

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E HISTOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA**

*Implicación de los biomarcadores moleculares de inflamación
endotelial y de disfunción endocrino metabólica en la clasificación
patogénica de los pacientes con Síndrome Metabólico*

María Teresa Carrascal Velasco
Tesis Doctoral
Diciembre 2015

INDICE DE MATERIAS	i
INDICE DE FIGURAS	v
INDICE DE TABLAS	viii
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xvi
I- INTRODUCCION	1
A. ANTECEDENTES HISTORICOS PARA EL ESTUDIO DE LOS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR.....	1
1. Preludio epidemiológico.....	1
2. La necesidad de actuación.....	1
3. Planteamiento de la hipótesis de estudio.....	3
4. Diseño de la investigación.....	4
5. Identificación de los principales factores de riesgo de ECV.....	5
B. DATOS EPIDEMIOLOGICOS DE LOS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN ESPAÑA 2001-2011/2012.....	6
1. Principales hallazgos.....	7
A. INFLAMACION: GENERALIDADES.....	12
1. La vía inflamatoria.....	15
1-1. Inductores y Sensores de la Inflamación.....	16
1-1-1. Inductores exógenos.....	16
1-1-2. Inductores endógenos.....	17
1-2. Inflamasoma.....	21
1-2-1. Inducción en la formación del Inflamasoma.....	22
1-2-2. Regulación de la actividad del Inflamasoma.....	22
1-3. Factor de Transcripción NF-kappaB (NF- κ B).....	24
1-3-1. Inductores de NF- κ B.....	25
1-3-2. NF- κ B y el estrés oxidativo.....	26
1-4. Mediadores y efectores de la Inflamación.....	27
1-4-1. Aminas vasoactivas.....	28
1-4-2. Péptidos vasoactivos.....	28
1-4-3. Fragmentos del Complemento.....	28
1-4-4. Mediadores lipídicos.....	29
1-4-5. Citocinas inflamatorias.....	29
1-4-6. Quimiocinas.....	29
1-4-7. Enzimas proteolíticas.....	29
1-5. Control de homeostasis a través de respuestas de estrés y adaptación.....	30
1-6. Estados celulares.....	32

1-7. Inflamación: Respuesta celular al estrés	36
1-8. Para-Inflamación	37
1-9. Regulación de la respuesta inflamatoria	38
1-10. La evolución de los rasgos adaptativos	40
B. CANCER E INFLAMACION	41
1. Inflamación y oncogenes	42
2. Factores clave en la inflamación relacionada con el cáncer	46
3. Leucocitos tumorales	48
4. Inflamación relacionada con el tumor e inmunidad adaptativa	49
5. Vías inflamatorias en la invasión y metástasis	50
6. Inflamación e inhibición de la progresión tumoral	52
7. Las grandes cuestiones	53
E. SÍNDROME METABOLICO	55
1. Patogénesis	57
1-1. Acciones y señalización de la insulina	57
1-2. Resistencia Insulínica	59
1-3. Ácidos grasos libres	59
1-4. Ciclo de Randle	60
1-5. Acumulación de derivados lipídicos intracelulares:	60
2. Señalización inflamatoria	61
2-1. La IL-18 como citocina proinflamatoria	63
2-1-a. IL-18 en el tejido adiposo	63
2-1-b. IL-18 y musculo	64
2-2. IL-18 y Angiogénesis	65
2-3. IL-18 y Síndrome Metabólico	66
3. Estrés oxidativo	68
4. Disfunción mitocondrial	69
5. Adipocinas	69
5-1. Adiponectina	69
5-2. Leptina	71
5-3. Resistina	72
5-4. Proteína de unión del retinol	73
6. Efectos de la resistencia insulínica	73
6-1. Hiperglicemia y DMII	73
6-2. Hipertensión	74
6-3. Dislipemia	78
7. Esteatosis hepática no alcohólica	79
8. Síndrome ovario poliquístico	80

9. Apnea obstructiva del sueño.....	80
10. Disfunción sexual.....	81
11. Cáncer	81
F. INFLAMASOMAS Y SÍNDROME METABOLICO.....	82
1. Regulación de la señalización insulínica por la activación del inflamasoma.....	82
2. La activación del inflamasoma empeora la función de la célula B.....	86
3. Activación del inflamasoma y aterosclerosis.....	88
G. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y MECANISMOS INFLAMATORIO.....	89
1. Resistencia insulínica y aterotrombosis.....	92
1-1. MicroRNA y enfermedad DM.....	98
1-2. Trombosis y coagulación.....	99
1-3. Memoria vascular hiperglicémica.....	101
2. Insuficiencia cardiaca.....	103
2-1. Activación neurohormonal en IC.....	104
2-2. Síndrome cardiorrenal.....	105
2-3. IC: Bionarcadores o mediadores.....	107
2-4. Citocinas inflamatorias como biomarcadores.....	111
2-4-1. Papel patogénico de la inflamación en la IC.....	111
3. Acción de las citocinas inflamatorias en los mecanismos moleculares y celulares desencadenados en el tejido miocárdico en situaciones de isquemia-reperfusión.....	112
II.- PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS.....	118
A. ANTECEDENTES E HIPOTESIS.....	120
B. OBJETIVOS DE ESTUDIO.....	120
III.- MATERIAL Y METODOS.....	121
1. Sujetos de Estudio.....	121
2. Definición de la Población a Estudio.....	121
2.1. Criterios de selección de casos (pacientes con SM) y del grupo control (controles).....	121
A. Casos (pacientes con SM).....	121
B. Controles.....	122
3. Principales Variables.....	122
3.1. Parámetros Clínicos.....	122
3-1-1. Examen Clínico Antropométricos.....	123
3-1-2. Medida de la Tensión Arterial.....	123
3-2. Niveles plasmáticos de grupos de adipocitocinas y	

citoquinas inflamatorias:.....	124
3-3. Parámetros que pueden expresar aparición o progresión de daño o lesión orgánica subclínica:.....	124
3-4. Parámetros bioquímicos séricos de estimación de RCV (basal) y su control (en las visitas de seguimiento).....	125
4. Tiempos y Modos de Recogida de los Datos.....	128
5. Análisis estadístico de los datos.....	128
6. Limitaciones del Estudio.....	129
7. Plan de Trabajo.....	129
8. Ámbito de Estudio.....	129
Anexo 1: Criterios de Síndrome Metabólico (SM) y niveles normales de otros parámetros clínicos.....	130
Anexo 2: Hoja de Información del Paciente.....	131
Anexo 3: Modelo de Consentimiento Informado para el paciente.....	132
IV. RESULTADOS.....	135
1. Distribución de la Población a Estudio.....	135
2. Interrelación entre biomarcadores de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica en pacientes con Síndrome Metabólico.....	143
3. Diferentes patrones de presentación de los componentes del Síndrome Metabólico con respecto al nivel del patrón de expresión de los biomarcadores plasmáticos de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica.....	149
V.- DISCUSION.....	175
VI.- CONCLUSIONES.....	187
VII.- BIBLIOGRAFIA.....	189

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Porcentaje de hombres y mujeres fumadores en España 2001-2011/2012.....7

Fig. 2. Prevalencia de inactividad física según el nivel de estudios en España 2001-2011/2012.....9

Fig. 3. Diferencia absoluta (2011/2012-2001) en la frecuencia de obesidad en hombres y mujeres según edad.....9

Fig. 4. Diferencia absoluta (2011/2012-2001) en la frecuencia de consumo insuficiente de frutas y verduras según la edad en hombres y mujeres.....10

Fig. 5. Porcentaje de hombres y mujeres bebedores de riesgo 2003, 2006, 2009 y 2011/2012.....11

Fig. 6. Porcentaje de hombres bebedores de riesgo según el nivel de estudios España 2003 y 2011/2012.....12

Fig. 7. Fisiopatología de la Inflamación: dependiente del iniciador del proceso inflamatorio la respuesta tiene un propósito fisiológico y unas consecuencias diferentes.....15

Fig. 8. La vía inflamatoria:.....18

Fig. 9. Cebado del inflamasoma.....24

Fig. 10. Muerte celular y sus consecuencias:.....31

Fig. 11. Tres modelos de adaptación y mantenimiento de la homeostasis tisular:.....33

Fig. 12. Vías que conectan inflamación y cáncer: Esta conectadas por dos vías intrínseca y extrínseca.....44

Fig. 13. Oncogenes e inflamación:.....45

Fig. 14. Papel de las células del sistema inmune en el desarrollo de la inflamación inducida por la obesidad:.....62

Fig. 15. La inflamación del tejido adiposo visceral es una señal detonante en el inicio y la propagación de la inflamación sistémica de bajo grado.....72

Fig. 16. Acciones de la IL-1B y/o IL-18 en los mecanismos mediadores de la hipertensión.....76

Fig. 17. La inflamación del tejido adiposo en la patogénesis del SM y DMII.....84

Fig. 18. Perfil inflamatorio del adipocito en el desbalance entre un tejido adiposo de un obeso metabólicamente sano o enfermo.....85

Fig. 19. Activación del inflamasoma en el miocardio inflamado.....85

Fig. 20. IAPP (islet amyloid polypeptide o amilina) es cosecretada con la insulina desde las células beta del páncreas y en su forma amiloide es internalizado en los macrófagos, este inestabiliza el fagolisosoma provocando una liberación de catepsinas.....86

Fig. 21. Relaciones entre TLR y el inflamasoma NLRP3 con la alteraciones metabólicas en el SM.....	87
Fig. 22. Mecanismos de daños vascular inducidos por la hiperglicemia.....	90
Fig. 23. Características del desarrollo y ruptura de la placa aterosclerótica asociada a enfermedad coronaria.....	96
Fig. 24 La resistencia insulínica inicia la aterotrombosis.....	97
Fig. 25. Papel de los microRNAs están relacionados con la afectación vascular de la diabetes.....	99
Fig. 26. Coagulación y reactividad de las plaquetas en diabéticos.....	101
Fig. 27. Señalización de la memoria hiperglucemia vascular:.....	102
Fig. 28. Activación neurohormonal en la IC:.....	109
Fig. 29. Papel del Inflamasoma en el Síndrome Metabólico:.....	112
Fig. 30. Modelo de la desregulación de la respuesta inmune e inflamatoria que provoca el desarrollo de un estado de insulina resistencia a nivel cardiovascular.....	117
Fig. 31. Distribución de la Población según edad, sexo, Lesión Órgano Subclínico y componentes signos clínicos de Síndrome Metabólico.....	135
Fig. 32. Distribución de las Variables Analíticas a estudio.....	138
Fig. 33. Distribución de las Variables Clínicas a estudio.....	139
Fig. 34. Resumen numérico de los pacientes según el grado se-de síndrome metabólico y la presencia o no de lesión órgano subclínico.....	140
Fig. 35. Distribución de las Variables Analíticas según su distribución por numero de signos clínicos componentes de Síndrome Metabólico y de Lesión de Órgano Subclínico.....	141
Fig. 36. Distribución de las Variables Analíticas según su distribución por numero de signos clínicos componentes de Síndrome Metabólico y de Lesión de Órgano Subclínico.....	142
Fig. 37. Distribución de las Variables Analíticas según su distribución por numero de signos clínicos componentes de Síndrome Metabólico y de Lesión de Órgano Subclínico.....	144
Fig. 38. Modelo de r relación entre variables combinadas (variable 1 y variable 2).....	144
Fig. 39. Primera función canónica para los conjuntos de variables.....	146
Fig. 40. Relación entre las tres proteínas más relacionadas con el indicador de proteínas y el indicador formado por lesión y número de componentes.....	148
Fig. 41. Distribución en la población de pacientes de la Variable IL-1B.....	150
Fig. 42. Distribución en la población de pacientes de la Variable MCP-1.....	150
Fig. 43. Distribución en la población de pacientes de la Variable VEGF.....	150
Fig. 44. Distribución en la población de pacientes de la Variable ICAM-1.....	151
Fig. 45. Distribución en la población de pacientes de la Variable VCAM-1.....	151

Fig. 46. Distribución en la población de pacientes de la Variable IL-18.....	151
Fig. 47. Distribución en la población de pacientes de la Variable Grelina.....	152
Fig. 48. Distribución en la población de pacientes de la Variable PAI-1.....	152
Fig. 49. Distribución en la población de pacientes de la Variable GLP-1.....	152
Fig. 50. Distribución en la población de pacientes de la Variable GIP.....	153
Fig. 51. Distribución en la población de pacientes de la Variable Resistina.....	153
Fig. 52. Distribución en la población de pacientes de la Variable Visfatina.....	153
Fig. 53. Distribución en la población de pacientes de la Variable Leptina.....	154
Fig. 54. Distribución en la población de pacientes de la Variable Adipsina.....	154
Fig. 55. Distribución de la Variable PAI-1.....	155
Fig. 56. Distribución de la Variable Leptina.....	155
Fig. 57. Distribución de la Variable VCAM-1.....	155
Fig. 58. Distribución de la Variable IL-18.....	156
Fig. 59. Distribución de la Variable ICAM-1.....	156
Fig. 60. Distribución de la Variable GLP-1.....	156
Fig. 61. Distribución de la Variable VEGF.....	157
Fig. 62. Distribución de la Variable MCP-1.....	157
Fig. 63. Distribución de la Variable IL-1B.....	157
Fig. 64. Distribución de la Variable Adipsina.....	158
Fig. 65. Distribución de la Variable Visfatina.....	158
Fig. 66. Distribución de la Variable Resistina.....	158
Fig. 67. Distribución de la Variable Grelina.....	159
Fig. 68. Pacientes que muestran una distribución discordante entre parámetros clínicos y analíticos.....	161
Fig. 69. Distribución de pacientes donde se muestran aquellos pacientes que muestran una relación de citocinas e integrinas bajas con respecto a las proteínas endocrino metabólicas.....	163
Fig. 70. Distribución de pacientes que muestran una citocinas e integrinas elevadas así como unos niveles de las proteínas endocrino-metabólicas bajas.....	163
Fig. 71. Grafica de distribución de Proteínas Proinflamatorias y Endocrino-Metabólicas con respecto al numero de Componentes de Síndrome Metabólico que presentan los pacientes del Grupo 1.....	164
Fig. 72. Grafica de distribución de Proteínas Proinflamatorias y Endocrino-Metabólicas con respecto al numero de Componentes de Síndrome Metabólico que presentan los pacientes del Grupo 2.....	165
Fig. 73. <u>Modelo de</u> relación a establecer entre las variables consideradas. <u>Se pretende buscar</u> la relación entre las combinaciones de variables (variable 1 y variable 2).....	166

Fig. 74. Primera función canónica para los conjuntos de variables en el segundo grupo de pacientes.....168

Fig. 75. Correlaciones estadísticamente significativas de los pacientes con biomarcadores plasmáticos de inflamación altos y de disfunción endocrino metabólicos bajos.....173

Fig. 76. Correlaciones estadísticamente significativas de los pacientes con biomarcadores plasmáticos de inflamación bajos y de disfunción endocrino metabólicos altos.....174

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Principales diferencias entre inflamación clásica y la inflamación sistémica de bajo grado.....13

TABLA 2. Efectos positivos de la disminución de las concentraciones lipídicas en placas ateroscleróticas a nivel de laboratorio.....98

TABLA 3. Biomarcadores y mediadores en la Insuficiencia Cardíaca.....110

TABLA 4. Valores de las diferentes variables en la población.....136

TABLA 5. Resumen numérico de los datos de los pacientes. ~~sd~~SD=desviación típica.....137

TABLA 6. ~~Valores de de~~ correlación ~~de las~~ entre biomarcadores plasmáticos de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica-citocinas e integrinas con las proteínas endocrino metabólicas.....144

TABLA 7. Importancia de cada variable en la variable canónica a la que pertenece.....146

TABLA 8. Correlaciones de cada variable con el otro conjunto de variables.....147

TABLA 9. Coeficientes utilizados para construir los indicadores.....147

TABLA 10. p-valores regresión robusta. En rojo, p-valores menores que el nivel de significación.....149

TABLA 11. Construida para la categorización de la distribución de las concentraciones proteicas de cada paciente.....158

TABLA 12. Representación de los dos grupos de pacientes de la población a estudio en base a su disociación o no clínica-metabólica.....162

TABLA 13. Importancia de cada variable en la variable canónica a la que pertenece.....169

TABLA 14. Correlaciones de cada variable con el otro conjunto de variables.....169

TABLA 15. Correlación de la variables VCAM-1 e ICAM-1 con los principales variables clínicas en el Grupo 2.....171

TABLA 16. Correlación de la variables VCAM-1 e ICAM-1 con los principales variables clínicas en el Grupo 1.....171

Con formato: Fuente: 10 pto, Sin Negrita, Sin subrayado

Con formato: Fuente: 10 pto, Sin Negrita, Sin subrayado

TABLA 17. Pacientes con biomarcadores de inflamación altas y de disfunción endocrino-
metabólica bajos.....172

TABLA 18. Pacientes con biomarcadores de inflamación bajos y de disfunción
endocrino-metabólica altos.....172

Con formato: Fuente: 10 pto, Sin Negrita, Sin subrayado

Con formato: Fuente: 10 pto, Sin Negrita, Sin subrayado

Con formato: Fuente: 10 pto, Sin Negrita, Sin subrayado

Con formato: Fuente: 10 pto, Sin Negrita, Sin subrayado

ABREVIATURAS

Ach:	Acetilcolina
AcPL:	Proteína accesoria
ADMA:	inhibidor de la NOS
ADH:	Hormona antidiurética
Adipo R-1:	Receptor de adiponectina 1
Adipo R-2:	Receptor de adiponectina 2
AGE:	Productos de glicosilación avanzada
AGL:	Ácidos grasos libres;
AgRP:	Proteína r-agouti
AHA:	Asociación americana del corazón
AIM2:	Proteína inducible por Interferón
AKT:	proteína quinasa B
AMP:	Adenosin Monofosfato
AMPK:	proteína quinasa activada por AMP
AP-1:	Proteína activadora-1
ApoE:	Apolipoproteína E
APS:	Proteína adaptadora
ASC:	Proteína pro-apoptótica con dominio pirina PD y un dominio de unión a caspasa CARD
ATF β :	Factor de transcripción
ATI:	Angiotensina I
ATII:	Angiotensina II
ATP:	Adenosin trifosfato
AVP:	Arginina-vasopresina
BCECF-AM:	2', 7'-bis(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester
BCG:	Bacilo Calmette Guérin
BCL2:	Proteína "B-cell lymphoma 2"
BH2:	Dihydrobiopterina
BH4:	Tetrahydrobiopterina
BSO:	l-Butionina-(S,R)-Sulfoximina (BSO).
Cab:	Oncogen "Casitas B-lineage Lymphoma"
CAP:	proteína activadora por catabolitos
CARD:	Caspase activation and recruitment domains
CC-CCR1:	Receptor de quimiocinas con motivo C-C 1
CC-CCL2:	ligando 2 de la <i>quimiocina</i> con motivo C-C (CCL2)
CCL20:	ligando de <i>quimiocinas</i> CC de tipo 20
CCL21:	ligando de <i>quimiocinas</i> CC de tipo 21
CCNE:	Ciclina E1
CCR7, 9, 10:	receptor de quimiocinas C-C tipo 7, 9, 10
CD:	Grupo de diferenciación
Cdc25A:	Proteína fosfatasa "Cell division cycle 25 homolog A"
COX1:	Ciclooxigenasa 1
COX2:	Ciclooxigenasa 2
CQ10;	Coenzima Q10
CSFs:	factores estimulantes de colonias
CSH:	Células sinusoidales hepáticas

CT-1:	Cardiotrofina-1
CV:	Cardiovaacular
CVB3:	Coxsackievirus B3
CX3C:	Fractalcina
CXCL5:	ligando CxC-quimiocina 5
CXCL8:	ligando CxC-quimiocina 8 o IL-8 (Interleuciona 8)
CXCL12:	ligando CxC-quimiocina 12
CXCR1, 2, 5, 7:	Receptor de quimiocinas con motivo C-X-C 1, 2, 5, 7
CX3CR1:	Receptor de Quimiocina CX3C 1
CXCR4:	receptor quimiocina CXC 4
DAG:	Diacilglicerol
DAMPs:	patrones moleculares asociados a daño
DE:	Desviación estándar
DLP:	Dislipemia
DMEM:	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA:	Acido Dexosirribonucleico
DNasa:	Desoxirribonucleasa I
DO:	Densidad óptica
DPP-4:	Dipeptidil peptidasa-4
DTT:	Dithiothreitol
ECA:	Enzima convertidora de angiotensina
ECV:	Enfermedad Cardio-Vascular
EDTA:	Acido etilén-diamino-tetraacético
EII:	Enfermedad inflamatoria intestinal
ELAM:	Molécula de adhesión endotelio-leucocitaria
EPCs:	células progenitoras endoteliales
ERB:	Proto-oncogen erb
ERK:	Quinasas reguladas por señales extracelulares
ESH:	Endotelio Sinusoidal Hepático
ESM:	Error estandar de la media
EMSA:	Electroforesis en geles de retardo (Electrophoretic Mobility Shift Assay)
ESH:	Endotelio sinusoidal hepático
ET-1:	Endotelina 1
FEVI:	Fraccion de Eyeccion de Ventriculo Izquierdo
FFA:	Ácidos grasos libres
FGF 23:	Factor de crecimiento fibroblastico 23
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína
FOXO 1:	Factor de Transcripcion (Forkhead box)
Gab:	Proteina adaptadora
GC-A:	Guanilato ciclasa A
GC-B:	Guanilato ciclasa B
GIP:	Polipéptido inhibidor gástrico
GLP-1:	Peptido similar al glucagón tipo 1
GLUT4:	transportador de glucosa 4 liberado en respuesta a la insulina
GM-CSF:	Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos

GMPC:	Guanosín monofosfato cíclico
GSH:	Glutación reducido
GSH-Px:	Glutathion peroxidasa
H ₂ O ₂ :	Agua oxigenada
HbA _{1c} :	Hemoglobina glicosilada
HBSS:	Solución salina de Hank
HDL:	Colesterol de alta densidad
HEPES:	Acido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperacín-etan-sulfónico
HIF1 α :	Factor inducible por hipoxia 1 α
HMGB1:	Proteína de alta movilidad grupo caja 1
HNE:	4-Hydroxynonenal
HOMA-IR:	Modelo homeostático de evaluación de la resistencia en insulina
HRP:	Peroxidasa de rábano picante
HSP:	Proteínas de choque termico
HSC:	Célula estrellada hepática (Hepatic sinusoidal cell)
hsCRP:	Protein C reactiva de alta sensibilidad
HSF-1:	factor de transcripción de choque térmico 1
Hs-cTn:	Troponina ultrasensible
HTA:	Hipertension
IAM:	Infarto agudo de miocardio
IAPP:	Amilina
IC:	Insuficiencia cardiaca
ICAM-1:	Molécula 1 de adhesión intercelular
ICE:	Enzima de conversión de la IL-1 α
iICE:	Inhibidor del enzima de conversión de la IL-1 α
IDF:	Federacion Internacional contra la diabetes
IFN γ :	Interferón gamma
IGF-1:	Factor de crecimiento insulinico 1
IKK:	Cinasa inhibitoria de κ B
I κ B:	Inhibidor del factor de transcripción NF- κ B
IL-1 α :	interleucina-1 alfa
IL-1 β :	Interleucina-1 beta
IL-1Ra:	Antagonista del receptor de la IL-1
IL-1Rrp:	Proteína relacionada con el receptor de IL-1
IL-1R-AcP:	Proteína accesoria de la IL-1
IL-2:	Interleucina-2
IL-10:	Interleucina-10
IL-12:	Interleucina 12
IL-18:	Interleucina-18
IL-18AcPL:	Proteína accesoria de la IL-18
IL-18BP:	Proteína de unión a la IL-18 (IL-18 binding protein)
IL-18R:	Receptor de IL-18
IL-18R α :	Cadena alfa del receptor de la IL-18
IL-18R β :	Cadena beta del receptor de la IL-18

IL-23:	Interleucina 23
IL-37:	Interleucina 37
IMC:	Índice de masa corporal
IRAK:	Cinasa activadora del receptor de IL-1
IRC:	Insuficiencia renal crónica
IRS-1:	<i>Insulin receptor substrate 1 (IRS-1)</i>
IRS-2:	<i>Insulin receptor substrate 2 (IRS-2)</i>
i.s.:	Intraesplénica
ISGB:	inflamación sistémica de grado bajo
i.v.:	Intravenosa
JAK:	janus quinasas
JNK:	quinasas c-Jun N-terminal
kDa:	Kilodalton
LAL:	Linfocito asociado al hígado
LDL:	Colesterol de baja densidad
Ldlr:	Receptor de LDL
LFA-1:	Antígeno asociado a la función linfocitaria
LRR:	dominio rico en leucinas
LPS:	Lipopolisacárido
LXR:	Receptor X hepático
Mad-CAM-1:	Molécula de adhesión celular dirigida mucosal
MAPK:	Proteína cinasa activada por mitógeno
MB16:	Melanoma B16
MC:	Medio condicionado
MCP-1:	Proteína quimiotrayente de monocitos 1
M-CSF:	Factor estimulante de crecimiento de colonias de macrófagos
MC-ESH:	Medio condicionado de Endotelio Sinusoidal Hepático
MC-MB16:	Medio condicionado de Melanoma B16
MCP-1:	Proteína quimiotáctica del monocito
MDA:	Productos de peroxidación lipídica inducidos por ROS
MDSC:	<i>células supresoras de origen mieloide</i>
MGSA:	Proteína con actividad estimulante del crecimiento del melanocito
MHO:	Obesos metabólicamente sanos
miR:	MicroRNA
MMPs:	Metaloproteasas de la matriz extracelular
MR:	Medula renal
MUO:	Obesos metabólicamente enfermos
MYC:	Protooncogen MYC
MyD88:	Adaptador molecular intracelular 88
NAC:	N-acetil-cisteína
NADPH:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NHANES:	Encuesta nacional de salud y nutrición
NHLBI:	Instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre
NIK:	Cinasa inductora de NFκB

NF	□□ BFactor nuclear kappaB
NK:	Célula asesina natural (natural killer)
NLRC4:	Proteína 4 conteniendo "NLR family CARD domain"
NLRP3:	Inflamasoma NLPR3
NLR:	receptores tipo NOD
NLS:	"nuclear locating sequence"
NOs:	Oxido Nitrico sintasa
NOX:	NADPH oxidasa
NPR-C:	Receptor de peptido natriurético tipo C
NPY:	Neuropeptido Y
NRF-2:	Factor de Transcripcion
NT-proBNP:	N-terminal prohormona del péptico natriurético cerebral
NYHA:	New York Heart Association (escala insuficiencia cardiaca)
oxLDL:	lipoproteínas de baja densidad oxidadas
ONOO-:	Peroxinitrito
P2X7:	receptores de purinas
P27KIP1:	protein-quinasa dependiente de ciclina relacionada con la inhibición del ciclo celular
P38:	Protein quinasas activadas por mitogenos
P66Shc:	Proteína adaptadora
P57KIP2:	protein-quinasa dependiente de ciclina relacionada con la inhibición del ciclo celular
PAMPs:	patrones moleculares asociados a patógeno
PAI:	Inhibidor del activador del plasminógeno-1)
PAMPs:	patrones moleculares conservados para todos los patógenos
PARP:	Poli ADP ribosa polimerasa
PBS:	Solución salina de tampón fosfato
PBMCs:	Células mononucleares de sangre periférica
PFA:	Paraformaldehído
PGC1alpha:	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PI3K:	Fosfoinositol 3-quinasa
PCR:	Proteína C reactiva
PGI2:	Prostaciclina
PGIS:	Sintasa de PGI2
PIK:	Fosfoinositol Quinasa
PKC:	Protein quinasa C
PMSF:	Fenilmetilsulfonilfluorato
PNA:	Peptido natriuretico atrial
PNB:	Peptido natriurético tipo B
PNC:	Peptido natriurético tipo C
POMC:	Proopiomelanocortina
PPAR:	Receptor activador por la proliferación del peroxisoma
ProIL-18:	Forma precursora de la IL-18
PTEN:	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PTH:	Paratohormona
Pro-TNF-alfa:	Forma precursora del TNF-alfa
PRRs:	Receptores de reconocimiento de patrones
PYD:	Dominio Piridin

p/v:	Peso/volumen
RAF:	Cinasa de serina/treonina
RANGE:	Receptores de glicosilación avanzada
RANK:	receptor de activación de NF- κ B
RAS:	Proteína monomérica, una pequeña GTPasa, con actividad reguladora GTP-hidrolasa
RBP:	Proteína de unión al retinol
RET:	protooncogen Receptor Tirosin Kinasa
RNA:	Acido Ribonucleico
RNAm:	Acido Ribonucleico mensajero
ROI:	Radicales libres derivados del oxígeno
ROS:	Especies reactivas del Oxígeno
RT-PCR:	Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa
S100A8:	Proteína de unión al calcio 8
S100A9:	Proteína de unión al calcio 9
S100A12:	Calgranulina C
SAOS:	Síndrome de apnea obstructiva del sueño
SBF:	Suero bovino fetal
SDS:	Dodecil sulfato sódico
Shc:	Proteína adaptadora
SIRT1:	Sirtuina 1,
SM:	Síndrome metabólico
SMA:	alfa-actina de músculo liso
SNA:	Sistema Nervioso autónomo
SNC:	Sistema Nerviosos central
SOCS-3:	Supresor de la señalización de citocinas 3
SOS:	Superoxido dismutasa
Spred-1:	Proteína 1 conteniendo "Sprouty-related, EVH1 domain"
SRAA:	Sistema renina angiotensina aldosterona
ST2:	Miembro de la familia del receptor IL-1
STAT:	Transductor de la señal y activador de la transcripción
T/A:	Tensión arterial
TACE:	Enzima de conversión del tumor de necrosis tumoral
TAM:	Macrófagos asociados a tumor
TBS:	Solución salina tamponada con Tris-HCl
TF:	Factor tisular
TG:	Triglicéridos
TGF β :	Factor de Crecimiento Tumoral β
Th1:	Células colaboradoras tipo 1
Th2:	Células colaboradoras tipo 2
TIE2:	Receptor de las <i>células</i> endoteliales
TIR:	Toll/IL-1 Receptor
TLR4	Receptor tipo Toll 4
TNFBP:	Proteína de unión al factor de necrosis tumoral (TNF binding protein)

TNF- α :	Factor de necrosis tumoral -alfa
TNFR 1:	Receptor del TNF de tipo uno
t-PA:	Activador tisular del plasminógeno
TRAF-6:	Factor 6 asociado al receptor deTNF
Tris-HCl:	Tris (hidroximetil) aminometano tamponado con ácido clorhídrico
TXA2:	Tromboxano A2
TXN:	Peptidos similares a Thioredoxina
TXNPI:	Proteína que ineracciona con thioredoxina
UA:	Unidades arbitrarias
VCAM-1:	Molécula de adhesión celular vascular
VEGF:	Factor de crecimiento endotelial vascular
VLA-4:	Antígeno de aparición tardía
VLDL:	Colesterol de muy baja densidad
VHL:	Proteína Von Hippel Lindau
VI:	Ventrículo izquierdo
vWF:	Factor de von Willebrand.
8-epi-PGF2alpha :	8-Epi-prostaglandin F2 alpha

I. RESUMEN

El síndrome metabólico (SM) (Reaven y Cols. 1988), hace referencia al padecimiento de una serie de factores de riesgo para desarrollar arteriosclerosis, enfermedad cardiovascular (ECV) y diabetes. Se trata de una entidad con alta prevalencia (hasta 17-25% en la población española; y hasta el 40% en EEUU) a la que se asocia elevada morbi-mortalidad cardiovascular, por lo que constituye en la actualidad un problema clínico y de salud pública de primer orden (Ford y Cols. 2002; Cordero y Cols. 2005). Los principales factores que conforman el SM son la obesidad, la dislipemia aterogénica, la glucemia basal alterada y la elevación de la presión arterial. Pero existe controversia sobre si el SM es un síndrome real o una manera de agrupar diferentes fenotipos sin relación entre ellos. Tampoco se ha evidenciado claramente que la presencia de SM en un paciente le confiera riesgo cardiovascular (RCV) adicional a la suma de sus componentes individuales.

Existen bastantes definiciones operativas de SM, basadas en criterios diagnósticos, pero los criterios diagnósticos del National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (ATPIII) de 2001 (NCEP 2001), revisados en 2005 y confirmados por un documento de consenso de 2009 (Alberti y Cols. 2009)(ver anexo 1), son los más utilizados en la práctica clínica debido a su sencillez y practicidad y al hecho de que no precisan la demostración de resistencia insulínica (ya que esto resulta complejo en la práctica clínica).

La característica más significativa del SM es la obesidad abdominal, mientras que desde el punto de vista etiopatogénico y fisiopatológico, la Resistencia insulínica (RI) es el hecho principal.

Aunque la patogénesis del SM no está clara, se piensa que el sustrato patogénico fundamental del SM es la resistencia a la insulina (RI), que se ha encontrada asociada con DM tipo 2, obesidad, dislipemia aterogénica, hipertensión arterial (HTA) y enfermedad cardiovascular. La RI es aún más prevalente que el SM y sería, por tanto, la clave patogénica del SM y el nexo común entre las demás alteraciones que participan en la definición del SM (Laclaustra y Cols. 2007). La RI origina hiperinsulinismo y éste somete a los tejidos a una inadecuada acción lipogénica, favoreciendo la aparición de obesidad

abdominal, dislipemiaaterogénica, anomalías del metabolismo glucémico e HTA. La RI se relaciona con arteriosclerosis mediante la puesta en marcha de procesos inflamatorios, alteraciones en la agregación plaquetaria y disfunción endotelial. Así, el SM se ha reconocido como un estado pro-inflamatorio y protombótico, con elevación de los niveles de proteína C reactiva (PCR), interleukina- 6 (IL-6) y del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1). Esta elevación de marcadores inflamatorios y adipocinas se asocia con riesgo aumentado de DM-2 y ECV. Pero estos hechos solo explican parcialmente la asociación entre SM y ECV. Hay algo más. La suma de FRCV y la disfunción inflamatoria y endotelial no lo explican todo. Si bien "in vivo" el patrón oro es la pinza euglucémica-hiperinsulinémica, en la práctica clínica actual la RI no está claramente definida y se acepta que hay RI si se documenta elevación de la insulina plasmática en ayunas y/o del índice HOMA (HOMeostasisModelAssesment)(> 3.8), el modelo más extendido de los que relacionan glucemia e hiperinsulinemia en ayunas (Matthews y Cols. 1985; Rabasa y Cols. 2003). Sin embargo, con estas sencillas herramientas clínicas no siempre se consigue documentar RI en pacientes que reúnen criterios de SM.

Parece que la obesidad abdominal es el fenómeno inicial, que por distintas vías origina alteraciones en la sensibilidad a la insulina. Es evidente que tanto la obesidad como el sedentarismo están detrás de la alta prevalencia del SM en la sociedad actual. Es clara la relación entre obesidad y RI y que ambas situaciones aumentan el riesgo de mortalidad cardiovascular (Katzmarzyk y Cols. 2006)). Por tanto, el conjunto de alteraciones metabólicas y cardiovasculares que conforman el SM están relacionadas con la obesidad abdominal y la resistencia a la insulina (RI). La secuencia patogénica más aceptada sería la siguiente: la obesidad origina crecimiento del tejido adiposo y el crecimiento de este tejido adiposo, que es fuente de numerosas citocinas (TNF, IL-1, IL-6, proteína quimiotáctica de monocitos) y adipocininas (leptina, adiponectina, resistina), conlleva una intensa captación de monocitos circulantes que en la grasa se transforman en macrófagos (ricos en citocinas pro-inflamatorias) y desarrollan un estado inflamatorio crónico y resistencia insulínica. Así el tejido adiposo (muy incrementado en la obesidad) juega un papel nuclear en la activación crónica de la inflamación y el desarrollo de alteraciones en la sensibilidad a la insulina. Estas 2 condiciones presentes en el SM constituyen la base patogénica para el desarrollo de arteriosclerosis

Los criterios actuales de SM son imprecisos y designan bajo el mismo síndrome a un grupo muy heterogéneo de sujetos con grandes diferencias fisiopatológicas y pronósticas. El núcleo fisiopatológico fundamental del SM es la obesidad abdominal y el estado pro-inflamatorio creado por los efectos de la disfunción adipocitaria sobre el sistema monocito/macrófago del paciente.

Partiendo de estos supuesto, el presente proyecto pretende reclasificar pacientes con SM, a través de la determinación de citocinas inflamatorias y adipocinas procedentes de monocitos y tejido adiposo con el fin de identificar nuevos parámetros cuya correlación con el daño cardio-vascular (clínico/subclínico) de los mismos pacientes indique su posible utilidad como biomarcadores de interés terapéutico en esta enfermedad.

Para estudiar la asociación de estos parámetros con la fisiopatología del SM, se confeccionó una base de datos con inclusión de datos clínicos de evaluación de daño orgánico mediante procedimientos no invasivos para el estudio de la función cardiovascular, pulmonar, hepático...

De esta forma nuestros resultados demuestran que Los niveles plasmáticos de los principales grado de relación del Síndrome Metabólico con los biomarcadores de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica permite es compleja, observándose varias distinguir por vez primera subpoblaciones de pacientes con Síndrome Metabólico de distinto perfil fisiopatológico y de lesión orgánica, que sugieren mecanismos patogénicos diferentes para la misma enfermedad, con independencia de su estadio de evolución.

Entre los sugrupos encontrados hay un en sus relaciSubtipogrupo I1, mostrando disociación clínica analítica y por tanto con una nula ausencia de correlación significativa entre sus parámetros clínicos y sus los niveles de plasmáticos de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica, bien sea con (bien presenten biomarcadores plasmáticos de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica -altoselevados pero con apenas cambios clínicos o al revés con apenas cambios en sus biomarcadores plasmáticos de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica bajos conpero notables alteraciones parámetros clínicos en cuanto a sus niveles de resistencia a la insulina y de lesión orgánicanula o mínima o. El y los parámetros clínicSubtipo grupo II2, mostraría unacon una buena correlación clínico-analítica y por tanto

Con formato: Texto independiente, Sangría: Izquierda: 0 cm, Primera línea: 1,25 cm

una relación significativa entre parámetros clínicos y biomarcadores plasmáticos de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica.

Igualmente se objetivo entre el conjunto de la población que la relación ~~entre biomarcadores plasmáticos de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica~~ no siempre era lineal de esta manera se pudo también dividir el conjunto del grupo a estudio en tres grupos, el primero donde los niveles de ambas proteínas eran similares, este era el grupo mayoritario y otros dos subgrupos donde biomarcadores plasmáticos de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica se muestran discordantes entre ellos. ~~important~~ Al estudiar las correlaciones clínico-analíticas directas e inversas en estos dos últimos subtipos se evidenció que en el grupo con biomarcadores plasmáticos de inflamación elevados y de disfunción endocrino-metabólica bajos hubo casi la mitad de correlaciones estadísticamente significativas entre biomarcadores moleculares y signos clínicos de Síndrome Metabólico que en el subgrupo con biomarcadores plasmáticos de inflamación bajos y de disfunción endocrino-metabólica altos, sugiriendo que en este segundo grupo podrían haber concurrido patologías inflamatorias agudas no detectadas en este estudio.

Con formato: Sangría: Izquierda: 0 cm, Primera línea: 1,25 cm

Esta subclasificación de pacientes con Síndrome Metabólico ~~sugiere~~ la existencia de el estudio de correlaciones clínicos analíticos de ambos mecanismos patogénicos diferentes en el proceso por el que las alteraciones moleculares inflamatorias y endocrinas intervienen en la disfunción una diferente participación del metabolismo glucídico, que conduce a la resistencia a la insulina, y a la progresiva aparición de lesiones orgánicas del sistema cardiovascular. en ambas subpoblaciones, ya que los pacientes con una gran presencia de componentes de Síndrome Metabólico muestran una gran relación de las variables proteicas con los parámetros clínicos relativos al metabolismo glucídico a diferencia de los pacientes con elevados con clínica mínima.

