



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA,
INSTITUTO DE FISIOPATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA CLÍNICA (INFIBIOC),**

TESIS DOCTORAL

**ESTADO INFLAMATORIO, OXIDANTE Y PROATEROGÉNICO EN
TRASTORNOS DEL METABOLISMO DEL HIERRO**

TESISTA: *BIOQ. TOMÁS MEROÑO*

DIRECTOR: *PROF. DR. FERNANDO DANIEL BRITES*

2014

*“Solo si nos detenemos a pensar
en las pequeñas cosas llegaremos
a comprender las grandes”*

-José Saramago-

Agradecimientos

Al Prof. Dr. Fernando D. Brites por haberme enseñado los fundamentos de la investigación científica y haberme inculcado su concepción del quehacer profesional como inseparable del trabajo científico. Por su generosidad al enseñar y su excepcional humildad.

A la Dra. Laura Boero, al Dr. Leonardo Gómez Rosso y al Dr. Diego Lucero por su amistad, colaboración y apoyo incondicional. Gracias por el placer de haber compartido con uds. el trabajo del día a día.

A la Dra. Patricia Sorroche, Bioq. Ma. Soledad Saez y al Dr. Jorge Arbelbide porque gracias a su colaboración desinteresada pude desarrollar y concluir mi trabajo de tesis.

A la Dra. Laura Schreier y a mis compañeros de laboratorio: Anita, Claudia, Gabriela, Graciela, Laurita, Leíto, Luz, Martín, Nahuel, Valeria y Verónica.

A mis colegas del Dpto. de Bioquímica Clínica, a la Dra. Leticia Madalena, Dra. Marta Carballo, Dra. Marcela López Nigro y Dr. Alberto Lazarowski por haberme permitido utilizar los equipamientos de sus laboratorios para los experimentos de mi tesis. Al Dr. Luis Palaoro por su invaluable amistad. Al Dr. Jorge Rey por haber realizado los estudios moleculares. A la Dra. Margarita Angerosa por su alegría y por haberme enseñado e incentivado a personalizar las ilustraciones del presente trabajo de tesis.

A los compañeros y médicos del Hospital de Clínicas “José de San Martín”, en especial a Susi, Juanita, Romina y Horacio, y a los Dres. Alejandra Artega, Esteban González Ballerga y Jorge Daruich del Servicio de Gastroenterología.

Al Dr. John Chapman, Dr. Anatol Kontush, Dra. Marie L'Homme y Carolane Dautuille de la Unidad de Investigación INSERM-ICAN 1166 por generosamente abrirme las puertas de su laboratorio y compartir su experiencia.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por las becas y subsidios que financiaron el presente trabajo.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires por haberme brindado los elementos posibles para mi formación científica y académica desde mis primeros días de estudiante.

A mis compañeros de la Facultad y a mis amigos.

A mi familia, por su apoyo durante el transcurso de mis estudios, su incentivo para mi desarrollo profesional y su cariño.

Y a mi compañera del alma, Mariana, por haberme motivado siempre a perseguir mis sueños y haberme enseñado desde hace mucho tiempo que *“La grandeza de un hombre no se mide por el terreno que ocupan sus pies, sino por el horizonte que descubren sus ojos”*.

Abreviaturas

ADA	<i>American Diabetes Association</i>
ADE	Amplitud de la distribución eritrocitaria
ADH	Anemia por deficiencia de hierro
Apo	Apoproteína
ARE	Arilesterasa
C	Colesterol
CE	Colesterol esterificado
CETP	Proteína transportadora de colesterol esterificado
CL	Colesterol libre
CT	Colesterol total
CV	Coefficiente de variación
DcytB	Citrocromo B duodenal
DH	Deficiencia de hierro
DMT	Transportador de cationes divalentes
ECV	Enfermedad cardiovascular
FAO	<i>Food American Organization</i>
FL	Fosfolípidos
Fpn	Ferroportina
GAA	Glucemia alterada en ayunas
Hb	Hemoglobina
HCP	Proteína transportadora de hemo
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HFE	Proteína de la hemocromatosis humana
HH	Hemocromatosis hereditaria
HOMA-IR	<i>Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance</i>
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
IL	Interleuquina

IMC	Índice de masa corporal
IRS	Sustrato del receptor de insulina
LCAT	Lecitina colesterol aciltransferasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDLox	Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
LH	Lipasa hepática
LPL	Lipoproteína lipasa
Lp-PLA ₂	Fosfolipasa A ₂ asociada a lipoproteínas
MCP	Proteína quimiotáctica de monocitos
NTBI	<i>Non-transferrin bound iron</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR _{us}	Proteína C reactiva ultrasensible
PBS	Buffer fosfato salino
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PGI ₂	Prostaciclina
PON	Paraoxonasa
POTG	Prueba oral de tolerancia a la glucosa
Q	Cuartilo
QUICKI	<i>Quantitative Sensitive Check Index</i>
SH	Sobrecarga de hierro
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
TAG	Tolerancia alterada a la glucosa
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
Tf	Transferrina
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TG	Triglicéridos
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular-1
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

Publicaciones

Parte de los datos presentados en esta Tesis Doctoral dieron lugar a las siguientes publicaciones:

1. **Meroño T**, Brites F, Dauteuille C, Lhomme M, Menafra M, Arteaga A, Castro M, Saez MS, González Ballerga E, Sorroche P, Rey J, Lesnik P, Sordá JA, Chapman MJ, Kontush A, Daruich J. Metabolic alterations HFE gene mutations and atherogenic lipoprotein modification in patients with primary iron overload. Clin Sci. Aceptado para su publicación Noviembre 2014
2. **Meroño T**, Gómez Rosso L, Sorroche P, Boero L, Arbelbide J, Brites F. High risk of cardiovascular disease in iron overload patients. Eur J Clin Invest. 2011;41:479-86.
3. **Meroño T**, Sorroche P, Brites F. Aumento de los depósitos de hierro y su relación con la enfermedad cardiovascular. Medicina (Buenos Aires) 2011;71(6):566-72.
4. **Meroño T**, Sorroche P, Gómez Rosso L, Casañas L, Boero L, Arbelbide J, Brites F. Proatherogenic disturbances in lipoprotein profile, associated enzymes and transfer proteins in women with iron deficiency anaemia. Clinical Biochemistry 2010;43:416-423.
5. **Meroño T**, Sorroche P, Gómez Rosso L, Casañas L, Boero L, Arbelbide J, Brites F. Riesgo cardiovascular elevado en pacientes con sobrecarga de hierro. Bioquímica y Patología Clínica 2009; 73:39-46.
6. **Meroño T**, Gómez Rosso L, Sorroche P, Brites F. Alteraciones del metabolismo del hierro y enfermedad cardiovascular aterosclerótica. Actualización en Nutrición 2008; 9:335-343.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Generalidades de la enfermedad cardiovascular.....	2
1.1.1. Fisiopatología de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica.....	5
a) Aterogénesis: disfunción endotelial e inicio de la lesión aterosclerótica	5
b) Crecimiento y progresión de la lesión aterosclerótica.....	7
c) Ruptura de placa y trombosis	9
1.1.2. Factores de riesgo cardiovascular.....	9
1.1.2.1. Resistencia a la insulina.....	9
1.1.2.2. Alteraciones lipoproteicas	12
a) Subfracciones de lipoproteínas de muy baja densidad.....	14
b) Subfracciones de lipoproteínas de baja densidad.....	15
c) Subfracciones de lipoproteínas de alta densidad.....	17
1.1.2.3 Inflamación	19
1.2. Generalidades del metabolismo del hierro y sus alteraciones	21
1.2.1. Metabolismo del Hierro	22
a) Absorción.....	22
b) Distribución.....	24
c) Regulación	25
1.2.2. Alteraciones del metabolismo del hierro: sobrecarga de hierro	27
a) Etiología y epidemiología.....	27
b) Evolución y diagnóstico.....	28

1.2.3. Alteraciones del metabolismo del hierro:	
deficiencia de hierro	30
a) <i>Etiología y Epidemiología</i>	30
b) <i>Evolución y diagnóstico</i>	31
1.3. Relación entre el riesgo de enfermedad cardiovascular y las alteraciones del metabolismo del hierro	32
1.3.1. Sobrecarga de hierro.....	33
a) <i>Depleción de hierro como factor preventivo.</i> <i>Hipótesis del hierro</i>	33
b) <i>Sobrecarga de hierro como factor de riesgo cardiovascular</i>	34
c) <i>Portadores de mutaciones del gen HFE, pacientes con hemocromatosis hereditaria y riesgo cardiovascular</i>	35
1.3.2. Deficiencia de hierro	36
2. Hipótesis	39
3. Objetivos	40
3.1. Objetivos generales	40
3.2. Objetivos específicos	40
4. Materiales y métodos.....	42
4.1. Diseño y descripción de los estudios	42
a) <i>Sobrecarga de hierro</i>	42
b) <i>Deficiencia de hierro</i>	42
4.2. Sujetos	43
a) <i>Sobrecarga de hierro</i>	43

b) <i>Deficiencia de hierro</i>	44
4.3. Muestras	45
4.4. Características clínicas	45
4.5. Genotipificación del gen HFE	46
4.6. Determinaciones bioquímicas generales.....	46
4.7. Marcadores de inflamación, estrés oxidativo y aterosclerosis.....	47
a) <i>Proteína C reactiva ultrasensible</i>	48
b) <i>Interleuquina-6</i>	48
c) <i>Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico</i>	48
d) <i>Actividad de la fosfolipasa A₂ asociada a lipoproteínas</i>	48
e) <i>Lipoproteínas de baja densidad oxidadas</i>	49
4.8. Medida de la actividad de proteínas y enzimas asociadas	
a lipoproteínas	50
a) <i>Actividad de la proteína transportadora de colesterol</i>	
<i>esterificado</i>	50
b) <i>Medida de la actividad de paraoxonasa 1</i>	50
c) <i>Estimación del genotipo de paraoxonasa 1</i>	52
4.9. Marcadores de resistencia a la insulina y estimadores	
de la funcionalidad de la célula β	52
4.10. Aislamiento de lipoproteínas y determinación de su	
composición química	53
a) <i>Ultracentrifugación en gradiente de densidad</i>	53
b) <i>Ultracentrifugación secuencial</i>	54

c) <i>Composición química</i>	55
4.11. Ensayos de funcionalidad de HDL.....	55
a) <i>Actividad antioxidante de HDL</i>	55
b) <i>Capacidad de HDL para promover el eflujo de colesterol celular</i>	56
4.12. Análisis estadísticos.....	57
a) <i>Análisis de la potencia y cálculo de la sensibilidad</i>	57
b) <i>Análisis de datos</i>	57
5. Resultados	59
5.1. Sobrecarga de hierro	59
5.1.1. Factores de riesgo cardiovascular y biomarcadores de enfermedad cardiovascular aterosclerótica	59
a) <i>Análisis genotípico y características clínicas y bioquímicas generales</i>	59
b) <i>Perfil de lípidos y lipoproteínas</i>	62
c) <i>Asociación entre las mutaciones del gen HFE y el perfil metabólico</i>	63
d) <i>Actividad de proteínas y enzimas asociadas a lipoproteínas</i>	63
e) <i>Biomarcadores de enfermedad cardiovascular aterosclerótica</i>	66
5.1.2. Caracterización del metabolismo de los hidratos de carbono y de las lipoproteínas, y funcionalidad de HDL.....	70
a) <i>Características genotípicas y fenotípicas</i>	70
b) <i>Metabolismo de los hidratos de carbono</i>	72

c) <i>Metabolismo lipoproteico</i>	73
d) <i>Funcionalidad de HDL</i>	81
e) <i>Interacciones entre los niveles de hierro y las alteraciones metabólicas</i>	82
5.1.3. Efectos de la reducción de los niveles de hierro.....	84
5.2. Deficiencia de hierro	88
5.2.1. Factores de riesgo cardiovascular y marcadores de estrés oxidativo, inflamación y enfermedad cardiovascular aterosclerótica	88
a) <i>Características clínicas y bioquímicas generales</i>	88
b) <i>Perfil de lípidos y lipoproteínas</i>	90
c) <i>Marcadores de inflamación, estrés oxidativo y enfermedad cardiovascular aterosclerótica</i>	93
5.2.2. Caracterización de la composición y funcionalidad de las HDL.....	96
a) <i>Composición química de las HDL</i>	96
b) <i>Funcionalidad de las HDL</i>	98
5.2.3. Efectos subagudos de la administración endovenosa de hierro.....	101
5.2.4. Efectos de la restauración de los niveles de hemoglobina ...	105
6. Discusión	109
6.1. Sobrecarga de hierro	109

6.1.1. Factores de riesgo cardiovascular y biomarcadores de enfermedad cardiovascular aterosclerótica	109
6.1.2. Caracterización del metabolismo de los hidratos de carbono y de las lipoproteínas, y funcionalidad de HDL.....	112
6.1.3. Efectos de la reducción de los niveles de hierro	116
6.2. Deficiencia de hierro	118
6.2.1. Factores de riesgo cardiovascular y marcadores de estrés oxidativo, inflamación y enfermedad cardiovascular aterosclerótica.....	118
6.2.2. Caracterización de la composición y funcionalidad de las HDL.....	120
6.2.3. Efectos subagudos de la administración endovenosa de hierro	122
6.2.4 Efectos de la restauración de los niveles de hemoglobina	124
7. Conclusiones y perspectivas	126
7.1. Relevancia de los resultados para la prevención cardiovascular.....	126
7.2. Relevancia de los resultados para el abordaje de la sobrecarga y deficiencia de hierro	127
8. Referencias bibliográficas.....	130

1. Introducción.

El hierro juega un rol esencial en muchos procesos vitales incluidos el transporte de oxígeno, el metabolismo oxidativo y el crecimiento celular. En el organismo, el hierro forma parte de hemoproteínas, proteínas con centro ferrosulfurado y otras proteínas, cuyas funciones son indispensables para la supervivencia y la proliferación celular (Lill, R y col. 2005; Hentze, MW y col. 2010).

La importancia biológica del hierro se debe a su capacidad para involucrarse en reacciones de óxido-reducción, variando entre sus dos estados de oxidación estables: Fe^{2+} (ferroso; reducido) y Fe^{3+} (férrico; oxidado). De este modo, el hierro es requerido por una amplia variedad de enzimas y proteínas para su adecuado funcionamiento.

La sobrecarga de hierro (SH) resulta tóxica para las células. De hecho, el hierro puede participar en la generación del radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), altamente reactivo, vía reacción de Haber-Weiss (Kehrer, JP 2000). Este radical reacciona con proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, alterando su estructura y función. En consecuencia, la concentración de hierro “libre” en el organismo y en las células se encuentra fuertemente regulada mediante su unión a la transferrina (Tf) en la circulación, así como a la ferritina en el compartimento intracelular (Hentze, MW y col. 2010).

Por otro lado, la deficiencia de hierro (DH) a nivel celular se traduce en una disminución de la actividad de una amplia variedad de proteínas que en última instancia pueden conducir a un arresto en el ciclo celular y, posteriormente, a su muerte (Hentze, MW y col. 2010).

Las alteraciones del metabolismo del hierro pueden clasificarse, de modo general, en SH y DH. Si bien ambos trastornos exhiben etiologías y manifestaciones clínicas particulares, los dos comparten su asociación con un aumento de la morbimortalidad en los pacientes afectados. Es así que los pacientes con SH presentan mayor riesgo de cirrosis hepática y algunos tipos de cáncer, mientras que los pacientes con DH manifiestan anemia y una mayor

susceptibilidad a infecciones (Ekiz, C y col. 2005; Allen, KJ y col. 2008; Zacharski, LR y col. 2008). Por otro lado, algunos estudios vincularon tanto a la SH como a la DH con un aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV) (Salonen, JT y col. 1992; Sarnak, MJ y col. 2002; Friedrich, N y col. 2009). En base a estas evidencias, se sugiere la existencia de una concentración óptima de hierro con la cual el riesgo de enfermedad sería mínimo, mientras que a niveles superiores o inferiores, el riesgo se vería incrementado. De este modo, la relación entre el riesgo de ECV y los niveles de hierro mostrarían una relación de “J” entre salud y nutrición, similar a muchos otros nutrientes.

La ECV y, en particular la ECV aterosclerótica, es una de las mayores causas de muerte en todo el mundo (Go, AS y col. 2013) . Esta es una patología silente que tarda años en manifestarse y, por este motivo, la identificación y tratamiento de los factores que precipitan su desarrollo, denominados factores de riesgo, resulta prioritaria (Lloyd-Jones, DM y col. 2010; Charakida, M y col. 2013). En este contexto, los trastornos del metabolismo del hierro se constituyen como condiciones de alta prevalencia, caracterizadas por su cronicidad y largo tiempo de evolución, incluso anterior a su diagnóstico. Por lo tanto, de no tomar las medidas terapéuticas específicas para cada condición, tanto la SH, como la DH, serían capaces de aumentar el riesgo de ECV de los pacientes afectados en el mediano o largo plazo.

1.1. Generalidades de la enfermedad cardiovascular.

La ECV es una de las mayores causas de muerte en el mundo occidental y, en particular, en nuestro país (Dirección de Estadísticas e Información de Salud 2011; Go, AS y col. 2013). Datos del Ministerio de Salud de la Nación (Dirección de Estadísticas e Información de Salud 2011) estiman que aproximadamente un 30% del total de las muertes durante el año 2011 fueron atribuibles a la ECV. Para reducir la mortalidad por ECV, diversos estudios resaltaron la importancia del control, farmacológico o no farmacológico, de los factores de riesgo cardiovascular (Lloyd-Jones, DM y col. 2010; Charakida, M y col. 2013). Sin embargo, la

instauración de un control estricto de los mismos no ha logrado los resultados esperados (Wilkins, JT y col. 2012). Incluso, la morbimortalidad atribuible a la ECV ha ido en aumento año tras año (Wilkins, JT y col. 2012; Charakida, M y col. 2013; Fowkes, FG y col. 2013). Es probable que el fracaso en disminuir la morbimortalidad por ECV se deba a que muchos eventos cardiovasculares ocurren en ausencia de los factores de riesgo tradicionales (Lyngbaek, S y col. 2012; Budoff, MJ y col. 2013). En consecuencia, se justifica y resulta prioritaria la identificación de nuevos biomarcadores y de condiciones asociadas a mayor riesgo cardiovascular. El rápido incremento en la incidencia de eventos cardiovasculares evidencia el importante efecto de los hábitos de vida como uno de los principales factores predisponentes. No obstante, diversas patologías del metabolismo de los lípidos, de los hidratos de carbono, y de los sistemas endócrino, renal y vascular, así como procesos inflamatorios crónicos y diversas variantes genéticas se hallan también asociadas a un mayor riesgo cardiovascular. Por lo tanto, la comprensión de las complejas interacciones entre factores de riesgo, hábitos de vida no saludables, la presencia de condiciones predisponentes y la genética es necesaria para un eficaz abordaje de la ECV.

Recientemente, en un intento por prevenir el desarrollo de la ECV y de mejorar el abordaje de los pacientes que ya presentan manifestaciones clínicas, *el American College of Cardiology y la American Heart Association* elaboraron un nuevo documento de consenso basado exclusivamente en estudios clínicos randomizados, que son los que aportan mayor nivel de evidencia (Stone, NJ y col. 2014). No obstante, las estrategias empleadas para su elaboración así como las recomendaciones surgidas de este documento resultan altamente controvertidas, mostrando ello que las expectativas de lograr los objetivos planteados en relación a la disminución de la morbimortalidad por ECV son por el momento escasas (Kavousi, M y col. 2014; Seth, B y col. 2014)

Las principales manifestaciones de la ECV , tales como la enfermedad coronaria isquémica, la enfermedad arterial periférica y la enfermedad cerebrovascular, son consecuencia del desarrollo de aterosclerosis (Insull, W, Jr. 2009). La aterosclerosis es una enfermedad de evolución silente y asintomática

con un comienzo abrupto de sus manifestaciones clínicas desencadenado por la obstrucción parcial o total de la arteria afectada. El proceso por el cual ocurre esta repentina aparición de síntomas se debe al compromiso de la luz arterial por el crecimiento de la lesión aterosclerótica o a eventos de ruptura de placa, entre los cuales se distinguen la erosión superficial y la ruptura franca, seguidos por trombosis (Figura 1) (Libby, P 2013).

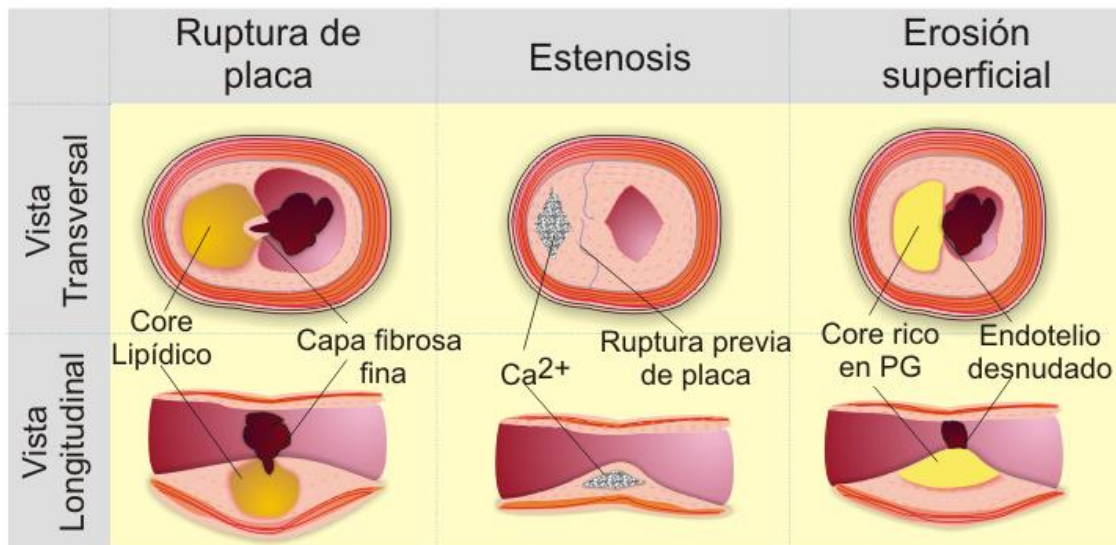


Figura 1. Características de las placas ateromatosas asociadas a diversas manifestaciones de enfermedad cardiovascular. La ruptura de placa es el mecanismo responsable de la mayor parte de los eventos cardiovasculares. PG, proteoglicano. Adaptado de N Engl J Med. 2013;368:2004-13.

La aterosclerosis se caracteriza por ser una enfermedad natural, de progresión lenta y difusa de la vasculatura con múltiples factores predisponentes o de riesgo. De hecho, se ha demostrado la ocurrencia de lesiones vasculares en la vida intrauterina e incluso se postula que el ambiente intrauterino podría estar influenciando el desarrollo precoz de complicaciones cardiovasculares en la vida adulta (Skilton, MR 2008). A su vez, este inicio temprano de la enfermedad, seguido de su manifestación en la vida adulta, describe otra de las características de esta patología que exhibe uno de los períodos más largos de incubación entre

las enfermedades humanas (Libby, P 2013). Adicionalmente, la aterosclerosis es una enfermedad difusa, lo que implica un desarrollo similar de la patología en distintos segmentos arteriales (Dalager, S y col. 2007; Bhatt, DL y col. 2010). Esta característica se hace evidente a través del mayor riesgo de enfermedad coronaria que presentan pacientes con enfermedad arterial periférica o con enfermedad cerebrovascular, y asimismo a la inversa (Bhatt, DL y col. 2010; Grenon, SM y col. 2013). Por último, la naturaleza multifactorial de la aterosclerosis se evidencia a través de las complejas interacciones entre alteraciones genético-ambientales, hemodinámicas, metabólicas y del sistema inmune que influyen en el curso de la patología.

1.1.1. Fisiopatología de la enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

a) Aterogénesis: disfunción endotelial e inicio de la lesión aterosclerótica.

En la actualidad, se acepta a la disfunción endotelial como uno de los eventos más tempranos en la aterogénesis (Sitia, S y col. 2010). De hecho, muchos de los factores de riesgo tradicionales y no tradicionales impactan sobre la función endotelial (Dalla-Riva, J y col. 2010; Sitia, S y col. 2010). Fisiológicamente, el endotelio secreta diversas moléculas que regulan el tono vascular, la activación del sistema inmune y la agregación plaquetaria (Figura 2). En el cumplimiento de estas funciones son de especial relevancia el óxido nítrico, la prostaciclina (PGI₂), y el activador tisular del plasminógeno, entre otros (Barton, M 2013). La presencia de los factores de riesgo aterogénico compromete la síntesis endotelial de estas moléculas y determina el comienzo de una serie de eventos que son cruciales en la formación de la lesión aterosclerótica temprana. Este proceso, también denominado activación o disfunción endotelial, se caracteriza por menor síntesis y/o biodisponibilidad de óxido nítrico y de PGI₂, así como por la secreción de interleuquina (IL)-1 β , de factor de necrosis tumoral (TNF)- α y de la proteína

quimiotáctica de monocitos (MCP)-1, todas ellas citoquinas proinflamatorias (Sitia, S y col. 2010) (Figura 2).

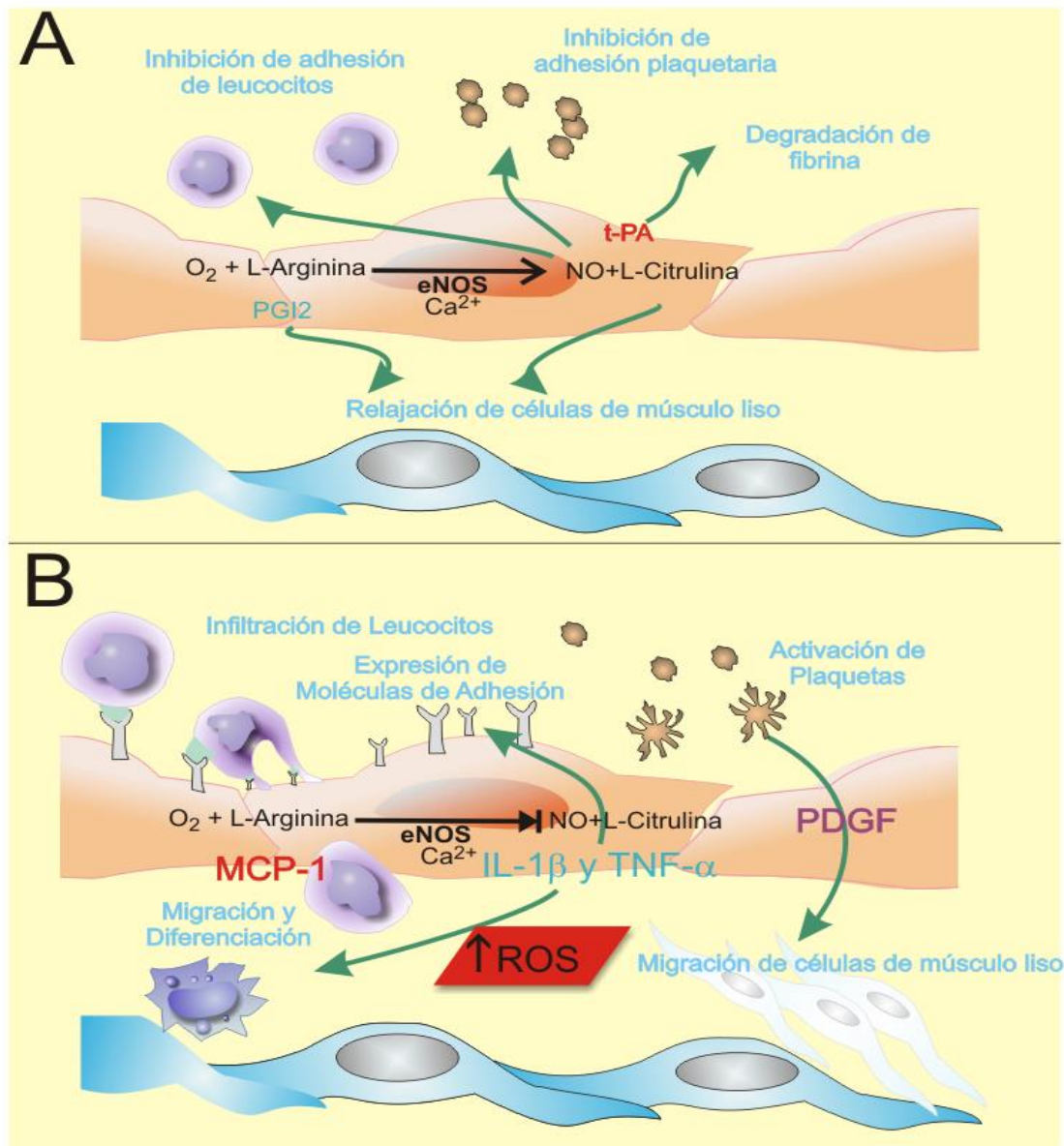


Figura 2. Función (Panel A) y disfunción (Panel B) endotelial. T-PA, activador tisular del plasminógeno, NO, óxido nítrico; eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; PGI₂, prostaciclina; MCP, proteína quimiotáctica de monocitos; IL, interleuquina; TNF, factor de necrosis tumoral; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; ROS, especies reactivas del oxígeno. Adaptado de J Am Coll Cardiol. 2012;60:1455-69.

Más aún, el endotelio injuriado aumenta la expresión de moléculas de adhesión, entre las que se destacan la molécula de adhesión vascular (VCAM)-1 y la molécula de adhesión intercelular (ICAM)-1, que son necesarias para el reclutamiento de leucocitos circulantes al espacio subendotelial de la zona afectada (Libby, P 2012). Este evento y, en particular, la migración de monocitos al área constituyen la base de la formación de la estría grasa o lesión aterosclerótica temprana. La diferenciación posterior de los monocitos dentro del espacio subendotelial implica un aumento del tamaño celular, el desarrollo de actividad fagocítica, la producción de radicales libres del oxígeno y la expresión de diversos factores de crecimiento y receptores (Figura 2). De este modo, los macrófagos subendoteliales expresan receptores para las lipoproteínas de baja densidad (LDL) modificadas, o receptores *scavenger*, por medio de los cuales se inicia el depósito de lípidos en el área de la lesión (Moore, KJ y col. 2006). La excesiva acumulación de lípidos en los macrófagos lleva a un tráfico vesicular anormal y gatilla el secuestro lisosomal de lípidos, dando origen a las células espumosas que exhiben alteraciones fenotípicas adicionales, tales como mayor expresión de MCP-1 y del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Hayashi, K y col. 1992; Leonarduzzi, G y col. 2005; Karvinen, H y col. 2009; Jerome, WG 2010). Mediante estas moléculas, las células espumosas contribuyen a la infiltración del subendotelio por nuevas células del sistema inmune y por células de músculo liso vascular perpetuando la lesión aterosclerótica.

b) Crecimiento y progresión de la lesión aterosclerótica.

Las estrías grasas son lesiones amarillas, ligeramente prominentes, estrechas y orientadas longitudinalmente. Los tipos celulares presentes en estas lesiones son células espumosas, macrófagos, linfocitos T, y células de músculo liso vascular (Hansson, GK y col. 2006). El análisis histológico de estas lesiones ubica en el centro a las células espumosas derivadas de células de músculo liso vascular, seguidas en dirección a la luz arterial por un importante número de células de músculo liso, para finalmente encontrar escasos macrófagos, linfocitos

T y células espumosas derivadas de macrófagos en regiones superficiales adyacentes a la capa fibrosa que recubre la lesión (Kockx, MM y col. 1998). Una de las características distintivas de la estría grasa es que la mayor proporción de lípidos se encuentra dentro de las células, siendo mínimo el contenido extracelular.

La evolución desde la estría grasa hacia una lesión complicada está determinada por el aumento de radicales libres del oxígeno, de la permeabilidad del endotelio injuriado, del influjo de LDL al espacio subendotelial, y su posterior oxidación, y por un mayor reclutamiento de células del sistema inmune y de células de músculo liso vascular (Kockx, MM y col. 1998; Insull, W, Jr. 2009). Es así que, en paralelo a la progresión de la lesión aterosclerótica, se desarrolla el núcleo o *core* de lípidos extracelular derivado de la apoptosis o necrosis de células, en su mayoría células espumosas (Martinet, W y col. 2011; Sakakura, K y col. 2013). La presencia del *core* acelular de lípidos o también llamado *core* necrótico es la característica distintiva del siguiente estadio evolutivo del ateroma, denominado fibroateroma. De este modo, la progresión hacia estadios más complicados de la lesión aterosclerótica dependen en gran medida del desequilibrio entre los procesos de muerte celular, que determinan la expansión del *core* necrótico, y los factores estabilizantes que involucran la capacidad secretora de colágeno de las células de músculo liso, así como la eliminación de lípidos, detritos y otros restos celulares mediada por los fagocitos de la lesión (Martinet, W y col. 2011).

El *core* necrótico se caracteriza por la presencia de iones metálicos, cristales de colesterol y productos de la oxidación lipídica, los cuales exhiben propiedades citotóxicas y proinflamatorias (Li, W y col. 2006; Khatib, S y col. 2014). Adicionalmente, la inflamación y, en particular, los linfocitos T facilitan el crecimiento del *core* al promover la apoptosis de las células de músculo liso vascular (Geng, YJ y col. 1996). De este modo, se establece un círculo vicioso en el que la inflamación favorece la expansión del *core* promoviendo procesos de muerte celular (Seimon, T y col. 2009; Martinet, W y col. 2011), mientras que los propios componentes del *core* estimulan la secreción de citoquinas

proinflamatorias (Duewell, P y col. 2010). Al prevalecer la apoptosis, la inflamación y la expansión de la zona necrótica por sobre los factores estabilizantes, el espesor de la capa fibrosa que recubre la lesión disminuye y da origen al próximo estadio evolutivo denominado fibroateroma de capa delgada o placa vulnerable.

c) Ruptura de placa y trombosis.

Las placas de ateroma pueden sufrir diversos ciclos de ruptura y reparación sin ningún tipo de sintomatología, y éste representa otro mecanismo de crecimiento de la lesión. No obstante, gran número de eventos de ruptura seguidos por trombosis terminan en la oclusión de la arteria afectada y en eventos cardiovascular mayores (Libby, P 2013). Por lo tanto, los factores que contribuyen a la ruptura de la placa aterosclerótica resultan de sumo interés para la clínica. Entre éstos, los procesos de muerte celular, las alteraciones en el metabolismo del colágeno dentro de la lesión, con aumento de macrófagos secretores de metaloproteasas y menor número de células de músculo liso productoras de colágeno, y la inflamación, en general, revisten crucial importancia (Libby, P 2013).

El conocimiento de los fenómenos descritos anteriormente y del rol de la inflamación en todos los eventos que conducen a la formación, desarrollo y desestabilización de las lesiones ateroscleróticas es fundamental para diseñar nuevas estrategias de prevención y tratamiento de la ECV. No obstante, aún en la actualidad no hay una nueva alternativa terapéutica concreta y, por lo tanto, la prevención continúa siendo el pilar fundamental en el abordaje de la ECV. En este contexto, la detección temprana de los factores de riesgo, así como la reversión de las condiciones fisiopatológicas que implican un mayor riesgo de ECV se complementan entre sí.

1.1.2. Factores de riesgo cardiovascular.

La definición clásica de un factor de riesgo resalta la causalidad como principal característica. Sin embargo, en la práctica clínica este término engloba

tanto a factores causales como predictivos (Stampfer, MJ y col. 2004). Dado la naturaleza multifactorial de la aterosclerosis, la relación de causalidad no siempre es demostrable e, incluso, la presencia de un factor de riesgo no asegura que todos los pacientes que lo presentan padezcan de la enfermedad. Tal es el caso de algunos de los factores de riesgo tradicionales de ECV entre los que se incluyen la edad, los antecedentes familiares de ECV, el sexo masculino, el tabaquismo, la hipertensión, la diabetes y la dislipemia (ATP III 2002).

En los últimos años, se han propuesto numerosos factores de riesgo cardiovascular denominados nóveles. En líneas generales, se ha determinado que un nuevo factor de riesgo debe: a) ser fácilmente medible y de sencilla aplicación práctica, b) ser un factor de riesgo independiente de los factores ya establecidos, c) encontrarse presente antes del inicio de cualquier tipo de manifestación de la patología, d) estar involucrado en los eventos moleculares que llevan al desarrollo de la enfermedad y e) brindar información que pueda incorporarse a las guías de tratamiento actuales (Stampfer, MJ y col. 2004). Entre los nuevos factores de riesgo con amplio reconocimiento en la bibliografía, se encuentran: la resistencia a la insulina y/o el síndrome metabólico, algunas alteraciones lipoproteicas más allá de la hipercolesterolemia y la inflamación.

1.1.2.1. Resistencia a la insulina.

La resistencia a la insulina se caracteriza por la disminución de la capacidad de la insulina para ejercer sus acciones biológicas en tejidos diana, primariamente músculo esquelético, hígado y tejido adiposo (Shanik, MH y col. 2008). Fisiológicamente, la capacidad de metabolizar glucosa mediada por la insulina varía ampliamente entre sujetos aparentemente sanos y la homeostasis de la glucemia se logra por un equilibrio entre la secreción pancreática y la sensibilidad de los tejidos a la insulina (Kahn, SE y col. 1993; Yeni-Komshian, H y col. 2000). La relación hiperbólica de equilibrio entre estos factores implica que siempre y cuando un aumento de la secreción pancreática compense a las disminuciones de sensibilidad a la insulina, o viceversa, no va a ser detectable ningún tipo de

alteración en la glucemia. De este modo, si bien el aumento compensatorio de la secreción de insulina logra mantener los niveles de glucosa en sangre, a largo plazo afecta aspectos del metabolismo en general y a la vasculatura, en particular.

A pesar de que la resistencia insulínica no es considerada una enfermedad, la misma es un síndrome multifacético que, además de asociarse con algún grado de intolerancia a la glucosa, se relaciona con diversas alteraciones como dislipemia, disfunción endotelial, un estado procoagulante y proinflamatorio, y alteraciones hemodinámicas y hormonales (Reaven, GM 2005). De hecho, la resistencia a la insulina, independientemente de cómo haya sido definida (síndrome metabólico, cintura hipertriglicéridémica, aumento de los índices de resistencia o disminución de los índices de sensibilidad a la insulina), fue consistentemente asociada a mayor riesgo cardiovascular en un gran número de estudios (Howard, G y col. 1996; Rutter, MK y col. 2005; Czernichow, S y col. 2007; Gast, KB y col. 2012). La importancia de reconocer a los individuos con resistencia a la insulina radica en que ésta es detectable varios años antes del desarrollo de prediabetes, diabetes tipo 2 y/o algún tipo de complicación cardiovascular (Facchini, FS y col. 2001; Hanley, AJ y col. 2003; Faerch, K y col. 2009; Viitasalo, A y col. 2014). Por este motivo, en la actualidad, cobra relevancia el concepto de riesgo cardiometabólico que engloba tanto al riesgo de padecer diabetes tipo 2 así como ECV, y que agrega a la obesidad abdominal y al síndrome de resistencia a la insulina a la lista de factores de riesgo clásicos o tradicionales (Despres, JP y col. 2008).

En la historia evolutiva de la diabetes tipo 2, en cuanto se quiebra el equilibrio entre la sensibilidad y la secreción de insulina, una de las primeras manifestaciones es el aumento de los valores de la glucemia en ayunas y/o postprandiales. Estos cambios tempranos en la glucemia consisten en los estados prediabéticos definidos por la *American Diabetes Association* (ADA) como glucemia alterada en ayunas (GAA: glucemia en ayunas > 100 y < 126 mg/dl) o tolerancia alterada a la glucosa (TAG: glucemia postcarga > 140 y < 200 mg/dl) (*American Diabetes Association* 2012). Entre los eventos que conducen desde la normoglucemia (o tolerancia normal a la glucosa) a la GAA o TAG se diferencian

los aportes individuales de la resistencia a la insulina hepática y muscular, y la disfunción de las células β del páncreas (Abdul-Ghani, MA y col. 2006). De hecho, si bien los estados prediabéticos son considerados como equivalentes, en realidad, éstos responden a diferentes entidades fisiopatológicas (Meigs, JB y col. 2003; Abdul-Ghani, MA y col. 2006; Faerch, K y col. 2009). El desarrollo aislado de GAA implica fundamentalmente un aumento de los valores de insulinemia en ayunas y una mayor producción hepática de glucosa compatibles con una menor sensibilidad a la inhibición de la gluconeogénesis hepática (dependiente de insulina) y a un mínimo deterioro de la función pancreática a lo largo del tiempo. Por otro lado, el desarrollo aislado de TAG se considera consecuencia de un deterioro constante y sostenido de la funcionalidad de las células β , luego de un primer evento de disminución de la sensibilidad a la insulina, predominantemente a nivel del tejido muscular. Estas diferencias fisiopatológicas explican el mayor grado de progresión a diabetes y de desarrollo de eventos cardiovasculares que presentan los pacientes con TAG respecto a aquellos con GAA (DECODE study group 1999; DeFronzo, RA y col. 2011a). En este contexto, la disfuncionalidad de las células β característico de la TAG sería responsable de una mayor susceptibilidad a padecer hiperglucemias postprandiales y, por ende, presentar una mayor afección del metabolismo y la función vascular. Por último, la disminución de la funcionalidad pancreática más allá de un determinado umbral conduce a la instauración de diabetes manifiesta, cuya asociación con el riesgo cardiovascular es ampliamente conocida.

Además de las alteraciones asociadas a las hiperglucemias, el mayor riesgo cardiovascular de los pacientes con prediabetes o diabetes manifiesta implica también a otros factores tales como los componentes que integran el síndrome de resistencia a la insulina, la modificación proaterogénica de lipoproteínas y un estado proinflamatorio crónico (Kontush, A y col. 2008; Querton, L y col. 2012; Romeo, GR y col. 2012).

1.1.2.2. Alteraciones lipoproteicas.

Las alteraciones en los niveles de colesterol como factor de riesgo cardiovascular han sido destacadas desde los primeros reportes del estudio *Framingham* en 1961 (Kannel, WB y col. 1961). Luego de este artículo pionero, numerosos estudios confirmaron este hallazgo e incluso se describió la asociación directa entre los niveles de colesterol-LDL (C-LDL) y el riesgo cardiovascular, e inversa para la concentración de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL) (Kannel, WB y col. 1981). Esta distinción entre las lipoproteínas fue una de las primeras referencias a la complejidad del metabolismo lipoproteico y a su rol en la aterosclerosis.

