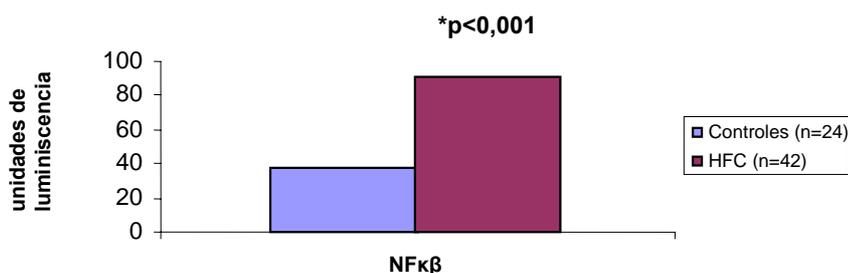


Figura 19. Adiponectina

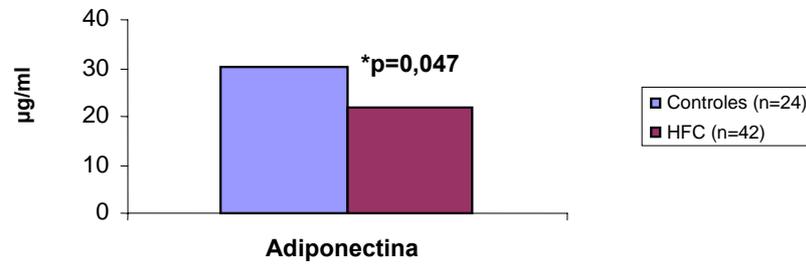


Figura 20. IL-1

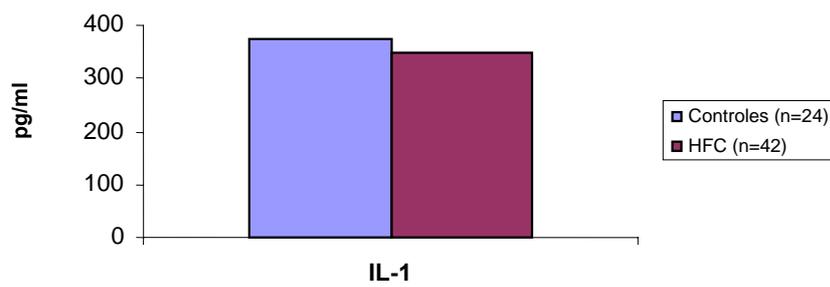


Figura 21. IL-6

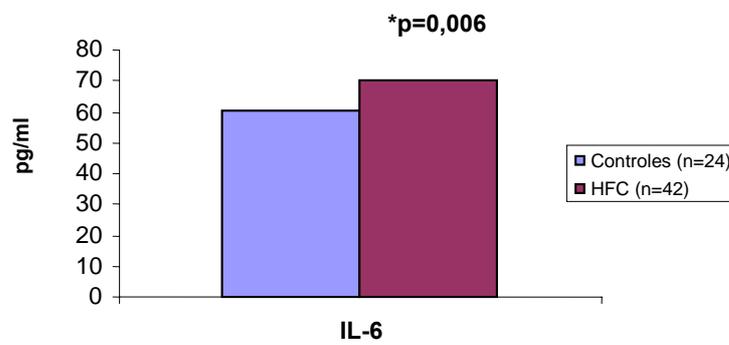
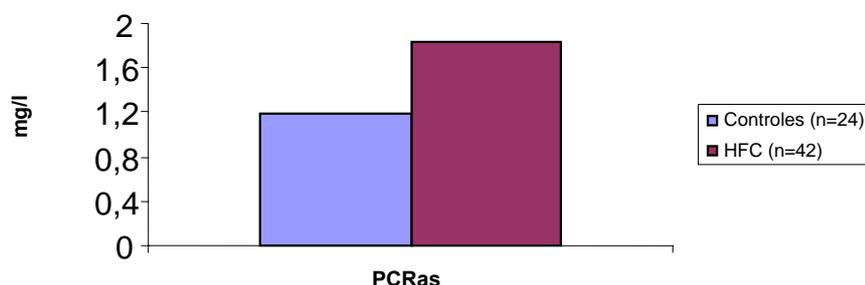


Figura 22. PCRas



Estas diferencias significativas se mantienen cuando se corrigen las variables por la cintura, la edad y el sexo.

1.5 Determinantes de oxidación

En la tabla 5 se muestran las correlaciones significativas (correlación de Pearson) entre oxidación, medida por 8-oxo-dG, GSH, GSSG, CAT y GPX, y las variables antropométricas y bioquímicas características de la insulinoresistencia (cintura, glucosa, HOMA, TG, cHDL, remanentes y apo B) en el grupo completo. Se encontró una relación significativa de la glucosa con GSH de forma negativa; del HOMA con 8-oxo-dG de forma positiva, y con GSH negativa; de HDL con GSH de forma positiva, y con 8-oxo-dG de forma negativa; y de apoB con CAT y GPX de forma negativa.

Tabla 5.- Correlación de Pearson entre parámetros antropométricos y bioquímicos de insulinoresistencia con parámetros de oxidación en el grupo completo.

	8-oxo-dG (8-oxo-dG/10 ⁶ dG)	GSH (nmol/mg proteína)	GSSG (nmol/mg proteína)	CAT (U/g proteína)	GPX (U/g proteína)
Cintura (cm)	0,174	-0,110	0,044	-0,063	0,064
Glucosa (mg/dl)	0,054	-0,255*	0,006	-0,012	-0,233
HOMA	0,405**	-0,299*	0,197	-0,102	-0,085
cHDL (mg/dl)	-0,341**	0,282*	-0,158	0,118	0,149
TG (mg/dl)	0,107	-0,055	0,060	-0,207	-0,022
Remanentes	0,119	-0,054	0,056	-0,114	0,040
Apo B (mg/dl)	0,044	-0,149	0,056	-0,397**	-0,348**

*p<0,05; **p<0,01.

En el grupo de HFC se encontraron únicamente correlaciones entre cintura y GPX (r 0,360, $p=0,019$), y apo B de forma inversa con 8-oxo-dG (r -0,356, $p=0,021$) y con CAT (r -0,392, $p<0,01$).

En el grupo de controles no se encontraron correlaciones significativas.

Para evaluar si existe relación entre los distintos parámetros de oxidación, se han realizado correlaciones (correlación de Pearson) entre dichos parámetros. En la tabla 6, se observa la relación en el grupo completo: 8-oxo-dG se relaciona de forma significativa con GSSG de forma positiva, y con GSH y GPX de forma inversa; GSSG se relaciona de forma significativa con 8-oxo-dG de forma positiva, y con GSH, CAT y GPX de forma inversa; GSH se relaciona de forma directa con CAT y GPX, e inversa con 8-oxo-dG y GSSG; CAT se relaciona de forma directa con GPX, e inversa con GSSG; y GPX se relaciona de forma directa con GSH y CAT, e inversa con 8-oxo-dG y GSSG.

Tabla 6.- Correlación de Pearson entre parámetros de oxidación en el grupo completo

	8-oxo-dG (8-oxo-dG/10 ⁶ dG)	GSH (nmol/mg proteína)	GSSG (nmol/mg proteína)	CAT (U/g proteína)	GPX (U/g proteína)
8-oxo-dG (8-oxo-dG/10 ⁶ dG)		-0,674**	0,444**	0,185	-0,459**
GSH (nmol/mg proteína)	-0,674**		-0,335**	0,207	0,641**
GSSG (nmol/mg proteína)	0,444**	-0,335**		-0,400**	-0,343**
CAT (U/g proteína)	-0,185	-0,400**	0,207		0,488**
GPX (U/g proteína)	-0,459**	-0,343**	0,641**	0,488**	

* $p<0,05$; ** $p<0,01$.

En el caso del grupo de HFC y del grupo de controles, se observan resultados similares.

1.6 Determinantes de inflamación

En la tabla 7 se muestran las correlaciones significativas (correlación de Pearson) entre inflamación, medida por NF- κ B, adiponectina, IL-6 y PCRas, y las variables antropométricas y bioquímicas características de la insulinoresistencia (cintura, glucosa, HOMA, TG, cHDL, remanentes y apo B). Se encontró una relación significativa del perímetro de la cintura con adiponectina de forma negativa, y con PCRas de forma positiva; de la glucosa con adiponectina de forma negativa; del HOMA con adiponectina de forma negativa, y con NF- κ B y PCRas de forma positiva; de cHDL con adiponectina de forma positiva; de los TG con NF- κ B, IL-6 y PCRas; de los remanentes con PCRas; y de apo B con NF- κ B e IL-6 de forma positiva.

Tabla 7.- Correlación de Pearson entre parámetros antropométricos y bioquímicos de insulinoresistencia con parámetros de inflamación en el grupo completo.

	NF- κ B (unidades relativas de luminiscencia)	Adiponectina (μ g/ml)	IL-6 (pg/ml)	PCRas (mg/l)
Cintura (cm)	0,207	-0,473**	0,187	0,372**
Glucosa (mg/dl)	0,232	-0,354**	-0,070	0,197
HOMA	0,493**	-0,369**	0,160	0,432**
cHDL (mg/dl)	-0,093	0,514**	-0,181	-0,149
TG (mg/dl)	0,674**	-0,196	0,272*	0,402**
Remanentes	0,526	-0,220	0,219	0,361**
ApoB (mg/dl)	0,619**	-0,045	0,320*	0,185

*p<0,05; **p<0,01.

En el caso del grupo de controles y del grupo de HFC, se observan resultados similares.

Para evaluar si existe relación entre los distintos parámetros de inflamación, se han realizado correlaciones (correlación de Pearson) entre dichos parámetros. En la tabla 8, se observa la relación en el grupo completo. NF- κ B se correlaciona con PCRas.

Tabla 8.- Correlación de Pearson entre parámetros de inflamación en el grupo completo.

	NF- κ B (unidades relativas de luminiscencia)	Adiponectina (μ g/ml)	IL-6 (pg/ml)	PCRas (mg/l)
NF- κ B (unidades relativas de luminiscencia)		-0,159	0,313	0,511**
Adiponectina (μ g/ml)	-0,159		-0,190	-0,127
IL-6 (pg/ml)	0,313	-0,190		0,051
PCRas (mg/l)	0,511**	-0,127	0,051	

*p<0,05; **p<0,01.

En el caso del grupo de HFC y del grupo de controles, se observan resultados similares.

1.7 Relación entre oxidación e inflamación en el grupo de HFC

Para determinar si existe relación entre los distintos parámetros de oxidación (medida por 8-oxo-dG, GSH, GSSG, CAT y GPX) e inflamación (medida por NF- κ B, adiponectina, IL-6 y PCRas), se han evaluado las correlaciones existentes entre dichos parámetros (correlación de Pearson). En la tabla 9 se muestran los resultados del grupo de HFC. No se han encontrado relaciones estadísticamente significativas.

Tabla 9.- Correlación de Pearson entre parámetros de oxidación y parámetros de inflamación en el grupo de HFC.