Con formato: Sangría: Izquierda: 0 cm, Primera línea: 1,25 cm

Por último, el presente estudio confirma estudios anteriores sobre la importancia ~~de la~~ inflamación en la patogenia del Síndrome Metabólico y demuestra que los biomarcadores plasmáticos de inflamación más relacionados con los signos clínicos de Síndrome Metabólico fueron las molecular solubles de adhesión vascular ICAM-1 y VCAM-1, sugiriendo que la disfunción endotelial producida durante el desarrollo del Síndrome Metabólico pudo ser

Con formato: Sangría: Izquierda: 0 cm, Primera línea: 0 cm

Con formato: Sangría: Izquierda: 0 cm, Primera línea: 1,25 cm

determinante en la evolución de la enfermedad, y que la inhibición de tales moléculas podría representar una nueva vía de abordaje terapéutico para los pacientes con síndrome metabólico.

I. INTRODUCCION

A-ANTECEDENTES HISTORICOS PARA EL ESTUDIO DE LOS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR.

1. Preludio Epidemiológico

Durante las décadas de los años 1930 a 1950 las enfermedades infecciosas quedaron bajo control. Los principales objetivos de la salud pública antes de la Segunda Guerra Mundial fueron dirigidas al control de estas enfermedades, ya que eran las principales causas de morbilidad y mortalidad dentro de la sociedad. Los esfuerzos realizados en este sentido produjeron grandes resultados. De este modo la mejora del saneamiento disminuyó considerablemente las enfermedades diarreicas. También se produjeron grandes avances en el control de la tuberculosis y la neumonía neumocócica y un salto cualitativo se produjo con la introducción de la penicilina en 1942.

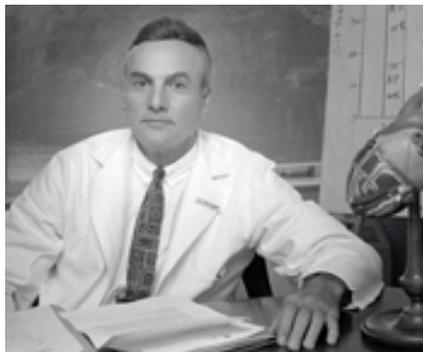
El azote de las enfermedades infecciosas fue reemplazado en los años 1940 y 1950 por una epidemia en progresivo avance, la de la enfermedad cardiovascular (ECV). Con la Segunda Guerra Mundial el avance de la ECV se hizo cada vez más evidente. En 1950 uno de cada tres hombres en los Estados Unidos desarrollaron ECV antes de alcanzar los sesenta años. Su prevalencia era superior a la patología tumoral. Se había convertido en la principal causa de muerte y la razón por la que la esperanza de vida no aumentaba a pesar de los avances médicos en el campo de la patología infecciosa. Además de que los tratamientos en la patología cardiovascular no estaban desarrollados como para lograr prolongar la supervivencia aunque hubieras superado un síndrome coronario o cerebrovascular agudo. Además por aquellas fechas se desconocían los factores determinantes de la ECV, así como tampoco los métodos para controlar dicha epidemia.

2. La necesidad de actuación

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte y enfermedad grave en el mundo Occidental. Ante esta situación, había que realizar acciones que nos condujeran a vislumbrar una solución a dicha situación, hacer una búsqueda de métodos para tratar y revertir dicho proceso. Los clínicos y básicos de la época no lograban

encontrar una solución para atajar el problema por lo que salieron voces que afirmaban que había que trabajar desde un punto de vista epidemiológico aumentaban (Dawber, 1980). Se consideraba a la patología cardiovascular como un proceso degenerativo, por lo que era imposible ponerle freno y evitarlo. Sin embargo si que valoraban la posibilidad de que dicho proceso podría retrasarse y ahí podría entrar en juego el campo de la preventiva que obtuvieran una confirmación de las hipótesis propuestas, con unas conclusiones que fueran aplicables a la población general por médicos y otros trabajadores en el campo de la salud pública. Para ello habría que identificar las características de la persona y el entorno que llevarían a la aparición temprana de la enfermedad, y fijarse en particular en aquellos que fueran prevenibles o modificables,

En 1948, el Framingham Heart Study - bajo la dirección del Instituto Nacional del Corazón (ahora conocido como el Instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre o NHLBI) - se embarcó en un ambicioso proyecto de investigación. En ese momento, poco se sabía acerca de la etiología de las enfermedades cardíacas y cerebrovasculares, pero las tasas de mortalidad por dichas patologías habían ido aumentando constantemente desde el comienzo del siglo XX y se habían convertido en una epidemia. El Framingham Heart Study se convirtió en un proyecto conjunto del Instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre y la Universidad de Boston.



Thomas Dawber, MD

El objetivo del estudio de Framingham fue identificar los factores o características comunes que contribuyen a las enfermedades cardiovasculares, siguiendo su desarrollo durante un largo período de tiempo en un gran grupo de participantes que aún no habían desarrollado síntomas evidentes de enfermedad cardiovascular o sufrido un ataque cardíaco o accidente cerebrovascular. Objetivos del estudio

El estudio, desarrollado tenía un objetivo principal y dos objetivos subsidiarios (Dawber y Moore, 1952):

- En primer lugar, para asegurar los datos epidemiológicos sobre arteriosclerótica y ECV hipertensiva.
- En segundo lugar, para asegurar los datos sobre la prevalencia de todas las formas de enfermedad cardiovascular en una muestra representativa de la población.
- En tercer lugar, para probar la eficacia de diversos procedimientos de diagnóstico.
- El primer objetivo era importante. Los otros dos fueron vistos como por productos.

3. Planteamiento de la hipótesis de estudio

Se asumió desde el principio que en el desarrollo de la ECV no había una sola causa. Si no que era el resultado de múltiples causas que trabajaban lentamente en el individuo para producir la enfermedad. Los factores que potencialmente podían estar relacionados con las enfermedades cardiovasculares se enumeraron en términos de hipótesis. Estos fueron generados por los investigadores de Framingham en reunión con un comité consultivo compuesto por especialistas que representaban a varias ramas de las ciencias médicas. La historia clínica y el examen físico que se obtuvieron de los sujetos del estudio generaron datos para probar estas hipótesis. Las principales hipótesis generadas fueron las siguientes (Dawber, 1980):

1. ECV aumentaba con la edad. Se producía antes y con más frecuencia en los varones.
2. Las personas con hipertensión desarrollaron ECV a un ritmo mayor que los que no son hiper-intensivo.
3. El nivel de colesterol en la sangre elevada se asociaba con un mayor riesgo de ECV.
4. El consumo de tabaco se asociaba con una mayor incidencia de las enfermedades cardiovasculares.
5. El uso habitual de alcohol se asociaba con una mayor incidencia de las enfermedades cardiovasculares.
6. El aumento de la actividad física se asociaba con una disminución en el desarrollo de ECV.
7. Un aumento en la función tiroidea se asociaba con una disminución en el desarrollo de ECV.

8. Una hemoglobina arterial alta o el nivel de hematocrito se asociaban con una mayor tasa de desarrollo de enfermedades cardiovasculares.
9. Un aumento en el peso corporal predisponía a ECV.
10. Había un aumento de la frecuencia del desarrollo de las enfermedades cardiovasculares en personas con diabetes mellitus.
11. Había mayor incidencia de las enfermedades cardiovasculares en las personas con gota.

4. Diseño de la investigación

¿Por Framingham?. De hecho en 1948 Framingham era una población básicamente blanca de clase media. Sin embargo, como afirmaron los primeros investigadores "que era un lugar donde se podía llevar a cabo un estudio de este tipo, sin mostrar rasgos discordantes en los aspectos que parecían relevantes en el estudio" (Dawber y Moore, 1952)

Framingham, sí tenía ciertas características que lo hicieron muy adecuado para un estudio epidemiológico a largo plazo. Éstos se enumeran en Feinlieb (1983):

1. La ciudad era de un tamaño adecuado para proporcionar suficientes individuos para el estudio.
2. Era una población poco dispersa en cuanto a extensión
3. Contenía una serie de subgrupos socioeconómicos y étnicos para proporcionar grupos contrastantes para el análisis.
4. La población era relativamente estable para permitir un seguimiento adecuado por mucho tiempo. Esto se debió en parte a una economía estable apoyado por una diversidad de oportunidades de empleo.
5. La ciudad estaba situada cerca de un centro médico que podría proporcionar consultas y la oportunidad para el desarrollo educativo de los empleados.
6. Los médicos y otros profesionales de la medicina en la ciudad fueron de gran apoyo del estudio y cooperaron plenamente con sus objetivos.
7. Framingham contenía 2 hospitales generales al comienzo del estudio. Sin embargo, uno cerrado poco después de que el estudio comenzó, de manera que una porción importante de la atención médica era provista por un solo hospital.

8. Framingham, como la mayoría de las ciudades en Massachusetts, mantiene una lista anual de sus residentes.
9. El personal del departamento de salud ayudó a proporcionar la información necesaria
10. Framingham ya había participado en un estudio sobre la tuberculosis casi 30 años antes por lo que se creía que estar todavía presente en 1948 este espíritu de cooperación.

Los investigadores reclutaron a 5.209 hombres y mujeres entre las edades de 30 y 62 de la ciudad de Framingham, Massachusetts, comenzando la primera ronda de extensos exámenes físicos y entrevistas sobre estilo de vida que serían posteriormente analizadas con patrones comunes relacionados con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Desde 1948, cada dos años se realizó seguimiento de los pacientes incluyendo actualización de la historia clínica, examen físico y pruebas de laboratorio, en 1971, se reclutó a la segunda generación - 5124 hijos adultos de los participantes originales y sus cónyuges - para participar en exámenes similares. En abril de 2002 el estudio entró en una nueva fase, la inscripción de una tercera generación de los participantes, los nietos de la cohorte original.

5. Identificación de los principales factores de riesgo de ECV

A través del trabajo del Dr. Thomas Royle (Roy) Dawber como Director del Estudio (1949-1966), que a diferencia de muchos otros epidemiólogos, estaba interesado principalmente en proporcionar información útil para la prevención de patología a nivel comunitario. Consideraba la epidemiología como la investigación clínica a nivel comunitario. Bajo su dirección, los investigadores de Framingham Study obtuvieron información muy útil sobre la prevalencia, incidencia, manifestaciones clínicas y factores de riesgo predisponentes modificables implicados en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular.

Esto dio las claves a los investigadores de Framingham para corregir muchos importantes malentendidos que los médicos de aquel entonces tenían acerca de enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo predisponentes. Por lo tanto, los informes científicos elaborados pusieron en alerta sobre las consecuencias nefastas de la hipertrofia ventricular izquierda, pequeñas cantidades de albúmina en la orina, hipertensión sistólica, la rigidez arterial, la obesidad, el colesterol alto... Estos y otros hallazgos

tempranos hicieron del estudio Framingham una de las referencias más citadas en la literatura médica. Estos hallazgos también le hicieron el prototipo para otros estudios epidemiológicos y establecer la utilidad del concepto de factor de riesgo para obtener una valiosa información sobre el desarrollo y la prevención de enfermedades crónicas.

Con los años, un control cuidadoso de la población de Framingham Study ha llevado a la identificación de los principales factores de riesgo de ECV - presión arterial alta, colesterol alto, tabaquismo, la obesidad, la diabetes y la inactividad física -, así como una gran cantidad de información valiosa sobre los efectos de los factores relacionados, como los triglicéridos en la sangre y los niveles de colesterol HDL, la edad, el género y las cuestiones psicosociales. Aunque la cohorte de Framingham es principalmente de raza caucásica, la importancia de los principales factores de riesgo de ECV identificados en este grupo se han correlacionado con otros estudios en otros grupos raciales y étnicos lo que ha permitido una aplicación casi universal de los resultados, aunque si es cierto que los patrones de distribución pueden variar de un grupo a otro. En el último medio siglo, el Estudio ha producido aproximadamente 1.200 artículos en las principales revistas médicas. El concepto de factores de riesgo de ECV se ha convertido en una parte integral del plan de estudios de la medicina moderna y ha llevado al desarrollo de un tratamiento eficaz y estrategias preventivas en la práctica clínica.

B. DATOS EPIDEMIOLOGICOS DE LOS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR EN ESPAÑA 2001-2011/2012.

Las enfermedades crónicas son enfermedades de larga duración que se desarrollan lentamente con el paso del tiempo. En los países ricos constituyen las principales causas de muerte y de incapacidad. Se trata de un grupo heterogéneo de enfermedades que incluye, entre otras, el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, las enfermedades respiratorias crónicas y la diabetes. En España, un 60% de las defunciones están causadas por el cáncer, las enfermedades del corazón, las enfermedades cerebrovasculares, las enfermedades crónicas de las vías respiratorias inferiores y la DMII. La adopción de conductas de riesgo saludables, como la reducción o eliminación del tabaquismo, el consumo moderado de alcohol, la práctica de actividad física o una dieta adecuada, pueden reducir la morbilidad y la mortalidad prematura por las enfermedades crónicas. Esa es la razón por la que, en muchos países, las prioridades en el ámbito de las enfermedades crónicas se centran en la

eliminación del tabaquismo, el aumento de la proporción de población físicamente activa, la adopción de dietas que contengan menos cantidad de grasas y más cantidad de frutas y verduras y la disminución de la proporción de población que consume alcohol en cantidades de riesgo para la salud. En la mayor parte de los países es posible monitorizar estos factores de riesgo en la población, a partir de la información que proporcionan las encuestas nacionales de salud. Los cuestionarios de esas encuestas suelen incluir preguntas que permiten estimar la frecuencia de todos o de la mayoría de esos factores de riesgo. Para ello se ha utilizado la información de las encuestas nacionales de salud realizadas entre 2001 y 2011/12. Concretamente se han analizado los datos obtenidos de los entrevistados de 16 años de edad y mayores. Se ha considerado fumador a aquellos entrevistados que declaran consumir tabaco diariamente o de manera ocasional. Un individuo se ha considerado con inactividad física cuando declara no realizar ejercicio físico alguno en su tiempo libre y dedicarlo a actividades sedentarias como leer, ir al cine, ver la televisión, etc. La obesidad se ha definido como un índice de masa corporal igual o superior a 30 kg/m, y se han tenido en cuenta los individuos de 18 años de edad y mayores. Se ha considerado consumo insuficiente de FV cuando es un consumo con una frecuencia menor que diaria. Se ha definido consumo de alcohol en cantidad de riesgo para la salud cuando el consumo medio es superior de 40 gramos en hombres y a 30 gramos en mujeres.

Los resultados muestran un importante descenso en el porcentaje de población fumadora a lo largo de esa década –excepto en mujeres de 45 a 64 años- y un descenso en el porcentaje de población que fuma 20 y más cigarrillos –excepto en mujeres de 45 a 64 años-. El porcentaje de población con inactividad física ha disminuido desde 2001 a 2011/12, si bien, ese último año, más de un 40% de la población adulta se declaró inactiva. La frecuencia de obesidad aumentó en la población adulta española entre 2001 y 2011/12, excepto en las mujeres de 45 a 64 años, en las que se redujo un 2,6%. El consumo insuficiente de FV aumentó entre 2001 y 2011/12 en los sujetos de 16 a 24 años de edad, mientras que en el resto de grupos, la tendencia fue descendente. Finalmente, se ha encontrado una importante disminución en el porcentaje de bebedores de riesgo para la salud.

1. Principales Hallazgos

- El porcentaje de fumadores en España era 34,5% en 2001 y 27,1% en 2011/12. El porcentaje de mujeres fumadoras se redujo de 27,3% en 2001 a 22,9% en 2011/12, mientras que en

hombres el porcentaje de fumadores se redujo de 42,2% a 31,6%, respectivamente. Esa tendencia descendente se observó a lo largo de toda la década, excepto entre 2006 y 2009: en uno y otro año el porcentaje de población fumadora fue similar.

- En hombres, la tendencia descendente en el porcentaje de fumadores se observó en todos los grupos de edad. En mujeres, esa tendencia descendente se observó en aquellas con una edad inferior a los 45 años, ya que en las mujeres de 45 a 64 años la tendencia en el porcentaje de fumadores fue ascendente. En las mujeres de 65 años de edad y mayores, el porcentaje de fumadores fue de escasa magnitud y mostró una tendencia estable.

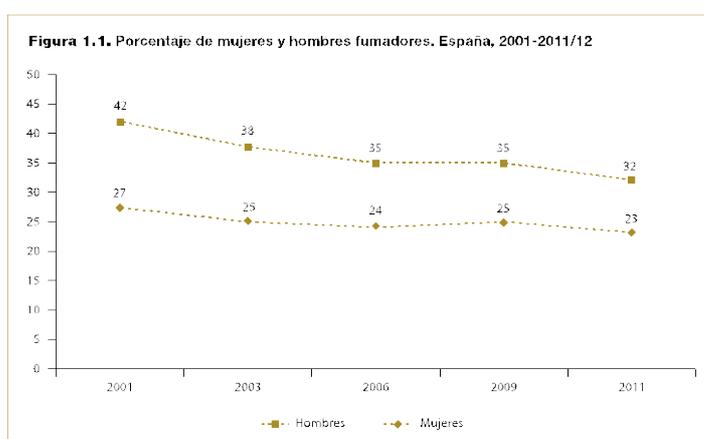


Figura 1: Tendencia de los principales factores de riesgo de enfermedades crónicas. España 2001-2011/2012. Información y estadísticas sanitarias 2014. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

- En hombres, la tendencia descendente en el porcentaje de fumadores se observó en todos los grupos de edad. En mujeres, esa tendencia descendente se observó en aquellas con una edad inferior a los 45 años, ya que en las mujeres de 45 a 64 años la tendencia en el porcentaje de fumadores fue ascendente. En las mujeres de 65 años de edad y mayores, el porcentaje de fumadores fue de escasa magnitud y mostró una tendencia estable.
- El porcentaje de grandes fumadores (20 o más cigarrillos al día) experimentó un descenso paulatino entre 2001 y 2011/12: de 11,0% a 8,3%. Sin embargo, entre 2009 y 2011/12 se observó un pequeño incremento en mujeres de 25 a 64 años.

- El porcentaje de hombres fumadores presenta un gradiente inverso con el nivel de estudios: aquellos con menor nivel de estudios muestran el porcentaje de fumadores más alto. En mujeres, ese patrón es diferente dependiendo de la edad: en las mujeres menores de 45 años, el porcentaje de fumadoras más bajo se observó en aquellas con estudios altos, mientras que en las mayores de 45 años el porcentaje de fumadoras más bajo se observó en aquellas con estudios bajos.
- En 2011/12, más del 40% de la población adulta española (39,0% en hombres y 49,9% en mujeres) se declaró inactiva en su tiempo libre.
- La frecuencia de inactividad física fue mayor en las mujeres que en los hombres, siendo esas diferencias de mayor magnitud en los grupos de edad más joven (16 a 24) y más avanzado (65 y más años).
- La prevalencia de inactividad física en el tiempo libre en 2011/12 fue de alrededor de un 60% mayor en los individuos con menor nivel de estudios que en aquellos con otros con el nivel de estudios más elevado. Esa diferencia en 2001 era de alrededor del 70%. Este gradiente se observó tanto en hombres como en mujeres, si bien las diferencias en la prevalencia entre el grupo con mayor y con menor nivel de estudios fue ligeramente superior en hombres.
- En 2011/12, la diferencia absoluta entre las comunidades autónomas con mayor - Cantabria y Murcia- y con menor prevalencia de inactividad física -Navarra, Rioja, o Asturias- fue de más del 31%. Este amplio rango observado entre las comunidades autónomas ha venido aumentando desde el año 2001, cuando era de alrededor del 22%.

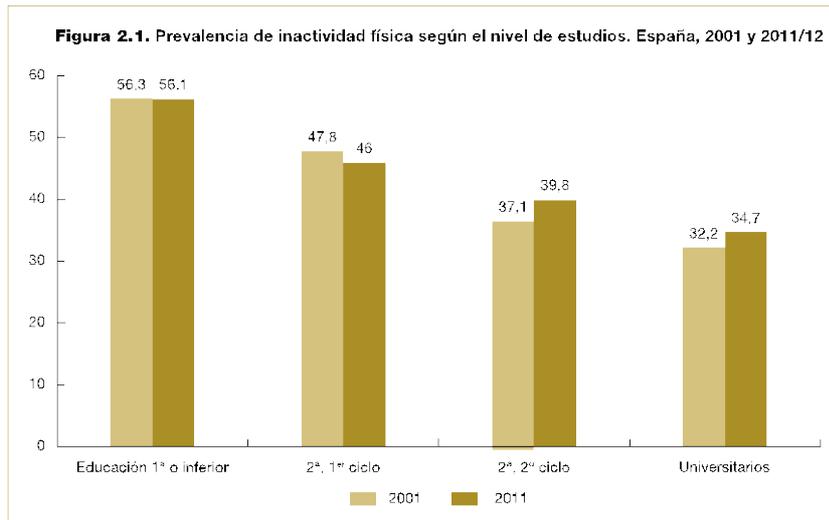


Figura 2: Tendencia de los principales factores de riesgo de enfermedades crónicas. España 2001-2011/2012. Información y estadísticas sanitarias 2014. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

- La frecuencia de la obesidad en la población adulta española aumentó en términos absolutos en un 3,8% (2% en mujeres y 5,7% en hombres) desde 2001 a 2011/12. Esta tendencia ascendente se observó de forma continuada durante toda la década, excepto en las mujeres, entre las que se observó un ligero descenso entre 2006 y 2009.

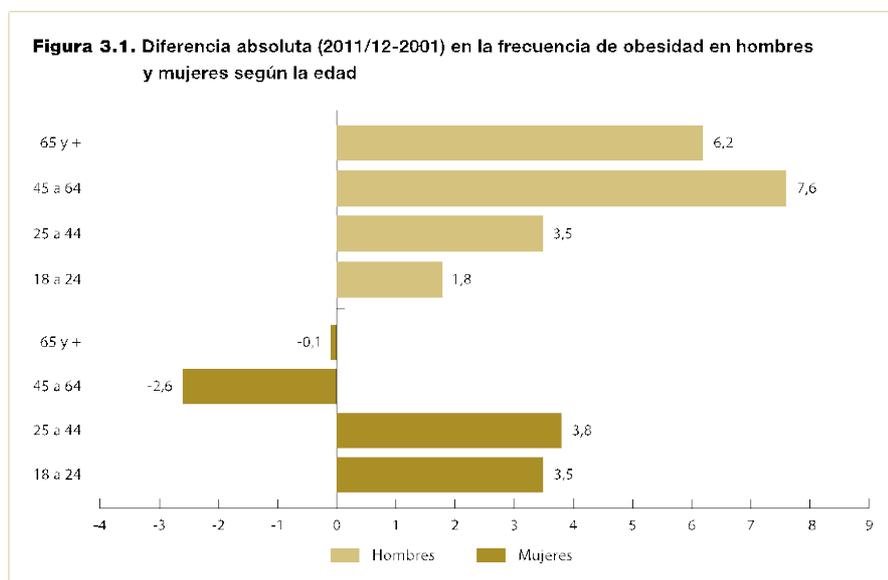


Figura 3: Tendencia de los principales factores de riesgo de enfermedades crónicas. España 2001-2011/2012. Información y estadísticas sanitarias 2014. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

- La tendencia creciente que experimentó la prevalencia de obesidad entre 2001 y 2011/12 se observó en todos los grupos de edad y sexo estudiados, excepto en las mujeres de 45 a 64 años, en las que la prevalencia de obesidad se redujo un 2,6% en la década estudiada.
- Los individuos con un menor nivel de estudios muestran una mayor prevalencia de obesidad. Este gradiente inverso se observó tanto en uno como en otro sexo, pero mientras que la prevalencia de obesidad en las mujeres con estudios primarios o inferiores fue 4 veces superior a la de aquellas con estudios universitarios, en los hombres fue aproximadamente 2 veces superior.

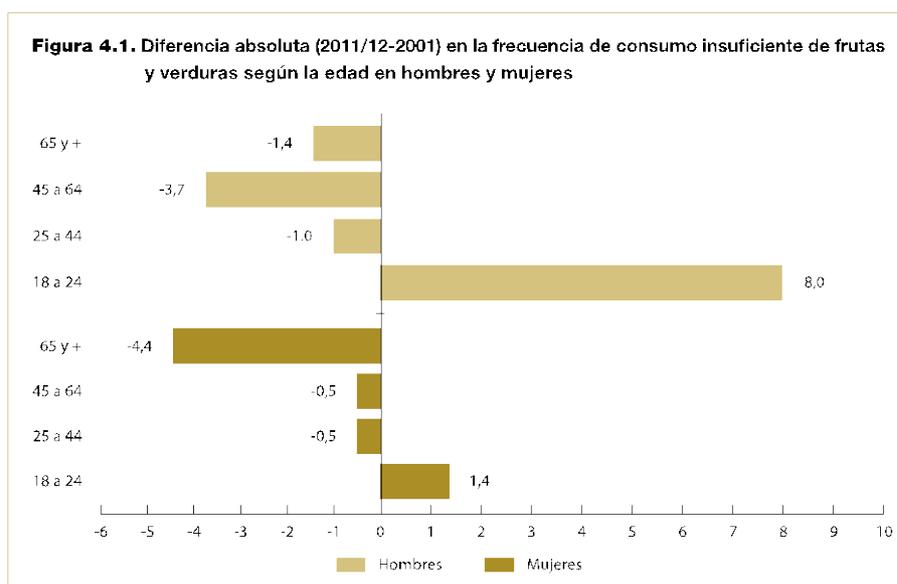


Figura 4: Tendencia de los principales factores de riesgo de enfermedades crónicas. España 2001-2011/2012. Información y estadísticas sanitarias 2014. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

- El gradiente que la obesidad presenta según el tamaño del municipio de residencia se invirtió durante la década estudiada: si en el año 2001 la prevalencia de obesidad era mayor cuanto menor era el tamaño del municipio, en 2011/12 ocurrió justamente lo contrario.
- En 2011/12, el 28,6% de la población adulta española declaró un consumo insuficiente de frutas y verduras (FV). Ese porcentaje fue del 30,5%, 22,4%, y 24,1% en 2001, 2003 y 2006 respectivamente. El consumo insuficiente de FV fue mayor en hombres que en mujeres: en 2011/12, dicho consumo fue del 33,0% y del 24,4% en uno y otro sexo respectivamente.
- El consumo insuficiente de FV sigue un gradiente inverso con la edad, siendo casi del doble en los individuos de 16 a 24 años que en los de 65 y más años. En ese grupo de edad

más joven, el consumo insuficiente de FV aumentó entre 2001 a 2011/12 en un 8% y un 1,4% en hombres y mujeres, respectivamente. En el resto de los grupos de edad, la tendencia en el consumo insuficiente de FV fue descendente.

- El consumo insuficiente de FV fue mayor en los individuos con menor nivel de estudios. La diferencia en el consumo insuficiente entre el mayor y el menor nivel de educación fue de mayor magnitud en los individuos más jóvenes. Además, el mayor incremento en el porcentaje de personas con un consumo insuficiente de FV se produjo en los sujetos de 16 a 24 años con menor nivel de estudios.

- El porcentaje de consumidores de una cantidad de alcohol que supone un riesgo crónico para la salud era 4,1% en 2003 y 1,2% en 2011/12. El porcentaje de mujeres bebedoras de riesgo se redujo de 1,5% en 2003 a 0,3% en 2011/12, mientras que en hombres esos porcentajes fueron 6,9% y 2,1%, respectivamente.

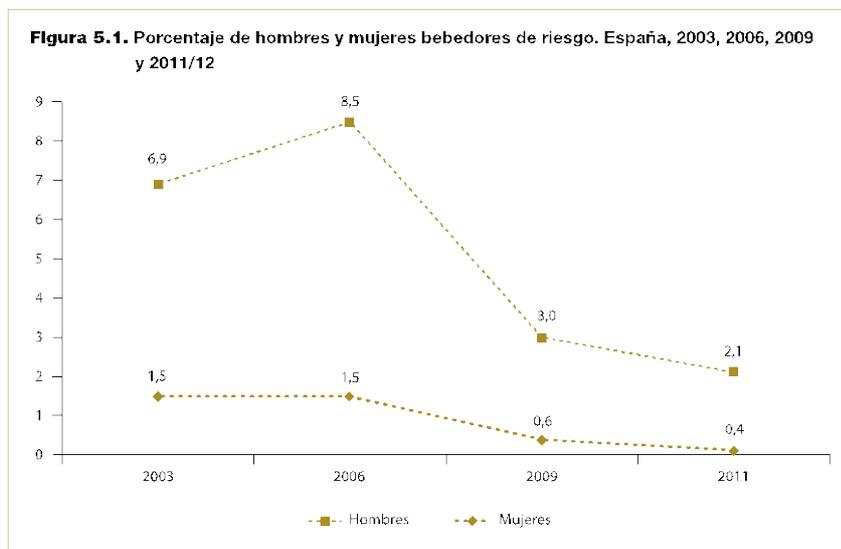


Figura 5: Tendencia de los principales factores de riesgo de enfermedades crónicas. España 2001-2011/2012. Información y estadísticas sanitarias 2014. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

- En hombres entre 25 y 64 años se observó un importante descenso en términos absolutos en el porcentaje de bebedores de riesgo. En 2003, casi un 10% de los hombres de 45 a 64 años eran bebedores de riesgo, mientras que en 2011/12 esa cifra era el 3,0%.

• En hombres, la proporción de bebedores de riesgo para la salud muestra un gradiente inverso con el nivel de estudios. En 2003, el porcentaje de consumidores de una cantidad de alcohol que supone un riesgo para la salud fue 8,8% en aquellos con estudios primarios o inferiores y 4,6% en los universitarios. En 2011/12 esos porcentajes fueron 4,3% y 1,6%, respectivamente. En cambio en mujeres ese patrón de las bebedoras de riesgo para la salud según el nivel de estudios no se observó.

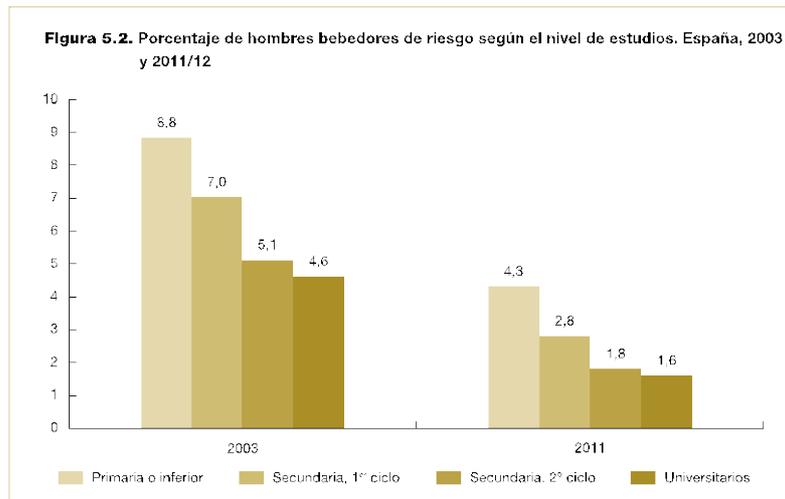


Figura 6: Tendencia de los principales factores de riesgo de enfermedades crónicas. España 2001-2011/2012. Información y estadísticas sanitarias 2014. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad.

C. INFLAMACION: GENERALIDADES

La inflamación es una respuesta adaptativa iniciada por estímulos nocivos como una infección o un daño tisular (Majno y Cols. 2004, Kumar y Cols 2003). En las últimas décadas se han hecho grandes avances en la comprensión de las rutas moleculares y celulares que intervienen en el inicio y desarrollo de la respuesta inflamatoria, un ejemplo de ello son los procesos que ocurren en la inflamación crónica sobre todo los debidos a infecciones crónicas o enfermedades autoinmunes. Lo que todavía se encuentra en una fase temprana de conocimiento son las causas y mecanismos que acontecen en los estados de inflamación crónica producidos en enfermedades sistémico-metabólicas, estos suceden en una amplia variedad de patologías como DMII o las enfermedades cardiovasculares. Estos estados de inflamación crónica no parecen estar causados por los clásicos mediadores de la infección o daño tisular. En cambio si parecen ser consecuencia del malfuncionamiento tisular, esto

significa que son debidos a una perdida del equilibrio de la homeostasis celular y tisular, mecanismos que no tienen por que formar parte de la defensa y/o reparación celular o tisular.

Esta demostrado que una respuesta inflamatoria controlada seria benefiosa por ejemplo para proporcionar protección contra infecciones, pero se volvería perjudicial si esta se desregula, algo que ocurre por ejemplo en una sepsis.

Por tanto un estado inflamatorio patológico tendría repercusiones a nivel fisiológico. Sin embargo, mientras que la inflamación y los procesos fisiopatológicos que ocurren en una infección son claros y están bien estudiados, los procesos inflamatorios que ocurren por alteraciones metabólicas no están tan claros ni tan bien estudiados, un ejemplo de este hecho serian la obesidad o la gota. El hecho de que existan ciertas homologías entre los procesos inflamatorios desencadenados por diferentes vías no esta tan claro y se encuentra también pendiente de profundizar en su estudio. Por ello a día de hoy el proceso inflamatorio requiere una visión mas amplia que abarque otras situaciones como es su demostrada implicación en las enfermedades endocrino-metabólicas. De hecho la obesidad puede dar lugar a inflamación mientras que la inflamación crónica puede promover una obesidad asociada a la diabetes relacionada en parte con la resistencia insulínica producida por la inflamación (Hotamisligil y Cols. 2006). Feedback similares están presentes en la aterosclerosis, cáncer y otras enfermedades inflamatorias. Afinando se puede afirmar que este tipo de relación reciproca puede ser la causante por lo menos en parte de la naturaleza crónica de estas inflamaciones y las hace diferentes de la inflamación crónica debida a la persistencia del inductor inflamatorio.

Independientemente de la causa, la inflamación se relaciona con una respuesta adaptativa de nuestros tejidos de cara a restaurar la homeostasis. Por tanto el origen de la respuesta inflamatoria quizás debería visualizarse desde un contexto mas amplio. (Tabla 1)

Tabla 1 Principales diferencias entre la inflamación clásica y la inflamación sistémica de grado bajo

	Inflamación clásica	Inflamación sistémica de grado bajo
Duración	Aguda, subaguda	Crónica
Ubicación	Localizada	Sistémica, tejido insulino dependiente
Infiltrado celular	Neutrófilos, eosinófilos, células NK, linfocitos T, macrófagos	Macrófagos, linfocitos T
Citocinas y factores solubles	TNF- α , IL-1 β , IL-6, ERO	TNF- α , IL-6, proteína C reactiva, ERO
Activadores	PAMP y DAMP	DAMP metabólicos
Lesión tisular	Presente	Ausente
Patologías relacionadas	Colitis, peritonitis, SRIS, etc.	Dislipidemia, aterogénesis, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial sistémica

DAMP: patrones moleculares asociados a daño; ERO: especies reactivas del oxígeno; NK: células asesinas naturales; IL: interleucina; PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos; SRIS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; TNF: factor de necrosis tumoral.

(León-Pedroza y Cols. 2014)

A nivel básico encontramos que la respuesta inflamatoria aguda producida de forma secundaria a un daño tisular requeriría la participación sobre el tejido dañado de diferentes componentes sanguíneos (plasma y leucocitos) (Majno y Cols. 2004, Kumar y Cols 2003). Esta respuesta esta muy bien documentada cuando es debida a una infección donde se produce una activación de los TLRs y NLRs (Barton, y Cols. 2008). Esta señal inicial de reconocimiento es producida por macrófagos y mastocitos residentes en los tejidos, que una vez activados dan lugar a la producción de gran variedad mediadores inflamatorios incluidos quimiocinas, citoquinas, aminas vasoactivas, eicosanoides y productos de cascadas proteolíticas. El principal y mas inmediato efecto de estos mediadores es dar lugar a una inflamación local conformada por proteínas plasmáticas y leucocitos (principalmente neutrófilos) que habitualmente se circunscriben a los vasos sanguíneos y que se extravasan a los tejidos infectados o dañados a través de las vénulas postcapilares. El endotelio activado de estos vasos sanguíneos permite una extravasación selectiva de neutrófilos evitando la salida de los eritrocitos. Esta selectividad se logra gracias a selectinas endoteliales que se unen a receptores de integrinas y quimiocinas de los leucocitos, este suceso ocurre tanto en la superficie endotelial como en los espacios extravasculares. Cuando alcanzan el tejido dañado, los neutrófilos se activan tanto por el contacto directo con los patógenos como por la acción de citoquinas secretadas por células residentes en el tejido. Los neutrófilos se encargan de eliminar los agentes invasores con su degranulación, liberándose entre otras sustancias ROS, especies reactivas del nitrógeno, proteinasa 3, catepsina G y elastasa (Nathan y Cols. 2006). Estos potentes efectores no discriminan entre antígenos microbianos o antígenos propios así que se producirá un daño colateral en los tejido del huésped el cual sería inevitable (Nathan y Cols 2002).

Una respuesta inflamatoria adecuada elimina los agentes infecciosos, con una fase posterior de resolución y reparación del daño causado la cual es llevada a cabo principalmente por macrófagos tanto del tejido como otros reclutados a partir del torrente sanguíneo (Serhan y Cols. 2005). La conversión de las prostaglandinas inflamatorias en mediadores lipídicos como las lipoxinas, estas últimas con acciones anti-inflamatorias, sería un paso crucial en este proceso de resolución de la inflamación, las lipoxinas inhiben el reclutamiento de neutrófilos y por tanto permiten la acción de los monocitos los cuales retiran las células muertas e inician el remodelado tisular (Serhan y Cols. 2005): Resolvinas y protectinas así como TGF beta y otros factores de crecimiento producidos por macrófagos, también tendrían un papel clave en la resolución de la inflamación. (Serhan y Cols. 2007). (Figura 1).

Si la respuesta inflamatoria falla en su papel de eliminación del antígeno extraño, el proceso inflamatorio persistirá y adquirirá nuevas propiedades. La infiltración por neutrófilos será sustituida por macrófagos y en el caso de infección también por células T, si aun así esta combinación resultara insuficiente para su resolución un estado inflamatorio persistente llevara a la formación de granulomas y tejidos linfoides terciarios (Drayto y Cols. 2006). Las características de este estado inflamatorio pueden diferir dependiendo de la clase de células T presente, o sea de cual es su efector. Además debido a la persistencia del patógeno, la inflamación crónica tisular puede ser secundaria a otros procesos como pueden ser las enfermedades autoinmunes (por la presencia de auto antígenos) o anticuerpos que no se degradan adecuadamente. En el desarrollo de los granulomas las partículas extrañas son rodeados por una capa de macrófagos en empalizada, a fin de proteger al huésped. (Majno y Cols. 2004, Kumar y Cols 2003).

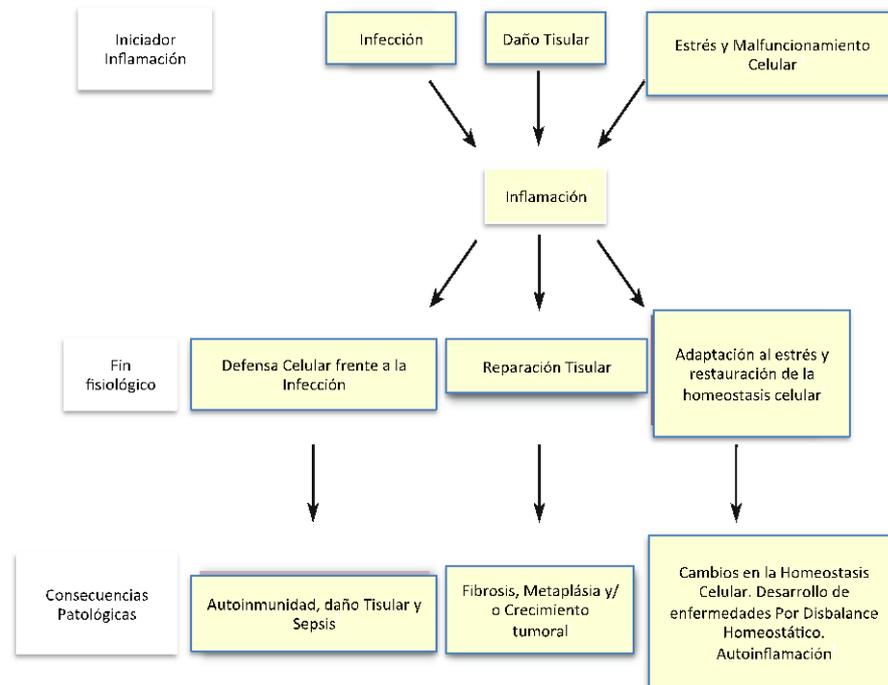


Figura 7: Fisiopatología de la Inflamación: dependiente del iniciador del proceso inflamatorio la respuesta tiene un propósito fisiológico y unas consecuencias diferentes. De las tres posibles iniciadores, solo la inflamación inducida por la infección lleva como consecuencia el inicio de una respuesta adaptativa.