En la actualidad, numerosos avances en las metodologías de estudio de las lipoproteínas permitieron un mejor abordaje de su heterogeneidad y de su relación con el riesgo cardiovascular. De hecho, entre las fracciones lipoproteicas tradicionalmente reconocidas, se ha logrado la distinción de subfracciones con características fisicoquímicas y biológicas particulares. Por ultracentrifugación en gradiente de densidad, se han caracterizado dos subfracciones entre las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL; VLDL-1 y VLDL-2), 5 subfracciones de LDL (acorde a densidad creciente: LDL-1, LDL-2, LDL-3, LDL-4 y LDL-5) y otras 5 subfracciones de HDL (acorde a densidad creciente: HDL2b, HDL2a, HDL3a, HDL3b y HDL3c) (Figura 3) (Chapman, MJ y col. 1981; Guerin, M y col. 2002). En líneas generales, las diferencias en densidad entre las lipoproteínas y sus respectivas subfracciones coinciden con diferencias de tamaño, de composición química y de potencial aterogénico, para las VLDL y LDL, o antiaterogénico, para las HDL. Es así que las LDL-5 son más pequeñas, densas y con mayor contenido relativo de proteínas que las LDL-1; así como las HDL3c son las más pequeñas y densas entre las subfracciones de HDL. A continuación, se describen las subfracciones lipoproteicas principales y las evidencias que existen en relación a su potencial aterogénico o antiaterogénico.

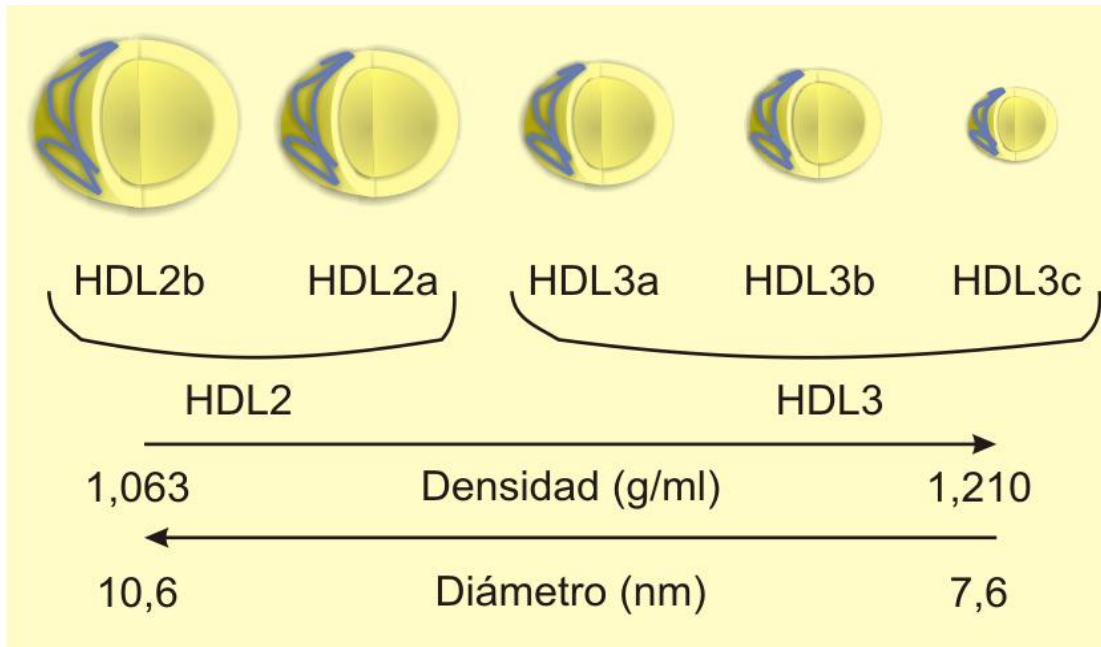


Figura 3. Subfracciones plasmáticas de HDL acorde a su densidad de flotación característica y diámetro. HDL, lipoproteína de alta densidad. Adaptado de Trends Mol Med. 2011;17:594-603.

a) Subfracciones de lipoproteínas de muy baja densidad.

Las VLDL son lipoproteínas de origen hepático que se distinguen de las otras fracciones lipoproteicas principalmente por su contenido en triglicéridos (TG) (>50%). Asimismo, las particularidades entre las subfracciones de VLDL radican en su tamaño, densidad, contenido en TG y destino metabólico final (Demant, T y col. 1998). En particular, las VLDL-2, que son las partículas denominadas nativas, son lipoproteínas relativamente enriquecidas en colesterol esterificado (CE), de menor tamaño y, en su mayoría, precursoras de las LDL plasmáticas. Su relación colesterol total (CT) / TG es aproximadamente 1 / 5 y su catabolismo en pasos sucesivos por la lipoproteína lipasa (LPL) y por la lipasa hepática (LH) conduce a la formación de LDL. Se estima que la proporción de VLDL-2 que se cataboliza a LDL en circulación es de aproximadamente un 80% y, por lo tanto, las VLDL-2 no son consideradas lipoproteínas aterogénicas *per se* (Demant, T y col. 1998). En contraste, las VLDL-1 están relativamente enriquecidas en TG y exhiben mayor

tamaño y menor catabolismo hacia LDL. De hecho, se ha estimado que solo un 20% de la VLDL-1 se cataboliza a LDL, mientras que el resto sería captada por macrófagos, hecho que les confiere potencial aterogénico (Demant, T y col. 1998). La secreción de VLDL-1 se encuentra normalmente inhibida por la insulina y aumenta significativamente en paralelo a la caída de la sensibilidad hepática a la insulina (Adiels, M y col. 2007; Duvillard, L y col. 2011). Un modo sencillo de estimar la relación entre VLDL-1 y VLDL-2 consiste en el cálculo del índice C-VLDL / TG. Una disminución de este índice (aprox. $< 0,15$) sería compatible con un aumento del número de VLDL-1. En relación al riesgo de ECV, se ha reportado que tanto el aumento de la proporción de VLDL-1, así como la disminución del índice C-VLDL / TG se encuentran asociados significativa e independientemente con un aumento del riesgo cardiovascular (Mackey, RH y col. 2002; Hopkins, PN y col. 2009; Maki, KC y col. 2012).

b) Subfracciones de lipoproteínas de baja densidad.

A diferencia de las VLDL, las LDL se destacan porque todas sus subfracciones poseen potencial aterogénico. Este hecho se fundamenta en que dado su pequeño tamaño, estas partículas son naturalmente capaces de penetrar al espacio subendotelial e iniciar la acumulación intimal de lípidos. Sin embargo, las subfracciones de LDL exhiben distinto potencial aterogénico. Es así que desde hace más de 15 años, las LDL pequeñas y densas han sido identificadas como una subfracción con mayor potencial aterogénico (Lamarche, B y col. 1997). De hecho, la determinación de sus niveles plasmáticos exhibió un elevado poder predictivo para la incidencia de eventos cardiovasculares (Lamarche, B y col. 1997; Toft-Petersen, AP y col. 2011). En claro contraste, la presencia de LDL grandes y flotadoras ha sido asociada a un menor riesgo cardiovascular respecto a pacientes con predominio de LDL pequeñas y densas (Skoglund-Andersson, C y col. 1999). Más aún, se ha visto que distintos fármacos que reducen el riesgo cardiovascular modifican la distribución entre las subfracciones de LDL,

favoreciendo el predominio de las subfracciones grandes y flotadoras por encima de las pequeñas y densas (Florentin, M y col. 2010).

Entre los factores que determinan la formación de las LDL pequeñas y densas, el aumento de los TG plasmáticos es uno de los más significativos (Packard, CJ y col. 2000; Packard, CJ 2003). Sin embargo, también resultan destacables los efectos de los aumentos de la actividad de la LH y de la proteína transportadora de colesterol esterificado (CETP), de la proporción plasmática de VLDL-1 y de la presencia de resistencia hepática a la insulina (Koba, S y col. 2003; Packard, CJ 2003; Lucero, D y col. 2011).

El mayor potencial aterogénico de las LDL pequeñas y densas se explicaría a través de su susceptibilidad a sufrir modificaciones químicas y de su particular retención en la íntima arterial por interacción con los proteoglicanos (Tribble, DL y col. 1995; Bjornheden, T y col. 1996; Younis, NN y col. 2013). De este modo, se ejemplifica el rol determinante que poseen las características fisicoquímicas sobre el potencial aterogénico de las lipoproteínas. De hecho, el tamaño, la densidad y la carga eléctrica superficial de las subfracciones de LDL son determinantes de su susceptibilidad para ser modificadas por oxidación, glicación o carbamilación. Lo importante de estas LDL modificadas es su mayor capacidad proinflamatoria y citotóxica respecto a las LDL no modificadas o nativas, y que su remoción de la circulación depende exclusivamente de los receptores *scavenger* de macrófagos (Tribble, DL y col. 1995; Younis, N y col. 2008; Tsimikas, S y col. 2011). De esta manera, las LDL modificadas contribuyen directamente a la formación y progresión de las lesiones ateroscleróticas (Tribble, DL y col. 1995; Younis, N y col. 2008; Tsimikas, S y col. 2011).

Por último, respecto a sus constituyentes químicos [proteínas, fosfolípidos (FL), TG, CE y colesterol libre (CL)], algunas evidencias atribuyen un rol proaterogénico al enriquecimiento en TG de las partículas de LDL. De acuerdo con numerosos experimentos, estas LDL de composición modificada serían más susceptibles a la oxidación y más injuriantes para el endotelio vascular (Tornvall, P y col. 1993; Schreier, LE y col. 1996; Allison, BA y col. 1999). Por lo tanto, respecto al potencial aterogénico de las LDL, no solo es importante determinar la

distribución de sus subfracciones, sino también analizar su composición química y la presencia de modificaciones adicionales.

c) Subfracciones de lipoproteínas de alta densidad.

Contrariamente a las otras lipoproteínas plasmáticas, las HDL son las únicas lipoproteínas con propiedades antiaterogénicas. Numerosos estudios demostraron una relación inversa entre el C-HDL y el riesgo cardiovascular (Kannel, WB y col. 1981; Barter, P 2011). Tradicionalmente, esta asociación se sustentó en la capacidad de las HDL para promover el transporte inverso del colesterol desde los tejidos periféricos hacia el hígado y para inhibir la oxidación de las LDL. No obstante, en la actualidad, se atribuyeron un mayor número de funciones cardioprotectoras a las HDL, tales como inhibir la generación de trombos y la expresión de moléculas de adhesión endotelial, promover la reparación endotelial y mejorar su funcionalidad, y favorecer el control glucémico en pacientes diabéticos, entre otras (Rye, KA y col. 2013). Gran número de estas funciones antiaterogénicas de las HDL parecen involucrar a la apolipoproteína (apo) A-I, la proteína mayoritaria de las HDL. Por este motivo, se ha sugerido a la disminución de la concentración plasmática de apo A-I como un marcador de la presencia de HDL disfuncionales (Barter, PJ y col. 2006). No obstante, otras proteínas, entre las que se destacan la paraoxonasa (PON)-1, y la lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT), resultan importantes para la adecuada funcionalidad de las HDL (Rye, KA y col. 2013). De hecho, la disminución de la PON-1, que participaría en la inactivación de fosfolípidos oxidados por las HDL, se encontró significativamente asociada a mayor riesgo de ECV (Tang, WH y col. 2012).

Coherente con la heterogeneidad de las HDL, sus distintas subfracciones plasmáticas resultan particulares en sus capacidades antiaterogénicas. Específicamente, se ha demostrado que las HDL3c, las partículas más pequeñas y densas, presentan potentes propiedades cardioprotectoras (Kontush, A y col. 2010; Camont, L y col. 2013). Así, las HDL3c poseen mayor capacidad para mediar el eflujo de colesterol celular, inhibir la oxidación de las LDL y la apoptosis

de células endoteliales (Camont, L y col. 2013). Sin embargo, pese a estos estudios, por el momento no existen evidencias suficientes que avalen una mayor utilidad clínica de la medición de los niveles de las subfracciones de HDL por encima del C-HDL (Rosenson, RS y col. 2011).

Más allá de los niveles de C-HDL o de sus subfracciones, Khera y col. (Khera, AV y col. 2011) demostraron que la disfuncionalidad de las HDL es un factor de riesgo cardiovascular independiente. En el citado estudio, el aumento de una unidad de desvío estándar en la capacidad de las HDL para promover el eflujo de colesterol se asoció a una reducción del 30% del riesgo de enfermedad coronaria independientemente de los niveles de C-HDL. En consecuencia, se sugirió que las medidas de la funcionalidad de las HDL podrían constituir un factor de riesgo emergente capaz de explicar el elevado riesgo cardiovascular de algunas condiciones particulares (Toth, PP y col. 2013). A su vez, este resultado explica por qué las intervenciones que lograron aumentos significativos de los niveles de C-HDL no tuvieron los resultados esperados (Tariq, SM y col. 2014).

Por último y de modo similar a las otras lipoproteínas, las alteraciones de la composición química de las HDL conducen a modificaciones de su funcionalidad. La más frecuente y estudiada es el enriquecimiento en TG acompañado por la depleción en CE (Brites, FD y col. 1999; Brites, FD y col. 2000; de Souza, JA y col. 2008). La presencia de HDL modificadas de este modo es característica de pacientes con resistencia a la insulina, síndrome metabólico y diabetes tipo 2 (Brites, FD y col. 1999; Brites, FD y col. 2000; Nobecourt, E y col. 2005; de Souza, JA y col. 2008). El mecanismo fisiopatológico por el cual se generan estas partículas está íntimamente relacionado a los aumentos de la concentración de TG plasmáticos y al consecuente efecto inductor sobre la actividad de CETP (Kontush, A y col. 2008). La CETP media el intercambio de TG de las lipoproteínas con apo B (VLDL y LDL) por CE de las HDL (Lagrost, L y col. 1993). En consecuencia, en la hipertrigliceridemia, el aumento de la actividad de CETP produce tanto el enriquecimiento en TG de las HDL, así como su depleción en CE. La importancia de este mecanismo en las alteraciones funcionales de las HDL se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* (Brites, FD y col. 1999; Brites, FD y col.

2000; Nobecourt, E y col. 2005; de Souza, JA y col. 2008). De hecho, las HDL enriquecidas en TG, características de pacientes con resistencia a la insulina, síndrome metabólico y diabetes tipo 2, presentaron menor capacidad para mediar el eflujo de colesterol y para inhibir la oxidación de las LDL y el proceso inflamatorio vascular (Brites, FD y col. 1999; Brites, FD y col. 2000; Nobecourt, E y col. 2005; de Souza, JA y col. 2008).

1.1.2.3 Inflamación.

El rol de la inflamación en la aterosclerosis fue sugerido en primer lugar por Rudolf Virchow a mediados del siglo XIX (Virchow, R 1989). El patólogo alemán afirmó que las degeneraciones grasas o ateromatosas de las arterias tenían como punto de partida la inflamación de sus capas internas. Luego, como consecuencia de este proceso inflamatorio crónico, las lesiones protruían sobre la luz del vaso, momento en que era posible evidenciar la acumulación de material graso originado por la muerte de células dentro de la pared arterial. Estas afirmaciones contrastaban con el concepto dominante del momento que sostenía que la degeneración grasa de las arterias era consecuencia de un proceso de acumulación pasivo. Este último concepto prevaleció hasta un siglo después cuando el papel de la inflamación en la aterosclerosis comenzó a ganar aceptación. En particular, la concepción inflamatoria de la aterosclerosis fue indudablemente demostrada por las observaciones del grupo del Dr. Peter Libby en sus estudios de la aterosclerosis coronaria postransplante (Salomon, RN y col. 1991). Estos estudios permitieron explicar cómo el rechazo inmune de las arterias de los donantes conducía al desarrollo de un fibroateroma caracterizado por la presencia de monocitos, macrófagos, linfocitos T y proliferación de células de músculo liso vascular. De este modo, quedó asentada la capacidad de la respuesta inflamatoria vascular para inducir la aterogénesis aún en ausencia de los factores de riesgo tradicionales.

En la fisiopatología de la ECV aterosclerótica se encuentran numerosas moléculas del proceso inflamatorio cuyos niveles son plausibles de ser utilizados

como biomarcadores de riesgo o factores de riesgo cardiovascular. Entre éstas, se encuentran las moléculas de adhesión vascular (VCAM-1 e ICAM-1), las interleuquinas (IL-1 β e IL-6), el TNF- α , la proteína C reactiva (PCR) secretada por el hígado en respuesta a la estimulación por IL-6, el interferón (IFN)- γ , la fosfolipasa A₂ asociada a lipoproteínas (Lp-PLA₂), proteínas quimiotácticas (fundamentalmente MCP-1) y algunas metaloproteasas secretadas por macrófagos (Davidson, MH y col. 2011; Badimon, L y col. 2012). Prácticamente, todos estos biomarcadores inflamatorios han sido asociados a mayor riesgo de eventos cardiovasculares incidentes y recurrentes, así como el aumento de sus niveles se asoció a condiciones de alto riesgo cardiovascular (obesidad, síndrome metabólico, diabetes, etc.) (Baldassarre, D y col. 2008; Hamirani, YS y col. 2008; Arnett, DK y col. 2011; Sarwar, N y col. 2012; Zamani, P y col. 2013). Si bien estos resultados demostraron el valor pronóstico de algunos marcadores inflamatorios, la aplicación clínica de los mismos aún es cuestionada en muchos casos. Las mayores limitaciones se fundamentan en la alta complejidad de las metodologías, el nivel de imprecisión analítica y el poco valor que agregan a los modelos de predicción basados en los factores de riesgo cardiovascular tradicionales (Baldassarre, D y col. 2008; Arnett, DK y col. 2011). Por el momento, los únicos con evidencias suficientes, tal que fueron recomendados para la evaluación global del riesgo cardiovascular en individuos asintomáticos, son los niveles de PCR por método ultrasensible (PCRus) y la Lp-PLA₂ (Davidson, MH y col. 2011; Kaptoge, S y col. 2012; Ridker, PM y col. 2012). Esta última es una enzima secretada por monocitos y macrófagos responsable de la generación de lípidos proinflamatorios a partir de las LDL oxidadas y constituye un bioindicador de inflamación vascular (Asano, K y col. 1999; Lavi, S y col. 2007).

Adicionalmente, la inflamación interactúa con otros factores de riesgo cardiovascular. En particular, diversos estudios demostraron que la inflamación favorece el desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes (Maedler, K y col. 2011). A nivel molecular, esta asociación se explicaría a través de acciones directas de mediadores inflamatorios sobre las vías de señalización del receptor de insulina. Por ejemplo, el TNF- α es capaz de modular la fosforilación de residuos

de serina del sustrato del receptor de la insulina 1 (IRS1) (Boura-Halfon, S y col. 2009) y desviar la cascada normal de señalización intracelular promoviendo una respuesta proinflamatoria (Yuan, M y col. 2001). Además, la interacción de la IL-1 β con el receptor supresor de la señalización de citoquinas (SOCS) favorece la degradación de los IRS, alterando aún más las vías de señalización de la insulina (Rui, L y col. 2002; Boura-Halfon, S y col. 2009). Estos mecanismos moleculares proveen una explicación a los efectos sobre la homeostasis de la glucosa observados durante el tratamiento de pacientes diabéticos con altas dosis de aspirina a principios del siglo XX (Williamson, RT 1901; Yuan, M y col. 2001).

Por otro lado, también se ha reportado que la inflamación puede influir sobre el metabolismo de los lípidos y las lipoproteínas (van Diepen, JA y col. 2013). De hecho, patologías inflamatorias se encuentran frecuentemente asociadas a aumento de TG y disminución de C-HDL (van Diepen, JA y col. 2013). Más aún, se ha demostrado que la inflamación puede comprometer la funcionalidad de las HDL (Marsche, G y col. 2013). Este hecho estaría fundamentado por los efectos de la IL-1 β e IL-6 sobre la expresión y secreción hepática del amiloide sérico A (SAA), el cual se une a las HDL y desplaza a la apo A-I de su unión a la lipoproteína. En efecto, se ha observado que las HDL con SAA sufren una alteración de su conformación que favorece la disociación de otras proteínas también involucradas en sus funciones cardioprotectoras (Marsche, G y col. 2013). La relevancia de este mecanismo en la clínica se ilustra en el mayor riesgo cardiovascular de pacientes con patologías inflamatorias crónicas, aún en aquellos que no presentan alteraciones en el perfil lipídico (van Diepen, JA y col. 2013; Ronda, N y col. 2014).

1.2. Generalidades del metabolismo del hierro y sus alteraciones.

En el organismo, existen aproximadamente 35 – 45 mg de hierro/Kg de peso, distribuidos de la siguiente manera: 65 % como parte de la hemoglobina (Hb) de los eritrocitos, 10 – 15 % en la mioglobina muscular y diversas proteínas, y 20 – 25 % como hierro de depósito (Andrews, NC 1999). Por lo tanto, el hierro es

uno de los micronutrientes más abundantes en el organismo. Adicionalmente, el metabolismo del hierro presenta otra característica distintiva que radica en la falta de mecanismos fisiológicos para su excreción. Por este motivo, el hierro en el organismo sigue un circuito cerrado en el que la absorción de la fracción dietaria se adecúa para compensar sus pérdidas. Por lo tanto, en líneas generales, las alteraciones del metabolismo del hierro son, en parte, consecuencia de una alteración en su absorción, su distribución o de un aumento no compensado de sus pérdidas.

1.2.1. Metabolismo del Hierro.

a) Absorción.

El hierro proveniente de la dieta se presenta de dos formas, hierro hemínico y hierro no hemínico. La forma hemínica es absorbida por medio de la proteína transportadora de hemo-1 (HCP-1), presente en la membrana apical del enterocito (Shayeghi, M y col. 2005; West, AR y col. 2008). Esta fracción constituye aproximadamente del 5 al 20 % del hierro dietario y es de alta biodisponibilidad, por lo cual su aporte a los requerimientos diarios resulta significativo (Bjorn-Rasmussen, E y col. 1974). Por otro lado, el hierro no hemínico, que en la luz del intestino se encuentra en mayor grado como férrico, ingresa a la célula intestinal por dos vías: a) la vía de la β_3 -integrina mobilferrina, para los iones oxidados (Conrad, ME y col. 2000), y b) la vía del transportador de cationes divalentes-1 (DMT-1), para los iones reducidos. Esta reacción de reducción previa a la absorción es catalizada por la enzima citocromo b duodenal (DcytB), que se encuentra en la membrana apical de los enterocitos (Figura 4) (Oakhill, JS y col. 2008). A pesar de que el hierro no hemínico constituye del 80 al 95 % del hierro dietario, su biodisponibilidad es baja (Bjorn-Rasmussen, E y col. 1974).

El hemo dentro del enterocito es metabolizado por la hemo oxigenasa generando ión ferroso, monóxido de carbono y biliverdina (West, AR y col. 2008). El hierro así obtenido de ambas formas nutricionales puede ser exportado hacia la

circulación vía ferroportina (Fpn) o almacenado en forma de ferritina en el enterocito. En el primer caso, la salida del ión ferroso vía Fpn implica su posterior oxidación por la hefastina (proteína de la membrana basolateral dependiente de cobre) y su asociación en circulación con la Tf para su distribución (Vulpe, CD y col. 1999; Lee, SM y col. 2012) (Figura 4). Por otro lado, en caso de no ser requeridas mayores cantidades de hierro por el organismo, el recambio celular del duodeno conduce a la pérdida del hierro absorbido por descamación.

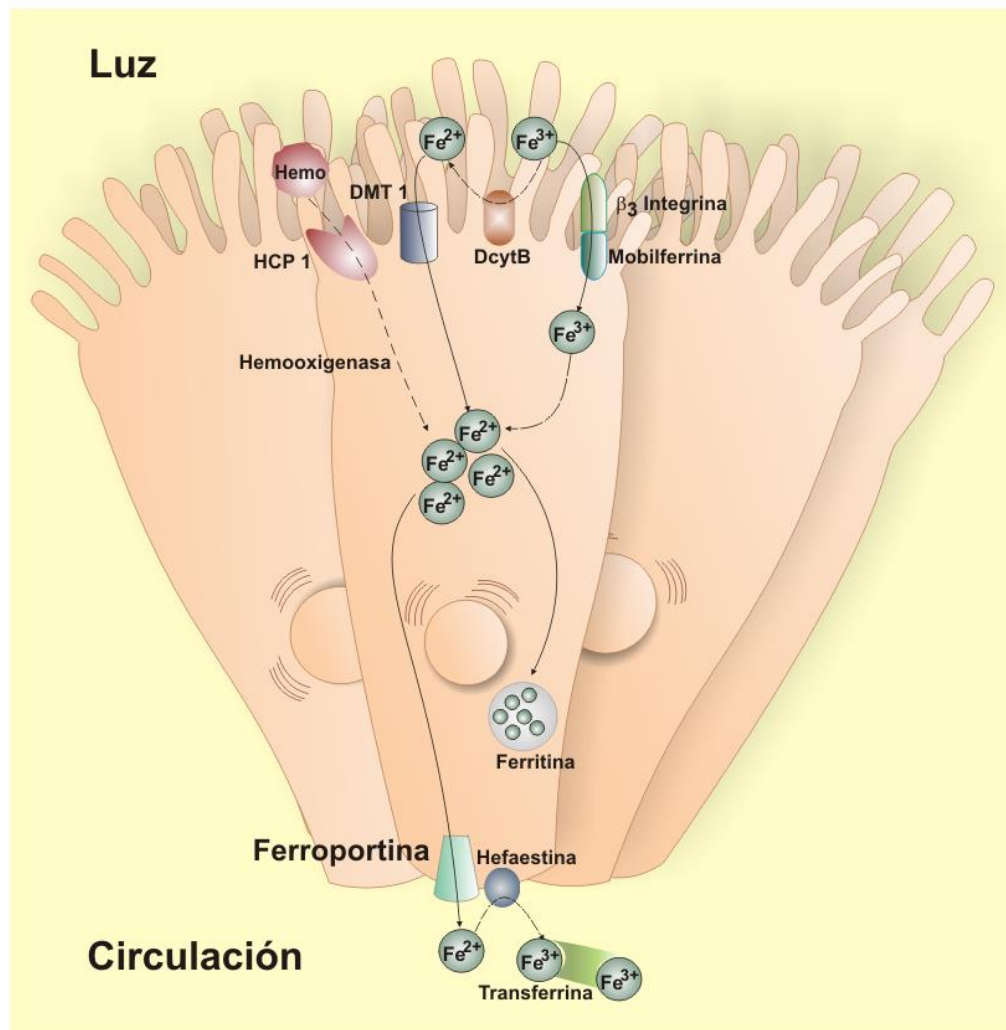


Figura 4. Absorción intestinal de hierro. DMT, transportador de metales divalentes; DcytB, citocromo B duodenal; HCP, proteína transportadora de hemo. Adaptado de N Engl J Med. 1999;341:1986-95.

b) Distribución.

En circulación se ha distinguido la presencia de hierro unido a Tf, así como de una fracción no unida a transferrina (NTBI, *non-transferrin bound iron*). Fisiológicamente, la primera es la mayoritaria en individuos con niveles adecuados de hierro y es la fracción que satisface los requerimientos celulares mediante la interacción con su receptor específico (Figura 5). Por otro lado, el NTBI se caracteriza por estar unido a ligandos de distintos pesos moleculares y tiende a ser mayoritariamente captado por los hepatocitos, probablemente vía el transportador de iones ZIP-14 o por un mecanismo endocítico (Sohn, YS y col. 2012; Nam, H y col. 2013).

En condiciones fisiológicas, es necesario un aporte de 20 mg de hierro/día para la eritropoyesis. La mayor parte de esta cantidad está cubierta por el circuito de reciclaje del hierro (Figura 5). Los macrófagos del sistema retículo endotelial remueven a los eritrocitos senescentes de la circulación, metabolizan la Hb y exportan el hierro reciclado hacia la circulación vía Fpn (Andrews, NC 1999). En plasma, el hierro se oxida a ión férrico por acción de la ceruloplasmina y se une a la Tf para su redistribución entre las células que requieren de hierro, principalmente los progenitores eritropoyéticos. Como destino alternativo, el hierro puede ser tomado por los hepatocitos para su reserva. De este modo, en condiciones fisiológicas, los hepatocitos y los macrófagos del sistema retículo endotelial constituyen las células involucradas en el almacenamiento de hierro del organismo.

Dado la eficiencia de los mecanismos de reciclaje del hierro, la dieta aporta sólo 1 – 2 mg/día en ausencia de procesos patológicos. Esta cantidad es suficiente para compensar las pérdidas fisiológicas producidas por sangrado y descamación de células epiteliales, entre otras (Figura 5). Consecuentemente, y considerando la biodisponibilidad de las formas nutricionales del hierro, la *Food American Organization* (FAO) recomendó una ingesta de hierro de 8 mg/día para hombres y 18 mg/día para mujeres (WHO/UNICEF/UNU 2008).

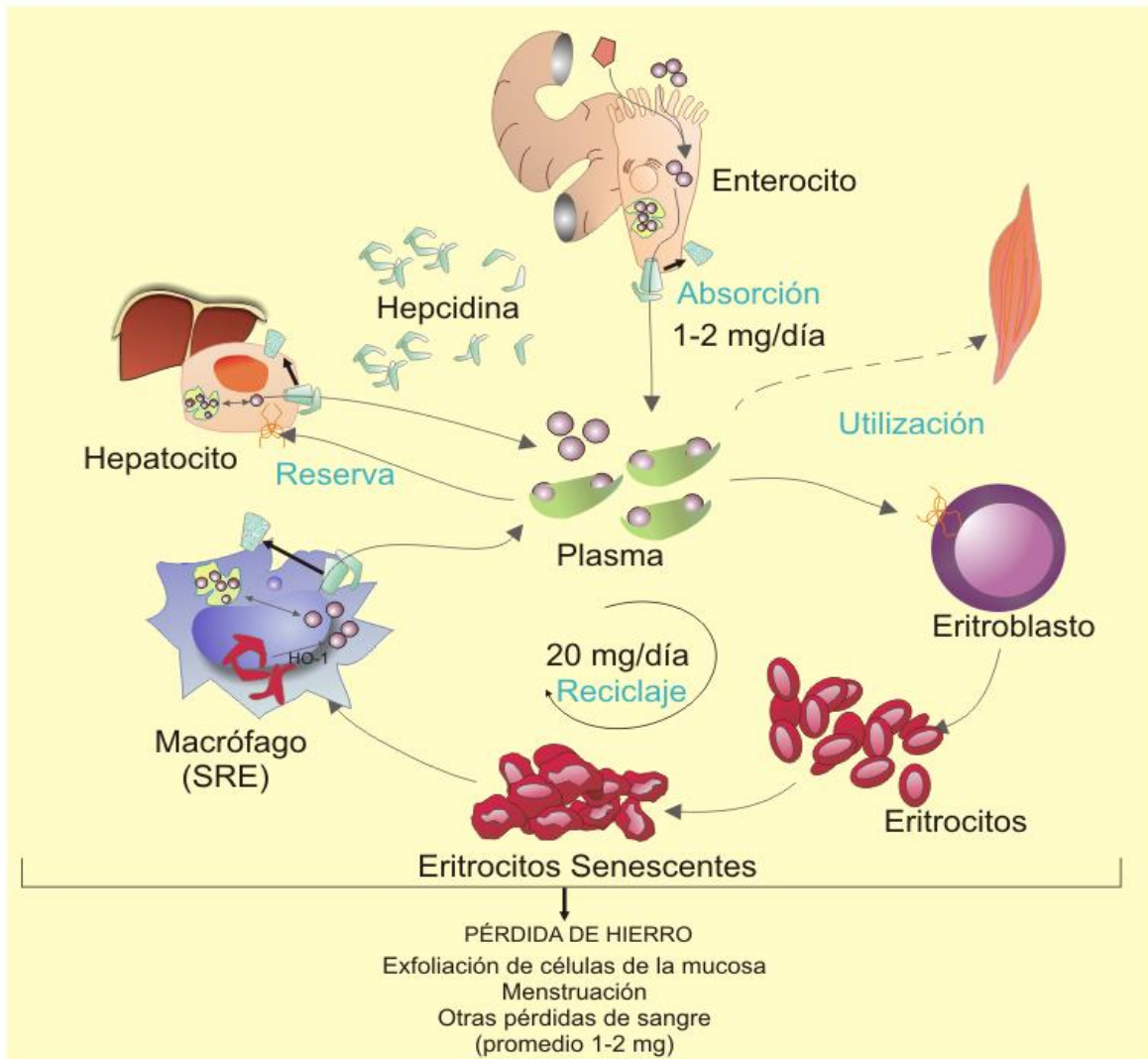


Figura 5. Distribución del hierro en el organismo. La hepcidina es secretada por los hepatocitos y regula el pasaje del hierro a la circulación (ver sección *Regulación*). SRE, sistema retículo endotelial; HO, hemooxigenasa. Adaptado de N Engl J Med. 1999;341:1986-95.

c) *Regulación.*

La homeostasis del hierro en el organismo se consigue mediante la regulación de la absorción intestinal. Esta regulación consiste en: a) un aumento de la absorción en respuesta a bajos depósitos de hierro, a la presencia de hipoxia

y al aumento de los requerimientos eritropoyéticos, y b) una disminución de la absorción en situaciones de inflamación o SH (Andrews, NC 1999).

Estudios recientes demostraron que la molécula responsable de orquestar la regulación del metabolismo del hierro es un péptido de síntesis hepática denominado hepcidina (Park, CH y col. 2001). El mecanismo de acción de la hepcidina consiste en mediar la internalización, ubiquitinización y posterior degradación de la Fpn presente en células intestinales, hepatocitos, y macrófagos (Figura 5) (Rivera, S y col. 2005; De Domenico, I y col. 2007). Consecuentemente, ante aumentos de hepcidina se imposibilita la salida del hierro de depósito desde estas células hacia la circulación, logrando la inmovilización del hierro. Así, ratones *knock out* que no expresaban hepcidina sufrían de SH asociada a mayor absorción intestinal (Nicolas, G y col. 2001), mientras que aquellos ratones que la sobreexpresaban padecían anemia (Nicolas, G y col. 2002). La expresión de hepcidina está sujeta a cambios en los niveles del hierro en el hepatocito y en la circulación, a las necesidades eritropoyéticas y a la inflamación. Los mecanismos moleculares, descritos hasta el momento, involucrados en la expresión de hepcidina se resumen en la figura 6.

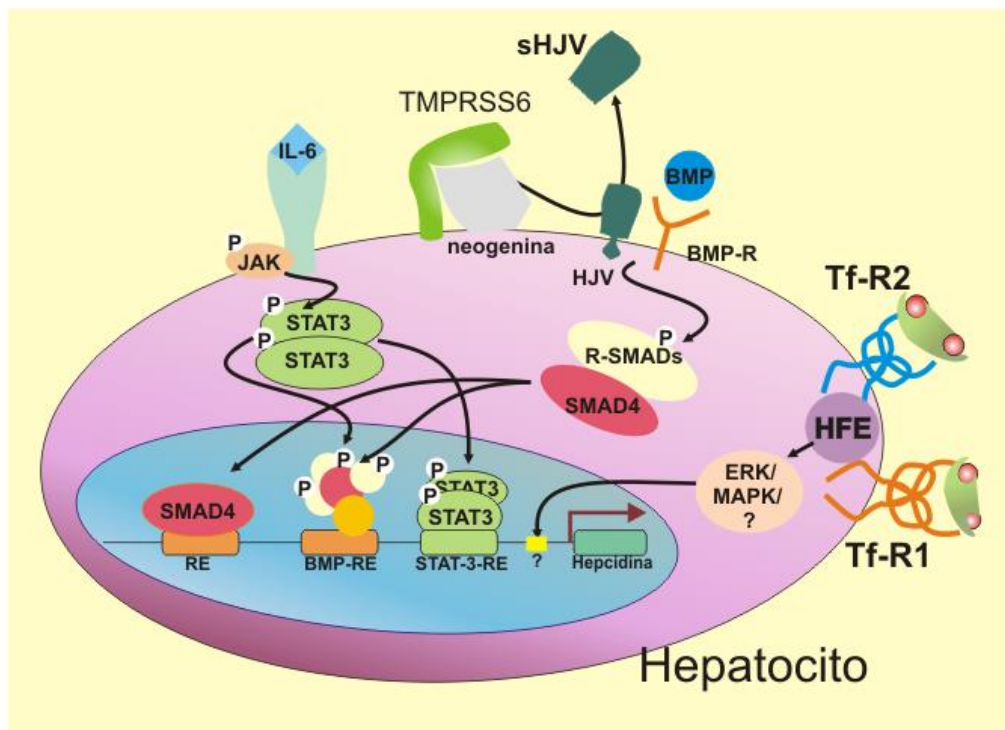


Figura 6. Regulación de la expresión de hepcidina. BMP, proteína morfogénica del hueso; Tf, transferrina; HJV, hemojuvelina; IL, interleuquina; RE, elemento de respuesta; TMPRSS6, serina 6 proteasa transmembrana; JAK, quinasa de Janus; STAT, transductor de señales y activador de la transcripción; ERK, quinasa regulada por señales extracelulares; MAPK, proteína quinasa activada por mitógenos; SMAD, proteínas relacionadas con Sma y Mad. Adaptado de Curr Opin Hematol. 2013;20:208-14.

1.2.2. Alteraciones del metabolismo del hierro: sobrecarga de hierro.

a) *Etiología y epidemiología.*

Según su etiología, la SH se clasifica en primaria y secundaria. Entre las causas primarias, se incluyen enfermedades de origen genético como: hemocromatosis hereditaria (HH), enfermedad por Fpn, atranferrinemia y aceruloplasminemia. Entre las causas secundarias, se encuentran: hemoglobinopatías talasémicas, patologías inflamatorias y alteraciones

metabólicas como la esteatosis hepática no alcohólica (Piperno, A 1998; Riva, A y col. 2008).

El modelo humano de SH primaria más estudiado es la HH, una patología de herencia autosómica recesiva que afecta a aproximadamente uno de cada doscientos descendientes de individuos de Europa del Norte. El gen afectado en este caso es el HFE que codifica para una proteína que participa en la vía de señalización del receptor de Tf-1 y Tf-2, cuya finalidad es aumentar la expresión de hepcidina en respuesta a elevaciones de los niveles de hierro circulante (Burke, W y col. 1998) (Figura 6). Las mutaciones más frecuentes en el gen HFE reportadas mundialmente son la C282Y y la H63D, seguidas en prevalencia por la mutación S65C (Mura, C y col. 1999). Estas mutaciones afectan la capacidad de respuesta del hepatocito para aumentar la expresión de hepcidina ante aumentos del hierro en circulación. Por lo tanto, la HH se caracteriza por cursar con bajos niveles de hepcidina y SH debido a una absorción desregulada del hierro dietario.

b) Evolución y diagnóstico.

La HH presenta una edad de manifestación variable ya que durante el crecimiento las grandes demandas de hierro previenen la SH. Por lo tanto, en estos pacientes, la SH se desarrollaría, por lo general, en la vida adulta y con mayor frecuencia en hombres que en mujeres (Allen, KJ y col. 2008). Así, en el desarrollo de SH en pacientes con mutaciones del gen HFE, tienen una fuerte influencia diversos factores genético-ambientales (Pietrangelo, A 2004).

En una primera etapa, el paciente portador de mutaciones en el gen HFE en presencia de condiciones predisponentes (consumo elevado de alcohol, hepatitis virales, etc.) desarrolla una expansión del pool plasmático de hierro, evidenciado como un aumento de la saturación de Tf. Esta expansión responde tanto a la desregulación de la absorción intestinal de hierro, así como a la incapacidad del individuo de retener hierro en los macrófagos del sistema retículo endotelial (Pietrangelo, A 2004). En consecuencia, existe un aumento de la proporción de hierro que circula como NTBI y el hierro en el organismo se

redistribuye depositándose principalmente en hígado, páncreas y corazón (Subramaniam, VN y col. 2012). El incremento gradual de los depósitos de hierro en los distintos tejidos se traduce en un aumento de la concentración plasmática de ferritina, el cual correlaciona con la aparición de las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Pietrangelo, A 2004).

Los pacientes con HH se caracterizan por presentar: a) alteraciones de la función hepática, consecuencia de la sobrecarga hepática de hierro, b) alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono, relacionadas a SH en páncreas, c) hiperpigmentación, debido a acumulación de hierro en piel, y d) artropatías, en respuesta a la acumulación de hierro en las articulaciones (Pietrangelo, A 2004; Allen, KJ y col. 2008). Adicionalmente, los pacientes pueden presentar alteraciones en la función cardíaca debido al daño mediado por hierro en tejido muscular cardíaco (Pietrangelo, A 2004; Allen, KJ y col. 2008).

Para el diagnóstico de la HH, se sugiere el dosaje del porcentaje de saturación de Tf y la concentración de ferritina, seguido por diagnóstico molecular y, de ser necesaria, biopsia hepática (Pietrangelo, A 2004; Piperno, A 2013). La saturación de Tf sería el primer parámetro bioquímico en verse alterado en la HH, y, por lo tanto, el más sensible. Este hecho se fundamenta en que en la fisiopatología de la HH la expansión del pool plasmático de hierro ocurre antes de su acumulación en los tejidos (Baer, DM y col. 1995; Adams, PC y col. 2005). Sin embargo, la saturación de Tf posee alta variabilidad y baja especificidad para el diagnóstico de HH (Adams, PC y col. 2007; Waalen, J y col. 2008). Por lo tanto, en la práctica clínica, ante la sospecha de HH se recomienda el estudio de la saturación de Tf y la concentración de ferritina acompañadas por el hepatograma (Bacon, BR y col. 2011). En caso de que un paciente presente valores alterados de saturación de Tf, acompañado o no por aumentos de ferritina y enzimas hepáticas, se recomienda realizar el estudio de las mutaciones H63D y C282Y del gen HFE (Pietrangelo, A 2004; Bacon, BR y col. 2011; Piperno, A 2013). No obstante, es importante considerar que un test genético negativo no es suficiente para descartar la presencia de HH. De hecho, existen mutaciones poco frecuentes en el gen HFE que también se asocian a HH (Aguilar-Martinez, P y col. 2011; Del-

Castillo-Rueda, A y col. 2012). Por lo tanto, el método de elección y *gold estándar* para el diagnóstico de HH en aquellos pacientes que presentan elevaciones crónicas de la concentración de ferritina en ausencia de homocigosis para las mutaciones H63D o C282Y es la biopsia hepática. El patrón de acumulación de hierro compatible con HH consiste en siderosis hepatocelular, con escasos depósitos de hierro en las células de *Kupffer* (Pietrangelo, A 2004; Piperno, A 2013).