	NF- κ B (unidades relativas de luminiscencia)	Adiponectina (μ g/ml)	IL-6 (pg/ml)	PCRas (mg/l)
8-oxo-dG (8-oxo-dG/10 ⁶ dG)	-0,028	0,005	0,129	0,233
GSH (nmol/mg proteína)	-0,107	-0,079	0,331	0,051
GSSG (nmol/mg proteína)	-0,120	0,151	-0,119	0,187
CAT (U/g proteína)	0,363	0,049	-0,074	-0,238
GPX (U/g proteína)	0,160	-0,036	0,327	0,285

*p<0,05; **p<0,01.

Tampoco se observaron diferencias ni en el grupo completo ni en el de controles.

1.8 Análisis del efecto de obesidad en el grupo completo

Para estudiar el efecto de la obesidad en los parámetros bioquímicos y en los parámetros de oxidación e inflamación, hemos dividido el grupo completo (HFC y controles) en otros 2 subgrupos atendiendo al $IMC \geq 27 \text{ kg/m}^2$. Los datos resultantes de esta subdivisión en cuanto a edad, peso, IMC, cintura, glucosa, insulina, HOMA, CT, TG, cHDL, cLDL, cVLDL, remanentes y apo B, se resumen en la tabla 10.

Tabla 10.- Efecto del $IMC \geq 27 \text{ kg/m}^2$ en diversas variables antropométricas y bioquímicas en el grupo completo

	IMC<27 kg/m ² (n=36)	IMC≥27 kg/m ² (n=30)
Edad (años)	42,00(12,56)	42,86(10,39)
IMC (kg/m ²)	23,88(2,36)	30,62(2,85)**
Cintura (cm)	84,02(10,49)	97,83(11,41)**
Glucosa (mg/dl)	94,51(11,33)	96,43(10,72)
Insulina (μU/ml)	9,60(5,58)	15,03(8,36)**
HOMA	2,29(1,53)	3,55(1,99)**
CT (mg/dl)	242,71(87,22)	229,30(61,26)
TG (mg/dl)	199,94(251,57)	254,36(237,54)*
cHDL (mg/dl)	44,51(10,28)	41,73(7,99)
cLDL (mg/dl)	160,57(62,70)	145,76(49,88)
cVLDL (mg/dl)	39,98(50,31)	50,87(47,50)*
Remanentes	0,35(0,40)	0,46(0,42)**
Apo B (mg/dl)	113,00(37,29)	107,63(26,16)

*p<0,05; **p<0,01.

En la tabla 11 se resumen los datos de oxidación resultantes de esta subdivisión en el grupo completo.

Tabla 11.- Efecto del IMC ≥ 27 kg/m² en diversos parámetros de oxidación en el grupo completo

	IMC<27 kg/m ² (n=36)	IMC \geq 27 kg/m ² (n=30)
8-oxo-dG (8-oxo-dG/10 ⁶ dG)	5,13(1,24)	5,19(1,11)
GSH (nmol/mg proteína)	19,90(3,85)	20,39(4,40)
GSSG (nmol/mg proteína)	0,31(0,11)	0,28(0,11)
GSSG/GSH (GSSG/GSH %)	1,65(0,68)	1,53(0,80)
SOD (U/mg proteína)	5,41(3,51)	6,48(3,96)
CAT (U/g proteína)	174,02(57,41)	184,47(48,89)
GPX (U/g proteína)	51,33(6,00)	55,10(7,09)*

*p<0,05.

En la tabla 12 se resumen los datos de inflamación resultantes de esta subdivisión en el grupo completo.

Tabla 12.- Efecto del IMC ≥ 27 kg/m² en diversos parámetros de inflamación en el grupo completo

	IMC<27 kg/m ² (n=36)	IMC \geq 27 kg/m ² (n=30)
NF- κ β (unidades relativas de luminiscencia)	57,00(24,76)	65,78(49,22)
Adiponectina (μ g/ml)	29,87(16,33)	21,29(12,23)*
IL-1 (pg/ml)	347,43(356,88)	371,80(265,83)
IL-6 (pg/ml)	65,71(13,83)	66,98(13,43)
PCRas (mg/l)	0,97(0,98)	2,16(1,79)**

*p<0,05; **p<0,01.

En las siguientes figuras (23 a 27) están representados los marcadores de inflamación en función del IMC en el grupo completo. Únicamente se observan diferencias significativas en adiponectina y PCRas.

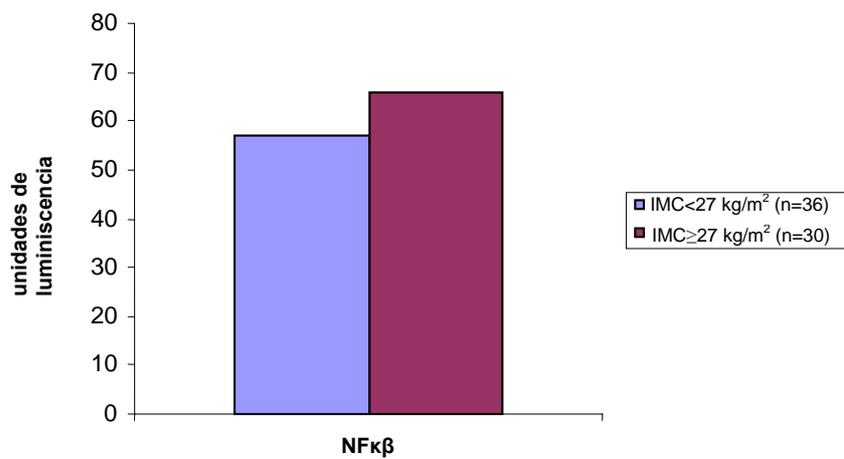
Figura 23. NF- κ β 

Figura 24. Adiponectina

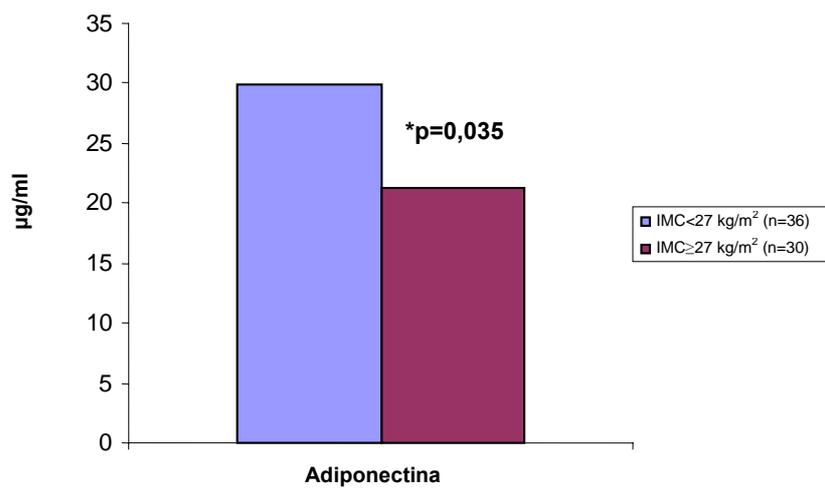


Figura 25. IL-1

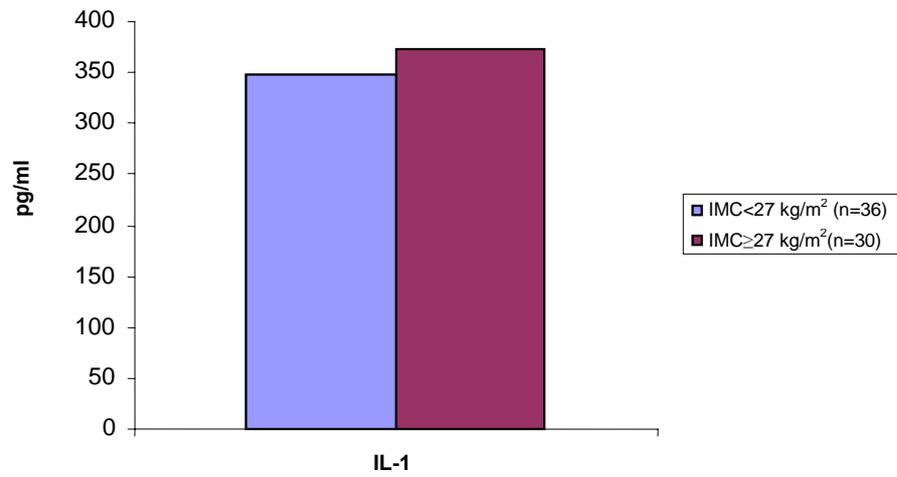


Figura 26. IL-6

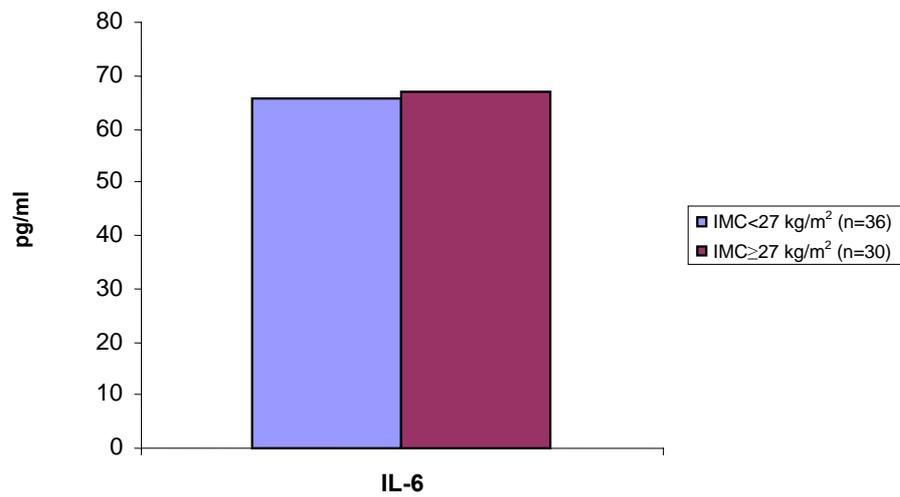
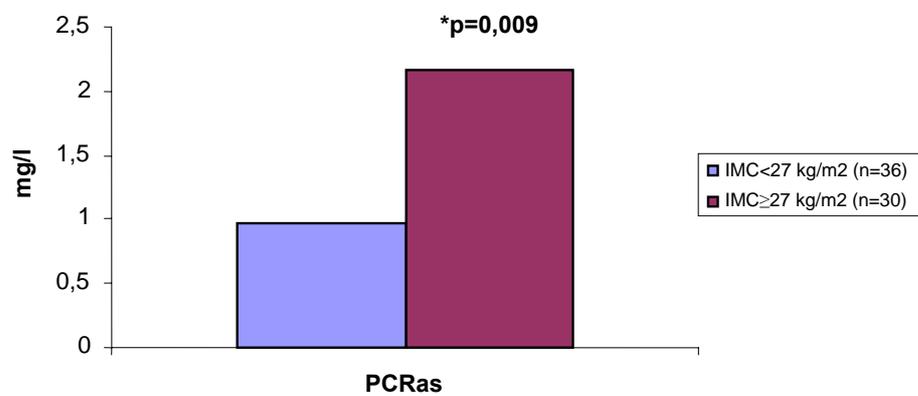


Figura 27. PCRas



1.9 Análisis del efecto de obesidad en el grupo de HFC

Para estudiar el efecto de la obesidad en los parámetros bioquímicos y en los parámetros de oxidación e inflamación, hemos dividido el grupo de HFC en otros 2 subgrupos atendiendo al $IMC \geq 27 \text{ kg/m}^2$. Los datos resultantes de esta subdivisión en cuanto a edad, peso, IMC, cintura, glucosa, insulina, HOMA, CT, TG, cHDL, cLDL, cVLDL, remanentes y apo B, se resumen en la tabla 13.