Los mecanismos de una inflamación crónica causados por patología endocrino-metabólica son poco conocidos aunque parece claro que ellos no se sigue el patrón de transición de inflamación aguda a crónica explicada anteriormente.

1. La vía infamatoria:

La respuesta inflamatoria es coordinada por un amplio rango de mediadores que forman las redes necesarias para su regulación. Para comprender este complicado entramado es útil diseccionar dichas redes en categorías funcionales y distinguir entre inductores y mediadores inflamatorios. Los inductores son los que inician la respuesta inflamatoria, activan sensores especializados los cuales permiten el inicio de la producción de mediadores específicos. Los mediadores por el contrario alteran los estados funcionales de los tejidos y órganos (los cuales son los efectores de la inflamación) permitiéndoles adaptarse a las condiciones iniciadas por un inductor inflamatorio específico. Por tanto una vía inflamatoria se compone de inductores, sensores, mediadores y efectores siendo cada componente el que determina el tipo de respuesta inflamatoria. (Figura 2)

1-1-Inductores y sensores de inflamación

1-1-1.-Inductores exógenos

Se pueden clasificar en dos grupos, microbianos y no microbianos. Hay dos clases de inductores microbianos, PAMPs y los factores de virulencia. Los PAMPs son una serie limitada y definida de patrones moleculares conservados para todos los patógenos en general, no solo para los pertenecientes a una clase determinada (vale tanto para microorganismos patógenos como comensales) (Medzhitov y Cols. 1997). El huésped posee un grupo de receptores específico para estas PAMPs. La segunda clase de inductores quedan restringido solo a patógenos y no existen receptores específicos de reconocimiento por parte del huésped. Debidos a sus efectos adversos sobre el huésped dan lugar al proceso inflamatorio. La actividad de los factores de virulencia es detectada por sensores especializados, un ejemplo la exotoxinas formadoras de poros de los Gram positivos son detectadas por el inflamasoma NALRP3 , el cual es sensible al flujo de iones K secundarias a la formación del poro (Mariathasan y Cols. 2006). De forma similar la actividad proteolítica de la proteasa producidas por helmintos es detectada por basófilos por un sensor desconocido (Sokol, y Cols. 2008). A destacar que este mecanismos de sensado puede ser activado de forma inadvertida por moléculas similares a los patógenos (alérgenos), de esta forma estos alérgenos podrían iniciar la respuesta inflamatoria de una forma similar a como los harían los helmintos (Sokol, y Cols. 2008). Una manera alternativa y no específica de sentir la virulencia es hacerlo de forma indirecta a través de la detección de la muerte y daño celular/tisular. En este caso los inductores de la respuesta inflamatoria serían los productos endógenos secundarios al daño celular/tisular.

Es de destacar que la respuesta inflamatoria inducida por estos dos mecanismos de virulencia difieren en su especificidad, porque el primero es típico del patógeno (o la clase de patógeno) y la otra no.

Hay que destacar que los inductores inflamatorios no son necesariamente derivados de patógenos. Las bacterias comensales serian una fuente importante de inductores inflamatorios detectados por las TLRs. (Rakoff-Nahoum y Cols. 2004). La Activación de las

TLRs por estas bacterias es abolida de gran variedad de formas, un ejemplo de esto es la inflamación letal que se produce en ratones que carecen de A20 uno de los reguladores más cruciales de la señal TLR (Turer y Cols. 2008).

Los inductores exógenos de inflamación de origen no microbiano incluyen alérgenos, irritantes, compuestos tóxicos y cuerpos extraños. Ciertos alérgenos son detectados porque mimetizan la actividad virulenta de los parásitos, otros pueden actuar como irritantes de la mucosa epitelial. La respuesta inflamatoria inducida por ambos tipos de alérgenos es similar porque se defiende contra parásitos e irritantes ambientales permitiendo su expulsión y limpieza a través de la mucosa epitelial. Los sensores para los alérgenos son desconocidos.

Los cuerpos extraños son partículas indigeribles demasiado largas para ser fagocitadas o que causan daños en la membrana fagosomal de los macrófagos, una vez digeridas. Las partículas de sílice y asbesto que desencadenan una respuesta inflamatoria son ejemplos de este hecho. Su gran tamaño y el hecho de que sean resistentes a su eliminación así como que carecen de marcadores biológicos (como el CD47) presentes normalmente en las células y que posibilitan su eliminación, son la base para su persistencia en los tejidos. La falta de reconocimiento como propio presumiblemente dispara la capacidad fagocítica de los macrófagos pero debido a su gran tamaño se produce una fagocitosis ineficiente, por tanto los macrófagos formaban un granuloma alrededor de la partícula. El sensor que dispara esta reacción tampoco es conocido. En algunos casos los macrófagos se fusionan formando células gigantes que encapsulan al cuerpo extraño, este es un mecanismo defensivo muy conservado en la ontogenia evolutiva y ya se objetiva en *Drosophila melanogaster*, la cual posee una células llamadas lamelocitos (de función similar a macrófagos) que se encargan de encapsular los huevos de avispa para proteger al huésped (Rizk y Cols. 1992). De cualquier manera cuando se produce este mecanismo el inflamomasoma NALP3 (un sensor) es activado.

1-1-2. Inductores endógenos

Son señales producidas por estrés, daño o cualquier otra malfunción de los tejidos. La identidad y características de estas señales está mal definida, pero probablemente pertenecen a varias clases funcionales de acuerdo a la naturaleza y grado de las anomalías tisulares en que se registren.

Las células y tejidos habitualmente se encuentran organizadas en compartimentos rodeados de membranas celulares, membranas basales, epitelios de superficie o endotelio vascular.

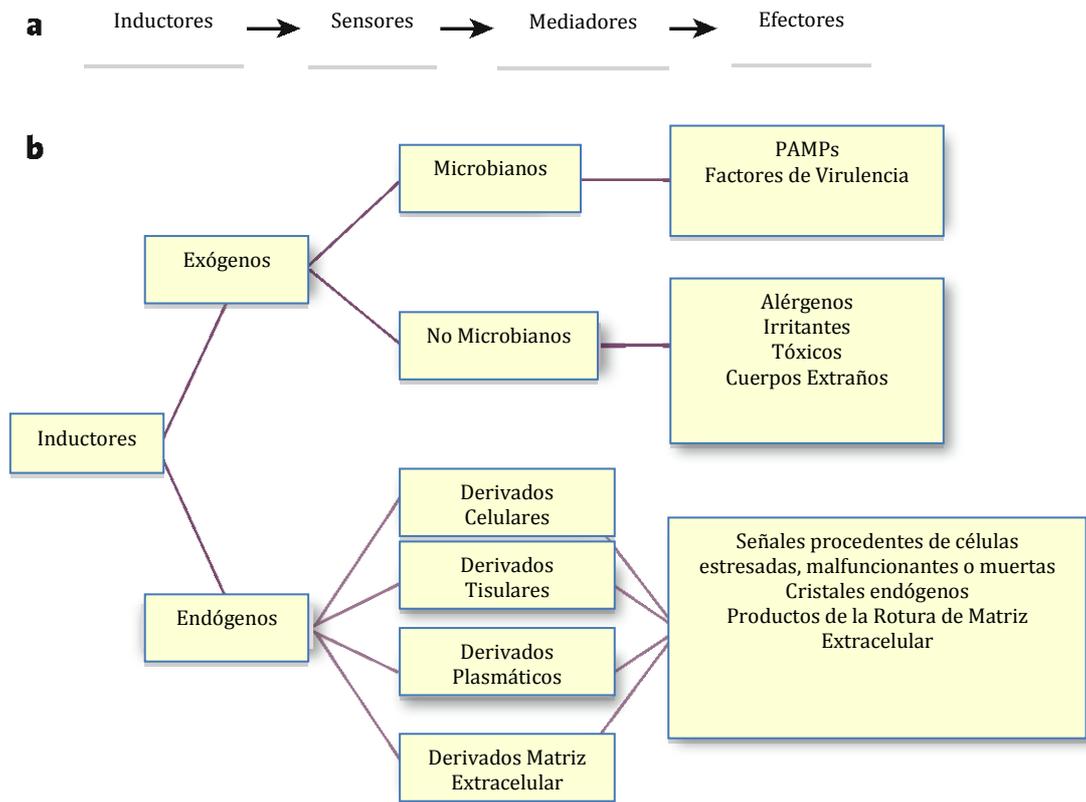


Figura 8: La vía inflamatoria: a- Una vía inflamatoria genérica se compone de inductores, sensores, mediadores y efectores. B-los inductores de la inflamación se pueden clasificar como exógenos o endógenos y estos dos grupos se pueden clasificar como se muestra.

Durante la muerte celular la integridad de dichas barreras desaparece liberándose moléculas intracelulares como ATP, K, Acido úrico, HMGB1 y otra gran variedad de proteínas como S100A8, S100A9 y S100A12 (Rock y Cols 2008; Bianchi y Cols 2007). El ATP se une a los receptores de purinas (incluyendo P2X7) sobre la superficie de los macrófagos dando lugar a un flujo de iones K pudiendo cooperar con otras señales dando así lugar a la activación del inflamasoma NALP3. (Mariathasan y Cols. 2006).. HMGB1 y S100A12 se unen al receptor RAGE el cual (al menos en caso de HMGB1) coopera con TLRs en inducir una

respuesta inflamatoria (Park y Cols 2006). S100A8 y S100A9 actúan a través de TLR4 (Vogl y Cols. 2007). Hay que destacar que aunque las proteínas intracelulares se piensa que son liberadas de forma pasiva cuando se desintegra la membrana celular, muchísimas proteínas intracelulares pueden ser secretadas por otros medios de forma independiente al Retículo Endoplásmico y aparato de Golgi, esto es posible gracias a la acción de la Caspasa-1, implicando que dicha secreción esta mediada por inflamomas (Keller y Cols. 2008). Así podemos tener proteínas liberadas de forma pasiva tras la muerte celular o liberadas a través de la acción de la Caspasa-1 a través de ATP, esta ultima posibilidad seria exclusiva de células activas ya que las necróticas no poseen actividad metabólica. Si la Caspasa-1 es responsable de la secreción de proteínas intracelulares con actividad inflamatoria, podría aportar mucha luz acerca de como las proteínas inflamatorias intracelulares pueden iniciar el proceso inflamatorio así como el papel que juegan las células necróticas. El mejor ejemplo de este hecho es HMGB1 secretada por macrófagos tras la estimulación del receptor TLR4 con LPS (Chen y Cols 2004), esto ocurre aparentemente en ausencia de muerte celular sugiriendo que este fenómeno esta ocurriendo a través de la Caspasa-1.

En tejidos intactos las células epiteliales y mesenquimales están separadas por la membrana basal y la interrupción de dicha barrera conlleva una interacción entre ambas células, esta interacción da a entender que se ha producido un daño tisular y conlleva el inicio de los fenómenos de reparación tisular, aunque se desconoce como se sensan estas interacciones. El epitelio superficial separa el compartimento interno del ambiente. En órganos como el intestino, colonizado por bacterias comensales, la ruptura de esta barrera da acceso a los microorganismo a interactuar con las TLRs de los macrófagos que se encuentran en la lamina propia, dando lugar a una inducción de la respuesta de reparación mediada por TLR (Pull y Cols. 2005). En órganos estériles con un epitelio, la descompartilización de ciertos componentes celulares puede jugar el mismo papel. Otro ejemplo de descompartibilización es la separación del factor de crecimiento heregulina de sus receptores ERB2, ERB3 y ERB4 en el epitelio respiratorio. La uniones “zonula occludens” del epitelio intacto separa la heregulina (expresado a nivel apical) de su receptor (expresado a nivel basolateral). Si hay daño epitelial la heregulina se une a sus receptores e inicia la respuesta de reparación del tejido (Vermeer y Cols 2003).

Finalmente el daño al endotelio vascular permite que proteínas plasmáticas y plaquetas lleguen a los espacios extravasculares. De este modo el factor de Hageman se

activa al contactar con el colágeno y otros componentes de la matriz extracelular. El factor de Hageman activado actúa como un sensor del daño vascular e inicia las 4 cascadas proteolíticas que generan los mediadores inflamatorios: la cascada caliceína-quinina, la cascada de la coagulación, la cascada fibrinolítica y la del complemento. Las plaquetas también se activan al contacto con el colágeno y producen varios mediadores inflamatorios incluyendo tromboxanos y serotoninas (Majno y Cols. 2004).

Los inductores endógenos comentados hasta este momento están implicados en la respuesta inflamatoria aguda. Para la respuesta inflamatoria crónica existen otros inductores, entre estos nos encontramos cristales de urato monosódico y pirofosfato cálcico dihidratado, AGEs, lipoproteínas oxidadas. La formación de estos cristales es facilitada en algunos tejidos conectivos, ya que proveen una superficie adecuada para la enucleación de los cristales (Rock y Cols. 2008). La formación de cristales en las articulaciones y tejidos periarticulares son los responsables de provocar un estado inflamatorio conocido como gota (urato) y pseudogota (pirofosfato cálcico) (Rock y Cols. 2008). Cuando alcanzan un cierto tamaño son detectados por los macrófagos y se tratan como si fueron cuerpos extraños. La fagocitosis dispara la activación del inflammasoma NLP3y por tanto la producción de mediadores secundarios a la acción de la Caspasa-1 como pueden ser los miembros de la familia de IL-1. (Martinon y Cols 2006).

Los AGEs son productos de la glicación no enzimática de las proteínas de larga supervivencia como el colágeno (Brownlee y Cols. 1998), estos productos pueden dar lugar a un entrecruzamiento de estas proteínas, llevándolas a una degradación funcional progresiva. Además las AGEs son reconocidas por su receptor, RAGE el cual ya posee una actividad inflamatoria por si mismo o en combinación con TLR (Yan y Cols. 2007). Las AGEs pueden acumularse bajo condiciones de hiperglicemia y pro-oxidativas incluyendo DMI y DMII así como en el envejecimiento (Brownlee y Cols. 1988). ROS producidos por fagocitos también tienen un papel en la conversión de las lipoproteínas de alta y baja densidad en señales inflamatorias debido a la oxidación de sus componentes lipídicos y proteicos.

Otro grupo de inductores endógenos de la inflamación lo conforman los productos de rotura de la matriz extracelular generados durante la mal función o daño cerebral. El componente mejor estudiado en este contexto es el glicosaminoglicano hialurato. En

condiciones normales el hialuronato se encuentra como un polímero inerte de alto peso molecular. El daño tisular promueve su rotura en fragmentos de bajo peso molecular que provocan inflamación activando TLR4 e iniciando la respuesta de reparación tisular (Jiang y Cols 2005). Esta rotura tiene lugar a través de especies reactivas del O₂ (Jiang y Cols 1984). Por tanto varias de las vías endógenas de activación inflamatoria ocurren a través de ROS.

El daño tisular es detectada tanto por macrófagos tisulares los cuales inducen la inflamación y la reparación tisular así como los receptores del dolor (nociceptores) que producen sensación de dolor en el tejido dañado. Interesantemente ambos tipos de sensores de daño tisular pueden ser activados por algunos de las mismas señales que son producidas después de la lesión, por ejemplo, el ATP extracelular procedente de las células dañadas y la generación de bradicidina por una cascada proteolítica producida por el daños vascular (Basbaum y Cols. 2009).

1-2. Inflamasoma

El Inflamasoma es un grupo de complejos de proteínas multimericas conformadas por un receptor citoplasmático de la familia de NLR (Receptor tipo Nod), una proteína adaptadora llamada ASC (Apoptosis-associated Speck-like), con un dominio a nivel N-terminal que es una zona de anclaje de caspasa (CARD) y la procaspasa (Schroder y Cols. 2010). El complejo de inflamasoma mejor caracterizado es NLPR3 , el cual ha sido descrito en un amplio rango de células como macrófagos, cardiofibroblastos y cardiomicocitos (Vandanmagsar y Cols; Hirao y Cols. 2009) NLPR3 se encuentra de forma inactiva gracias a chaperones citoplasmáticos.

Los inflamasomas reconocen un gran numero de estímulos inducidos por la inflamación que incluyen PAMPs (patrones moleculares asociados a patógeno) y DAMPs (patrones moleculares asociados a daño como HMGB1, DNA y RNA, Moléculas S100, metabolitos de las purinas, fragmentos de del hialuronico) y que controlan la producción de importantes citocinas pro-inflamatorias tales como IL-1B, IL-18 (Schroder, K. & Tschopp 2010; Davis y Cols. 2011, además se encargan de la regulación de otros aspectos importantes de la inflamación y la reparación del tejido como la piroptosis, una forma de muerte celular.

Estudios recientes han caracterizado distintos mecanismos de activación molecular para varias proteínas sensoras y han identificado multitud de ligandos tanto de origen endógeno como exógeno. Además, las diversas funciones de estos complejos tanto en las respuestas antimicrobianas, como también en enfermedades complejas como el síndrome metabólico y la enfermedad inflamatoria intestinal están empezando a ser dilucidadas, es de destacar que mutaciones en compuestos pertenecientes a este inflamasoma han sido asociadas con enfermedad humana.

Una vez que NLRP3 es liberado, la subsecuente oligomerización lleva a una adhesión de la procaspasa-1, que provoca la activación de inflamasoma (Schroder y Cols. 2010). Los inflamasomas controlan la actividad de la caspasa-1: IL-1beta es una de las citocinas proinflamatorias por excelencia que afectan de forma amplia a todos los procesos inflamatorios (Dinarello y Cols 2010). Hay fuertes controles en su producción, por tanto se requiere un control tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional. IL-1B se sintetiza como una pro-proteína sin una secuencia de señalización típica que permite su secreción, y por tanto su activación y liberación celular esta controlada por una cisteína proteasa caspasa-1 (Cerreti y Cols. 1992). De forma similar Caspasa-1 es responsable del procesamiento y secreción de IL-18 así como de otras proteínas como IL-1 alpha y el factor de crecimiento fibroblástico 2 a través de una vía de secreción proteica alternativa (Keller y Cols. 2008). Además la caspasa-1 es requerida para la piroptosis, una forma de muerte celular observada durante las infecciones microbianas que combina las características de la apoptosis (fragmentación de DNA) y necrosis (inflamación y liberación de citocinas) (Bergsbaken y Cols. 2009). Como otras caspasas, la caspasa-1 es sintetizada como un zimógeno inactivo (pro-caspasa-1) y adquiere la actividad proteolítica solo después de una dimerización controlada en el inflamasoma que esta conformado alrededor de uno de varias moléculas diferentes (Kerur y Cols. 2011). Mientras el dominio rico en leucinas (LRR) parece que esta relacionado con la regulación de homo-oligomerización o hetero-oligomerización, que son requeridas para el ensamblaje del inflamasoma. Los sensores del inflamasoma se unen a la pro-caspasa 1 tanto directamente a través de una unión homotípica de CARD o indirectamente a través de PYD por medio de ASC, el cual contiene PYD y CARD.

Siendo la vía necesaria de inicio de muchas vías inflamatorias incluyendo el NF-kappaB, MAPK, IFN gamma, citoquinas y ROS, así como la resistencia a la insulina (Coggins

y Cols. 2012).

1-2-1. Inducción de la formación del inflamasoma:

El ensamblaje del inflamasoma es único en su inducción por la variedad de señales tanto exógenas como endógenas que intervienen. El rango de sensado de activación de la señales por cada proteína es distinto, pero puede incluir un solapamiento de señales. Mientras los inflamasomas AIM2 y NLRC4 son activados solo por PAMPs específicas, dsDNA y proteínas bacterianas específicas respectivamente (Dostert y Cols. 2008). NLRP3 es activado por una larga variedad de señales incluyendo PAMPs, DAMPs y toxinas bacterianas (Dostert y Cols. 2008). La diversidad estructural de los ligandos activadores de NLRP3 esta en contraste con otros receptores patrones de reconocimiento innato como receptores Toll-like (TLR) lo cuales de forma general reconocen conformaciones estructurales mas restringidas (Jin y Cols. 2008). Estos mecanismos incluyen tanto señales de reconocimiento directas como indirectas mediadas por proteínas accesorias adicionales (Zhou y Cols. 2010)

1-2-2. Regulación de la actividad del inflamasoma:

La actividad del inflamasoma debe ser muy finamente regulada por el huésped para evitar el exceso de producción de citocinas que llevaría a la célula a la muerte. La regulación ocurre a nivel transcripcional y post-transcripcional. Primero, la expresión de los sensores del inflamasoma, en particular NLRP3, su nivel basal es bajo en la mayoría de las células requiriendo una señal de activación para su inducción (Hornung y Cols. 2010). Esta señal es frecuentemente referida como señal I y es proporcionada por ligandos microbianos, citocinas o ROS. Además, procesados alternativos del RNA correspondiente a las proteínas que conforman el inflamasoma generan variantes proteicas con diferentes actividades. Por tanto las variantes del procesamiento de ASC han sido identificadas con diferentes propiedades de cara a servir como una adaptación de este inflamasoma, pudiendo llegar a desarrollarse en algún caso incluso una actividad inhibidora (Bryan y Cols. 2010). Además, el huésped expresa proteínas que regulan la actividad del inflamasoma principalmente por secuestro de los componentes del inflamasoma a través de interacciones homotípicas de CARD o PYD o directamente a través de la inhibición directa de la función de la caspasa-1 (Stehlik y Cols. 2007). De forma similar, la localización subcelular y el trafico de los componentes del

inflammasoma parece ser importante en la regulación de la actividad del inflammasoma ya que el ASC de las células no activas metabólicamente se encuentra principalmente en el núcleo (Bryan y Cols. 2009). Otro nivel de regulación puede ocurrir a través del ensamblaje del complejo con diferentes componentes sugerido por la observación de que el procesamiento de citocinas a continuación de la activación de NLRC4 es dependiente de ASC, mientras la piroptosis es independiente de ASC (Marlathasan y Cols 2004). Además se ha sugerido que los diferentes procesados en la Caspasa-1 podría contribuir a este hallazgo porque la actividad catalítica de la Caspasa-1 que ha sido incapaz de realizar un correcto procesamiento es disfuncionante en su habilidad para eliminar citocinas, pero todavía es capaz de iniciar la piroptosis en el proceso de reconocimiento de la infección por Salmonella mediada por NLRC4 (Broz y Cols 2010). La regulación de la actividad del inflammasoma también es optimizada a través de los entrecruzamientos en las vías de señalización con los de los procesos asociados al estrés celular tales como su autofagia. (Figura 3).

La inducción de la autofagia lleva a la degradación de substratos celulares como los agregados de proteínas y organelas en autolisosomas para el reciclado de metabolitos. Sorprendentemente las células deficientes en la capacidad de autofagia tienen una disminución de umbral para la activación del inflammasoma (Saltoh y Cols. 2010). Esto ha sido sugerido que sería el resultado de un aclaramiento deficiente de mitocondrias disfuncionantes dando lugar a niveles elevados de ROS, insinuando el papel de NLRP3 como sensor (Zhou y Cols. 2011). Otro aspecto de la regulación de la actividad del inflammasoma es la regulación negativa a través de factores de secreción o células (interacción celular). Ejemplos de estas señales son los interferones o interacciones entre células T CD4+ y macrófagos o células dendríticas, provocando una regulación negativa a nivel transcripcional y post-transcripcional de la actividad del inflammasoma (Guarda y Cols. 2011). Todos estos procesos probablemente cooperan en la organización temporal y espacial de los procesos mediados por el inflammasoma. En resumen el huésped desarrolla distintos mecanismos para regular la activación del inflammasoma para prevenir las consecuencias de una sobreactuación de este inflammasoma.

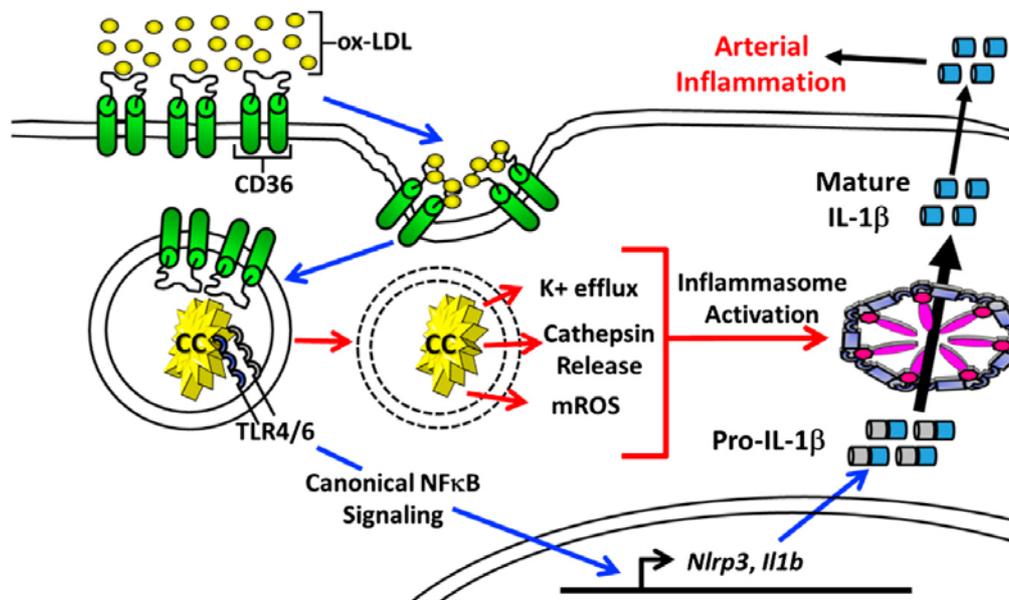


Figura 9: Señal 1: Cebado del inflammasoma (flecha azul): Las LDL oxidadas son endocitadas por el receptor CD36 y es transformado en cristales de colesterol que activan TLR4 y TLR6 induciendo la transcripción de los genes de IL-1b y del inflammasoma vía el factor de transcripción NF-kappaB.

Señal 2: Ensamblado y activación del inflammasoma (flechas rojas): los cristales de colesterol inducen la desestabilización del fagolisosoma y la liberación de catepsinas lisosomales. El ensamblado de NLRP3 en respuesta a los cristales de colesterol requiere un flujo de mROS (especies reactivas del Oxígeno derivadas de la mitocondria) y Potasio. El inflammasoma activado procesa la pro-IL-1Beta en su forma madura. (Robbins y Cols. 2014)

Los procesos regulados por inflammasoma dependen de la expresión simultánea de multitud de componentes proteicos del inflammasoma en el mismo tipo celular de los tejidos inflamados. ASC y Caspasa-1 se encuentran en muchos tejidos y células, mientras que los sensores del inflammasoma muestran una expresión diferente, sugiriendo mecanismos específicos dependientes de tejido y que interactúan con el microambiente.

1-3. Factor de Transcripción NF-kappaB (NF-κB).

La expresión génica del factor de transcripción NF-kappaB (NF-κB) en eucariotas está regulada principalmente en el plano transcripcional. Los promotores de los genes poseen secuencias indispensables para la regulación de la transcripción que son reconocidas por una familia de proteínas denominadas factores de transcripción. La unión de estos factores al DNA permite que componentes de la maquinaria de la transcripción interactúen con el promotor para activar o reprimir la misma.

El NF-kappaB (NF- κ B) es un factor de transcripción inducible de células eucariotas que se encuentra presente en la mayoría de las células. En 1986, fue descrito por vez primera como el factor nuclear necesario para la transcripción de la cadena ligera kappa de las inmunoglobulinas (Sen y Cols., 1986). Desde entonces, su nombre ha perdurado como factor nuclear de la cadena kappa en células B.

El NF- κ B juega un importante papel en la inflamación, en la respuesta inmune a las infecciones y en el crecimiento celular (Baeuerle y Henkel, 1994). En la mayoría de los tipos celulares, el NF- κ B se activa en situaciones de infección, estrés o agresión celular, encargándose de modular sus respuestas. En un contexto más sistémico, este factor regula la respuesta hepática de fase aguda (Siebenlist y Cols., 1994; Grilli y Cols., 1993a), y activa la transcripción de genes que codifican para citocinas, factores de transcripción, moléculas de adhesión y receptores celulares que controlan muchos de los sistemas de proliferación, diferenciación y activación de las células del sistema inmune (Kopp y Ghosh, 1995; Neish y Cols., 1995; Moynagh y Cols., 1994).

En situación de reposo es un dímero formado por combinaciones homo o heterodiméricas de las distintas subunidades de la familia de proteínas denominada NF- κ B/Rel, al que se le une una molécula inhibidora IkappaB (I κ B) (b, 1996; Ghosh y Cols., 1998). Esta subunidad inhibidora enmascara una secuencia en la proteína denominada *nuclear locating sequence* (NLS) que es la encargada de permitir la translocación al núcleo del NF- κ B activo. Es un mecanismo de respuesta rápido, cuyo proceso de activación no requiere nueva síntesis de proteínas sino que basta la liberación de la subunidad inhibidora para que se active la translocación del factor activo al núcleo donde se puede unir al DNA (Baldwin, 1996). Las secuencias de DNA a las que se une el NF- κ B son motivos de 10-12 pares de bases (pb), denominados secuencias kappaB. Cada subunidad contacta con la mitad del motivo, y cada combinación de subunidades determina la mayor o menor afinidad de los dímeros p50/RelA por el DNA (Baldwin, 1996; Grilli y Cols., 1993b). La importancia y la versatilidad del sistema NF- κ B queda patente al constatar su conservación a lo largo de la evolución desde los insectos hasta los mamíferos.

1-3-1. Inductores de NF- κ B.

Existe una gran diversidad de señales, aparentemente poco relacionadas entre sí, que provocan la activación de NF- κ B (Grilli y Cols., 1993b). Sin embargo, el efecto de un

determinado agente sobre el grado de activación de NF- κ B y el tipo de subunidad que participa dependen del tipo celular (Kopp y Ghosh, 1995). Durante los procesos infecciosos, la rápida activación de NF- κ B está mediada por proteínas bacterianas y virales que promueven la síntesis de importantes reguladores del sistema inmune para combatir la infección (Thanos y Maniatis, 1995; Ghosh y col, 1993). NF- κ B también se activa a través de radicales libres que actúan como segundos mensajeros en ciertos procesos celulares (Schreck y Cols., 1991), y por ciertas citocinas, como el TNF- α y la IL-1, que a su vez están reguladas por NF- κ B, estableciendo circuitos de autorregulación positiva (Baeuerle y Henkel, 1994).

Muchas de estas señales, como por ejemplo el TNF- α y otras citocinas, se unen a su receptor celular activando una cascada de mensajeros secundarios y proteínas cinasas que conducen a la activación del NF- κ B. La fosforilación de I κ B- α en las serinas 32 y 36 provoca la ubiquitinación del inhibidor y la degradación de la proteína por el proteasoma 26S (Chen y col, 1995; Brown y Cols., 1995; Didonato y Cols., 1996). Las cinasas IKK1 e IKK2 forman parte de un complejo de alto peso molecular localizado en el citosol, y parece que son las responsables de la fosforilación de I κ B- α y desencadenantes de la activación del NF- κ B (Mercurio y Cols., 1997). Sin embargo, la regulación por NF- κ B es muy compleja incluyendo muchos puntos de control, como la regulación a nivel de transcripción, estabilidad del mRNA, procesamiento post-traduccional, fosforilaciones, interacción con otras proteínas, especificidad de la secuencia e interacción con activadores de inhibidores nucleares.

1-3-2. NF- κ B y el estrés oxidativo.

En la célula, una porción del oxígeno consumido se reduce a compuestos altamente reactivos conocidos como intermediarios reactivos del oxígeno (ROs). Durante las enfermedades inflamatorias agudas los ROs incrementan su concentración generando un microambiente con efectos tisulares que van desde la agresión funcional subletal, hasta la citotoxicidad y citolisis. Se atribuye el concepto de estrés oxidativo al conjunto de acciones microambientales dependientes de ROs que conllevan cambios funcionales en las células asociados a la expresión de nuevos genes y la modificación de ciertas proteínas.

Al mantener las células en presencia de concentraciones no letales de H₂O₂ se ha constatado que los niveles de algunos intermediarios reactivos del oxígeno (IROs) pueden regular la vía NF- κ B (Schreck y Cols., 1991; Sen y Cols., 1996). Sin embargo, el estado de la

maquinaria celular anti-oxidante (catalasa, glutatión reducido, etc.) puede variar con el tipo celular y con el estado proliferativo y metabólico de un mismo tipo celular. Experimentos en los que se puede alterar el nivel de GSH mediante el uso de N-acetil-L-cisteína (NAC), precursor de la síntesis de GSH—el principal tiol y antioxidante intracelular—, y Butionina-sulfoximina (BSO) —depletor del GSH— sugieren que la activación de NF- κ B por H₂O₂ es ineficaz comparada por la provocada por inductores como el TNF-alfa (Li y Karin, 1999). Sin embargo, existen otros estudios en los que el tratamiento de las células con NAC y otros anti-oxidantes, bloquean la activación del factor de transcripción NF- κ B producida por cicloheximida, TNF- α Ca²⁺, ésteres de forbol activo, IL-1, LPS o lectinas. De esta manera se comprueba que diversos agentes capaces de activar el NF- κ B por diferentes vías intracelulares, pudieran actuar a través de un mecanismo común, produciendo radicales libres dentro de las células, los cuales actuarían como segundos mensajeros regulando directa o indirectamente la activación y translocación del NF- κ B (Schreck y Cols., 1991). Por otro lado, la oxidación de determinados residuos en el NF- κ B puede favorecer o evitar las interacciones proteína-proteína o DNA-proteína, modulando la activación del NF- κ B (Toledano y Leonard, 1991).

1-4. Mediadores y efectores de inflamación.

Los inductores de inflamación posibilitan la producción de numerosos mediadores inflamatorios, los cuales alteran el normal funcionamiento de muchos tejidos y órganos. Muchos de ellos actúan sobre el tejido vascular y sobre el reclutamiento de leucocitos. Estos mediadores pueden provenir de proteínas plasmáticas o ser secretados por células (Majno y Cols. 2004, Kumar y Cols 2003) Los mediadores celulares pueden ser producidos por leucocitos especializados (en particular macrófagos y mastocitos residentes en los tejidos) o por células del propio tejido. Algunos mediadores (como la histamina y serotonina) están preformados y almacenados en gránulos de mastocitos, basófilos y plaquetas. Otros están preformados y circulan como precursores inactivos por el plasma. Las concentraciones plasmáticas de estos mediadores pueden sufrir un importante incremento como resultado de un aumento de su secreción por parte de los hepatocitos durante la fase de respuesta aguda. Otros mediadores son producidos de forma directa en respuesta a una adecuada estimulación por los inductores de la inflamación. Este proceso es ayudado por componentes plasmáticos, incluyendo anticuerpos y complemento. Además IL-1, TNF alpha e IL-6 pueden

tener efectos sistémicos cuando se secretan en cantidades importantes. Estas al actuar sobre los hepatocitos aumentando la producción de proteínas de fase aguda como la PCR y factores de coagulación y estas activaran al endotelio cerebral para producir prostaglandinas, incluyendo la prostaglandina mas proinflamatoria PGE2. La producción localizada de PGE2 induce una población especifica de neuronas en el SNC que van a promover los síntomas de enfermedad: fiebre, anorexia, fatiga, somnolencia y decaimiento social (Pechchi y Cols 2009).

Dependiendo del tipo de infección (bacteriana, vírica o parasito), los sensores, mediadores y el tejido diana, variaran para adaptarse y obtener la respuesta inflamatoria mas adecuada frente a la agresión sufrida. Por ejemplo las infecciones virales inducen la producción de interferones (IFN-alpha, IFN-beta) por las células infectadas y la activación de linfocitos citotóxicos, mientras que la infección por gusanos parásitos lleva a la producción de histamina, IL-4, IL-5 e IL-13 por mastocitos y basófilos. La respuesta tardía puede ser inducida por alérgenos, dando lugar a una inflamación que afecta en primer lugar al epitelio de las mucosas, musculo liso y vasos sanguíneos.

Los mediadores de inflamación pueden clasificarse en 7 grupos de acuerdo a sus propiedades bioquímicas (Majno y Cols. 2004, Kumar y Cols 2003): Aminas vasoactivas, péptidos vasoactivos, fragmentos del complemento, mediadores lipídicos, citoquinas, quimiocinas y enzimas proteolíticas.

1-4-1. Aminas vasoactivas: (histamina y serotonina) Son producidas según la ley del todo o nada cuando se produce la degranulación de los mastocitos y las plaquetas. Tienen efectos complejos sobre la vasculatura causando un incremento de la permeabilidad vascular, vasodilatación o vasoconstricción, dependiendo del contexto en que se liberen. Las consecuencias inmediatas de su liberación pueden ser muy severas en caso de organismos sensibilizados previamente, dando lugar a un colapso cardiovascular y respiratorio en el transcurso de un shock anafiláctico.

1-4-2. Péptido vasoactivos: Pueden almacenarse en una forma activa en vesículas secretoras (como por ejemplo la sustancia P) o generarse por un proceso proteolítico a partir de precursores inactivos en la sustancia extracelular (por ejemplo quininas, fibrinopeptidos A, fibrinopeptido B y productos de la degradación de la fibrina). La sustancia O es liberada

por neuronas sensoriales y puede por si misma causar la degranulación de los mastocitos. Otros péptidos vasoactivos son generados a través de fenómenos de proteólisis por el factor de Hageman, trombina o plasmina dando lugar a vasodilatación y un incremento de la permeabilidad vascular (tanto directamente o induciendo la liberación de histamina por los mastocitos). Como mencionábamos anteriormente el factor de Hageman tiene un papel clave en la regulación de estas respuestas y una importante función tanto como un sensor del daño vascular, como inductor de inflamación. El factor de Hageman activa la cascada caliceína-kinina y el principal producto de esta cascada la bradicinina afecta a la permeabilidad vascular, además de tener un potente efecto pro-algésico. La sensación de dolor tiene un papel fisiológico muy importante dentro de la inflamación ya que alerta al organismo de un anormal funcionamiento y por tanto de daño tisular.

1-4-3. Fragmentos del complemento: C3a, C4a y C5a (también conocida como anafilotoxina) son producidas por varias vías de activación del complemento. C5a (y en menos extensión C3a y C4a) promueve el reclutamiento de los granulocitos y monocitos e induce la degranulación de mastocitos, por tanto afectando a la vasculatura.

1-4-4. Mediadores lipídicos: (Eicosanoides y factores activadores de plaquetas) Son derivados de fosfolípidos, tal como la fosfatidilcolina, que esta presente en la parte interior de la membrana celular. Después de la activación por el calcio intracelular, la fosfolipasa A2 citosólica genera ácido araquidónico y ácido lisofosfatídico, los precursores de las dos clases de mediadores lipídicos a partir de la fosfatidilcolina. El ácido araquidónico es metabolizado para formar eicosanoides tanto por la ciclooxigenasa (COX1 y COX2), generándose prostaglandinas y tromboxanos o por la lipooxigenasa la cual genera leucotrienos y lipoxinas (Kumar, y Cols 2003). Las prostaglandinas PGE2 y PGI2, causan vasodilatación y PGE2 también hiperalgesia, además de que es un potente inductor de fiebre (Higgs y Cols. 1884). Las lipoxinas inhiben la inflamación y ayudan a la resolución de la inflamación, así como a la reparación del tejido (Serhan y Cols. 2007). La segunda clase de mediadores lipídicos, los factores activadores de plaquetas son generados por la acetilación de ácido lisofosfatídico y activan varios procesos que ocurren durante la respuesta inflamatoria, incluyendo el reclutamiento de leucocitos, la permeabilidad vascular y la activación de plaquetas. (Majno y Cols. 2004, Kumar y Cols 2003).

1-4-5. Citocinas inflamatorias como TNF alpha, familia IL-1..., son producidas por varios tipos celulares, las mas importantes: macrófagos mastocitos. Juegan varios papeles en la respuesta inflamatoria, incluyendo la activación endotelial, así como la del los leucocitos, junto con la inducción de la respuesta de fase aguda.

1-4-6. Quimiocinas producto de varios tipos celulares en respuesta a los inductores de la inflamación. Ellos controlan la extravasación de los leucocitos y la quimiotaxis hacia los tejidos dañados.

1-4-7. Enzimas proteolíticas (elastina, catepsinas, y metaloproteinasas de la matriz) tienen diversos papeles en la inflamación, en parte a través de la degradación de la matriz extracelular y de las proteínas de la membrana basal. Estas proteasas tienen un importantes papel en multitud de procesos incluyendo la defensa celular, remodelado tisular y migración leucocitaria.