Respecto a los genotipos HFE asociados a HH, en nuestro país y en población hispana es más frecuente la presencia del alelo H63D por sobre el C282Y (de Diego, C y col. 2004; Rossetti, MV y col. 2009). Esta distribución alélica hallada en nuestro medio difiere claramente de la reportada para población de Europa del Norte, en la que el alelo C282Y es el más frecuente en pacientes con HH (Hanson, EH y col. 2001). Sin embargo, contrastando con las diferencias genotípicas que existen entre los pacientes con HH, no se han reportado diferencias significativas en el curso clínico de los pacientes afectados (homocigotos C282Y o no homocigotos) (Adams, P y col. 2009; Fracanzani, AL y col. 2010).

1.2.3. Alteraciones del metabolismo del hierro: deficiencia de hierro.

a) Etiología y Epidemiología.

La DH es un proceso silente que recién se manifiesta cuando se altera la síntesis de Hb y la función de transporte del oxígeno resulta comprometida. Es en este estadio avanzado de la DH que se observan las manifestaciones típicas del síndrome anémico: astenia, cansancio, disminución de la coloración de mucosas, etc. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la anemia como la disminución de la concentración de Hb por debajo de 13,0 g/dl para hombres y 12 g/dl para mujeres (WHO/UNICEF/UNU 2008).

En adultos, la DH está relacionada con disminución de los aportes o aumento de las pérdidas de hierro. Entre las causas de disminución de los

aportes, se encuentran dieta inadecuada y absorción alterada que pueden ser consecuencia de enfermedad celíaca, aclorhidria y cirugía bariátrica, entre otras. Por otro lado, el aumento en las pérdidas de hierro puede deberse a: sangrado de origen gastrointestinal asociado a colitis ulcerosa, divertículos, hemorroides, consumo crónico de aspirina, o sangrados de origen uterino (Clark, SF 2009).

Se estima que la prevalencia de anemia en el mundo es del 37 %, siendo atribuible a la DH más del 50 % de los casos (WHO/UNICEF/UNU 2008). En nuestro país, datos de la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud (ENNyS) estimaron una prevalencia de anemia ligeramente menor a la global, aproximadamente del 20 % (Ministerio de Salud de la Nación 2007). No obstante, de modo similar a lo reportado por la OMS, la DH fue identificada como la mayor causa de anemia. Entre las variables asociadas a su incidencia, los principales factores son el sexo femenino, necesidades básicas insatisfechas y embarazo (Marín, G y col. 2008; WHO/UNICEF/UNU 2008).

b) Evolución y diagnóstico.

Inicialmente, cuando las pérdidas superan la absorción de hierro o cuando ésta es inadecuada, existe una depleción gradual de los depósitos de hierro con la finalidad de mantener la síntesis de Hb a un nivel que asegure la oxigenación de los tejidos. La disminución del hierro de depósito se refleja en la menor concentración de ferritina (< 15 ng/ml), la cual es característica del primer estadio de la DH o deficiencia prelatente (Clark, SF 2009).

Si la situación que origina la DH no es revertida, se progresa al segundo estadio. En éste, la ferritina continúa disminuyendo pero también se ven otras alteraciones como: aumento de la concentración de Tf y de la amplitud de la distribución del tamaño eritrocitario (ADE), y disminución del porcentaje de saturación de Tf. Estos son marcadores medios y definen a la DH latente.

El último estadio de la DH se observa cuando ésta se manifiesta en la forma de anemia. Recién en esta etapa, se observan alteraciones del hemograma, como disminución de la Hb y de los índices hematimétricos [volumen corpuscular

medio (VCM) y hemoglobina corpuscular media (HCM)], además de profundizarse los cambios descritos anteriormente (Thomas, C y col. 2002; Clark, SF 2009). En conjunto, la anemia por DH (ADH) se caracteriza por ser una anemia microcítica, hipocrómica, con disminución de VCM y HCM, y un marcado descenso de la saturación de Tf y de la concentración de ferritina.

1.3. Relación entre el riesgo de enfermedad cardiovascular y las alteraciones del metabolismo del hierro.

Distintos estudios han sugerido un aumento del riesgo de ECV en pacientes con alteraciones del metabolismo del hierro. En particular, hace aproximadamente 30 años, Jerome Sullivan (Sullivan, JL 1981) postuló la hipótesis del hierro, la cual propone a la depleción de hierro, evitando la ADH, como un factor protector frente a la ECV. Si bien la hipótesis fue formulada pretendiendo explicar la diferencia en la incidencia de ECV entre hombres y mujeres posmenopáusicas en comparación con mujeres en edad fértil, los estudios derivados de ella abarcaron tanto a la reducción de hierro como alternativa para disminuir el riesgo cardiovascular, a la SH (evaluada a través de la concentración de ferritina) como factor de riesgo de ECV, así como a la asociación entre las mutaciones del gen HFE y la ECV.

Es de notar que también la ADH ha sido asociada a mayor mortalidad cardiovascular. Tanto el estudio ARIC (Sarnak, MJ y col. 2002), como los estudios VA-HIT (Chonchol, M y col. 2008) y AMORIS (Holme, I y col. 2012) demostraron que la presencia de anemia era una condición asociada a mayor riesgo de ECV en mujeres.

A pesar de estos resultados, la asociación entre las alteraciones del metabolismo del hierro y el riesgo de ECV aún no se encuentra completamente avalada por los estudios clínicos. En contraste, a nivel molecular diversas investigaciones confirmaron el depósito de hierro en placas ateroscleróticas y asociaron sus niveles con la progresión de las lesiones y la incidencia de eventos cardiovasculares mayores (Stadler, N y col. 2004; Stanley, N y col. 2006; Lapenna, D y col. 2007). Por lo tanto, si bien el metabolismo del hierro y sus alteraciones

influyen en la fisiopatología de la ECV, los mecanismos involucrados y su impacto en el contexto clínico resultan poco conocidos. Más importante aún, todavía es desconocido el potencial preventivo o terapéutico del mantenimiento de la homeostasis del hierro en referencia al riesgo cardiovascular.

1.3.1. Sobrecarga de hierro.

a) Depleción de hierro como factor preventivo. Hipótesis del hierro.

En apoyo a la hipótesis del hierro (Sullivan, JL 1981), la relación entre disminución de hierro por donación de sangre y menor riesgo de padecer ECV ha sido avalada por distintos estudios (Salonen, JT y col. 1998; Meyers, DG y col. 2002). Sin embargo, el tema es controvertido, ya que Ascherio y col. (Ascherio, A y col. 2001) no observaron diferencias en el riesgo de ECV entre donantes de sangre frecuentes y no frecuentes. Paralelamente, estudios de la función endotelial y de marcadores de aterosclerosis subclínica, llevados a cabo en dadores de sangre en comparación con no dadores, resultaron también controvertidos (Zheng, H y col. 2005; Engberink, MF y col. 2008). Es probable que en estos estudios, la controversia sea parcialmente atribuible a diferencias en los niveles de hierro de depósito (determinados como la concentración sérica de ferritina) entre los grupos de donantes evaluados. En efecto, la donación de sangre no garantiza una efectiva depleción de los niveles de hierro, la cual sería necesaria para que se manifestase el efecto protector. Por lo tanto, para comprobar si la depleción de hierro, evitando la anemia por deficiencia, ejercía protección frente a la ECV, se implementó un protocolo de reducción de los niveles de hierro en pacientes en prevención cardiovascular secundaria (Zacharski, LR y col. 2007). En el citado estudio, si bien no se observaron diferencias significativas en el riesgo de infarto de miocardio o accidente cerebrovascular entre los pacientes tratados con flebotomías periódicas y los controles, se detectó una interacción significativa entre el tratamiento y la edad; no pudiendo descartarse el efecto beneficioso del tratamiento en pacientes jóvenes

(Zacharski, LR y col. 2007). Así, hasta el momento, la relación entre bajos niveles de hierro (equiparables con los de mujeres en edad fértil) y menor incidencia de ECV no ha sido fehacientemente comprobada.

b) Sobrecarga de hierro como factor de riesgo cardiovascular.

En paralelo a los primeros estudios destinados a confrontar la hipótesis del hierro (Sullivan, JL 1981), se analizó la existencia de una relación positiva entre el riesgo de ECV y el aumento de la concentración de ferritina. Al respecto, un estudio en población finlandesa de hombres observó que individuos con concentración de ferritina mayor o igual a 200 ng/ml presentaban dos veces mayor riesgo de infarto agudo de miocardio que individuos con menores concentraciones (Salonen, JT y col. 1992). A pesar de este primer reporte el rol del aumento de los depósitos de hierro como factor de riesgo de ECV fue cuestionado por estudios clínicos posteriores (Kiechl, S y col. 1997; Danesh, J y col. 1999; Knuiman, MW y col. 2003; Wolff, B y col. 2004; van der, AD y col. 2005).

No obstante, pese a la controversia existente, otros estudios describieron asociaciones entre la concentración de ferritina y bioindicadores de inflamación, disfunción endotelial y aterosclerosis. En particular, la concentración de ferritina correlacionó positivamente con la concentración de oxisteroles, LDL oxidadas, PCRus, IL-6, y moléculas de adhesión celular en diversas poblaciones (Tuomainen, TP y col. 2003; Brouwers, A y col. 2004; Ikeda, Y y col. 2006; van Tits, LJ y col. 2007; Depalma, RG y col. 2010). Más aún, se ha propuesto a la elevación de los depósitos de hierro como un componente del síndrome de resistencia insulínica y como factor de riesgo para alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono (Fernandez-Real, JM y col. 1998; Gillum, RF 2001; Brudevold, R y col. 2008). De hecho, estudios poblacionales describieron correlaciones positivas entre la ferritina y los niveles de glucosa en ayunas o el área bajo la curva de la prueba oral de tolerancia a la glucosa (POTG) (Tuomainen, TP y col. 1997). Asimismo, la SH demostró ser capaz de inducir resistencia a la insulina en adipocitos viscerales (Gabrielsen, JS y col. 2012).

En conclusión, pese a que hasta el momento los estudios clínicos no han podido definir al aumento de la concentración de ferritina como un factor de riesgo de ECV en la población general, existe abundante bibliografía que relaciona al exceso de hierro con la resistencia a la insulina y con bioindicadores de inflamación; no pudiéndose descartar un mayor riesgo en individuos de sexo masculino con concentraciones de ferritina significativamente elevadas.

c) Portadores de mutaciones del gen HFE, pacientes con hemocromatosis hereditaria y riesgo cardiovascular.

En línea con la hipótesis que postula al exceso de hierro como un factor de riesgo de ECV, se estudió si las mutaciones del gen HFE que predisponen a HH influían en la incidencia de eventos cardiovasculares. Al respecto, diversos estudios concluyeron que sólo la mutación H63D se asoció a riesgo de ECV (Njajou, OT y col. 2002; Ellervik, C y col. 2005; Ellervik, C y col. 2007; Dunn, T y col. 2008; Pankow, JS y col. 2008). En particular, Ellervik y col. (Ellervik, C y col. 2007) reportaron que los pacientes homocigotos para la mutación H63D presentaban entre 2 y 3 veces mayor riesgo de accidente cerebrovascular isquémico respecto a aquellos sin mutaciones en el gen HFE. De modo similar, Njajou y col. (Njajou, OT y col. 2002) destacaron que la mutación H63D exhibe una relación sinérgica con la hipertensión arterial y el hábito de fumar para aumentar el riesgo de ECV. En contraposición, recientemente un metaanálisis reportó que ni la mutación H63D ni la C282Y se encontraban asociadas a mayor riesgo cardiovascular (van der, AD y col. 2008). No obstante, los estimadores de riesgo para el alelo H63D fueron mayores que para el alelo C282Y. Es de notar que parte de la controversia respecto a estos estudios podría deberse a que las mutaciones que conducen a HH son factores predisponentes, pero por sí solos no conducen a SH. Más aún, el efecto de las mutaciones en mujeres en edad fértil se ve atenuado, debido a que en éstas la acumulación de hierro presenta una evolución diferente por el sangrado menstrual. Por lo tanto, los niveles de ferritina en cohortes de pacientes con mutaciones en el gen HFE son muy variables y no

representan un contraste adecuado a la hipótesis que plantea si los niveles aumentados de hierro constituyen un factor de riesgo para ECV.

Dado esta limitación, se estudió la función vascular y algunos biomarcadores de inflamación en grupos de pacientes con sobrecarga franca de hierro por HH en comparación con controles sanos. En estos estudios, todos los pacientes presentaban valores aumentados de ferritina y de saturación de Tf, y/o siderosis hepática detectada por biopsia. Gaenzer y col. (Gaenzer, H y col. 2002) demostraron que los pacientes de sexo masculino presentaban disfunción endotelial, determinada por el espesor íntima-media y la dilatación dependiente de flujo, en comparación con controles sanos pareados por sexo. Más aún, apoyando el rol de la SH como agente causal, la función endotelial aumentó en respuesta a la reducción de los niveles de hierro por flebotomía (Gaenzer, H y col. 2002). Por otro lado, los pacientes con HH presentaron mayor riesgo de diabetes (Acton, RT y col. 2006) y un incremento en la concentración de TG (Solanas-Barca, M y col. 2009). Por lo tanto, se puede concluir que, si bien no se ha demostrado un efecto de las mutaciones del gen HFE sobre el riesgo de ECV, los pacientes de sexo masculino con sobrecarga franca de hierro asociada a HH poseen alteraciones en la función vascular y resistencia a la insulina, lo cual apoyaría la relación entre la concentración de ferritina y el riesgo de ECV en los pacientes con HH.

Respecto a los mecanismos que sustentan estas asociaciones, numerosos estudios resaltan el rol prooxidante del hierro. Sin embargo, el papel de las alteraciones metabólicas en pacientes con HH ha sido muy poco estudiado en relación al riesgo cardiovascular. Al ser frecuente el hallazgo de alteraciones en el metabolismo de la glucosa en pacientes con HH, sería posible el desarrollo de alteraciones en las lipoproteínas así como de un estado proinflamatorio que aumentaría la susceptibilidad de los individuos afectados al desarrollo de aterosclerosis y sus consecuencias clínicas.

1.3.2. Deficiencia de hierro.

Diversos estudios epidemiológicos detectaron asociaciones significativas entre la anemia o la DH y el riesgo de ECV en mujeres en edad reproductiva. Tanto el estudio ARIC (Sarnak, MJ y col. 2002), como los estudios VA-HIT (Chonchol, M y col. 2008) y AMORIS (Holme, I y col. 2012) demostraron que la presencia de anemia era una condición asociada a mayor riesgo de ECV en mujeres. Más aún, resaltando el rol de la DH, el estudio DAN-MONICA (Friedrich, N y col. 2009) describió que a partir de valores de ferritina menores a 50 ng/ml, el riesgo de ECV de las mujeres aumentaba progresivamente. Si bien estos estudios sugieren una relación entre la anemia y la ECV, los mecanismos que sustentarían esta asociación se encuentran actualmente en estudio. Algunos de los factores postulados fueron mayor actividad simpática, sobreactivación del eje renina-angiotensina-aldosterona y un estado proinflamatorio, entre otros (Holme, I y col. 2012).

En paralelo, diversos estudios asociaron la ADH con alteraciones en marcadores de estrés oxidativo y menor actividad de enzimas antioxidantes (Kurtoglu, E y col. 2003; Aslan, M y col. 2007; Sundaram, RC y col. 2007). En este contexto, el aumento del estrés oxidativo podría explicar el mayor riesgo de ECV asociado a la ADH. Particularmente, Sundaram y col. (Sundaram, RC y col. 2007), al estudiar un grupo de mujeres en edad fértil con ADH severa (Hb < 8 g/dl), describieron mayores concentraciones de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), un marcador de estrés oxidativo, respecto a controles sanas. A su vez, en el mismo trabajo, el tratamiento con hierro por vía oral durante un mes disminuyó los valores de TBARS sugiriendo a la ferropenia como la causa. Asimismo, la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa se encontraron disminuidas en pacientes anémicas (Kurtoglu, E y col. 2003). En consecuencia, dado un aumento del estrés oxidativo en las pacientes con ADH, una reducción de la biodisponibilidad del óxido nítrico, así como un aumento de la oxidación de las LDL podrían precipitar el desarrollo de disfunción endotelial y aterosclerosis (Stocker, R y col. 2004).

Adicionalmente, la actividad de PON-1, una enzima antioxidante asociada exclusivamente a las HDL, se encontró también alterada en mujeres con ADH

(Aslan, M y col. 2007). El deterioro de la funcionalidad de las HDL podría contribuir al desarrollo de injuria endotelial en la ADH (Aslan, M y col. 2007). De hecho, se ha demostrado que la actividad de PON-1 resulta crucial para que las HDL protejan a las células endoteliales contra el daño mediado por fosfolípidos oxidados, liberados por acción de la Lp-PLA₂ sobre las LDL oxidadas (Ahmed, Z y col. 2003). Las actividades de PON-1 y Lp-PLA₂, y los niveles de LDL oxidadas en pacientes con ADH aún no han sido estudiados.

La ADH no sólo se ha asociado con disminución de la PON-1, sino también con la presencia de dislipemia (Aslan, M y col. 2007). Estas alteraciones lipoproteicas consistieron principalmente en reducción de los niveles de C-HDL. De modo interesante, esta alteración lipoproteica se encuentra comúnmente asociada a aumento de la actividad de CETP. Debido a que la CETP intercambia TG y CE entre las lipoproteínas, un aumento de su actividad es compatible con la presencia de HDL enriquecidas en TG y potencialmente disfuncionales. La evaluación de la composición química y funcionalidad de las HDL en pacientes con ADH no ha sido abordada hasta el momento. En este contexto, los resultados recientes sobre la funcionalidad de las HDL y el riesgo cardiovascular (Khera, AV y col. 2011) justifican aún más el estudio de la funcionalidad de las HDL en la ADH.

Por otro lado, evidencias de estudios *in vitro* sustentan una relación entre la DH, la anemia y un estado proinflamatorio. La situación de baja hepcidina característica de la DH se encontró asociada a un estado proinflamatorio y a una exacerbada respuesta de macrófagos frente al tratamiento con lipopolisacáridos (Pagani, A y col. 2011). De modo similar, se observó que la DH estimula la secreción de metaloproteasas de los macrófagos con capacidad de promover la ruptura de placas ateroscleróticas (Fan, Y y col. 2011).

En conjunto, el estrés oxidativo y el estado proinflamatorio favorecerían la expresión de moléculas de adhesión por las células endoteliales y el proceso inflamatorio de la vasculatura en la ADH. En este contexto, los diversos factores que podrían explicar el mayor riesgo de ECV en pacientes con ADH, particularmente en mujeres, han sido poco estudiados.

2. Hipótesis.

La SH y la DH estarían asociadas a mayor proclividad al desarrollo de procesos inflamatorios, disfunción endotelial y posterior generación de lesiones ateroscleróticas.

Estos componentes constitutivos de la ECV podrían estar inducidos por un perfil lipoproteico proaterogénico, alteraciones de la composición química de las lipoproteínas y modificaciones de la actividad de CETP. Más aún, en estas condiciones patológicas se podría evidenciar un estado proinflamatorio subyacente a través del hallazgo de aumento de los niveles de marcadores inflamatorios como ser PCRus, IL-6, moléculas de adhesión endotelial y/o Lp-PLA₂. Por otro lado, si los niveles plasmáticos de LDL oxidadas o la susceptibilidad de las LDL a la oxidación estuviesen aumentados, inclusive en presencia de las HDL, se podría asumir una mayor frecuencia de eventos oxidativos en la pared arterial, cuya relación con la aterosclerosis es bien conocida.

Específicamente en los pacientes con SH, la resistencia insulínica, en conjunto con las modificaciones antes mencionadas, podría explicar la disfunción endotelial. Más aún, frente a concentraciones crecientes de hierro sería posible evidenciar una mayor secreción de moléculas proaterogénicas, entre las cuales se ubicarían citoquinas proinflamatorias y la Lp-PLA₂. De este modo, se estaría aportando información respecto al rol del hierro en relación a la ocurrencia de procesos inflamatorios a nivel de la pared arterial.

Específicamente en pacientes con ADH, dichos fenómenos se verían favorecidos por una menor actividad antioxidante de las HDL, debido principalmente a disminución de la actividad de la enzima PON-1.

En caso de que las alteraciones observadas sean corregidas mediante la reducción de los niveles de hierro en la SH y la administración de hierro en la ADH; el rol de las alteraciones del metabolismo del hierro en la instauración de un estado proaterogénico sería corroborado.

3. Objetivos.

3.1. Objetivos generales.

Evaluar el rol de los niveles de hierro sobre la inflamación, la disfunción endotelial y la aterosclerosis a través de la caracterización de sus bioindicadores en pacientes con sobrecarga y deficiencia de hierro en comparación con controles sanos, y estudiar el impacto de sus respectivos tratamientos.

3.2. Objetivos específicos.

A. En pacientes con SH y en pacientes con ADH, en comparación a controles sanos pareados por sexo y de edades similares:

1. Determinar características clínicas y bioquímicas generales.
2. Caracterizar los parámetros ferrocinéticos.
3. Evaluar el metabolismo de los hidratos de carbono a través de los biomarcadores de resistencia a la insulina.
4. Evaluar el metabolismo lipoproteico a través del perfil de lípidos y lipoproteínas y de la actividad de CETP, encargada del remodelamiento lipoproteico en circulación.
5. Estudiar marcadores plasmáticos de estrés oxidativo, la actividad de la enzima antioxidante asociada a HDL, PON-1, y la concentración de LDL oxidadas.
6. Determinar bioindicadores de inflamación sistémica y vascular, tales como la PCRus, la actividad de Lp-PLA₂, y los niveles de la molécula de adhesión VCAM-1.
7. Aislar las HDL por ultracentrifugación y caracterizar su composición química.
8. Evaluar la funcionalidad de las HDL aisladas.
9. Analizar la asociación entre los parámetros ferrocinéticos, utilizados para definir cada condición, y las determinaciones realizadas.

B. Una vez lograda la meta terapéutica por flebotomía en el caso de los pacientes con SH y por administración de hierro en los pacientes con ADH:

1. Estudiar el metabolismo de los hidratos de carbono.
2. Evaluar el metabolismo lipoproteico.
3. Caracterizar el estado proinflamatorio.

4. Materiales y métodos.

4.1. Diseño y descripción de los estudios.

Estudios transversales y longitudinales en pacientes de sexo masculino con SH y de sexo femenino con ADH.

a) Sobrecarga de hierro.

En el caso de los pacientes con SH, se estudiaron transversalmente los siguientes grupos de sujetos:

- i) 20 pacientes con SH y 20 controles provenientes del Servicio de Hematología del Hospital Italiano de Buenos Aires.
- ii) 18 pacientes con SH y 16 controles provenientes del Servicio de Hepatología del Hospital de Clínicas “José de San Martín”.

El estudio longitudinal se llevó a cabo en los pacientes pertenecientes al grupo i. Se estableció como punto de reevaluación el momento en el que los pacientes alcanzasen una concentración de ferritina < 100 ng/ml (Bacon, BR y col. 2011).

b) Deficiencia de hierro.

En el caso de los sujetos con ADH, se estudió transversalmente un grupo compuesto por 24 pacientes y 24 controles. Posteriormente, se realizó un estudio anidado seleccionando aleatoriamente a 18 pacientes con ADH en comparación a sus respectivos controles.

Los estudios longitudinales en el grupo principal incluyeron tanto una reevaluación luego de 72 hs de administrada una infusión endovenosa de hierro sacarato (300mg) por goteo lento (indicadas según criterio clínico del médico hematólogo), así como una vez resuelta la anemia (concentración de Hb > 12 g/dl).

4.2. Sujetos.

a) **Sobrecarga de hierro.**

Los pacientes con SH provinieron del Servicio de Hematología del Hospital Italiano de Buenos Aires y del Servicio de Hepatología del Hospital de Clínicas “José de San Martín”. En ambos estudios, se utilizó la técnica *gold standard* como criterio diagnóstico para SH primaria compatible con HH. Este criterio implica la visualización directa de un aumento de los depósitos de hierro con distribución hepatocelular en una muestra de tejido. A su vez, todos los pacientes seleccionados fueron adultos (> 18 años) de sexo masculino y presentaron alteraciones en los parámetros ferrocinéticos (saturación de Tf > 50 % o concentración sérica de ferritina > 300 ng/ml).

Se excluyeron del estudio aquellos individuos que presentaban: a) diagnóstico previo de diabetes, b) hipotiroidismo, c) cirrosis, d) hepatitis virales, e) infección por HIV, f) cáncer, g) patologías renales, h) consumo excesivo de tabaco (> 10 cigarrillos/día) o alcohol (> 40 g/día), i) terapia con drogas que pudiesen afectar el metabolismo glucídico, lipídico o con antioxidantes, y j) valores de ferritina compatibles con la fase de mantenimiento del tratamiento de depleción de hierro (ferritina < 100 ng/ml). De este modo, se evaluaron 20 pacientes provenientes del Hospital Italiano de Buenos Aires y 18 pacientes del Hospital de Clínicas “José de San Martín” que fueron comparados con controles de sexo masculino, sin mutaciones del gen HFE y con edad y características socio-económicas similares (n = 20 y 16, acorde al grupo estudiado). Todos los sujetos firmaron el consentimiento informado para participar del protocolo, el cual fue aprobado por los Comités de Ética del Hospital Italiano de Buenos Aires y del Hospital de Clínicas “José de San Martín”, según el grupo estudiado, además de contar en ambos casos con el aval del Comité de Ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

Los pacientes con SH provenientes del Hospital Italiano de Buenos Aires fueron seguidos durante el tratamiento mediante flebotomías periódicas (cada 2, 3 o 4 meses, según el caso particular) La meta terapéutica fue un valor de ferritina < 100 ng/ml. En el transcurso del protocolo (años 2008 - 2010) 11 de 20 sujetos alcanzaron dicha meta. El tiempo de seguimiento varió entre los 15 y 20 meses acorde a los valores iniciales de ferritina.

b) Deficiencia de hierro.

Se estudiaron pacientes mayores de edad, de sexo femenino con ADH provenientes del Servicio de Hematología del Hospital Italiano de Buenos Aires. El criterio diagnóstico de ADH estuvo compuesto por: concentración de Hb < 12 g/dl, VCM < 80 fl, ADE > 14,5 %, saturación de Tf < 15 % y concentración de ferritina < 15 ng/ml. Aquellas pacientes que cumplieron con alguno de los siguientes criterios fueron excluidas del estudio: a) diagnóstico de diabetes o algún otro tipo de patología endócrina, b) padecer afecciones hepáticas o renales, c) presentar alguna patología inflamatoria que pudiese cursar con anemia, tales como colitis ulcerosa, artritis reumatoidea y enfermedad celíaca, entre otras, d) cursar algún proceso inflamatorio agudo (PCRus > 10 mg/l), e) tabaquismo (> 10 cigarrillos/día) o abuso de alcohol (> 40 g/día) y f) tratamiento con drogas que pudiesen afectar el metabolismo de los hidratos de carbono y de los lípidos, al igual que la toma periódica de anticonceptivos orales o suplementos con antioxidantes. De este modo, se incluyeron en el estudio 24 pacientes que fueron comparadas con un grupo de mujeres normolipémicas, pareadas por edad y características socio-económicas con las pacientes. Todas las personas involucradas en el estudio firmaron el consentimiento informado y el protocolo fue aprobado por los Comités de Ética del Hospital Italiano de Buenos Aires y de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA.

De las 24 pacientes estudiadas, 16 fueron tratadas mediante infusión endovenosa por goteo lento de 300 mg de hierro sacarato (Venofer®, Vifor Pharma, Glattbrugg, Suiza) administrados durante 2 hs. Estas pacientes fueron

reevaluadas transcurridas 72 hs de la infusión. En sólo dos casos, la evaluación basal no coincidió con el momento previo a la infusión endovenosa de hierro. Para estas pacientes, el tiempo transcurrido entre el día de la evaluación basal y de la infusión endovenosa de hierro fue de 5 y 10 días. Por otro lado, las 9 pacientes restantes fueron tratadas con hierro administrado por vía oral. Del total de pacientes estudiadas inicialmente (n = 24), 7 lograron finalizar el protocolo (todas ellas bajo tratamiento con hierro endovenoso). Estas pacientes fueron reevaluadas al confirmarse la resolución de la anemia (Hb > 12 g/dl). El tiempo de seguimiento varió entre los 7 y 9 meses.

4.3. Muestras.

En todos los casos, se extrajo sangre de la vena antecubital entre las 08.00 y 10.00 hs, luego de 12 hs de ayuno previo. Adicionalmente, como parte del estudio del grupo de pacientes con SH del Hospital de Clínicas “José de San Martín”, se realizó una prueba oral de tolerancia a la glucosa (POTG, 75 g de glucosa anhidra en 350 ml) con extracciones de sangre a los 0, 30, 60, 90 y 120 minutos. Para la obtención del suero, los tubos fueron centrifugados a 1.500 x g durante 15 minutos a 4° C. Se guardaron alícuotas a 4° C para las determinaciones bioquímicas generales que fueron realizadas en un período inferior a 3 días y a -70° C para la evaluación de los otros parámetros estudiados. La alícuota de suero destinada a realizar el fraccionamiento de las lipoproteínas por ultracentrifugación, seguido de ensayos funcionales, fue adicionada con un 10 % de sacarosa como criopreservante previo al congelamiento (CF=0,6 % V/V) (Kekulawala, JR y col. 2008). Asimismo, de todos los individuos estudiados se extrajo sangre entera para la determinación del hemograma completo. En todos los sujetos de sexo masculino evaluados, se utilizó una alícuota adicional de sangre entera para realizar el estudio de las mutaciones del gen HFE.

4.4. Características clínicas.

En todos los pacientes, se evaluaron signos y síntomas típicos de las patologías en estudio y se midieron peso, altura y presión arterial. La altura y el peso se determinaron vistiendo ropas ligeras y sin calzado. Se calculó el índice de masa corporal (IMC) y los sujetos fueron clasificados en normopeso, sobrepeso u obesos acorde a la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS 2000). La presión arterial se midió en 3 oportunidades luego de 5 minutos de reposo con un esfigmomanómetro certificado (Welch-Allyn, USA) desinflado a un ritmo de 2 mm Hg por segundo. Se consideró válido el promedio de las dos últimas determinaciones. En los diferentes estudios, se definió hipertensión acorde a las guías internacionales (Chobanian, AV y col. 2003)

También, se realizó una anamnesis exhaustiva, la cual abordó, entre otros aspectos, el tiempo de evolución de la enfermedad y los hábitos alimentarios.

4.5. Genotipificación del gen HFE.

Se realizaron los estudios para las mutaciones H63D y C282Y en el gen HFE por reacción en cadena de la polimerasa y análisis de la longitud de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP) (Rey, J y col. 2011). Se amplificó el material genético de interés mediante PCR, diseñando 2 juegos de *primers* específicos dirigidos contra los exones 2 y 4 del gen HFE. Para la detección de las mutaciones puntuales H63D y C282Y, se realizó una digestión con enzimas de restricción, Rsa I, Bcl I y Hinf I, y se evaluaron los productos de digestión por electroforesis horizontal en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. El genotipo fue asignado acorde a los patrones de corte observados.

4.6. Determinaciones bioquímicas generales.

Se analizó el hemograma completo en un autoanalizador Coulter GEN S[®] (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EEUU). Se midieron las concentraciones de Tf, apolipoproteína (apo) A-I y apo B por inmunonefelometría (IMMAGE[®], Beckman Coulter, Fullerton, CA, EEUU) y la concentración sérica de ferritina mediante un

ensayo automatizado de electroquimioluminiscencia (VITROS® ECiQ, Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan City, NJ, EEUU). Se determinaron los niveles de hierro, glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, TG, colesterol total (CT) y el hepatograma completo por métodos estandarizados (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) en un autoanalizador Hitachi 917 (Hitachi, Tokio, Japón). La saturación de Tf se determinó por cálculo.

Las concentraciones de C-LDL y C-HDL fueron medidas utilizando métodos de precipitación selectiva. Se determinó el colesterol de las HDL aisladas en el sobrenadante obtenido luego de la precipitación selectiva de las lipoproteínas con apo B utilizando reactivo precipitante 0,44 mmol/l ácido fosfotúngtico en presencia de iones magnesio (Warnick, GR y col. 1982). Se evaluó el nivel de C-LDL como la diferencia entre el colesterol total y el colesterol contenido en el sobrenadante obtenido después de la precipitación selectiva de LDL con 10 g/l polivinil sulfato en polietilenglicol (600 Da; 2,5% P/V; pH 6,7) (Assmann, G y col. 1984). El C-VLDL fue calculado mediante la siguiente fórmula: $CT - (C-HDL + C-LDL)$. También fueron calculados los índices TG / C-HDL, C-VLDL / TG y CT / C-HDL.

Los coeficientes de variación (CV) intraensayo para las determinaciones de glucosa, CT, TG, creatinina y urea fueron 2,0 %; 1,1 %, 1,3 %, 2,7 % y 2,4 %, respectivamente. Los CV interensayo fueron 2,8 %; 1,5 %, 2,4 %, 3,1 % y 2,7 %, respectivamente. Los CV intraensayo e interensayo para C-HDL fueron 3,2 % y 3,8 %, respectivamente. Los CV intra e interensayo para C-LDL fueron 4,7 % y 5,0 %, respectivamente. Los CV intra e interensayo de las determinaciones por nefelometría fueron: para apo A-I 1,9 % y 2,4 %, respectivamente, para apo B 1,2 % y 2,1 %, respectivamente, y para Tf 1,3 % y 1,8 %, respectivamente. Se expresaron todos los resultados del perfil de lípidos y lipoproteínas, glucosa, creatinina y urea como mg/dl. Los CV intra e interensayo para la determinación de ferritina fueron < 4,3 % y < 5,7 %, respectivamente, y sus resultados fueron expresados como ng/ml.

4.7. Marcadores de inflamación, estrés oxidativo y aterosclerosis.

a) Proteína C reactiva ultrasensible.

La concentración de PCRus se midió por un ensayo inmunoturbidimétrico ultrasensible (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Se expresaron los resultados como mg/l. Los CV intra e interensayo para la determinación fueron < 2,7 % y < 4,0 %, respectivamente.

b) Interleuquina-6.

La concentración de IL-6 se determinó por método de enzimoimmunoensayo (ELISA) empleando un kit comercial que utiliza anticuerpos monoclonales específicos para IL-6 humana (R&D systems, MN, EEUU). Los resultados se expresaron como pg/ml. Todas las determinaciones hechas para cada estudio individual fueron realizadas en el mismo ensayo. El CV intraensayo fue 6,3 %.

c) Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.

Se determinó la concentración de TBARS mediante un método espectrofotométrico (Janero, DR 1990). Brevemente, se precipitaron las proteínas con 20 % P/V de ácido tricloroacético. Se aisló el sobrenadante y se adicionó ácido tiobarbitúrico al 0,7 % P/V utilizando ácido sulfúrico al 1 % P/V como solvente. La reacción se desarrolló durante 1 h a 100° C. Como patrón, se utilizó el tetraetoxipropano que es un generador de malondialdehído. Se determinó la absorbancia a 532 nm. Los resultados se expresaron como $\mu\text{moles/ml}$ (nM). Las determinaciones de los estudios longitudinales fueron realizadas de modo pareado. El CV intraensayo fue 5,6 %.

d) Actividad de la fosfolipasa A₂ asociada a lipoproteínas.

La actividad de la Lp-PLA₂ fue evaluada empleando el ensayo radiométrico previamente descrito (Blank, ML y col. 1983) con algunas modificaciones. La

extracción del acetato marcado, liberado luego de la acción de la enzima sobre el sustrato lipídico, fue realizada mediante partición líquido-líquido y, para su cuantificación, se midió la radioactividad de la fase acuosa. Brevemente, la mezcla de reacción se compuso de suero diluido 1/50 y de 10 $\mu\text{mol/l}$ 1-hexadecil-2- ^3H]acetil-glicero-3-fosfocolina (actividad específica 25 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$; NEN Life Science Products, Boston, EEUU), disueltos en un volumen total de 0,5 ml de PBS, pH 7,4. El sustrato presente en el medio de reacción consistía en una mezcla entre las especies sin marca y marcada con tritio. Estos sustratos se encontraban disueltos en sus respectivos solventes, por lo cual fueron sometidos a evaporación secuencial bajo corriente de N_2 para luego ser redisueltos juntos en buffer PBS. A continuación, se realizó un paso de sonicación consistente en 1 ciclo de 5 minutos. Se llevó a cabo la incubación de la mezcla de reacción a 37° C durante 5 minutos. Se detuvo la reacción enzimática ubicando los tubos en baño de hielo y adicionando rápidamente 1,5 ml de cloroformo y se agitó vigorosamente. Posteriormente, se agregaron 0,5 ml de solución saturada de NaHCO_3 y se agitó nuevamente. Se centrifugaron los tubos a baja velocidad durante 15 minutos, se recuperó la fase acuosa y ésta fue lavada dos veces con cloroformo repitiendo los pasos de agitación y centrifugación en ambos casos. Finalmente, se midió la radioactividad de la fase acuosa de cada muestra y de los blancos en un contador de centelleo líquido (Packard 210 TR; Packard Instruments, Meridians, CT, EEUU). También, se midió la radioactividad del buffer sustrato. Se expresaron los resultados como μmol de factor activador de plaquetas liberado por ml de suero por hora de reacción. La medida de la actividad de la Lp-PLA₂ en la totalidad de las muestras pertenecientes a cada estudio individual fue realizada en el mismo ensayo. Las determinaciones de los estudios longitudinales fueron realizadas de modo pareado. El CV intraensayo fue 5,1 %.

e) *Lipoproteínas de baja densidad oxidadas.*

Los niveles plasmáticos de LDL oxidadas se determinaron por método de ELISA (Mercodia, Uppsala, Suecia) utilizando el anticuerpo monoclonal 4E6

desarrollado por Holvoet y col. (Holvoet, P y col. 1996). Este anticuerpo está dirigido contra un epítoto conformacional generado por la sustitución de los grupos amino de los residuos de lisina de la apo B-100 por grupos aldehídos resultantes de la peroxidación lipídica (Holvoet, P 2006). Se expresaron los resultados como UI/l. Todas las determinaciones hechas para cada estudio individual fueron realizadas en el mismo ensayo. El CV intraensayo fue 8,6 %.

4.8. Actividad de proteínas y enzimas asociadas a lipoproteínas.

a) *Actividad de la proteína transportadora de colesterol esterificado.*

Se determinó la actividad de CETP en muestras de suero siguiendo el método endógeno, radiométrico, previamente descrito (Lagrost, L y col. 1993) con pequeñas modificaciones. Para ello, se evaluó la capacidad del suero para promover la transferencia de colesterol esterificado tritiado desde la fracción de HDL₃ marcada biosintéticamente (³H-CE-HDL₃) (NEN Life Science Products, Boston, EEUU) hacia las lipoproteínas con apo B presentes en el suero evaluado. Se incubaron las muestras séricas con ³H-CE-HDL₃ (50 μmol/l de colesterol) e iodoacetato (1,5 mmol/l) en buffer tris salino (TBS, pH 7,4) durante 3 horas a 37° C. Luego de la incubación, se separaron las lipoproteínas con apo B de las HDL mediante el método de precipitación selectiva utilizando ácido fosfotúngstico (0,44 mmol/l) en presencia de iones magnesio. Se midió la radioactividad en la mezcla de reacción y en el sobrenadante que contenía la fracción de HDL en un contador de centelleo líquido (Packard 210 TR; Packard Instruments, Meridians, CT, EEUU). Se expresaron los resultados como porcentaje de colesterol esterificado tritiado transferido desde la fracción de HDL₃ hacia las lipoproteínas con apo B, por ml, por hora. Todas las determinaciones hechas para cada estudio individual fueron realizadas en el mismo ensayo. Las determinaciones de los estudios longitudinales fueron realizadas de modo pareado. El CV intraensayo fue 4,9 %.

b) *Medida de la actividad de paraoxonasa 1.*

Se evaluó la enzima PON-1 empleando dos sustratos diferentes: paraoxón (actividad paraoxonasa propiamente dicha, PON) y fenilacetato (actividad arilesterasa, ARE). Se midieron ambas actividades siguiendo el método previamente descrito (Furlong, CE y col. 1989).

Se determinó la actividad PON añadiendo 20 μ l de suero a 2 ml de buffer TRIS / HCl (100 mmol/l, pH 8,0) conteniendo 2 mmol/l CaCl_2 , 1 mol/l NaCl y 2,6 mmol/l paraoxón (O,O-dietil-O-p-nitrofenil-fosfato, Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU). Se monitoreó la tasa de generación de p-nitrofenol a una longitud de onda de 405 nm y a una temperatura de incubación de 25° C, en un espectrofotómetro Hitachi U-1100 (Hitachi Ltd, Tokio, Japón). Se registró el aumento de la absorbancia en intervalos de 30 segundos durante un lapso de 5 minutos, luego de 30 segundos de un período de preincubación. Se calculó la actividad enzimática a partir del coeficiente de extinción molar (17.000 $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Se expresaron los resultados como nmol de paraoxón hidrolizado por ml de suero por minuto de reacción. La medida de la actividad PON en la totalidad de las muestras pertenecientes a cada estudio individual fue realizada en el mismo ensayo. Las determinaciones de los estudios longitudinales fueron realizadas de modo pareado. El CV intraensayo fue 5,5 %.