Tabla 13.- Efecto del $IMC \geq 27 \text{ kg/m}^2$ en diversas variables antropométricas y bioquímicas en el grupo de HFC

	IMC<27 kg/m ² (n=22)	IMC≥27 kg/m ² (n=20)
Edad (años)	46,77(9,27)	43,00(8,07)
IMC (kg/m ²)	23,60(2,52)	30,41(2,16)**
Cintura (cm)	84,59(10,41)	101,15(11,19)**
Glucosa (mg/dl)	97,27(12,78)	99,85(11,29)
Insulina (μU/ml)	11,56(5,56)	17,77(8,19)**
HOMA	2,82(1,60)	4,28(1,90)**
CT (mg/dl)	281,31(87,43)	245,85(65,42)
TG (mg/dl)	265,90(299,38)	328,95(259,37)*
cHDL (mg/dl)	43,04(10,66)	38,80(6,43)
cLDL (mg/dl)	188,77(61,92)	154,85(56,12)*
cVLDL (mg/dl)	53,18(59,87)	65,79(51,87)*
Remanentes	0,43(0,49)	0,58(0,48)**
ApoB (mg/dl)	130,72(35,07)	117,40(24,03)

*p<0,05; **p<0,01.

En la tabla 14 se resumen los datos de oxidación resultantes de esta subdivisión en el grupo de HFC.

Tabla 14.- Efecto del IMC ≥ 27 kg/m² en diversos parámetros de oxidación en el grupo de HFC

	IMC<27 kg/m ² (n=22)	IMC \geq 27 kg/m ² (n=20)
8-oxo-dG (8-oxo-dG/10 ⁶ dG)	5,51(1,19)	5,51(0,92)
GSH (nmol/mg proteína)	18,60(3,33)	19,26(3,52)
GSSG (nmol/mg proteína)	0,32(0,11)	0,30(0,09)
GSSG/GSH (GSSG/GSH %)	1,78(0,63)	1,68(0,67)
SOD (U/mg proteína)	5,56(3,83)	6,12(4,33)
CAT (U/g proteína)	171,03(62,53)	172,68(43,82)
GPX (U/g proteína)	49,72(3,47)	53,32(6,44)*

*p<0,05.

En la tabla 15 se resumen los datos de inflamación resultantes de esta subdivisión en el grupo de HFC.

Tabla 15.- Efecto del IMC ≥ 27 kg/m² en diversos parámetros de inflamación en el grupo de HFC

	IMC<27 kg/m ² (n=22)	IMC \geq 27 kg/m ² (n=20)
NF- κ β (unidades relativas de luminiscencia)	79,00(11,33)	98,55(54,96)
Adiponectina (μg/ml)	30,14(13,89)	14,33(7,50)**
IL-1 (pg/ml)	424,93(352,36)	281,88(261,74)
IL-6 (pg/ml)	71,58(10,29)	69,33(14,27)
PCRas (mg/l)	1,08(1,19)	2,46(1,83)**

*p<0,05; **p<0,01.

1.10 Análisis del efecto de obesidad en el grupo de controles

Este mismo análisis, en función del IMC, se realizó en el grupo control, sin evidenciar diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de inflamación y oxidación.

1.11 Análisis del efecto de la insulinoresistencia en el grupo completo

Para estudiar el efecto de la insulinoresistencia en los parámetros bioquímicos y en los parámetros de oxidación e inflamación, hemos dividido el grupo completo

(controles y HFC) en otros 2 subgrupos en función del percentil 75 del índice HOMA (HOMA75) de nuestra población. Como se ha comentado previamente, Ascaso et al^{117,118} han demostrado que este valor del índice HOMA, define la situación de insulinoresistencia en la Comunidad Valenciana. Los datos resultantes de esta subdivisión en cuanto a edad, peso, IMC, cintura, glucosa, insulina, HOMA, CT, TG, cHDL, cLDL y apoB, se resumen en la tabla 16.

Tabla 16.- Efecto del HOMA75 en diversas variables antropométricas y bioquímicas en el grupo completo

	HOMA<HOMA75 (n=37)	HOMA≥HOMA75 (n=29)
Edad (años)	41,69(11,92)	43,27(11,16)
Peso (kg)	73,00(14,45)	78,54(16,59)
IMC (kg/m ²)	26,32(4,20)	27,82(4,24)
Cintura (cm)	85,86(13,07)	96,03(10,28)**
Glucosa (mg/dl)	91,70(9,60)	99,79(11,13)**
Insulina (μU/ml)	6,71(2,18)	18,78(6,15)**
HOMA	1,51(0,54)	4,55(1,50)**
CT (mg/dl)	217,64(60,29)	259,13(87,29)*
TG (mg/dl)	134,51(98,51)	339,48(316,49)**
cHDL (mg/dl)	46,16(9,35)	39,41(7,76)**
cLDL (mg/dl)	146,27(54,58)	161,89(59,67)
Apo B (mg/dl)	102,78(31,94)	119,44(31,09)*

*p<0,05; **p<0,01.

Los datos resultantes de esta subdivisión en cuanto a parámetros de oxidación, se resumen en la tabla 17.

Tabla 17.- Efecto del HOMA75 en diversos parámetros de oxidación en el grupo completo

	HOMA<HOMA75 (n=37)	HOMA≥HOMA75 (n=29)
8-oxo-dG (8-oxo-dG/10 ⁶ dG)	4,76(1,14)	5,67(1,01)**
MDA (U/g proteína)	0,22(0,09)	0,25(0,09)
GSH (nmol/mg proteína)	21,68(4,22)	18,33(3,13)**
GSSG (nmol/mg proteína)	0,27(0,11)	0,33(0,10)
GSSG/GSH (GSSG/GSH %)	1,37(0,71)	1,86(0,69)**
SOD (U/mg proteína)	6,38(3,58)	5,35(3,88)
CAT (U/g proteína)	191,07(54,67)	164,91(48,81)*
GPX (U/g proteína)	54,69(7,49)	51,40(5,49)*

*p<0,05; **p<0,01.

Los datos resultantes de esta subdivisión en cuanto a parámetros de inflamación, se resumen en la tabla 18.

Tabla 18.- Efecto del HOMA75 en diversos parámetros de inflamación en el grupo completo

	HOMA<HOMA75 (n=37)	HOMA≥HOMA75 (n=29)
NF-κβ (unidades relativas de luminiscencia)	50,56(22,66)	88,10(58,24)**
Adiponectina (μg/ml)	29,73(14,72)	19,40(13,18)**
IL-1 (pg/ml)	327,51(281,79)	407,91(347,70)
IL-6 (pg/ml)	64,98(12,80)	68,05(14,35)
PCRas (mg/l)	1,08(1,15)	2,20(1,78)**

*p<0,05; **p<0,01.

En las siguientes figuras (28 a 32) están representados los marcadores de inflamación en función del HOMA en el grupo completo. Se observan diferencias significativas en NF-κβ, adiponectina y PCRas.