No esta todavía del todo estudiado que condiciona la liberación de determinados mediadores. Además de que los mediadores no solamente actúan de forma directa sobre el tejido, si no que además son capaces de inducir a otros mediadores de forma secundaria, creándose una cascada inflamatoria organizada de forma jerárquica.

El objetivo de la respuesta inflamatoria son los tejidos y las células, especialmente a nivel de su estado funcional. La respuesta a determinados mediadores inflamatorios es casi ubicua, aunque estos mediadores tienen diferentes acciones a diferentes niveles dentro de la célula y los tejidos. Aunque la acción mas obvia de los efectores de la inflamación es inducir la formación de un exudado (por los efectos sobre vasos y migración leucocitaria), muchos mediadores tienen otros muchos efectos igual de importantes, así hay efectos sobre la función neuroendocrina-metabólica y sobre el mantenimiento tisular y la homeostasis en general (Turnbull, y Cols. 1999). Estas funciones de los mediadores inflamatorias reflejan un acción general del fenómeno inflamatorio en el control de la homeostasis tisular así como la adaptación a condiciones nocivas para el funcionamiento celular.

1-5. Control de la homeostasis a través de respuestas de estrés y adaptación

El control de los mecanismos de homeostasis posibilita que el metabolismo celular (como los niveles de glucosa o las concentraciones de O₂) se mantengan dentro de un rango adecuado para el correcto funcionamiento celular (Cannon y Cols 2006). Agresiones celulares pueden causar un desviación de algunos de estos parámetros dando lugar al desencadenamiento de la respuesta de fase aguda que permiten una adaptación mas sostenida a la nueva situación. El termino de inflamación aguda y crónica implica diferentes tipos de adaptación celular, que actúan cuando otros mecanismos de regulación homeostática son insuficientes.

Se cree que la respuesta inflamatoria opera en graves alteraciones de la homeostasis como puede ser una infección, el daño tisular y la presencia de cuerpos extraños o irritantes. Sin embargo, las infecciones y los daños están en el máximo de las posibles agresiones celulares que pueden llegar a dar lugar a una inflamación y por tanto desencadenara una respuesta en consecuencia de la mas alta magnitud posible (por ello es la respuesta inflamatoria mejor caracterizada y conocida). De forma mas general, es presumible que una vez que se produce una perdida de la homeostasis celular se va a dar lugar al inicio del fenómeno inflamatorio. Estos tipos de respuesta inflamatoria serian los mas comunes de todos, pero serian de una menor magnitud que la inducida por una infección o daño tisular. La naturaleza y el grado de mal funcionamiento tisular puede influir en el hecho de que la respuesta inflamatoria pueda o no ser detectada con los medios habituales. El grado de las alteraciones tisulares provocadas puede cubrir un rango variable que va desde un daño medio a uno masivo, provocándose una inflamación en concordancia con el daño provocado. Un daño mínimo puede ser resuelto por las propias células del tejido dañado mientras un daño de mas importancia requeriría la actuación de leucocitos extratisulares así como de diferentes proteínas plasmáticas. Estos efectos tardíos secundarios a una lesión extensa son los descritos clásicamente como respuesta inflamatoria. A diferencia de la señal inflamatoria causada por una infección o daño tisular extenso, las señales, mediadores y su procesamiento todavía son bastante desconocidas.

Independientemente de la causa de inflamación, su propósito es hacer desaparecer o mitigar la causa que esta produciendo el daño para permitir al huésped de esta forma adaptarse a las condiciones de estrés y por ultimo restaurar la funcionalidad y homeostasis del tejido. Si las condiciones que condujeron a este estrés son transitorias, una respuesta

inflamatoria aguda será capaz de lograr la restauración de la funcionalidad y homeostasis tisular. Si por el contrario las condiciones de estrés son mantenidas en el tiempo provocara un estado inflamatorio crónico que dará lugar a un cambio en el funcionamiento tisular. Este cambio adaptativo a menudo ofrece beneficios a corto plazo sin embargo en un fase ya mas crónica llegara a producirse una descompensación, un ejemplo de ello es una desensibilización a la insulina progresiva a nivel del musculo esquelético y otro ejemplo seria la metaplasia escamosa del epitelio respiratorio. Mas específicamente una disminución de la sensibilidad transitoria a la insulina podría permitir una redistribución de la glucosa desde su principal consumidor que es musculo esquelético hacia leucocitos y otros tipos celulares que pueden requerir un mayor aporte energético durante una infección y reparación tisular.

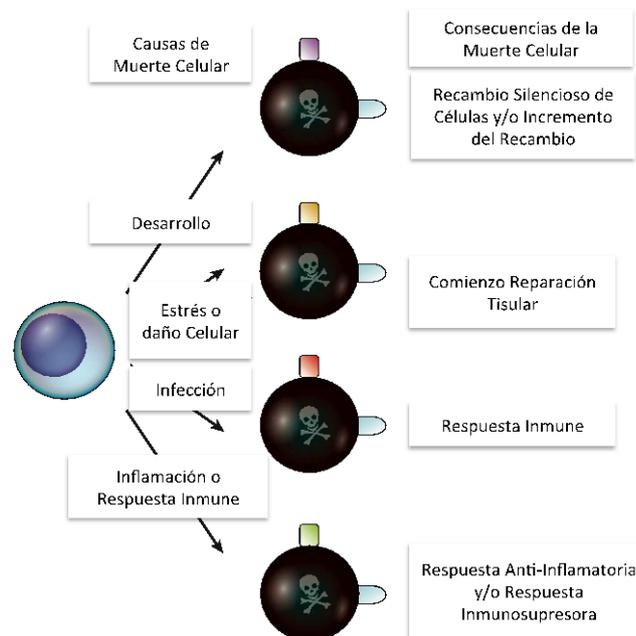


Figura 10: Muerte celular y sus consecuencias: las células apoptóticas expresan el lípido fosfatidilserina (azul) sobre la membrana plasmática, posibilitando su reconocimiento y subsecuentemente su fagocitosis por los macrófagos. Además las células apoptóticas probablemente produce otras señales (rectángulos coloreados) que son los que posibilitan su reconocimiento por los macrófagos, aunque el tipo de señal es dependiente de la causa de muerte celular. (Medzhitov y Cols. 2008).

Sin embargo una resistencia a la insulina en el musculo esquelético de forma mantenida puede conducir al desarrollo de DMII. A pesar de que la metaplasia escamosa pueda tener un beneficio a corto plazo ya que protege el tracto respiratorio del daño provocado por irritantes, ocasionara un empeoramiento de la función respiratoria a largo plazo. Además, los cambios adaptativos inducibles generalmente ocurren a expensas de

otros muchos procesos y por tanto no podrán mantenerse sin provocar por otro lado efectos adversos por una pérdida de la eficacia a la hora de realizar sus funciones. Por ejemplo, la respuesta de fase aguda y el edema tienen ambos valores adaptativos durante la infección bacteriana pero ocurre a expensas de empeorar el normal funcionamiento de muchos tejidos. Durante los fenómenos inflamatorios agudos se incrementan los niveles de proteínas plasmáticas, esto provocaría una alteración de la presión oncótica, el cual tiene la capacidad de provocar múltiples efectos adversos sobre el sistema circulatorio, y además causa hipoxia a nivel local por un incremento de la distancia entre las células y los capilares.

El potencial para provocar efectos adversos es intrínseco a cualquier cambio adaptativo, independientemente que estos sucedan a nivel celular, tisular o del organismo completo, o sea la agresión y su adaptación va a ocurrir a expensas de perder el funcionamiento celular normal. Existen varios sensores relacionados con la detección de agentes nocivos e inducir la subsiguiente respuesta adaptativa: así el golpe de calor, hipoxia, ROS, glucosa y deprivación de amino ácidos son sensadas por HSF-1, HIF-1 α , NRF-2, AMPK y ATF4 respectivamente, estos cambios ocurren a expensas del funcionamiento celular normal y si la agresión es mantenida llevara a disfuncionamiento. A nivel del organismo, un ambiente desfavorable como frío, desnutrición o deshidratación afecta el cambio entre procesos antagonistas fisiológicos que promueven tanto la reproducción como el mantenimiento corporal. Este cambio es controlado por la vía de IGF-1-FOXO con la activación del factor de transcripción FOXO llevando aun incremento de la resistencia al estrés. Esta transición suele ocurrir a expensas de las funciones normales principalmente la reproducción. (Figura 4).

1-6. Estados Celulares

Cualquier célula puede encontrarse en uno de los cuatro estados posibles: basal, estresada, apoptótica o necrótica. Una célula en su estado basal cuando las condiciones en que se desarrollan son normales y esta situación se mantiene por el hecho de la disponibilidad de nutrientes, oxígeno y factores de crecimiento y por su adhesión a otras células y/o a la matriz extracelular. Un cambio en cualquiera de los parámetros ambientales de crecimiento celular (temperatura, osmolaridad, oxígeno...) va a provocar una respuesta a ese estrés ambiental, lo que en esencia es una adaptación celular a esas condiciones

anormales. Si el cambio ambiental es mas importante que la capacidad de respuesta celular ante ese estrés, la célula entrara en apoptosis. Si el cambio es aun mayor, la célula entrara en necrosis.

Cada uno de estos cuatro estados celulares es regulado por vías de señalización específicas. Evidencias recientes indican que incluso la necrosis es regulada por códigos genéticos específicos (Zong y Cols. 2006). Las vías que inducen o mantienen cada uno de estos estados están conectadas con lo que se inhibe el paso al siguiente estado como se demuestra con los siguientes ejemplos: el estado basal puede ser mantenido a través de las vías de supervivencia celular de forma dependiente a un factor denominado IGF1, el cual inhibe la respuesta al stress regulada por los factores de transcripción FOXO (Huang y Cols. 2007). El factor de transcripción NFkappaB inhibe la apoptosis por múltiples mecanismos (Ghosh y Cols. 2002). Los efectores de apoptosis caspasa 3, caspasa 6 y caspasa 7 inactivan PARP (relacionado con la reparación de DNA), y por tanto la necrosis dependiente del bloqueo de la necrosis dependiente de PARP (lo cual ocurre por la depleción del NAD citosólico, substrato de PARP (Zong y Cols 2006).

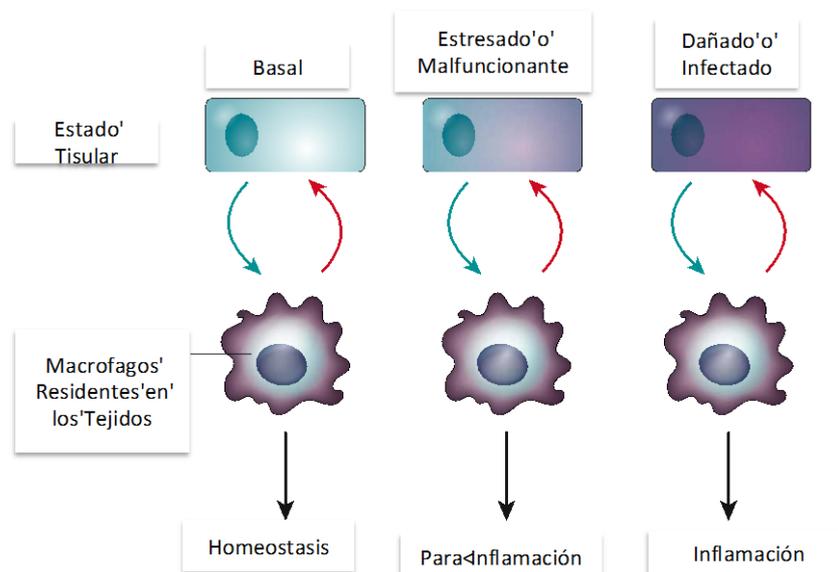


Figura 11: Tres modelos de adaptación y mantenimiento de la homeostasis tisular: El estado funcional de tejido puede encontrarse desde basal a estresado pasando por malfuncionante y por ultimo dañado o infectado. El estado afecta el modo de mantenimiento de la homeostasis tisular llevada cabo por los macrófagos tisulares y en algunos tejidos por otros tipos celulares. En el extremo mas grave nos encontramos los daños por daño o infección, en el otro extremo tenemos el estrés tisular o malfunción que va a dar lugar a una para-inflamación, que ayuda a la adaptación de tejido a

las nuevas condiciones funcionales restaurar la función tisular. La para-inflamación puede ser responsable de los estados de inflamación crónica, asociados con muchas patologías de las sociedades occidentales como DMII y aterosclerosis. (Medzhitov y Cols. 2008)

De esta manera el paso de un estado celular a otro de peor condición funcional esta inhibido hasta que la situación es inevitable dado el grado de daño celular, esto tiene dos grandes implicaciones, una se asegura que la transición ocurre de un manera brusca en vez de ser gradual, y esto es importante por que permite a la célula agotar los intentos de permanecer en un estado funcional mas alto antes de claudicar. Segundo cada célula puede expresar distintos conjuntos de señales que reflejan el estado celular y el cambio brusco evita señalizaciones celulares ambiguas.

El estado celular y tisular probablemente es principalmente controlado por macrófagos tisulares (y en algunos tejidos también por mastocitos). Cuando los tejidos se encuentran en un estado basal, los macrófagos tisulares mantienen la homeostasis celular gracias a una amplia variedad de mecanismos específicos de ese tejido. Los macrófagos constituyen el 10-15% de la mayoría de los tejidos y sus funciones se extienden mas allá de la defensa y eliminación de las células apoptóticas (Hume y Cols. 2006). Ejemplos de esto son el recambio de las células epiteliales, la regulación de la actividad metabólica de los adipocitos y el remodelado del hueso (llevado a cabo por osteoclastos) (Hume y Cols. 2006). Cuando los tejidos se encuentran en condiciones de estrés o cuando se produce un mal funcionamiento por otras razones, se emite un conjunto de señales a los macrófagos tisulares diferente de las enviadas cuando los tejidos se encuentran en su estado basal. Los macrófagos tisulares de hecho producen un incremento en las cantidades, o diferentes sets, de factores de crecimiento y otras señales relevantes para un tejido en particular. Cuando el estrés o mal función es máxima, la ayuda proporcionada por los macrófagos locales podría ser insuficiente y los tejidos podrían ser invadidos por macrófagos atraídos por la quimiotaxis desarrollada en los tejidos enfermos. Por tanto, los adipocitos malfuncionates procedentes de animales obesos secretan la quimiocina CC que se une al ligando CCL2, esto posibilita la llegada de mas macrófagos al tejido adiposo (Kanda, y Cols 2006). Los tejidos hipóxicos producen la quimiocina CXC que se une al ligando CXCL12, lo que posibilita la llegada de mas macrófagos (Ceradin y Cols 2005). Existen muchos mas casos en que se produce el reclutamiento de los macrófagos como consecuencia de un daño tisular o condición especifica (Mantovani y Cols 2004). (Figura 5).

Además, las señales tisulares pueden controlar el estado de activación y el tipo de reclutamiento macrofágico (Mantovani y Cols 2004). El principal propósito de estas interacciones es ayudar a los tejidos a adaptarse a las condiciones de estrés y restaurar su funcionalidad. Sin embargo, cuando estas interacciones son mantenidas o se producen en exceso, llegan a ser mal adaptativas, como se evidencia por el hecho que los macrófagos reclutados contribuyen a la resistencia a la insulina que se produce en el tejido adiposo. Además, la función accesoria de los macrófagos (asistir a la adaptación de los tejidos al estrés) puede ser utilizada por células tumorales, las cuales pueden reclutar macrófagos y utilizarlos como fuente de factores de crecimiento, factores angiogénicos y quimiocinas. Varios ejemplos de este hecho han sido documentados y son un paso crucial en la progresión tumoral y la metástasis. (Condeelis y Cols. 2006) (Vidal-Vanaclocha y Cols. 2000).

Si el malfuncionamiento tisular es excesivo y la adaptación no es posible mantenerla por más tiempo, las células mueren por apoptosis o necrosis. La infección y el daño tisular son los contribuyentes más comunes a la transición, pero como ya se ha comentado existen otras agresiones que también pueden conducir a esta situación. Los daños pueden producirse a través de inductores de inflamación, en estos casos, la muerte celular es llevada cabo por macrófagos. Además de retirar las células apoptóticas y necróticas, la acción de los macrófagos va desde la eliminación silenciosa de las células muertas a la inducción de la respuesta inflamatoria (Rock, y Cols 2008). La apoptosis por el contrario puede ocurrir por varias razones, y los macrófagos deben ser capaces de descodificar las causas de la muerte para actuar de la forma correspondiente. En este sentido, para cada una de los cuatro o más situaciones en las cuales ocurre la apoptosis es posible un diferente desenlace.

Primero durante el desarrollo de la apoptosis, las células muertas son retiradas por macrófagos sin ninguna otra consecuencia. Ya que esta forma de apoptosis es parte intrínseca del normal funcionamiento del recambio celular, por lo que no se necesitan acciones adicionales (aunque en el caso del recambio celular, los macrófagos podrían producir factores de crecimiento que promueven la proliferación celular, para restituir las células muertas).

Segundo, la apoptosis inducida por daño celular excesivo sobre células no programadas para muerte celular, esto debe ser compensado por la generación de nuevas

células del mismo tipo. Por tanto, los macrófagos al reconocer la muerte celular de forma prematura suele inducir casi siempre una respuesta de cara a reparar el tejido.

Tercero la apoptosis inducida por una infección (incluyendo el proceso dependiente de Caspasa-1 conocido como piroptosis (Fink y Cols. 2005), cambia la función macrofágica enfocándola hacia la defensa del huésped, por tanto promueven la generación de una respuesta inmune.

Cuarta la apoptosis inducida por inflamación o respuesta inmune debería tener los efectos contrarios a la apoptosis inducida por una infección. El reconocimiento de las células apoptóticas por los macrófagos, en este caso, debería producir la inducción de vías antiinflamatorias e inmunosupresoras. Esto se demuestra por una serie de vías antiinflamatorias controladas por la familia TAM de receptores de tirosin-kinasas (Rothlin y Cols 2007).

Los macrófagos reconocen todas las células apoptóticas (independientemente de los mecanismos de apoptosis) gracias a la detección de fosfatidil serina en la superficie de estas células (Ravichandran, y Cols 2007). La existencia de varias formas de apoptosis es determinada probablemente gracias a señales adicionales producidas de forma diferenciada por las células apoptóticas dependiendo de las causas que la han llevado a la muerte.

1-7. Inflamación: Respuesta tisular al estrés

La analogía entre inflamación y la respuesta al estrés esta ilustrada por una razón adicional: la inflamación local se desarrolla a través de una respuesta tisular al estrés, mientras que la inflamación sistémica es respuesta al estrés que ocurre a nivel de todo el organismo. De hecho, en algunos casos no esta claro donde se dibuja la línea que separa la respuesta al estrés celular clásica y la inflamación.

La principal distinción podría ser que la respuesta al estrés celular se compone de un gran numero de adaptaciones celulares, mientras que la inflamación típicamente opera a nivel del tejido u organismo en general. Sin embargo, incluso en la respuesta de estrés clásica hay componentes que no se circunscribe a la autonomía celular. Por ejemplo, hipoxia es sensada por HIF-alpha e induce una adaptación celular a la restricción de O₂, pero

también da como resultado la producción de VEGF, el cual induce la adaptación tisular a través de la angiogénesis. Las infecciones virales inducen una respuesta celular autónoma pero también dan lugar a la producción de IFN-beta, el cual induce una adaptación a nivel tisular para el virus induciendo un estado antiviral alrededor de las células.

Además en la mayoría si no en todas las respuestas celulares además de los cambios adaptativos celulares autónomos, se produce la secreción de factores que afectan a otras células del tejido incluyendo a los macrófagos tisulares. De hecho estos últimos podrían ser células centinelas que no sensan solamente el daño o la infección si no también otros tipos de condiciones nocivas. De hecho los macrófagos podrían tener funciones tróficas esenciales para la homeostasis y mantenimiento tisular (Pollard 2009) y presumiblemente también para la adaptación al estrés. Dependiendo de la naturaleza del problema los macrófagos tisulares puede contribuir a la entrada de nuevas células (como diferentes tipos de monocitos) que afectaran al tejido incluso cuando el problema no esta asociado con infección o daño. Así los macrófagos infiltran el tejido adiposo de los animales obesos, un fenómeno con bien conocidas consecuencias patológicas (insulin-resistencia) pero sin un objetivo fisiológico conocido (Schenk y Cols. 2008). La respuesta tisular al estrés esta dirigida por macrófagos y mastocitos siendo esta un paso intermedio entre la respuesta al estrés celular autónoma y la respuesta inflamatoria conocida como Parainflamación (Medzhitov y Cols 2008).

1-8. Para-Inflamación

Los estados celulares son estados definidos mas que una transición, además la transición entre los estados ocurren en un mecanismo del todo o nada, por el contrario los estados tisulares son graduales, los tejidos pueden contener un numero diferente de células muertas, por ejemplo, o pueden tener un malfuncionamiento en diferentes grados. De acuerdo a esto la respuesta adaptativa desarrollada por los tejidos puede tomar diferentes formas dependiendo del grado del daño que se este produciendo. Por tanto en condiciones basales, los tejidos se mantienen en un estado homeostático en muchos casos con la ayuda de macrófagos residentes en el tejido. En condiciones nocivas, los tejidos entran en estrés y pueden funcionar de forma inadecuada. Si los cambios son importantes, entonces la adaptación a esa condición requiere la ayuda de macrófagos tisulares y reclutados a partir de la sangre periférica y podría requerir la aportación de leucocitos adicionales y proteínas plasmáticas, dependiendo de la extensión del problema. Esta respuesta adaptativa tiene la

característica de que es un intermedio entre los estados basal e inflamatorio. Y podría llamarse para-inflamación.

La respuesta para-inflamatoria es gradual, en un extremo esta próxima al estado basal, mientras que por otra es el inicio a la transición hacia la inflamación. La inducción de esta respuesta no requiere un daño celular o una infección, por tanto el cambio se produce por un malfuncionamiento tisular, de acuerdo a restaurar la funcionalidad tisular y la homeostasis. Si el malfuncionamiento tisular es mantenido en el tiempo, la para-inflamación se convierte en crónica. El subsecuente malfuncionamiento puede ser el resultado de mutaciones o factores ambientales. Puede también ser causada por rasgos mal adaptativos que son los responsables de muchas enfermedades humanas. Muchas enfermedades crónicas metabólicas no secundarias a agentes infecciosos o agresiones, parecen asociadas a condiciones no presentes en la ontogenia de la raza humana, incluyendo la continua biodisponibilidad de nutrientes de alto poder energético, niveles bajos de actividad física, exposición a compuestos tóxicos, supervivencia cada vez más alta. Las enfermedades humanas asociadas a estas condiciones, incluyendo la obesidad, DMII, aterosclerosis, asma, enfermedades neurodegenerativas, se caracterizan por bajos niveles de inflamación (para-inflamación), la cual podría no tener una significación clínica. Además, la para-inflamación crónica que persiste en estas condiciones, podría contribuir a una progresión de la enfermedad, en parte causada por los cambios metabólicos asociados a dicha inflamación (como la sensibilidad a la insulina o la T/A).

El alcance de la significación de la inflamación propuesto es consistente con el hecho del papel que tiene la inflamación dentro del metabolismo en su papel de mantenimiento de la homeostasis tisular, monitorizando el malfuncionamiento tisular y promoviendo la adaptación a las condiciones adversas y estados disfuncionantes que los tejidos no pueden resolver por ellos mismos. Esta idea está de acuerdo con el hecho de que muchos mediadores inflamatorios, juegan también un importante papel en la homeostasis, por ejemplo en la reparación de tejido, control del metabolismo, y regulación del eje hipotálamo-hipofisario. Por tanto el proceso inflamatorio puede extender la capacidad homeostática del organismo y complementar los mecanismos de homeostasis proporcionados por el sistema endocrino y vegetativo.

1-9. Regulación de la respuesta infamatoria

La respuesta inflamatoria puede ser controlada a varios niveles (Nathan y Cols. 2002), pero los principales reguladores no son conocidos a día de hoy, en parte en consecuencia de la gran complejidad de la respuesta inflamatoria y la gran cantidad de participantes. Por un lado una forma de comprender esta trama tan compleja es diferenciar entre diferentes puntos de control que se dan en esta respuesta y considerar los diferentes modos de actuación de las señales reguladoras.

De inicio la respuesta inflamatoria puede ser controlada a cuatro niveles, correspondiendo a los cuatro componentes de la inflamación inductores, sensores, mediadores y tejidos diana.

Un punto de control importante se produce a nivel de los mediadores inflamatorios a través de señales anti-inflamatorias como IL-10, TGF-beta, glucocorticoides. Sin embargo las señales anti-inflamatorias podrían actuar sobre el tejido diana por ellos mismos. Primero la respuesta del tejido diana a los mediadores inflamatorios puede ser regulada a nivel de receptores y vías de señalización activadas por mediadores. Este modo de regulación aporta un nivel extra de especificidad al controlar que tejidos responden así como la extensión y duración de la respuesta a un determinado mediador. Es de destacar como muchos mediadores inflamatorios como PGE2 pueden llevarse a cabo a través de múltiples subtipos de receptores que tienen efectos antagónicos en el tejido diana. En otros casos, la acción de los mediadores inflamatorios puede ser moderada por receptores señuelo, para lograr un control más específico de los diferentes tipos de receptores. Segundo, las señales anti-inflamatorias pueden revertir los efectos de los mediadores sobre el tejido diana. Por ejemplo, noradrenalina puede revertir los efectos de histamina y bradicidina en el músculo liso bronquial al inducir broncodilatación. Vasoconstricción y vasodilatación también pueden ser controladas por pro y ante señales inflamatorias sin afectar la producción de mediadores inflamatorios. La ventaja de este tipo de control es que selectivamente se encarga de regular la respuesta de diferentes tejidos diana sin afectar a la intensidad o duración de la respuesta inflamatoria.

Los mecanismos reguladores son a menudo específicos para un componente particular de la respuesta inflamatoria. Por tanto más allá que inhibir la respuesta de forma

completa, muchas señales anti-inflamatorias inhiben selectivamente ciertos aspectos de la respuesta. Los ejemplos incluyen los efectos de la IL-10 y glucocorticoides sobre la respuesta inflamatoria inducida por TLR en los macrófagos. Estas señales anti-inflamatorias inhiben la expresión de solo el 10-15% de los genes inducibles por TLR. Parece suceder lo mismo con muchas otras señales anti-inflamatorias. La razón de esta selectividad de regulación es que la respuesta inducida por los sensores inflamatorios como TLR típicamente tiene múltiples componentes funcionales. Por tanto, además de los mediadores inflamatorios TLR induce la expresión de genes antimicrobianos, de reparación tisular o metabólicos. Estos componentes podrían necesitar ser regulados de forma independiente, lo cual presumiblemente explica el hecho de que la mayoría de las señales anti-inflamatorias actúan de manera específica. Este tipo de control es a menudo regido a nivel de la transcripción génica.

Otro importante aspecto del control de la respuesta inflamatoria es el hecho en que se producen las señales anti-inflamatorias. Por ejemplo, IL-10 es producido como resultado de una respuesta inflamatoria y su actividad es un parte de un feedback negativo inducido por la inflamación. IL-10 típicamente inhibe la respuesta que el mismo inicio y actúa sobre células que producen mediadores inflamatorios, como los macrófagos o células T. Aunque los glucocorticoides pueden ser inducidos por inflamación (Besedovsky y del Rey 2000), también puede ser producida en respuesta a señales no relacionadas con la respuesta inflamatoria (estrés psicológico, ritmo circadiano...) y pueden actuar en casi todas las células incluyendo aquellas objetivo de la respuesta inflamatoria. Por tanto, IL-10 y glucocorticoides (y muchos receptores nucleares) actúan de una manera que es intrínseca o extrínseca a la vía inflamatoria respectivamente. No es de sorprender, que la IL-10 y los glucocorticoides tienen papeles no redundantes en el control de la inflamación, y podría ser útil comparar sus diferentes funciones regulatorias bajo diferentes condiciones inflamatorias.

1-10. La evolución de los rasgos adaptativos

Porque la respuesta inflamatoria está íntimamente asociada con las condiciones patológicas? Para responder a esta pregunta hay que considerar algunos principios básicos de la evolución de los rasgos adaptativos (Stearns y Cols. 2008).

Es de uso corriente asumir que cualquier proceso fisiológico es producto de la evolución, por lo que ha tenido lugar un proceso de adaptación y selección. Sin embargo, algunos rasgos puede tener lugar sin que sean adaptativos si no debidos al azar. De igual forma la evolución no necesariamente produce una solución optima para todos los problemas.

Para el propósito de esta discusión, es útil considerar dos situaciones. La primera es que un rasgo o característica particular puede ser adaptativo (que es beneficioso), si fue seleccionado fue porque proporcionaba efectos positivos sobre el funcionamiento del organismo (y en ultimo caso en el éxito reproductivo del organismo). Es importante destacar que tales rasgos son adaptativos en las condiciones que estaban presentes cuando se desarrollaron. Si estas condiciones cambian lo suficiente, los mismos rasgos pueden ser perjudiciales. La obesidad y la alergia son ejemplos de rasgos mal-adaptativos. La segunda situación es que un rasgo puede ser no adaptativo cuando existe como una consecuencia de otro (adaptativo) pero que no tiene un valor positivo por si mismo. El shock anafiláctico y la destrucción de tejidos por los neutrófilos activados son ejemplos de rasgos no adaptativos. Estos no fueron seleccionados para ello, porque son neutrales o perjudiciales con respecto a la actividad de un organismo (en las condiciones en las que se desarrolla) pero existen como una consecuencia de un rasgo adaptativo. Esta segunda situación es común y constituye una compensación de la evolución entre los efectos beneficiosos de los rasgos adaptativos y los efectos perjudiciales de los rasgos no adaptativos con los cuales ellos se emparejan. En esta condición los efectos beneficiosos están compensando los efectos perjudiciales. Pero de nuevo un cambio en las condiciones puede cambiar el balance de esta compensación, provocando que los rasgos no adaptativos se conviertan en una carga substancial para el organismo. Esta situación es característica de especies jóvenes como los humanos que no han alcanzado todavía un equilibrio evolutivo. Muchas enfermedades humanas recientes son resultado de una falta de este equilibrio causado por cambios en las condiciones ambientales o del estilo de vida.

Dado este problema por muy especializado que sea el mecanismo se producirá un daño tisular no deseado, esta en discusión la existencia de un mecanismo especializado que minimice el daño inflamatorio, si existiera debería actuar sin afectar los aspectos protectores de la inflamación, por ejemplo, controlando la respuesta de los tejidos diana a los

mediadores inflamatorios a través de la inducción de mecanismos citoprotectores (Seixas y Cols. 2009).

Cuando consideramos el proceso inflamatorio, hay muchos ejemplos de rasgos adaptativos y no adaptativos. Sin embargo para muchos procesos de inflamación crónica, solo el aspecto patológico (mal adaptativo) son evidentes, y no se llegan a entender sus rasgos fisiológicos (adaptativos), los que por otro lado se supone que existen. Distinguir entre las características adaptativas y no-adaptativas no solamente se investiga para lograr una mayor comprensión de la inflamación si no también para el desarrollo de eficaces estrategias terapéuticas. Por ejemplo ambas respuestas pueden contribuir a los síntomas (propriadamente a la compensación inherente), pero la interferencia con los procesos adaptativos pueden producir un empeoramiento mientras que el bloqueo de la no-adaptativa puede ser beneficioso y no causaría efectos adversos secundarios. (Figura 6)

D. CANCER E INFLAMACION

Los puntos en común entre cáncer e inflamación fueron postulados en el siglo XIX, al objetivarse que los tumores muchas veces anidan en zonas de inflamación crónica y que las células inflamatorias estaban presentes en las biopsias procedentes de estos tumores (Balkwill y Cols. 2001). La idea de que estos procesos están relacionados se conoce desde hace mas de 100 años aunque es en los últimos años cuando esta resurgiendo el interés. Varias líneas de investigación (Karin y Cols. 2006) basados en un amplio numero de evidencias que comprenden desde a estudios epidemiológicos a estudios moleculares realizados en ratones modificados genéticamente, han proporcionado las pruebas definitivas de esta unión.

Los estudios epidemiológicos han mostrado que la inflamación crónica predispone a padecer varios tipos de cáncer. Se estima que las infecciones y la respuesta inflamatoria están en relación con el 15-20% de todas las muertes debidas al cáncer (Balkwill y Cols. 2001). Hay muchos iniciadores de la inflamación crónica que incrementan el riesgo de desarrollar cáncer. Entre ellos nos encontramos infecciones microbianas (por ejemplo la infección por *Helicobacter pylori* esta asociada con el cáncer gástrico y el linfoma de la mucosa gástrica), enfermedades autoinmunes (por ejemplo, enfermedades inflamatorias

intestinales están en relación con el cáncer de colon) y condiciones inflamatorias de origen desconocido (por ejemplo la prostatitis esta asociada con el cáncer de próstata). De acuerdo con estos el tratamiento con agentes anti-inflamatorios no esteroideos disminuiría esta incidencia y la mortalidad resultante en varios tipos de tumores (Koehne y Cols. 2004; Fiossmann y Cols 2007; Chan y Cols 2007).

Los puntos a tener en cuenta en esta relación incluyen la presencia en los tejidos tumorales de células y mediadores inflamatorios (por ejemplo quimiocinas, citocinas y prostaglandinas), así como un remodelamiento tisular y angiogénesis similar a las que se observan en las respuestas inflamatorias crónicas y los fenómenos de reparación tisular. Estas señales de inflamación latente (Balkwill y Cols. 2005) están presentes en los tumores en los cuales, no ha sido establecida una firme relación causal con la inflamación (por ejemplo, en el tumor de mama). Un estudio mas detallado lleva a concluir que las células y los mediadores inflamatorios están presentes en el microambiente tumoral independientemente del iniciador que los desarrolla.

Los estudios sobre ratones modificados genéticamente y los análisis sobre tumores humanos han permitido a los investigadores empezar a desentrañar las vías moleculares que unen el proceso inflamatorio con el tumoral.

1. Inflamación y Oncogenes

La conexión entre inflamación y cáncer es través de dos vías de señalización: la extrínseca, llevada a cabo por la inflamación que incrementan el riesgo tumoral (como la enfermedad inflamatoria intestinal); y la vía intrínseca, llevada a cabo por alteraciones genéticas que causan inflamación y neoplasia (como los oncogenes) (fig. 1).

La vía intrínseca fue descubierta cuando se objetivaron células inflamatorias y mediadores presentes en el microambiente tumoral de la mayoría sino todos los tumores e incluso están presentes en los casos en los cuales no hay datos epidemiológicos de inflamación basal. Este hecho nos hace cuestionarnos sobre los eventos genéticos pro-tumorales responsables de la generación de ambiente inflamatorio. Esta cuestión se ha mantenido en los últimos años gracias a modelos preclínicos y clínicos donde se han objetivado el papel jugado por varios oncogenes. Un ejemplo de ello seria el carcinoma papilar de tiroides. Se ha descubierto reordenamientos cromosómicos que afectan a la

proteín tirosin-kinasa RET y este reordenamiento es un evento temprano en la patogénesis de este tumor siendo un evento necesario y suficiente para el desarrollo de este tumor. En un contexto celular apropiado el cual es proporcionado por células del parénquima tiroide, la activación de RET induce un programa transcripcional que es similar al que ocurre en la inflamación (Borrello y Cols 2005) (fig. 2). El transcrito secundario a la activación de RET incluye RNAm perteneciente a varios factores: CSFs (factores estimulantes de colonias), que promueven la supervivencia de leucocitos y su reclutamiento desde los vasos sanguíneos; IL-1B una de las principales citocinas inflamatorias, Ciclooxygenasa 2 (COX2), el cual es expresado frecuentemente por las células tumorales y esta relacionado con la síntesis de prostaglandinas, quimiocinas que son capaces de atraer monocitos y células dendríticas (CC-CCL2 y CCL20); quimiocinas que promueven la angiogénesis (como IL-8, también conocida como ligando CxC-quimiocina 8 (CXCL8), el receptor quimiocina CXC-Receptor quimiocina 4 (CXCR4), el cual se une a CXCL12; Enzimas que degradan la matriz extracelular; y la molécula de adhesión leucocitaria selectina (L-selectina). Los componentes proteicos de la vía inflamatoria RET se encuentran en biopsias tumorales y grandes cantidades de estas moléculas inflamatorias son aisladas en tumores primarios de pacientes con adenopatías. (Borrello y Cols. 2005). Estos resultados muestra que un evento genético temprano es necesario y suficiente para el desarrollo de un tumor en humanos y esto ocurre gracias a la construcción consecuente de un ambiente inflamatorio (Borrello y Cols. 2005). Aunque este (Borrello y Cols. 2005; De Falco y Cols. 2007) y otros resultados (Xu y Cols. 2007) conecta con la activación de oncogenes que codifican proteínas tirosin-kinasas que promueven la inflamación, el papel preciso que juegan estos compuestos inflamatorios en la progresión tumoral esta comenzando a ser definido. (Figura 7)

Miembros de la familia RAS, el oncogén dominante que muta con mas frecuencia, actúa a través de la vía de señalización RAS-RAF que va a dar lugar a la generación de quimiocinas y citocinas inflamatorias que promueven la progresión tumoral (Guerra y Cols. 2007). Otro oncogén MYC, codifica un factor de transcripción que esta sobreexpresado en muchos tumores humanos, la desregulación de la expresión de este gen inicia y mantiene aspectos claves en el fenotipo tumoral. Además de la producción de proliferación independiente de la regulación celular, MYC provoca la adaptación del microambiente extracelular mediante células inflamatorias y mediadores que intervienen en el desarrollo tumoral. En un modelo murino sobre un modelo tumoral de células beta pancreáticas

dependientes del oncogén MYC, la primera fase de angiogénesis se debe a la activación de un programa transcripcional por parte de MYC, que posibilita la producción de la citocina IL-1B (Shchors y Cols. 2006). La activación de MYC también permite la producción de varias citocinas que actúan como atrayentes de mastocitos, esto se sabe que son capaces de guiar la angiogénesis y en este caso junto con la IL-1B, de procurar la formación de nuevos vasos, así como del crecimiento tumoral. (Soucek y Cols. 2007). (Figura 8)

Estos estudios sobre los miembros de la familia RAS y MYC muestran que los oncogenes promueven la creación de un microambiente tumoral en el tejido en el que se desarrollan (vía intrínseca), pero los resultados obtenidos hasta este momento, no se centran en el carácter de la interacción entre los oncogenes y las condiciones inflamatorias que incrementan el riesgo de desarrollo del tumor (vía extrínseca). Esta interrelación ocurre por ejemplo en el carcinoma de páncreas en que ambas vías de actuación confluyen e interactúan en un proceso inflamatorio en forma de pancreatitis junto con mutaciones en el oncogén K-RAS.