Se evaluó la actividad ARE añadiendo 20 μ l de suero diluido 1/20 a 2 ml de buffer TRIS / acetato (50 mmol/l, pH 7,8) conteniendo 20 mmol/l CaCl_2 y 4,4 mmol/l fenilacetato (Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU). Se monitoreó la tasa de generación de fenol a una longitud de onda de 270 nm y a una temperatura de incubación de 25° C, en un espectrofotómetro Hitachi U-1100 (Hitachi Ltd, Tokio, Japón). Se registró el aumento de absorbancia en intervalos de 30 segundos durante un lapso de 5 minutos, luego de 30 segundos de un período de preincubación. Se calculó la actividad enzimática a partir del coeficiente de extinción molar (1.310 $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Se expresaron los resultados como μ mol de fenilacetato hidrolizado por ml de suero, por minuto de reacción. Dado la labilidad del sustrato en solución acuosa, se evaluó el impacto de dicha inestabilidad en la medida de la actividad utilizando un blanco de hidrólisis espontánea. La medida de la actividad ARE en la totalidad de

las muestras pertenecientes a cada estudio individual fue realizada en el mismo ensayo. Las determinaciones de los estudios longitudinales fueron realizadas de modo pareado. El CV intraensayo fue 4,8 %.

c) Estimación del genotipo de paraoxonasa 1.

La evaluación de la actividad PON-1 empleando dos sustratos diferentes (fenilacetato y paraoxón) permite aplicar la metodología del doble sustrato para estimar el genotipo de PON-1 al cual pertenece un individuo dentro de un grupo. Esta metodología fue validada comparándola con el estudio genético de los alelos de PON-1 (Nevin, DN y col. 1996) y se concluyó que existía una correlación muy elevada entre ambos métodos. Mediante el cociente PON / ARE o, alternativamente, mediante un gráfico PON vs. ARE se puede asignar cada individuo a 1 de 3 fenotipos posibles: AA, AB o BB. Esta metodología fue aplicada a todas las poblaciones evaluadas, lo cual permitió validar el método empleado en nuestro laboratorio y, al mismo tiempo, disponer de la estimación del genotipo de PON-1 sin necesidad de realizar un estudio genético.

4.9. Marcadores de resistencia a la insulina y estimadores de la funcionalidad de la célula β .

Se midió la concentración de insulina por un radioinmunoensayo (RIA) comercial (DPC, Los Ángeles, CA, EEUU). Los resultados se expresaron en $\mu\text{U/ml}$. El CV intraensayo fue $< 5 \%$ y el interensayo $< 12 \%$. Se calculó el índice HOMA-IR mediante la fórmula $[\text{Glucosa (mmol/l)} \times \text{Insulina } (\mu\text{U/ml})] / 22,5$ (Bonora, E y col. 2000).

En los pacientes con SH que realizaron la POTG, se determinó la glucemia e insulinemia cada 30 minutos hasta completar el estudio a los 120 minutos. A partir de los datos de glucemia basal y a los 120 minutos post carga, se clasificó a los pacientes según las guías de la *American Diabetes Association* (ADA) como: glucemia alterada en ayunas, intolerancia a la glucosa o diabetes (American

Diabetes Association 2012). Adicionalmente, se calculó el índice de sensibilidad a la insulina de Matsuda acorde a la fórmula descrita originalmente (Matsuda, M y col. 1999). Se calcularon distintos índices de secreción de insulina, a nombrar: índice insulinogénico ($\Delta\text{Insulina}_{0-30} / \Delta\text{Glucosa}_{0-30}$), índice de secreción-sensibilidad de insulina (ISSI)-2 ($\text{AUC}_{\text{insulina}} / \text{AUC}_{\text{glucosa}}$) y el índice $\Delta\text{Insulina}_{0-120} / \Delta\text{Glucosa}_{0-120}$ (Muniyappa, R y col. 2008; Retnakaran, R y col. 2008). Se evaluó la relación hiperbólica entre el estimador de la sensibilidad a la insulina y el de la secreción mediante la regresión lineal entre los logaritmos de ambos parámetros (Retnakaran, R y col. 2008). Al graficarse los logaritmos de los diversos estimadores de secreción de insulina contra el índice de sensibilidad a la insulina, el que describe una relación hiperbólica es aquel que abarca al -1 en el intervalo de confianza 95 de la pendiente de la recta de regresión lineal. El único estimador que cumplió con esta condición fue $\Delta\text{Insulina}_{0-120} / \Delta\text{Glucosa}_{0-120}$ y, por lo tanto, fue empleado como indicador de la secreción de insulina. A continuación, se procedió a calcular la medida de la funcionalidad de la célula β (índice de disposición de la glucosa) como el producto entre el índice de Matsuda y $\Delta\text{Insulina}_{0-120} / \Delta\text{Glucosa}_{0-120}$, representando la sensibilidad y la secreción de insulina, respectivamente (Abdul-Ghani, MA y col. 2006).

4.10. Aislamiento de lipoproteínas y determinación de su composición química.

a) Ultracentrifugación en gradiente de densidad.

Las subfracciones de LDL y HDL de los pacientes con SH fueron aisladas a partir del suero de los sujetos estudiados utilizando un único paso de ultracentrifugación isopícnica en gradiente, en condiciones no desnaturalizantes, empleando un rotor de ángulo móvil, modelo SW41 Ti en una ultracentrífuga Beckman XL 40 (Beckman, CA, EEUU). Las condiciones de corrida fueron 40.000 rpm durante 44 hs a 15° C acorde al método previamente descrito (Chapman, MJ y col. 1981; Guerin, M y col. 1996). Luego de la ultracentrifugación, el gradiente

fue fraccionado en volúmenes predefinidos desde el menisco hacia el fondo con una pipeta de precisión Gilson® (Gilson, Middletown, WI, EEUU) en 11 fracciones. La primera fracción corresponde a la VLDL e IDL (densidad, $d < 1,019$ g/ml), las siguientes 5 alícuotas corresponden a las subfracciones de LDL (LDL1, $d = 1,019-1,023$ g/ml; LDL2, $d = 1,023-1,029$ g/ml; LDL3, $d = 1,029-1,039$ g/ml; LDL4, $d = 1,039-1,050$ g/ml; y LDL5, $d = 1,050-1,063$ g/ml) y las últimas 5 alícuotas pertenecen a las 5 subfracciones de HDL (HDL2b, $d = 1,063-1,091$ g/ml; HDL2a, $d = 1,091-1,110$ g/ml; HDL3a, $d = 1,110-1,133$ g/ml; HDL3b, $d = 1,133-1,156$ g/ml y HDL3c, $d = 1,156-1,179$ g/ml). La validez y reproducibilidad del método empleado se encuentran ampliamente documentadas (Chapman, MJ y col. 1981; Guerin, M y col. 2002). Las subfracciones de LDL se emplearon inmediatamente para la determinación de su composición química, mientras que las subfracciones de HDL fueron dializadas frente a PBS (pH 7,4) durante 24 horas en la oscuridad a 4° C hasta su utilización para la determinación de la composición química y para los ensayos funcionales. Para la realización de estos últimos, se reconstituyó la HDL total a partir de las subfracciones respetando sus proporciones en circulación. Para los ensayos de capacidad antioxidante y eflujo de colesterol celular, las muestras fueron conservadas por un lapso no mayor a 2 días y 10 días, respectivamente, a 4° C en la oscuridad.

b) Ultracentrifugación secuencial.

Para el estudio de las pacientes con ADH, se aislaron las HDL mediante ultracentrifugación secuencial en una ultracentrífuga Beckman XL-90 (Beckman, CA, EEUU) usando un rotor de ángulo fijo modelo 70.1 Ti (Schumaker, VN y col. 1986). En primer lugar, se llevó a cabo la separación de VLDL, IDL y LDL empleando solución de KBr ($d = 1,063$ g/ml, pH 7,4). Luego, en dos pasos posteriores se separó y lavó la fracción de HDL utilizando una solución de KBr ($d = 1,210$ g/ml; pH 7,4). Cada paso de ultracentrifugación se realizó a $105.000 \times g$ durante 24 horas. Se testeó la pureza de la HDL por electroforesis en gel de agarosa (Noble, RP 1968) y el contenido de albúmina por inmunoturbidimetría

(Roche, Mannheim, Alemania), el cual no superó en ningún caso el 2 % del contenido total de proteínas de cada fracción. La fracción de HDL fue sometida a diálisis por 24 hs en buffer PBS pH 7,4 a 4° C en la oscuridad. Las fracciones dializadas fueron utilizadas en un lapso máximo de 2 días para los ensayos de funcionalidad antioxidante y de 10 días para los ensayos de promoción del eflujo de colesterol celular.

c) Composición química.

Se usó cada fracción no dializada de LDL y cada fracción dializada de HDL para la determinación de la composición química. Los TG, el CT, el CL, las PT y los FL en las fracciones lipoproteicas aisladas fueron dosados por métodos enzimáticos estandarizados (Roche, Mannheim, Alemania y Dyasis, Francia). Se calculó el CE como la diferencia entre el CT y el CL multiplicado por 1,67. Se calculó la masa lipoproteica total como la sumatoria de todos los componentes dosados y, a partir de ella, se calculó la composición porcentual.

4.11. Ensayos de funcionalidad de HDL.

a) Actividad antioxidante de HDL.

La capacidad antioxidante de HDL (concentración final: 40 mg de masa total/dl) fue evaluada empleando una LDL de referencia (10 mg colesterol/dl) aislada de un mismo sujeto control, normolipémico (Hansel, B y col. 2004). La oxidación de la LDL fue realizada a 37° C en PBS (pH 7,4) en presencia de un generador de radicales libres hidrosoluble: azo-iniciador 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) clorhidrato (AAPH; CF 1mM). La HDL se agregó a la LDL en el instante previo a la oxidación. La cinética de acumulación de dienos conjugados fue seguida a través de los cambios de absorbancia a 234nm (Kontush, A y col. 2003; Hansel, B y col. 2004). Se corrigieron los datos por la absorbancia del blanco de AAPH en un medio libre de lipoproteínas. La cinética característica de la

oxidación de la LDL revela dos fases: una primera etapa de iniciación y una segunda de propagación. Para cada fase, se calculó la duración y la tasa promedio de oxidación. La actividad antioxidante de las HDL se expresó como la disminución de la tasa de oxidación en la fase de propagación relativa a la cinética de la LDL en ausencia de HDL.

b) Capacidad de HDL para promover el eflujo de colesterol celular.

La capacidad de las HDL (15µg de FL-HDL/ml) para promover el eflujo de colesterol celular fue determinada empleando la línea celular de monocitos humanos THP-1 (ATCC). Los monocitos fueron cultivados en botellas de cultivo celular en medio RPMI 1640 con 10% V/V de suero fetal bovino inactivado, 80 µg/ml de penicilina, 80 µg/ml de estreptomycin y 2 mM de glutamina. Luego de dos pasajes para asegurar la viabilidad celular, las células fueron transferidas a placas de cultivo celular de 24 pocillos a razón de 1.10^6 células/pocillo en un medio con 50 ng/ml de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU). Las placas fueron incubadas durante 48 hs, para asegurar la inducción de la diferenciación de monocitos a macrófagos. Luego, se removió el medio de cultivo, se lavaron los pocillos y se cargaron las células con colesterol agregando una LDL acetilada marcada con ^3H -colesterol (1 µCi/ml, NEN Life Science Products, Boston, EEUU) en un medio RPMI libre de suero suplementado con 50 mM de glucosa, 80 µg/ml de penicilina, 80 µg/ml de estreptomycin, 2 mM glutamina, y 0,2 % P/V de albúmina bovina (medio RGGB). Luego de 24 hs de incubación, las células fueron lavadas y se dejaron en estufa durante 24 hs adicionales en medio RGGB para permitir el equilibrio de los *pools* celulares de colesterol. El ensayo de promoción del eflujo se efectuó incubando las HDL con las células por un período de “caza” de 4 hs a 37° C. Luego, se aisló el sobrenadante de cultivo, así como se extrajo el colesterol de las células con una mezcla de solventes hexano:isopropanol (3:2). El solvente de extracción fue evaporado y reconstituido en reactivo de colesterol de Trinder para permitir la escisión del CE, y se determinó la radioactividad tanto en el sobrenadante como

en el extracto celular en contador de centelleo líquido (Wallac Trilux 1450 Microbeta, Perkin Elmer, EEUU). Los resultados se expresaron como porcentaje según la fórmula: $[\text{dpm del medio} / (\text{dpm del medio} + \text{dpm de las células}) \times 100]$. Todas las muestras fueron corregidas frente a blanco de PBS.

4.12. Análisis estadísticos.

a) Análisis de la potencia y cálculo de la sensibilidad.

Debido a la falta de bibliografía respecto a algunos parámetros evaluados en los estudios, se definió el efecto esperable (d) como una unidad de desvío estándar ($dz = 1$). De este modo, en los estudios transversales, el número de pacientes a evaluar en cada grupo fijando una potencia de 0,8, con un nivel de significancia (α) de 0,05, en un test a dos colas no debía ser menor de 17.

En los estudios longitudinales, las diferencias mínimas detectables con 0,8 de potencia y con un nivel $\alpha = 0,05$, en la situación bilateral (cálculo de sensibilidad) fueron: $dz = 0,94$ para el estudio de SH; $dz = 0,75$ para el estudio de los efectos subagudos de la administración de hierro endovenoso; y $dz = 1,27$ para el estudio longitudinal en pacientes anémicas al restaurarse los valores de hemoglobina. Para el análisis de la potencia y el cálculo de sensibilidad, se utilizó el software G*Power 3.1.3 (Universidad de Düsseldorf, Düsseldorf, Alemania).

b) Análisis de datos.

Se determinó la distribución de las distintas variables por el método de Shapiro-Wilks. Las variables con distribución normal fueron expresadas como media \pm desvío estándar (DE) y las de distribución no paramétrica como mediana (cuartil 1 – cuartil 3). Las diferencias en variables categóricas y los estudios de asociación entre los alelos HFE y las variables metabólicas fueron evaluados mediante el test Chi cuadrado (χ^2). En los estudios transversales, las diferencias en variables continuas con distribución paramétrica fueron analizadas con el test T

de Student para muestras independientes. Cuando las variables presentaron una distribución no paramétrica, las diferencias fueron evaluadas empleando el test U de Mann-Whitney. En los estudios longitudinales, las diferencias pre y post tratamiento fueron analizadas utilizando el test T para muestras pareadas y el test de Wilcoxon, acorde a la distribución paramétrica o no paramétrica de las variables, respectivamente. Las correlaciones simples fueron evaluadas por los métodos de Pearson y Spearman, acorde a la distribución de las variables, respectivamente. En los casos en los que se efectuaron diferencias de grupos ajustadas, correlaciones parciales y regresiones lineales, se normalizaron las variables no paramétricas antes de ser incluidas en los análisis. Las diferencias ajustadas fueron realizadas por ANCOVA. En todos los casos, los tests se consideraron significativos con un $p < 0,05$ en la situación bilateral. Para los análisis estadísticos se utilizaron los programas informáticos INFOSTAT (Grupo INFOSTAT, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) y SPSS 17.0 (IBM, Chicago, Ill, EEUU).

5. Resultados.

5.1. Sobrecarga de hierro.

5.1.1. Factores de riesgo cardiovascular y biomarcadores de enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

El objetivo del presente capítulo fue evaluar las alteraciones metabólicas y las modificaciones en los biomarcadores de enfermedad cardiovascular aterosclerótica en un grupo compuesto por 20 pacientes con SH provenientes del Hospital Italiano de Buenos Aires en comparación con un grupo de 20 controles sanos pareados por sexo y edad con los pacientes.

a) Análisis genotípico y características clínicas y bioquímicas generales.

De los 20 pacientes con SH provenientes del Hospital Italiano de Buenos Aires, 16 (80%) presentaron alguna de las mutaciones evaluadas en el gen HFE. Seis pacientes fueron homocigotos para la mutación C282Y, 5 homocigotos para la mutación H63D, 2 doble heterocigotos C282Y/H63D y 3 fueron heterocigotos para la mutación H63D.

Las características clínicas y bioquímicas generales se muestran en la tabla 1. Los pacientes con SH presentaron mayor IMC que los controles, pese a no haber diferencias en el porcentaje de individuos con sobrepeso u obesidad. Como era esperado, los marcadores del metabolismo del hierro se encontraron significativamente aumentados en los pacientes con SH respecto a los controles, como así también los marcadores de daño hepático. Adicionalmente, los pacientes presentaron un marcado aumento en la insulinemia en ayunas y en el índice HOMA-IR (Tabla 1). Estas diferencias se mantuvieron significativas aún al ajustar por el IMC ($p < 0,05$). Por otro lado, los niveles de los marcadores de inflamación crónica, PCRus e IL-6, no fueron diferentes entre pacientes y controles.

De acuerdo al rol del hierro en las alteraciones del hepatograma, la saturación de Tf y la concentración de ferritina correlacionaron con los niveles de bilirrubina total ($r=0,70$; $p<0,001$, y $r=0,50$; $p<0,001$, respectivamente) y las actividades de ASAT ($r=0,62$; $p<0,001$, y $r=0,52$; $p<0,001$, respectivamente) y ALAT ($r=0,45$; $p<0,001$, y $r=0,55$; $p<0,001$, respectivamente). De modo similar, la relación entre los niveles de hierro y las alteraciones del metabolismo de la glucosa fue evidenciada a través de las correlaciones de la saturación de Tf y la ferritina con los niveles de insulina en ayunas ($r=0,36$; $p<0,05$, y $r=0,34$; $p<0,001$, respectivamente) y con el índice HOMA-IR ($r=0,34$; $p<0,05$, y $r=0,31$; $p<0,05$, respectivamente). En líneas generales, estas correlaciones evidencian el efecto deletéreo de la SH a nivel hepático, así como su estrecha vinculación con la resistencia insulínica.

Tabla 1. Características clínicas y bioquímicas generales de los pacientes con sobrecarga de hierro y los sujetos controles.

	Pacientes con SH (n=20)	Sujetos controles (n=20)	p
Edad (años)	48±12	49±13	NS
IMC (Kg/m²)	29±3	26±3	<0,05
Sobrepeso (n)	4	3	NS
Obesidad (n)	5	1	NS
Hipertensión (n)	4	0	NS
Hb (g/dl)	15,1±1,7	14,4±1,0	NS
GB (10³céls/ml)	6,7±1,1	6,4±1,5	NS
PLQ (10³céls/ml)	228±52	243±35	NS
Saturación Tf (%)	49 (36-56)	24 (21-28)	<0,001
Ferritina (ng/ml)	460 (176-714)	120 (75-159)	<0,001
Bilirrubina (mg/dl)	0,9 (0,7-1,1)	0,5 (0,3-0,5)	<0,001
ASAT (IU/l)	29 (24-35)	20 (17-23)	<0,001
ALAT (IU/l)	33 (23-47)	13 (9-16)	<0,001
FAL (IU/l)	66 (51-76)	68 (56-129)	NS
Glucosa (mg/dl)	95±16	89±7	NS
Insulina (µU/ml)	12,0 (7,0-18,1)	6,4 (3,1-7,7)	<0,001
HOMA-IR	2,5 (1,6-5,1)	1,3 (0,6-1,8)	<0,001
PCRus (mg/l)	1,4 (0,7-2,8)	1,1 (0,7-1,8)	NS
IL-6 (pg/ml)	2,7 (2,3-3,2)	2,8 (2,0-3,2)	NS

SH, sobrecarga de hierro; IMC, índice de masa corporal; Hb, hemoglobina; GB, glóbulos blancos; PLQ, plaquetas; Tf, transferrina; ALAT, alanina aminotransferasa; ASAT, aspartato aminotransferasa; FAL, fosfatasa alcalina; HOMA-IR, *Homeostasis Model Assessment*; PCRus, proteína C reactiva ultrasensible; IL, interleuquina; NS, no significativo. Los resultados están expresados como media±DE o mediana (Q1-Q3) para variables con distribución paramétrica y no paramétrica, respectivamente.

b) Perfil de lípidos y lipoproteínas.

El perfil de lípidos y lipoproteínas de los pacientes con SH y los sujetos controles se muestra en la tabla 2. En comparación con los controles, se observó que los pacientes con SH se caracterizaron por un aumento de los niveles plasmáticos de TG y disminución de C-HDL. Adicionalmente, los valores de los índices CT / C-HDL y TG / C-HDL fueron mayores en los pacientes con SH. Todas estas diferencias permanecieron significativas aún al ajustar por IMC y HOMA-IR ($p < 0,05$).

Tabla 2. Perfil de lípidos y lipoproteínas de los pacientes con sobrecarga de hierro y los sujetos controles.

	Pacientes con SH (n=20)	Sujetos Controles (n=20)	P
TG (mg/dl)	137 (110-193)	77 (49-91)	<0,001
CT (mg/dl)	197±44	189±32	NS
C-VLDL (mg/dl)	19±8	16±7	NS
C-LDL (mg/dl)	140 (102-156)	117 (96-136)	NS
C-HDL (mg/dl)	42±10	52±9	<0,005
CT / C-HDL	5,0 (3,8-5,6)	3,4 (3,1-4,3)	<0,01
TG / C-HDL	3,2 (2,3-5,1)	1,5 (1,0-1,8)	<0,001
Apo B (mg/dl)	96±32	82±22	NS
Apo A-I (mg/dl)	140±32	144±23	NS

SH, sobrecarga de hierro; TG, triglicéridos; CT, colesterol total; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad; apo, apolipoproteína; NS, no significativo. Los resultados están expresados como media±DE o mediana (Q1-Q3) para variables con distribución paramétrica y no paramétrica, respectivamente.

c) Asociación entre las mutaciones del gen HFE y el perfil metabólico.

La presencia del alelo H63D se asoció significativamente con hipercolesterolemia [CT > 200 mg/dl y C-LDL > 160 mg/dl (ambos $p < 0,05$)]. Por otro lado, la presencia del alelo C282Y no se encontró asociada a ninguna de las alteraciones del metabolismo de la glucosa, ni del metabolismo de los lípidos ($p > 0,05$).

d) Actividad de proteínas y enzimas asociadas a lipoproteínas.

La prevalencia de los fenotipos de la enzima PON-1 fue similar en ambos grupos de sujetos estudiados (Pacientes con SH: AA = 7; AB = 10; BB = 3; vs. controles: AA = 5; AB = 11; BB = 4; $p > 0,05$). Por tal motivo, al comparar la actividad PON entre los grupos, no se efectuaron consideraciones referentes al fenotipo. Los pacientes con SH presentaron una disminución significativa en la actividad PON y en el índice PON / ARE respecto a los controles (Tabla 3). En contraste, la actividad ARE y los índices PON / apo A-I y ARE / apo A-I fueron similares entre los grupos. Al ajustar por IMC y/o HOMA-IR, las diferencias observadas perdieron significancia estadística ($p > 0,05$).

Tabla 3. Actividades e índices relacionados a la enzima paraoxonasa-1 en pacientes con sobrecarga de hierro y los sujetos controles.

	Pacientes con SH (n=20)	Sujetos Controles (n=20)	p
PON (nmol/ml.min)	274 (149-410)	428 (283-515)	<0,05
ARE (µmol/ml.min)	148±38	134±28	NS
PON / Apo A-I	2,1±1,1	2,9±1,7	NS
ARE / Apo A-I	1,1±0,4	1,0± 0,2	NS
PON / ARE	2,2±1,4	3,2±1,6	<0,05

SH, sobrecarga de hierro; PON, paraoxonasa; ARE, arilesterasa; apo, apolipoproteína; NS, no significativo. Los resultados están expresados como media±DE o mediana (Q1-Q3) para variables con distribución paramétrica y no paramétrica, respectivamente.

Por otro lado, al evaluar la actividad de CETP, se detectaron valores mayores en los pacientes con SH (Figura 7). No obstante, de modo similar a la actividad PON, esta diferencia perdió significancia estadística al ajustar por el IMC y/o el HOMA-IR.

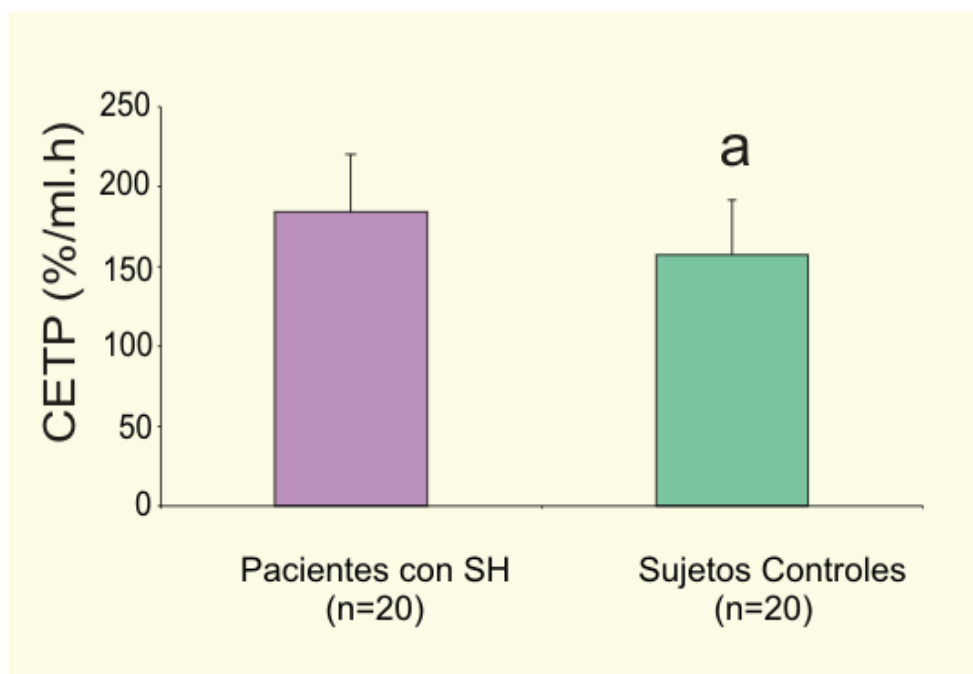


Figura 7. Actividad de CETP en los pacientes con sobrecarga de hierro y sujetos controles. SH, sobrecarga de hierro; CETP, proteína transportadora de colesterol esterificado. ^a p<0,01.

La disminución en la actividad PON se asoció con el HOMA-IR ($r=-0,50$; $p<0,001$), con la actividad de CETP ($r=-0,33$; $p<0,05$) y con la concentración de ferritina ($r=-0,38$; $p<0,05$). Por otro lado, el aumento de la actividad de CETP estuvo correlacionado con la menor concentración de C-HDL observada en los pacientes ($r=-0,73$; $p<0,001$), así como con el IMC ($r=0,46$; $p<0,01$), la concentración de TG ($r=0,60$; $p<0,001$), el HOMA-IR ($r=0,38$; $p<0,05$), los niveles de apo B ($r=0,52$; $p<0,001$) y la concentración de ferritina ($r=0,38$; $p<0,05$). Dado la diversidad de parámetros asociados a las actividades de PON y CETP, y la superposición entre SH y resistencia a la insulina, se realizaron análisis multivariados para evaluar cuáles fueron los factores determinantes de las alteraciones observadas. El análisis de regresión lineal multivariado, modelando a las actividades de PON y CETP como variables dependientes, permitió la identificación del HOMA-IR como uno de los mayores determinantes

independientes del deterioro de ambos parámetros relacionados a la funcionalidad y metabolismo de las HDL en pacientes con SH (Tabla 4).

Tabla 4. Regresión múltiple para las actividades de PON y CETP en la población estudiada (n=40).

Variable Dependiente	Variabes Independientes	Bst	T	p=	R²
PON	Edad	0,031	0,210	NS	0,30
	IMC	-0,026	-0,145	NS	
	HOMA-IR	-0,563	-3,909	<0,001	
	C-HDL	-0,076	-0,439	NS	
	Ferritina	-0,175	-1,136	NS	
CETP	Edad	0,096	0,758	NS	0,47
	IMC	0,097	0,617	NS	
	HOMA-IR	0,309	2,160	<0,05	
	C-HDL	-0,503	-3,514	<0,001	
	Ferritina	0,013	0,094	NS	

PON, paraoxonasa; IMC, índice de masa corporal; HOMA-IR, *homeostasis model assessment*; C-HDL, colesterol de la lipoproteína de alta densidad; CETP, proteína transportadora de colesterol esterificado; NS, no significativo.

e) Biomarcadores de enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

Al evaluar los niveles plasmáticos de LDL oxidadas, se observó una mayor concentración en los pacientes con SH respecto a los controles (Figura 8). Este resultado no varió al ajustar por el índice HOMA-IR ($p<0,05$), pero perdió significancia estadística al ajustar por el IMC ($p=0,074$).

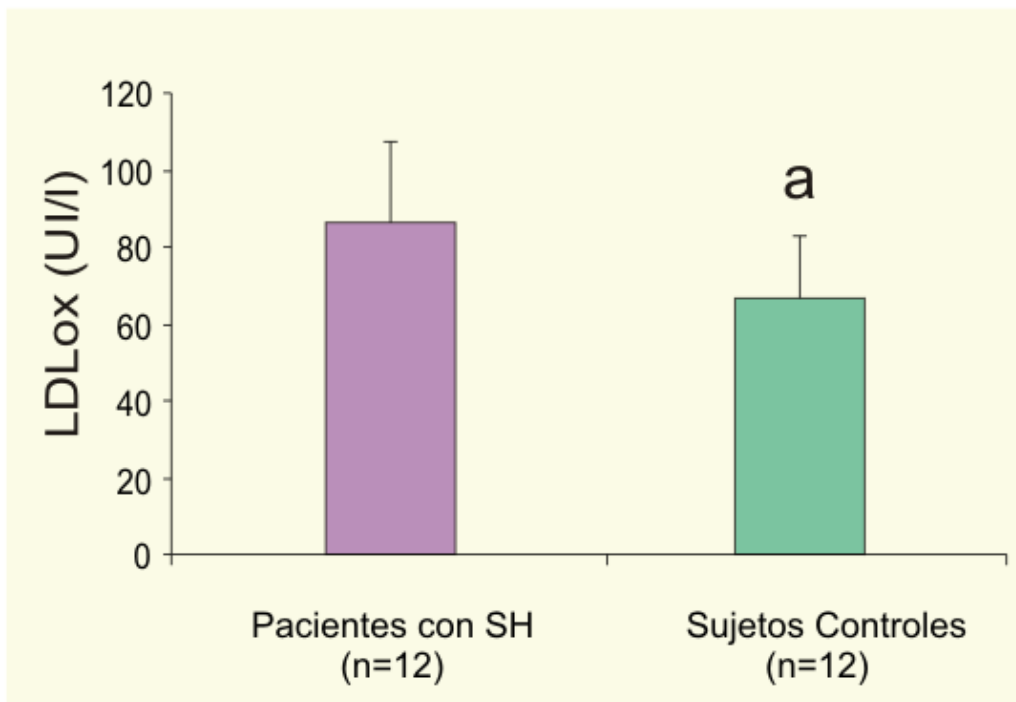


Figura 8. Niveles de LDL oxidadas en un subgrupo aleatorio de los 20 pacientes con sobrecarga de hierro y sus respectivos controles pareados. SH, sobrecarga de hierro; LDLox, lipoproteínas de baja densidad oxidadas. ^a $p < 0,05$.

Revelando un rol de los depósitos de hierro sobre esta alteración, la concentración de ferritina correlacionó con el aumento de LDLox ($r=0,49$; $p < 0,05$). Cabe destacar que esta correlación permaneció significativa aún al ajustar por el IMC y el HOMA-IR ($p < 0,05$). De modo similar, se evidenció una correlación significativa entre los niveles de IL-6 y LDL oxidadas en los pacientes con SH ($r=0,46$; $p < 0,05$). Esta correlación, también fue independiente del IMC y del HOMA-IR ($p < 0,05$). Globalmente, estas correlaciones reflejan el importante vínculo fisiopatológico entre la SH, la inflamación y la oxidación de las lipoproteínas.

Por otro lado, la actividad de Lp-PLA₂, considerada como un marcador de inflamación vascular específico, fue mayor en los pacientes con SH que en los controles (Figura 9). Este aumento fue independiente del mayor IMC y del HOMA-IR que exhibieron los pacientes ($p < 0,01$).

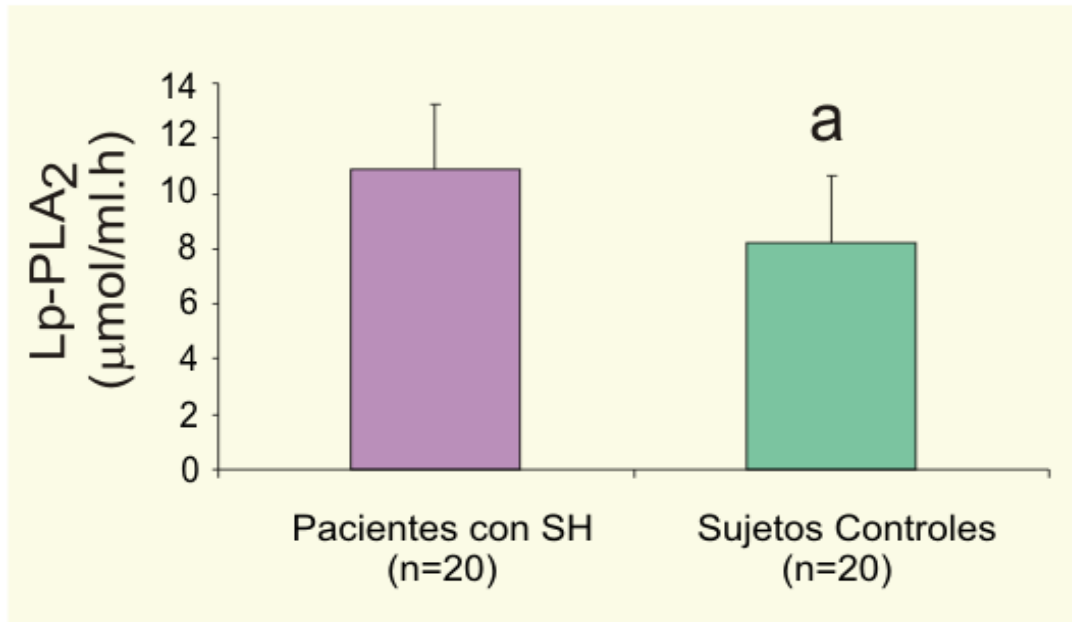


Figura 9. Actividad de Lp-PLA₂ en los pacientes con sobrecarga de hierro y sujetos controles. SH, sobrecarga de hierro; Lp-PLA₂, fosfolipasa A₂ asociada a lipoproteínas. ^a p<0,001.

De acuerdo con el rol propuesto para la Lp-PLA₂ como factor de riesgo y como agente promotor de la aterogénesis, su actividad correlacionó positivamente con la concentración de LDL oxidadas ($r=0,45$; $p<0,05$). Asimismo, se observaron correlaciones con la saturación de Tf ($r=0,42$; $p<0,01$) y con las concentraciones de ferritina ($r=0,59$; $p<0,001$), PCRus ($r=0,33$; $p<0,05$), TG ($r=0,52$; $p<0,001$), C-HDL ($r=-0,42$; $p<0,01$), y C-LDL ($r=0,42$; $p<0,01$). Al realizar el análisis multivariado para identificar los determinantes de la actividad de Lp-PLA₂, la concentración de ferritina fue el único predictor independiente y logró explicar por sí sola casi un 50 % de la variabilidad total (Tabla 5).

Tabla 5. Regresión múltiple modelando la actividad de Lp-PLA₂ como variable dependiente en la población estudiada (n=40).

Variable Dependiente	Variabes Independientes	Bst	T	p=	R²
Lp-PLA₂	Edad	0,249	1,730	NS	0,49
	IMC	-0,202	-1,198	NS	
	HOMA-IR	0,014	0,083	NS	
	C-HDL	-0,288	-1,944	NS	
	Apo B	0,187	1,365	NS	
	Ferritina	0,527	3,698	<0,001	

Lp-PLA₂; fosfolipasa A₂ asociada a lipoproteínas; IMC, índice de masa corporal; HOMA-IR, *homeostasis model assessment*; C-HDL, colesterol de la lipoproteína de alta densidad; apo, apolipoproteína; NS, no significativo.

5.1.2. Caracterización del metabolismo de los hidratos de carbono y de las lipoproteínas, y de la funcionalidad de HDL.

En el estudio anterior, se observaron alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono y de los lípidos, así como de la actividad de proteínas y enzimas asociadas a las HDL. Por lo tanto, en el presente capítulo, se profundizó en la caracterización de estas modificaciones. Este estudio involucró a 18 pacientes con SH y 16 controles sanos de sexo masculino, con edad similar a los pacientes provenientes del Hospital de Clínicas “José de San Martín”.

a) Características genotípicas y fenotípicas.

Siete de los 18 pacientes con SH fueron homocigotos para la mutación C282Y del gen HFE, 2 fueron doble heterocigotos C282Y/H63D, 1 fue homocigoto H63D, 4 heterocigotos H63D y 4 no presentaron ninguna de las mutaciones evaluadas en el gen HFE. En 4 de los 18 pacientes (22%), se observó esteatosis leve en la biopsia hepática. La mayor parte de los pacientes presentaban sobrepeso (11/18) y 3 fueron obesos. Las características clínicas y bioquímicas generales se muestran en la tabla 6. No hubo diferencias en la edad, en el IMC, o en la prevalencia de hipertensión entre pacientes y controles. Como era esperable, los pacientes exhibieron un aumento de los parámetros ferrocinéticos, así como de bilirrubina y de las actividades de ASAT y ALAT respecto a los controles. Adicionalmente, se evidenció un estado proinflamatorio en los pacientes, caracterizado por un aumento de la concentración de PCRus (Tabla 6).

Tabla 6. Características clínicas y bioquímicas de los pacientes con sobrecarga de hierro y los sujetos controles.

	Pacientes con SH (n=18)	Sujetos controles (n=16)	p
Edad (años)	47±15	47±15	NS
IMC (Kg/m²)	28±2	26±3	NS
Hipertensión (n)	3	0	NS
Hb (g/dl)	14,8±1,4	14,6±0,1	NS
GB (10³céls/ml)	6,7±1,8	6,3±1,6	NS
PLQ (10³céls/ml)	202±66	237±36	NS
Saturación Tf (%)	54 (41-83)	25 (23-29)	<0,001
Ferritina (ng/ml)	502 (351-781)	124 (102-162)	<0,001
Bilirrubina (mg/dl)	0,9 (0,8-1,2)	0,5 (0,3-0,6)	<0,001
ASAT (UI/l)	31 (25-40)	20 (18-22)	<0,001
ALAT (UI/l)	46 (28-48)	13 (9-21)	<0,001
FAL (UI/l)	70 (54-100)	56 (53-61)	NS
PCRus (mg/l)	1,4 (1,0-2,4)	0,9 (0,6-1,3)	<0,05

SH, sobrecarga de hierro; IMC, índice de masa corporal; Hb, hemoglobina; GB, glóbulos blancos; PLQ, plaquetas; Tf, transferrina; ALAT, alanina aminotransferasa; ASAT, aspartato aminotransferasa; FAL, fosfatasa alcalina; PCRus, proteína C reactiva ultrasensible; NS, no significativo. Los resultados están expresados como media±DE o mediana (Q1-Q3) para variables con distribución paramétrica y no paramétrica, respectivamente.

Para analizar la influencia del genotipo sobre los parámetros metabólicos, el grupo de pacientes fue dividido según la presencia de homocigosis para la mutación C282Y como: homocigotos C282Y (n=7) y no homocigotos (n=11). La saturación de Tf fue significativamente mayor en los pacientes homocigotos respecto a los no homocigotos (88±12 vs. 45±14% respectivamente, p<0,001).

Contrariamente, no hubo diferencias en la concentración de ferritina entre ambos subgrupos (2120 (456-2440) vs. 444 (246-616) ng/ml, respectivamente; $p=0,0782$). Al analizar los marcadores de la función hepática, la concentración de bilirrubina total [1,0 (0,9-1,6) vs. 0,8 (0,7-1,0) mg/dl, $p<0,05$] y la actividad de ASAT [41 (26-75) vs. 29 (23-32) U/l, $p<0,05$] fueron significativamente mayores en los homocigotos C282Y. Respecto a la concentración de PCRus, no hubo diferencias entre los subgrupos de pacientes. No obstante, en comparación a los controles, los pacientes no C282Y presentaron un aumento más marcado [2,0 (0,8-2,5) vs. 0,9 (0,6-1,3) mg/l, $p<0,05$] que los homocigotos C282Y [1,4 (1,0-1,4) vs. 0,9 (0,6-1,3) mg/l, $p=0,185$].

b) Metabolismo de los hidratos de carbono.

En comparación a los controles, los pacientes con SH presentaron mayor glucemia basal (100 ± 11 vs. 90 ± 8 mg/dl; respectivamente, $p<0,01$), insulinemia en ayunas [13 (11-18) vs. 7 (4-8) μ U/ml, $p<0,001$] e índice HOMA-IR [2,9 (2,4-4,6) vs. 1,5 (0,9-1,7), $p<0,001$]. Estos resultados confirman los del estudio previo y sugieren la presencia de resistencia a la insulina en los pacientes con SH.

La mitad de los pacientes con SH presentó algún tipo de alteración acorde a su glucemia basal o postcarga: 7/18 presentaron GAA, 1 exhibió TAG y otro presentó valores compatibles con diabetes. No hubo diferencias significativas en la frecuencia de estas alteraciones entre ambos subgrupos de pacientes. Sin embargo, los casos de intolerancia y diabetes ocurrieron exclusivamente en los homocigotos C282Y.

Para una mayor comprensión de la fisiopatología de las alteraciones del metabolismo de la glucosa en los pacientes con SH, se calcularon índices de sensibilidad y secreción de insulina, y de funcionalidad de la célula β a partir de la glucemia e insulinemia durante la POTG (Figura 10). La sensibilidad a la insulina fue similar entre pacientes homocigotos C282Y y no homocigotos. Sin embargo, se observó un deterioro de la capacidad secretoria, que se tradujo en una menor funcionalidad de la célula β en los homocigotos C282Y (Figura 10).