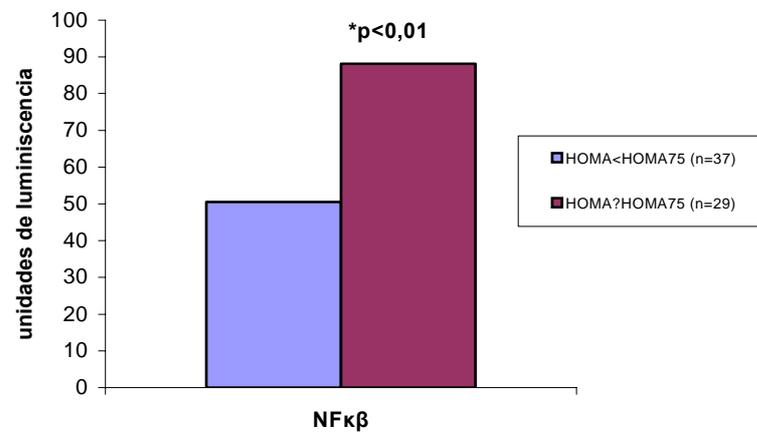
Figura 28. NF- κ β 

Figura 29. Adiponectina

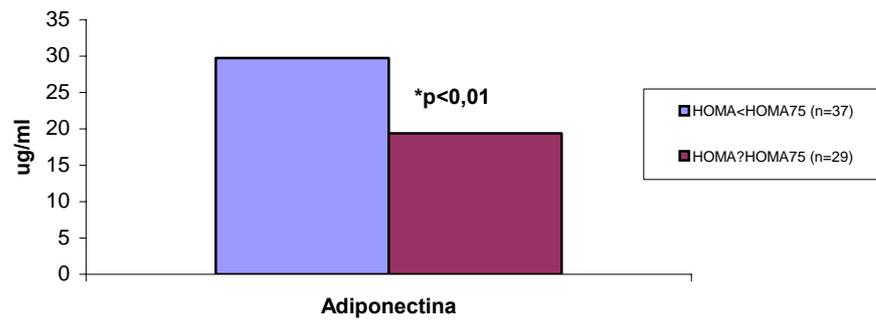


Figura 30. IL-1

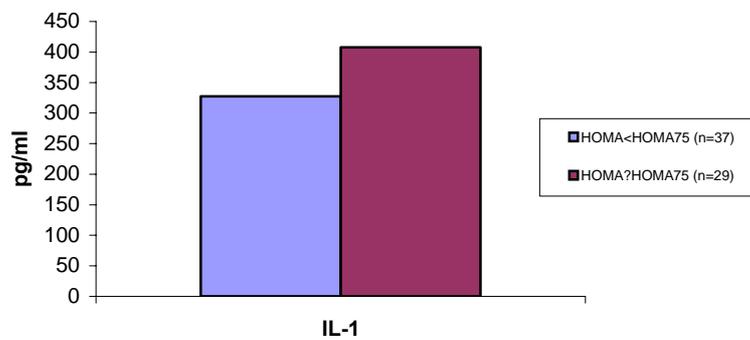


Figura 31. IL-6

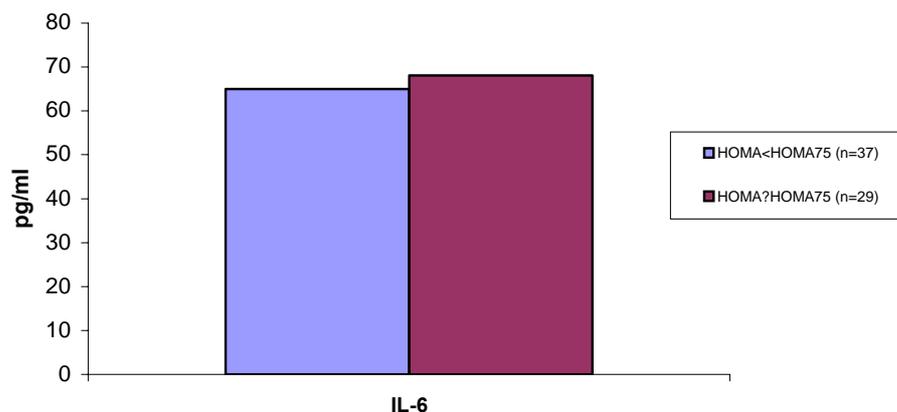
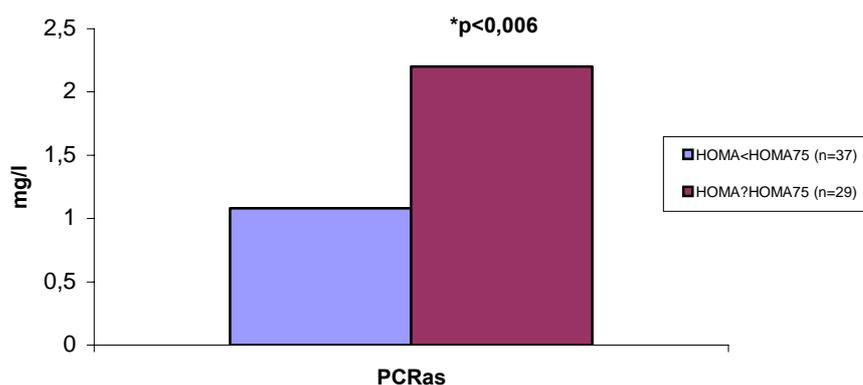


Figura 32. PCRas



En el subgrupo de HFC existen diferencias estadísticamente significativas (test de Mann Whitney) en insulina ($p < 0,001$), HOMA ($p < 0,001$), TG ($p 0,02$), cHDL ($p 0,031$), cVLDL ($p 0,02$), remanentes ($p 0,02$) y PCRas ($p 0,023$).

En el subgrupo de controles no se ha realizado porque sólo 3 sujetos cumplen criterios de RI

1.12 Estudio multivariante de los factores que predicen el HOMA en el grupo completo

En las tablas que se exponen a continuación evaluamos que variables predicen el HOMA. Para ello, hemos seleccionado dentro de los parámetros, aquellos que a priori podrían predecir el HOMA. Dentro de los parámetros antropométricos, hemos seleccionado el perímetro de la cintura y el IMC; de entre los bioquímicos, cHDL y

remanentes; de entre los parámetros de oxidación, 8-oxo-dG, GSH y GSSG; y de entre los inflamatorios, NF- κ β , adiponectina y PCRas.

En la tabla 18 se estudia la relación entre el HOMA y los parámetros clásicos de RI. La cintura y los remanentes predicen el HOMA, mientras que IMC y HDL no lo predicen.

Tabla 18. Estudio multivariante de los parámetros clásicos que predicen el HOMA en el grupo completo

	Coefficiente estandarizado β	Significación
Remanentes	0,314	0,002
Cintura (cm)	0,359	0,004
IMC (kg/m ²)	0,081	0,474
cHDL (mg/dl)	-0,056	0,595

Variable dependiente: HOMA.

En la tabla 19 se estudia la relación entre el HOMA y los parámetros de oxidación a priori relacionados con éste. Únicamente 8-oxo-dG predice el HOMA.

Tabla 19. Estudio multivariante de los parámetros de oxidación que predicen el HOMA en el grupo completo

	Coefficiente estandarizado β	Significación
8-oxo-dG (8-oxo-dG/10 ⁶ dG)	0,381	0,009
GSSG (nmol/mg proteína)	-0,090	0,421
GSH (nmol/mg proteína)	0,026	0,857

Variable dependiente: HOMA.

En la tabla 20 se estudia la relación entre el HOMA (variable dependiente) y los parámetros de inflamación a priori relacionados con éste. Únicamente NF- κ β predice el HOMA.

Tabla 20. Estudio multivariante de los parámetros que predicen el HOMA en el grupo completo

	Coefficiente estandarizado β	Significación
NF- $\kappa\beta$ (unidades relativas de luminiscencia)	0,430	0,008
Adiponectina ($\mu\text{g/ml}$)	-0,098	0,488
PCRas (mg/l)	0,085	0,579

Variable dependiente: HOMA.

En la tabla 21 se estudia la relación entre cintura y parámetros de oxidación y de inflamación, previamente predictores por separado (análisis univariante), y el HOMA, como variable dependiente. En este caso, únicamente predicen la cintura y NF- $\kappa\beta$, pero no 8-oxo-dG.

Tabla 21. Estudio multivariante de cintura y parámetros de oxidación y de inflamación que predicen el HOMA en el grupo completo

	Coefficiente estandarizado β	Significación
Cintura (cm)	0,476	0,000
NF- $\kappa\beta$ (unidades relativas de luminiscencia)	0,364	0,004
8-oxo-dG (8-oxo-dG/ 10^6 dG)	0,077	0,528

Variable dependiente: HOMA.

1.13 Estudio multivariante de los factores que predicen el grado de oxidación (8-oxo-dG) y de inflamación en el grupo completo

En la tabla 22 se estudia la relación entre el 8-oxo-dG, elegido como marcador de oxidación (variable dependiente), y el HOMA, cHDL, GSSG e IL-6.

Tabla 22. Estudio multivariante del HOMA, cHDL y parámetros de inflamación y oxidación en el grupo completo

	Coefficiente estandarizado β	Significación
GSSG (nmol/mg proteína)	3,001	0,011
HOMA	0,189	0,031
cHDL (mg/dl)	0,029	0,074
IL-6 (pg/ml)	17,852	0,077

Variable dependiente: 8-oxo-dG.

En la tabla 23 se estudia la relación entre (variable dependiente), elegido como marcador de inflamación, y el HOMA, remanentes y PCRas.

Tabla 23 Estudio multivariante del HOMA y parámetros de oxidación y de inflamación que predicen NF- $\kappa\beta$ en el grupo completo

	Coefficiente estandarizado β	Significación
Remanentes	69,229	0,012
HOMA	8,758	0,028
PCRas (mg/l)	7,306	0,067

Variable dependiente: NF- $\kappa\beta$.

En la tabla 24 se estudia la relación entre los remanentes (como variable dependiente) y el HOMA, NF- $\kappa\beta$ y PCRas.

Tabla 24. Estudio multivariante de parámetros predictores de remanentes en el grupo completo

	Coefficiente estandarizado β	Significación
NF- $\kappa\beta$ (unidades relativas de luminiscencia)	0,003	0,012
PCRas (mg/l)	0,001	0,675
HOMA	0,002	0,917

Variable dependiente: remanentes.

V. Discusión

La HFC es la dislipemia familiar más frecuente y conlleva un alto riesgo de AE precoz. En el presente trabajo se estudia la presencia de oxidación e inflamación en sujetos sanos y con HFC.

En la actualidad, no disponemos de resultados en sujetos con HFC con respecto a parámetros de oxidación ni de inflamación. En el caso de la adiponectina, sí se conoce que está disminuida en sujetos con HFC¹²².

En nuestro trabajo de investigación, mediante la determinación de los distintos parámetros previamente comentados, hemos podido conocer, estudiar y evaluar la presencia de inflamación y oxidación en un importante grupo de controles y pacientes, aunque faltan estudios prospectivos y de intervención para evaluar si este aumento de inflamación y oxidación se relaciona realmente con mayor riesgo cardiovascular, desarrollo de diabetes tipo 2, y si la intervención con distintos fármacos, disminuye los niveles de inflamación y EO, y esto se correlaciona con descenso del riesgo cardiovascular.

1. Nivel de estrés oxidativo y factores de inflamación relacionados con la arteriosclerosis en sujetos con HFC y controles

La HFC es la dislipemia primaria más frecuente y, como ya hemos comentado, conlleva un alto riesgo de AE precoz. Existen múltiples trabajos que demuestran la mayor prevalencia de enfermedad cardiovascular en pacientes con HFC, que se correlaciona con la presencia de AE. De hecho, las primeras descripciones de la enfermedad, fueron en sujetos que habían presentado episodios de cardiopatía isquémica precoz³⁻⁶.

La AE es una enfermedad caracterizada por la presencia de inflamación y oxidación. Actualmente existen múltiples evidencias que sugieren que la inflamación juega un papel muy importante en el desarrollo y progresión de la enfermedad coronaria (AE)⁹⁹ ya que es esencial en la cascada de procesos desde la formación de la placa de ateroma, en respuesta al daño vascular, hasta la subsecuente ruptura de la misma, y aparición del IAM⁹⁴.

El EO también está involucrado de forma importante en la patogenia de la disfunción endotelial y en el desarrollo y progresión de AE en todas las fases de la enfermedad¹²². Múltiples enzimas expresados en el tejido vascular contribuyen a la producción y degradación de ROS, y el aumento de la actividad de enzimas

oxidantes junto con la reducción de la actividad de enzimas antioxidantes puede causar EO. Además, la inflamación se asocia con incremento de EO, y éste, a su vez, con aumento de inflamación, perpetuándose así un círculo vicioso.

En nuestro estudio hemos encontrado aumento de los parámetros de inflamación y oxidación. Los procesos de inflamación y oxidación se relacionan con AE, y por tanto, debe de ser a través de ellos por los que se produce enfermedad cardiovascular. Sin embargo, no existen estudios al respecto que relacionen HFC con oxidación e inflamación, si bien, sí existen múltiples modelos de inflamación y oxidación que se relacionan con cardiopatía isquémica.

En nuestro estudio, los sujetos con HFC presentan en condiciones de ayuno y sin tratamiento hipolipemiante, frente a controles, un aumento de los productos de oxidación molecular (8-oxo-dG, MDA, GSSG y cociente GSSG/GSH), y un descenso de los sistemas antioxidantes (GSH, SOD, CAT y GPX), tal y como vemos en la tabla 3 y en las figuras 10 a 17.

Aunque no hay datos en HFC, sí existen datos de numerosos estudios que subrayan la importancia de la disregulación oxidación/antioxidación para el desarrollo y progresión de enfermedad AE en modelos animales y humanos. Algunos estudios han demostrado que un incremento en la actividad de la enzima NAD(P)H oxidasa a nivel vascular, se relacionaba con AE en animales y en humanos. Además, en pacientes con enfermedad arterial coronaria se ha encontrado, tanto a nivel plasmático, como a nivel coronario, aumento de la actividad enzimática de NAD(P)H oxidasa y de XO, junto con un descenso de la actividad de SOD¹²³⁻¹²⁵. También, la presencia de bajos niveles de actividad de GPX y niveles elevados de mieloperoxidasa, han demostrado ser un factor de riesgo independiente para episodios cardiovasculares en pacientes con cardiopatía isquémica previa¹²⁶. Asimismo, un descenso de la concentración de GSH se ha asociado con enfermedad cardiovascular, y se ha encontrado MDA en las placas de ateroma de sujetos con diabetes⁸⁹. Además, 8-oxo-dGTPasa se encontró enormemente elevado en miocitos cardíacos en un modelo en ratones con insuficiencia cardíaca post IAM tras ligadura de la arteria coronaria izquierda, sugiriendo que este sistema enzimático puede ser activado en respuesta a incrementos de EO para prevenir daño oxidativo del ADN⁸⁷. Por último, en un estudio prospectivo a 10 años en hombres diabéticos, se asoció la presencia de enfermedad coronaria con incremento de los marcadores de EO¹²⁷.