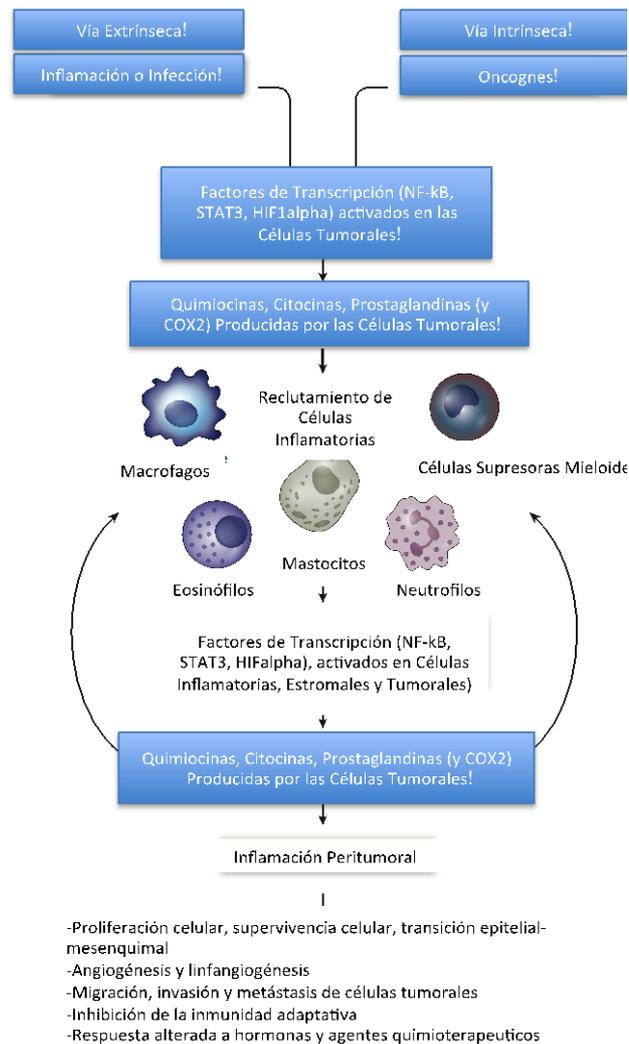


Figura 12: Vías que conectan inflamación y cáncer: Esta conectadas por dos vías intrínseca y extrínseca. La vía intrínseca esta activada por eventos genéticos que causan neoplasia. Estos eventos incluyen la activación de varios tipos de oncogenes por mutaciones, reordenamiento o amplificación cromosómicos e inactivación de genes supresores de tumores. Las células transformadas producen mediadores inflamatorios, generando por tanto un microambiente inflamatorio en los tumores que no nacen a partir de un estado inflamatorio previo (tumor mama). Por el contrario en la vía extrínseca, las condiciones inflamatorias e infecciosas aumentan el riesgo de desarrollar cáncer en ciertos sitios anatómicos (colon, próstata y páncreas). Las dos vías convergen dando como resultado la activación de factores de transcripción, principalmente NF-kB, STAT3 e HIF1alpha, en las células tumorales. Estos factores coordinan la producción de mediadores inflamatorios, incluyendo citocinas y quimiocinas como la producción de COX2 (que dará lugar a la producción de prostaglandinas). Estos factores reclutan y activan varios leucocitos , lo mas notable células del linaje mielomonocítico. Las citocinas activan los mismos factores de transcripción en las células inflamatorias, estomales y tumorales dando lugar un incremento del estado inflamatorio. La inflamación latente relacionada con el tumor tiene acciones pro tumorales muy importantes (Mantovani y Cols. 2008).

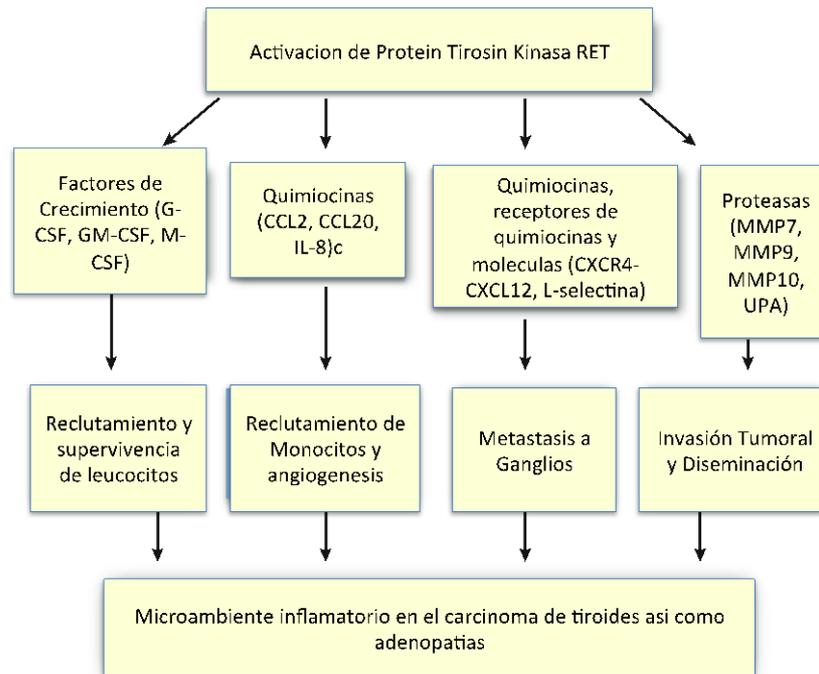


Figura 13: Oncogenes e inflamación: una clase de oncogenes codifica para la proteína tirosin-kinasa que esta continuamente activada como resultado de un reordenamiento cromosómico que afecta a RET siendo un efecto temprano en la patogénesis del carcinoma papilar de tiroides.

Las proteínas supresoras de tumores también pueden regular la producción de mediadores inflamatorios. Ejemplos de estas son la proteína VHL, TGF-beta y PTEN (Staller y Cols. 2003). VHL es un componente del complejo molecular que actúa sobre el factor de transcripción HIF1alpha, provocando su degradación. HIF1 alpha promueve la respuesta celular a la hipoxia, incluyendo la angiogenesis. También a nivel del carcinoma de células renales interactúa con NF-kB dando lugar a la producción de TNF-alpha y el receptor de quimiocinas CXCR4, estos hechos se han objetivado igualmente en otras estirpes tumorales (Staller y Cols. 2003).

Recientes evidencias en un modelo tumoral murino afirma que TGF-B una proteína supresora de tumor que participa activamente en la progresión tumoral, se encarga de la generación de un microambiente inflamatorio que favorezca el desarrollo tumoral (Bierie y Cols 2006). En un modelo animal de carcinoma de mama, la inactivación de gen que codifica el receptor tipo IL del TGF-beta (el cual inicia la carcinogenesis previniendo la acción de TGF-beta), provoca la producción de CXCL5 y CXCL12. Estas quimiocinas atraen células MDSCs, las cuales pertenecen a la línea mielomonocítica. MDSCs es un potente supresor de la

respuesta inmune adaptativa antitumoral lo cual facilita el proceso metastásico. Sería importante evaluar si se produce esta vía en tumores humanos en los que participa el TGF beta.

Por tanto, los variados tipos de oncogenes (como los que codifican proteínas tirosin-kinasas, RAS y RAF, factores de transcripción y proteínas supresoras de tumores), independientemente de su clase molecular o modo de acción, coordinan vías transcripcionales inflamatorias. Y estos parece que tienen aspectos en común como su relación con el proceso de angiogénesis, y el reclutamiento de células de origen mielomonocítico. Varias cuestiones quedan en interrogación como que componentes de la inflamación son esenciales y cuales redundantes, la relativa importancia de estos componentes en la carcinogénesis en los diferentes tejidos y la relevancia de estos componentes en los diferentes tipos celulares humanos.

2. Factores clave en la inflamación relacionada con el cáncer

En el conjunto de moléculas que se relaciona con la inflamación relacionada con el tumor deben ser identificados los factores endógenos clave (intrínsecos). Estos incluyen factores de transcripción (como el NF- κ B las señales de traducción y activación de transcripción (STAT3) y una amplia variedad de citocinas (como IL-1B IL-6, IL-23 y TNF.alpha) (Yu y Cols 2007).

NF-KB es un punto clave en la coordinación de la inmunidad innata y la inflamación, y destaca como un importante promotor endógeno de la progresión tumoral (Karin y Cols. 2006). NF- κ B es crucial en el desarrollo de tumor o como inductor de potenciales células tumorales e igualmente en el contexto de la inflamación celular. En estos tipos celulares, NF- κ B actúa en la ruta de señalización activada por microorganismos o por daño tisular a través de la vía de señalización TLR-MyD88 y por la rutas mediadas por las citocinas inflamatorias TNF-alpha y IL-1B. Además , NF- κ B puede ser activado por los cambios génicos que tiene lugar en las células tumorales ya sea en forma de amplificación , mutación o delección. (Courtois y Cols. 2006).

Tanto en células tumorales, como epiteliales en riesgo de transformación oncológica, así como en células inflamatorias, el NF- κ B activa la expresión de genes que codifican

citocinas inflamatorias, moléculas de adhesión, proteínas en la vía de síntesis de prostaglandinas como la COX 2, NOs y factores angiogénicos. Además una de las más importantes funciones del NF- κ B en células tumorales o células en las que actúan agentes carcinógenos es promover la supervivencia celular, al inducir la expresión de genes anti-apoptóticos (como BCL2). Hay también evidencias de interconexiones y vías compensatorias entre NF- κ B y el sistema HIF α (Rius y Cols. 2008), interconectando la inmunidad innata con la respuesta a la hipoxia.

Hay evidencias que apoyan que NF- κ B está relacionada con el inicio y progresión del proceso tumoral en los tejidos en los cuales se desarrollan las células tumorales sobre un ambiente inflamatorio (como en el tracto gastrointestinal y el hígado) (Pikarsky y Cols. 2004). Esta evidencia se basa en varios estudios genéticos como la búsqueda de genes que codifican para componentes del complejo I κ B kinasa (IKK). Este complejo fosforila al inhibidor de NF- κ B (I κ B), causando que se disocie de NF- κ B y permitiendo que este último se transloque al núcleo, donde puede ejercer su función como factor de transcripción. Es de destacar que el punto de actuación a nivel nuclear en células hepáticas tiene efectos divergentes en diferentes modelos de carcinogénesis, posiblemente esto ocurra en función del balance entre promotores de la apoptosis que ya habrán empezado a actuar y la proliferación celular iniciada para compensar este fenómeno (Pikarsky y Cols. 2004).

La vía de actuación del NF- κ B está controlada a diferentes niveles gracias a inhibidores que actúan a lo largo de la vía. Un ejemplo es TIR8, un miembro de la familia del receptor de IL-1. TIR8 posee un único dominio inmunoglobulina, una larga cola citoplasmática, y un receptor TIR (Toll/IL-1 Receptor) que difiere de otros miembros de la familia del receptor de IL-1. Inhibe la señalización a través de TLRs y del receptor IL-1 encontrándose altamente expresado en la mucosa intestinal. La deficiencia en el gen que codifica para TIR8 está asociada con un incremento de la susceptibilidad con la inflamación intestinal y carcinogénesis (Xiao y Cols. 2007). Por tanto el balance de inhibidores y activadores cambia la extensión por la cual la vía de señalización NF- κ B opera como un promotor tumoral endógeno.

Apoyando la conexión entre cáncer e inflamación están los estudios del papel jugado por el NF- κ B en la infiltración leucocitaria del tumor. Por ejemplo, si se produce la inactivación de los genes que codifican para IKK-B en la línea mieloide, se provocaba la inhibición de la inflamación relacionada con el tumor en el intestino así como la colitis

asociada con el cáncer, demostrando que las células inflamatorias están relacionadas con el fenómeno de carcinogénesis en el tejido (Greten y Cols. 2004). En tumores avanzados, en los que ya existe un microambiente inflamatorio latente (Balkwill y Cols. 2005), los macrófagos asociados al tumor retrasan la activación deletérea de NF- κ B (Biswas y Cols. 2006). Esta evidencia sugiere que los homodímeros de la subunidad p50 de la NF- κ B (como regulador negativo de la vía NF- κ B) son responsables de esta lenta activación de NF- κ B en los macrófagos tumorales además del fenotipo protumoral que muestran estas células (Saccani y Cols. 2006). Por tanto, NF- κ B parece que funciona como un reóstato donde su función puede interferir a diferentes niveles, tal propiedad permite regular la extensión de la inflamación tumoral, tal regulación posibilita una importante inflamación (por ejemplo en la enfermedad inflamatoria intestinal) que predispone a los individuos a desarrollar una progresión tumoral y ayuda a los macrófagos tumorales a mantener un microambiente inflamatorio latente.

Similar al NF- κ B, STAT3 es también un punto de convergencia para numerosas vías de señalización oncogénica (Bieri y Cols. 2006). Este factor de transcripción está constitutivamente activado tanto en células tumorales como en células inmunes, estando en relación con la oncogénesis y la inhibición de la apoptosis (Bromberg y Cols. 1999). Esta activación de STAT3 en las células tumorales también incrementa la capacidad del tumor para evadir el sistema inmune, al inhibir la maduración de las células dendríticas (Wang y Cols. 2004) así como la supresión de la respuesta inmune (Kortylewski y Cols. 2005).

3. Leucocitos tumorales

La infiltración leucocitaria está presente en la mayoría de tumores (por no decir todos) aunque varía en tamaño, composición y distribución. Estos incluyen macrófagos y células similares, mastocitos y células T. Hay evidencias de que estas células puedan estar relacionadas con la carcinogénesis y/o invasión tumoral y metástasis (Mantovani y Cols. 1992).

Los macrófagos tumorales son un importante componente del infiltrado leucocitario, y los estudios realizados en estos macrófagos constituyen las bases sobre el estudio de la relación que tiene este infiltrado leucocitario en la progresión tumoral. La plasticidad y

diversidad son características de los fagocitos mononucleares. Además de los macrófagos tumorales, poblaciones celulares relacionadas con ellos, como los monocitos que expresan TIE2, MDSCs y células dendríticas mieloides han sido relacionadas con el microambiente inflamatorio que rodea al tumor (De Palma y Cols. 2005). La relación ontogénica entre estas células y su completa participación en el desarrollo tumoral están todavía por dilucidar en toda su extensión.

Los macrófagos tisulares y las células relacionados en tumores murinos y humanos generalmente poseen un fenotipo M2, el cual esta orientado a promover el desarrollo del tumor, ya sea remodelando los tejidos, promoviendo la angiogénesis y suprimiendo las acciones de la inmunidad adaptativa (Mantovani y Cols. 2002). Señales que derivan tanto de células T reguladoras como de las propias células tumorales están presentes en el tejido tumoral, entre ellas tenemos M-CSF, IL-10 y TGF-beta (Mantovani y Cols. 2002) y podría intervenir en esta polarización al fenotipo M2 de los macrófagos encontrado en el interior del tejido tumoral. Sin embargo un exigente análisis de los mecanismos moleculares que conllevan esta polarización en la progresión tumoral tampoco se conoce en profundidad.

La infiltración leucocitaria esta interrelacionada con la angiogénesis, la cual es primordial en tumores de cierta envergadura. El VEGF y otras moleculares similares son potentes atrayentes de monocitos y contribuyen a la entrada en juego de leucocitos posibilitando la secreción de factores pro-angiogénicos (Sozzani y Cols 2007). Es posible por tanto que la inhibición de este reclutamiento leucocitario podría facilitar estrategias terapéuticas de cara a inhibir los mecanismos de angiogénesis.

4. Inflamación relacionada con el tumor e inmunidad adaptativa.

Hay fuertes evidencias en modelos animales murinos de que las células de la respuesta inmune realizan una vigilancia ante la aparición de células tumorales, pudiendo eliminar los tumores incipientes (un proceso llamado inmuno-editing) (Dunn y Cols. 2004). La respuesta inmune innata, la cual se manifiesta como un proceso inflamatorio, es crucial para el inicio de la respuesta inmune adaptativa. Por tanto se objetiva una divergencia en la participación de sistema inmune en el desarrollo o inhibición tumoral. Un modelo murino in vivo muestra que el adaptador de TLR MyD88 (el cual esta relacionado con la respuesta inmune innata) tiene una gran importancia en el desarrollo tumoral y en la inflamación

asociada a el, igualmente se ha comprobado que el proceso de “immuno-edinting” puede ocurrir a la vez en el mismo modelo tumoral (Swann y Cols. 2007).

Otro aspecto de la compleja interrelación entre la inmunidad adaptativa y el proceso inflamatorio que rodea al tumor se muestra por estudios *in vivo* realizados en ratones sobre el virus del papiloma humano. En este modelo los anticuerpos se depositan sobre el estroma tumoral. Estos anticuerpos funcionan como un sistema de control remoto uniéndose a moléculas no identificadas en la matriz extracelular y por tanto activando la respuesta inflamatoria que promueve la progresión tumoral (de Visser y Cols. 2005).

En neoplasia avanzadas, la respuesta inmune esta suprimida a través de la activación de varias vías. Por ejemplo la diferenciación y activación de las células dendrítica, las cuales son el punto de partida de la respuesta inmune adaptativa son inhibidas por señales como la IL-10 presentes en el microambiente tumoral. Además estos tumores están frecuentemente infiltrados por células reguladoras, las cuales suprimen tanto la respuesta inmune adaptativa como la innata. Y MDSCs proliferan sirviendo como anclaje para soportar el crecimiento tumoral; estas células, como las convencionales TAMs, son potentes supresores de la inmunidad antitumoral (Mantovani y Cols. 2002). Por tanto en la inflamación asociada al tumor, existen multitud de vías de señalización de cara a la supresión de la inmunidad antitumoral. Esta interrelación entre estas vías, su organización jerárquica y en que punto puede ser objeto de terapias antitumorales es algo a desarrollar en un futuro.

5. Vías inflamatorias en la invasión y metástasis

La mayoría de los estudios sobre la inflamación peritumoral se han centrado en las etapas tempranas del desarrollo tumoral, pero los mediadores y células inflamatorias están en relación con la migración, invasión y metástasis de las células malignas.

Los receptores de quimiocinas y sus ligandos dirigen el movimiento celular durante la inflamación, cáncer y el mantenimiento de la homeostasis, al afectar a la movilidad celular, la invasividad y la supervivencia (Balkwill y Cols. 2004). En la transformación, muchas células comienzan a expresar receptores de quimiocinas y por tanto utilizan a estas quimiocinas en la migración y supervivencia de las células tumorales en el proceso de metástasis (Balkwill y Cols. 2004). Por ejemplo, el receptor de quimiocinas CXCR4 y su

ligando CXCL12 son importantes para movimiento celular tanto en la homeostasis normal como en condiciones de enfermedad (Burger y Cols. 2006). CXCR4 es frecuentemente expresado por células tumorales (Balkwill y Cols. 2004), y la cantidad de CXCR4 expresada por tumores primarios humanos se correlaciona con la extensión con la que ocurren las metástasis ganglionares en el cáncer colorrectal, mama, hepático y esofágico. Otros receptores de quimiocinas incluyendo, (CX3C-CX3CR1, CC-CCR1, CCR7, CCR9, CCR10, CXCR1, CXCR2, CXCR5 y CXCR7), son también expresadas por células malignas procedentes de varios órganos y están implicados en metástasis organoespecíficas (Salvucci y Cols. 2006), por ejemplo la expresión de CCR7 se correlaciona con metástasis ganglionares y la expresión de CCR9 con las metástasis de melanoma en el intestino delgado. El melanoma expresa muchos de estos receptores, quizás por ello se explica porque estos son tan prometastásicos.

Como las células tumorales adquieren la habilidad para expresar receptores de citocinas?, bueno se han propuesto diversos mecanismos. Podrían contribuir a ello señales extracelulares paracrina y autocrina, así como alteraciones genéticas y epigenéticas. Un ejemplo, la referida anteriormente mutación en VHL y el reordenamiento cromosómico que afecta a RET induce la expresión de CXCR4. A pesar de todo, esta claro que la adquisición de la expresión de receptores para quimiocinas es un rasgo bastante habitual en las células tumorales de origen epitelial y mesenquimal, las cuales no expresan estos receptores y esta propiedad tendría lugar en las primeras etapas de la malignización celular (Salvucci y Cols. 2006).

La capacidad invasora de las células tumorales puede incrementarse con la presencia de citocinas proinflamatorias como TNF alpha, IL-1beta y IL-6, posiblemente como resultado de la expresión aumentada de receptores gracias a la acción de estas citocinas (Kulbe y Cols. 2007). Por ejemplo TNF alpha secretado de forma autocrina media la señal que promueve la regulación génica de CXCR4 en las células de tumor de ovario (Kulbe y Cols. 2005) y si logramos evitar la formación de los RNAm de estas citocinas reduciríamos la expresión por las células tumorales tanto de CXCR4 como su ligando CXCL12, inhibiéndose la colonización de la cavidad peritoneal, la angiogénesis y la diseminación a órganos lejanos (Kulbe y Cols. 2007). TNF alpha también se comporta como un potente estimulador de la transición epitelio-mesenquimal que ocurre en las células de cáncer de mama (Bates y Cols. 2003), así como su activación de la señal mediada por NF-kB.

Una interrelación mas profunda entre la señal por NF-kB y la metástasis fue encontrada al estudiar un modelo murino en rata donde la inactivación de los genes que codifican IKK-alpha uno de los principales componentes de la vía de señalización a través de NF-kB se encontró que estaba relacionado con la activación de forma paracrina del receptor de activación de NF-kB (RANK) en la superficie celular de las células malignas prostáticas de estirpe epitelial, a través de ligandos derivados de la infiltración leucocitaria del tumor primario. IKK-alpha esta relacionada con la vía de señalización celular, entonces la inhibición de la expresión de maspin una proteína de supresión de diseminación tumoral, por tanto esta relacionada con la promoción de la metástasis, por tanto, retirar IKK-alpha tiene el efecto contrario. Es interesante determinar que ligandos de citocinas y sus receptores pueden contribuir al efecto de IKK-alpha y como IKK-alpha esta implicado en las vías de metástasis.

Otras células intratumorales también afectan al proceso en etapas mas avanzadas de progresión tumoral. Los macrófagos se han descrito como participantes obligados de los procesos de migración, invasión y metástasis (Condeelis y Cols. 2006). El primer experimento que mostro esto de forma concluyente se relaciona con un modelo de cáncer de mama deficientes de macrófagos (Lin y Cols. 2001). Los tumores se desarrollan de forma normal pero es incapaz de metastatizar a pulmón en ausencia de macrófagos. Los mecanismos por los que ocurre la diseminación tumoral esta en relación a una interacción paracrina entre el tumor, M-CSF celular, factor de crecimiento epidermico macrófagico y los macrófagos tumorales (Wyckoff y Cols. 2007).

Los macrófagos tumorales incrementan la diseminación peritoneal del tumor así como la diseminación metastásica en un modelo de cáncer de ovario (Robinson-Smith y Cols. 2007). La habilidad de los macrófagos para ayudar al tumor de ovario en su proceso de invasividad tumoral puede modularse *in vitro*. El co-cultivo de macrófagos con células tumorales se ha visto que incrementa su capacidad de invasividad de una manera dependiente de NF-kB y TNF-alpha .

En resumen; las quimiocinas y citocinas coordinan de una manera autocrina y paracrina las células tumorales y los leucocitos infiltrantes en el tumor. Estas interacciones incrementan la migración, invasión y supervivencia de las células tumorales. Ello afectan el

crecimiento del tumor primario y la habilidad de este para desarrollar el proceso de metástasis. (Marchesi y Cols. 2004)

6. Inflamación e inhibición de la progresión tumoral.

Aunque numerosos experimentos y resultados clínicos se centran en el papel de la inflamación como promotora de la actividad tumoral, algunas evidencias no se ajustan a este patrón general. Por ejemplo una inflamación crónica como la que ocurre en la psoriasis no está asociado con un incremento en el riesgo de padecer cáncer de piel (Nickoloff y Cols. 2005). También es cierto de que algunos tumores o subgrupos tumorales, la presencia de células inflamatorias está asociada con un mejor pronóstico (por ejemplo, eosinófilos en el tumor de colon, y macrófagos intratumorales en un subgrupo de tumores de mama y de páncreas). Estas observaciones están en la línea que defiende que estas células inflamatorias podrían destruir las células tumorales (Mantovani y Cols. 1992). Así una activación adecuada de macrófagos, dentro del ambiente proinflamatorio tumoral, puede eliminar las células tumorales y facilitar el microambiente proinflamatorio que va a producir la destrucción de células tumorales, este hecho ocurre fundamentalmente gracias a la participación del endotelio vascular, aunque nunca hay que olvidar que en muchas ocasiones prevalece los efectos protumorales de la inflamación (Mantovani y Cols. 1992). La evidencia indica que NF- κ B es importante a la hora de determinar el balance entre las propiedades tumorales y anti-tumorales de los macrófagos (Hagemann y Cols. 2008), por tanto NF- κ B podría ser un objetivo terapéutico de cara a conseguir un cambio en las funciones macrofágicas desde ser promotores tumorales a antitumorales.

La importancia de este balance es importante en la psoriasis. La psoriasis es una enfermedad mediada por células Th1 que implica una acumulación masiva de neutrófilos y monocitos en la piel, estos últimos se convertirán a nivel tisular en macrófagos con fenotipo M1, el cual tiene propiedades antitumorales. Por tanto, el tipo de inflamación que encontramos en la psoriasis no promueve el crecimiento tumoral ya que la presencia de macrófagos provoca la eliminación de cualquier células que adquiera características tumorales. Esta propiedad dual de la inflamación que se encuentra en el ambiente tumoral puede también verse afectada por el tejido en el que se desarrolla el proceso. En un modelo de tumor de piel la sobreexpresión de NF- κ B se ha encontrado que inhibe el desarrollo de tumores a nivel de hepático y colon (Greten y Cols. 2004).

El concepto de que la activación de la respuesta inmune puede dar lugar a una respuesta protectora frente al desarrollo tumoral no es nueva. En el siglo XIX, William Coley objetivó que en algunos pacientes con cáncer con importantes infecciones post-operatorias a nivel del punto de implantación tumoral provocaban una importante regresión tumoral. Entonces desarrolló un conjunto de toxinas recogidas de cultivos de *Streptococcus pyogenes* y *Serratia marcescens*, la cual es administrada intra o peri-tumoral o en los tejidos peritumorales de pacientes con una amplia variedad y diseminación de tumores. Aunque ambos tanto la técnica como los resultados son controvertidos, en su tiempo, este autor documentó casos de larga supervivencia en individuos con tumores avanzados, un reto que todavía a día de hoy genera muchas preguntas. Incluso antes de los trabajos de Coley había evidencia de regresiones tumorales después de ciertas infecciones bacterianas. Mas recientemente este planteamiento ha sido aplicado de forma satisfactoria en el tratamiento de pacientes con cáncer de vejiga al administrarles BCG. Tal tratamiento provocó de inicio una respuesta inflamatoria a través de TLRs que no solo logró la diferenciación de monocitos en macrófagos M1 tisulares, además provocó una respuesta mantenida y efectiva contra el tumor. Este tipo de respuesta podría contribuir a conseguir una mayor efectividad de la quimioterapia y radioterapia de acuerdo de los datos aportados por Lionel Apetoh en 2007. Después del tratamiento experimental sobre tumores de mama, los autores encontraron que las células tumorales pre-necróticas eran capaces de presentar un antígeno a las células dendríticas a través de la vía de señalización TLR4 y MyD88, así como iniciar la respuesta inmune protectora a través de la señal HMGB1, otra vez a través de TLR4. Sin embargo cuando los tumores se inoculaban en ratones mutantes en TLR4 se encontró que desarrollan un mayor grado de diseminación metastásica.

Los mecanismos exactos por los que se dispara una respuesta inmune antitumoral no están del todo claros. Sería importante averiguar que estímulos llevan a desarrollar una respuesta protumoral Th2 y macrófagos M2 o antitumoral Th1 y macrófagos M1, todavía es un reto a desarrollar en los próximos años.

7. Las grandes cuestiones

La conexión entre inflamación y cáncer está demostrada, pero hay muchas cuestiones que quedan en el tintero.

Primero: no está claro si la inflamación es suficiente en sí misma para el desarrollo de cáncer. Podría la inflamación causar neoplasia en la ausencia de otros agentes carcinógenos?. En un modelo murino de EII causado por la deficiencia de IL-10, la frecuencia de mutaciones en el DNA a nivel del colon en ausencia de carcinógenos exógenos se demostraba 4-5 veces mayor con respecto a ratones con niveles de IL-10 normal (Sato y Cols. 2006). Además si comparamos tumores humanos y tejidos normales se ha demostrado que existe de forma habitual gran variedad de mutaciones a nivel de las células tumorales (Bielas y Cols. 2006). La única excepción a este punto lo encontramos en tejidos inflamados que muestran un nivel de mutaciones más elevado que las células procedentes de tejidos normales (Gungor y Cols 2007). Un candidato como carcinógeno endógeno serían los ROS. Los neutrófilos, se ha visto que son capaces de desarrollar una inhibición en la reparación del DNA sobre una línea celular de epitelio alveolar, un efecto que es mediado por un producto de la actividad mieloperoxidasa, el ácido hipocloroso (Gungor y Cols 2007). Interesantemente un polimorfismo en el promotor del gen que codifica para la mieloperoxidasa ha sido asociado con la resistencia al desarrollo de cáncer de pulmón en fumadores (Dally y Cols. 2002). Por tanto aunque la evidencia sugiere que la inflamación puede causar tumor, aunque queda pendiente un ensayo definitivo.

Segundo: la diversidad y plasticidad son características de la inflamación crónica y su principal protagonista los macrófagos. Estudios realizados usando técnicas de histología clásica y sobre variedad de sistemas, muestran que la inflamación relacionada con el tumor difiere entre diferentes tipos tumorales. Es importante definir que componentes moleculares y celulares son comunes para promover esta respuesta inflamatoria y cual son específicos de un tejido o tumor específicos.

Tercero: hay que tipificar el balance entre respuesta inflamatoria promotora tumoral y la anti-tumoral. Un punto clave que hay que profundizar en como activar una adecuada respuesta inmune adaptativa anti-tumoral.

Cuarta: Los MDSCs han emergido como un importante factor en relación con la inflamación peritumoral (Sica Cols. 2007). La definición de MDSCs es operacional e incluye un conjunto de células heterogéneo en los vasos sanguíneos periféricos y bazo. Son estas células una población distinta o pertenecen a una diferenciación continua de los macrófagos?

Quinta: la aparición de una conexión entre hormonas esteroideas, inflamación y cáncer es un concepto importante ya que no provee de la primera conexión entre las dos vías de promoción tumoral (Mantovani y Cols. 2007). Analizando esta conexión entre tumor y su resistencia a las terapias hormonales puede tener un gran impacto en la clínica, dando lugar al amplio uso de los moduladores de los receptores de andrógenos selectivos y los moduladores de receptores de estrógenos selectivos (tamoxifeno) para inhibir los efectos protumorales de las hormonas sexuales en los cánceres de próstata y mama respectivamente.

Por último, la gran pregunta es si el conocimiento sobre la inflamación relacionada con el cáncer puede ser trasladada a la práctica clínica para prevenir, diagnosticar y tratar el cáncer. Las células malignas son objetivos en movimiento que llegan a ser resistentes incluso con los más sofisticados tratamientos. Usando una terapia combinada que ataca tanto a las células tumorales como las células inflamatorias que conviven con ellas podría ser más efectivo y mejorar la inmunidad adaptativa a largo plazo contra las células tumorales.

Muchas terapias que actúan con la inflamación relacionada con el tumor, por ejemplo antagonistas contra receptores de quimiocinas y antagonistas de receptor de citocinas así como inhibidores de COX, son útiles en otras patologías. Con respecto al cáncer hay ensayos clínicos muy avanzados sobre antagonistas de IL-6, receptor de IL-6, CCL2, CCR4 y CXCR4 son útiles en tumores epiteliales y hematológicos. Los primeros ensayos clínicos sobre antagonistas de TNF α en pacientes con cánceres avanzados han dado como resultado la estabilización tumoral y algunas respuestas parciales (Brown y Cols. 2008). Particularmente ocurriría para aquellos pacientes con carcinoma renal. También un análogo de la talidomida, la lenalidomida que inhibe la producción de varias citocinas inflamatorias, se ha visto que es activo contra el mieloma cuando se combina con la desametasona (Weber y Cols. 2007). Además los inhibidores de COX2 se ha visto que previenen la recurrencia tanto de pólipos adenomatosos esporádicos, como de adenomas en pacientes con predisposición genética a su desarrollo (Bertagnolli y Cols. 2006).

Los fármacos que se centran en la inflamación peritumoral tienen la capacidad de interactuar con esas células inflamatorias o prevenir que dichas células migren hacia el foco

tumoral. También serían capaces de reajustar el microambiente tumoral para que llegue a tener capacidades antitumorales, alentar la respuesta inmune adaptativa e inhibir la metástasis. Este potencial para modular la inflamación peritumoral inicia un nuevo campo terapéutico prometedor.

E. SINDROME METABOLICO

El síndrome metabólico (SM) descrito por primera vez en 1988 por Reaven es una recopilación de los factores de riesgo que predisponen para el desarrollo de diabetes tipo 2 (DM2), así como de enfermedad cardiovascular (ECV). Desde entonces se han propuesto varias definiciones del síndrome, en un esfuerzo para dar mayor consistencia tanto al cuidado clínico, como a la investigación de pacientes con SM, la IDF, NHBLI, AHA, World Heart Federation y la Asociación internacional para el estudio de la obesidad publicaron una declaración conjunta en 2009 que proporcione una definición común de SM (Alberti y Cols. 2009). Siendo por tanto la definición más reciente, es diagnóstico el hallazgo de 3 de 5 de los siguientes factores de riesgo están presentes: circunferencia de la cintura con criterios específicos de población y de país; triglicéridos ≥ 150 mg/dl, HDL-c <40 mg/dl en varones y <50 mg/dl en mujeres, presión arterial sistólica ≥ 130 mm Hg o presión arterial diastólica ≥ 85 mm Hg y glucosa en ayunas > 100 mg/dl, con la inclusión de los pacientes que toman medicamentos para controlar la hipertrigliceridemia, HDL-c, hipertensión e hiperglucemia. Es importante decir que en esta definición la obesidad se diagnostica utilizando la circunferencia de la cintura y no el IMC ya que la circunferencia de la cintura se ha visto que esta mejor correlacionada con la adiposidad visceral y la resistencia insulínica como mecanismos promotores de DMII, y ECV (Ashwell y Cols. 2012). Hay que tener en cuenta que en esta definición se utiliza una circunferencia de cintura ajustada a población y país y se ha demostrado que en ciertos grupos étnicos en especial en el sudeste asiático, tienen niveles más altos de grasa visceral que los europeos, hay que tener en cuenta que la definición de SM deberá ser revisada si aparecen nuevas evidencias

La resistencia a la insulina se cree que desempeña un papel primordial en la conexión de los diferentes componentes del síndrome metabólico, así como la predisposición para su desarrollo del síndrome. Tanto en modelos animales como en los pacientes con síndrome metabólico se ha descrito los siguientes sucesos: Resistencia a la insulina que se caracteriza por alterar el metabolismo de los lípidos y la glucosa, niveles de ácidos grasos

libres elevados, un estado pro-inflamatorio, aumento del estrés oxidativo y alteraciones en el perfil de adipocinas. Algunas enfermedades relacionadas con el Síndrome metabólico son: DMII, dislipidemia, enfermedad del hígado graso no alcohólico, síndrome de ovario poliquístico, la apnea obstructiva del sueño, disfunción sexual y el cáncer. La asociación no es sorprendente teniendo en cuenta aspectos comunes en las vías fisiopatológicas las cuales se consideran esenciales en su génesis.

En los últimos años, el SM ha concentrado los esfuerzos del personal sanitario para mejorar el diagnóstico y tratamiento de los diferentes integrantes en aras de intentar reducir la ECV y otras secuelas del SM. Las modificaciones del estilo de vida incluyen el aumento de la actividad física, y los cambios dietéticos, los cuales son considerados la línea principal de tratamiento basado en una fuerte evidencia científica.

Todas las definiciones de SM que ha habido incluida la última armonizada significativamente predicen la incidencia de ECV y DMII. Además la última definición consensuada era el mejor predictor del “endpoint” de ECV.

Continúa la controversia en torno al SM en cuanto a su existencia, definición y significado clínico. El hecho de diagnosticar SM o cada uno de sus componentes por separado realmente no cambia el manejo clínico, iniciándose tan pronto se diagnostica el tratamiento con dieta y ejercicio. Sin embargo varios estudios han descrito la existencia de individuos obesos que son metabólicamente normales y no necesariamente tendrían un incremento en el riesgo de desarrollo de Enfermedad Cardiovascular o DMII, a pesar de su peso (Stefan y Cols. 2008), aunque NHANES ha demostrado que esto es rarísimo. Adicionalmente se ha encontrado que la obesidad en pacientes metabólicamente normales tienen un incremento de mortalidad global similar a la presentada por obesos metabólicamente anormales (Kuk y Cols. 2009).

1. Patogénesis

Hay muchos factores que contribuyen al desarrollo de SM: genéticos, estilo de vida (dieta y actividad física), obesidad y resistencia insulínica. Todos son importantes elementos en la patogénesis de SM. Sin embargo, como inicialmente dijo Reaven, la resistencia

insulínica se piensa que juega un papel determinante en la conexión de los diferentes componentes del SM y en el desarrollo de este (Smith y Cols. 2004). En este proceso pueden contribuir niveles elevados de ácidos grasos libres (FFA) y perfiles de adipocinas anormales (Gallagher y Cols. 2011).

1-1. Acciones y señalización de la insulina

En individuos con una sensibilidad a la insulina normal, la liberación de insulina por las células B del páncreas se produce en respuesta a los niveles incrementados de glucosa en sangre producidos en el periodo post-prandial. La insulina disminuye las concentraciones de glucosa plasmática al coordinar la supresión a nivel hepático de la producción de glucosa a partir de aminoácidos y otros intermediarios del metabolismo (neoglucogenesis) y glucógeno (glucogenolisis) y mejora la entrada de glucosa en el tejido muscular y adiposo. Es en estos tejidos, la insulina incrementa la movilización del transportador de glucosa 4 liberado en respuesta a la insulina (GLUT4) desde las vesículas de almacenamiento intracelular hacia la superficie celular, por tanto mejorando la captación de glucosa (Karnielli y Cols. 1981). La expresión de GLUT4 se correlaciona con la sensibilidad a la insulina y se incrementa con el ejercicio (Karnielli y Cols. 2008).

Debido a su efecto en la captación de glucosa, la insulina también inhibe la lipólisis en el tejido adiposo al inhibir la lipasa sensible a la insulina, es una enzima que media en la hidrólisis de los triglicéridos en ácidos grasos y glicerol (Gallagher y Cols. 2011). La insulina también favorece la adipogénesis y la diferenciación del tejido adiposo al estimular PPAR, este es un receptor nuclear que al igual que LXR, son factores de transcripción activados por lípidos y que se esta empezando a comprobar el importante papel que desarrollan en el metabolismo lipídico y en la inflamación, se activan por ácidos grasos no esterificados y metabolitos del colesterol respectivamente, llevando a cabo una regulación tanto positiva como negativa sobre la expresión génica de un amplio numero de genes implicados en el metabolismo como en la inflamación . La Tiazolidinediona es agonista de PPAR gamma y promueve la sensibilidad insulínica al activar la adipogénesis al almacenar la glucosa como triglicérido. Interesantemente mientras PPARgamma inhibe GLUT4 bajo condiciones normales, las tiazolidinediona, media en la eliminación de la represión de GLUT4 al secuestrar PPARgamma (Armoni y Cols. 2007). La insulina también activa la lipoprotein lipasa en el tejido adiposo, una enzima que hidroliza a ácidos grasos a triglicéridos presentes

en VLDL y quilomicrones, mediando su subsiguiente captación en las células. La insulina inhibe la síntesis y secreción hepática de VLDL de una forma dependiente de PI3K (Stefan y Cols. 2008). La síntesis de ácidos grasos también se ve afectada por la insulina, que es inhibida por la insulina en la fase aguda y, paradójicamente, reforzada por la insulina en condiciones de hiperinsulinemia crónica (Najjar y Cols. 2005).

A nivel celular la insulina se une a su receptor el cual es un hetero-tetramero perteneciente a la familia de los receptores tirosin-kinasas. La insulina se une como resultado de la activación del receptor por una trans-fosforilación del receptor llevando a la subsiguiente fosforilación de las proteínas adaptadoras, incluyendo (IRS1, IRS2), Gab, Shc y APS, que forman puntos de anclaje para efectores de la vía de señalización (Paz y Cols. 1997). La insulina media la actividad metabólica vía PI3K mientras los efectos mitogénicos ocurren a través de la vía de señalización MAPK (Taniguchi y Cols. 2006). La activación de PI3K lleva a una activación de la protein kinasa AKT la cual es responsable de los efectos mediadores de la insulina sobre el transporte y almacenamiento de glucosa, la síntesis proteica y la prevención de la degradación lipídica (Martins y Cols. 2008). De forma adicional, la señalización por una segunda vía que esta relacionada con la fosforilación de la tirosina del oncogén Cbl y sus proteínas asociadas CAP dan como resultado la movilización de GLUT4 a la superficie celular mejorando la captación. (Saltiel y Cols 2001).

Uno de los puntos de acción de la insulina es el factor de transcripción FOXO1 (Armoni y Cols. 2006). FOXO1 afecta a la neoglucogenesis hepática y también inhibe la transcripción de PPARgamma, un punto de acción importante de la insulina a nivel del tejido hepático (Puigserver y Cols. 2003). La insulina media la fosforilación de FOXO1 en la ruta de señalización de PI3K/Akt produciendo su exclusión nuclear (Puigserver y Cols. 2003). Bajo condiciones de resistencia a la insulina, los incrementos de la actividad transcripcional de FOXO1 median en la hiperglicemia al activar la gluconeogénesis e inhibir la proliferación de las células B y la adipogénesis (Kousteni y Cols. 2012). La resistencia a la insulina pueden llevar también a un descenso en la sensibilidad de tejido muscular y adiposo a la insulina (Cheng y Cols. 2011).