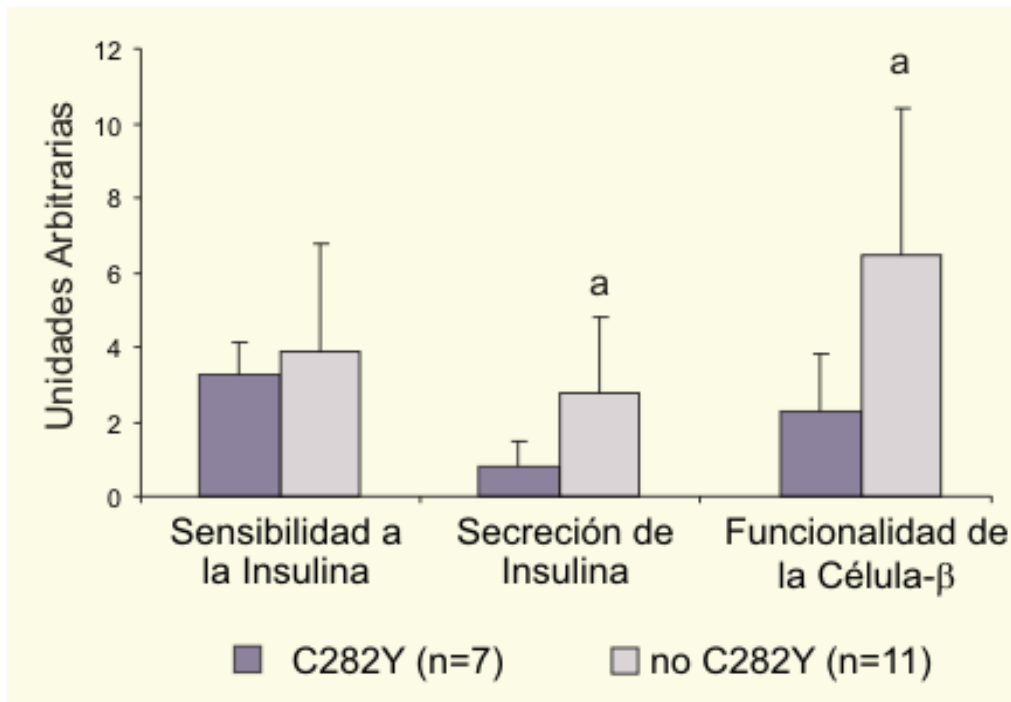


Figura 10. Surrogantes de sensibilidad y secreción de insulina, y funcionalidad de la célula β en los pacientes homocigotos para la mutación C282Y y en los no homocigotos. ^a p<0,05.

c) *Metabolismo lipoproteico.*

Los resultados del perfil de lípidos y lipoproteínas de pacientes y controles se muestran en la tabla 7. Los niveles de TG se encontraron aumentados y los de C-HDL y apo A-I disminuidos en los pacientes respecto a los controles. Adicionalmente, el índice TG / C-HDL fue mayor. Coherente con las alteraciones lipídicas observadas, la actividad de CETP estuvo aumentada en los pacientes (160±40 vs. 128±36 %/ml.h, p<0,05). No hubo diferencias significativas en el perfil lipoproteico, ni en la actividad de CETP entre ambos subgrupos de pacientes (p>0,05). Sin embargo, cuando las dos categorías genotípicas fueron comparadas por separado con el grupo de controles, la concentración de apo A-I se encontró

más afectada en los homocigotos C282Y (120±24 vs. 148±22 mg/dl, p<0,05) que en los no homocigotos (138±25 vs. 148±22 mg/dl; p>0,05).

Tabla 7. Perfil de lípidos y lipoproteínas de los pacientes con sobrecarga de hierro y los sujetos controles.

	Pacientes con SH (n=18)	Sujetos Controles (n=16)	p
TG (mg/dl)	111 (75-147)	75 (49-82)	<0,01
CT (mg/dl)	170±38	187±24	NS
C-VLDL (mg/dl)	19±9	15±8	NS
C-LDL (mg/dl)	105±31	118±26	NS
C-HDL (mg/dl)	44 (38-51)	52 (45-64)	<0,01
TG / C-HDL	2,5 (1,5-3,7)	1,3 (0,8-1,8)	<0,005
Apo B (mg/dl)	82±21	84±21	NS
Apo A-I (mg/dl)	131±25	148±22	<0,05

SH, sobrecarga de hierro; TG, triglicéridos; CT, colesterol total; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad; apo, apolipoproteína; NS, no significativo. Los resultados están expresados como media±DE o mediana (Q1-Q3) para variables con distribución paramétrica y no paramétrica, respectivamente.

Los perfiles de distribución de subfracciones de LDL y HDL de pacientes y controles fueron estudiados por ultracentrifugación en gradiente de densidad. La figura 11 muestra la masa plasmática total de las subfracciones de LDL, desde la LDL1, grande y flotadora, hasta la LDL5, pequeña y densa, en los pacientes con SH (acorde al genotipo y como grupo) y en los controles. El grupo de pacientes con SH exhibió una menor masa plasmática total de LDL2 y LDL3 respecto a los controles. No obstante, se observó una distribución opuesta de las subfracciones de LDL entre las categorías genotípicas de pacientes. Mientras que los homocigotos C282Y presentaron un aumento de las LDL grandes y flotadoras, los

pacientes no C282Y exhibieron aumentos en las LDL pequeñas y densas. Estas diferencias dentro del grupo de los pacientes fueron la causa de los pocos resultados significativos al ser comparados como grupo con los controles. Adicionalmente, la sumatoria de las masas de todas las subfracciones de LDL fue menor en los pacientes C282Y respecto a los otros grupos (C282Y: 223 ± 24 ; no C282Y: 277 ± 59 ; controles: 303 ± 45 mg/dl, $p<0,01$).

Al calcular la distribución porcentual, se observó que los homocigotos C282Y exhibieron la proporción más elevada de las subfracciones de LDL grandes y flotadoras (LDL1 y LDL2) (C282Y: 43 ± 5 ; no C282Y: 25 ± 8 controles: 32 ± 7 %, $p<0,001$). Por el contrario, la proporción más elevada de LDL pequeñas y densas (LDL4 y LDL5) fue detectada en los pacientes no C282Y (C282Y: 23 ± 5 , no C282Y: 39 ± 10 , controles: 26 ± 4 %, $p<0,05$).

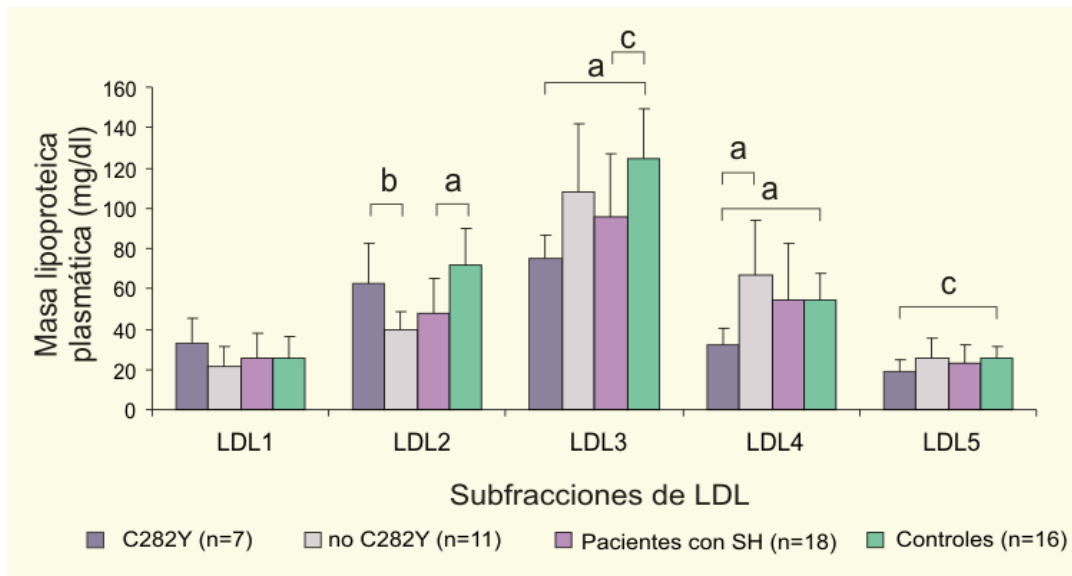


Figura 11. Distribución de la masa plasmática total de las subfracciones de LDL en los pacientes con sobrecarga de hierro y los sujetos controles. SH, sobrecarga de hierro; LDL, lipoproteína de baja densidad. ^a $p<0,005$; ^b $p<0,01$; ^c $p<0,05$.

Además de las alteraciones cuantitativas observadas en las LDL de los pacientes con SH, se evidenciaron alteraciones en su composición química (Tabla 8). El grupo de pacientes con SH presentó un enriquecimiento en TG de todas las

subfracciones de LDL salvo la LDL1. De modo similar, ambas categorías genotípicas de pacientes presentaron un incremento en el contenido de TG de las LDL2, LDL3 y LDL5 respecto a los controles. El enriquecimiento en TG de la LDL4 fue significativo solo en los homocigotos C282Y (Tabla 8).

Tabla 8. Composición química de las subfracciones de LDL de los pacientes con sobrecarga de hierro y los sujetos controles.

	Grupo	LDL1	LDL2	LDL3	LDL4	LDL5
CL (%)	C282Y (n=7)	11±3	8±3	10±2	9±2	7±1
	No C282Y (n=11)	10±2	10±2	9±1	9±2	9±2
	Pacientes con SH (n=18)	10±3	9±2	10±2	9±2	8±2
	Controles (n=16)	10±1	11±1	9±1	10±2	10±3
CE (%)	C282Y (n=7)	38±6	42±9	38±5	33±13	30±3
	No C282Y (n=11)	28±8	36±6	42±3	31±6	31±6
	Pacientes con SH (n=18)	32±9	38±7	40±4	37±8	31±5
	Controles (n=16)	33±5	39±3	41±5	37±3	32±5
TG (%)	C282Y (n=7)	17±7	12±4 ^c	10±2 ^b	11±1 ^a	13±3 ^b
	No C282Y (n=11)	23±7	14±6 ^b	8±2 ^c	9±3	11±2 ^c
	Pacientes con SH (n=18)	20±7	14±5 ^b	8±2 ^b	10±3 ^c	12±3 ^b
	Controles (n=16)	17±4	8±2	6±1	7±2	9±2
FL (%)	C282Y (n=7)	18±2 ^a	18±3 ^b	22±1 ^c	21±5	23±6
	No C282Y (n=11)	21±3	21±3	22±4	21±3	21±3

	Pacientes con SH (n=18)	21±5	20±3 ^c	22±3	23±4	22±4
	Controles (n=16)	22±3	23±2	25±3	23±2	21±3
Proteínas (%)	C282Y (n=7)	16±2	20±5	21±2	27±6	28±3
	No C282Y (n=11)	18±4	19±3	19±2	23±3	28±3
	Pacientes con SH (n=18)	17±4	19±4	20±2	24±5	28±3
	Controles (n=16)	18±2	19±1	20±4	24±2	29±2

LDL, lipoproteína de baja densidad; SH, sobrecarga de hierro; C282Y, homocigotos para la mutación C282Y; no C282Y, otros genotipos aparte de homocigosis C282Y; CL, colesterol libre; CE, colesterol esterificado; TG, triglicéridos; FL, fosfolípidos. Los resultados están expresados como media±DE. ^a p<0,001; ^b p<0,005; ^c p<0,05 vs. sujetos controles.

Al comparar la distribución de la masa total de las subfracciones de HDL entre pacientes y controles, la masa lipoproteica total tendió a ser menor en todas las subfracciones de HDL de los pacientes (Figura 12). Particularmente, la disminución observada alcanzó significancia estadística en la subfracción que exhibe las funciones antiaterogénicas más potentes, la HDL3c (Figura 12). En el análisis por subgrupos, se observó que los pacientes C282Y presentaron una disminución significativa de todas las subfracciones de HDL pequeñas y densas (HDL3a, HDL3b y HDL3c) respecto a los controles. Contrariamente, estas disminuciones no fueron tan marcadas en los pacientes no C282Y. Al comparar los niveles de las subfracciones de HDL como porcentajes del total de HDL circulante, sólo se observó un menor porcentaje de HDL3c en los homocigotos C282Y respecto a los controles (14±4 vs. 18±3 %, p<0,05).

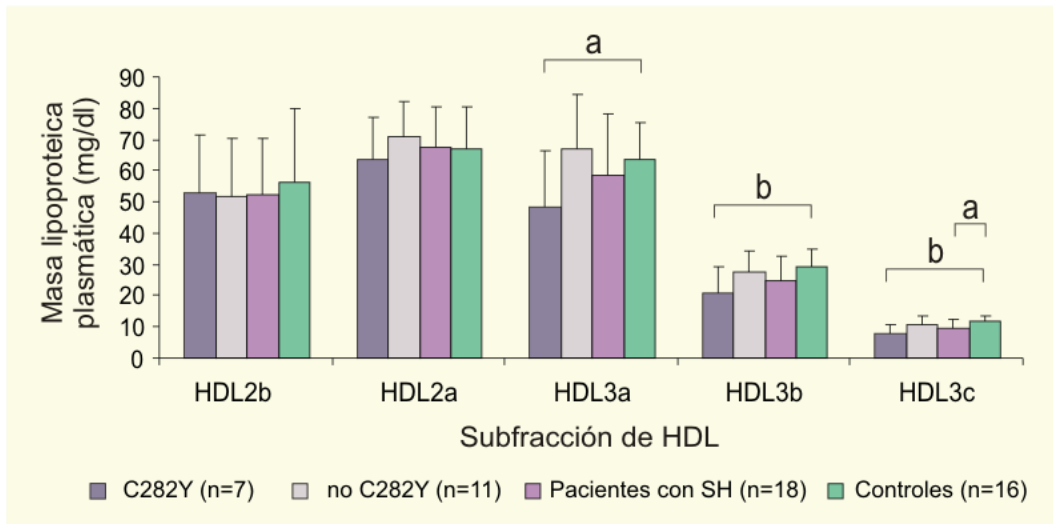


Figura 12. Distribución de la masa plasmática total de las subfracciones de HDL en los pacientes con sobrecarga de hierro y los sujetos controles. SH, sobrecarga de hierro; HDL, lipoproteína de alta densidad. ^a p<0,05, ^b p<0,01.

El estudio de la composición química de las subfracciones de HDL reveló alteraciones cualitativas estrechamente interrelacionadas. En particular, las subfracciones de HDL de los pacientes con SH respecto a las de los controles presentaron un enriquecimiento en TG, acompañado por una depleción relativa en CE (Tabla 9). Los homocigotos C282Y exhibieron las subfracciones de HDL más alteradas (Tabla 9).

Tabla 9. Composición química de las subfracciones de HDL de los pacientes con sobrecarga de hierro y los sujetos controles.

	Grupo	HDL2b	HDL2a	HDL3a	HDL3b	HDL3c
CL (%)	C282Y (n=7)	5±1	3±1	3±1	2±1	2±1
	No C282Y (n=11)	5±1	3±1	3±1	2±1	2±1
	Pacientes con SH (n=18)	5±1	3±1	3±1	2±1	2±1
	Controles (n=16)	6±1	3±1	2±1	2±1	2±1
CE (%)	C282Y (n=7)	23±2 ^a	21±2 ^a	19±3 ^b	15±3 ^c	13±3 ^c
	No C282Y (n=11)	25±2	22±3 ^c	21±2	18±2	13±1 ^c
	Pacientes con SH (n=18)	25±3 ^b	22±3 ^c	20±3 ^b	17±3 ^c	14±2 ^c
	Controles (n=16)	27±2	24±2	23±3	19±3	15±2
TG (%)	C282Y (n=7)	8±2 ^c	6±2 ^b	5±1 ^b	5±1 ^b	6±1 ^a
	No C282Y (n=11)	8±2 ^c	5±1 ^c	5±1	4±1 ^c	4±1
	Pacientes con SH (n=18)	8±1 ^c	6±1 ^b	5±1 ^b	5±1 ^c	5±1 ^c
	Controles (n=16)	6±2	4±1	4±1	4±1	4±1
FL (%)	C282Y (n=7)	30±2	30±3	27±1	23±2	16±3
	No C282Y (n=11)	30±3	32±3	28±3	24±2	16±2
	Pacientes con SH (n=18)	30±3 ^b	30±3	27±3	24±2	16±2
	Controles (n=16)	28±3	28±3	25±4	24±2	16±2

Proteínas (%)	C282Y (n=7)	34±2	40±2	46±2	54±3	63±2
	No C282Y (n=11)	31±5	38±2 ^c	44±3	52±2	64±3
	Pacientes con SH (n=18)	33±3	39±2	45±2	53±3	64±3
	Controles (n=16)	33±2	41±1	46±3	53±3	63±3

HDL, lipoproteína de alta densidad; SH, sobrecarga de hierro; C282Y, homocigotos para la mutación C282Y; no C282Y, otros genotipos aparte de homocigosis C282Y; CL, colesterol libre; CE, colesterol esterificado; TG, triglicéridos; FL, fosfolípidos. Los resultados están expresados como media±DE. ^a p<0,001; ^b p<0,005; ^c p<0,05 vs. sujetos controles.

Coherente con su rol en el intercambio de lípidos neutros (CE y TG) entre las lipoproteínas, la actividad de CETP, que estaba aumentada en los pacientes, se asoció significativamente con estas alteraciones (Tabla 10).

Tabla 10. Correlaciones entre la actividad de CETP y la composición química de las subfracciones de HDL en los pacientes con sobrecarga de hierro (n=18).

Componente Químico	Subfracción de HDL				
	HDL2b	HDL2a	HDL3a	HDL3b	HDL3c
CL (r)	-0,05	-0,15	0,01	0,03	0,21
CE (r)	-0,52 ^a	-0,58 ^a	-0,60 ^a	-0,53 ^a	-0,55 ^a
TG (r)	0,81 ^b	0,86 ^b	0,83 ^b	0,69 ^a	0,72 ^b
FL (r)	-0,37	0,05	0,01	0,05	-0,04
Proteínas (r)	-0,20	-0,08	-0,02	0,12	-0,04

HDL, lipoproteína de alta densidad; CL, colesterol libre; CE, colesterol esterificado; TG, triglicéridos; FL, fosfolípidos; r, coeficiente de correlación. ^a p<0,005; ^b p<0,001.

d) Funcionalidad de HDL.

La funcionalidad de HDL provenientes de pacientes y controles fue evaluada a través de su actividad antioxidante y de su capacidad para promover el eflujo de colesterol celular, primer paso del transporte inverso del colesterol.

No se observaron diferencias significativas en la actividad antioxidante de las HDL (inhibición de la tasa de oxidación durante la fase de propagación: 53±15 vs. 50±15 % respecto de LDL sola, y duración de la fase de oxidación: 110±22 vs. 107±18 % respecto de LDL sola, respectivamente, todos p>0.05). De modo similar, no hubo diferencias en la actividad antioxidante de las HDL entre los genotipos, ni entre alguno de los subgrupos de pacientes respecto a los controles (inhibición de la tasa de oxidación durante la fase de propagación: C282Y, 58±9; no C282Y, 45±18; y controles, 50±15 % respecto de LDL sola; y duración de la

fase de oxidación: C282Y, 112 ± 24 ; no C282Y, 104 ± 20 ; y controles, 107 ± 18 % respecto de LDL sola, respectivamente, todos $p > 0.05$).

En contraste, las HDL de los pacientes con SH demostraron una menor capacidad para promover el eflujo de colesterol desde macrófagos (Figura 13). Esta alteración fue más marcada en los pacientes que no eran homocigotos para la mutación C282Y.

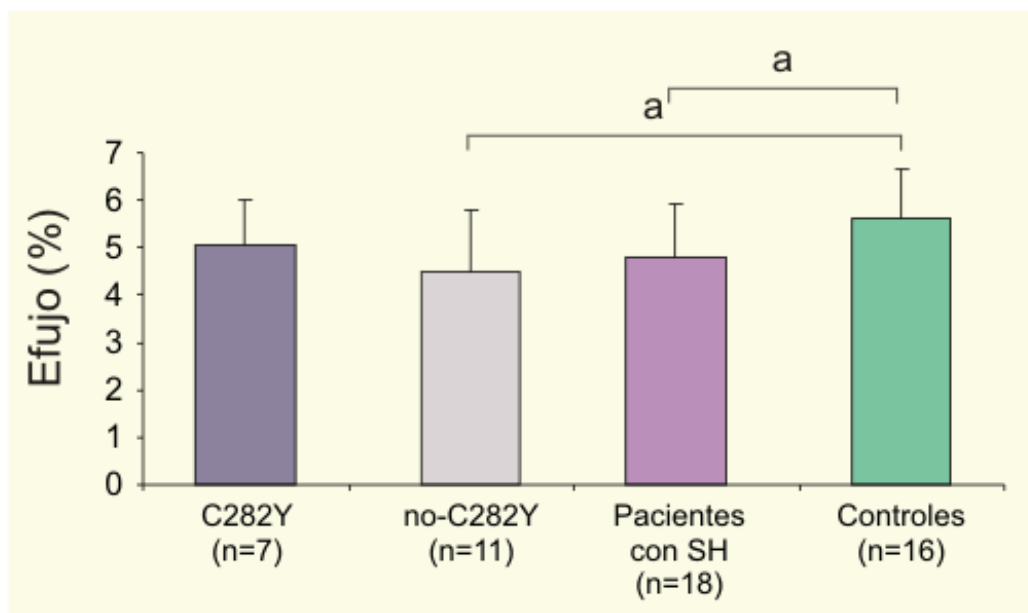


Figura 13. Capacidad de las HDL de los pacientes con sobrecarga de hierro y los sujetos controles para promover el eflujo de colesterol a partir de macrófagos humanos. SH, sobrecarga de hierro. ^a $p < 0,05$.

e) Interacciones entre los niveles de hierro y las alteraciones metabólicas.

En primer lugar, se evaluaron las correlaciones en el grupo total de sujetos estudiados ($n=34$). La concentración de ferritina correlacionó con el aumento de las enzimas hepáticas (ALAT: $r=0,56$, $p < 0,001$ y ASAT: $r=0,54$, $p < 0,005$), de PCRus ($r=0,38$, $p < 0,05$), de la actividad de CETP ($r=0,39$, $p < 0,05$) y con las modificaciones de la composición química en las subfracciones de HDL (HDL3a-

TG: $r=0,51$, $p<0,005$; HDL3a-CE: $r=-0,61$, $p<0,001$; HDL3b-TG: $r=0,37$, $p<0,05$; HDL3b-CE: $r=-0,44$, $p<0,05$; HDL3c-TG: $r=0,37$, $p<0,05$ y HDL3c-CE: $r=-0,61$, $p<0,001$). De modo interesante, el HOMA-IR correlacionó negativamente con la capacidad de las HDL para promover el eflujo de colesterol celular a partir de macrófagos ($r=-0,44$, $p<0,05$), sugiriendo un rol clave de la resistencia a la insulina en el deterioro de esta función antiaterogénica.

Cuando las correlaciones fueron evaluadas solo en el grupo de los pacientes ($n=18$), la concentración de ferritina presentó menor número de correlaciones significativas que la saturación de Tf. De hecho, la saturación de Tf correlacionó con la secreción de insulina ($r=-0,67$, $p<0,01$) y la funcionalidad de la célula β ($r=-0,68$, $p<0,01$), así como con la disminución de los niveles de las subfracciones de HDL (masas lipoproteicas de: HDL3a: $r=-0,64$, $p<0,01$; HDL3b, $r=-0,58$, $p<0,05$; y HDL3c: $r=-0,63$, $p<0,01$).

Respecto a los parámetros lipídicos, el índice TG / C-HDL mostró una amplia variedad de correlaciones con las alteraciones del metabolismo lipoproteico. Estas correlaciones fueron significativas con las concentraciones de C-VLDL ($r=0,57$, $p<0,01$) y de apo B ($r=0,46$, $p<0,05$), con la actividad de CETP ($r=0,84$, $p<0,001$), con el enriquecimiento en TG de las subfracciones de LDL (LDL3-TG: $r=0,63$, $p<0,01$; LDL5-TG: $r=0,57$, $p<0,01$), y con las alteraciones cualitativas en las subfracciones de HDL (HDL3a-TG: $r=0,68$, $p<0,01$; HDL3a-CE: $r=-0,71$, $p<0,01$; HDL3b-TG: $r=0,54$, $p<0,05$; HDL3b-CE: $r=-0,59$, $p<0,01$; y HDL3c-CE: $r=-0,64$, $p<0,01$).

5.1.3. Efectos de la reducción de los niveles de hierro.

Dado que los pacientes con SH presentaron diversas alteraciones metabólicas acompañadas por aumento de biomarcadores de enfermedad cardiovascular, en la presente sección se evaluó el impacto del tratamiento por flebotomías periódicas sobre la función hepática y el metabolismo de la glucosa y de las lipoproteínas.

De los 20 pacientes con SH estudiados inicialmente en la sección 5.1.1., 11 completaron el estudio longitudinal. Antes del tratamiento, las variables clínicas y bioquímicas generales de este subgrupo no habían mostrado diferencias respecto al grupo total de individuos ($p > 0,05$). El tratamiento no modificó los niveles de saturación de Tf, mientras que se observó una reducción sostenida de la concentración de ferritina (Tabla 11). En paralelo, se evidenció una disminución de las actividades de ASAT y ALAT, al igual que de los niveles del marcador inflamatorio, PCRus. La glucemia, la insulinemia y el índice HOMA-IR no se modificaron significativamente con el tratamiento (Tabla 11).

Tabla 11. Efecto de la reducción de los niveles de hierro sobre los parámetros bioquímicos generales de los pacientes con sobrecarga de hierro.

(n=11)	Pre	Post	Diferencia [media (IC95)]	p
Saturación Tf (%)	56±25	59±30	2 (-8-13)	NS
Ferritina (ng/ml)	444 (176-757)	80 (60-95)	-578 [-1050-(-105)]	<0,001
Bilirrubina (mg/dl)	0,9 (0,6-1,1)	0,5 (0,4-0,7)	-0,3 (-0,5-0,1)	NS
ALAT (UI/l)	35 (23-46)	27 (14-33)	-13 [-23-(-4)]	<0,001
ASAT (UI/l)	28 (25-35)	24 (20-28)	-9 [-16-(-2)]	<0,005
FAL (UI/l)	64±17	60±17	-4 (-12-3)	NS
Glucosa (mg/dl)	93±16	86±16	-4 (-13-5)	NS
Insulina (µU/ml)	14±7	13±8	-2 (-9-6)	NS
HOMA-IR	2,2 (1,8-5,3)	2,5 (1,5-3,4)	0,3 (-2,3-1,8)	NS
PCRus (mg/l)	1,0 (0,5-3,9)	0,6 (0,5-0,9)	-1,3 [-3,1-(-0,8)]	<0,05

Tf, transferrina; ALAT, alanina aminotransferasa; ASAT, aspartato aminotransferasa; FAL, fosfatasa alcalina; HOMA, *homeostasis model assessment*; PCRus, proteína C reactiva ultrasensible; NS, no significativo. Los resultados están expresados como media±DE o mediana (Q1-Q3) para variables con distribución paramétrica y no paramétrica, respectivamente.

En relación al perfil de lípidos y lipoproteínas, y la actividad de CETP, los cambios inducidos por la reducción de los niveles de hierro se muestran en la tabla 12. En particular, los niveles de TG, el índice TG / C-HDL y la actividad de CETP disminuyeron significativamente en respuesta al tratamiento.

Tabla 12. Efecto de la reducción de los niveles de hierro sobre el perfil lipoproteico y la actividad de CETP de los pacientes con sobrecarga de hierro.

(n=11)	Pre	Post	Diferencia [media (IC95)]	p
TG (mg/dl)	147 (120-205)	140 (106-202)	-33 [-67-(-15)]	<0,05
CT (mg/dl)	183±35	170±18	-15 (-40-10)	NS
C-VLDL (mg/dl)	18 (14-27)	16 (13-28)	-1 (-10-8)	NS
C-LDL (mg/dl)	122±32	102±25	-17 (-47-14)	NS
C-HDL (mg/dl)	40±8	42±8	1,7 (-2,0-5,4)	NS
CT / C-HDL	4,6±1,0	4,2±1,2	-0,4 (-1,1-0,3)	NS
TG / C-HDL	4,7 (2,8-5,1)	3,3 (2,5-4,5)	-0,9 [-1,9-(-0,5)]	<0,01
Apo B (mg/dl)	82±19	85±18	6 (-10-22)	NS
Apo A-I (mg/dl)	133±19	130±16	-2 (-15-10)	NS
CETP (%/ml.h)	181±30	153±28	-28 [-30-(-8)]	<0,05

TG, triglicéridos; CT, colesterol total; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad; apo, apolipoproteína; CETP, proteína transportadora de colesterol esterificado; NS, no significativo. Los resultados están expresados como media±DE o mediana (Q1-Q3) para variables con distribución paramétrica y no paramétrica, respectivamente.

Por último, mientras que no hubo diferencias en las actividades de PON [Pre: 290±130 vs. Post: 288±96 nmol/ml.min; Diferencias: 21 (-71-114) nmol/ml.min; p>0,05] o ARE [Pre: 161±31 vs. Post: 141±27 µmol/ml.min; Diferencias: -13 (-34-7) µmol/ml.min; p>0,05], se observó una reducción significativa en la actividad de Lp-PLA₂ luego del tratamiento por flebotomía (Figura 14).

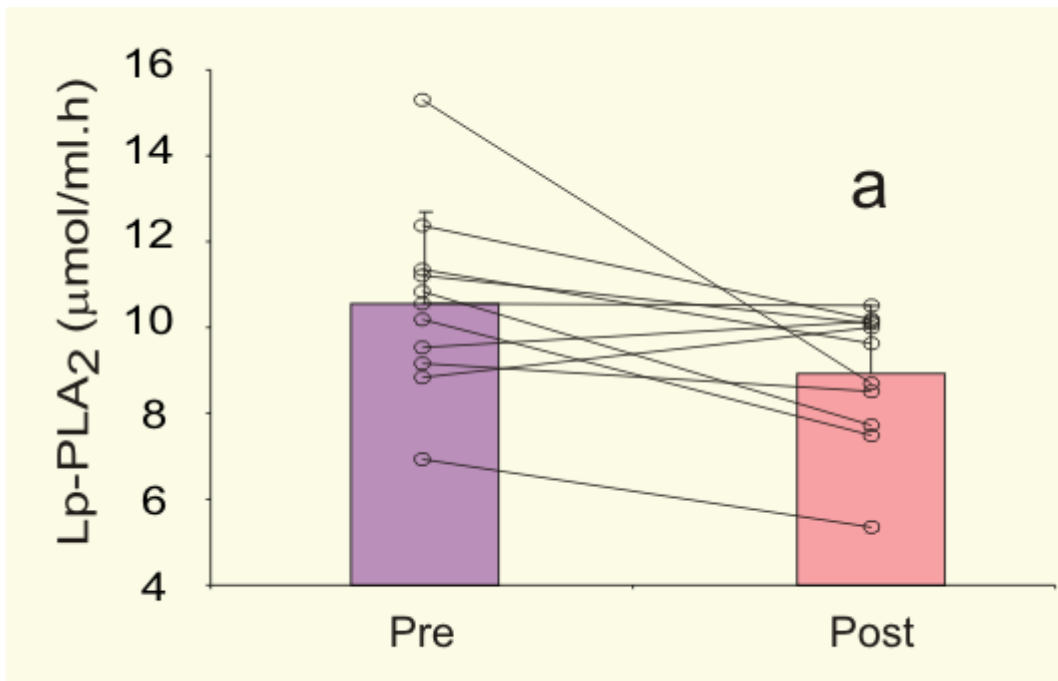


Figura 14. Actividad de Lp-PLA₂ en pacientes con sobrecarga de hierro antes y después de la reducción de los niveles de hierro por flebotomías periódicas (n=11). Lp-PLA₂, fosfolipasa A₂ asociada a lipoproteínas.

5.2. Deficiencia de hierro.

5.2.1. Factores de riesgo cardiovascular y marcadores de estrés oxidativo, inflamación y enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

El presente capítulo desarrolla las características metabólicas y el análisis de los factores de riesgo cardiovascular asociados a la ADH. Se evaluaron 24 pacientes con ADH en comparación a 24 controles sanas pareadas por sexo y edad con las pacientes.

a) Características clínicas y bioquímicas generales.

Las características clínicas y bioquímicas generales de las pacientes con ADH y de las controles sanas se encuentran en la tabla 13. El grupo de pacientes no presentó diferencias en la edad, el IMC, la prevalencia de sobrepeso/obesidad, ni en el número de pacientes menopáusicas respecto al grupo de controles.

Tabla 13. Características clínicas y bioquímicas generales de las pacientes con anemia por deficiencia de hierro y controles sanas.

	Pacientes con ADH (n=24)	Controles Sanas (n=24)	p
Edad (años)	44±10	44±13	NS
IMC (Kg/m²)	23±4	23±2	NS
Sobrepeso/obesidad (n)	4/0	3/0	NS
Menopausia (si/no)	4/20	4/20	NS
Hto (%)	30±3	40±2	<0,001
Hb (g/dl)	10,0 (8,9-10,9)	13,1 (12,5-13,8)	<0,001
VCM (fl)	74 (70-79)	89 (86-92)	<0,001
ADE (%)	16,5 (15,2-18,5)	13,1 (12,9-14,0)	<0,001
GB (10³céls/ml)	5,9 (4,7-7,3)	6,4 (5,3-7,0)	NS
Plaquetas (10³céls/ml)	322±69	275±59	<0,05
Saturación de Tf (%)	6 (3-8)	28 (19-37)	<0,001
Ferritina (ng/ml)	5,6 (4,3-9,0)	39,3 (19,0-68,7)	<0,001
Bilirrubina (mg/dl)	0,5±0,3	0,7±0,2	NS
ALAT (UI/l)	13±4	17±5	<0,05
ASAT (UI/l)	17±4	20±4	NS
FAL (UI/l)	48±20	50±16	NS
Glucosa (mg/dl)	88±8	84±13	NS
Insulina (μU/ml)	6,3 (3,0-7,8)	4,2 (2,4-6,5)	NS
HOMA-IR	1,3 (0,7-1,8)	1,0 (0,5-1,4)	NS

ADH, anemia por deficiencia de hierro; IMC, índice de masa corporal; Hto, hematocrito; Hb, hemoglobina; VCM, volumen corpuscular medio; ADE, amplitud de la distribución eritrocitaria; GB, glóbulos blancos; Tf, transferrina; ALAT, alanina aminotransferasa; ASAT, aspartato aminotransferasa; FAL, fosfatasa alcalina; HOMA, *homeostasis model assessment*; NS, no significativo. Los resultados están expresados como media±DE o mediana (Q1-Q3) para variables con distribución paramétrica y no paramétrica, respectivamente.

De acuerdo a los criterios de inclusión, las pacientes exhibieron menores valores de Hb, hematocrito, VCM, saturación de Tf y ferritina (Tabla 13). A su vez, las pacientes presentaron trombocitosis y mayor recuento absoluto de leucocitos mononucleares respecto a las controles (linfocitos: $2,0 \pm 0,6$ vs. $1,5 \pm 0,4$ 10^3 céls/ml, $p < 0,005$; y monocitos: $0,5 \pm 0,2$ vs. $0,4 \pm 0,1$ 10^3 céls/ml, $p < 0,001$). Por otro lado, no hubo diferencias significativas en los marcadores del metabolismo de los hidratos de carbono (Tabla 13).

b) Perfil de lípidos y lipoproteínas.

Los resultados del perfil de lípidos y lipoproteínas se muestran en la tabla 14. Las pacientes con ADH presentaron disminución del CT principalmente a expensas del C-HDL, en paralelo a un aumento de la concentración de TG. A su vez, mientras que el índice TG / C-VLDL fue menor en las pacientes con ADH, el índice TG / C-HDL se encontró aumentado (Tabla 14).

Tabla 14. Perfil de lípidos y lipoproteínas de las pacientes con anemia por deficiencia de hierro y controles sanas.

	Pacientes con ADH (n=24)	Sujetos Controles (n=24)	p
TG (mg/dl)	89 (74-108)	61 (52-71)	<0,001
CT (mg/dl)	172±31	192±36	<0,05
C-VLDL (mg/dl)	17 (12-22)	14 (10-18)	NS
C-LDL (mg/dl)	106±27	114±28	NS
C-HDL (mg/dl)	52±15	64±16	<0,05
C-VLDL / TG	0,14 (0,13-0,20)	0,21 (0,18-0,28)	<0,05
TG/ C-HDL	1,7 (1,4-3,1)	1,1 (0,8-1,3)	<0,001
Apo B (mg/dl)	83±20	80±21	NS
Apo A-I (mg/dl)	149 (128-173)	156 (138-204)	NS

ADH, anemia por deficiencia de hierro; TG, triglicéridos; CT, colesterol total; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad; apo, apolipoproteína; NS, no significativo. Los resultados están expresados como media±DE o mediana (Q1-Q3) para variables con distribución paramétrica y no paramétrica, respectivamente.

En coherencia con el perfil lipídico de las pacientes, la actividad de CETP se encontró significativamente aumentada (Figura 15).

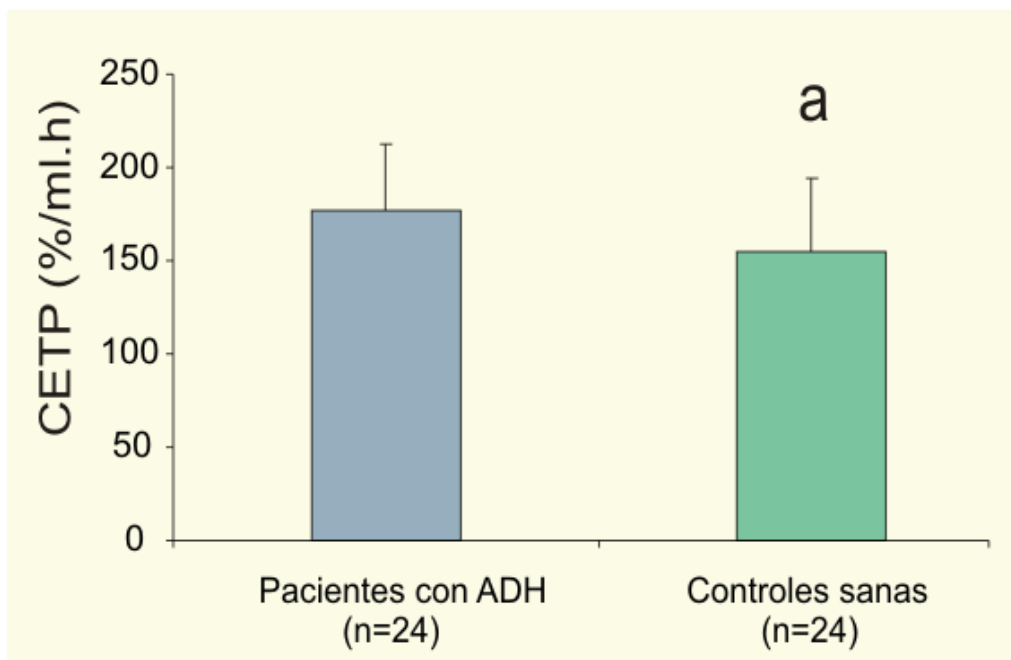


Figura 15. Actividad de CETP en pacientes con anemia por deficiencia de hierro y controles. ADH, anemia por deficiencia de hierro; CETP, proteína transportadora de colesterol esterificado. ^a p<0,05.

Las alteraciones del metabolismo lipoproteico estuvieron correlacionadas tanto con la concentración de Hb y ferritina, así como con la saturación de Tf (Tabla 15). Debido al diseño del estudio y a que todas las pacientes presentaron anemia por DH, no se pudieron determinar las contribuciones de la anemia y de la deficiencia de hierro por separado mediante un análisis multivariado, como se realizó para diferenciar entre SH y resistencia a la insulina en la sección 5.1.

Tabla 15. Correlaciones entre el perfil de lípidos y principales parámetros hematológicos y ferrocinéticos en la población estudiada (n=48).

	Hb	Saturación de Tf	Ferritina
TG [r (p)]	-0,45 (<0,001)	-0,45 (<0,001)	-0,46 (<0,001)
CT [r (p)]	0,26 (NS)	0,28 (NS)	0,38 (<0,01)
C-VLDL [r (p)]	-0,03 (NS)	-0,07 (NS)	0,02 (NS)
C-LDL [r (p)]	0,19 (NS)	0,12 (NS)	0,32 (<0,05)
C-HDL [r (p)]	0,26 (NS)	0,36 (<0,05)	0,24 (NS)
C-VLDL / TG [r (p)]	0,35 (<0,05)	0,36 (<0,05)	0,42 (<0,005)
TG / C-HDL [r (p)]	-0,48 (<0,001)	-0,57 (<0,001)	-0,49 (<0,001)
Apo B [r (p)]	0,09 (NS)	-0,02 (NS)	0,14 (NS)
Apo A-I [r (p)]	0,26 (NS)	0,18 (NS)	0,12 (NS)
CETP [r (p)]	-0,44 (<0,005)	-0,30 (<0,05)	-0,26 (NS)

Hb, hemoglobina; Tf, transferrina; TG, triglicéridos; CT, colesterol total; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad; apo, apolipoproteína; CETP, proteína transportadora de colesterol esterificado; NS, no significativo.

c) Marcadores de inflamación, estrés oxidativo y enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

Las concentraciones plasmáticas de los marcadores de inflamación, de estrés oxidativo y de ECV, así como las actividades PON y ARE, se muestran en la tabla 16. Las pacientes presentaron niveles de PCRus, VCAM-1, LDL oxidadas, TBARS y PON similares a los controles. Es destacable que la distribución de fenotipos de la enzima PON no fue diferente entre los grupos ($p>0,05$). Contrariamente, se observó una disminución significativa de la actividad ARE y una mayor actividad de Lp-PLA₂ en las pacientes con ADH respecto a los controles (Tabla 16 y Figura 16).

Tabla 16. Marcadores de inflamación y estrés oxidativo en pacientes con anemia por deficiencia de hierro y sujetos controles

	Pacientes con ADH (n=24)	Sujetos Controles (n=24)	P
PCRus (mg/l)	0,7 (0,5-2,0)	0,8 (0,4-1,4)	NS
VCAM-1* (ng/ml)	606±128	518±161	NS
LDLox* (UI/l)	60±11	71±21	NS
TBARS (nM)	2,8±0,5	2,7±0,4	NS
PON (nmol/ml.min)	232 (128-329)	240 (175-349)	NS
ARE (µmol/ml.min)	124±28	147±28	<0,05

ADH, anemia por deficiencia de hierro; PCRus, proteína C reactiva ultrasensible; VCAM, molécula de adhesión vascular; LDLox, lipoproteínas de baja densidad oxidadas; TBARS, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico; PON, actividad paraoxonasa; ARE, actividad arilesterasa; NS, no significativo. Los resultados están expresados como media±DE o mediana (Q1-Q3) para variables con distribución paramétrica y no paramétrica, respectivamente. *Determinaciones efectuadas en un subgrupo aleatorio de 12 pacientes y sus respectivos controles.