Tomados juntos los resultados de numerosos estudios se llega a la conclusión que la modulación de enzimas oxidantes y antioxidantes, que conducen a EO, juegan un importante papel en la patogenia de la enfermedad ateromatosa.

En nuestro estudio, también hemos encontrado que los sujetos con HFC presentan en condiciones basales frente a controles un aumento de los niveles de marcadores inflamatorios junto con un descenso de los marcadores antiinflamatorios.

En sujetos con HFC existe aumento de PCRas. Ésta es un marcador inflamatorio que actúa como reactante de fase aguda. Diversos estudios han mostrado que sus niveles están elevados en pacientes con síndrome coronario agudo⁹⁴ y que dichos niveles predicen e incrementan el riesgo de recurrencia entre pacientes estables con historia previa de IAM⁹⁹. Numerosos estudios prospectivos en diferentes poblaciones, han mostrado que la presencia de niveles elevados de PCR también se asocian con incremento de riesgo de episodios cardiovasculares en personas aparentemente sanas^{94,99,128}.

También hemos observado que en la HFC existe aumento de IL-6. Éste es un marcador de inflamación que media la respuesta de fase aguda, estimula la agregación plaquetaria, regula la expresión de otras citoquinas inflamatorias, tales como IL-1, TNF y PCR⁹⁹, y está presente en las placas de ateroma de las arterias coronarias. Además, la administración de IL-6 exógena en concentraciones suprafisiológicas en ratones apo e -/- exacerbó de forma considerable la formación de lesiones arterioscleróticas¹⁰². Por último, Maier et al¹²⁹ han encontrado en humanos un aumento de los niveles de IL-6 a nivel coronario en el lugar de la ruptura de la placa.

También hemos demostrado que los niveles de adiponectina están significativamente disminuidos en sujetos con HFC. Esta citoquina parece ser un modulador del metabolismo lipídico y de la inflamación sistémica. Tanto en modelos experimentales de daño vascular como en el proceso arteriosclerótico, la adiponectina parece jugar un papel protector, ya que in vitro ejerce efectos antiarterioscleróticos en células endoteliales, macrófagos y células musculares lisas de aorta. La adiponectina también está presente en bajas concentraciones en pacientes con enfermedad coronaria. En nuestro estudio, la adiponectina se asoció con cHDL y con indicadores de RI (glucosa, HOMA y cintura), pero no lo hizo, al menos de forma significativa, con marcadores de inflamación sistémica (NF- κ B, IL-

6 y PCRas). Estos resultados son similares a los encontrados por von Eynatten et al¹³⁰, al estudiar 1174 sujetos con antecedentes de cardiopatía isquémica, llegando a la conclusión, que el descenso de adiponectina se relaciona con la progresión de la AE.

En el único estudio existente en sujetos con HFC, los niveles de adiponectina se encontraron significativamente disminuidos, y dichos niveles fueron predictores independientes del perfil lipídico aterogénico, incluyendo hipertrigliceridemia, descenso de cHDL y LDL pequeñas y densas en HFC¹²².

También hemos observado aumento de NFκβ. Este factor de transcripción ejerce un papel central en la regulación de la inflamación sistémica y del EO, y se ha relacionado con enfermedad cardiovascular. NF-κβ se ha encontrado en placas de ateroma de humanos, y participa en todas las fases de la arteriosclerosis⁶².

Por tanto, aunque no existen estudios en HFC (excepto adiponectina), si tenemos en cuenta los datos existentes en la literatura, dado que inflamación y oxidación se asocian con el inicio y progresión de AE y que dichos marcadores se expresan de forma abundante en lesiones arterioscleróticas, y la AE se asocia con enfermedad cardiovascular, sugerimos, en base a nuestros resultados, que la mayor prevalencia de cardiopatía isquémica presente en sujetos con HFC, se relacionaría con el aumento de los sistemas oxidantes y de los marcadores de inflamación, junto con un descenso de los sistemas antioxidantes y de adiponectina, que hemos observado, y que inducirían la formación de placas de ateroma.

2. Relación entre parámetros antropométricos y grado de RI con el EO y la inflamación en sujetos con HFC y controles

En nuestro estudio, los sujetos con HFC presentan, con respecto a sujetos controles, mayor perímetro de cintura, y mayores cifras de CT, TG, cLDL, cVLDL, remanentes y apoB, de glucosa e insulina, y por tanto del HOMA, y menores cifras de cHDL, es decir, presentan una dislipemia mixta con RI. Presentan además un aumento de los marcadores de inflamación y oxidación, tal como hemos comentado previamente. Dado que todos estos parámetros no se modifican al corregir por la cintura, podemos considerar a la HFC como un modelo genético de dislipemia primaria con RI, y activación inflamatoria y oxidativa.

Si bien no existen muchos datos en HFC, sí se ha demostrado tanto en modelos animales como en modelos humanos (DM2, obesidad, SM) que la RI se relaciona con procesos de inflamación y oxidación, aunque no está claro qué es causa y qué es efecto. Se ha sugerido, que la inflamación crónica y el EO representan los factores desencadenantes en el origen de la RI¹²⁸, y que este descenso en la sensibilidad a la insulina en órganos tales como músculo esquelético, tejido adiposo e hígado conlleva un incremento de la actividad inflamatoria, que a su vez lleva a una reducción de la sensibilidad a la insulina, cerrándose así un círculo vicioso¹³¹.

En diversos estudios, se ha encontrado una fuerte asociación entre marcadores inflamatorios y descenso de la sensibilidad a la insulina¹²⁸. En estudios *in vitro* y en modelos animales, los antioxidantes han mostrado mejorar la SI. Además, se ha demostrado que la RI se asocia en humanos con descenso de la defensa antioxidante intracelular⁵⁵.

NF- κ B también ha sido relacionada con RI. Recientemente, en un modelo de animal transgénico con ausencia de IKK β , que, como ya se ha comentado, es el regulador principal y central de la respuesta inflamatoria por activación de NF- κ B, se ha demostrado la relación de estos factores con la RI¹⁰⁷. Además, en otro modelo de ratón transgénico con expresión selectiva de IKK β en hepatocitos, se ha observado que existe relación entre activación hepática de NF- κ B y cascada inflamatoria (citoquinas como TNF α , IL-1 e IL-6) con el desarrollo de RI y diabetes. Similares resultados se obtuvieron en animales no transgénicos alimentados con una dieta rica en grasa¹⁰⁸. En estos modelos la RI mejoró con la neutralización de IL-6 o con la inhibición de IKK β .

Además, se ha demostrado que la insulina suprime múltiples factores de transcripción proinflamatorios como Egr-1, Egr-2, PAI-1 y NF- κ B, y mediadores inflamatorios, como PCR, IL-1B, IL-6, MIF (factor inhibidor de la migración de macrófagos) y TNF α . También aumenta IKK β y suprime la génesis de ROS¹³². Por tanto, la insulina tiene efecto antiinflamatorio y efecto antioxidante, y en todas aquellas situaciones que conlleven un “uso inadecuado” de la misma, debe existir aumento de los procesos de inflamación y oxidación.

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

La obesidad también se asocia con el desarrollo de RI, un hallazgo presente en la diabetes tipo 2 y en el SM. De hecho, se piensa que el SM es consecuencia de la obesidad y la resistencia a la insulina asociada a ella. Actualmente se considera que la obesidad es un estado proinflamatorio. Hotamisligil et al¹³³, en un modelo animal, demostraron que TNF α era expresado por el tejido adiposo, y que en la obesidad estaba hiperexpresado, y mediaba RI. En este estudio también se observó que la neutralización de TNF α resultó en un restablecimiento de la sensibilidad a la insulina.

Existen también datos que refuerzan el concepto que la obesidad es un estado inflamatorio en humanos ya que las concentraciones plasmáticas de TNF α , IL-6, PCR, MIF y otros mediadores de inflamación están incrementados^{132,134}.

Se ha demostrado que el tejido adiposo expresa muchos de estos mediadores proinflamatorios. Además, se ha demostrado que los macrófagos que residen en el tejido adiposo pueden ser también una fuente de factores proinflamatorios y pueden modular la actividad secretora de los adipocitos¹³². Recientemente se ha observado que las células mononucleares de los obesos, se encuentran en un estado proinflamatorio, expresando cantidades elevadas de citoquinas proinflamatorias y factores relacionados. Además, estas células han mostrado presentar un incremento significativo de NF- κ B, el factor de transcripción proinflamatorio clave, y un incremento en la expresión intranuclear de p65, la principal componente de NF- κ B. Estas células también expresan cantidades disminuidas de IKK β , el inhibidor de NF- κ B. Por tanto, la existencia de inflamación es evidente en diversas células y en el plasma en los estados de obesidad. Por tanto, la obesidad supone un estado proinflamatorio^{106,132}.

Pero en el tejido adiposo se producen otras dos importantes proteínas, leptina y adiponectina. La leptina, además de su papel como señal de saciedad, es proinflamatoria y proagregante plaquetario y el aumento de sus concentraciones puede contribuir al estado proinflamatorio de la obesidad y a la aterogénesis a largo plazo. La adiponectina, secretada de forma abundante en sujetos normales, es antiinflamatoria y potencialmente antiaterogénica. Al contrario que la leptina, su concentración disminuye con la ganancia de peso y la obesidad¹³⁵, y conduce a un estímulo de NF- κ B, con lo cual se genera un aumento de citoquinas y moléculas de adhesión, e incrementa el EO, que conducen a la síntesis de LDL oxidadas, dislipemia, intolerancia a la glucosa, así como disfunción endotelial y aterogénesis,

todas ellas, situaciones que se asocian estrechamente con manifestaciones del SM, como son la RI y la DM2, y que conducen de nuevo a la hipótesis, que la RI inducida por la obesidad es una condición inflamatoria¹⁰⁷.

En nuestro estudio hemos encontrado, como ya hemos comentado, la presencia de mayor RI (medida por HOMA) en HFC que en sujetos controles, junto con aumento de los marcadores de oxidación e inflamación, y descenso de sistemas antioxidantes y adiponectina, que serían, causa, pero a la vez consecuencia de la situación de RI. Hemos encontrado además aumento de la glucemia basal en sujetos con HFC de forma significativa, que se mantiene al corregir por edad, sexo y perímetro de la cintura. Debe de estar en relación con la situación de RI, y probablemente haría a estos pacientes más susceptibles de desarrollar DM2 (en la que existe RI y disfunción de la célula β).