Respecto al metabolismo de la glucosa se puede añadir que la resistencia insulínica lleva a una interrupción del metabolismo lipídico. El estado de resistencia insulínica ha sido

relacionado con alteraciones en los quilomicrones, VLDL y LDL (Verges y Cols. 2015). Los niveles de quilomicrones se incrementan como resultado de la pérdida de la supresión normalmente ejercida por la insulina, así como una reducción de su hidrólisis parejo todo ello a la alteración de la actividad de la lipoprotein lipasa (Nogueira y Cols. 2012). La producción de VLDL se incrementa en los estados de resistencia insulínica en mujeres no diabéticas con obesidad abdominal (Pont y Cols. 2002). En pacientes con DMII, se ha demostrado que también se encuentra alterado el catabolismo del LDL y su afinidad por sus receptores B/E (Verges y Cols. 2015).

Además de sus efectos periféricos, la insulina tiene también acciones a nivel del SNC, así regula el apetito gracias a la expresión de moléculas orexigénicas como el neuropeptido Y, AgRP y anorexigénicas como el neuropeptido POMC. La insulina disminuye la síntesis de NPY y la liberación de AgRP, mientras incrementa la síntesis de POMC en el núcleo arcuato del hipotálamo, llevando a un descenso de la ingesta (Woods y Cols. 2008). Se ha sugerido que en la obesidad y la resistencia insulínica, hay una relativa resistencia insulínica que podría favorecer la ganancia de peso e incrementar la insulina periférica (Scherer y Cols 2011).

A través de esta compleja cascada de señalización, la insulina regula la glucosa y el metabolismo de los lípidos. En condiciones de resistencia insulínica, la señalización insulínica esta comprometida.

1-2. Resistencia Insulínica:

Se define como un descenso en la habilidad de la insulina para estimular la captación de la glucosa en los tejidos periféricos. Hay varios factores a través de los cuales se produce la resistencia insulínica y sus efectos adversos en el SM. Estos incluyen aunque no son los únicos factores: niveles elevados de ácidos grasos libres y un perfil anormal de adipocinas.

1-3. Ácidos grasos libres:

Se ha documentado ampliamente que estos median varios efectos metabólicos indeseables especialmente la insulin-resistencia (Karpe y Cols 2011). En la obesidad los ácidos grasos libres se incrementan de forma secundaria al incremento del componente

graso. Además, en condiciones de resistencia insulínica, se reducen los efectos inhibitorios de la insulina sobre la lipólisis, llevando a un incremento aun mayor en los ácidos grasos libres. Estos ácidos grasos no son solo el resultado de la insulín-resistencia, sino también su causa, creándose un círculo vicioso. Los ácidos grasos libres llevan a la insulín-resistencia gracias a un gran variedad de mecanismos que incluyen, aunque no se circunscriben solamente, al ciclo de Randle, la acumulación de derivados de lípidos intracelulares como diacilglicerol (DAG) y ceramidas, señales inflamatorias, estrés oxidativos y disfunciones mitocondriales.

1-4. Ciclo de Randle:

Se ha comprobado que la elevación de ácidos grasos libres en el diafragma y corazón estaba asociado con un incremento en la oxidación de los ácidos grasos y una mala utilización de la glucosa (Randle y Cols 1963). A través de este ciclo, los incrementos de los ácidos grasos libres y la oxidación de estos llevan a un incremento del contenido en glucosa intracelular y un descenso en la internalización celular de la glucosa (Randle y Cols 1998). Los estudios en ratones y humanos han demostrado que en situaciones que cursan con un incremento de ácidos grasos libres, ya sean procedentes del exceso de lípidos como de forma secundaria a una DMII, se produce un descenso en el uso de glucosa por los tejidos (Boden y Cols. 1991). Esto ocurre de forma secundaria a la inhibición de las vías de señalización de la insulina.

1-5. Acumulación de derivados lipídicos intracelulares:

Como se incrementan los niveles de ácidos grasos libres, la capacidad del tejido adiposo para captar y almacenar ácidos grasos esta sobrepasada. Cuando esto ocurre, se produce la acumulación de ácidos grasos libres en los tejidos que normalmente tienen una habilidad limitada para el almacenamiento lipídico, como el hígado o el musculo esquelético. Este fenómeno es conocido como deposito de grasa ectópica y esta muy relacionado con la resistencia insulínica (Yki-Jarvinen y Cols 2002), la acumulación de ácidos grasos en el miocito se hace como derivados de los ácidos grasos. De estos derivados el DAG, Triacilglicerol y las ceramidas se correlacionan directamente con la resistencia insulínica. DAG interfiere con la señalización insulínica normal por su interacción con un

grupo de quinasas, miembros de la familia de protein-kinasa C, por tanto no puede realizar correctamente la fosforilación de la tirosina y por tanto la activación de la insulina (Gallagher y Cols 2011). La ceramina activa la enzima protein fosfatasa 2^a, llevando a una defosforilación de AKT, evitando la señalización insulínica y la translocación de GLUT4 a la membrana celular. Esto perjudica la internalización de glucosa mediada por insulina en el interior del musculo esquelético (Summers y Cols 2012).

2. Señalización inflamatoria:

Los ácidos grasos libres incrementan las vías de señalización inflamatoria a través de la interacción directa con los miembros de los receptores Toll (TLR) y de forma indirecta a través de la secreción de citocinas como TNF-alpha, IL-1B e IL-6 (Martins y Cols 2012). *In vitro* los ácidos grasos libres activan las vías de señalización macrofágicas de TLR-2 y TLR-4, por tanto inducen la expresión de genes pro-inflamatorios (Nguyen y Cols 2007). Estudios en ratones con mutaciones a nivel del receptor TLR4 proporcionan protección frente a una dieta inadecuada y a la resistencia insulina (Tsukumo y Cols. 2007). De forma similar estudios realizados en animales en los cuales TLR2 esta ausente o es inhibido demuestran una mejora de las consecuencias de una dieta rica en grasas con el subsiguiente estado de resistencia insulínica (Ehse y Cols 2010). Un estudio reciente en humanos corrobora la importancia de TLR-2 y TLR-4 en el desarrollo de ácidos grasos libres en estados de resistencia insulínica. Jialal y Cols. estudiaron individuos con o sin SM y encontraron que aquellos con SM tenían un incremento de la expresión y actividad de TLR-2 y TLR-4 (Jialal y Cols. 2012). La actividad de TLR-4 lleva a una activación de JNK e IKK con el resultado de la degradación del inhibidor kB y la activación de NF-kB. A través de la activación de JNK e IKK se produce la fosforilación de la serina de IRS-1 y una disfunción de la señalización insulínica (Bhargava y Cols 2012). Ding y sus colaboradores sobre un estudio que incluída 1628 pacientes chinos, demostró que los niveles de IL-6 y PCR estaban significativamente elevados en la condición de SM, estableciéndose las bases de que el SM es un estado pro-inflamatorio (Ding y Cols 2015).

En la obesidad esta incrementada la infiltración macrofágica del tejido adiposo. este hecho lleva a un estado proinflamatorio con macrófagos productores de citocinas inflamatorias (Harford y Cols 2011). En concordancia con la señalización de los ácidos grasos libres a través de TLR, estas citocinas inflamatorias procedentes de los macrófagos activan

JNK e IKK interfiriendo en la señalización y acción de la insulina (Harford y Cols 2011).
(Figura 15)

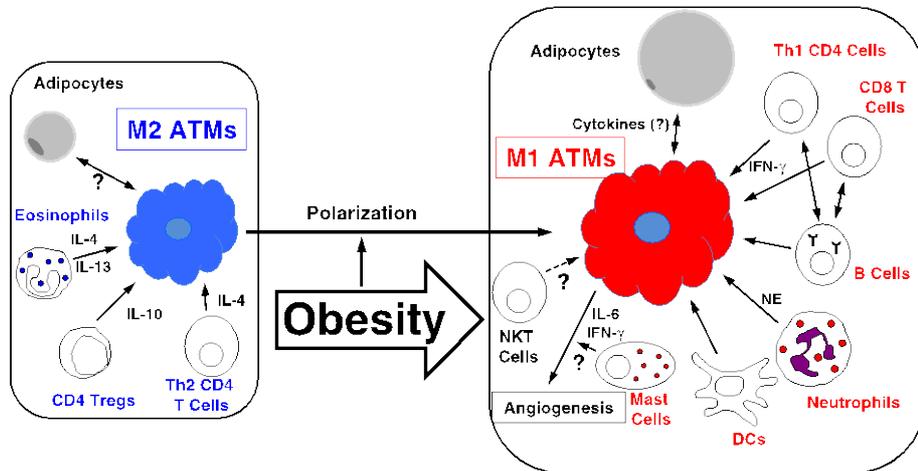


Figura 14: Papel de las células del sistema inmune en el desarrollo de la inflamación inducida por la obesidad (Lee y Cols. 2014)

En un estudio realizado por Rubin y Cols. en 2008 demostraron que existían hombres jóvenes y saludables con triglicéridos en sangre normales durante el ayuno pero que presentaban unos altos niveles de triglicéridos en el periodo postprandial mostraban altos niveles de sCAMs y E-selectina después de una comida rica en triglicéridos cuando se comparaban a los individuos que después de esa ingesta rica en lípidos no presentaban unos niveles tan elevados. Además este fenómeno se acompañaba por unos niveles altos de glucemia en el periodo post-prandial y bajos en el periodo de ayuno, siendo este fenómeno reconocido como una de las primeras señales del desarrollo del síndrome metabólico.

Ferri y cols. demostraron que en sujetos que presentaban alteraciones en las pruebas de sobrecarga oral de glucosa e hiperlipemia sufrían incrementos de sICAM-1 tras una sobrecarga oral de glucosa, existiendo una correlación de estos niveles con los de insulina postprandial. Los autores concluyeron que el metabolismo glucémico y la insulín resistencia, no así la hiperlipemia influían directamente sobre los niveles de sCAM.

Los pacientes con niveles incrementados de triglicéridos en el periodo post-prandial muestran unos niveles de peroxidación lipídica muy elevados, así como unos niveles de

antioxidantes como la vitamina C intracelulares disminuidos (Jagla y Cols 2001). La asociación entre niveles post-prandiales elevados de triglicéridos e insulina acompañados de elevaciones de CAMs muy posiblemente que este indicando una etapa temprana de disfunción endotelial.

Varios estudios han demostrado que tanto las alteraciones metabólicas como la dieta influyen en los niveles de CAM, y por tanto en la activación endotelial.

2.1. La IL-18 como citocina proinflamatoria

Hasta hace poco no se supo que la IL-18 aparte de las funciones que realiza dentro de la respuesta inmune Th1, poseía la capacidad de poder actuar como citocina proinflamatoria. En general, la habilidad de la IL-18 para inducir diferentes citocinas depende de la célula diana. En PBMCs humanas, la IL-18 induce la expresión y síntesis del gen de la IL-8 (Puren y Cols., 1998), usando IL-1Ra para bloquear la actividad de la IL-1, la producción de IL-8 por la IL-18 se reduce en un 40%. Cuando la actividad de TNF-alfa es eliminada, por el uso de receptores solubles para el TNF-alfa, la producción de IL-8 por la IL-18 se reduce en un 80%. Todo esto sugiere que la acción de la IL-18 se produce vía TNF-alfa. Por tanto en la población mixta de PBMCs, la cascada de citocinas pro-inflamatorias iniciada por la IL-18 comienza en los linfocitos y células NK con la activación por el TNF-alfa de los receptores constitutivos de la IL-18. La inducción de TNF-alfa se observa a nivel de expresión génica durante las siguientes dos horas posteriores al tratamiento con IL-18. La IL-18 también estimula la síntesis de la proteína inflamatoria de macrófagos-1 (Puren y Cols., 1998). Estos resultados concuerdan con la capacidad de la IL-18 para activar la translocación del NFkappaB en células T y fibroblastos (Matsimoto y Cols., 1997; Torigoe y Cols., 1997; Robinson y Cols., 1997).

En cuanto a la expresión de moléculas de adhesión, la IL-18 estimula la expresión de ICAM-1 en líneas celulares monocíticas (Kohka y Cols., 1998) anticuerpos contra el IFN-gamma no eliminan la expresión de ICAM-1 mediada por IL-18, por lo que es directamente mediada por esta citocina siendo independiente de la acción del IFN-gamma.

2-1-a. IL-18 en el tejido adiposo

La clásica percepción de que el tejido adiposo es un lugar de almacenamiento pasivo de ácidos grasos esta quedando en desuso ya que se esta comprobando que el tejido adiposo

y la grasa visceral poseen una alta actividad metabólica. La grasa visceral es ahora considerada un importante protagonista en el desarrollo del SM (Despres y Cols. 2008), este efecto esta en parte mediado por la liberación de una gran cantidad de sustancias activas metabólicamente conocidas como adipocinas que se relacionan con varios procesos biológicos, incluyendo inflamación, trombosis, sensibilidad a la insulina y el balance energético (Lau y Cols. 2005)

Los preadipocitos y adipocitos humanos han demostrado poseer de forma habitual la expresión y secreción de IL-18 (Woods y Cols. 2005). Hay que comentar que los obesos muestran un incremento en la expresión de IL-18 en el tejido adiposo y un incremento en tres puntos en la secreción de los adipocitos en comparación con los controles no obesos (Skurt y Cols. 2005). Interesantemente, la hiperglicemia experimental ha demostrado que incrementa la expresión de IL-18 en adipocitos, un efecto mas pronunciado en la presencia de hiperglucemias intermitentes (Faih y Cols. 2006).

Mientras estudios previos han referido la infiltración macrofágica en el tejido adiposo en pacientes obesos e insulino resistentes (Karpe y Cols. 2011), un reciente estudio mostro que la infiltración de los linfocitos T precede a la infiltración macrofágica en el tejido adiposo en las etapas tempranas de la insulino resistencia en ratones obesos (Randle y Cols. 1998). En el mismo estudio de pacientes con DMII, la circunferencia de la cintura esta correlacionada significativamente con la expresión de IFN gamma en el tejido adiposo, sugiriendo el papel de las células Th1 en la insulino resistencia (Randle y Cols. 1998). Además en otro estudio realizado en ratones obesos, se demuestra la polarización en el tejido adiposo de los linfocitos hacia la vía Th1, lo cual se asocia a la insulino resistencia, este efecto podría se revertido por la inmunoterapia (Boden y Cols. 1991). IL-18 actúa sinérgicamente con la IL-12 en la estimulación de la vía hacia Th1 (Kahn y Cols. 2008), y los niveles de IL-12 se ha demostrado que están aumentados en pacientes DMII (Summers y Cols. 2010), Además se ha especulado con el hecho que la IL-18 en combinación con un medio proinflamatorio secundario a un estado hiperglicémico podría actuar como interruptor de la activación Th1 y la producción de IFN gamma (Kousteni y Cols. 2012), tanto en el tejido adiposo como en el placa aterosclerótica.

2-1-b. IL-18 y musculo

Varios artículos sugieren que el tejido adiposo podría no ser la principal fuente de IL-18 en los pacientes obesos y con SM (Bruun y Cols. 2007). En un estudio donde se medían los niveles séricos de IL-18, estos se reducían al perder peso el paciente, mientras que no se veía alteración en la expresión de IL-18 a nivel del tejido adiposo (Bruun y Cols. 2007). En otro estudio, se demostró que la reducción en los niveles de IL-18 por el ejercicio estaba significativamente asociado con la mejora del SM, pero no con la reducción de grasa visceral (Troseid y Cols. 2009), por tanto tenían que intervenir otros compartimentos corporales .

Hay un incremento en la evidencia de que las citocinas están implicadas en la regulación de la función del músculo esquelético y el TNF alpha sido relacionado con el catabolismo y pérdida de función muscular (Li y Cols. 2001). Se ha demostrado la expresión de IL-18 en el músculo esquelético humano tanto en individuos sanos como en pacientes con miopatía (de Nooijer y Cols. 2004).

Experimentalmente se ha demostrado que la infusión de TNF alpha provoca una reducción en la captación de glucosa y un incremento en la expresión de IL-18 en el músculo esquelético humano pero no en el adiposo, sugiriendo que el tejido adiposo era improbable que fuera una gran fuente de IL-18 (Krogh-Madsen y Cols. 2006).

2-2. IL-18 y Angiogénesis

La angiogénesis es un proceso fundamental en la isquemia miocárdica ya que participa en el remodelado miocárdico, en dicho proceso se ha comprobado que la IL-18 juega un papel fundamental, aunque nos encontramos ante resultados discordantes. Por un lado la IL-18 aumenta GM-CSF en cultivos de células mononucleares y de células procedentes de membrana sinovial (Dinarello y Cols. 1999 y Grazie y Cols. 1999). además la IL-18 *in vitro* induce la migración de células endoteliales mientras que *in vivo* promueve la formación de estructuras tubulares (Park y Cols. 2001). Asimismo, la producción de VEGF mediada por IL-18 esta documentada en los fibroblastos aislados de pacientes con artritis reumatoide (Amin y Cols. 2007 y Cho y Cols. 2006), por tanto todos estos estudios apuntarían hacia la promoción del proceso de angiogénesis mediado por la IL-18.

Por el contrario, últimamente han aparecido pruebas que apoyarían las propiedades antiangiogénicas de la IL-18 (Couglin y Cols. 1998). La inhibición de la angiogénesis se produciría a través de la acción del IFN gamma mediado por IL-18, además en modelos

animales, se ha observado que la inhibición de la IL-18 por IL-18BP o en ratones knock-out para el gen de la IL-18 produce en ambos casos un incremento de los niveles de VEGF, aumentando la neovascularización inducida por la isquemia (Mallat y Cols. 2002). Apoyando este hecho, nos encontramos que IL-18 atenúa la activación de Akt, de la familia de las serina/treonina protein quinasas encargadas de fosforilar la NO sintasa, por ello disminuye la producción de NO a nivel del endotelio vascular isquémico y por tanto inhibe la proliferación endotelial necesaria para la angiogénesis (Mallat y Cols. 2002). Sin embargo futuros estudios deberán dilucidar este papel con más detalle.

Asimismo, existen estudios que han demostrado el mecanismo de acción de la IL-18 en la hipertrofia miocárdica provocada por incrementos de presión a nivel miocárdico. El incremento crónico en las concentraciones de IL-18 en los pacientes esta asociada con la hipertrofia miocárdica (Seta y Cols 2000). IL-18 intervendría en el proceso de hipertrofia miocárdica asociada a incrementos de presión, en este proceso se produciría un incremento del mRNA del PNA y posteriormente un incremento en los niveles de péptido natriurético atrial (PNA), así como la estimulación de del factor de transcripción GATA4, fenómeno observado tanto *in vivo* como *in vitro* a través de la vía Akt mediada por la PIK quinasa (Colston y Cols. 2007). Es posible que ERK1/2, JNK, MAPK y p38 activadas por la IL-18 estén relacionadas con el remodelamiento miocárdico, por tanto la inhibición de la IL-18 podría reducir dichos procesos.

Aunque la disfunción miocárdica producida por la IL-18 podría ser atribuida a la inducción de otras citocinas, dicho efecto pondría también deberse a la acción directa sobre los niveles de calcio. De este modo se ha comprobado que la estimulación con IL-18 provoca una rápida liberación de calcio citosólico en los cultivos de neutrófilos (Wyman y Cols. 2002). Woldback y Cols. también demostraron que la administración de IL-18 provoca un incremento de los niveles de calcio intracitosolico en los miocardiomiocitos el cual estaba asociado con una depresión miocárdica y relajación. Por tanto, la exposición del miocardio a la IL-18 reduce la respuesta de los miófilamentos al calcio, así la IL-18 altera la homeostasis del calcio intracelular y por tanto regula la respuesta miocárdica.

La IL-18 BP un antagonista natural de la IL-18 podría suprimir la inflamación mediada por la IL-18 y por tanto proteger a los tejidos de la isquemia o del daño producido por endotoxinas en el caso de la sepsis. Se ha comprobado que mejora la función miocárdica

tras los procesos de isquemia-reperfusión y en modelos animales de sepsis a través de la reducción de TNF alpha, IL-1 o moléculas de adhesión (Raeburn y Cols. 2000). La IL-18 BP aumenta la neovascularización, hecho comprobado en modelos animales de isquemia periférica en extremidades inferiores (Mallat y Cols. 2002). La disminución de los niveles de IL-18, no así de IL-1beta en ratones deficientes en Caspasa-1 incrementa la viabilidad celular periinfarto, reduce la dilatación del VI después de isquemia inducida a nivel del laboratorio y disminuye la mortalidad debida a LPS en los modelos de sepsis (Netean y Cols. 2000).

2-3. IL-18 y Síndrome Metabólico.

El síndrome metabólico se compone de un conjunto de factores de riesgo ya conocidos que caracterizan a una población con un riesgo incrementado para desarrollar DMII y enfermedad cardiovascular. El Síndrome metabólico es un fuerte predictor de DMII con un incremento de 5 a 7 puntos en su desarrollo. Además parece comprobado que esto iría parejo a un incremento del riesgo cardiovascular (Haffner y Cols. 1990). El riesgo de desarrollo de ECV es aproximadamente el doble en los pacientes con síndrome metabólico (Grundy y Cols. 2008). Hay pruebas de que asociado al síndrome metabólico existe una inflamación crónica de bajo intensidad (Grundy y Cols. 2005). Varias citocinas proinflamatorias se encuentran elevadas en paralelo con un mayor número de características asociadas al síndrome metabólico, mientras que las moléculas anti-inflamatorias y la adiponectina se encuentran disminuidas (Kowalska y Cols. 2008). Algunos investigadores han propuesto que tanto la DMII, como el SM como la aterosclerosis son una condición multifactorial con una base inflamatoria común, e incluso se discute si una valoración de ese estado inflamatorio debería ser o no incluido en los criterios diagnósticos. (Pradhan y Cols. 2002), siendo mas lejos se ha propuesto a la PCR como principal candidata.

IL-18 ha sido asociada en varios estudios con la obesidad (Hung y Cols. 2005); resistencia insulínica (Fischer y Cols. 2005) HTA (Rabkin y Cols. 2009) y la DLP (Evans y Cols. 2007). Además, la IL-18 se ha encontrado elevada en pacientes con SM (Van Guilder y Cols. 2006) y se incrementa de forma paralela con un incremento en el número de determinantes de SM (Zirlik y Cols. 2007). Polimorfismos génicos a nivel de la IL-18 dan como resultado incrementos en los niveles de IL-18 circulantes (He y Cols. 2010), cambios en la sensibilidad a la insulina y un incremento en el riesgo de padecer SM (Prieta y Cols. 2009) sugiriendo que podría estar relacionada con el inicio de SM.

Los niveles circulantes de IL-18 medidos en ensayos clínicos están elevados en pacientes con DMII (Esposito y Cols. 2003), y también se ha sugerido que contribuyen a la microangiopatía como la nefropatía de los diabéticos tipo II (Fujita y Cols. 2009). Además en otro par de ensayos clínicos los niveles elevados de IL-18 predicen el desarrollo de DMII (Hivert y Cols. 2009).

La IL-18 producida a nivel de los islotes pancreáticos produce NO y en última estancia lleva a la apoptosis (Lewis and Dinarello, 2006). En ratones diabéticos no obesos, las células beta pancreáticas producen IL-18 y mejoran la expresión de esta citocina llevando a una insulinitis destructiva (Frigerio y Cols., 2002; Rothe y Cols., 1997). Además se ha podido objetivar que la secreción de IL-18 es necesaria para la expansión de células T auto-reactivas en ratones diabéticos no obesos (Marleau and Sarvetnick, 2011). En humanos se han observado niveles elevados de IL-18 en el suero de pacientes con alto riesgo de desarrollo de DMI y DMII (Hivert y Cols., 2009; Nicoletti y Cols., 2001b), así como en niños y adultos diagnosticados con DMI y DMII (Ryba-Stanislawowska y Cols., 2014; Altinova y Cols., 2008; Dong y Cols., 2007; Katakami y Cols., 2007; Esposito y Cols., 2003). La expresión de IL-18 también ha sido objetivada en los islotes pancreáticos de los pacientes con DMI fulminante (Aida y Cols., 2011) y una asociación significativa entre los niveles elevados de IL-18 y un incremento en el número de autoanticuerpos objetivados se ha recogido en un nuevo tipo de DMI (T1Ds) (Hanifi-Moghaddam y Cols., 2003). Además se ha objetivado la asociación entre niveles incrementados de IL-18 y la resistencia insulínica en pacientes con DMII, igualmente se ha visto relación entre concentraciones elevadas de IL-18 y obesidad y SM (Bruun y Cols., 2007; Fischer y Cols., 2005; Hung y Cols., 2005; Trosheid y Cols., 2010; Van Guilder y Cols., 2006).

La acción de la IL-18BP provoca el retraso en el desarrollo de la DM en ratones y los ratones transgénicos para la IL-18BP muestran una prolongación del estado de normoglucemia mientras que los islotes transgénicos están protegidos contra la apoptosis inducida por estreptozotocina (Lewis y Dinarello 2006). Además una segunda citocina dentro de la familia de la IL-1 la IL-37 puede unirse a la IL-18BP y mejorar su función inhibitoria sobre la IL-18 (Bufler y Cols., 2002; Dinarello and Bufler, 2013).

Se demuestran incrementos significativos en las concentraciones de IL-18 en el suero de pacientes con DMI cuando los comparamos con el grupo control. También se analizaron los niveles de IL-18BP e IL-37 en estos pacientes. Aunque no hubo diferencias significativas

respecto a estas últimas citocinas entre población controles y DMI, si se objetivo una correlación positiva entre IL-18 e IL-18BP. Es de destacar que los niveles de IL-18 libre fueron significativamente más altos en DMI. También se objetivo una correlación positiva de los niveles de IL-18, IL-18 BP y los niveles de HbA1c. Finalmente se analizó la expresión de IL-18 en los islotes pancreáticos de pacientes con DMI, o pacientes con autoanticuerpos positivos y controles observándose un incremento significativo en el grupo DMI (Harms y Cols. 2015):

3. Estrés Oxidativo:

Los pacientes con SM que realizan test de tolerancia oral de la glucosa muestran niveles más bajos en la actividad de SOD y Glutatión peroxidasa (GSH-Px) y un incremento en la TAS a las 2 horas (Andreeva-Gateva y Cols. 2001). Linfocitos procedentes de pacientes con DMII muestran un patrón de estrés oxidativo (acumulación de ROS, peroxidación de membranas, incremento de protein carbonilos, incremento de SOD y la actividad de la catalasa (Belia y Cols. 2009). La resistencia insulínica de los DMII está asociada con el estrés oxidativo sistémico, medido por incrementos de 8-epi-PGF2alpha y TXM, y por la activación plaquetaria *in vivo* (Davi y Cols. 1999). Los suplementos de vitamina E reduce tanto 8-iso-PGF2 alpha (37%) y TXM (43%) en los mismos pacientes (Davi y Cols. 1999).

El estrés oxidativo puede contribuir al desarrollo de DMII por activación de vías de activación como NF-kappaB; la activación de esta vía podría dar lugar al desarrollo de insulín-resistencia a través de una disfunción endotelial que se acrecienta por un flujo de ácidos grasos alterados y pérdida de la regulación de la NO sintasa (Davi y Cols. 1999).

Niveles bajos de GSH y BH4 y niveles elevados de BH2 y HNE han sido detectados en ratas diabéticas de Zucker. BH4 se une al dominio oxidasa de la NO sintasa siendo un cofactor esencial para la síntesis de NO. Bajos niveles de BH4 causan un desacoplamiento de la NO sintasa con la generación de ambos NO y O₂- seguido de la producción de peroxinitrito (Chander y Cols. 2004).

ROS incrementan su producción en los casos de acumulación lipídica, los ácidos grasos libres activan la producción de ROS en el tejido adiposo al estimular la NADPH oxidasa, disminuyendo la expresión de enzimas anti-oxidantes. Cuando el tejido adiposo es

expuesto al estrés oxidativo, hay una disminución de las adipocinas anti-inflamatorias, como adiponectina (Soares y Cols. 2005). En el SM, hay un incremento en la producción de ROS como resultado de los niveles elevados de citocinas inflamatorias y los niveles disminuidos de adiponectina (Otani y Cols. 2011). Los niveles aumentados de ROS obstaculizan tanto la señalización insulínica al inducir la fosforilación de IRS, como la translocación de GLUT4 y la transcripción génica (Bloch-Damti y Cols. 2005).

4. Disfunción mitocondrial

Se ha comprobado que la conexión entre la disfunción mitocondrial y la resistencia insulínica en el musculo esquelético precede al desarrollo de obesidad e hiperglicemia, estudios en obesos, individuos insulín-resistentes así como aquellos con DMII poseen mitocondrias a nivel del musculo esquelético de menor tamaño y numero. También se ha visto que estos individuos muestran una disminución de la actividad de los genes relacionados con la fosforilación oxidativa de la mitocondria, el proceso por el cual la mitocondria produce energía en forma de ATP (Kim y Cols. 2008). Los estudios demostraron que PPARgamma, coactivador-1alpha (PGC-1alpha), un activador transcripcional relacionada con la biosíntesis mitocondrial, tiene disminuida su expresión en pacientes con DMII, obesidad o historia familiar de DMII (Patti y Cols. 2003). Los incrementos de los ácidos grasos libres y su oxidación incompleta han sido implicados en la disfunción mitocondrial en el musculo esquelético en condiciones de resistencia insulínica (Koves y Cols. 2008). Además la disfunción mitocondrial lleva a un incremento del estrés oxidativo y la formación de ROS el cual a la larga disminuye la función y masa mitocondrial.

5. Adipocinas:

El tejido adiposo es un órgano endocrino activo que libera adipocinas, mediadores bioactivos que afectan al metabolismo (Rabe y Cols. 2008). Se ha demostrado que los individuos con SM tiene un perfil de adipocinas anormales que afectan a la sensibilidad insulínica (Deng y Cols. 2010).

5-1. Adiponectina: difiere de otras adipoquinas en que sus niveles están inversamente correlacionados con la obesidad corporal e insulín resistencia (Yamaguchi y

Cols. 2001). La administración de adiponecina recombinante disminuye la resistencia insulínica en ratones obesos (Yamaguchi y Cols. 2001). Ratones transgénicos para la adiponecina demuestran mejoras en la sensibilidad a la insulina (Yamaguchi y Cols. 2001). La adiponecina incrementa la secreción de insulina *in vivo* e *in vitro* (Okamoto y Cols. 2008). Además se su habilidad para mejorar la sensibilidad a la insulina en los tejidos periféricos, tiene efectos a nivel de SNC que afectan a la ingesta y gasto energético (Kubota y Cols. 2007). En humanos con bajos niveles de adiponecina están fuertemente asociados a la resistencia insulínica, incremento de la grasa corporal, DMII y SM (Rabe y Cols 2008). La hipoadiponecตินemia de base genética lleva a un incremento de la propensión a sufrir SM (Kondo y Cols. 2002). Estudios prospectivos han demostrado que en individuos con un alto riesgo de desarrollo de DMII, y que mostraban altos niveles de adiponecina tenían menos posibilidades de desarrollar DMII que los que tenían niveles mas bajos (Lindsay y Cols 2002). Los niveles de adiponecina han sido propuestos para ser usados como punto de corte de manejo del riesgo de desarrollo de SM, en este estudio prospectivo realizado en Japón, sobre una cohorte de individuos obesos a los largo de tres años, se demostró que el tiempo medio para el desarrollo de SM disminuyo con el incremento de los niveles de adiponecina total.

La adiponecina modula el metabolismo glucídico a través de su interacción con sus receptores, el receptor de adiponecina 1 (AdipoR1) y el receptor de adiponecina 2 (AdipoR2). La unión de adiponecina a sus receptores da como resultado la activación de las vías de señalización que afectan a la glucosa y metabolismo de ácidos grasos. Como resultado de la señalización de adiponecina, AMPK es fosforilado dando lugar a un incremento en la toma de glucosa por el musculo así como una reducción de la gluconeogénesis (Yamauchi y Cols 2007). Adiponecina también posee acciones anti-inflamatorias, suprimiendo la expresión de TNF-alpha e IL-6 y efectos anti-aterogénicos, disminuyendo los niveles de factores proaterogénicos: LDL y niveles de TG (Rabe y Cols. 2008)

En los pacientes con insulín resistencia, esta reducida la respuesta del musculo esquelético, hígado y tejido adiposo a la insulina. Los niveles de insulina aumentan en su intento de mantener la euglucemia dando como resultado la hiperinsulinemia, esta ha demostrado disminuir la forma bioactiva de la adiponecina (Basu y Cols. 2007). Por tanto, la hiperinsulinemia en la resistencia insulínica puede disminuir la adiponecina contribuyendo

adicionalmente a la resistencia insulínica (Deng y Cols 2010). Tanto los efectos directos de la insulina, como los cambios que caracterizan el ambiente metabólico de la resistencia a la insulina como son la inflamación, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, todos ellos han demostrado suprimir la adiponectina (Deng y Cols 2010). Esta relación se observa clínicamente en el mismo estudio por Ding y colaboradores, mostrando una fuerte asociación inversa entre adiponectina y HOMA-IR y una tendencia inversa entre adiponectina y un mayor número de componentes del SM (Ding y Cols. 2015). Por tanto la asociación entre resistencia insulínica y adiponectina parece ser compleja y bidireccional.

5-2. Leptina: es otra importante adipocina producida por adipocitos, ejerce sus efectos sobre el apetito y gasto energético. Cuando las leptinas se unen a su receptor, las vías de señalización como JAK/STAT e IRS/PI3K son activadas. El resultado es similar al observado cuando la insulina se une a su receptor en el que las vías anorexigénicas (POMC) son favorecidas sobre las vías oxigénicas (NPY y AgRP) (Prodi y Cols. 2006). Los estudios sugieren que la leptina afecta el metabolismo de glucosa de forma independiente de sus efectos en la ingesta. Los estudios en roedores sugieren que la leptina estimula la vía JAK/STAT y esto es importante en la ingesta y gasto energético mientras que la vía PI3K juega su papel en la regulación del metabolismo (Morton y Cols.2005).

La leptina estimula la oxidación de los ácidos grasos libres en el hígado, páncreas y músculo esquelético. La leptina se opone a la acción de la insulina al disminuir los efectos lipogénicos de la insulina sobre los adipocitos y disminuyendo el contenido en TG del tejido adiposo sin incrementar los niveles circulantes de ácidos grasos libres (Lago y Cols. 2009) Aparte de sus efectos sobre el metabolismo lipídico y glucémico, la leptina afecta al sistema inmune, al mejorar la producción de citocinas inflamatorias al estimular la proliferación de células T (Rasouli y Cols. 2008).

Mientras la ausencia de leptina lleva a una obesidad extrema e insulino-resistencia, la mayoría de obesos no son deficientes en leptina. Mas allá, tienen niveles incrementados de esta pero son inmunes a sus efectos supresores del apetito. Esta observación ha dado lugar al concepto de resistencia a la leptina en la obesidad (Munzberg y Cols 2005). La sensibilidad disminuida a la leptina lleva a incrementos en el acumulo de TG en el tejido adiposo, músculo, hígado y páncreas, dando como resultado resistencia a la insulina (Rabe y Cols.

2008). Una alternativa es el concepto de insuficiencia de leptina hipotalámica, que establece que en condiciones de hiperleptinemia, la barrera cerebral sanguínea previene la entrada de leptina dentro del tejido cerebral dando como resultado una insuficiencia de leptina a nivel de ciertas zonas del SNC (Kalra y Cols. 2008). Además aunque la respuesta decreciente a la leptina observada en la obesidad es pareja de la resistencia a la leptina o insuficiencia hipotalámica de leptina, la habilidad de la leptina para activar la señalización a nivel hipotalámico esta disminuida en obesos e insulín-resistentes (Kalra y Cols. 2008).

Las ratas deficientes en el receptor de la leptina se caracterizan por sufrir HTA, obesidad, e intolerancia a la glucosa, así como DLP representando otro modelo animal de SM. La administración de Coenzima Q10 (capturador de ROS e inhibidor de la peroxidación lipídica, minimiza el incremento de estrés oxidativo de una manera dosis dependiente, reduciendo la T/A previniendo los niveles elevados de insulina de estas ratas (Kunitomo y Cols. 2007).

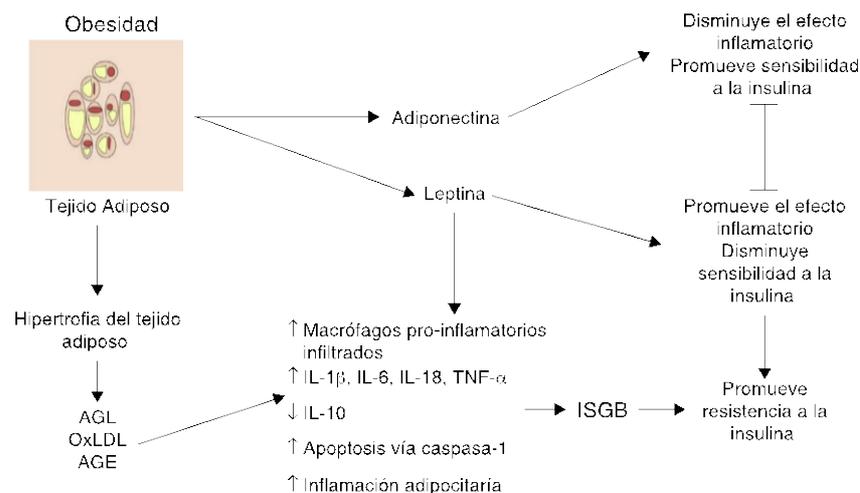


Figura 15: La inflamación del tejido adiposo visceral es una señal detonante en el inicio y la propagación de la inflamación sistémica de grado bajo.

AGE: productos terminales de glucosilación avanzada; AGL: ácidos grasos libres; IL: interleucina; ISGB: inflamación sistémica de grado bajo; oxLDL: lipoproteínas de baja densidad oxidadas; TNF: factor de necrosis tumoral . (León-Pedroza y Cols. 2014).

5-3. Resistina: su papel en el SM no está del todo comprendido, es una adipocina que se ha visto que se incrementa en modelos murinos de obesidad, llevando a acciones disfuncionantes de la insulina y disfunción de la célula B (Gao y Cols. 2009). Esta altamente

asociada con la resistencia insulínica y la DMII en modelos animales (Yang y Cols. 2009). Activa SOCS-3 el cual inhibe la fosforilación del receptor de la insulina y la señal proteica de la insulina (Steppan y Cols. 2005). También inhibe la toma de glucosa por el musculo e hígado y mejora la gluconeogénesis hepática (Yang y Cols. 2009). En humanos la relación entre resistina, SM y sus componentes no esta clara, sin embargo la asociación entre los componentes del SM han llevado a un mayor interés en un entendimiento mas profundo de su papel. La expresión de resistina en humanos difiere de los ratones en su baja expresión en la grasa blanca y la regulación de su concentración por células mononucleares de sangre periférica, macrófagos y medula ósea (Abate y Cols. 2014). Su papel en la vía inflamatoria ha sido descrito asociada con la regulación positiva de citocinas inflamatorias y al inducir la adhesión de los monocitos a las células endoteliales 106. El incremento de los niveles de resistina se ha visto en varios estudios en pacientes con SM pero las correlaciones son mas consistentes en mujeres que hombres (Norata y Cols. 2007).

5-5-4. Proteína de Unión del Retinol: es el transportador de la vitamina A y es secretado por el tejido adiposo y el hepático. RBP-4 se ha demostrado que se incrementa en el tejido adiposo de los ratones knock-out para GLUT-4 específico de tejido adiposo (Yang y Cols 2005). Los niveles de RBP-4 están elevados en obesos, DMII, intolerancia a glucosa y aquellos con una fuerte historia familiar de DMII (Meisinger y Cols. 2011). El mecanismo sugerido por el cual RBP-4 puede mediar la resistencia insulínica incluido el incremento de la gluconeogénesis y empeoramiento de las acciones de la insulina en el hígado y musculo (Yang y Cols. 2005). Sin embargo, hay otros estudios que no apoyan esta relación del RBP-4 con el metabolismo alterado de la glucosa (Janke y Cols. 2006).