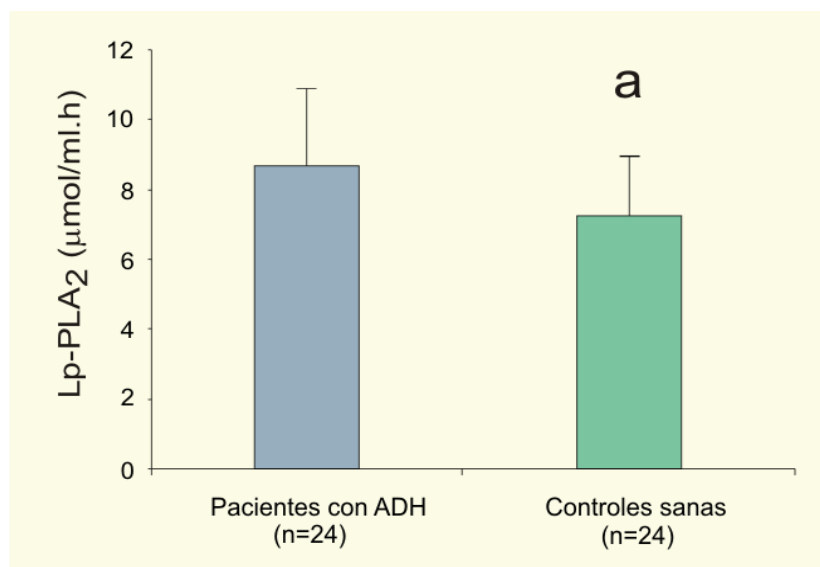


Figura 16. Actividad de Lp-PLA₂ en pacientes con anemia por deficiencia de hierro y controles. ADH, anemia por deficiencia de hierro; Lp-PLA₂, fosfolipasa A₂ asociada a lipoproteínas. ^a p<0,05.

En cuanto al estudio de correlaciones, mientras que la concentración de Hb se asoció inversamente con la actividad de Lp-PLA₂ ($r=-0,39$; $p<0,01$) y la concentración de VCAM-1 ($r=-0,49$; $p<0,05$), el porcentaje de saturación de Tf se asoció con la actividad ARE ($r=0,31$; $p<0,05$). De modo similar a la concentración de Hb, la ferritina tuvo una correlación negativa con los niveles de VCAM-1 ($r=-0,50$; $p<0,05$). Por último, la disminución de la actividad ARE correlacionó con los menores niveles de C-HDL observados en las pacientes ($r=0,47$; $p<0,001$).

Globalmente, los presentes resultados muestran una disminución de la capacidad antioxidante de las HDL y un proceso inflamatorio vascular que se acentuaría en paralelo a la severidad de la anemia. Sin embargo, es de notar que estas alteraciones no condujeron a modificaciones significativas de marcadores sistémicos (de menor sensibilidad), tales como la concentración de PCRus, para la inflamación, de TBARS, para el estrés oxidativo, y de LDL oxidadas, para el deterioro de la función antioxidante de las HDL. Por este motivo y a razón de los cambios bioquímicos involucrados en el metabolismo y la funcionalidad de las HDL, a continuación se evaluó el efecto de la ADH sobre la calidad de estas lipoproteínas.

5.2.2. Caracterización de la composición y funcionalidad de las HDL.

La caracterización de la composición química y de la funcionalidad de las HDL fue llevada a cabo en un subgrupo de pacientes (n=18) y controles (n=18) seleccionados aleatoriamente. Las características generales y el perfil de lípidos y lipoproteínas de este subgrupo no variaron significativamente de los de la población general ya presentadas.

a) Composición química de las HDL.

Se efectuó el aislamiento de las HDL por ultracentrifugación secuencial y se determinó su composición química. La figura 17 muestra la composición porcentual de las HDL de las pacientes con ADH y de las controles. Coherente con el aumento de CETP observado, las HDL de las pacientes con ADH exhibieron un enriquecimiento en TG respecto a las HDL de las controles. Asimismo, en paralelo a la disminución del C-HDL, la masa plasmática total de HDL fue menor en las pacientes [64 (52-96) vs. 103 (66-122) mg/dl, $p < 0,05$].

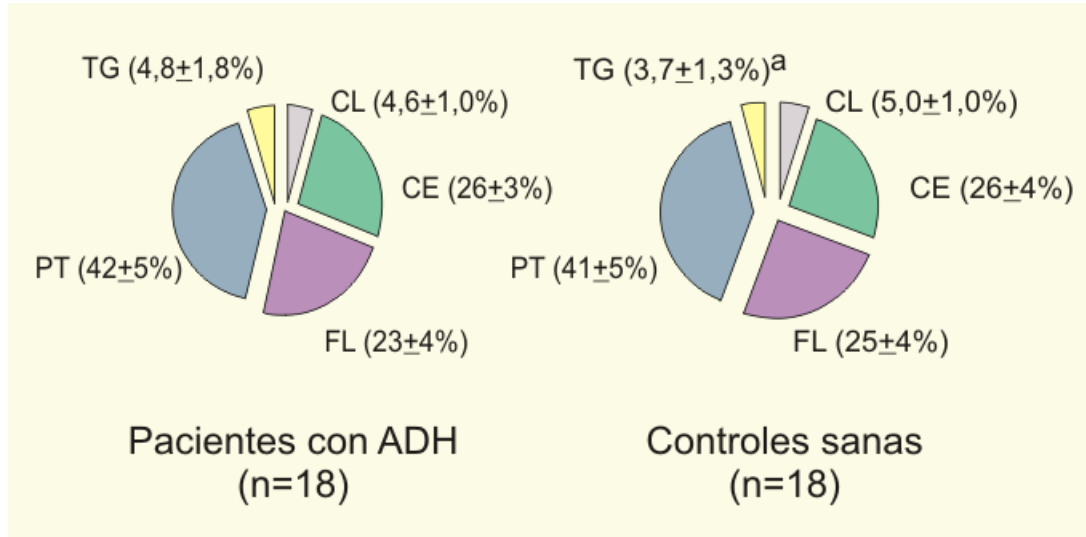


Figura 17. Composición química porcentual de las HDL de las pacientes con anemia por deficiencia de hierro y de las controles. ADH, anemia por deficiencia de hierro; CL, colesterol libre; CE, colesterol esterificado; TG, triglicéridos; FL, fosfolípidos; PT, proteínas totales. Los resultados están expresados como media±DE. ^ap<0,05.

El aumento de la actividad de CETP se asoció tanto al enriquecimiento en TG de las HDL ($r=0,55$; $p<0,01$), como a la disminución de su masa lipoproteica total ($r=-0,33$; $p<0,05$). A su vez, el contenido en TG de las HDL correlacionó con la concentración de TBARS ($r=0,40$; $p<0,05$), sugiriendo un vínculo entre el enriquecimiento en TG de las HDL y el estrés oxidativo. Por último, la actividad ARE se asoció directamente con la masa total de HDL ($r=0,39$; $p<0,05$), así como con los niveles plasmáticos de apo A-I ($r=0,43$; $p<0,05$).

En cuanto a las relaciones entre la composición química de las HDL, la anemia y la DH, las concentraciones de Hb y ferritina presentaron correlaciones significativas con el contenido en TG de las HDL ($r=-0,41$; $p<0,05$, y $r=-0,34$; $p<0,05$, respectivamente) y con la masa plasmática total de HDL ($r=0,41$; $p<0,05$, y $r=0,39$; $p<0,05$, respectivamente). En conjunto, estas correlaciones sugieren que el deterioro cuantitativo y cualitativo de las HDL se exagera acorde al grado de anemia y de DH.

b) Funcionalidad de las HDL.

Al evaluar las funciones antiaterogénicas de las HDL de las pacientes y las controles, se observó un deterioro en la función antioxidante, acompañado por una disminución no significativa en su capacidad para promover el eflujo de colesterol celular (Figura 18).

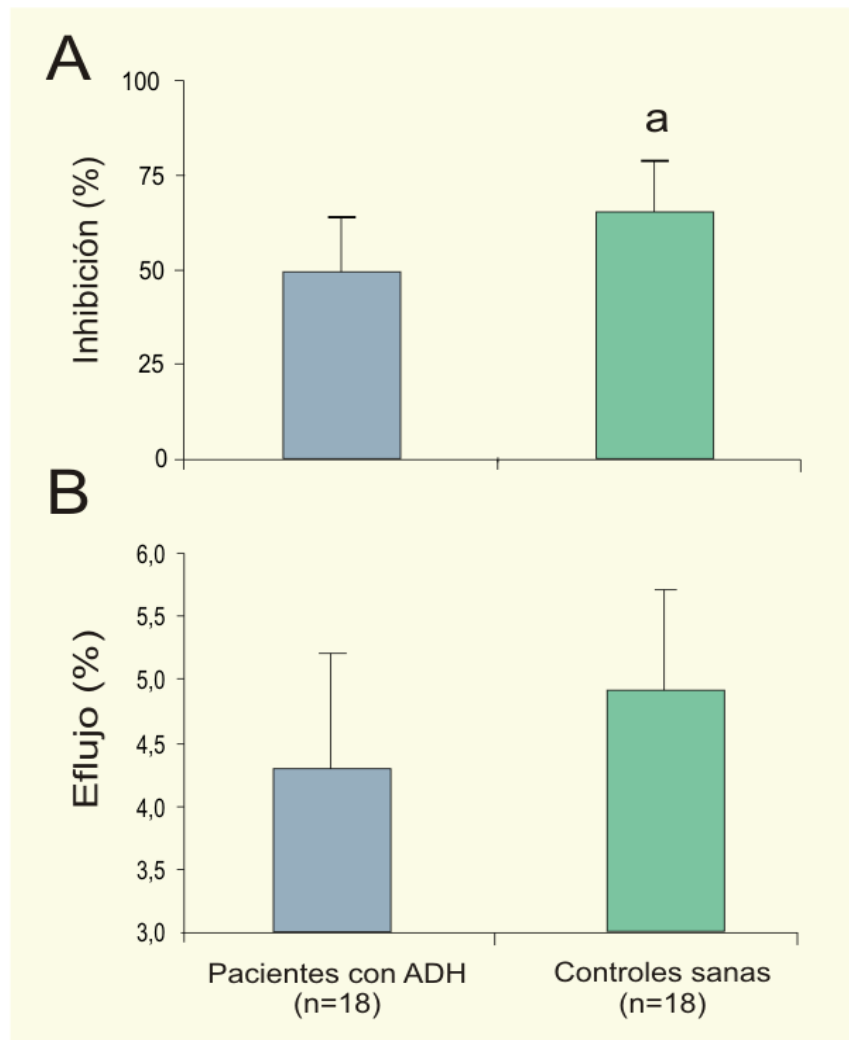


Figura 18. Capacidad para inhibir la oxidación de las LDL (Panel A) y para promover el eflujo de colesterol de macrófagos (Panel B) de las HDL de las pacientes con anemia por deficiencia de hierro y de las controles. ADH, anemia por deficiencia de hierro. ^a p<0,05.

La capacidad antioxidante de las HDL correlacionó con la concentración de Hb ($r=0,53$; $p<0,01$) y la saturación de Tf ($r=0,55$; $p<0,01$), indicando que las propiedades antioxidantes de las HDL están más afectadas en relación al grado de severidad de la anemia. Asimismo, la actividad plasmática de ARE correlacionó positivamente con la actividad antioxidante de las HDL ($r=0,49$; $p<0,01$) y negativamente con la concentración de TBARS ($r=-0,37$; $p<0,05$).

Al ser la actividad ARE un factor que se asoció íntimamente con las alteraciones de la función antioxidante de las HDL y con los TBARS, se realizó un estudio multivariado para identificar a los predictores de su actividad plasmática (Tabla 17). Este análisis reveló que casi un 50% del deterioro de la actividad plasmática de ARE fue atribuible a la disminución del C-HDL en un modelo ajustado por edad, IMC, Hb, ferritina y CETP.

Tabla 17. Análisis de regresión lineal múltiple empleando a la actividad arilesterasa como variable dependiente en la población estudiada (n=36).

Variable Dependiente	Variabes Independientes	Bst	T	p	R²
ARE	Edad	-0,167	-1,244	NS	0,48
	IMC	-0,249	-0,897	NS	
	Hb	0,392	1,940	NS	
	C-HDL	0,724	4,907	<0,001	
	Ferritina	-0,077	-0,445	NS	
	CETP	0,290	1,647	NS	

ARE; actividad arilesterasa; IMC, índice de masa corporal; Hb, hemoglobina; C-HDL, colesterol de la lipoproteína de alta densidad; CETP, proteína transportadora de colesterol esterificado; NS, no significativo.

Por otro lado, al analizar las variables asociadas a la actividad antioxidante de las HDL, resultaron significativas la edad (Bst = 0,509; $t = 3,056$; $p<0,05$), los

niveles de Hb (Bst = 0,580; t = 3,189 p<0,05) y la actividad ARE (Bst = 0,588; t = 2,723; p<0,05) en un modelo ajustado por IMC y C-HDL ($R^2 = 0,68$).

5.2.3. Efectos subagudos de los administración endovenosa de hierro.

Las características clínicas y bioquímicas generales de las 16 pacientes que fueron tratadas con hierro endovenoso no variaron respecto a las del total del grupo estudiado en 5.2.1. En la mayor parte de los casos, la indicación de la infusión de hierro endovenoso por goteo lento se basó en la intolerancia al tratamiento con hierro por vía oral.

La tabla 18 exhibe los cambios de los parámetros hematológicos, del perfil del hierro y de los indicadores del metabolismo de los hidratos de carbono 72 hs posteriores a la infusión endovenosa de hierro. El tratamiento no modificó la concentración de Hb, pero elevó significativamente la saturación de Tf y la ferritina. Este aumento de ferritina es atribuible al depósito transitorio del hierro administrado en los macrófagos y podría ser considerado como hierro “en tránsito”. Acompañando estos cambios, se evidenció una disminución de la insulina y del índice HOMA-IR, sin verse afectados los niveles de glucemia en ayunas, ni los otros parámetros evaluados.

Tabla 18. Efectos subagudos de la administración endovenosa de hierro sobre los parámetros bioquímicos generales de las pacientes con anemia por deficiencia de hierro.

(n=16)	Pre	Post 72hs	Diferencia [media (IC95)]	P
Hto (%)	29±3	31±3	0,9 (-0,2-2,0)	NS
Hb (g/dl)	9,7±1,4	10,1±1,2	0,3 (-0,1-0,7)	NS
VCM (fl)	74±8	75±7	0,6 (-0,6-1,8)	NS
ADE (%)	17,5 (15,6-19,0)	17,9 (15,8-19,3)	0,3 (-0,4-1,0)	NS
GB (10³céls/ml)	6,1±1,9	6,0±1,8	-0,1 (-0,8-0,6)	NS
Plaquetas (10³céls/ml)	320±96	296±76	-10 (-44-23)	NS
Saturación de Tf (%)	7±3	18±8	11 (6-15)	<0,001
Ferritina (ng/ml)	6 (4-10)	105 (70-213)	127 (74-180)	<0,001
Glucosa (mg/dl)	92±11	86±12	-6 (-14-2)	NS
Insulina (µU/ml)	6,3 (3,0-8,3)	5,5 (2,8-7,5)	-2,1 [-2,7-(-0,4)]	<0,05
HOMA-IR	1,4 (0,7-2,1)	1,1 (0,6-1,5)	-0,4 [-0,7-(-0,1)]	<0,05

Hto, hematocrito; Hb, hemoglobina; VCM, volumen corpuscular medio; ADE, amplitud de la distribución eritrocitaria; GB, glóbulos blancos; Tf, transferrina; HOMA, *homeostasis model assessment*. Los resultados están expresados como media±DE o mediana (Q1-Q3) para variables con distribución paramétrica y no paramétrica, respectivamente.

Al evaluar el perfil de lípidos y lipoproteínas y la actividad de CETP no se evidenciaron modificaciones significativas como resultado del tratamiento (Tabla 19). Asimismo, las actividades de Lp-PLA₂ y de PON tampoco fueron diferentes (Tabla 19). No obstante, se observó una disminución de los TBARS, acompañado por un aumento de la actividad ARE en las pacientes post infusión endovenosa de hierro (Figura 19).

Tabla 19. Efectos subagudos de la administración endovenosa de hierro sobre el perfil de lípidos y las actividades de proteínas y enzimas asociadas a lipoproteínas de las pacientes con anemia por deficiencia de hierro.

(n=16)	Pre	Post 72hs	Diferencia [media (IC95)]	p
TG (mg/dl)	91 (74-108)	95 (72-134)	6 (-15-28)	NS
CT (mg/dl)	167±32	169±29	1 (-11-13)	NS
C-VLDL (mg/dl)	15±6	15±8	0,5 (-9,6-10,6)	NS
C-LDL (mg/dl)	102±26	105±29	3 (-6-12)	NS
C-HDL (mg/dl)	51±14	49±11	-2 (-10-6)	NS
CT / C-HDL	3,5±0,9	3,6±0,9	0,1 (-0,3-0,5)	NS
Apo B (mg/dl)	78±20	80±21	2 (-4-8)	NS
Apo A-I (mg/dl)	153±29	153±22	2 (-19-23)	NS
CETP (%/ml.h)	196±21	221±60	25 (-15-64)	NS
PON (nmol/ml.min)	230±90	215±98	-16 (-68-37)	NS
Lp-PLA₂ (µmol/ml.h)	9,2±1,8	8,3±2,6	-0,9 (-2,3-0,6)	NS

TG, triglicéridos; CT, colesterol total; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad; apo, apolipoproteína; CETP, proteína transportadora de colesterol esterificado; PON, actividad paraoxonasa; Lp-PLA₂, fosfolipasa A₂ asociada a lipoproteínas. Los resultados están expresados como media±DE o mediana (Q1-Q3) para variables con distribución paramétrica y no paramétrica, respectivamente.

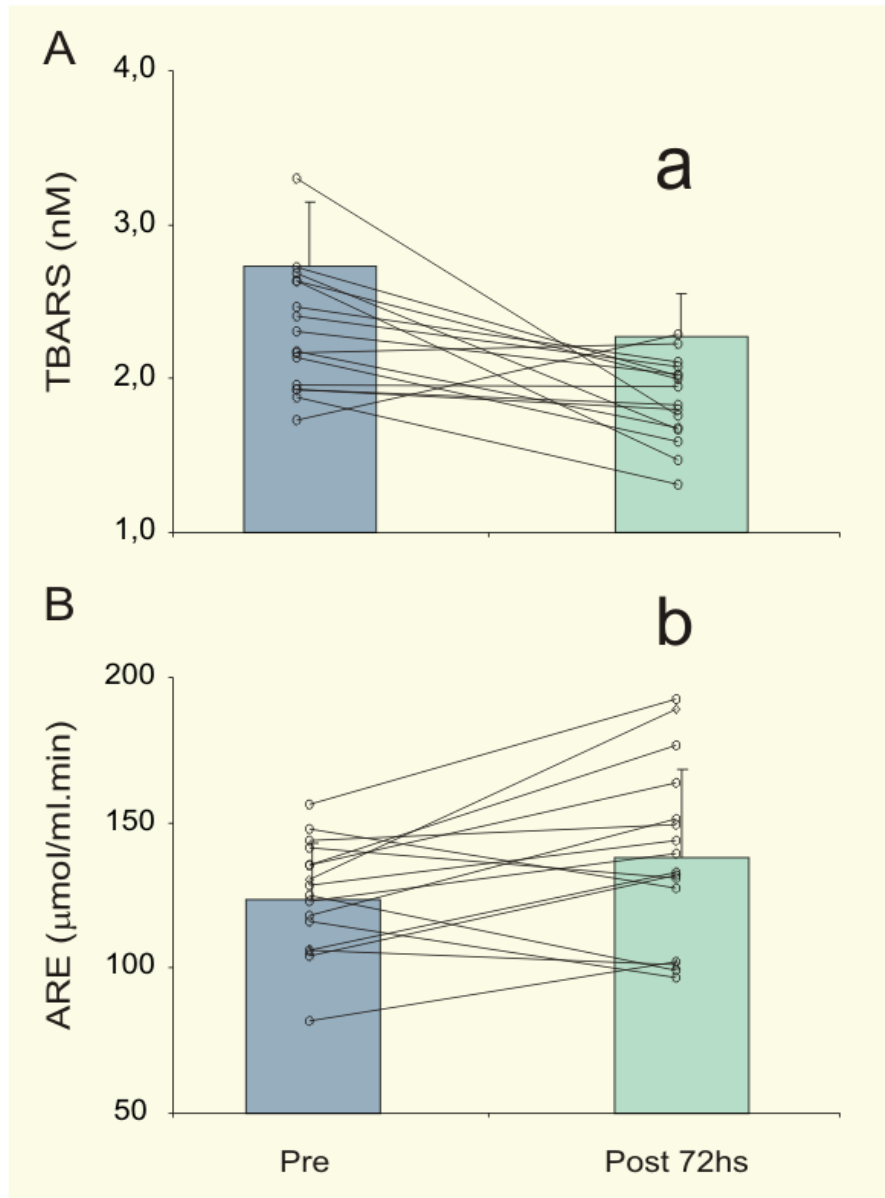


Figura 19. Concentración de TBARS (Panel A) y actividad ARE (Panel B) en pacientes con anemia por deficiencia de hierro antes y después de la infusión endovenosa de 300mg de hierro sacarato (n=16).TBARS, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico; ARE, arilesterasa. ^a p<0,005; ^b p<0,05.

5.2.4 Efectos de la restauración de los niveles de hemoglobina.

Las pacientes que completaron el tratamiento fueron evaluadas una vez resuelta la situación de anemia ($Hb > 12$ g/dl; $n=7$). Estas pacientes sólo se diferenciaron del resto del grupo por exhibir mayor edad (52 ± 13 vs. 40 ± 7 años, $p<0,05$) y saturación de transferrina (10 ± 3 vs. $5\pm 2\%$, $p<0,05$) en la evaluación inicial.

Respecto a los parámetros hematológicos y ferrocínéticos, se observó un aumento de la concentración de Hb, del hematocrito, del VCM, de la saturación de Tf y de los niveles de ferritina. Por otro lado, la amplitud de la distribución eritrocitaria (ADE) disminuyó (Tabla 20). Adicionalmente, se observó una reducción de la concentración de TBARS luego del tratamiento que no alcanzó la significancia estadística [Pre: $2,7\pm 0,3$ vs. Post: $2,4\pm 0,5$ nM; diferencia: $-0,3$ ($-0,8$ - $0,4$) nM; $p=0,210$].

Tabla 20. Efecto de la restauración de los niveles de hemoglobina sobre los parámetros bioquímicos generales de las pacientes con anemia por deficiencia de hierro.

(n=7)	Pre	Post	Diferencia [media (IC95)]	p
Hto (%)	31±5	40±2	9,3 (0,5-18)	<0,05
Hb (g/dl)	10,9 (7,6-11,6)	13,3 (13,0-13,8)	3,2 (1-7)	<0,005
VCM (fl)	77±9	89±2	12 (1-23)	<0,05
ADE (%)	16,5 (14,4-19,5)	13,3 (13,2-13,4)	-3,2 [-5,7-(-0,8)]	<0,05
GB (10 ³ céls/ml)	6,5±1,4	6,1±1,1	-0,6 (-2,1-0,9)	NS
Plaquetas (10 ³ céls/ml)	313±93	241±45	-22 (-70-26)	NS
Saturación de Tf (%)	10±3	26±10	17 (2-31)	<0,05
Ferritina (ng/ml)	8±4	24±9	16 (1-32)	<0,05
Glucemia (mg/dl)	90±6	88±10	0,4 (-12,4-13,2)	NS
Insulina (µU/ml)	5,9±1,8	6,8±3,2	1,0 (-3,1-3,8)	NS
HOMA-IR	1,3±0,5	1,4±0,7	0,4 (-0,5-1,2)	NS
PCRus (mg/l)	1,0±0,7	0,9±0,4	-0,1 (-0,8-0,5)	NS

Hto, hematocrito; Hb, hemoglobina; VCM, volumen corpuscular medio; ADE, amplitud de la distribución eritrocitaria; GB, glóbulos blancos; Tf, transferrina; HOMA, *homeostasis model assessment*. Los resultados están expresados como media±DE o mediana (Q1-Q3) para variables con distribución paramétrica y no paramétrica, respectivamente.

En cuanto al perfil lipídico y las actividades de las enzimas y proteínas asociadas a las lipoproteínas, el tratamiento se asoció a una disminución significativa en las actividades de CETP (Tabla 21) y de Lp-PLA₂ (Figura 20).

Tabla 21. Efecto de la de la restauración de los niveles de hemoglobina sobre el perfil de lípidos y las actividades de proteínas y enzimas asociadas a lipoproteínas de las pacientes con anemia por deficiencia de hierro.

(n=7)	Pre	Post	Diferencia [media (IC95)]	p
TG (mg/dl)	99±49	82±21	-17 (-52-18)	NS
CT (mg/dl)	169±24	187±35	18 (-15-52)	NS
C-VLDL (mg/dl)	16±9	17±6	0,5 (-9,6-10,6)	NS
C-LDL (mg/dl)	98±18	112±30	19 (-17-54)	NS
C-HDL (mg/dl)	60±15	60±11	-0,9 (-8,6-6,8)	NS
CT / C-HDL	3,0±0,7	3,3±1,1	0,3 (-0,1-0,8)	NS
C-VLDL / TG	0,15±0,09	0,19±0,08	0,04 (-0,09-0,17)	NS
TG / C-HDL	1,9±0,8	1,4±0,5	-0,5 (-1,6-0,6)	NS
Apo B (mg/dl)	80±18	71±6	6 (-7-18)	NS
Apo A-I (mg/dl)	163±21	162±18	-9 (-73-55)	NS
CETP (%/ml.h)	184±25	150±14	-34 [-58-(-10)]	<0,05
PON (nmol/ml.min)	222±91	200±86	77 (-69-223)	NS
ARE (µmol/ml.min)	132±28	136±32	-1 (-36-35)	NS

TG, triglicéridos; CT, colesterol total; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad; apo, apolipoproteína; CETP, proteína transportadora de colesterol esterificado; PON, actividad paraoxonasa; Lp-PLA₂, fosfolipasa A₂ asociada a lipoproteínas. Los resultados están expresados como media±DE o mediana (Q1-Q3) para variables con distribución paramétrica y no paramétrica, respectivamente.

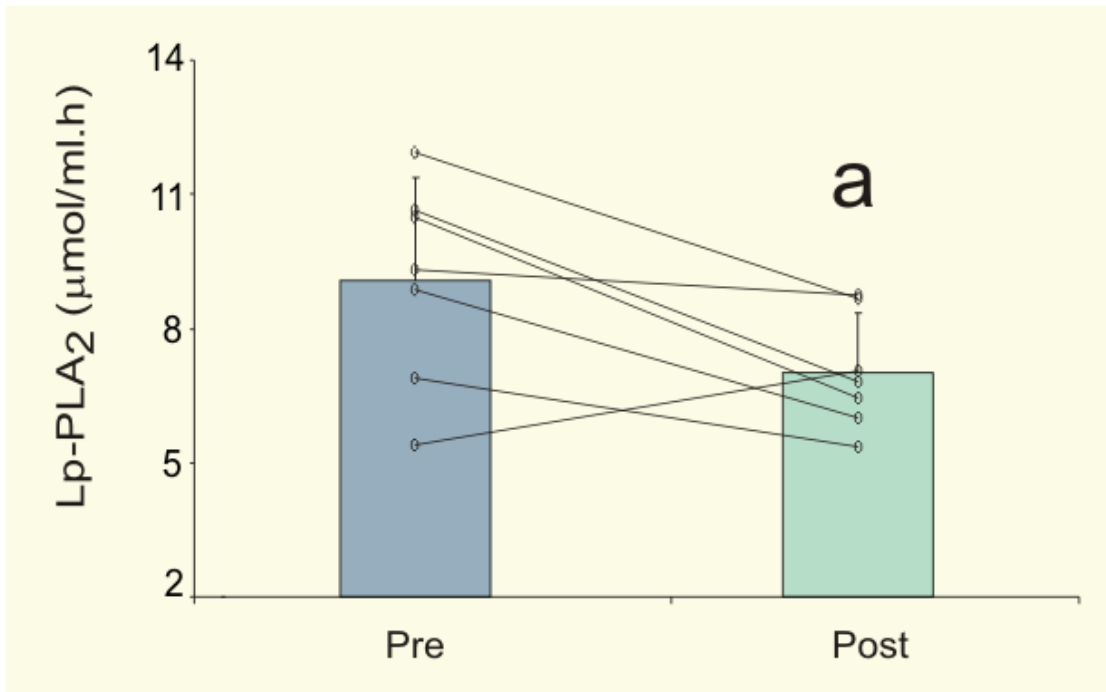


Figura 20. Actividad de Lp-PLA₂ en pacientes con anemia por deficiencia de hierro antes y después de la restauración de los niveles de hemoglobina (n=7). Lp-PLA₂, fosfolipasa A₂ asociada a lipoproteínas. ^a p<0,05.

6. Discusión

Tanto los pacientes con SH como aquellos con ADH presentaron alteraciones en el perfil de lípidos y lipoproteínas acompañado por un aumento de la actividad de CETP. A su vez, estas modificaciones estuvieron asociadas a la presencia de partículas de HDL modificadas y disfuncionales. Si bien se observaron diferencias en las magnitudes de dichas alteraciones entre los pacientes con SH y ADH, en comparación a sus respectivos grupos de controles, éstas serían atribuibles a la menor presencia de factores de riesgo aterogénico en el sexo femenino. Es así que los pacientes con SH mostraron un marcado aumento de la concentración de TG respecto a los controles y a los valores de referencia para adultos, mientras que las pacientes con ADH exhibieron niveles de TG, si bien dentro del rango de referencia, significativamente mayores en comparación a las controles. Adicionalmente, se evidenció un estado proinflamatorio en ambos trastornos del metabolismo del hierro a través del hallazgo de una mayor actividad de Lp-PLA₂, lo que sugiere la presencia de inflamación vascular. En resumen, tanto la sobrecarga como la deficiencia de hierro se asociaron a la presencia de factores de riesgo cardiovascular no tradicionales, los cuales se modificaron en respuesta al tratamiento específico de cada condición.

6.1. Sobrecarga de hierro.

6.1.1. Factores de riesgo cardiovascular y biomarcadores de enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

Este primer estudio permitió la descripción de distintas alteraciones en el metabolismo de los lípidos y las lipoproteínas, y la detección de marcadores de inflamación y aterosclerosis en pacientes con SH primaria. En particular, los pacientes presentaron, además de resistencia a la insulina, aumento de los niveles plasmáticos de TG acompañado por disminución de la concentración de C-HDL,

aumento del índice TG / C-HDL, de los niveles de LDL oxidadas, de las actividades de CETP y Lp-PLA₂, y disminución de la actividad PON. No obstante, no se evidenciaron aumentos en marcadores sistémicos de inflamación, tales como la PCRus y la IL-6. En este estudio se pudo identificar, por un lado, a la resistencia a la insulina como uno de los determinantes de la disminución de la actividad PON y del aumento de CETP, y por otro lado, al aumento de los depósitos de hierro como predictor independiente del incremento de los niveles de LDL oxidadas y de la actividad de Lp-PLA₂.

La disminución del C-HDL extiende los hallazgos previos de aumento de la concentración de TG en pacientes con SH (Solanas-Barca, M y col. 2009). Este perfil lipoproteico particular, denominado “dislipemia aterogénica”, es característico del síndrome de resistencia a la insulina. En el mismo, se observa tanto aumento de la secreción hepática de partículas de VLDL-1, sobrecargadas en TG (Goff, DC, Jr. y col. 2005), así como mayor actividad de CETP y disminución del C-HDL (Gomez Rosso, L y col. 2008). De hecho, en el grupo de pacientes estudiado, la insulinemia en ayunas, el índice HOMA-IR y la actividad de CETP se encontraron significativamente aumentados. Sin embargo, debido a que las diferencias en el perfil de lípidos permanecieron significativas aún al ajustar por el IMC y el HOMA-IR, el efecto de otros mecanismos relacionados con la SH no puede ser completamente descartado. A pesar de ello, el HOMA-IR fue uno de los predictores independientes del aumento de la actividad de CETP y la disminución de la actividad PON en un modelo ajustado por la concentración de ferritina. De este modo, la resistencia a la insulina constituiría un factor crucial en las alteraciones cuali y cuantitativas de las HDL en la SH. Un mecanismo que podría explicar estos resultados implica la inducción de modificaciones de la composición química de las HDL por acción de la mayor actividad de CETP. Como resultado, la funcionalidad de las HDL se vería comprometida siendo la menor actividad de PON uno de sus indicadores. Por lo tanto, si bien un efecto de la SH sobre el aumento de TG y la disminución de C-HDL no puede ser descartado, la resistencia a la insulina tendría un rol independiente en el desarrollo de alteraciones en las HDL en los pacientes con SH.

Por otro lado, en apoyo a los estudios que indican un mayor riesgo de ECV asociado a la mutación H63D (van der, AD y col. 2008; Lian, J y col. 2013), la presencia de este alelo en la población estudiada se asoció significativamente a concentraciones de CT > 200 mg/dl y de C-LDL > 160 mg/dl.

El hallazgo de resistencia a la insulina en pacientes con SH es frecuente (Dandona, P y col. 1983). Al respecto, estudios como los de McClain y col. (McClain, DA y col. 2006) y Dmochowski y col. (Dmochowski, K y col. 1993) describieron una correlación inversa entre la sensibilidad a la insulina y los niveles de los depósitos de hierro en pacientes con HH (SH primaria) y talasemia mayor (SH secundaria), respectivamente. Sin embargo, el mecanismo fisiopatológico es aún desconocido y todavía existe controversia en relación a si el defecto primario radica en el aumento de la resistencia a la acción de la insulina en el hígado o en tejidos periféricos o en una menor capacidad secretoria de las células β como consecuencia de la SH. Al respecto, McClain y col. (McClain, DA y col. 2006) atribuyeron un rol principal al deterioro de la capacidad secretoria, mientras, que Hatunic y col. (Hatunic, M y col. 2010) reportaron un aumento de la resistencia a la insulina. La importancia de estas diferencias radicaría en su posible impacto sobre el riesgo cardiometabólico de los pacientes (Tominaga, M y col. 1999). Los resultados del presente estudio apoyarían la hipótesis de un incremento de la resistencia a la insulina en pacientes con SH.

Coherente con resultados de estudios anteriores, los niveles de LDL oxidadas fueron mayores en los pacientes con SH (Brouwers, A y col. 2004). Más aún, se pudo identificar un rol crucial de la SH en esta alteración, independientemente de la resistencia a la insulina. El hierro es un conocido prooxidante y en condiciones de SH podría impactar en el balance entre oxidantes y antioxidantes del espacio subendotelial, compartimento donde tiene lugar la oxidación de las LDL (Xing, X y col. 1998). A su vez, el aumento de LDL oxidadas se encontró íntimamente asociado con la mayor actividad de Lp-PLA₂ en los pacientes con SH. Este resultado responde al vínculo fisiopatológico entre las LDL oxidadas y la inflamación vascular (Wilensky, RL y col. 2009; Tektas, AK y col. 2012). De hecho, durante la oxidación de las LDL, la Lp-PLA₂ media la liberación

de lisofosfatidilcolina y ácidos grasos oxidados, los cuales exhiben un amplia variedad de acciones injuriantes y proinflamatorias sobre el endotelio (Wilensky, RL y col. 2009).

Por último, al investigar a los predictores independientes de la actividad de Lp-PLA₂ mediante el análisis multivariado, nuevamente los niveles de hierro resultaron significativos en un modelo ajustado por el índice HOMA-IR, entre otras variables. Este hallazgo concuerda con las observaciones de Tsimikas y col (Tsimikas, S y col. 2009) en un estudio poblacional. Globalmente, estas asociaciones destacan la interrelación entre SH, peroxidación lipídica e inflamación vascular.

En conclusión, los pacientes con SH presentaron resistencia a la insulina y una dislipidemia aterogénica (aumento de TG con disminución de C-HDL) acompañada por aumento de la actividad de CETP. Este perfil metabólico sugiere a su vez un predominio de LDL pequeñas y densas, y menor funcionalidad de HDL en los pacientes con SH. Por otro lado, el aumento de los niveles de LDL oxidadas y de la actividad de Lp-PLA₂ es coherente con el desarrollo de procesos de inflamación vascular como consecuencia directa de la SH. Por lo tanto, en la SH, no sólo estarían operando factores relacionados con la actividad prooxidante del hierro, sino también alteraciones metabólicas e inflamatorias que justificarían la asociación entre SH y elevado riesgo de ECV.

6.1.2. Caracterización del metabolismo de los hidratos de carbono y de las lipoproteínas, y funcionalidad de HDL.

En línea con la hipótesis de trabajo y las conclusiones del estudio previo, este nuevo reclutamiento se condujo con los objetivos de profundizar en los mecanismos fisiopatológicos responsables de las alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono, de evaluar la presencia de lipoproteínas modificadas y de identificar diferencias entre los pacientes con SH asociada a distintos genotipos HFE.

En primer lugar, al evaluar los indicadores basales del metabolismo de los hidratos de carbono confirmamos nuestros hallazgos previos compatibles con el desarrollo de resistencia a la insulina en los pacientes con SH. No obstante, y en coherencia con los resultados de McClain y col. (McClain, DA y col. 2006), los homocigotos C282Y presentaron una menor funcionalidad de las células β respecto a los no homocigotos. Más aún, al analizar los resultados de la POTG, se identificó la presencia de TAG y de diabetes (diagnóstico) exclusivamente en los pacientes homocigotos C282Y. Así, los pacientes con SH y homocigosis para la mutación C282Y presentarían un mayor riesgo de padecer un déficit funcional de las células β en comparación a pacientes con SH asociada a otros genotipos. Probablemente, el deterioro acelerado de la funcionalidad pancreática en estos pacientes sea atribuible a un aumento del estrés oxidativo y a la apoptosis de las células β , consecuencia del depósito excesivo de hierro en el órgano (Cooksey, RC y col. 2004). De hecho, los homocigotos C282Y presentan mayor concentración de hierro hepático y serían más susceptibles al depósito de hierro en órganos extrahepáticos que los pacientes con otros genotipos HFE (Cheng, R y col. 2009; Subramaniam, VN y col. 2012). Por lo tanto, es posible sugerir que la menor capacidad secretoria y funcionalidad de las células β de los homocigotos C282Y sea causada por una mayor acumulación de hierro en el páncreas de estos pacientes.

La menor funcionalidad de las células β se encuentra fuertemente asociada, por encima de cualquier otro factor, al deterioro de la tolerancia a la glucosa, y, por lo tanto, a las llamadas excursiones glucémicas o picos de hiperglucemia postprandial (DeFronzo, RA y col. 2010; Mari, A y col. 2010). Diversos estudios han demostrado que la hiperglucemia postprandial es un importante factor de riesgo cardiovascular independiente (DECODE study group 1999; Tominaga, M y col. 1999; DeFronzo, RA y col. 2011a; Nonogaki, K 2012). Por este motivo, en los pacientes con SH homocigotos para la mutación C282Y, la disfuncionalidad de las células β representaría un factor de susceptibilidad para el desarrollo de diabetes y ECV.

En conclusión, respecto al metabolismo de la glucosa, si bien los pacientes con SH presentaron resistencia hepática a la insulina, la caída de la funcionalidad de las células β se limitó sólo a los pacientes homocigotos para la mutación C282Y. Este efecto podría deberse a distintos patrones de evolución de la enfermedad acorde al genotipo o bien podría constituir una diferencia en el mecanismo fisiopatológico responsable de las alteraciones del metabolismo de los hidratos de carbono.

En segundo lugar, los principales hallazgos en referencia al metabolismo lipoproteico indican que los pacientes con SH presentan lipoproteínas con modificaciones proaterogénicas. En particular, independientemente del genotipo, los pacientes con SH presentaron partículas de LDL enriquecidas en TG, menor concentración de la subfracción de HDL pequeña y densa (HDL3c), y partículas de HDL con una composición química y funcionalidad alterada. Al considerar los genotipos, los pacientes homocigotos para la mutación C282Y exhibieron profundas alteraciones cuantitativas y cualitativas de las subfracciones de HDL (HDL3a, 3b y 3c); mientras que los pacientes no homocigotos para la mutación C282Y presentaron un predominio de las subfracciones de LDL pequeñas y densas.

Es remarcable el efecto que presentaron las mutaciones del gen HFE sobre los niveles y la distribución de las subfracciones plasmáticas de LDL. Mientras que los homocigotos C282Y exhibieron una distribución de LDL caracterizada por mayor proporción de las LDL grandes y flotadoras (LDL1 y LDL2), los pacientes no C282Y se caracterizaron por un aumento de las subfracciones de LDL pequeñas y densas (LDL4 y LDL5). Más aún, la masa plasmática total de LDL en los homocigotos C282Y fue menor incluso que en los controles, por lo que los pacientes con SH asociada a este genotipo presentaron un perfil de LDL que podría considerarse “menos aterogénico”. Este efecto de la mutación C282Y sobre el fenotipo de LDL concuerda con los resultados obtenidos en la población del estudio ARIC (Pankow, JS y col. 2008), en la que los homocigotos C282Y presentaron menor C-LDL que sujetos sin mutaciones en el gen HFE. En contraste, los pacientes no C282Y exhibieron una distribución de LDL “más

aterogénica". Curiosamente, esta modificación podría representar una base para explicar los mayores estimadores de riesgo cardiovascular asociados al alelo H63D (cuya frecuencia alélica en el grupo de pacientes no homocigotos fue de 63%) en comparación al alelo C282Y (Ellervik, C y col. 2005; Ellervik, C y col. 2007; van der, AD y col. 2008; Lian, J y col. 2013).