El mecanismo por el cual se llega a esta situación de RI es el incremento en las concentraciones de AGL. El papel de éstos es importante, hasta el punto, que un incremento en los niveles de AGL en sujetos normales hasta alcanzar niveles comparables a los de los obesos, también resulta en la inducción de EO, inflamación, reactividad vascular anormal, y en último término, RI. Muchos estudios sugieren que la disfunción de la célula β es consecuencia de una exposición prolongada a glucemias elevadas, niveles de AGL elevados, o una combinación de ambos⁵⁵. Dado que la RI a su vez no conduce a la supresión de LHS, se produce lipólisis con el consecuente aumento de la concentración de AGL, y entonces se cierra un círculo vicioso de lipólisis, aumento de AGL, RI e inflamación¹³¹. Cuando las células β no son capaces de compensar el estado de RI con un adecuado incremento en la producción de insulina aparece TAG, que puede evolucionar hacia diabetes. Estas alteraciones se han descrito en HFC, y por tanto, se puede hipotetizar, que estos pacientes presentan mayor riesgo de desarrollar DM2.

Estas 3 circunstancias, RI, TAG y DM2, se asocian con un incremento del riesgo CV. Dado que estas 3 se acompañan de la presencia de EO e inflamación, se han propuesto a estos dos como mecanismos patogénicos mediadores de la aparición de RI, así como el paso de RI a TAG, y de ésta a DM⁵⁵. Sin embargo, la DM establecida se cree que está precedida de un largo período de RI, durante el cual la glucosa plasmática se mantiene en niveles cercanos a la normalidad por hiperinsulinemia compensadora. Cuando no es suficiente, aparece TAG, y finalmente DM. Todo ello conduce a aumento de TG y apo B, aumento de LDL

pequeñas densas y descenso de HDL. Dado que estos hallazgos son característicos de la HFC, y de otras entidades como la DM2 y el SM, cabe pensar que estas entidades están relacionadas²³. Estos mismos resultados son los que hemos observado en nuestro estudio (aumento de glucosa y aumento de insulina de forma compensadora), pero serían necesarios estudios prospectivos para evaluar el desarrollo de DM2 en sujetos con HFC.

Para estudiar el efecto de la RI en los parámetros bioquímicos y en los parámetros de oxidación e inflamación, hemos dividido al grupo completo (controles y HFC) en otros 2 subgrupos en función del percentil 75 del índice HOMA de nuestra población, que como Ascaso et al^{117,118} han demostrado, define la situación de RI en la Comunidad Valenciana. Encontramos diferencias significativas en el perfil lipídico (aumento de CT, TG y apo B, y descenso de cHDL) como corresponde a la RI, y diferencias en diversos parámetros de oxidación (aumento de 8-oxo-dG y cociente GSSG/GSH, y descenso de GSH, CAT y GPX) y de inflamación (aumento de NF- κ β y de PCRas, y descenso de adiponectina). Estos datos apoyan la importancia de la RI en la inflamación y oxidación. Sin embargo, cuando realizamos esta subdivisión en el grupo de HFC, no observamos diferencias estadísticamente significativas en los parámetros de oxidación, y únicamente observamos diferencias en el perfil lipídico (como es lógico, dado que la subdivisión se basa en el grado de RI) y en PCRas. Esto demuestra de nuevo, que la HFC es una dislipemia primaria con RI, y que la activación de inflamación y oxidación, es independiente del grado de RI, ya que viene determinado genéticamente.

Cuando realizamos análisis multivariantes, observamos que el HOMA es predecido por el perímetro de la cintura (como es lógico, ya que el HOMA es un indicador de RI, y ésta se relaciona con el perímetro de la cintura) y la inflamación (en concreto por NF- κ β , que es el mediador de la respuesta inflamatoria sistémica), pero no por la oxidación, cuando se intenta esta relación de forma conjunta. Cuando se realiza por separado, tanto los procesos de oxidación como los de inflamación predicen el HOMA. Es decir, la inflamación y la oxidación conducen a RI.

Según los diversos estudios, en la obesidad existe aumento de los fenómenos de inflamación y oxidación, que se relacionan con la RI, y ésta, con el perímetro de la cintura. Al analizar el grupo completo, no encontramos diferencias significativas en el IMC ($27,25 \pm 4,51$ kg/m² en el grupo de controles frente a $27,14 \pm 4,02$ kg/m² al de

HFC), aunque sí existen diferencias significativas en la cintura, que es mayor en los sujetos con HFC ($p=0,043$). Además, en el grupo de HFC existe aumento de la mayoría de parámetros de inflamación y oxidación respecto al grupo control, y aunque este aumento debería estar en relación con el acúmulo de grasa abdominal, al corregir por la cintura, no encontramos diferencias. Por tanto, en los sujetos con HFC, independientemente del perímetro de la cintura, existe un aumento de los procesos inflamatorios y de EO, lo que viene a confirmar de nuevo que se trata de un modelo genético de RI.

Cuando comparamos el nivel de oxidación e inflamación de 2 subgrupos dentro del grupo completo, utilizando como criterio de división el IMC de 27 kg/m^2 , para separar aquellos individuos con sobrepeso leve o moderado, de individuos con sobrepeso grado 2, en los que se asocian generalmente otras condiciones del síndrome de resistencia a la insulina, observamos únicamente diferencias significativas en el caso de PCRas, que está aumentada, y de adiponectina, que está disminuida, ambas relacionadas con el tejido adiposo, y desaparecen el resto de diferencias significativas que observábamos en el grupo completo en los demás parámetros de inflamación y oxidación. Dichos resultados evidencian que el tipo y grado de obesidad no parecen tener mucho efecto en modificar el perfil de estos parámetros.

Cuando el grupo de HFC lo subdividimos utilizando este mismo criterio, únicamente se observan diferencias en los mismos parámetros. Por tanto, confirma de nuevo que el tipo y grado de obesidad no parecen tener mucho efecto en modificar el perfil de inflamación y oxidación, que de por sí ya está alterado en estos sujetos, porque viene determinado genéticamente.

Todo esto apoya una vez más la importancia de una base genética que supone la RI para el desarrollo de inflamación y oxidación, independientemente del efecto de los parámetros antropométricos comentados (IMC y perímetro de cintura). Es por ello, que aunque como hemos visto, la obesidad se asocia con RI y con inflamación y oxidación, en el caso de HFC lo más importante es la predisposición genética, lo que vendría a corroborar la hipótesis emitida por Dandona et al¹³², que refieren que además de la obesidad, debe existir algún factor genético y ambiental que puede inducir la activación de mecanismos inflamatorios y la inducción de EO, y que estos factores genéticos y ambientales, podrían ser relevantes en esos grupos étnicos en los cuales el SM se ha visto que ocurre en ausencia de obesidad.

VI. Conclusiones

Con los resultados obtenidos en nuestro estudio establecemos las siguientes conclusiones:

- 1. La HFC es un modelo genético de dislipemia mixta con RI.**
- 2. En los sujetos con HFC existe elevación de los productos de oxidación y descenso de los sistemas antioxidantes.**
- 3. En los sujetos con HFC existe elevación de la inflamación sistémica.**
- 4. NF- κ B, como factor clave en la regulación de los procesos de inflamación y oxidación, está elevado en sujetos con HFC.**
- 5. Las variables antropométricas (tipo y grado de obesidad) no tienen efecto significativo en la inflamación y oxidación en sujetos con HFC, ni en el grupo completo.**
- 6. La RI se relaciona de forma independiente con parámetros de inflamación y oxidación en sujetos con HFC.**
- 7. La inflamación es el factor predictor independiente de la RI en sujetos con HFC y no el tipo y grado de obesidad ni la dislipemia.**

VII. Bibliografía

1. Marrugat J, Medrano MJ, Tresserras R. La cardiopatía isquémica como causa principal de muerte en España: realidad epidemiológica, necesidades asistenciales y de investigación. *Clin Invest Arterioscl* 2001;13:262-70.
2. Badimón JJ, Badimón L, Fuster V. Fisiopatología de la enfermedad aterotrombótica coronaria. *Clin Invest Arterioscl* 2002;14:258-71.
3. Goldstein JL, Hazzard WR, Schrott G, Bierman EL, Motulsky AG. Hyperlipidemia in coronary heart disease. I. Lipid levels in 500 survivors of myocardial infarction. *J Clin Invest* 1973;52:1533-43.
4. Goldstein JL, Schrott HG, Hazzard WR, Bierman EL, Motulsky HG. Hyperlipidemia in coronary heart disease. II. Genetic analysis of lipid levels in 176 families and delineation of a new inherited disorder, combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1973;52:1544-68.
5. Hazzard WR, Goldstein JL, Schrott HG, Motulsky AG, Bierman EL. Hyperlipidemia in coronary heart disease. III. Evaluation of lipoprotein phenotypes of 156 genetically defined survivors of myocardial infarction. *J Clin Invest* 1973;52:1569-77.
6. Nikkila EA, Aro A. Family study of serum lipids and lipoproteins in coronary heart disease. *Lancet* 1973;1:954-8.
7. Rose HG, Kranz P, Weistek M, Juliano J, Haft JJ. Inheritance of combined hyperlipoproteinemia: evidence for a new lipoprotein phenotype. *Am J Med* 1973;54:148-60.
8. Veerkamp MJ, de Graaf J, Bredie SJH, Hendriks JCM, Demacker PNM, Stalenhoef AFH. Diagnosis of familial combined hyperlipidemia based on lipid phenotype expression in 32 families. Results of a 5-year follow-up study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:274-82.
9. de Graaf J, Veerkamp MJ, Stalenhoef AFH. Metabolic pathogenesis of familial combined hyperlipidaemia with emphasis on insulin resistance, adipose tissue metabolism and free fatty acids. *J R Soc Med* 2002;95:46-53.
10. Bredie SJ, Demacker PNM, Stalenhoef AFH. Metabolic and genetic aspects of familial combined hiperlipidemia with emphasis on low-density lipoprotein heterogeneity. *Eur J Clin Invest* 1997;27:802-11.
11. Ayyobi AF, McGladdery SH, McNeely MJ, Austin MA, Motulsky AG, Brunzell JD. Small, dense LDL and elevated apolipoprotein B are the common characteristics for the three major lipid phenotypes of familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1289-94.
12. Veerkamp MJ, de Graaf J, Hendriks JCM, Demacker PNM, Stalenhoef AFH. Nomogram to diagnose familial combined hyperlipidemia on the basis of results of a 5-year follow-up study. *Circulation*. 2004;109:2980-5.