Apelina, omentina y visfatina son otras adipocinas que han sido implicados en la patogénesis de la resistencia insulínica y SM

6. Efectos de la resistencia insulínica

Como ya se menciona los factores relacionados en la patogénesis de la resistencia insulínica y SM llevan a los efectos metabólicos que caracterizan este síndrome, algunas de las secuelas metabólicas del SM son:

6.1 Hiperglicemia y DMII:

La resistencia insulínica es crucial para el desarrollo de hiperglicemia y DMII. En individuos normales, la ingestión de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos libres lleva a la secreción de insulina a partir de las células B pancreáticas. Inmediatamente después de la ingestión, la insulina se libera, con un pico máximo a los 10 minutos y desaparece en aproximadamente 20 minutos. Esta primera fase la respuesta a la insulina inhibe la producción de glucosa a nivel hepático y mejora la toma de glucosa por los tejidos. La segunda respuesta a la insulina sigue a la primera a los 15-20 minutos y alcanza el máximo dentro de los 20-40 minutos. En los individuos resistentes a la insulina hay una anormal respuesta de las células B a la glucosa dando una pérdida inicial de la primera fase de respuesta a la insulina, seguidos por un aumento de la segunda respuesta llevando a hipeinsulinemia. Con una sobrecarga continua de nutrientes la células B eventualmente fallan. Por tanto, la hiperglucemia crónica da como resultado un incremento de los niveles basales de insulina, pero disminuye la respuesta de las células B a la estimulación por la glucosa (Gallagher y Cols. 2010). Además los ácidos grasos libres también incrementan los niveles basales de insulina, sin embargo a altas concentraciones inhibe la liberación de insulina desde las células B en respuesta a la glucosa. Por tanto, este fenómeno conocido respectivamente como glucotoxicidad y lipotoxicidad mediada por una disfunción de células B en la resistencia insulínica (Muoio y Cols. 2008).

La demanda incrementada de insulina da como resultado un estrés en el retículo endoplásmico y muerte celular. La amilina es hipersecretada con la insulina desde las células B, esto produce fibrillas de amiloide que se almacenan en las células B y causa una disfunción de las mismas. La sensibilidad individual a la insulina tiene un feedback mutuo entre las células B y el hígado, musculo esquelético y tejido adiposo y por tanto puede correlacionarse con la secreción de amilina. Cuando este feedback no funciona correctamente, se produce un desajuste en la tolerancia a la glucosa y llevara a DMII (Muoio y Cols. 2008).

La glucotoxicidad y lipotoxicidad llevan a una progresión de la resistencia a la insulina a la pre-diabetes y finalmente a la DMII. Muchas de las complicaciones de la DMII, denominadas enfermedades macrovasculares como la enfermedad cardiovascular y microvasscular con la retinopatía, neuropatía y nefropatía pueden contribuir a prolongar la

hiperglicemia y por tanto el riesgo de estas condiciones puede empezar en fase de prediabetes (Grundy y Cols. 2012).

6-2. Hipertensión:

La resistencia a la insulina y/o hiperinsulinemia están presentes en la mayoría de los pacientes HTA (Leroith y Cols. 2012). A través de la vía de señalización a través de PI3K y la fosforilación de la NOs endotelial, la insulina estimula NO, un potente vasodilatador. En un individuo sensible a la insulina, la ingesta produce liberación de insulina y la disponibilidad de glucosa, lo cual lleva a la vasodilatación de la musculatura esquelética vascular (Muniyappa y Cols. 2008). Endotelina 1 es un vasoconstrictor estimulado por la actividad insulínica a través de la vía APK. La endotelina es inhibida por NO. En un individuo sensible a la insulina, los efectos estimulados por la insulina son compensados por la producción de NO estimulada por la insulina, dando como resultado una homeostasis hemodinámica. Sin embargo, en el momento que se inicia la resistencia insulínica, la señalización a través de PI3K es disfuncionante, disminuyendo la producción de NO e incrementándose la de endotelina y la subsiguiente HTA (Muniyappa y Cols. 2008). Además las condiciones presentes en la resistencia insulínica como el incremento de las citocinas inflamatorias elevan ROS, disminución de los niveles de adiponectina y disminución de la sensibilidad a la leptina, pudiendo llevar a un descenso del NO, incrementos de la endotelina-1 apareciendo la HTA, agravando aun mas el problema (Muniyappa y Cols. 2008).

En la obesidad el SNS esta a menudo hiperactivo. Cuando esto ocurre de forma crónica, la elevación de la tensión arterial puede ser resultado de una vasoconstricción periférica y un aumento de la reabsorción de sodio a nivel del túbulo renal (Vaz y Cols. 1997).

Además a estos efectos sobre el apetito y el metabolismo, la leptina puede mediar incrementos en la actividad simpática renal y de la tensión arterial por cambios en el hipotálamo ventromedial y dorsomedial (Marsh y Cols. 2003). Los estudios sugieren que en la obesidad, existe el concepto de la resistencia selectiva a la insulina, en el cual hay resistencia a los efectos supresivos de la leptina sobre el apetito, pero sensibles a los efectos activadores simpáticos a nivel renal de la leptina. De hecho la hiperleptinemia se piensa que

explica muchos de los incrementos en el tono simpáticos renal observados en la obesidad (Rahmouni y Cols. 2005).

La activación del SRAA puede también jugar un papel en la asociación entre la HTA y SM. El SRAA es un complejo hormonal que regula la presión arterial. La renina es secretada en respuesta a una volemia disminuida y promueve la conversión de angiotensinógeno en angiotensina I. La angiotensina I se convierte en angiotensina II un potente péptido vasoactivo que causa vasoconstricción, dando como resultado un incremento en la tensión arterial. Estudios en ratones demostraron que el angiotensinógeno derivado de adipocitos puede actuar localmente afectando al crecimiento y diferenciación del adipocito y puede ser secretado en la circulación sanguínea (Massiera y Cols. 2001). Por tanto los niveles elevados de angiotensinógeno en obesos pueden ser secundarios a un incremento de la grasa y por tanto de angiotensinógeno que puede producir vasoconstricción y HTA.

Aunque no se han realizado estudios que valoren los efectos de la IL-18 sobre el tono vascular, esta citocina ha demostrado en varios estudios que promueve la proliferación y migración de las células de musculo liso vascular (Chandrasekar *y Cols.*, 2006; Valente *y Cols.*, 2012) proceso muy importante en el remodelado vascular asociado y que contribuye a la HTA.

Estos efectos parecen ser debidos a un incremento en la producción de ROS dependiente de NADPH oxidasa (NOX) y la subsecuente activación de las vías de transcripción NF kappa beta y AP-1 (Valente *etal.*, 2012). Además la respuesta proliferativa de las células de musculo liso vascular cultivadas in vitro a la angiotensina II es bloqueada siguiendo una ruta que lleva a la inactivación de la traducción del gen de la IL-18 (Valente *etal.*, 2012), indicando que la IL-18 podría ser un intermediario importante en la vía en la que la Angiotensina II promueve el remodelado vascular. Hay evidencias de que los niveles de IL-1 beta e IL-18 están elevados en la HTA, así pacientes con HTA esencial tienen niveles séricos mas altos de IL-1 beta que los controles normotensos (Dalekos y Cols. 1997). Además monocitos aislados de sangre periférica procedente de individuos HTA con respecto a los normotensos generan mas cantidad de IL-1 beta en respuesta a la estimulación con angiotensina II o LPS (Dörffel *y Cols.*, 1999; Li *y Cols.*, 2005). Estos datos no solo sugieren que los monocitos de pacientes HTA tienen favorecida la producción de IL-1beta, si no que

además indica que la ATII puede actuar directamente sobre los monocitos iniciando la producción y/o liberación de la citocina. De acuerdo con este último concepto los antagonistas del receptor de la ATI inhiben la producción de IL-1beta por los monocitos aislados de HTA, tanto cuando se administra a paciente *in vivo* o cuando es preincubada *ex vivo* y a continuación se cultivan. (Dörffel y Cols., 1999; Li y Cols., 2005).

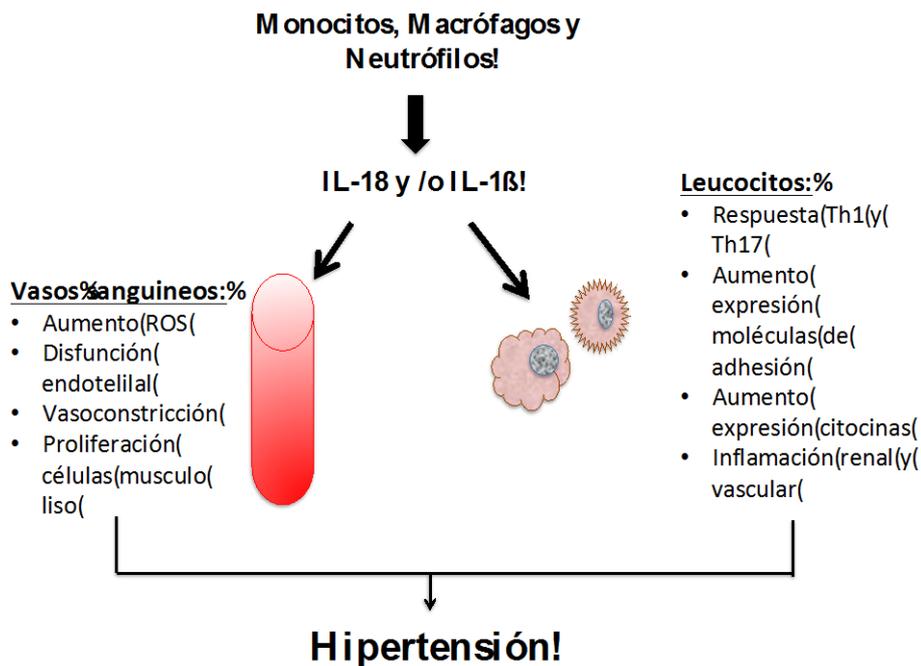


Figura 16: Acciones de la IL-1B y/o IL-18 en los mecanismos mediadores de la hipertensión. IL-1B e il-18 son primordialmente secretadas por monocitos, macrófagos y neutrófilos. Estas citocinas proinflamatorias pueden actuar sobre las células inmunes como macrófagos, células dendríticas y neutrófilos así como otros tipos celulares no pertenecientes al sistema inmune, incluyendo endotelio vascular y células del músculo liso, para inducir inflamación u otros efectos pro hipertensivos.

Dado que los monocitos se acumulan en la pared de los vasos y el intersticio renal durante la HTA, estas células podrían convertirse en una importante fuente de IL-1Beta a nivel renal (Haller y Cols., 1997; Boos and Lip, 2006), y hay evidencia de la mejora de la respuesta a IL-1beta en hipertensión, específicamente el tratamiento *ex vivo* con IL-1 beta causa una respuesta vasoconstrictora en aorta procedentes de ratas HTA en comparación con normotensivas, y esto provoca la activación de COX (Dorrance, 2007), si esta respuesta a nivel de la vasculatura es debida a la activación del receptor de IL-1 o es el paso final de una cascada de señalización queda pendiente de estudio. Finalmente se ha comprobado que los

niveles de IL-1RA se encuentran elevados en pacientes con HTA esencial en comparación con normotensivos posiblemente como consecuencia de efecto compensador sobre las cantidades elevadas de IL-1 beta (Peeters y Cols., 2001).

En cuanto a la IL-18 un metaanálisis investigando la asociación entre la IL-18 y la HTA identifica una correlación positiva entre HTA y los niveles circulantes de IL-18 (Rabkin, 2009). La IL-18 también se correlaciona positivamente con el grosor de la intima-media carotídea (Yamagami y Cols., 2005) lo que es una consecuencia de la HTA y marca el futuro riesgo cardiovascular de estos pacientes (VanBortel, 2005). Juntando todos estos hallazgos nos encontramos el gran papel que juegan las citocinas pertenecientes a la familia de la IL-1 como mediadores tempranos de inflamación y potenciales contribuidores a la patogénesis de la HTA.

En sujetos con HTA esencial ha sido investigado el impacto de los factores del SM sobre el estrés oxidativo y sobre las actividades de las enzimas antioxidantes (Abdilla y Cols. 2007). El status entre estado oxidativo y antioxidante fue controlado con la medida de GSH oxidado/reducido. Productos de peroxidación lipídica inducidos por ROS (MDA), dañan el DNA genómico y mitocondrial, la actividad plasmática de SOD y catalasa y la actividad de GSH-Px en eritrocitos hemolisados. Estos parámetros fueron evaluados en HTA, algunos de ellos con criterios de SM y en normotensos. El estrés oxidativo y la reducción en la actividad de las enzimas antioxidantes objetivados en HTA no se encontraron afectados por la presencia de otros factores del SM (hipertriglicerilemia y hiperglucemia en ayunas) (Abdilla y Cols. 2007). Entonces la HTA podría ser considerada un factor crucial en el desarrollo del estrés oxidativo y la disfunción endotelial.

Un modelo animal de SM consiste en el empleo de ratas obesas hipertensas, estos animales muestran una relajación reducida dependiente de endotelio, a pesar de un incremento en la generación de NO por este endotelio (Kagota y Cols 2007). El efecto de amlodipino, moxonidina y telmisartan en la función endotelial mostro que solo el telmisartan disminuía la vasodilatación mediada por acetilcolina e incrementaba la expresión de NO sintasa (Kagota y Cols 2007). Una activación de la NADPH oxidasa junto a la estimulación de los receptores AT1 podría ser responsable del incremento de la producción de O₂⁻ y una subsiguiente reducción en la disponibilidad de NO.

ADMA, un inhibidor de la NOS esta incrementada en sujetos con hipercolesterolemia, resistencia insulínica, DNMI e HTA y esto se correlaciona con el grosor de la intima-media carotídea. La infusión de ADMA disminuye la complianza vascular e incrementa la retención de sodio (Kielstein y Cols. 2007).

La IL-18 promueve la proliferación y migración de las células de musculo liso, paso critico en el proceso de remodelado vascular asociado, contribuyendo a la HTA. La respuesta proliferativa, a la angiotensina II, de las células de musculo liso cultivadas *in vitro* es el bloqueo de la señal de transducción de la IL-18.

6-3. Dislipemia:

En el SM el perfil lipídico a menudo se relaciona con niveles bajos de HDL y niveles elevados de TG. La resistencia insulínica lleva a un perfil lipídico anormal (Ginsberg y Cols. 2000). Como se dijo anteriormente en la resistencia insulínica hay un incremento de la producción de ácidos grasos libres en los adipocitos a través de la pérdida de inhibición de la lipasa sensible a la hormona. Además, la función de la lipoproteinlipasa endotelial esta dañada, produciendo un incremento de los ácidos grasos libres circulantes. El incremento en la carga de ácidos grasos libres al hígado va emparejado con la estimulación de la lipogénesis hepática dando como resultado un incremento en la producción hepática de TG como VLDL, así como esteatosis hepática (Boden y Cols. 2008). Los adipocitos producen proteína transferasas de esterios de colesterol que facilita la transferencia de esterios de colesterol desde el HDL al VLDL. De forma adicional hay un incremento del aclaramiento renal de HDL y la retirada hepática de HDL y la producción de VLDL llevando a bajos niveles de HDL y altos de TG que caracterizan al SM (Gallagher y Cols. 2011).

Muchos estudios han encontrado que el HDL es un predictor inverso independiente para enfermedad cardiovascular. Las partículas de HDL protegen contra la enfermedad arterial por su habilidad para participar en el transporte reverso de colesterol (un proceso que transporta el exceso de colesterol desde los tejidos periférico al hígado para su excreción) para reducir oxidación, inflamación y trombosis para mejorar la función endotelial y reparar y promover la secreción y sensibilidad a la insulina (Barter y Cols. 2011)

Un largo meta-análisis de los estudios prospectivos encontraron un incremento en el riesgo de enfermedad coronaria en individuos con niveles de TG en el tercio superior de la población en comparación con aquellos en el tercio inferior (Sarwar y Cols. 2007). Diferentes grupos de investigadores han demostrado que una disminución en los elevados niveles de TG estaba asociado con una disminución en los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular cuando los comparáramos con aquellos con niveles de TG elevados de forma persistente (Tirosch y Cols. 2007). Otros estudios han encontrado una carencia en la evidencia para apoyar una relación entre los factores de riesgo cardiovascular y los niveles de TG (Di Angelantonio y Cols. 2009). Por tanto la importancia de TG como un factor causal de enfermedad cardiovascular debe ser determinada. Sin embargo cuando combinamos con bajos niveles de HDL, los niveles elevados de TG representan un riesgo incrementado de enfermedad cardiovascular (Miller y Cols. 2011).

Kadoglou y Cols. en 2005 encontró que los pacientes diabéticos con hipercolesterolemia tienen niveles elevados de metaloproteasas (MMP-7, MMP-8), IL-18, y hsCRP. El tratamiento con atorvastatina mejora el perfil lipídico y reduce significativamente los niveles de MMP-7, MMP-8, IL-18 y hs CRP.

7. Esteatosis hepática no alcohólica:

Se define como una depósito de TG en hígado mayor del 5% del peso total hepático en ausencia de consumo de alcohol excesivo (Szczepaniak y Cols. 2005), la primera etapa se caracteriza por esteatosis, acumulación grasa en el hígado. Este se continua por una esteatosis no alcohólica, la cual se caracteriza por daño hepático e inflamación (Scorletti y Cols. 2011). Afecta al 15-30% de la población general y al menos al 70-90% de los obesos o DMII, sugiriendo una conexión entre obesidad, la resistencia insulínica y esteatosis hepática no alcohólica (Targher y Cols. 2007). La asociación con SM no es exclusiva de los obesos, en un estudio con cerca de 30.000 coreanos, la esteatosis hepática no alcohólica se asociaba con el riesgo de desarrollar componentes del SM con incluso una asociación mas fuerte en los individuos no obesos en comparación con obesos (Kwon y Cols. 2012). La estrecha relación entre SM y esteatosis hepática no alcohólica no es inesperado teniendo en cuenta ambos aspectos comunes asociados a la resistencia insulínica e inflamación así como incrementos compartidos en el riesgo de desarrollo de enfermedades metabólicas (Asrih y Cols. 2015).

En condiciones de resistencia insulínica, la pérdida de inhibición de la lipasa sensible a la insulina lleva a una lipólisis incontrolada y un aumento de flujo de ácidos grasos libres hacia el hígado. Los incrementos en los ácidos grasos libres causa una resistencia hepática a la insulina al inhibir los efectos de la supresión de insulina sobre la gluconeogénesis, dando como resultado una mejora de la gluconeogénesis hepática. El incremento de esta gluconeogénesis produce un aumento de glucosa hacia la vía lipogénesis hepática, un proceso que paradójicamente está potenciado por la insulina en los individuos con resistencia insulínica. Esto produce un incremento del almacenamiento hepático de lípidos. El incremento de la acumulación de ácidos grasos libres en el hígado da como resultado la β -oxidación a nivel mitocondrial y la producción de radicales libres, aumentando la producción de ROS y citocinas inflamatorias. Esto entonces puede producir daño mitocondrial, aumentando la acumulación hepática de grasa y esteatosis hepática no alcohólica (Scorlitti y Cols. 2011).

El diagnóstico de esteatosis hepática no alcohólica está asociado con un incremento en la incidencia de enfermedad cardio-vascular (Targher y Cols. 2007). Los mecanismos que unen esta patología con el riesgo de ECV no se conocen bien. Se ha sugerido que la esteatosis podría incrementar la resistencia insulínica y la DLP con una sobre producción de TG llevando a aterosclerosis. De forma adicional, los ROS que se producen en la esteatosis hepática no alcohólica producen un estado pro-inflamatorio que caracteriza el SM y promueve la aterogénesis (Targher y Cols. 2007). La adiponectina puede también tener su papel ya que en individuos con esteatosis hepática no alcohólica se demuestra un descenso en los niveles de adiponectina (Musso y Cols. 2005). De hecho la administración de adiponectina se ha visto que disminuye la hepatomegalia asociada a la obesidad así como la infiltración grasa del hígado en un modelo murino de obesidad (Xu y Cols. 2003).

En el conjunto de la resistencia a la insulina, los incrementos en la acumulación de ácidos grasos libres puede producir esteatosis hepática no alcohólica, además de contribuir al incremento del riesgo de ECV en pacientes con SM.

8. Síndrome ovario poliquístico:

Esta asociado con la resistencia insulínica y frecuentemente se observa en pacientes con SM

9. Apnea Obstructiva del Sueño:

Es una alteración del sueño con una obstrucción del flujo aéreo intermitente produciendo una interrupción o descenso del flujo de aire en la vía respiratoria (Gopalakrishnan y Cols 2011). La obesidad esta fuertemente asociada con el SAOS, una ganancia del 10% de peso aumenta en 6 puntos el incremento de sufrir SAOS (Peppard y Cols. 2000). En un estudio de individuos con un diagnostico reciente de SM, el diagnostico de SAOS esta presente en el 68% (Drager y Cols. 2009). SAOS a menudo resulta en una privación del sueño y somnolencia diurna. La resistencia insulínica esta muy relacionada con el SAOS y podría estar relacionada al aumento de las hormonas contra-reguladoras y el aumento de marcadores inflamatorios (Vgontzas y Cols. 2000).

Las obstrucciones repetitivas dan como resultado fenómenos de hipoxia/reoxigenación que pueden provocar daño tisular y ROS que pueden contribuir a la disfunción mitocondrial y la resistencia insulínica (Lam y Cols. 2012). La inflamación que caracteriza el medio metabólico de los pacientes con SAOS y que a la larga empeora las acciones de la insulina en los tejidos periféricos. Los estudios han mostrado un incremento en las citocinas inflamatorias en SAOS. Estos marcadores están asociados con un excesiva somnolencia diurna (Trakada y Cols. 2007). De forma adicional lo pacientes con SAOS tiene alterada el patrón de adipocinas lo que puede contribuir a la resistencia insulínica y SM, sin embargo los estudios no son concluyentes (Lam y Cols. 2012).

10. Disfunción sexual:

Parece que hay una fuerte asociación entre SM y disfunción sexual. Los individuos con SM se ha demostrado un incremento en los niveles de disfunción eréctil e hipogonodismo. Además la disfunción eréctil puede ser una manifestación de tener un elevado riesgo de sufrir enfermedad cardiovascular.

11. Cáncer:

Los estudios han demostrado una asociación entre cáncer, insulinoresistencia y SM. Los estudios han mostrado un incremento del riesgo de cáncer y mortalidad relacionada con el cáncer en los pacientes con SM. En un estudio sobre 33.000 hombres sin un diagnóstico previo de cáncer, un diagnóstico de SM se asociaba con un 56% más de riesgo de mortalidad por el cáncer en un seguimiento a 14 años (Jaggars y Cols. 2009).

Los individuos con SM tenían hiperinsulinemia y resistencia insulínica. La hiperinsulinemia afecta al riesgo de cáncer y la mortalidad relacionada con el cáncer a través de los efectos mitogénicos directos de la insulina (Chappell y Cols. 2001) Además juegan un papel mitogénico indirecto al mejorar la producción de IGF-1 (Renehan y Cols. 2004) IGF-1 actúa vía mecanismos endocrinos, paracrinos y autocrinos influyendo en el crecimiento celular, proliferación y diferenciación (Braun y Cols. 2011).

El anormal perfil de las adipocinas y citocinas que caracterizan al SM y la insulinoresistencia puede intervenir en el desarrollo tumoral, así la leptina aumenta la proliferación celular en los tumores colorrectales, esofágicos, mama y próstata (Somasundar y Cols. 2004). Junto con sus capacidades anti-inflamatorias efectos promovidos por la insulina, la adiponectina se ha visto que inhibe el crecimiento y proliferación celular en tumores de próstata, mama y esófago (Cleary y Cols. 2009). Los niveles incrementados de IL-6 se han detectado en pacientes con cáncer de mama, próstata, linfomas y mieloma, igual con la IL-18 en melanomas (Carrascal y Cols 2002). El TNF alpha estimula el desarrollo y progresión de muchos tumores al activar el NF-kB.

F. INFLAMASOMAS Y SÍNDROME METABÓLICO

La incidencia de obesidad se ha incrementado en las últimas décadas. La obesidad está asociada con alteraciones metabólicas e inflamatorias crónicas y multiorgánicas (circunscritas al páncreas, tejido adiposo, hepático, cardíaco y músculo). Estas alteraciones incluyen disfunciones en la sensibilización a la insulina, disfunciones de las células B del páncreas, esteatosis hepática no alcohólica y aterosclerosis. Experimentos y evidencia clínica interrelacionan IL-1B e IL-18 con el desarrollo de estas patologías metabólicas y sus complicaciones (Fève y Cols. 2009). Sin embargo los mecanismos moleculares que están implicados y que se deben a una activación del inflammasoma específico del tejido afectado no

están del todo explicados.

1. Regulación de la señalización insulínica por la activación del inflammasoma

La activación de los componentes del inflammasoma NLRP3 y de la Caspasa-1 están incrementados en el tejido adiposo y hepático procedente de ratones obesos y humanos; además, su nivel de expresión está directamente implicado con la severidad de la DM tipo II en individuos obesos (Vandanmagsar y Cols. 2011). Durante el superávit nutricional, además de la hipertrofia para de esta forma lograr un incremento del almacenamiento de lípidos, el tejido adiposo es infiltrado por macrófagos M1 (pro-inflamatorios) que secretan citocinas proinflamatorias (Lumeng y Cols. 2007). NLRP3, ASC y Caspasa-1 están expresados de forma preferencial en el tejido adiposo infiltrado por macrófagos, en el cual el ácido palmítico (ácido graso saturado) y la ceramida lipotóxica inician la activación del inflammasoma NLRP3 a través de un mecanismo que se relaciona con un proceso autofágico ineficiente y la acumulación de ROS mitocondriales explicados anteriormente (Wen y Cols. 2011). La mejora de la activación de la Caspasa-1 mediada por NLRP3 en este tejido adiposo tiene al menos dos consecuencias perjudiciales sobre la sensibilidad de los tejidos a la insulina: Primero, IL-1B inhibe la señalización a través de una fosforilación de la serina del sustrato del receptor de la insulina e induce la expresión de TNF- α , una citocina bien caracterizada como citocina promotora de la resistencia a la insulina y segundo, IL-1B e IL-18 inducen la diferenciación linfocitaria a CD4-Th1 en este tejido adiposo (Vandanmagsar y Cols. 2011).

El inflammasoma también parece tener funciones intrínsecas en el adipocito. Caspasa-1 está sobrerregulado durante la diferenciación adipocítica, este promueve la resistencia insulina a través de los efectos mediados por IL-1B autocrina; sin embargo, quizás más interesantemente, los precursores adipocíticos deficientes en Caspasa-1 se diferencian más eficientemente en adipocitos maduros y tienen un incremento en la tasa de oxidación (Stienstra y Cols. 2010). Por tanto en ratones knock-out para NLRP3, ASC y Caspasa-1 se ha visto que pierden peso y masa grasa, tanto como una disminución de la resistencia a la insulina. Interesantemente un aumento de la pérdida de función de NLRP3 disminuye pero no elimina la activación de caspasa-1 en el tejido adiposo o hígado, sugiriendo que sensores adicionales del inflammasoma podrían contribuir a la fisiopatología de la obesidad, además, la

naturaleza de los estímulos que inician la activación de la Caspasa-1 durante la acumulación de grasa en los adipocitos debe ser estudiada en mas profundidad.

Una vez sintetizado el precursor de la IL-18 (pro-IL-18), y se requiere la acción de la enzima de conversión de la IL-1 (iICE), la cual también es conocida como caspasa-1, para que la IL-18 sea secretada desde el citoplasma hacia el exterior celular. La pro-caspasa 1 primeramente es convertida en Caspasa-1 activa gracias al inflammasoma (aunque el 80% del precursor de la IL-18 permanece inalterado dentro de la célula). El Inflammasoma es un grupo de complejos de proteínas multimericas conformadas por un receptor citoplasmático de la familia de NLR (Nod-like receptor), una proteína adaptadora llamada ASC (Apoptosis-associated Speck-like, con un dominio a nivel N-terminal una zona de anclaje de caspasa (CARD) y la procaspasa (Schroder y Cols. 2010). El complejo de inflammasoma mejor caracterizado es NLPR3 , el cual ha sido descrito en un amplio rango de células como macrófagos, cardiofibroblastos y cardiomicocitos (Vandanmagsar y Cols. 2011) NLRP3 se encuentra de forma inactiva gracias a chaperones citoplasmáticos. Una vez que NLRP3 es liberado, la subsecuente oligomerización lleva a un a adhesión de la procaspasa-1, que provoca la activación de inflammasoma (Schroder y Cols. 2010). La caspasa activa procesa los precursores de la IL-1B, así como de la IL-18. Posibilitando como vía necesaria de inicio de muchas vías inflamatorias incluyendo el NF-kappaB, MAPK, IFN gamma, citocinas y ROS y la resistencia a la insulina (Coggins y Cols. 2012)

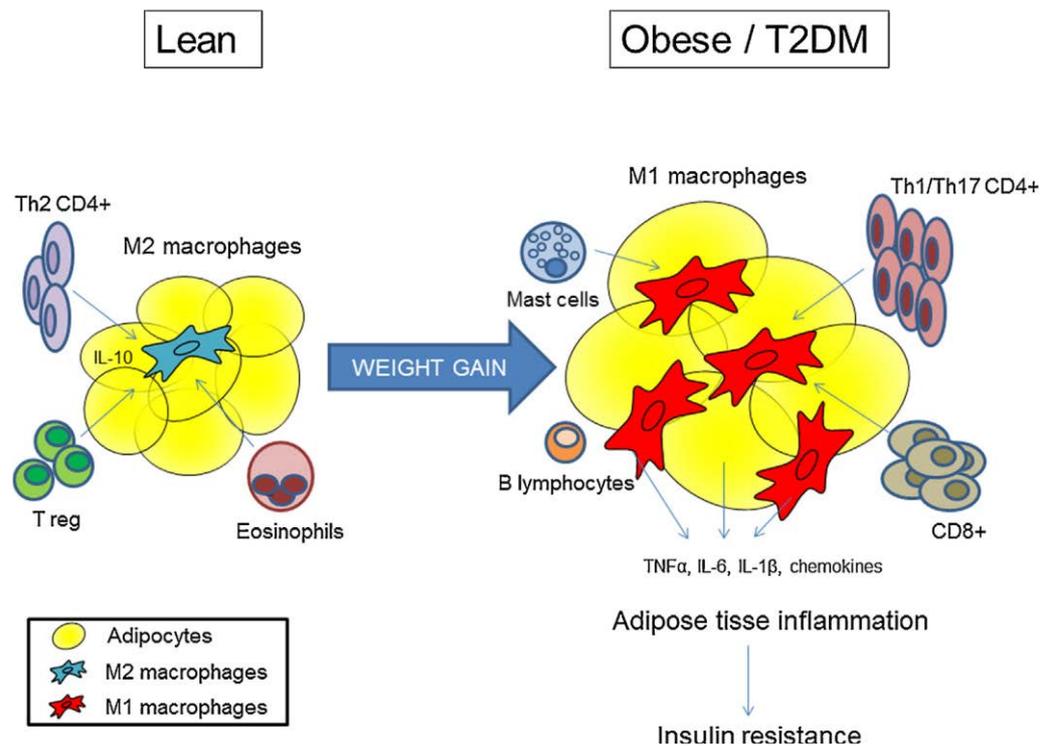


Figura 17: La inflamación del tejido adiposo en la patogénesis del SM y DMII. La obesidad induce la hipertrofia del adipocito, así como cambios en la composición celular del estroma vascular ya que se produce una activación hacia un estado pro-inflamatorio. Las células del sistema inmune adaptativo interactúan con los macrófagos del tejido adiposo modificando su estado de activación. Así el tejido adiposo, Th2, los linfocitos T reguladores provocan el cambio de los macrófagos hacia su forma funcional M2, la cual mantiene un estado anti-inflamatorio. El eosinófilo también podría inducir el estado M2 de los macrófagos. en la obesidad y DM2, el tejido adiposo se caracteriza por un enriquecimiento en macrófagos y linfocitos T produciendo un cambio del estado antiinflamatorio al pro-inflamatorio. CD8+ citotóxicos, linfocitos Th1 y Th17, estimulan el estado funcional de los macrófagos como M1 contribuyendo a la inflamación inducida por la obesidad. Otras células incluyendo los Linfocitos B y mastocitos también están incrementadas en el tejido adiposo de los obesos pudiendo contribuir a la inflamación inducida por la obesidad. En la obesidad el desbalance entre las células inmunes produce quimiocinas y citocinas pro-inflamatorias, lo cual provoca una inflamación sistémica e insulin-resistencia. (Eser y Cols. 2014).

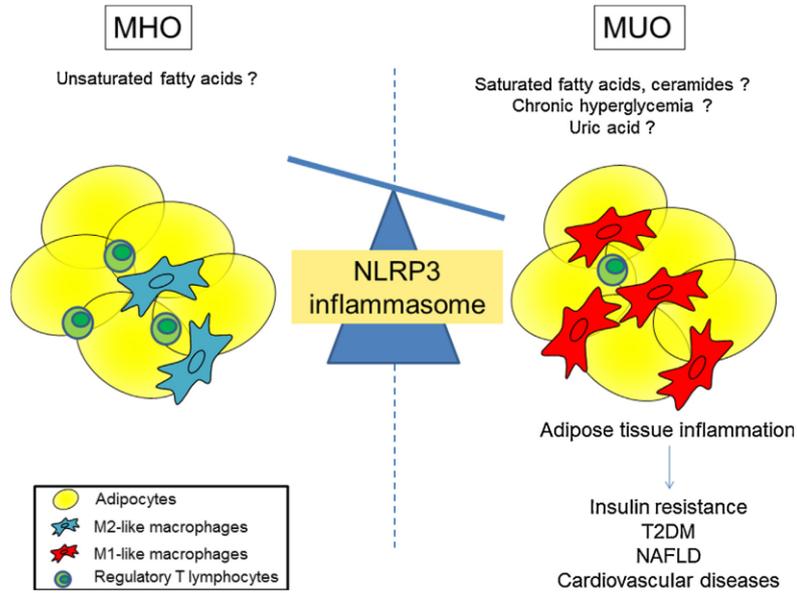


Figura 18: Perfil inflamatorio del adipocito en la falta de equilibrio entre un tejido adiposo de un obeso metabólicamente sano o enfermo. En el tejido adiposo del obeso metabólicamente enfermo a diferencia del metabólicamente sano se produce una gran infiltración del tejido adiposo visceral así como existe una gran activación del inflammasoma NLRP3, y una disminución de los Linfocitos T reguladores antiinflamatorios. Esta descompensación en el equilibrio del perfil inflamatorio podría explicar porque los obesos con metabolismo normal tienen menos riesgo de desarrollo de DMII y enfermedades cardiovasculares. El disparador que determina la activación o no del inflammasoma no se conoce, son candidatos los ácidos grasos, glucosa, ácido úrico... (Eser y Cols. 2014).

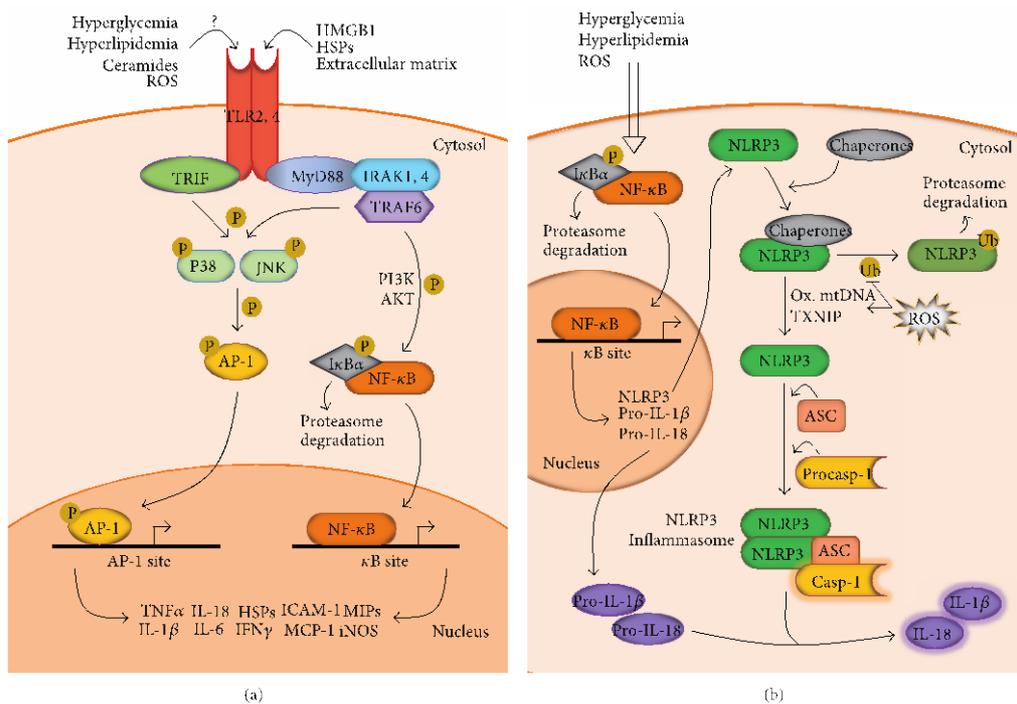


Figura 19: Activación del inflammasoma en el miocardio inflamado a. Acción de TLR-2 t TLR-4, b. El complejo NLRP3 en cardiomiocitos. Fuentes-Antras y Cols. 2014.

TLRs son unas proteínas de anclaje en la membrana presentes en varios tipos celulares desde macrófagos a células B y T pasando por células no pertenecientes al sistema inmune como los cardiomiocitos (Dong y Cols. 2012). Funciona como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) implicados en la inmunidad innata (Coll y Cols. 2010). TLR disparan vías inflamatorias que llevan a la activación del NF-kappaB, activando la proteína-1 AP-1. Los ligandos de dichas proteínas HMGB1, HSP 60, HSP70, endotoxinas y componentes de la matriz extracelular (Tsan y Cols. 2004). También las ROS pueden modificar los componentes de la membrana y provocar la liberación de factores que interaccionen con las proteínas TLR activándolas, a nivel cardiológico predomina la TLR2 y la TLR-4. (Figuras 19, 20 y 21).

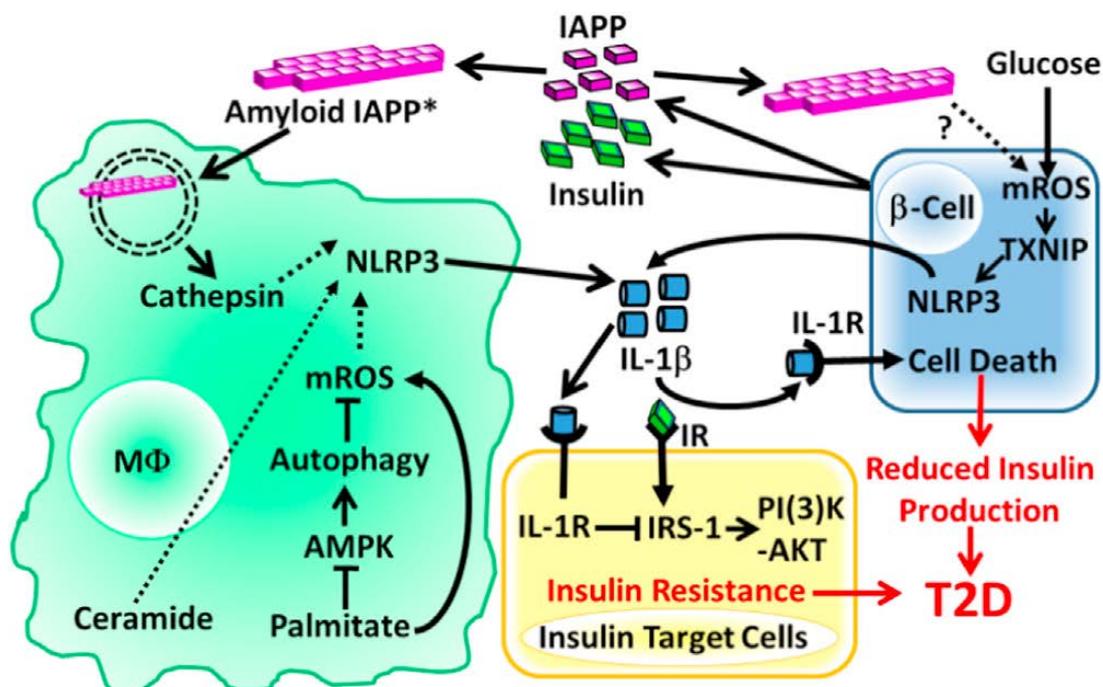


Figura 20: IAPP (islet amyloid polypeptide o amilina) es cosecretada con la insulina desde las células beta del páncreas y en su forma amiloide es internalizado en los macrófagos, este inestabiliza el fagolisosoma provocando una liberación de catepsinas. El Palmitato incrementa los niveles de especies reactivas del oxígeno, catepsinas y ceramidas activando el inflammasoma NLRP3 aunque no se conoce todo el proceso con exactitud. La glucosa y posiblemente IAPP induce la activación del NLRP3 en las células beta por un mecanismo relacionado con las especies reactivas del oxígeno y la activación TXNIP. La liberación de IL-1beta induce la muerte de las células beta y bloquea el receptor de insulina llevando al desarrollo de DMII. (Robbins y Cols. 2014)

2. La activación del inflamasoma empeora la función de la célula B

La hiperglicemia crónica como resultado de la resistencia insulínica a nivel periférico es compensada por un incremento en la producción de insulina por las células pancreáticas. Los procesos de inflamación local junto con los efectos tóxicos de la glucosa contribuyen a acelerar la pérdida de las células B, disminuyendo con el tiempo la secreción de insulina, lo cual fomenta la aparición, a partir de la obesidad e insulín-resistencia, de DMII. IL-1Beta que es expresada preferentemente por macrófagos que infiltran el páncreas y en menor medida por células B, ha sido relacionada con un papel clave de la muerte de células B en condiciones de exposición crónica a elevadas concentraciones de glucosa (Dinarello y Cols. 2010) Un soporte adicional del importante papel de los inflamasomas en el desarrollo de DMII proviene de una reciente investigación que muestra que gliburide, una droga que favorece la secreción de glucosa, abole la liberación de IL-1B mediada por NLRP3 (Lamkanfi y Cols. 2009) y mas importante un dato proveniente de ensayos clínicos con el empleo de IL-1Ra para tratamiento de DMII han demostrado una mejora en el control glucémico y la función de las células B.