Independientemente del genotipo, los pacientes con SH presentaron partículas de LDL enriquecidas en TG. Esta alteración cualitativa se encontró asociada a LDL más oxidables, más injuriantes para el endotelio y, en consecuencia, más aterogénicas (Tornvall, P y col. 1993; Schreier, LE y col. 1996; Allison, BA y col. 1999). Esta modificación cualitativa permitiría explicar, entre otros factores tales como el efecto directo de la SH, por qué los pacientes con el genotipo C282Y no presentan menor riesgo de ECV asociado a menores niveles de LDL.

Sorprendentemente, todas las alteraciones de HDL observadas en los pacientes con SH fueron asociadas a mayor riesgo de ECV (Di Angelantonio, E y col. 2009; Khera, AV y col. 2011; Williams, PT y col. 2011). En particular, un estudio reciente mostró que la capacidad de las HDL para mediar el eflujo desde los macrófagos fue un predictor independiente negativo de aterosclerosis (Khera, AV y col. 2011). Más aún, se ha demostrado que el enriquecimiento en TG y la depleción en CE de las HDL conduce a alteraciones en sus capacidades antiaterogénicas, contribuyendo así al riesgo cardiovascular (Gowri, MS y col. 1999; de Souza, JA y col. 2008). En consecuencia, estas modificaciones en las HDL sugieren un mayor riesgo de desarrollo de aterosclerosis en los pacientes con SH primaria. Es probable que la reducción de la capacidad de las HDL para mediar el eflujo de colesterol desde los macrófagos pudiera deberse tanto a los menores niveles de HDL3c, así como a las modificaciones en su contenido de lípidos neutros (CE y TG), consecuencia del aumento de la actividad de CETP. De este modo, y de acuerdo con los resultados de algunos estudios clínicos en la población general (de Vries, R y col. 2005; Zeller, M y col. 2007), la mayor actividad de CETP podría ser un factor de riesgo adicional presente en los pacientes con SH.

En conclusión, los pacientes con SH presentaron alteraciones proaterogénicas en las LDL y HDL de distinto tipo y magnitud acorde al genotipo HFE. La presencia de LDL pequeñas y densas, de menores niveles de HDL3c, de alteraciones en la composición química de las lipoproteínas, de mayor actividad de CETP y de HDL disfuncionales contribuirían a explicar un aumento del riesgo cardiovascular en pacientes de sexo masculino con SH.

6.1.3. Efectos de la reducción de los niveles de hierro.

La reducción de los niveles de hierro no solo impactó en los indicadores de la función hepática, sino también en el estado inflamatorio y en el metabolismo lipoproteico. La disminución de los niveles de PCRus y de la actividad de Lp-PLA₂ después del tratamiento son indicadores claros del rol del hierro como un factor proinflamatorio capaz de promover procesos de inflamación vascular. Tal es así que estos resultados refuerzan el rol de la concentración de ferritina como uno de los determinantes de la actividad de Lp-PLA₂ (Ver 5.1.1.). La inflamación vascular podría ser uno de los mecanismos que explique el desarrollo de disfunción endotelial reportado en pacientes con SH (Gaenger, H y col. 2002). Más aún, en coherencia con los resultados obtenidos al medir la actividad de Lp-PLA₂, en el estudio de Gaenger y col. (Gaenger, H y col. 2002) el tratamiento de los pacientes mediante flebotomías se asoció a una mejora significativa en la función endotelial. Probablemente, este paralelismo entre los cambios en la función endotelial y en los niveles de Lp-PLA₂ responda al estrecho vínculo reportado entre ambos parámetros (Lavi, S y col. 2007; Tektas, AK y col. 2012). Por lo tanto, la inducción de procesos inflamatorios de la vasculatura atribuible a la SH sería responsable del desarrollo de disfunción endotelial y determinaría un mayor riesgo cardiovascular en los pacientes afectados.

La reducción de los niveles de TG asociada al tratamiento por flebotomías coincide con un estudio previo realizado en pacientes con HH (Casanova-Esteban, P y col. 2011) y con otros estudios realizados en pacientes con síndrome metabólico (Houschyar, KS y col. 2012) y con diabetes tipo 2 (Bofill, C y col. 1994).

Este hallazgo estuvo acompañado por una disminución significativa de la actividad de CETP. Por lo tanto, pese a no haberse observado cambios significativos en los niveles de C-HDL, PON y ARE en este grupo de pacientes, no es posible descartar un efecto beneficioso del tratamiento sobre las partículas de HDL.

Pese a ser esperable, la reducción de los niveles de hierro no se asoció a un aumento de la sensibilidad a la insulina. En contraste, Equitani y col. (Equitani, F y col. 2008) describieron un aumento de la sensibilidad y secreción de insulina asociado al tratamiento por flebotomías de pacientes con SH y esteatosis hepática. Asimismo, resultados similares fueron obtenidos por Valenti y col. (Valenti, L y col. 2007) al estudiar pacientes con esteatosis hepática no alcohólica con hiperferritinemia. No obstante, en el presente estudio, el tratamiento se asoció a una disminución del índice TG / C-HDL, el cual fue propuesto como un marcador de resistencia a la insulina (McLaughlin, T y col. 2005). Este hallazgo podría ser indicador de una mejora en el metabolismo de los hidratos de carbono. Alternativamente, la falta de cambios significativos en la glucemia e insulinemia en ayunas podría deberse al efecto ambiguo de la depleción de hierro reportado en un grupo de pacientes con HH similar al estudiado (Abraham, D y col. 2006). Abraham y col. observaron un aumento de la secreción de insulina en paralelo a una caída en la sensibilidad a la insulina durante el tratamiento con flebotomías (Abraham, D y col. 2006). De esta manera, los índices basales en respuesta al tratamiento se encontraron sólo mínimamente afectados en los pacientes. Por lo tanto, el efecto de la depleción de hierro sobre el metabolismo de la glucosa en pacientes con SH primaria resta por ser completamente definido.

En conclusión, los cambios descritos en relación al tratamiento por flebotomías refuerzan las evidencias que definen a la SH como una condición asociada a inflamación, alteraciones metabólicas y, en última instancia, a mayor riesgo cardiovascular.

6.2. Deficiencia de hierro.

6.2.1. Factores de riesgo cardiovascular y marcadores de estrés oxidativo, inflamación y enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

El presente estudio permitió la identificación de modificaciones en el perfil lipoproteico, en marcadores de inflamación y en indicadores de estrés oxidativo en la ADH. En relación al metabolismo lipoproteico, las pacientes con ADH presentaron alteraciones discretas en los niveles de TG y C-HDL, en el índice C-VLDL / TG, y en la actividad CETP. A su vez, la actividad Lp-PLA₂ fue mayor y la actividad ARE menor en las pacientes con ADH respecto a las controles. Todas estas alteraciones correlacionaron, en distinto grado, con la disminución de la concentración de Hb, así como con los indicadores de DH.

Diversos estudios mostraron la asociación entre la anemia, la DH y el mayor riesgo cardiovascular en mujeres (Sarnak, MJ y col. 2002; Chonchol, M y col. 2008; Friedrich, N y col. 2009; Holme, I y col. 2012). Los mecanismos más destacables a los que fue atribuida esta asociación fueron: aumento del gasto cardíaco, procesos de remodelamiento vascular, activación del eje renina-angiotensina-aldosterona y mayor nivel de citoquinas proinflamatorias. Los presentes resultados sugieren que las alteraciones en el perfil lipídico, el desarrollo de inflamación vascular y el aumento del estrés oxidativo podrían encontrarse involucrados en la relación entre ADH y el mayor riesgo de ECV.

Los cambios observados en el metabolismo lipoproteico sugieren una modificación en las propiedades de las VLDL y HDL en las pacientes con ADH. De hecho, para la maduración y “capacitación” funcional de las HDL, la actividad de CETP, así como la composición y el catabolismo de las VLDL son cruciales (Brites, FD y col. 1998). Por lo tanto, estas alteraciones estarían íntimamente vinculadas en la ADH. El menor índice C-VLDL / TG es indicador de la presencia de partículas de VLDL enriquecidas en TG, con un mayor potencial proinflamatorio y proaterogénico (Hopkins, PN y col. 2009; Nonogaki, K 2012). Este hecho podría deberse a un menor catabolismo de las lipoproteínas en circulación, como también

a una mayor síntesis hepática de TG (Ahmed, U y col. 2012). Curiosamente, ambos mecanismos parecen estar involucrados en la ADH (Lewis, M y col. 1971; Sherman, AR 1978; Muratsubaki, H y col. 2003; Davis, MR y col. 2012). Por otro lado, no se encontraron evidencias para sugerir a la resistencia a la insulina como un mecanismo relevante en el aumento de TG asociado a la ADH. De hecho, en concordancia con otros estudios (Borel, MJ y col. 1993; Ozdemir, A y col. 2007; Han, DH y col. 2011), no se observaron diferencias en los indicadores del metabolismo de los hidratos de carbono en ayunas en pacientes con ADH. Por lo tanto, en la ADH, el aumento de TG parece responder a alteraciones en el metabolismo de las VLDL. No obstante, el aumento en los niveles de TG observado en las pacientes podría haber pasado desapercibido, ya que no se evidenció una hipertrigliceridemia franca (TG > 200 mg/dl) en ninguna paciente. En este sentido, la correlación entre las concentraciones de Hb y de TG (y con el índice C-VLDL / TG) sugieren que en pacientes con anemias de mayor severidad que las evaluadas en el presente estudio [Hb=10,0 (8,9-10,9) g/dl], estos cambios podrían ser de mayor magnitud.

En relación a las HDL, no sólo se observó una menor concentración del C-HDL, sino también una menor actividad ARE. Este resultado confirma resultados previos en los que la actividad de la PON-1, se encontró disminuida en pacientes con ADH (Aslan, M y col. 2007). Asimismo, en línea con el citado estudio, la disminución de la actividad ARE estuvo íntimamente asociada con la disminución del C-HDL. En este contexto, el aumento de la actividad de CETP, como agente promotor de cambios cuantitativos y cualitativos en las HDL, resultaría relevante en la ADH.

Pese a ser esperable un aumento en los niveles de marcadores de estrés oxidativo en las pacientes, no se observaron diferencias significativas respecto a los controles. Este resultado pudo deberse a la combinación de la baja sensibilidad de la concentración de TBARS como indicador de estrés oxidativo, con el leve grado de anemia de las pacientes estudiadas. De hecho, en el estudio de Sundaram y col. (Sundaram, RC y col. 2007), en el cual se observaron mayores niveles de TBARS en las pacientes anémicas, la población presentaba

una media de Hb de 8 g/dl. Por lo tanto, es destacable que diversas alteraciones en pacientes con ADH comienzan a desarrollarse desde la instauración de la anemia y que su expresión se exacerbaría en paralelo a la disminución de los niveles de Hb.

Por último, en relación a los indicadores de inflamación, si bien las concentraciones de PCRus y VCAM-1 no fueron diferentes entre pacientes y controles, la actividad de Lp-PLA₂ se encontró aumentada. Este resultado sumado a la correlación entre los niveles de VCAM-1, Hb y ferritina sugieren la ocurrencia de procesos inflamatorios de la vasculatura asociados a la ADH. En particular, estudios en modelos animales sugirieron que en la ADH la baja concentración de hepcidina sería responsable de un estado proinflamatorio (Pagani, A y col. 2011). Por lo tanto, una hiperreactividad de células del sistema inmune resulta un posible mecanismo para explicar el aumento de actividad de Lp-PLA₂ en la ADH. De hecho, un estudio reciente reportó que la producción de Lp-PLA₂ por monocitos de sangre periférica contribuye significativamente al pool plasmático de Lp-PLA₂, a la vez que correlaciona con indicadores de aterosclerosis subclínica (Fratta Pasini, A y col. 2013). Adicionalmente, el aumento del estrés oxidativo en la ADH, entre otros factores, podría favorecer la secreción de Lp-PLA₂ de otras fuentes celulares, tales como macrófagos del espacio subendotelial, linfocitos T y mastocitos (Hakkinen, T y col. 1999; Paik, JK y col. 2012; Fratta Pasini, A y col. 2013).

En conclusión, las pacientes con ADH presentaron alteraciones en el metabolismo lipoproteico y una disminución de la actividad ARE, en un contexto de inflamación vascular. La suma de estos factores indicaría que la ADH, aún en presencia de disminuciones leves de la concentración de Hb, representaría un estado proaterogénico.

6.2.2. Caracterización de la composición y funcionalidad de las HDL.

De acuerdo con la hipótesis de trabajo y basados en las conclusiones de la sección anterior, el objetivo de este estudio anidado fue evaluar la composición y funcionalidad de las HDL en pacientes con ADH.

Coherente con el aumento de la actividad de CETP observado, las HDL de las pacientes presentaron un enriquecimiento relativo en TG. Asimismo, la mayor actividad de CETP se asoció con la disminución de la masa total de HDL. Este resultado destaca el papel de la CETP como uno de los determinantes de la tasa catabólica de las HDL (Ikewaki, K y col. 1993). Adicionalmente, tanto la anemia como la DH se encontraron íntimamente relacionadas con las alteraciones cuantitativas y cualitativas de HDL.

Al realizar el análisis funcional de las HDL, se observó un deterioro de su capacidad antioxidante. Esta disminución estuvo relacionada con la menor actividad ARE que presentaban las pacientes y extiende reportes previos realizados por Aslan y col. (Aslan, M y col. 2007). A su vez, mientras que el contenido en TG de las HDL se asoció positivamente con los niveles de TBARS, la actividad ARE exhibió una correlación inversa. Estos hallazgos demuestran cómo el deterioro de la estructura y funcionalidad de las HDL afecta el estatus oxidativo general y determinaría una mayor susceptibilidad al desarrollo de lesiones vasculares. De hecho, la disminución de la capacidad antioxidante de las HDL se asoció a mayor riesgo de cardiopatía isquémica y de enfermedad coronaria aguda (Winning, S y col. 2010; Patel, PJ y col. 2011). Por lo tanto, la presencia de alteraciones funcionales de las HDL en las pacientes brinda mayor sustento a la relación entre la ADH, el aumento del estrés oxidativo y el riesgo cardiovascular.

Al evaluar predictores independientes de la capacidad antioxidante de las HDL por regresión múltiple, se destacó el rol de la edad, la concentración de Hb y la actividad ARE en un modelo ajustado por C-HDL e IMC. Si bien en el estudio anterior y en el presente, la disminución de la actividad ARE se asoció a la de C-HDL, su relación con la actividad antioxidante fue independiente. Este hecho justificaría la inclusión de la actividad ARE como un indicador del riesgo cardiovascular en mujeres con ADH. En la discusión de los estudios longitudinales, se analizará si estos resultados responderían a una relación causal

entre la ADH y la menor actividad ARE o entre la ADH y la concentración de C-HDL.

En conclusión, las mujeres con ADH presentaron HDL enriquecidas en TG y con menor funcionalidad antioxidante. Estas alteraciones dependieron del grado de severidad de la anemia e implicaron modificaciones en las actividades de CETP y ARE. Así, en la ADH, el deterioro funcional de las HDL contribuiría al estrés oxidativo, y podría constituir un factor asociado al aumento del riesgo de ECV en las pacientes afectadas.

6.2.3. Efectos subagudos de la administración endovenosa de hierro.

En la presente sección de la tesis, se evaluó el efecto de una infusión endovenosa lenta de hierro sacarato 72 hs posteriores a su administración. El tiempo de muestreo fue elegido considerando que el hierro administrado debía ser asimilado por el organismo para inducir cambios significativos en los marcadores metabólicos, inflamatorios y de estrés oxidativo evaluados. Adicionalmente, esta etapa del protocolo fue diseñada con el objetivo de identificar cuáles de las alteraciones observadas se encontraban específicamente relacionadas con la DH.

Como era esperable, el tratamiento produjo un aumento de la saturación de Tf y de la concentración de ferritina, mientras que no hubo cambios significativos en los otros parámetros hematológicos. En contraste, la disminución de la insulinemia en ayunas y del índice HOMA-IR fueron inesperados. Este resultado podría ser debido a la normalización de la tasa metabólica y a una menor necesidad de producción hepática de glucosa en las pacientes con ADH. En modelos animales, se ha demostrado que la ADH se asocia a una mayor tasa de recambio y dependencia metabólica de glucosa (Henderson, SA y col. 1986; Brooks, GA y col. 1987). Esta situación exige un aumento de la producción hepática de glucosa, la cual implica una disminución relativa en los mecanismos inhibitorios mediados por la insulina para el mantenimiento de la glucemia (Linderman, JK y col. 1994). Por lo tanto, los efectos observados sobre los marcadores del metabolismo de los hidratos de carbono responderían más a la

normalización de los mecanismos fisiológicos de adaptación a la ADH que a un incremento neto en la sensibilidad a la insulina.

El tratamiento por hierro endovenoso no se asoció a ningún cambio significativo en el metabolismo lipoproteico a las 72hs. De modo similar, la actividad de Lp-PLA₂ no varió con el tratamiento. Aparentemente, el tiempo de evaluación elegido en el presente protocolo fue muy corto como para observar alguna modificación en el metabolismo lipoproteico o en los indicadores de inflamación vascular. Sin embargo, es destacable que la administración parenteral de hierro no generó un aumento significativo en la actividad de Lp-PLA₂. Al respecto, algunos estudios reportaron el desarrollo de disfunción endotelial y aumento de marcadores de inflamación en pacientes con enfermedad renal crónica como consecuencia de la administración de hierro endovenoso (Bishu, K y col. 2006; Zheng, H y col. 2006). Los resultados del presente estudio respaldan a los de otros autores (Bolanos, L y col. 2008; Ozkurt, S y col. 2012). Desafortunadamente, pocos trabajos evaluaron el impacto de la administración de hierro endovenoso sobre marcadores de disfunción endotelial y de inflamación en pacientes con ADH sin enfermedad renal crónica.

A diferencia de los otros aspectos evaluados, el impacto del hierro endovenoso sobre marcadores de estrés oxidativo en pacientes con ADH fue evaluado en numerosos estudios. Estos trabajos destacan un aumento del estrés oxidativo en las pacientes y menor actividad de enzimas antioxidantes luego de 1 a 4 hs de la infusión endovenosa (efecto agudo) (Isler, M y col. 2002; Toblli, JE y col. 2011; Akarsu, S y col. 2013). No obstante, el efecto subagudo de la administración de hierro endovenoso no fue analizado en los estudios citados. En nuestro análisis, a las 72hs post infusión, las pacientes con ADH presentaron una reducción significativa del estrés oxidativo, asociado, en parte, a un aumento de la actividad ARE. Estos resultados concuerdan parcialmente con los estudios en pacientes con enfermedad renal crónica, en los cuales la infusión endovenosa de hierro no afectó ni los marcadores de estrés oxidativo ni la función endotelial evaluada entre 3 y 7 días luego del tratamiento (Pai, AB y col. 2007; Ozkurt, S y col. 2012). A la luz de estas evidencias, los cambios en los niveles de TBARS y

ARE observados en el grupo de pacientes con ADH parecen indicar que la infusión de hierro, pese a generar un aumento de marcadores del estrés oxidativo como parte de un efecto agudo, promueve un incremento posterior de las enzimas antioxidantes, el cual impacta favorablemente en el estrés oxidativo. Este efecto de instauración precoz se mantendría a lo largo del tiempo (Kurtoglu, E y col. 2003; Yoo, JH y col. 2009). Por otro lado, el aumento de la actividad ARE no se asoció a mayores niveles de C-HDL por lo que este efecto sería atribuible a la normalización de los parámetros ferrocínéticos.

En conclusión, la administración endovenosa de hierro indujo a las 72hs un aumento de la actividad ARE y una disminución del estrés oxidativo. Adicionalmente, la ausencia de incrementos en los indicadores de inflamación vascular atestigua el adecuado perfil de seguridad del tratamiento con hierro endovenoso en pacientes con ADH.

6.2.4. Efectos de la restauración de los niveles de hemoglobina.

Con la finalidad de verificar el carácter secundario de las alteraciones observadas en las secciones anteriores, se reevaluó a las pacientes al finalizar el tratamiento con hierro ($Hb > 12g/dl$). Este análisis se vio limitado por el elevado porcentaje de pacientes que desistieron durante el seguimiento (70%). La extensión del tratamiento con hierro, la levedad del grado de anemia de las pacientes y la relativa ausencia de sintomatología asociada fueron posibles causas de la baja adherencia al protocolo. No obstante, el cálculo de la sensibilidad demostró un mínimo efecto detectable solo un 27% mayor ($dz=1,27$) al establecido en el diseño del protocolo ($dz=1,00$).

Como era esperable al finalizar el tratamiento, se normalizaron todos los parámetros hematológicos y ferrocínéticos relacionados al diagnóstico de ADH (Hb, VCM, ADE, saturación de Tf, ferritina). A su vez, el conteo de leucocitos y de plaquetas tendió a disminuir, al igual que la concentración de TBARS. Por lo tanto y, en coherencia con otros estudios (Kurtoglu, E y col. 2003; Yoo, JH y col. 2009;

Akca, H y col. 2013), resulta evidente que la ADH es un estado de elevado estrés oxidativo.

Al evaluar el metabolismo lipoproteico, se observó una tendencia hacia un aumento del colesterol total a expensas del C-LDL. Sin embargo, estos cambios fueron paralelos a una predisposición hacia menores concentraciones de TG y de apo B con el tratamiento. Estos cambios serían consistentes con un menor número de lipoproteínas ricas en TG. Estas tendencias concuerdan con los resultados obtenidos en un reciente estudio que evaluó una serie de 70 pacientes con ADH (Verma, U y col. 2010). Verma y col. observaron que los niveles de TG disminuyeron en paralelo al C-VLDL luego de suplementar a los pacientes con hierro oral durante 3 meses. Coherente con una disminución de los niveles de las lipoproteínas ricas en TG, en el presente estudio se observó una reducción significativa de la actividad de CETP al revertirse la anemia. Siendo la CETP un factor determinante de las alteraciones estructurales y funcionales de las HDL en las pacientes con ADH, esta disminución podría ser relevante para una mejor protección del endotelio vascular a pesar de la falta de cambios en la concentración del C-HDL.

Por último, el tratamiento se asoció a una disminución significativa de la actividad de Lp-PLA₂. Esta disminución revela el carácter secundario y reversible de los procesos de inflamación vascular inducidos por la ADH. En particular, este efecto no se observó luego de la administración endovenosa de hierro y requirió de la resolución de la anemia para su normalización. Si bien, la inflamación vascular podría estar asociada al mayor estrés oxidativo de las pacientes, no es posible descartar algún mecanismo relacionado específicamente con la anemia y la disminución de la oxigenación tisular. Un estudio reciente identificó a la hipoxia como un importante factor implicado en la adhesión de monocitos al endotelio (Winning, S y col. 2010). Esta reacción inflamatoria de la vasculatura estuvo mediada por un aumento de la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 y fue independiente de la activación de los factores inducibles por hipoxia (Winning, S y col. 2010).

En conclusión, la disminución de las actividades de CETP y Lp-PLA₂, indicadora de inflamación vascular, muestran que la ADH constituiría una condición asociada a alteraciones del metabolismo lipoproteico y a un estado proinflamatorio capaz de aumentar el riesgo de ECV de las pacientes afectadas.

7. Conclusiones.

7.1. Relevancia de los resultados para la prevención cardiovascular.

A pesar de que en los últimos años se ha enfatizado en la importancia de la prevención y de la intervención temprana para evitar las complicaciones cardiovasculares a largo plazo, las ECV continúan siendo la principal causa de morbimortalidad en el mundo (Go, AS y col. 2013). Es de notar que el riesgo aterogénico residual, que persiste aunque se alcancen las metas terapéuticas en los niveles de C-LDL, podría ser atribuido a modificaciones en la calidad y en la funcionalidad de las lipoproteínas (Chapman, MJ y col. 2011; Fruchart, JC y col. 2014). De hecho, en el síndrome metabólico, el elevado riesgo cardiovascular no está comúnmente asociado al aumento del C-LDL, sino a la presencia de “dislipemia aterogénica”, definida como aumento de TG y disminución del C-HDL. Subyacentemente, este perfil lipoproteico se encuentra asociado a resistencia a la insulina, a mayor proporción de las LDL pequeñas y densas, al aumento del estrés oxidativo, a disfuncionalidad de las HDL y a un estado proinflamatorio crónico.

Relevantemente, la “dislipemia aterogénica” fue observada tanto en los pacientes con SH, así como con DH. Más aún, los tratamientos específicos para cada condición (depleción y suplementación, respectivamente) revirtieron gran parte de las alteraciones metabólicas y de los marcadores de inflamación. Si bien en la SH primaria la influencia de factores genéticos no puede ser desestimada, la reducción de los niveles de TG en pacientes tratados por flebotomía fue evidenciada también en pacientes con SH secundaria (Piperno, A y col. 2004; Houschyar, KS y col. 2012). Por lo tanto, el diagnóstico e intervención precoz en pacientes con SH cobraría mayor relevancia al prevenir no sólo afecciones hepáticas sino también posibles complicaciones cardiovasculares. Por otro lado, este efecto podría ser extrapolable a pacientes con patologías metabólicas crónicas y elevado riesgo residual (Houschyar, KS y col. 2012; Fernandez-Real, JM y col. 2014). De hecho, un protocolo de reducción de los niveles de hierro por flebotomías programadas en pacientes en prevención secundaria reportó un

menor riesgo cardiovascular asociado al tratamiento en grupos particulares de sujetos (Zacharski, LR y col. 2007; Zacharski, LR y col. 2011). Por el contrario, en referencia a la ADH, el impacto de su abordaje terapéutico sobre el riesgo cardiovascular aún no sido evaluado.

Si bien el enfoque actual respecto al riesgo residual se concentra en el manejo de los niveles de TG y C-HDL, o en los niveles de marcadores de inflamación (Chapman, MJ y col. 2011), se destaca pobremente el diagnóstico de patologías que secundariamente podrían contribuir a un riesgo cardiovascular persistentemente aumentado. El análisis de los resultados del presente trabajo de tesis, más allá de la hipótesis y los objetivos planteados, permite sugerir la evaluación del metabolismo del hierro en pacientes con un elevado riesgo residual. Es posible que el abordaje de las alteraciones del metabolismo del hierro en determinados grupos de pacientes demuestre ser una opción costo-efectiva que contribuya a las estrategias actuales de prevención cardiovascular (Zacharski, LR y col. 2013; Fernandez-Real, JM y col. 2014).

7.2. Relevancia de los resultados para el abordaje de la sobrecarga y deficiencia de hierro.

La evaluación metabólica realizada en los pacientes con SH demostró algunos puntos de importancia clínica. En primer lugar, a partir de los resultados obtenidos, se destaca la relevancia del estudio de la POTG con medición de glucemia e insulinemia en pacientes con SH primaria. El fundamento radica en que los valores en ayunas no permiten una identificación adecuada de los pacientes con mayor riesgo de progresión a diabetes. De hecho, la resistencia a la insulina en pacientes con SH resultó un hallazgo frecuente (aproximadamente un 75% presentó un HOMA-IR > 2,5 y un 50% HOMA-IR > 3,0). Por lo tanto, debido a que el deterioro de la funcionalidad de la célula β es la alteración fisiopatológica que antecede a la diabetes manifiesta (DeFronzo, RA y col. 2011b), la evaluación de la POTG, con al menos la determinación de glucemia a los 30 minutos, acompañado por la insulinemia a los 30 o 120 min sería recomendable. Por otro

lado, dado que los pacientes con homocigosis para la mutación C282Y podrían presentar un deterioro de la función secretora, el control de los factores que comprometen la sensibilidad a la insulina, como la obesidad, debería ser considerado. En segundo lugar, respecto a la evaluación del metabolismo lipoproteico en pacientes con SH, se destaca el hecho de que el C-LDL, comúnmente utilizado para la evaluación del riesgo cardiovascular, sería una herramienta insuficiente en pacientes con SH primaria y, en particular, en los portadores del alelo H63D. Es sabido que el C-LDL dentro del rango de referencia podría enmascarar un aumento del número de partículas y, por ende, un mayor riesgo de aterosclerosis. De este modo, un marcador sencillo y eficiente podría ser el índice TG / C-HDL. Efectivamente, este fue el parámetro que correlacionó mejor que cualquier otra determinación del perfil lipoproteico básico con las complejas modificaciones reportadas en las LDL y HDL. En concreto, los presentes resultados agregan evidencias para recomendar la evaluación del metabolismo de los hidratos de carbono mediante una POTG y el metabolismo lipoproteico con el cálculo del índice TG / C-HDL en pacientes con SH primaria.

Respecto a los estudios en pacientes con ADH, fue destacable la presencia de alteraciones tempranas en marcadores de estrés oxidativo y de inflamación vascular, aún cuando los valores de Hb se encontraron alrededor de 10 g/dl. Ante estos resultados, se destaca la importancia de la detección y el tratamiento precoces de la condición, la cual en muchos casos adquiere características crónicas. Resulta alarmante que la prevalencia de ADH se mantuvo estable durante los últimos años tanto en el mundo, como en nuestro país (Ministerio de Salud de la Nación 2007; WHO/UNICEF/UNU 2008). La ley nacional 25.630 de fortificación de harinas (Ministerio de Salud de la Nación y col. 2003) representó una estrategia para combatir la incidencia, sintomatología y comorbilidades de la patología. No obstante, en cuanto no se generen estrategias que apunten a una concientización individual sobre las implicancias de esta condición clínica, la prevalencia de esta patología podría permanecer elevada, tal como se ha demostrado en la ENNyS (Ministerio de Salud de la Nación 2007). Al ser la ADH una enfermedad relativamente silente y de alta prevalencia, la misma suele pasar

inadvertida o no tratarse. En este contexto, la vinculación de la ADH con la ECV, de mayor conciencia social y de peor pronóstico, podría fortalecer estrategias de prevención.

8. Referencias bibliográficas

- Abdul-Ghani, MA, Tripathy, D, DeFronzo, RA (2006). Contributions of beta-cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Diabetes Care* 29:1130-1139.
- Abraham, D, Rogers, J, Gault, P, Kushner, JP, McClain, DA (2006). Increased insulin secretory capacity but decreased insulin sensitivity after correction of iron overload by phlebotomy in hereditary haemochromatosis. *Diabetologia* 49:2546-2551.
- Acton, RT, Barton, JC, Passmore, LV y col. (2006). Relationships of serum ferritin, transferrin saturation, and HFE mutations and self-reported diabetes in the Hemochromatosis and Iron Overload Screening (HEIRS) study. *Diabetes Care* 29:2084-2089.
- Adams, P, Barton, JC, McLaren, GD y col. (2009). Screening for iron overload: lessons from the hemochromatosis and iron overload screening (HEIRS) study. *Can J Gastroenterol* 23:769-772.
- Adams, PC, Reboussin, DM, Barton, JC y col. (2005). Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. *N Engl J Med* 352:1769-1778.
- Adams, PC, Reboussin, DM, Press, RD y col. (2007). Biological variability of transferrin saturation and unsaturated iron-binding capacity. *Am J Med* 120:999 e991-997.
- Adiels, M, Westerbacka, J, Soro-Paavonen, A y col. (2007). Acute suppression of VLDL1 secretion rate by insulin is associated with hepatic fat content and insulin resistance. *Diabetologia* 50:2356-2365.
- Aguilar-Martinez, P, Grandchamp, B, Cunat, S y col. (2011). Iron overload in HFE C282Y heterozygotes at first genetic testing: a strategy for identifying rare HFE variants. *Haematologica* 96:507-514.
- Ahmed, U, Latham, PS, Oates, PS (2012). Interactions between hepatic iron and lipid metabolism with possible relevance to steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 18:4651-4658.

- Ahmed, Z, Babaei, S, Maguire, GF y col. (2003). Paraoxonase-1 reduces monocyte chemotaxis and adhesion to endothelial cells due to oxidation of palmitoyl, linoleoyl glycerophosphorylcholine. *Cardiovasc Res* 57:225-231.
- Akarsu, S, Demir, H, Selek, S, Oguzoncul, F (2013). Iron deficiency anemia and levels of oxidative stress induced by treatment modality. *Pediatr Int* 55:289-295.
- Akca, H, Polat, A, Koca, C (2013). Determination of total oxidative stress and total antioxidant capacity before and after the treatment of iron-deficiency anemia. *J Clin Lab Anal* 27:227-230.
- Allen, KJ, Gurrin, LC, Constantine, CC y col. (2008). Iron-overload-related disease in HFE hereditary hemochromatosis. *N Engl J Med* 358:221-230.
- Allison, BA, Nilsson, L, Karpe, F, Hamsten, A, Eriksson, P (1999). Effects of native, triglyceride-enriched, and oxidatively modified LDL on plasminogen activator inhibitor-1 expression in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:1354-1360.
- American Diabetes Association (2012). Executive summary: Standards of medical care in diabetes--2012. *Diabetes Care* 35 Suppl 1:S4-S10.
- Andrews, NC (1999). Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 341:1986-1995.
- Arnett, DK, McClelland, RL, Bank, A y col. (2011). Biomarkers of inflammation and hemostasis associated with left ventricular mass: The Multiethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Int J Mol Epidemiol Genet* 2:391-400.
- Asano, K, Okamoto, S, Fukunaga, K y col. (1999). Cellular source(s) of platelet-activating-factor acetylhydrolase activity in plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 261:511-514.
- Ascherio, A, Rimm, EB, Giovannucci, E, Willett, WC, Stampfer, MJ (2001). Blood donations and risk of coronary heart disease in men. *Circulation* 103:52-57.
- Aslan, M, Kosecik, M, Horoz, M y col. (2007). Assessment of paraoxonase and arylesterase activities in patients with iron deficiency anemia. *Atherosclerosis* 191:397-402.

- Assmann, G, Jabs, HU, Kohnert, U, Nolte, W, Schriewer, H (1984). LDL-cholesterol determination in blood serum following precipitation of LDL with polyvinylsulfate. *Clin Chim Acta* 140:77-83.
- ATP III (2002). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 106:3143-3421.
- Bacon, BR, Adams, PC, Kowdley, KV, Powell, LW, Tavill, AS (2011). Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 54:328-343.
- Badimon, L, Romero, JC, Cubedo, J, Borrell-Pages, M (2012). Circulating biomarkers. *Thromb Res* 130 Suppl 1:S12-15.
- Baer, DM, Simons, JL, Staples, RL, Rumore, GJ, Morton, CJ (1995). Hemochromatosis screening in asymptomatic ambulatory men 30 years of age and older. *Am J Med* 98:464-468.
- Baldassarre, D, De Jong, A, Amato, M y col. (2008). Carotid intima-media thickness and markers of inflammation, endothelial damage and hemostasis. *Ann Med* 40:21-44.
- Barter, P (2011). HDL-C: role as a risk modifier. *Atheroscler Suppl* 12:267-270.
- Barter, PJ, Rye, KA (2006). The rationale for using apoA-I as a clinical marker of cardiovascular risk. *J Intern Med* 259:447-454.
- Barton, M (2013). Prevention and endothelial therapy of coronary artery disease. *Curr Opin Pharmacol* 13:226-241.
- Bhatt, DL, Eagle, KA, Ohman, EM y col. (2010). Comparative determinants of 4-year cardiovascular event rates in stable outpatients at risk of or with atherothrombosis. *Jama* 304:1350-1357.
- Bishu, K, Agarwal, R (2006). Acute injury with intravenous iron and concerns regarding long-term safety. *Clin J Am Soc Nephrol* 1 Suppl 1:S19-23.
- Bjorn-Rasmussen, E, Hallberg, L, Isaksson, B, Arvidsson, B (1974). Food iron absorption in man. Applications of the two-pool extrinsic tag method to

- measure heme and nonheme iron absorption from the whole diet. *J Clin Invest* 53:247-255.
- Bjornheden, T, Babyi, A, Bondjers, G, Wiklund, O (1996). Accumulation of lipoprotein fractions and subfractions in the arterial wall, determined in an in vitro perfusion system. *Atherosclerosis* 123:43-56.
- Blank, ML, Hall, MN, Cress, EA, Snyder, F (1983). Inactivation of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine by a plasma acetylhydrolase: higher activities in hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun* 113:666-671.
- Bofill, C, Joven, J, Bages, J y col. (1994). Response to repeated phlebotomies in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 43:614-620.
- Bolanos, L, Gonzalez-Juanatey, C, Testa, A, Ranero, R (2008). Intravenous iron sucrose does not impair sonographic brachial vasodilation in peritoneal dialysis patients. *Adv Perit Dial* 24:90-95.
- Bonora, E, Targher, G, Alberiche, M y col. (2000). Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 23:57-63.
- Borel, MJ, Beard, JL, Farrell, PA (1993). Hepatic glucose production and insulin sensitivity and responsiveness in iron-deficient anemic rats. *Am J Physiol* 264:E380-390.
- Boura-Halfon, S, Zick, Y (2009). Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E581-591.
- Brites, FD, Bonavita, CD, Cloes, M y col. (1998). VLDL compositional changes and plasma levels of triglycerides and high density lipoprotein. *Clin Chim Acta* 269:107-124.
- Brites, FD, Bonavita, CD, De Geitere, C y col. (2000). Alterations in the main steps of reverse cholesterol transport in male patients with primary hypertriglyceridemia and low HDL-cholesterol levels. *Atherosclerosis* 152:181-192.

- Brites, FD, Cavallero, E, de Geitere, C y col. (1999). Abnormal capacity to induce cholesterol efflux and a new LpA-I pre-beta particle in type 2 diabetic patients. *Clin Chim Acta* 279:1-14.
- Brooks, GA, Henderson, SA, Dallman, PR (1987). Increased glucose dependence in resting, iron-deficient rats. *Am J Physiol* 253:E461-466.
- Brouwers, A, Langlois, M, Delanghe, J y col. (2004). Oxidized low-density lipoprotein, iron stores, and haptoglobin polymorphism. *Atherosclerosis* 176:189-195.
- Brudevold, R, Hole, T, Hammerstrom, J (2008). Hyperferritinemia is associated with insulin resistance and fatty liver in patients without iron overload. *PLoS One* 3:e3547.
- Budoff, MJ, Young, R, Lopez, VA y col. (2013). Progression of coronary calcium and incident coronary heart disease events: MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis). *J Am Coll Cardiol* 61:1231-1239.
- Burke, W, Thomson, E, Khoury, MJ y col. (1998). Hereditary hemochromatosis: gene discovery and its implications for population-based screening. *JAMA* 280:172-178.
- Camont, L, Lhomme, M, Rached, F y col. (2013). Small, dense high-density lipoprotein-3 particles are enriched in negatively charged phospholipids: relevance to cellular cholesterol efflux, antioxidative, antithrombotic, anti-inflammatory, and antiapoptotic functionalities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33:2715-2723.
- Casanova-Esteban, P, Guiral, N, Andres, E y col. (2011). Effect of phlebotomy on lipid metabolism in subjects with hereditary hemochromatosis. *Metabolism* 60:830-834.
- Clark, SF (2009). Iron deficiency anemia: diagnosis and management. *Curr Opin Gastroenterol* 25:122-128.
- Conrad, ME, Umbreit, JN, Moore, EG y col. (2000). Separate pathways for cellular uptake of ferric and ferrous iron. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G767-774.

- Cooksey, RC, Jouihan, HA, Ajioka, RS y col. (2004). Oxidative stress, beta-cell apoptosis, and decreased insulin secretory capacity in mouse models of hemochromatosis. *Endocrinology* 145:5305-5312.
- Czernichow, S, Bruckert, E, Bertrais, S y col. (2007). Hypertriglyceridemic waist and 7.5-year prospective risk of cardiovascular disease in asymptomatic middle-aged men. *Int J Obes (Lond)* 31:791-796.
- Chapman, MJ, Ginsberg, HN, Amarenco, P y col. (2011). Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. *Eur Heart J* 32:1345-1361.
- Chapman, MJ, Goldstein, S, Lagrange, D, Laplaud, PM (1981). A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. *J Lipid Res* 22:339-358.
- Charakida, M, Masi, S, Deanfield, JE (2013). The Year in Cardiology 2012: focus on cardiovascular disease prevention. *Eur Heart J* 34:314-317.
- Cheng, R, Barton, JC, Morrison, ED y col. (2009). Differences in hepatic phenotype between hemochromatosis patients with HFE C282Y homozygosity and other HFE genotypes. *J Clin Gastroenterol* 43:569-573.
- Chobanian, AV, Bakris, GL, Black, HR y col. (2003). The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *Jama* 289:2560-2572.
- Chonchol, M, Nielson, C (2008). Hemoglobin levels and coronary artery disease. *Am Heart J* 155:494-498.
- Dalager, S, Paaske, WP, Kristensen, IB, Laurberg, JM, Falk, E (2007). Artery-related differences in atherosclerosis expression: implications for atherogenesis and dynamics in intima-media thickness. *Stroke* 38:2698-2705.
- Dalla-Riva, J, Garonna, E, Elliott, J, Botham, KM, Wheeler-Jones, CP (2010). Endothelial cells as targets for chylomicron remnants. *Atheroscler Suppl* 11:31-37.

- Dandona, P, Hussain, MA, Varghese, Z y col. (1983). Insulin resistance and iron overload. *Ann Clin Biochem* 20 Pt 2:77-79.
- Danesh, J, Appleby, P (1999). Coronary heart disease and iron status: meta-analyses of prospective studies. *Circulation* 99:852-854.
- Davidson, MH, Ballantyne, CM, Jacobson, TA y col. (2011). Clinical utility of inflammatory markers and advanced lipoprotein testing: advice from an expert panel of lipid specialists. *J Clin Lipidol* 5:338-367.
- Davis, MR, Rendina, E, Peterson, SK y col. (2012). Enhanced expression of lipogenic genes may contribute to hyperglycemia and alterations in plasma lipids in response to dietary iron deficiency. *Genes Nutr* 7:415-425.
- de Diego, C, Murga, MJ, Martinez-Castro, P (2004). Frequency of HFE H63D, S65C, and C282Y mutations in patients with iron overload and controls from Toledo, Spain. *Genet Test* 8:263-267.
- De Domenico, I, Ward, DM, Langelier, C y col. (2007). The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Mol Biol Cell* 18:2569-2578.
- de Souza, JA, Vindis, C, Hansel, B y col. (2008). Metabolic syndrome features small, apolipoprotein A-I-poor, triglyceride-rich HDL3 particles with defective anti-apoptotic activity. *Atherosclerosis* 197:84-94.
- de Vries, R, Perton, FG, Dallinga-Thie, GM y col. (2005). Plasma cholesteryl ester transfer is a determinant of intima-media thickness in type 2 diabetic and nondiabetic subjects: role of CETP and triglycerides. *Diabetes* 54:3554-3559.
- DECODE study group (1999). Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. The DECODE study group. European Diabetes Epidemiology Group. *Diabetes Epidemiology: Collaborative analysis Of Diagnostic criteria in Europe*. *Lancet* 354:617-621.
- DeFronzo, RA, Abdul-Ghani, M (2011a). Assessment and treatment of cardiovascular risk in prediabetes: impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Am J Cardiol* 108:3B-24B.