13. Sniderman AD, Castro Cabezas M, Ribalta J, Carmena R, de Bruin TWA, de Graaf J, Erkelens DW, Humphries SE, Masana L, Real JT, Talmud PJ, Taskinen MR. A proposal to redefine familial combined hyperlipidemia-Third Workshop on FCHL held in Barcelona from 3 to 5 May 2001, during the scientific sessions of the European Society for clinical Investigation. *Eur J Clin Invest* 2002;32:71-3.
14. Austin MA, Wijsman E, Guo SW, Krauss RM, Brunzell JD, Deeb S. Lack of evidence for linkage between low-density lipoprotein subclass phenotypes and the apolipoprotein B locus in familial combined hyperlipidemia. *Genet Epidemiol* 1991;8:287-97.
15. LaBelle M, Austin MA, Rubin E, Krauss RM. Linkage analysis of low density lipoprotein subclass phenotypes and the apolipoprotein B gene. *Genet Epidemiol* 1991;8:269-75.
16. Holzl B, Kraft HG, Wiebusch H, Sandhofer A, Patsch J, Sandhofer F, Paulweber B. Two novel mutations in the lipoprotein lipase gene in a family with marked hypertriglyceridemia in heterozygous carriers. Potential interaction with the polymorphic marker D1S104 on chromosome 1q21-q23. *J Lipid Res* 2000;41:734-41.
17. de Bruin TW, Maily F, van Barlingen HH, Fisher R, Castro Cabezas M, Talmud P, Dallinga-Thie GM, Humphries SE. Lipoprotein lipase gene mutations D9N and N291S in four pedigrees with familial combined hyperlipidaemia. *Eur J Clin Invest* 1996;26:631-9.
18. Pajukanta P, Bodnar JC, Sallinen R, Chu M, Airakasinen T, Xiaro Q. Fine mapping of Hyperlip 1 and the human homolog, a potential locus for FCHL. *Mamm Genome* 2001;12:238-95.
19. Schaffler A, Orso E, Palitzsch KD, Buchler C, Drobnik W, Furst A, Scholmerich J, Schmitz G. The human apM-1, an adipocyte-specific gene linked to the family of TNF's and to genes expressed in activated T cells, is mapped to chromosome 1q21.3-q23, a susceptibility locus identified for familial combined hyperlipidaemia (FCH). *Biochem Biophys Res Commun* 1999;260:416-25.
20. Wojciechowski AP, Farall M, Cullen P, Wilson TME, Bayllis JD, Farren B, Griffin BA, Caslake MJ, Packard CJ, Shepherd J, Thakker R, Scott J. Familial combined hyperlipidemia linked to the apolipoprotein AI-CII-AIV gene cluster on chromosome 11q23-q24. *Nature* 1991;349:161-4.
21. Aouizerat BE, Allayee H, Bodnar J, Krass KL, Peltonen L, De Bruin TW, Rotter JJ, Lusis AJ. Novel genes for familial combined hyperlipidemia. *Curr Opin Lipidol.* 1999;10:113-22.
22. Ribalta J, Castro-Cabezas M, Plana N, Masana L. Visión actualizada de la hiperlipidemia familiar combinada aplicada a la mejora de su diagnóstico. *Clin Invest Arterioscl* 2005;17:34-47.

23. Veerkamp MJ, De Graaf J, Stalenhoef AFH. Role of insulin resistance in familial combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1026-31.
24. Babirak SP, Iverius P, Fujimoto, Brunzell JD. Detection and characterization of the heterozygotic state for lipoprotein lipase deficiency. *Arteriosclerosis* 1989;9:326-34.
25. Babirak SP, Brown BG, Brunzell JD. Familial combined hyperlipidemia and abnormal lipoprotein lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1992;12:1176-83.
26. Reynisdottir S, Eriksson M, Angelin B, Arner P. Impaired activation of adipocyte lipolysis in familial combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1995;95:2161-9.
27. Ylitalo K, Large V, Pajukanta P, Reynisdottir S, Porkka KV, Vakkilainen J, Nuotio I, Taskinen MR, Arner P. Reduced hormone-sensitive lipase activity is not a major metabolic defect in Finnish FCHL families. *Atherosclerosis* 2000;153:373-81.
28. Meijssen S, Derksen RJ, Bilecen S, Erkelens DW, Castro Cabezas M. In vivo modulation of plasma free fatty acids in patients with familial combined hyperlipidemia using lipid-lowering medication. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1576-80.
29. Sniderman AD, Cianflone P, Arner P, Summers LKM, Frayn KN. The adipocyte, fatty acid trapping, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1998;18:147-51.
30. Ascaso JF, Sales J, Merchante A, Real J, Lorente R, Martínez-Valls J, Carmena R. Influence of obesity on plasma lipoproteins, glycaemia and insulinaemia in patients with familial combined hyperlipidemia. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997;108:530-3.
31. Jacobson MS, Yoon DJ, Frank GR. Serum leptin is elevated out of proportion to the body mass index in adolescent females with familial combined hyperlipidemia. *Clin Pediatr* 1999;38:49-53.
32. Watts GF. Postprandial lipaemia in familial hypercholesterolaemia: clinical and metabolic significance. *Atherosclerosis* 2000;148:426-8.
33. Anderson RA, Evans ML, Ellis GR, Graham J, Morris K, Jackson SK, Lewis MJ, Rees A, Frenneaux MP. The relationships between post-prandial lipaemia, endothelial function and oxidative stress in healthy individuals and patients with type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2001;154:475-83.
34. Castro Cabezas M. Postprandial lipaemia in familial combined hyperlipidaemia. *Biochemical Society Transactions* 2003;31:1090-3.

-
35. van Wijk JPH, Buirma R, van Tol A, Halkes CJM, De Jaegere PPTH, Plokker HWM, van der Helm YJM, Castro Cabezas M. Effects of increasing doses of simvastatin on fasting lipoprotein subfractions, and the effect of high-dose simvastatin on postprandial chylomicron remnant clearance in normotriglyceridemic patients with premature coronary sclerosis. *Atherosclerosis* 2005;178:147-55.
36. Zilversmit DB. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation* 1979;60:473-85.
37. Castro Cabezas M, de Bruin TWA, de Valk HW, Shoulders CC, Jansen H, Erkelens EW. Impaired fatty acid metabolism in familial combined hyperlipidemia: A mechanism associating hepatic apolipoprotein B overproduction and insulin resistance. *J Clin Invest* 1993;92:160-8.
38. van Oostrom AJ, Sijmonsma TP, Verseyden C, Jansen EH, de Konin EJ, Rabelink TJ, Castro Cabezas M. Postprandial recruitment of neutrophils may contribute to endothelial dysfunction. *J Lipid Res* 2003;44(3):576-83
39. Bartual A, González C, Martínez-Hervás S, Real JT, Chaves FJ, Priego MA, Ascaso JF, Carmena R. Perfil diurno de triglicéridos en sujetos con hiperlipidemia familiar combinada de una población del sur de Europa. *Clin Invest Arterioscl* 2005;17:10-5.
40. Castro-Cabezas M, Halkes CJM, Meijssen S, van Oostrom AJHHM, Erkelens DW. Diurnal triglyceride profiles: a novel approach to study triglyceride changes. *Atherosclerosis* 2001;155:219-28.
41. Oostrom AJHHM, Castro Cabezas M, Ribalta J, Masana L, Twickler TB, Remijnse TA, Erkelens DW. Diurnal triglyceride profiles in healthy normolipidemic male subjects associated to insulin sensitivity, body composition and diet. *Eur J Clin Invest* 2000;30:964-71.
42. Ascaso JF, Merchante A, Lorente RI, Real JT, Martínez-Valls J, Carmena R. A study of insulin resistance using the minimal model in nondiabetic familial combined hyperlipidemic patients. *Metabolism* 1998;47:508-13.
43. Priego MA, Civera M, Real JT, Martínez-Valls J, Ascaso JF, Carmena R. Obesidad abdominal e índice de resistencia a la insulina en la hiperlipidemia familiar combinada. *Clin Invest Arterioscl* 1999;11:291-6.
44. Ascaso JF, Real JT, Merchante A, Rodrigo A, Carmena R. Lipoprotein phenotype in familial combined hiperlypidemia. *Metabolism* 2000;49:1627-31.
45. Ascaso JF, Lorente R, Merchante A, Real JT, Priego A, Carmena R. Insulin resistance in patients with familial combined hiperlypidemia and coronary heart disease. *Am J Cardiol* 1997;80:1484-7.

46. Halkes CJ, van Wijk JP, Ribalta J, Masana L, Castro Cabezas M. Diurnal triglyceridaemia and insulin resistance in mildly obese subjects with normal fasting plasma lipids. *J Intern Med* 2004;255:74-81.
47. Halkes CJ, Castro Cabezas M, Van Wijk JP, Erkelens DW. Gender differences in diurnal triglyceridemia in lean and overweight subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:1767-74.
48. Nourooz-Zadeh J, Smith CC, Betteridge DJ. Measures of oxidative stress in heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*. 2001;156:435-41.
49. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
50. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:29-38.
51. Napoli C, de Nigris F, Palinski W. Multiple role of ROS in the arterial wall. *J Cell Biochem*. 2001;82:674-82.
52. Lander HM An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J*. 1997;11:118-24.
53. Maher P, Schubert D. Signalling by reactive oxygen species in the nervous system. *Cell Mol Life Sci* 2000;50:686-9.
54. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-95.
55. Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:816-23.
56. Mueller CFH, Laude K, McNally JS, Harrison DG. Redox mechanisms in blood vessel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:274-8.
57. Stocker R, Keaney JF. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004;84:1381-478.
58. Kunsch C, Medford R. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res* 1999;85:753-66.
59. Wolin MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1430-42.
60. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. The role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;87:840-4.
61. Mercurio F, Manning AM. NF- κ B as a primary regulator of the stress response. *Oncogene*. 1999;18:6163-71.

-
62. de Winther M, Kanters E, Kraal G, Hofker MH. Nuclear factor κ B signaling in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:904-14.
63. Hayden M, Ghosh S. Signaling to NF- κ B. *Genes & Development* 2004;18:2195-224.
64. Luo J-L, Kamata H, Karin M. IKK/NF- κ B signaling: balancing life and death-a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest* 2005;115:2625-32.
65. Kempe S, Kestler H, Lasar A, Wirth T. NF- κ B controls the global proinflammatory response in endothelial cells: evidence for the regulation of a pro-atherogenic program. *Nucleic Acids Research* 2005;33:5308-19.
66. Schulze-Osthoff K, Los M, Bauerle PA. Redox signalling by transcription factors NF- κ B and AP-1 in lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 1995;50:735-41.
67. Gius D, Botero A, Shah S, Curry HA. Intracellular oxidation/reduction status in the regulation of transcription factors NF- κ B and AP-1. *Toxicol Lett* 1999;106:93-106.
68. Maziere C, Conte MA, Degonville J, Ali D, Maziere JC. Cellular enrichment with polyunsaturated fatty acid induces an oxidative stress and activates de transcription factors AP-1 and NF- κ B. *Biochem Biophys Res Com* 1999;265:116-22.
69. Marshall HE, Merchant K, Stamler JS. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *FASEB J* 2000;14:1889-900.
70. Jaiswal AK. Regulation of genes encoding NAD(P)H: quinone oxidoreductases. *Free Radic Biol Med* 2000;29:254-62.
71. Zhu CH, Huang Y, Oberley LW, Domann FE. A family of AP-2 proteins down-regulate manganese superoxide dismutase expression. *J Biol Chem* 2001;276:14407-13.
72. Kwak MK, Egner PA, Dolan PM, Ramos-Gómez M, Groopman JD, Itoh K, Yamamoto M, Kensler TW. Role of phase 2 enzyme induction in chemoprotection by dithiolethiones. *Mutat Res* 2001;480-481:305-15.
73. Myhrstad MC, Husberg C, Murphy P, Nordstrom O, Blomhoff R, Moskaug JO, Kolsto AB. TCF11/Nrf1 overexpression increases the intracellular glutathione level and can transactivate the gamma-glutamylcysteine synthetase (GCS) heavy subunit promoter. *Biochim Biophys Acta* 2001;1517:212-9.
74. Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. Regulation of the antioxidant response element by protein kinase C-mediated phosphorylation of NF-E2-related factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:12475-80.