- DeFronzo, RA, Abdul-Ghani, M (2011b). Type 2 diabetes can be prevented with early pharmacological intervention. *Diabetes Care* 34 Suppl 2:S202-209.
- DeFronzo, RA, Banerji, MA, Bray, GA y col. (2010). Determinants of glucose tolerance in impaired glucose tolerance at baseline in the Actos Now for Prevention of Diabetes (ACT NOW) study. *Diabetologia* 53:435-445.
- Del-Castillo-Rueda, A, Moreno-Carralero, MI, Cuadrado-Grande, N y col. (2012). Mutations in the HFE, TFR2, and SLC40A1 genes in patients with hemochromatosis. *Gene* 508:15-20.
- Demant, T, Packard, C (1998). In vivo studies of VLDL metabolism and LDL heterogeneity. *Eur Heart J* 19 Suppl H:H7-10.
- Depalma, RG, Hayes, VW, Chow, BK y col. (2010). Ferritin levels, inflammatory biomarkers, and mortality in peripheral arterial disease: a substudy of the Iron (Fe) and Atherosclerosis Study (FeAST) Trial. *J Vasc Surg* 51:1498-1503.
- Despres, JP, Lemieux, I, Bergeron, J y col. (2008). Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:1039-1049.
- Di Angelantonio, E, Sarwar, N, Perry, P y col. (2009). Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA* 302:1993-2000.
- Dirección de Estadísticas e Información de Salud (2011). Agrupamiento de causas de mortalidad por división político territorial de residencia, edad y sexo. Ministerio de Salud de la República Argentina.
- Dmochowski, K, Finegood, DT, Francombe, W, Tyler, B, Zinman, B (1993). Factors determining glucose tolerance in patients with thalassemia major. *J Clin Endocrinol Metab* 77:478-483.
- Duewell, P, Kono, H, Rayner, KJ y col. (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464:1357-1361.
- Dunn, T, Blankenship, D, Beal, N y col. (2008). HFE mutations in heart disease. *Heart Vessels* 23:348-355.

- Duvillard, L, Florentin, E, Pont, F y col. (2011). Endogenous chronic hyperinsulinemia does not increase the production rate of VLDL apolipoprotein B: proof from a kinetic study in patients with insulinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 96:2163-2170.
- Ekiz, C, Agaoglu, L, Karakas, Z, Gurel, N, Yalcin, I (2005). The effect of iron deficiency anemia on the function of the immune system. *Hematol J* 5:579-583.
- Ellervik, C, Tybjaerg-Hansen, A, Appleyard, M y col. (2007). Hereditary hemochromatosis genotypes and risk of ischemic stroke. *Neurology* 68:1025-1031.
- Ellervik, C, Tybjaerg-Hansen, A, Grande, P, Appleyard, M, Nordestgaard, BG (2005). Hereditary hemochromatosis and risk of ischemic heart disease: a prospective study and a case-control study. *Circulation* 112:185-193.
- Engberink, MF, Geleijnse, JM, Durga, J y col. (2008). Blood donation, body iron status and carotid intima-media thickness. *Atherosclerosis* 196:856-862.
- Equitani, F, Fernandez-Real, JM, Menichella, G y col. (2008). Bloodletting ameliorates insulin sensitivity and secretion in parallel to reducing liver iron in carriers of HFE gene mutations. *Diabetes Care* 31:3-8.
- Facchini, FS, Hua, N, Abbasi, F, Reaven, GM (2001). Insulin resistance as a predictor of age-related diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3574-3578.
- Faerch, K, Vaag, A, Holst, JJ y col. (2009). Natural history of insulin sensitivity and insulin secretion in the progression from normal glucose tolerance to impaired fasting glycemia and impaired glucose tolerance: the Inter99 study. *Diabetes Care* 32:439-444.
- Fan, Y, Wang, J, Wei, L y col. (2011). Iron deficiency activates pro-inflammatory signaling in macrophages and foam cells via the p38 MAPK-NF-kappaB pathway. *Int J Cardiol* 152:49-55.
- Fernandez-Real, JM, Manco, M (2014). Effects of iron overload on chronic metabolic diseases. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2:513-526.
- Fernandez-Real, JM, Ricart-Engel, W, Arroyo, E y col. (1998). Serum ferritin as a component of the insulin resistance syndrome. *Diabetes Care* 21:62-68.

- Florentin, M, Tselepis, AD, Elisaf, MS y col. (2010). Effect of non-statin lipid lowering and anti-obesity drugs on LDL subfractions in patients with mixed dyslipidaemia. *Curr Vasc Pharmacol* 8:820-830.
- Fowkes, FG, Rudan, D, Rudan, I y col. (2013). Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis. *Lancet*.
- Fracanzani, AL, Piperno, A, Valenti, L y col. (2010). Hemochromatosis in Italy in the last 30 years: role of genetic and acquired factors. *Hepatology* 51:501-510.
- Fratta Pasini, A, Stranieri, C, Pasini, A y col. (2013). Lysophosphatidylcholine and Carotid Intima-Media Thickness in Young Smokers: A Role for Oxidized LDL-Induced Expression of PBMC Lipoprotein-Associated Phospholipase A2? *PLoS One* 8:e83092.
- Friedrich, N, Milman, N, Volzke, H, Linneberg, A, Jorgensen, T (2009). Is serum ferritin within the reference range a risk predictor of cardiovascular disease? A population-based, long-term study comprising 2874 subjects. *Br J Nutr* 102:594-600.
- Fruchart, JC, Davignon, J, Hermans, MP y col. (2014). Residual macrovascular risk in 2013: what have we learned? *Cardiovasc Diabetol* 13:26.
- Furlong, CE, Richter, RJ, Seidel, SL, Costa, LG, Motulsky, AG (1989). Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma paraoxonase/arylesterase. *Anal Biochem* 180:242-247.
- Gabrielsen, JS, Gao, Y, Simcox, JA y col. (2012). Adipocyte iron regulates adiponectin and insulin sensitivity. *J Clin Invest* 122:3529-3540.
- Gaenger, H, Marschang, P, Sturm, W y col. (2002). Association between increased iron stores and impaired endothelial function in patients with hereditary hemochromatosis. *J Am Coll Cardiol* 40:2189-2194.
- Gast, KB, Tjeerdema, N, Stijnen, T, Smit, JW, Dekkers, OM (2012). Insulin resistance and risk of incident cardiovascular events in adults without diabetes: meta-analysis. *PLoS One* 7:e52036.

- Geng, YJ, Wu, Q, Muszynski, M, Hansson, GK, Libby, P (1996). Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:19-27.
- Gillum, RF (2001). Association of serum ferritin and indices of body fat distribution and obesity in Mexican American men--the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:639-645.
- Go, AS, Mozaffarian, D, Roger, VL y col. (2013). Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 127:e6-e245.
- Goff, DC, Jr., D'Agostino, RB, Jr., Haffner, SM, Otvos, JD (2005). Insulin resistance and adiposity influence lipoprotein size and subclass concentrations. Results from the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Metabolism* 54:264-270.
- Gomez Rosso, L, Benitez, MB, Fornari, MC y col. (2008). Alterations in cell adhesion molecules and other biomarkers of cardiovascular disease in patients with metabolic syndrome. *Atherosclerosis* 199:415-423.
- Gowri, MS, Van der Westhuyzen, DR, Bridges, SR, Anderson, JW (1999). Decreased protection by HDL from poorly controlled type 2 diabetic subjects against LDL oxidation may be due to the abnormal composition of HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2226-2233.
- Grenon, SM, Vittinghoff, E, Owens, CD y col. (2013). Peripheral artery disease and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease: Insights from the Heart and Soul Study. *Vasc Med* 18:176-184.
- Guerin, M, Bruckert, E, Dolphin, PJ, Turpin, G, Chapman, MJ (1996). Fenofibrate reduces plasma cholesteryl ester transfer from HDL to VLDL and normalizes the atherogenic, dense LDL profile in combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:763-772.
- Guerin, M, Egger, P, Soudant, C y col. (2002). Dose-dependent action of atorvastatin in type IIB hyperlipidemia: preferential and progressive reduction of atherogenic apoB-containing lipoprotein subclasses (VLDL-2,

- IDL, small dense LDL) and stimulation of cellular cholesterol efflux. *Atherosclerosis* 163:287-296.
- Hakkinen, T, Luoma, JS, Hiltunen, MO y col. (1999). Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase, is expressed by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2909-2917.
- Hamirani, YS, Pandey, S, Rivera, JJ y col. (2008). Markers of inflammation and coronary artery calcification: a systematic review. *Atherosclerosis* 201:1-7.
- Han, DH, Hancock, CR, Jung, SR y col. (2011). Deficiency of the mitochondrial electron transport chain in muscle does not cause insulin resistance. *PLoS One* 6:e19739.
- Hanley, AJ, Williams, K, Gonzalez, C y col. (2003). Prediction of type 2 diabetes using simple measures of insulin resistance: combined results from the San Antonio Heart Study, the Mexico City Diabetes Study, and the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes* 52:463-469.
- Hansel, B, Giral, P, Nobecourt, E y col. (2004). Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J Clin Endocrinol Metab* 89:4963-4971.
- Hanson, EH, Imperatore, G, Burke, W (2001). HFE gene and hereditary hemochromatosis: a HuGE review. *Human Genome Epidemiology. Am J Epidemiol* 154:193-206.
- Hansson, GK, Libby, P (2006). The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 6:508-519.
- Hatunic, M, Finucane, FM, Brennan, AM y col. (2010). Effect of iron overload on glucose metabolism in patients with hereditary hemochromatosis. *Metabolism* 59:380-384.
- Hayashi, K, Nishio, E, Nakashima, K y col. (1992). Role of cholesterol-accumulating macrophages on vascular smooth muscle cell proliferation. *Clin Biochem* 25:345-349.

- Henderson, SA, Dallman, PR, Brooks, GA (1986). Glucose turnover and oxidation are increased in the iron-deficient anemic rat. *Am J Physiol* 250:E414-421.
- Hentze, MW, Muckenthaler, MU, Galy, B, Camaschella, C (2010). Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell* 142:24-38.
- Holme, I, Aastveit, AH, Hammar, N, Jungner, I, Walldius, G (2012). High blood hemoglobin concentration as risk factor of major atherosclerotic cardiovascular events in 114,159 healthy men and women in the apolipoprotein mortality risk study (AMORIS). *Ann Med* 44:476-486.
- Holvoet, P (2006). Obesity, the metabolic syndrome, and oxidized LDL. *Am J Clin Nutr* 83:1438; author reply 1438-1439.
- Holvoet, P, Donck, J, Landeloos, M y col. (1996). Correlation between oxidized low density lipoproteins and von Willebrand factor in chronic renal failure. *Thromb Haemost* 76:663-669.
- Hopkins, PN, Nanjee, MN, Wu, LL y col. (2009). Altered composition of triglyceride-rich lipoproteins and coronary artery disease in a large case-control study. *Atherosclerosis* 207:559-566.
- Houschyar, KS, Ludtke, R, Dobos, GJ y col. (2012). Effects of phlebotomy-induced reduction of body iron stores on metabolic syndrome: results from a randomized clinical trial. *BMC Med* 10:54.
- Howard, G, O'Leary, DH, Zaccaro, D y col. (1996). Insulin sensitivity and atherosclerosis. The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Investigators. *Circulation* 93:1809-1817.
- Ikeda, Y, Suehiro, T, Yamanaka, S y col. (2006). Association between serum ferritin and circulating oxidized low-density lipoprotein levels in patients with type 2 diabetes. *Endocr J* 53:665-670.
- Ikewaki, K, Rader, DJ, Sakamoto, T y col. (1993). Delayed catabolism of high density lipoprotein apolipoproteins A-I and A-II in human cholesteryl ester transfer protein deficiency. *J Clin Invest* 92:1650-1658.
- Insull, W, Jr. (2009). The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment. *Am J Med* 122:S3-S14.

- Isler, M, Delibas, N, Guclu, M y col. (2002). Superoxide dismutase and glutathione peroxidase in erythrocytes of patients with iron deficiency anemia: effects of different treatment modalities. *Croat Med J* 43:16-19.
- Janero, DR (1990). Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 9:515-540.
- Jerome, WG (2010). Lysosomes, cholesterol and atherosclerosis. *Clin Lipidol* 5:853-865.
- Kahn, SE, Prigeon, RL, McCulloch, DK y col. (1993). Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. *Diabetes* 42:1663-1672.
- Kannel, WB, Dawber, TR, Kagan, A, Revotskie, N, Stokes, J, 3rd (1961). Factors of risk in the development of coronary heart disease--six year follow-up experience. The Framingham Study. *Ann Intern Med* 55:33-50.
- Kannel, WB, Gordon, T, Castelli, WP (1981). Role of lipids and lipoprotein fractions in atherogenesis: the Framingham study. *Prog Lipid Res* 20:339-348.
- Kaptoge, S, Di Angelantonio, E, Pennells, L y col. (2012). C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *N Engl J Med* 367:1310-1320.
- Karvinen, H, Rutanen, J, Leppanen, O y col. (2009). PDGF-C and -D and their receptors PDGFR-alpha and PDGFR-beta in atherosclerotic human arteries. *Eur J Clin Invest* 39:320-327.
- Kavousi, M, Leening, MJ, Nanchen, D y col. (2014). Comparison of application of the ACC/AHA guidelines, Adult Treatment Panel III guidelines, and European Society of Cardiology guidelines for cardiovascular disease prevention in a European cohort. *Jama* 311:1416-1423.
- Kehrer, JP (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149:43-50.
- Kekulawala, JR, Murphy, A, D'Souza, W y col. (2008). Impact of freezing on high-density lipoprotein functionality. *Anal Biochem* 379:213-215.

- Khatib, S, Vaya, J (2014). Oxysterols and symptomatic versus asymptomatic human atherosclerotic plaque. *Biochem Biophys Res Commun* 446:709-713.
- Khera, AV, Cuchel, M, de la Llera-Moya, M y col. (2011). Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *N Engl J Med* 364:127-135.
- Kiechl, S, Willeit, J, Egger, G, Poewe, W, Oberhollenzer, F (1997). Body iron stores and the risk of carotid atherosclerosis: prospective results from the Bruneck study. *Circulation* 96:3300-3307.
- Knuiman, MW, Divitini, ML, Olynyk, JK, Cullen, DJ, Bartholomew, HC (2003). Serum ferritin and cardiovascular disease: a 17-year follow-up study in Busselton, Western Australia. *Am J Epidemiol* 158:144-149.
- Koba, S, Hirano, T, Murayama, S y col. (2003). Small dense LDL phenotype is associated with postprandial increases of large VLDL and remnant-like particles in patients with acute myocardial infarction. *Atherosclerosis* 170:131-140.
- Kockx, MM, De Meyer, GR, Muhring, J y col. (1998). Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 97:2307-2315.
- Kontush, A, Chantepie, S, Chapman, MJ (2003). Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1881-1888.
- Kontush, A, Chapman, MJ (2008). Why is HDL functionally deficient in type 2 diabetes? *Curr Diab Rep* 8:51-59.
- Kontush, A, Chapman, MJ (2010). Antiatherogenic function of HDL particle subpopulations: focus on antioxidative activities. *Curr Opin Lipidol* 21:312-318.
- Kurtoglu, E, Ugur, A, Baltaci, AK, Undar, L (2003). Effect of iron supplementation on oxidative stress and antioxidant status in iron-deficiency anemia. *Biol Trace Elem Res* 96:117-123.

- Lagrost, L, Gandjini, H, Athias, A y col. (1993). Influence of plasma cholesteryl ester transfer activity on the LDL and HDL distribution profiles in normolipidemic subjects. *Arterioscler Thromb* 13:815-825.
- Lamarche, B, Tchernof, A, Moorjani, S y col. (1997). Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation* 95:69-75.
- Lapenna, D, Pierdomenico, SD, Ciofani, G y col. (2007). Association of body iron stores with low molecular weight iron and oxidant damage of human atherosclerotic plaques. *Free Radic Biol Med* 42:492-498.
- Lavi, S, McConnell, JP, Rihal, CS y col. (2007). Local production of lipoprotein-associated phospholipase A2 and lysophosphatidylcholine in the coronary circulation: association with early coronary atherosclerosis and endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 115:2715-2721.
- Lee, SM, Attieh, ZK, Son, HS y col. (2012). Iron repletion relocalizes hephaestin to a proximal basolateral compartment in polarized MDCK and Caco2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 421:449-455.
- Leonarduzzi, G, Gamba, P, Sottero, B y col. (2005). Oxysterol-induced up-regulation of MCP-1 expression and synthesis in macrophage cells. *Free Radic Biol Med* 39:1152-1161.
- Lewis, M, Iammarino, RM (1971). Lipemia in rodent iron-deficiency anemia. *J Lab Clin Med* 78:546-554.
- Li, W, Ostblom, M, Xu, LH y col. (2006). Cytocidal effects of atheromatous plaque components: the death zone revisited. *Faseb J* 20:2281-2290.
- Lian, J, Xu, L, Huang, Y y col. (2013). Meta-analyses of HFE variants in coronary heart disease. *Gene* 527:167-173.
- Libby, P (2012). Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:2045-2051.
- Libby, P (2013). Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med* 368:2004-2013.

- Lill, R, Muhlenhoff, U (2005). Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 30:133-141.
- Linderman, JK, Brooks, GA, Rodriguez, RE, Dallman, PR (1994). Maintenance of euglycemia is impaired in gluconeogenesis-inhibited iron-deficient rats at rest and during exercise. *J Nutr* 124:2131-2138.
- Lucero, D, Zago, V, Lopez, GI y col. (2011). Does non-alcoholic fatty liver impair alterations of plasma lipoproteins and associated factors in metabolic syndrome? *Clin Chim Acta* 412:587-592.
- Lyngbaek, S, Marott, JL, Sehestedt, T y col. (2012). Cardiovascular risk prediction in the general population with use of suPAR, CRP, and Framingham Risk Score. *Int J Cardiol*.
- Lloyd-Jones, DM, Hong, Y, Labarthe, D y col. (2010). Defining and setting national goals for cardiovascular health promotion and disease reduction: the American Heart Association's strategic Impact Goal through 2020 and beyond. *Circulation* 121:586-613.
- Mackey, RH, Kuller, LH, Sutton-Tyrrell, K y col. (2002). Lipoprotein subclasses and coronary artery calcium in postmenopausal women from the healthy women study. *Am J Cardiol* 90:71i-76i.
- Maedler, K, Dharmadhikari, G, Schumann, DM, Storling, J (2011). Interleukin-targeted therapy for metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Handb Exp Pharmacol*:257-278.
- Maki, KC, Dicklin, MR, Davidson, MH, Mize, PD, Kulkarni, KR (2012). Indicators of the atherogenic lipoprotein phenotype measured with density gradient ultracentrifugation predict changes in carotid intima-media thickness in men and women. *Vasc Health Risk Manag* 8:31-38.
- Mari, A, Tura, A, Natali, A y col. (2010). Impaired beta cell glucose sensitivity rather than inadequate compensation for insulin resistance is the dominant defect in glucose intolerance. *Diabetologia* 53:749-756.
- Marín, G, Rivadulla, P, Negro, L, Gelemur, M, Etchegoyen, G (2008). Estudio poblacional de prevalencia de anemia en población adulta de Buenos Aires, Argentina. *Aten Primaria* 40:133-138.

- Marsche, G, Saemann, MD, Heinemann, A, Holzer, M (2013). Inflammation alters HDL composition and function: implications for HDL-raising therapies. *Pharmacol Ther* 137:341-351.
- Martinet, W, Schrijvers, DM, De Meyer, GR (2011). Pharmacological modulation of cell death in atherosclerosis: a promising approach towards plaque stabilization? *Br J Pharmacol* 164:1-13.
- Matsuda, M, DeFronzo, RA (1999). Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 22:1462-1470.
- McClain, DA, Abraham, D, Rogers, J y col. (2006). High prevalence of abnormal glucose homeostasis secondary to decreased insulin secretion in individuals with hereditary haemochromatosis. *Diabetologia* 49:1661-1669.
- McLaughlin, T, Reaven, G, Abbasi, F y col. (2005). Is there a simple way to identify insulin-resistant individuals at increased risk of cardiovascular disease? *Am J Cardiol* 96:399-404.
- Meigs, JB, Muller, DC, Nathan, DM, Blake, DR, Andres, R (2003). The natural history of progression from normal glucose tolerance to type 2 diabetes in the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Diabetes* 52:1475-1484.
- Meyers, DG, Jensen, KC, Menitove, JE (2002). A historical cohort study of the effect of lowering body iron through blood donation on incident cardiac events. *Transfusion* 42:1135-1139.
- Ministerio de Salud de la Nación (2007). Documento de resultados de la Encuesta Nacional de Nutrición y Salud. http://www.msal.gov.ar/htm/site/ennys/pdf/ENNyS_Documento-de-resultados-2007-II.pdf.
- Ministerio de Salud de la Nación, ANMAT (2003). Ley N°25630. http://www.anmat.gov.ar/Legislacion/Alimentos/Ley_25630.pdf.
- Moore, KJ, Freeman, MW (2006). Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1702-1711.

- Muniyappa, R, Lee, S, Chen, H, Quon, MJ (2008). Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294:E15-26.
- Mura, C, Ragueneas, O, Ferec, C (1999). HFE mutations analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild form of hemochromatosis. *Blood* 93:2502-2505.
- Muratsubaki, H, Enomoto, K, Ichijoh, Y, Yamamoto, Y (2003). Hypertriglyceridemia associated with decreased post-heparin plasma hepatic triglyceride lipase activity in hypoxic rats. *Arch Physiol Biochem* 111:449-454.
- Nam, H, Wang, CY, Zhang, L y col. (2013). ZIP14 and DMT1 in the liver, pancreas, and heart are differentially regulated by iron deficiency and overload: implications for tissue iron uptake in iron-related disorders. *Haematologica* 98:1049-1057.
- Nevin, DN, Zambon, A, Furlong, CE y col. (1996). Paraoxonase genotypes, lipoprotein lipase activity, and HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:1243-1249.
- Nicolas, G, Bennoun, M, Devaux, I y col. (2001). Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8780-8785.
- Nicolas, G, Bennoun, M, Porteu, A y col. (2002). Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4596-4601.
- Njajou, OT, Hollander, M, Koudstaal, PJ y col. (2002). Mutations in the hemochromatosis gene (HFE) and stroke. *Stroke* 33:2363-2366.
- Nobecourt, E, Jacqueminet, S, Hansel, B y col. (2005). Defective antioxidative activity of small dense HDL3 particles in type 2 diabetes: relationship to elevated oxidative stress and hyperglycaemia. *Diabetologia* 48:529-538.
- Noble, RP (1968). Electrophoretic separation of plasma lipoproteins in agarose gel. *J Lipid Res* 9:693-700.
- Nonogaki, K (2012). Dysglycemia and cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* 60:1121.

- Oakhill, JS, Marritt, SJ, Gareta, EG, Cammack, R, McKie, AT (2008). Functional characterization of human duodenal cytochrome b (Cybrd1): Redox properties in relation to iron and ascorbate metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1777:260-268.
- OMS (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 894:i-xii, 1-253.
- Ozdemir, A, Sevinc, C, Selamet, U, Kamaci, B, Atalay, S (2007). Age- and body mass index-dependent relationship between correction of iron deficiency anemia and insulin resistance in non-diabetic premenopausal women. *Ann Saudi Med* 27:356-361.
- Ozkurt, S, Ozenc, F, Degirmenci, NA y col. (2012). Acute and subacute effects of EV iron sucrose on endothelial functions in hemodialysis patients. *Ren Fail* 34:1-6.
- Packard, CJ (2003). Triacylglycerol-rich lipoproteins and the generation of small, dense low-density lipoprotein. *Biochem Soc Trans* 31:1066-1069.
- Packard, CJ, Demant, T, Stewart, JP y col. (2000). Apolipoprotein B metabolism and the distribution of VLDL and LDL subfractions. *J Lipid Res* 41:305-318.
- Pagani, A, Nai, A, Corna, G y col. (2011). Low hepcidin accounts for the proinflammatory status associated with iron deficiency. *Blood* 118:736-746.
- Pai, AB, Boyd, AV, McQuade, CR y col. (2007). Comparison of oxidative stress markers after intravenous administration of iron dextran, sodium ferric gluconate, and iron sucrose in patients undergoing hemodialysis. *Pharmacotherapy* 27:343-350.
- Paik, JK, Kim, JY, Kim, OY y col. (2012). Circulating and PBMC Lp-PLA2 associate differently with oxidative stress and subclinical inflammation in nonobese women (menopausal status). *PLoS One* 7:e29675.
- Pankow, JS, Boerwinkle, E, Adams, PC y col. (2008). HFE C282Y homozygotes have reduced low-density lipoprotein cholesterol: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Transl Res* 152:3-10.
- Park, CH, Valore, EV, Waring, AJ, Ganz, T (2001). Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 276:7806-7810.

- Patel, PJ, Khera, AV, Jafri, K, Wilensky, RL, Rader, DJ (2011). The anti-oxidative capacity of high-density lipoprotein is reduced in acute coronary syndrome but not in stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 58:2068-2075.
- Pietrangelo, A (2004). Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease. *N Engl J Med* 350:2383-2397.
- Piperno, A (1998). Classification and diagnosis of iron overload. *Haematologica* 83:447-455.
- Piperno, A (2013). Molecular diagnosis of hemochromatosis. *Expert Opin Med Diagn* 7:161-177.
- Piperno, A, Vergani, A, Salvioni, A y col. (2004). Effects of venesections and restricted diet in patients with the insulin-resistance hepatic iron overload syndrome. *Liver Int* 24:471-476.
- Querton, L, Buyschaert, M, Hermans, MP (2012). Hypertriglyceridemia and residual dyslipidemia in statin-treated, patients with diabetes at the highest risk for cardiovascular disease and achieving very-low low-density lipoprotein-cholesterol levels. *J Clin Lipidol* 6:434-442.
- Reaven, GM (2005). The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment. *Annu Rev Nutr* 25:391-406.
- Retnakaran, R, Shen, S, Hanley, AJ y col. (2008). Hyperbolic relationship between insulin secretion and sensitivity on oral glucose tolerance test. *Obesity (Silver Spring)* 16:1901-1907.
- Rey, J, Castro, M, Lardo, M y col. (2011). [HFE gene mutations associated to hereditary hemochromatosis in males from the metropolitan area of Buenos Aires. Implications related with regular diet characteristics.]. *Bioquímica y Patología Clínica* 75:13-17.
- Ridker, PM, MacFadyen, JG, Wolfert, RL, Koenig, W (2012). Relationship of lipoprotein-associated phospholipase A(2) mass and activity with incident vascular events among primary prevention patients allocated to placebo or to statin therapy: an analysis from the JUPITER trial. *Clin Chem* 58:877-886.

- Riva, A, Trombini, P, Mariani, R y col. (2008). Reevaluation of clinical and histological criteria for diagnosis of dysmetabolic iron overload syndrome. *World J Gastroenterol* 14:4745-4752.
- Rivera, S, Nemeth, E, Gabayan, V y col. (2005). Synthetic hepcidin causes rapid dose-dependent hypoferremia and is concentrated in ferroportin-containing organs. *Blood* 106:2196-2199.
- Romeo, GR, Lee, J, Shoelson, SE (2012). Metabolic syndrome, insulin resistance, and roles of inflammation--mechanisms and therapeutic targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:1771-1776.
- Ronda, N, Favari, E, Borghi, MO y col. (2014). Impaired serum cholesterol efflux capacity in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 73:609-615.
- Rosenson, RS, Brewer, HB, Jr., Chapman, MJ y col. (2011). HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clin Chem* 57:392-410.
- Rossetti, MV, Mendez, M, Afonso, S y col. (2009). HFE gene mutations in patients with altered iron metabolism in Argentina. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 55:31-35.
- Rui, L, Yuan, M, Frantz, D, Shoelson, S, White, MF (2002). SOCS-1 and SOCS-3 block insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *J Biol Chem* 277:42394-42398.
- Rutter, MK, Meigs, JB, Sullivan, LM, D'Agostino, RB, Sr., Wilson, PW (2005). Insulin resistance, the metabolic syndrome, and incident cardiovascular events in the Framingham Offspring Study. *Diabetes* 54:3252-3257.
- Rye, KA, Barter, PJ (2013). Cardioprotective functions of HDL. *J Lipid Res*.
- Sakakura, K, Nakano, M, Otsuka, F y col. (2013). Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Heart Lung Circ* 22:399-411.
- Salomon, RN, Hughes, CC, Schoen, FJ y col. (1991). Human coronary transplantation-associated arteriosclerosis. Evidence for a chronic immune reaction to activated graft endothelial cells. *Am J Pathol* 138:791-798.

- Salonen, JT, Nyssonen, K, Korpela, H y col. (1992). High stored iron levels are associated with excess risk of myocardial infarction in eastern Finnish men. *Circulation* 86:803-811.
- Salonen, JT, Tuomainen, TP, Salonen, R, Lakka, TA, Nyssonen, K (1998). Donation of blood is associated with reduced risk of myocardial infarction. The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study. *Am J Epidemiol* 148:445-451.
- Sarnak, MJ, Tighiouart, H, Manjunath, G y col. (2002). Anemia as a risk factor for cardiovascular disease in The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *J Am Coll Cardiol* 40:27-33.
- Sarwar, N, Butterworth, AS, Freitag, DF y col. (2012). Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of 82 studies. *Lancet* 379:1205-1213.
- Schreier, LE, Sanguinetti, S, Mosso, H y col. (1996). Low-density lipoprotein composition and oxidability in atherosclerotic cardiovascular disease. *Clin Biochem* 29:479-487.
- Schumaker, VN, Puppione, DL (1986). Sequential flotation ultracentrifugation. *Methods Enzymol* 128:155-170.
- Seimon, T, Tabas, I (2009). Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis. *J Lipid Res* 50 Suppl:S382-387.
- Seth, B, Williams, JS (2014). Recent AHA/ACC cholesterol guidelines: vice or virtue? *Metabolism* 63:605-606.
- Shanik, MH, Xu, Y, Skrha, J y col. (2008). Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes Care* 31 Suppl 2:S262-268.
- Shayeghi, M, Latunde-Dada, GO, Oakhill, JS y col. (2005). Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 122:789-801.
- Sherman, AR (1978). Lipogenesis in iron-deficient adult rats. *Lipids* 13:473-478.
- Sitia, S, Tomasoni, L, Atzeni, F y col. (2010). From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Rev* 9:830-834.

- Skilton, MR (2008). Intrauterine risk factors for precocious atherosclerosis. *Pediatrics* 121:570-574.
- Skoglund-Andersson, C, Tang, R, Bond, MG y col. (1999). LDL particle size distribution is associated with carotid intima-media thickness in healthy 50-year-old men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:2422-2430.
- Sohn, YS, Ghoti, H, Breuer, W y col. (2012). The role of endocytic pathways in cellular uptake of plasma non-transferrin iron. *Haematologica* 97:670-678.
- Solanas-Barca, M, Mateo-Gallego, R, Calmarza, P y col. (2009). Mutations in HFE causing hemochromatosis are associated with primary hypertriglyceridemia. *J Clin Endocrinol Metab* 94:4391-4397.
- Stadler, N, Lindner, RA, Davies, MJ (2004). Direct detection and quantification of transition metal ions in human atherosclerotic plaques: evidence for the presence of elevated levels of iron and copper. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:949-954.
- Stampfer, MJ, Ridker, PM, Dzau, VJ (2004). Risk factor criteria. *Circulation* 109:IV3-5.
- Stanley, N, Stadler, N, Woods, AA, Bannon, PG, Davies, MJ (2006). Concentrations of iron correlate with the extent of protein, but not lipid, oxidation in advanced human atherosclerotic lesions. *Free Radic Biol Med* 40:1636-1643.
- Stocker, R, Keaney, JF, Jr. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 84:1381-1478.
- Stone, NJ, Robinson, JG, Lichtenstein, AH y col. (2014). 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 129:S1-45.
- Subramaniam, VN, McDonald, CJ, Ostini, L y col. (2012). Hepatic iron deposition does not predict extrahepatic iron loading in mouse models of hereditary hemochromatosis. *Am J Pathol* 181:1173-1179.

- Sullivan, JL (1981). Iron and the sex difference in heart disease risk. *Lancet* 1:1293-1294.
- Sundaram, RC, Selvaraj, N, Vijayan, G y col. (2007). Increased plasma malondialdehyde and fructosamine in iron deficiency anemia: effect of treatment. *Biomed Pharmacother* 61:682-685.
- Tang, WH, Hartiala, J, Fan, Y y col. (2012). Clinical and genetic association of serum paraoxonase and arylesterase activities with cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:2803-2812.
- Tariq, SM, Sidhu, MS, Toth, PP, Boden, WE (2014). HDL hypothesis: where do we stand now? *Curr Atheroscler Rep* 16:398.
- Tektas, AK, Uslu, S, Yalcin, AU y col. (2012). Effects of lipoprotein-associated phospholipase A2 on arginase/nitric oxide pathway in hemodialysis patients. *Ren Fail* 34:738-743.
- Thomas, C, Thomas, L (2002). Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem* 48:1066-1076.
- Toblli, JE, Cao, G, Oliveri, L, Angerosa, M (2011). Assessment of the extent of oxidative stress induced by intravenous ferumoxytol, ferric carboxymaltose, iron sucrose and iron dextran in a nonclinical model. *Arzneimittelforschung* 61:399-410.
- Toft-Petersen, AP, Tilsted, HH, Aaroe, J y col. (2011). Small dense LDL particles-- a predictor of coronary artery disease evaluated by invasive and CT-based techniques: a case-control study. *Lipids Health Dis* 10:21.
- Tominaga, M, Eguchi, H, Manaka, H y col. (1999). Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. The Funagata Diabetes Study. *Diabetes Care* 22:920-924.
- Tornvall, P, Bavenholm, P, Landou, C, de Faire, U, Hamsten, A (1993). Relation of plasma levels and composition of apolipoprotein B-containing lipoproteins to angiographically defined coronary artery disease in young patients with myocardial infarction. *Circulation* 88:2180-2189.

- Toth, PP, Barter, PJ, Rosenson, RS y col. (2013). High-density lipoproteins: a consensus statement from the National Lipid Association. *J Clin Lipidol* 7:484-525.
- Tribble, DL, Krauss, RM, Lansberg, MG, Thiel, PM, van den Berg, JJ (1995). Greater oxidative susceptibility of the surface monolayer in small dense LDL may contribute to differences in copper-induced oxidation among LDL density subfractions. *J Lipid Res* 36:662-671.
- Tsimikas, S, Miller, YI (2011). Oxidative modification of lipoproteins: mechanisms, role in inflammation and potential clinical applications in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des* 17:27-37.
- Tsimikas, S, Willeit, J, Knoflach, M y col. (2009). Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity, ferritin levels, metabolic syndrome, and 10-year cardiovascular and non-cardiovascular mortality: results from the Bruneck study. *Eur Heart J* 30:107-115.
- Tuomainen, TP, Diczfalusy, U, Kaikkonen, J, Nyysönen, K, Salonen, JT (2003). Serum ferritin concentration is associated with plasma levels of cholesterol oxidation products in man. *Free Radic Biol Med* 35:922-928.
- Tuomainen, TP, Nyysönen, K, Salonen, R y col. (1997). Body iron stores are associated with serum insulin and blood glucose concentrations. Population study in 1,013 eastern Finnish men. *Diabetes Care* 20:426-428.
- Valenti, L, Fracanzani, AL, Dongiovanni, P y col. (2007). Iron depletion by phlebotomy improves insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease and hyperferritinemia: evidence from a case-control study. *Am J Gastroenterol* 102:1251-1258.
- van der, AD, Grobbee, DE, Roest, M y col. (2005). Serum ferritin is a risk factor for stroke in postmenopausal women. *Stroke* 36:1637-1641.
- van der, AD, Rovers, MM, Grobbee, DE y col. (2008). Mutations in the HFE gene and cardiovascular disease risk: an individual patient data meta-analysis of 53 880 subjects. *Circ Cardiovasc Genet* 1:43-50.
- van Diepen, JA, Berbee, JF, Havekes, LM, Rensen, PC (2013). Interactions between inflammation and lipid metabolism: relevance for efficacy of anti-

- inflammatory drugs in the treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 228:306-315.
- van Tits, LJ, Jacobs, EM, Swinkels, DW y col. (2007). Non-transferrin-bound iron is associated with plasma level of soluble intercellular adhesion molecule-1 but not with in vivo low-density lipoprotein oxidation. *Atherosclerosis* 194:272-278.
- Verma, U, Shankar, N, Madhu, SV y col. (2010). Relationship between iron deficiency anaemia and serum lipid levels in Indian adults. *J Indian Med Assoc* 108:555-558, 562.
- Viitasalo, A, Lakka, TA, Laaksonen, DE y col. (2014). Validation of metabolic syndrome score by confirmatory factor analysis in children and adults and prediction of cardiometabolic outcomes in adults. *Diabetologia*.
- Virchow, R (1858). Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. *Nutr Rev* 47:23-25.
- Vulpe, CD, Kuo, YM, Murphy, TL y col. (1999). Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nat Genet* 21:195-199.
- Waalén, J, Felitti, VJ, Gelbart, T, Beutler, E (2008). Screening for hemochromatosis by measuring ferritin levels: a more effective approach. *Blood* 111:3373-3376.
- Warnick, GR, Benderson, J, Albers, JJ (1982). Dextran sulfate-Mg²⁺ precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 28:1379-1388.
- West, AR, Oates, PS (2008). Subcellular location of heme oxygenase 1 and 2 and divalent metal transporter 1 in relation to endocytotic markers during heme iron absorption. *J Gastroenterol Hepatol* 23:150-158.
- WHO/UNICEF/UNU (2008). Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005. WHO Global Database on Anaemia. Available online at: http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596657_eng.pdf.

- Wilensky, RL, Macphee, CH (2009). Lipoprotein-associated phospholipase A2 and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*.
- Wilkins, JT, Ning, H, Berry, J y col. (2012). Lifetime risk and years lived free of total cardiovascular disease. *Jama* 308:1795-1801.
- Williams, PT, Feldman, DE (2011). Prospective study of coronary heart disease vs. HDL2, HDL3, and other lipoproteins in Gofman's Livermore Cohort. *Atherosclerosis* 214:196-202.
- Williamson, RT (1901). On the Treatment of Glycosuria and Diabetes Mellitus with Sodium Salicylate. *Br Med J* 1:760-762.
- Winning, S, Splettstoesser, F, Fandrey, J, Frede, S (2010). Acute hypoxia induces HIF-independent monocyte adhesion to endothelial cells through increased intercellular adhesion molecule-1 expression: the role of hypoxic inhibition of prolyl hydroxylase activity for the induction of NF-kappa B. *J Immunol* 185:1786-1793.
- Wolff, B, Volzke, H, Ludemann, J y col. (2004). Association between high serum ferritin levels and carotid atherosclerosis in the study of health in Pomerania (SHIP). *Stroke* 35:453-457.
- Xing, X, Baffic, J, Sparrow, CP (1998). LDL oxidation by activated monocytes: characterization of the oxidized LDL and requirement for transition metal ions. *J Lipid Res* 39:2201-2208.
- Yeni-Komshian, H, Carantoni, M, Abbasi, F, Reaven, G (2000). Relationship between several surrogate estimates of insulin resistance and quantification of insulinmediated glucose disposal in 490 healthy, nondiabetic volunteers. . *Diabetes Care* 23:171-175.
- Yoo, JH, Maeng, HY, Sun, YK y col. (2009). Oxidative status in iron-deficiency anemia. *J Clin Lab Anal* 23:319-323.
- Younis, N, Sharma, R, Soran, H y col. (2008). Glycation as an atherogenic modification of LDL. *Curr Opin Lipidol* 19:378-384.
- Younis, NN, Soran, H, Pemberton, P y col. (2013). Small dense LDL is more susceptible to glycation than more buoyant LDL in Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)* 124:343-349.

- Yuan, M, Konstantopoulos, N, Lee, J y col. (2001). Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 293:1673-1677.
- Zacharski, LR, Chow, BK, Howes, PS y col. (2007). Reduction of iron stores and cardiovascular outcomes in patients with peripheral arterial disease: a randomized controlled trial. *Jama* 297:603-610.
- Zacharski, LR, Chow, BK, Howes, PS y col. (2008). Decreased cancer risk after iron reduction in patients with peripheral arterial disease: results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 100:996-1002.
- Zacharski, LR, DePalma, RG, Shamayeva, G, Chow, BK (2013). The statin-iron nexus: anti-inflammatory intervention for arterial disease prevention. *Am J Public Health* 103:e105-112.
- Zacharski, LR, Shamayeva, G, Chow, BK (2011). Effect of controlled reduction of body iron stores on clinical outcomes in peripheral arterial disease. *Am Heart J* 162:949-957 e941.
- Zamani, P, Schwartz, GG, Olsson, AG y col. (2013). Inflammatory biomarkers, death, and recurrent nonfatal coronary events after an acute coronary syndrome in the MIRACL study. *J Am Heart Assoc* 2:e003103.
- Zeller, M, Masson, D, Farnier, M y col. (2007). High serum cholesteryl ester transfer rates and small high-density lipoproteins are associated with young age in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 50:1948-1955.
- Zheng, H, Cable, R, Spencer, B, Votto, N, Katz, SD (2005). Iron stores and vascular function in voluntary blood donors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1577-1583.
- Zheng, H, Huang, X, Zhang, Q, Katz, SD (2006). Iron sucrose augments homocysteine-induced endothelial dysfunction in normal subjects. *Kidney Int* 69:679-684.