-
75. Nguyen T, Huang HC, Pickett CB. Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 and repression by Mafk. *J Biol Chem* 2000;275:15466-73.
76. Minc E, de Coppet P, Masson P, Thiery L, Dutertre S, Amor-Gueret M, Jaulin C. The human copper-zinc superoxide dismutase gene (SOD1) proximal promoter is regulated by Sp1, Egr-1 and WT1 via non-canonical binding sites. *J Biol Chem* 1999;274:503-9.
77. Porntadavity S, Xu Y, Kinningham K, Rangnekar VM, Prachayasatikul V, St Clair DK. TPA-activated transcription of the human MnSOD gene: role of transcription factors Sp-1 and Egr-1. *DNA Cell Biol* 2001;20:473-81.
78. Lacquemant C, Lepretre F, Pineda Torra I, Manraj M, Charpentier G, Ruiz J, Staels B, Froguel P. Mutation screening of the PPAR α gene in type 2 diabetes associated with coronary heart disease. *Diabetes Metab* 2000;26:393-401.
79. Swarbrick MM, Chapman CM, McQuillan BM, Hung J, Thompson PL, Beilby JP. A Pro12Ala polymorphism in the human peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 is associated with combined hyperlipidaemia in obesity. *Eur J Endocrinol* 2001;144:277-82.
80. Jacob S, Stumvoll M, Becker R, Koch M, Nielsen M, Loblein K, Maerker E, Volk A, Renn W, Balletshofer B, Machicao F, Rett K, Haring HU. The PPAR γ 2 polymorphism Pro12Ala is associated with better insulin sensitivity in the offspring of type 2 diabetic patients. *Horm Metab Res* 2000;32:413-6.
81. Luan J, Browne PO, Harding AH, Halsall DJ, O'Rahilly S, Chatterje VK, Wareham NJ. Evidence for gene-nutrient interaction at the PPAR γ locus. *Diabetes* 2001;50:686-9.
82. Choi AM, Sylvester S, Otterbein L, Holbrook NJ. Molecular responses to hyperoxia in vivo: relationship to increased tolerance in aged rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;13:74-82.
83. Krötz F, Sohn HY, Pohl U. Reactive oxygen species. Players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1988-96.
84. Leopold JA, Loscalzo J. Oxidative enzymopathies and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1332-40.
85. Cai H. NAD(P)H oxidase-dependent self-propagation of hydrogen peroxide and vascular disease. *Circ Res* 2005;96:818-22.
86. Dimmeler S, Hermann C, Galle J, Zehier AM. Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis suppressive effects of shear stress on endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:656-64.
87. Tsutsui H, Ide T, Shiomi T, Kang D, Hayashidani S, Suematsu N, Wen J, Utsumi H, Hamasaki N, Takeshita A. 8-oxo-dGTPase, which prevents oxidative

stress-induced DNA damage, increases in the mitochondria from failing hearts. *Circulation* 2001;104:2883-5.

88. Porkkala-Sarataho E, Salonen JT, Nyssönen K, Kaikkonen J, Salonen R, Ristonmaa U, Diczfalusy U, Brigelius-Flohe R, Loft S, Poulsen HE. Long-term effects of vitamin E, vitamin C, and combined supplementation on urinary 7-hydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine, serum cholesterol oxidation products, and oxidation resistance of lipids in nondepleted men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2087-93.

89. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006;52:601-23.

90. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1135-43.

91. Yerneni KKV, Bai W, Khan BV, Medford RM, Natarajan R. Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor $\kappa\beta$ in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 1999;48:855-64.

92. Maehara K, Oh-Hashi K, Isobe KI. Early growth-responsive-1-dependent manganese superoxide dismutase gene transcription mediated by platelet-derived growth factor. *FASEB* 2001;15:2025-6.

93. Devaraj S, O'Keefe G, Jialal I. Defining the pro-inflammatory phenotype using high sensitive C-reactive protein levels as the biomarker. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4549-54.

94. Yeh ET. CRP as a mediator of disease. *Circulation* 2004;109[suppl II]:II11-4.

95. Branen L, Hovgaard L, Nitulescu M, Bengtsson E, Nilsson J, Jovinge S. Inhibition of tumor necrosis factor- α reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:2137-42.

96. Boesten LS, Zadelaar AS, van Nieuwkoop A, Gijbels MJ, de Winther MP, Havekes LM, van Vlijmen BJ. *Cardiovasc Res* 2005;66:179-85.

97. Kirii H, Niwa T, Yamada Y, Wada H, Saito K, Iwakura Y, Asano M, Moriwaki H, Seishima M. Lack of interleukin-1 β decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:656-60.

98. Chi H, Messas E, Levine RA, Graves DT, Amar S. Interleukin-1 receptor signaling mediates atherosclerosis associated with bacterial exposure and/or a high-fat diet in a murine apolipoprotein E heterozygote model: pharmacotherapeutic implications. *Circulation*. 2004;110:1678-85.

99. Paoletti R, Gotto AM, Hajjar DP. Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy. *Circulation* 2004;109[suppl III]:III20-6.

-
100. Cesari M, Penninx BW, Newman AB, Kritchevsky SB, Nicklas BJ, Sutton-Tyrrell K, Rubin SM, Ding J, Simonsick EM, Harris TB, Pahor M. Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation* 2003;108:2317-22.
101. Lind L. Circulating markers of inflammation and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003;169:203-14.
102. Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2364-7.
103. Song L, Schindler C. IL-6 and the acute phase response in murine atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2004;177:43-51.
104. Schieffer B, Selle T, Hilfiker-Kleiner D, Grote K, Tietge UJ, Trautwein C, Luchtefeld M, Schmittkamp C, Heeneman S, Daemen MJ, Drexler H. Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation* 2004;110:3493-500.
105. Gómez Jerique JA. Inflamación, hemostasia y enfermedad coronaria. La proteína C reactiva y el dímero D como marcadores del proceso de la arteriosclerosis. *Clin Invest Arterioscl* 2002;14:242-57.
106. Sonnenberg GE, Krakower GR, Kissebah AH. A novel pathway to the manifestations of metabolic syndrome. *Obesity Research* 2004;12:180-6.
107. Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M. IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 2005;11:191-8.
108. Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systematic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nat Med* 2005;11:183-90.
109. Bray GA. Pathophysiology of obesity. *Am J Clin Nutr* 1992;55:488S-94S.
110. Alain CC, Poon LS, Chan CSG, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem* 1974;20:470-5.
111. Wahlefeld AW. Triglycerides: determination after enzymatic hydrolysis, in Bergmeyer HU, ed. *Methods of enzymatic analysis*. New York, Academic Press, Inc 1974;1831-5.
112. Manual de las Clínicas Españolas de Lípidos. Sociedad Española de Arteriosclerosis. Jarpyo Editores S.A., Madrid 1992.
113. Marcovina SM, Albers JJ, Dati F, Ledue TB, Ritchie RF. International Federation of Clinical Chemistry standardization Project for measurements of apolipoproteins AI and B. *Clin Chem* 1991;37:1676-82.

-
114. Kadish AH, Litle RH, Sternberg JC. A new and rapid method for determination of glucose by measurement of rate of oxygen consumption. *Clin Chem* 1986;14:116-31.
115. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Teacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9.
116. Radziuk J. Insulin sensitivity and its measurement: structural commonalities among the methods. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4426-33.
117. Ascaso JF, Pardo S, Real JT, Lorente RI, Priego A, Carmena R. Diagnosing insulin resistance by simple quantitative methods in subjects with normal glucose metabolism. *Diabetes Care* 2003;26:3320-5.
118. Ascaso JF, Romero P, Real JT, Priego A, Valdecabres C, Carmena R. Cuantificación de insulinoresistencia con los valores de insulina basal e índice HOMA en una población no diabética. *Med Clin* 2001;117:530-3.
119. Greenwald RA ed, in *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press Inc. Florida, USA 1986.
120. Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, Estrela JM, Viña J. Determination of oxidized glutathione in blood: high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol* 1994;234:367-71.
121. Frenkel K, Zhong ZJ, Wei HC, Karkoszka J, Patel U, Rashid K, Georgescu M, Solomon JJ. Quantitative high-performance liquid chromatography analysis of DNA oxidized in vitro and in vivo. *Anal Biochem* 1991;196:126-36.
122. van der Vleuten GM, van Tits LJH, den Heijer M, Lemmers H, Stalenhoef AFH, de Graaf J. Decreased adiponectin levels in familial combined hyperlipidemia patients contribute to the atherogenic lipid profile. *J Lipid Res* 2005;46:2398-404.
123. Heistad DD. Oxidative stress and vascular disease: 2005 Duff lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:689-95.
124. Sorescu D, Weiss D, Lassègue B, Clempus RE, Szöcs K, Sorescu GP, Valppu L, Quinn MT, Lambeth JD, Vega JD, Taylor WR, Griendling KK. Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation* 2002;105:1429-35.
125. Spiekermann S, Landmesser U, Dikalov S, Brecht M, Gamez G, Tatge H, Reepschlager N, Hornig B, Drexler H, Harrison DG. Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation* 2003;107:1383-9.
126. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hafner G, Tiret L, Smieja M, Cambien F, Meyer J, Lackner KJ. Glutathione peroxidase 1 activity and

cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 2003;349:1595-604.

127. Stephens JW, Gable DR, Hurel SJ, Miller GJ, Cooper JA, Humphries SE. Increased plasma markers of oxidative stress are associated with coronary heart disease in males with diabetes mellitus and with 10-year risk in a prospective sample of males. *Clin Chem* 2006;52:446-52.

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

129. Maier W, Altwegg LA, Corti R, Gay S, Hersberger M, Maly FE, Sutsch G, Roffi M, Neidhart M, Eberli FR, Tanner FC, Gobbi S, von Eckardstein A, Luscher TF. Inflammatory markers at the site of ruptured plaque in acute myocardial infarction: locally increased interleukin-6 and serum amyloid A but decreased C-reactive protein. *Circulation* 2005;111:1355-61.

130. von Eynatten M, Hamann A, Twardella D, Nawroth PP, Brenner H, Rothenbacher D. Relationship of adiponectin with markers of systemic inflammation, atherogenic dyslipidemia, and heart failure in patients with coronary heart disease. *Clin Chem* 2006;52:853-9.

131. Sjöholm A, Nyström T. Endothelial inflammation in insulin resistance. *The Lancet* 2005;365:610-2.

132. Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A, Bandyopadhyay A. The potential influence of inflammation and insulin resistance on the pathogenesis and treatment of atherosclerosis-related complications in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2422-9.

133. Hotamisligil GS. Molecular mechanisms of insulin resistance and the role of the adipocyte. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000;24:S23-7.

134. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006;354:610-21.

135. Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res* 2005;46:1369-79.