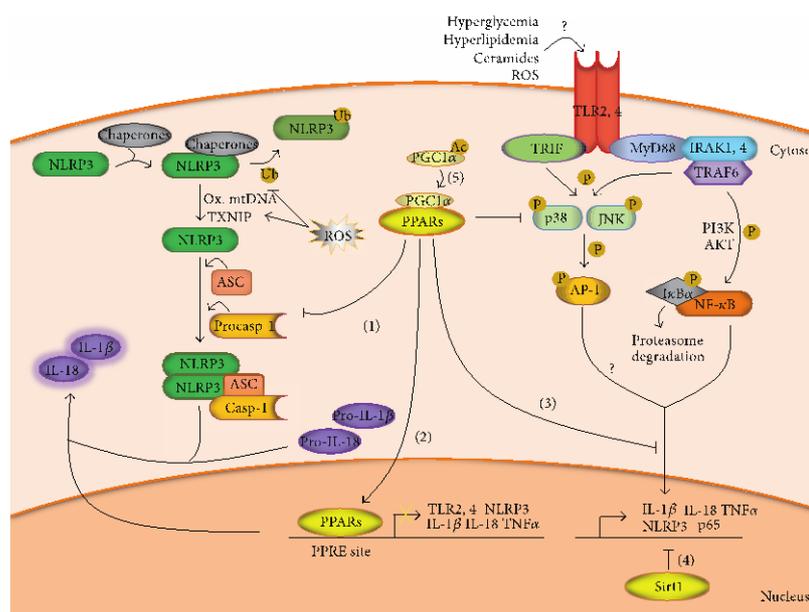


Figura 21: Relaciones entre TLR y el inflamasoma NLRP3 con las alteraciones metabólicas en el SM. PPARs y Sirt1 podrían controlar el inflamasoma NLRP3 y las vías de señalización TLR al interferir con el ensamblaje del inflamasoma (1), la sobreexpresión de genes inflamatorios (2), señalización a través de NF-κB (3-4). Además Sirt1 podría mediar en la activación de PPARs por la de acetilación de PGC1alpha (5). Fuentes-Antras y Cols. 2014.

En el fallo de las células B de los islotes pancreáticos que suceden en la DMII, el inflammasoma NLRP3 puede ser activado por diferentes mecanismos. Primero, la hiperglicemia inicia la producción de ROS por las mitocondrias en la células B al incrementarse la actividad de la cadena de transporte de electrones, la cual induce TXNIP a disociarse de thioredonina, produciendo la activación de NLRP3. Segundo, la severidad de DMII es claramente correlacionada con los niveles de depósito de polipeptido amiloide (IAPP, también conocida como amilina) en los islotes pancreáticos (Seino y Cols. 2001) (Figura 20). A destacar que IAPP ha sido objetivado que activa específicamente el inflammasoma NLRP3 en los macrófagos pancreáticos murinos previamente tratados con gran cantidad de mmLDL (LDL mínimamente oxidada) a través de una vía que se relaciona con la rotura de la vía fagolisosomal (Masters y Cols. 2010). Mas evidencias del papel de la activación de IAPP y NLRP3 en el deterioro de los islotes pancreáticos es debida a la observación de que los macrófagos expresan un mayor nivel de IL-1B en los islotes pancreáticos de los ratones transgénicos con IAPP humana (Masters y Cols. 2010). Mas allá, la IL-1B secretada puede actuar de forma autocrina o paracrina para inducir la muerte o disfunción de las células B y mejorar la expresión de factores quimio tácticos que empeoraría la infiltración de células inmunes. Es de destacar que TXNIP no es requerida para la activación de NLRP3 en macrófagos, fortaleciendo la noción de que el medio celular es un punto crítico de cómo el inflammasoma NLRP3 sensa las señales de daño en el contexto de las anormalidades metabólicas (Masters y Cols. 2010). Sin embargo, a pesar de los grandes avances en los años recientes, hay varias cuestiones que permanecen sin resolver incluyendo el mecanismo por la cual se produce la inducción de pro-IL-1B de las células B, la contribución exacta de la activación del inflammasoma en los macrófagos infiltrantes y da las células B en la progresión de la enfermedad, y el potencial papel de los sensores del inflammasoma en los procesos pancreáticos.

3. Activación del inflammasoma y aterosclerosis

La naturaleza de la inflamación en la aterosclerosis esta bien establecida, pero los agentes biológicos que inician la inflamación de la pared arterial permanece todavía por estudiar. Los cristales de colesterol depositados en los vasos arteriales hace tiempo que se ha demostrado que son el principal factor etiológico de la aterosclerosis, además evidencias recientes sugieren que están presentes desde las etapas tempranas del proceso

aterosclerótico, coincidiendo con la aparición temprana de las células inflamatorias (Duewell y Cols. 2010).

De forma similar a IAPP, los cristales de colesterol activan el inflamasoma a través de la desestabilización del fagolisosomal en macrófagos humanos y murinos tratados con mmLDL (Duewell y Cols. 2010). Los ratones deficientes en receptor de LDL (favorecen aterosclerosis) tratados con medula ósea deficiente en NLRP3, ASC o IL-1alpha/beta son muy resistentes al desarrollo de aterosclerosis, sugiriendo que la activación del inflamasoma NLRP3 y la secreción de IL-1 desde el compartimento hematopoyético son pasos claves en las etapas tempranas de la aterosclerosis. Otro modelo de la aterosclerosis el ratón Apoe -/-, los cuales desarrollan una hipercolesterolemia severa y una aterosclerosis espontánea cuando son alimentados con una dieta rica en grasas. Estudios recientes han demostrado que los ratones Apoe -/- deficientes en receptor de IL-1 y los ratones Apoe -/- tratados con IL-1R muestran un descenso de la aterosclerosis, sugiriendo un papel para el inflamasoma en un modelo murino de aterogénesis (Isoda y Cols. 2006). Interesantemente usando ratones knock-out tanto en ApoE como en los diferentes compuestos del NLRP3, Menu y Cols. en 2011 demostraron que en este contexto, el proceso de aterosclerosis es independiente del inflamasoma NLRP3. La explicación más razonable para esta discrepancia entre los dos estudios mostraba la diferencia entre modelos de aterosclerosis (Apoe -/- vs Ldlr -/-) y en un rol putativo para IL-1alpha en el modelo murino Apoe -/-. Sin embargo esta en boga la interesante posibilidad de que factores ambientales podrían tener algo que decir en estos fenotipos contradictorios. Claramente investigaciones más profundas justifican la implicación del inflamasoma en la patogénesis de la aterosclerosis y su papel sobre las células no hematopoyéticas durante la formación de la placa aterosclerótica.

G. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y MECANISMOS INFLAMATORIOS

La sobreproducción de ROS por la mitocondria es considerada un eslabón clave entre los niveles elevados de glucosa y las rutas metabólicas principales relacionadas con el desarrollo de las complicaciones vasculares de la DM (Nishikawa y Cols. 2000).

Profundizando, la producción de ROS inducida por la hiperglicemia induce varios mecanismos celulares incluyendo el flujo de poliol y hexosaminas, AGEs, activación de PKC y inflamación vascular mediado por NF- κ B (Nishikawa y Cols. 2000). Una de las principales fuentes de ROS en un ambiente hiperglicémico esta representada por PKC y sus metabolitos. Esta hiperglicemia induce una elevación crónica de los niveles de DAG en las células endoteliales con la subsecuente translocación a la membrana de las isoformas de PKC convencionales α , B1, B2 y no convencionales (γ). Una vez que se activa la PKC es responsable de diferentes cambios estructurales y funcionales en la vasculatura incluyendo alteraciones en la permeabilidad celular, inflamación, angiogénesis, crecimiento celular expansión de la matriz extracelular y apoptosis (Geraldés y Cols. 2010). Una consecuencia importantes de la activación de PKC en la generación de ROS. En las células endoteliales, la activación de PKC inducida por hiperglicemia incrementa la producción de superóxido vía NADPH oxidasa (Inoguchi y Cols. 2000). De hecho el tratamiento con inhibidores de PKCB suprime la generación de ROS dependiente de NADPH. (Quagliaro y Cols. 2003).

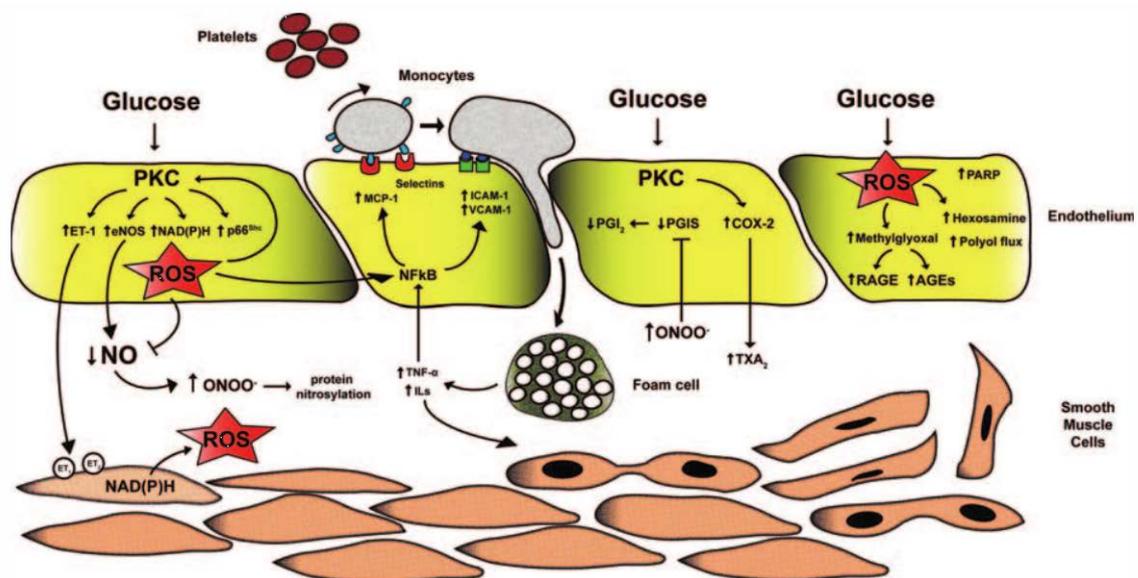


Figura 22: Mecanismos de daños vascular inducidos por la hiperglicemia: las elevadas concentraciones elevadas de glucosa intracelular llevan a la activación de PKC y la subsecuente producción de ROS por la NADPH oxidasa y la proteína adaptadora p66Shc. Los incrementos del estrés oxidativos rápidamente inactiva el NO conduciendo a la formación del ONOO- pro-oxidante responsable de la nitrosilación proteica. La reducción de la disponibilidad de NO se debe a la regulación negativa de NOS endotelial dependiente de PKC. PKC inicia la regulación positiva del enzima por tanto ayudando a la disfunción de la NOS endotelial, posibilitando la acumulación de radicales libres. Además, la hiperglicemia reduce la actividad de NOS endotelial impidiendo la fosforilación activadora sobre la serina 1177. Junto con la carencia de NO, la activación de PKC inducida por la glucosa causa un incremento en la síntesis de ET-1 favoreciendo la vasoconstricción y la agregación plaquetaria. La acumulación de anión superóxido provoca la activación de genes relacionados con la actividad pro-inflamatorias como MCP-1, VCAM-1 e ICAM-1 a través de la

activación de NF- κ B. Estos favorecen la adhesión el rodamiento y la diapédesis de monocitos con la formación de células espumosas en la capa sub-endotelial. Las citocinas inflamatorias provenientes de las células espumosas mantienen la inflamación vascular así como la proliferación de las células de musculo liso, acelerando el proceso aterosclerótico. La disfunción endotelial en la diabetes también se debe a los niveles incrementados de TXA2 a través de la activación de COX-2 y la inactivación de PGIS por el incremento de la nitrosilación. Además los ROS incrementan la síntesis de metabolitos de la glucosa metilglioxal produciendo la activación de la señalización a través de AGE/RAGE y las vías pro-oxidantes de la hexosamina y polioliol. (Paneni y Cols 2013)

Más recientemente se ha visto que la activación de PKC β inducida por glucosa fosforila p66Shc sobre la serina 36 provocando su translocación a la mitocondria, la oxidación del citocromo c y la acumulación de ROS (Paneni y Cols. 2012). La proteína adaptadora p66 Shc funciona como un enzima redox implicada en la generación mitocondrial de ROS y la translocación de las señales oxidativas en apoptosis (Consentino y Cols. 2008). Así ratones diabéticos p66 $^{-/-}$ están protegidos contra la disfunción endotelial y el estrés oxidativo inducido por hiperglicemia. La relevancia de p66Shc en la clínica propia de la DM se sustenta en los datos que muestran que la expresión génica de p66Shc está incrementado en las células mononucleares de sangre periférica procedentes de pacientes con DMII y se correlaciona con los niveles plasmáticos de 8-isoprostano, un marcador *in vivo* de estrés oxidativo (Pagnin y Cols 2005). Además la proteína p66Shc ha aparecido como un modulador de la activación de NADPH fortaleciendo aún más su papel en la generación de ROS (Pagnin y Cols 2005). (Figura 22)

PKC afecta a la disponibilidad de NO no solo a través de la acumulación intracelular de ROS sino también al disminuir la actividad de NO (Consentino y Cols. 1997). PKC también lleva a un aumento en la producción de endotelina-1 favoreciendo la vasoconstricción y la agregación plaquetaria (Geraldés y Cols. 2010). El papel de la endotelina 1 en la fisiopatología de las complicaciones de la DM está confirmada por la observación de que la actividad endógena de ET-1 sobre los receptores de la endotelina está mejorada en los vasos de resistencia de los pacientes con DM (Cardillo y Cols. 2002).

En la pared de los vasos, la producción de ROS dependiente de PKC también participa en los procesos de aterosclerosis al iniciar la inflamación vascular (Giacco y Cols. 2010), los ROS producen una activación y translocación de la subunidad p65 del NF- κ B, y por tanto una transcripción de genes pro-inflamatorios que codifican para MCP-1, selectinas, VCAM-1 e ICAM-1. Este último evento facilita la adhesión de los monocitos sobre el endotelio vascular,

con el posterior rodamiento y diapédesis hacia el sub-endotelio con la subsiguiente formación de células espumosas. La secreción de IL-1 y TNF α por los macrófagos produce una regulación positiva de las moléculas de adhesión al mejorar la señalización vía NF- κ B en el endotelio y también promueve el crecimiento y proliferación de las células del músculo liso (Hink y Cols. 2001). De hecho la inhibición de la isoforma PKC β impide la regulación positiva de VCAM-1 en las células endoteliales humanas expuestas a la glucosa (Kouroedov y Cols. 2004).

La disfunción endotelial en la DM no es solo resultado de la disponibilidad disminuida de NO, sino también por el incremento de la síntesis de vasoconstrictores y prostanoïdes (Hink y Cols. 2001). La activación de COX2 mediada por PKC está asociada con un incremento de Tromboxano A2 y reducciones en la liberación de prostaciclina (PGI2). Estos hallazgos sugieren que PKC es la señalización necesaria que afecta a la homeostasis vascular en situaciones de hiperglicemia (Consentino y Cols. 2003). Los ROS mitocondriales también incrementa los niveles intracelulares de los metabolitos de la glucosa metilglioxal y la síntesis de AGEs (Yan y Cols. 2010). En la DM experimental metilglioxal es muy importante en la fisiopatología de las complicaciones de la DM a través del estrés oxidativo, la acumulación de AGEs y la disfunción endotelial (Sena y Cols. 2012). La generación de AGEs lleva a una disfunción celular al provocar la activación del receptor de AGEs (RAGE) (Yan y Cols. 2010). La señalización AGE-RAGE activa las vías bioquímicas sensibles a ROS como el flujo de hexosamina (Giacco y Cols. 2010). En un ambiente hiperglucémico, un incremento de flujo de fructosa-6-fosfato activa la cascada de hechos que llevan a un diferentes patrón de glicosilación los cuales son responsables de la desregulación de enzimas que están relacionadas con la homeostasis vascular. Además la glicosilación de factores de transcripción causa regulación positiva de genes inflamatorios (TGF α , TGF β 1) y protrombóticos (PAI-1) (Buse y Cols. 2006). La producción de ROS inducida por glucosa también activan el flujo de polyol relacionado con el estrés oxidativo vascular (Nishikawa y Cols. 2000). En concordancia, la hiperactividad de esta vía ha sido asociada con un incremento de las lesiones ateroscleróticas en ratones diabéticos.

Además de la acción directa de estas células inmunes, IL-1 β e IL-18 han demostrado ejercer acciones directas sobre la pared vascular que podrían favorecer su papel como hipertensivas. Por ejemplo discos de arteria aorta de rata cultivadas ex vivo, fueron incubadas con IL-1 β causa un desacople temprano de la vasorelajación dependiente del

endotelio en respuesta a la ACh. Este desacople ocurre a través de un mecanismo que es predominantemente dependiente de la transcripción de ADN. Este efecto parece ser parejo a el incremento de ROS como los vasos tratados con IL-1 beta expresan altos niveles de enzimas prooxidantes, NO sintasa y xantina oxidasa con respecto a los controles Loughrey *y Cols.*, 2003. Briones *y Cols.*, 2005; Jimenez-Altayo *y Cols.*, 2006). Además el tratamiento de los vasos con SOD parcialmente revierte esta relajación defectuosa a la Ach.

Thorand y Hivert encontraron que niveles circulantes altos de IL-18 estaban asociados con una futura incidencia de diabetes cuando realizamos el estudio sobre una cohorte conformada por mujeres de mediana edad. Esta asociación era independiente de los ya conocidos factores de riesgo para DM como son obesidad, dieta, u otros factores de riesgo novedosos como los niveles de adipocinas, esto podría significar que la IL-18 estaría implicado en las primeras etapas del proceso

1. Resistencia Insulínica y aterotrombosis

La resistencia a la insulina es la principal característica de la DMII y se desarrolla en múltiples órganos, incluyendo musculo esquelético, hígado, tejido adiposo y corazón (Saltiel *y Cols.* 2001). El comienzo de la hiperglicemia y la DM es a menudo precedida durante muchos años de resistencia insulínica. La obesidad interviene de manera muy importante en este fenómeno proporcionando una importante conexión entre DMII y la acumulación de grasa (Bhatia *y Cols.* 2007). De hecho, una gran proporción de pacientes diabéticos son obesos (Hossain *y Cols.* 2007). La obesidad es un complejo desorden que lleva a la alteración del metabolismo lipídico, desregulación de las ejes hormonales, estrés oxidativo, inflamación sistémica y una distribución ectópica de la grasa. El tejido adiposo es una fuente activa de mediadores inflamatorios y ácidos grasos libres (Shulman *y Cols* 2000). De acuerdo a esto, lo obesos con DMII desarrollan un incremento de los niveles plasmáticos de marcadores inflamatorios (Cavelti-Weder *y Cols.* 2012). Los ácidos grasos libres se unen al TLR activando NF-kB a través de la degradación del complejo inhibitorio I κ B α por la kinasa IKKB (Kim *y Cols.* 2006). Como resultado, el NF-kB dispara la inflamación tisular a la vez que la regulación positiva de los genes inflamatorios IL-6 y TNF-alpha.

La activación de TLR por los ácidos grasos libres lleva a la fosforilación de IRS-1 por JNK y PKC, por tanto alterando su habilidad para activar posteriormente la kinasa PI3 y

Akt. Estos eventos moleculares producen la regulación negativa de del transportador de glucosa GLUT-4 y por tanto resistencia insulínica (Kim y Cols. 2012). La resistencia insulínica es crucial en la disfunción vascular en sujetos con DMII (Kim y Cols. 2006). Además, la regulación negativa de la vía kinasa PI3/Akt lleva a la inhibición de NOS endotelial y la disminución en la producción de NO (Du y Cols. 2006). Junto con la síntesis reducida de NO, la oxidación intracelular de los ácidos grasos libres almacenados generan ROS produciendo inflamación vascular, síntesis de AGE, actividad de la PGI2 sintasa reducida y activación de PKC (Giacco y Cols. 2010).

Los incrementos en los niveles de ROS asociados con la resistencia insulínica eliminan la producción de NO y produce peroxinitrito con una mayor disminución de la biodisponibilidad de NO. Los bajos niveles celulares de NO facilitan las vías proinflamatorias que llevan al incremento en la producción de citocinas. De hecho TNF-alpha e IL-1 incrementan la actividad de NF-kB y la expresión de moléculas de adhesión. El TNF-alpha también estimula la expresión de PCR la cual regula negativamente la NOSe e incrementa la producción de moléculas de adhesión y endotelina-1 (Cardillo y Cols. 2004). Un estudio reciente demostró que la pérdida de la señalización insulínica en el endotelio vascular produce una disfunción endotelial, expresión de moléculas de adhesión y lesiones ateroscleróticas en ratones (Rask-Madsen y Cols 2010).

Aunque el desarrollo de la resistencia insulínica ha sido atribuida a la inflamación derivada del adipocito, recientes evidencias están poniendo en duda esta teoría. De hecho, la inflamación y la activación macrofágica parece que ocurre en los tejidos no adiposos del obeso (Gray y Cols. 2011).

Este concepto se sostiene por el hecho de que la supresión de la inflamación en los vasos previene la insulín-resistencia en otros órganos y prolonga la esperanza de vida (Hasegawa y Cols. 2012). Consistentemente, los ratones transgénicos con sobreexpresión de Ikbalpha específica del endotelio fue protectora para el desarrollo de resistencia insulínica. En estos ratones, la infiltración macrofágica del tejido adiposo así como lo marcadores de estrés oxidativo plasmáticos inducidos por la obesidad estaban reducidos mientras que en sangre, mitocondrias musculares y el músculo esquelético estaban incrementados, confirmando el papel principal del factor de transcripción NF-kB en el estrés oxidativo, disfunción vascular e inflamación (Hasegawa y Cols. 2012). Otros estudios confirmaron

estos hallazgos, mostrando que la alteración genética de IRS-2 en las células endoteliales reducía la entrada de glucosa en el musculo esquelético. (Kubota y Cols. 2011). Estos hallazgos están fuertemente ligados al papel central del endotelio en la resistencia insulínica inducida por la obesidad, sugiriendo que el bloqueo de la inflamación vascular y el estrés oxidativo pueden ser una prometedora esperanza de cara a prevenir los desordenes metabólicos. A destacar los fármacos para mejorar la sensibilidad de la insulina en pacientes con DMII y SM esta asociada con una restauración de la vasodilatación mediada por flujo (Vitale y Cols. 2005).

Los efectos aterogénicos de la resistencia insulínica son también parejos a cambios en el perfil lipídico como TG altos, baja HDL, incremento de lipoproteínas remanentes, ApoB y LDL elevadas (Zhang y Cols. 2012). Una vez que los ácidos grasos libres alcanzan el hígado, se ensamblan las VLDL y se vuelven solubles por un incremento en la síntesis de ApoB. VLDL es procesado por la proteína transferidora de esterios de colesterol permitiendo la transferencia de TG a las LDL, el cual se vuelve mas denso y mas pequeño y por tanto mas aterogénico. La DLP aterogénica es de hecho un predictor de riesgo CV y su modulación farmacológica reduce los eventos vasculares en sujetos con DMII y SM (Lee y Cols. 2011). (Figura 23)

Los eventos coronarios en pacientes con resistencia insulínica son consecuencia de un estado pro-trombótico. En condiciones fisiológicas la insulina inhibe la agregación plaquetaria y la trombosis. Bajo condiciones fisiológicas, la insulina inhibe la agregación plaquetaria y la trombosis vía inhibición del factor tisular (TF) y mejora de la acción fibrinolíticos debido a la modulación de los niveles de PAI-1. Además, los pacientes con IAM que reciben terapia fibrinolíticos mas infusión de insulina de 48 horas muestran un marcado descenso en los niveles de PAI-1 (Chaudhuri y Cols 2004). En contraste, la resistencia a la insulina facilita la aterotrombosis a través de la síntesis intracelular de PAI-1 y fibrinógeno y reduce la producción de activador del plasminógeno tisular. En plaquetas, la carencia de insulina lleva a una regulación negativa de la vía IRS-1/Akt dando como resultado la acumulación de calcio por encima de las condiciones basales (Vinik y Cols. 2001). El posterior mecanismo podría explicar porque las plaquetas de los diabéticos muestran una respuesta mas rápida y un incremento de la agregación en comparación con aquellas procedentes de tejidos sanos (Ferreira y Cols. 2006). Además la reactividad plaquetar y la

excreción de los metabolitos del tromboxano están incrementados en los obesos con resistencia insulínica y este fenómeno es revertido por la pérdida de peso o tras el tratamiento con pioglitazona (Basili y Cols. 2006). El peso corporal tanto como la sensibilidad modificada a la insulina podría también influir en la recuperación más rápida de la actividad de la ciclooxigenasa a pesar del tratamiento con aspirina (Rocca y Cols. 2012). Un alto índice corporal podría ser un predictor independiente de una inadecuada supresión de la biosíntesis de tromboxano en sujetos no diabéticos tratados con aspirina (Rocca y Cols. 2012). En este estudio, el incremento de la dosis de aspirina fue suficiente para garantizar la inhibición plaquetaria. Esta observación clínica podría explicar el riesgo cardiovascular residual de los pacientes obesos tratados con medicaciones antiagregantes.

La hiperglucemia y la resistencia insulínica sola podría no explicar el persistente riesgo cardiovascular asociado a la DMII. Además, la normalización de la glucemia no reduce los eventos macrovasculares sugiriendo que los mediadores del riesgo vascular más que la glucosa significativamente participan en el incremento del riesgo cardiovascular residual en diabéticos (Sattar y Cols. 2008). En este sentido la disfunción del tejido adiposo, inflamación y la liberación de determinadas adipocinas podría ser relevante (Taube y Cols. 2012). En pacientes con obesidad abdominal, un incremento en el almacenamiento de lípidos conduce a la hipoxia, inflamación crónica junto con cambios en los componentes celulares del tejido adiposo, llevando a una secreción alterada. Las adipocinas ligadas a la enfermedad vascular son leptina, proteína de unión de ácidos grasos del adipocito, interleucinas lipocamina-2 y factor derivado del epitelio pigmentario. Estas moléculas podrían conducir a una disfunción vascular al incrementar la proliferación / migración de las células del músculo liso, la inhibición de NOSe y la activación de la señalización del NF-κB con la subsiguiente expresión de moléculas de adhesión y aterosclerosis (Li y Cols. 2011).

En la bibliografía existen estudios que muestran niveles elevados de IL-18 en relación con la presencia de aterosclerosis subclínica (evaluada como espesor de la íntima media carotídea) incluso después del ajuste para los factores de riesgo tradicionales, PCR e IL-6 (Yamagami y Cols. 2005).

Los datos también apoyan que la IL-18 sería un potente predictor de futuros eventos cardiovasculares. En pacientes con ECV, tanto los niveles circulantes de IL-18 como los polimorfismos en el gen de la IL-18 están asociados con mortalidad atribuible a eventos cardiovasculares (Tiret y Cols. 2005). En dos estudios de seguimiento, niveles elevados de

IL-18 fueron asociados eventos cardiovasculares tanto en hombres sanos (Blankenberg y Cols. 2003), como en mujeres (Everett y Cols. 2009), sin embargo otro estudio de seguimiento a lo largo de 11 años mostro incrementos de la IL-6 y PCR aunque no de IL-18 en relación con futuros eventos cardiovasculares (Koenig y Cols 2006). Además estudios provenientes de 5 cohortes europeas con ECV no mostro asociación entre los polimorfismos del gen de la IL-18 y el riesgo cardiovascular (Grisoni y Cols. 2009).

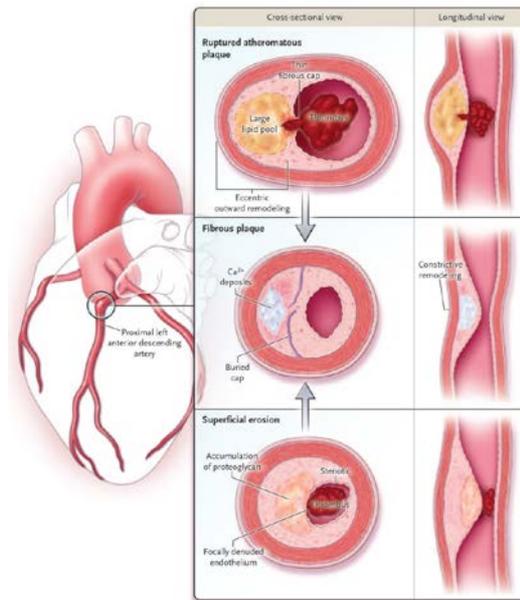


Figura 23: Características del desarrollo y ruptura de la placa aterosclerótica asociada a enfermedad coronaria

IL-18 muestra un alta expresión a nivel de las placas de ateroma, principalmente a nivel de los macrófagos y en las placas inestables (Mallat y Cols. 2001). IL-18 ejerce principalmente sus efectos aterógenos a través de la inducción de IFN gamma, lo cual potencia el proceso inflamatorio que lleva al adelgazamiento o inhibición de la formación de la capa fibrosa de la placa, dando como resultado una placa mas vulnerable a la ruptura (León y Cols. 2005) Además, IL-18 parece que incrementa a expresión de metaloproteinasas en las células vasculares y macrófagos, lo cual podría contribuir a la desestabilización de la placa (Robertson y Cols. 2006).

Además IL-18 podría directamente causar la desestabilización de la placa así como las disfunción cardiaca. En un modelo con ratones knock-out para ApoE, la sobreexpresión de IL-18 mejora la actividad colagenolítica de las células de musculo liso, reduce el colágeno intimal y el espesor de la capa fibrosa, dando lugar a una placa mas vulnerable (de Nooijer y

Cols. 2004). En un modelo murino con IAM el incremento de la expresión de RNAm de IL-18 a nivel cardíaco estaba asociado a una reducción de la contractilidad miocárdica (Woldbaek y Cols. 2003). Es interesante comentar que en un modelo realizado en ratas con SM, la sobreexpresión de IL-18 agrava la resistencia insulínica, incrementa la inflamación vascular y promueve el remodelado por aumento de la infiltración macrofágica y el incremento espesor medio de la pared aortica (Tan y Cols. 2010). (Figura 24)

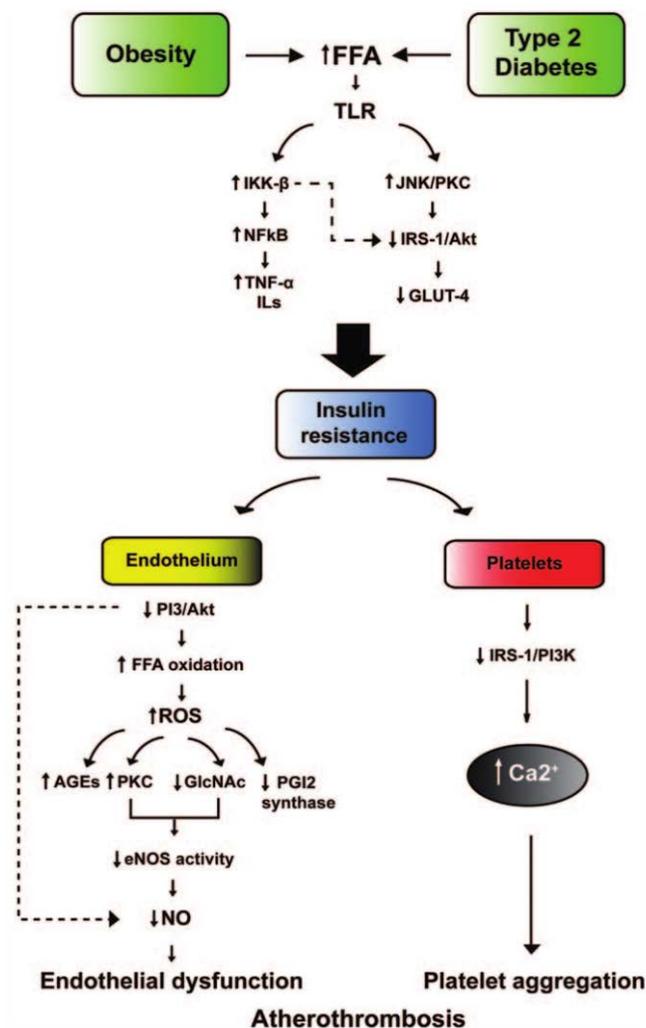


Figura 24: La resistencia insulínica inicia la aterosclerosis. En individuos obesos o con DMII los incrementos de los ácidos grasos libres activando la señalización a través de TLR conduce a la translocación del factor nuclear NF-κB y la subsiguiente activación de genes inflamatorios como TNF alpha e IL-6. Además JNK y PKC fosforilan a IRS-1, lo cual impide la actividad de la kinasa PI3 y Akt. Esto provoca la regulación negativa de GLUT-4 y por tanto la resistencia insulínica. La resistencia insulínica a nivel del endotelio vascular lleva a un incremento en la oxidación de los ácidos grasos libres, la formación de ROS y la subsiguiente activación de vías metabólicas perjudiciales como la

síntesis de AGE, la activación de PKC, la glicosilación proteica así como la regulación negativa de PGI₂. Estos hechos anulan la actividad de NOSe y por tanto causa la disfunción endotelial. La carencia de la señalización a través de la insulina en las plaquetas activa la vía IRS1/PI3K provocando la acumulación de Ca²⁺ y el incremento de la agregación plaquetaria. (Paneni y Cols. 2013)

Tabla 2. Efectos positivos de la disminución de las concentraciones lipídicas en placas ateroscleróticas a nivel de laboratorio.

Reduce la inflamación (niveles bajos de macrófagos, citocinas y quimiocinas) y expresión de moléculas de adhesión leucocitaria
Reducción de la expresión de metaloproteinasas (MMP-1)
Incremento de los niveles de colágeno intersticial
Bajos niveles de lipoproteínas de baja densidad oxidadas
Producción reducida de ROS
Incremento de la expresión de NOSe
Reducción del potencial trombótico (reducción del factor tisular y de su actividad)
Incremento del potencial fibrinolíticos (reducción de los niveles de PAI-1)

1-1. microRNA y enfermedad DM

Los microRNAs don un nuevo tipo de pequeños RNAs no codificantes que esta apareciendo como unos protagonistas importante en los daños vasculares ocasionados por la hiperglicemia (Shantikumar y Cols. 2012). Estos controlan diferentes aspectos de la enfermedad vascular diabética respecto a la regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional. Los estudios de microarrays han mostrado una alteración del panel de expresión de miRs en sujetos con DMII (Dehwah y Cols. 2012). De hecho los pacientes diabéticos muestran una significativa desregulación de los microRNAs relacionados con la angiogénesis, reparación vascular, y la homeostasis endotelial (Zampetaki y Cols. 2010). En los últimos años, diferentes estudios han investigado los mecanismos por los cuales la desregulación de la expresión de microRNAs podría contribuir a la enfermedad vascular en diabéticos. En endoteliales expuestas a altos niveles de glucosa también hay altos niveles de expresión de Micro-320 afectando a varios factores angiogénicos y sus receptores, incluyendo el VEGF e IGF-1. Niveles elevados de miR esta asociado con un descenso de la proliferación celular y la migración, mientras su regulación negativa restaura estas

propiedades e incrementa la expresión de IGF-1 promoviendo la angiogénesis y la reparación vascular (Wang y Cols. 2009).

La hiperglicemia también incrementa la expresión de miR-221 un regulador de la angiogénesis que actúa sobre el receptor c-kit y el cual es responsable de la migración y asentamiento de las células progenitoras endoteliales (EPCs) (Liy Cols. 2009) miR-221 y 222 se encuentra que median en el daño vascular producido por AGE (Togliatto y Cols. 2011). Además la regulación negativa de miR-222 tanto en endoteliales humanas expuestas a altos niveles de glucosa como en ratones diabéticos mejora la disfunción endotelial relacionada con AGE a través de una protein-kinasa dependiente de ciclina relacionada con la inhibición del ciclo celular (P27KIP1 y P57KIP2) (Togliatto y Cols. 2011). Un reciente estudio demostró que miR-502 esta críticamente relacionado con la disfunción endotelial inducida por la hiperglicemia en ratones diabéticos y es regulado positivamente en músculos isquémicos de los miembros de los sujetos diabéticos (Caporali y Cols. 2011). Los efectos deletéreos de miR-503 en el ajuste de la diabetes ha sido explicado por su interacción con CCNE y cdc25A, reguladores críticos de la progresión del ciclo celular afectando a la migración y proliferación de las células endoteliales. Interessantemente, la inhibición de miR-503es capaz de normalizar la neovascularización post-isquémica y la recuperación del flujo sanguíneo en ratones diabéticos. Estos hallazgos dan a entender los efectos protectivos de la modulación de la expresión de miR-503 contra la complicaciones vasculares de la diabetes.

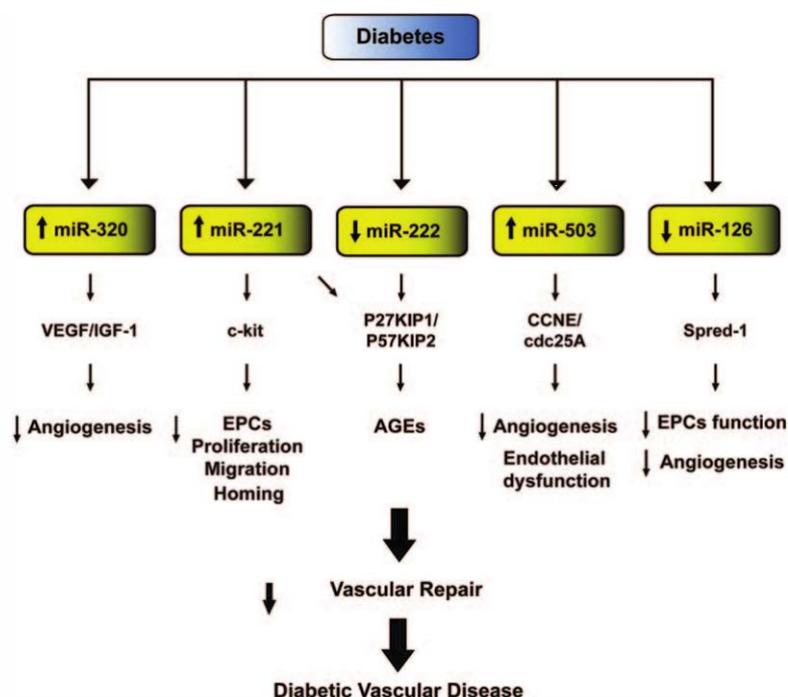


Figura 25: Papel de los microRNAs están relacionados con la afectación vascular de la diabetes. Representación esquemática de los microRNAs y sus probables objetivos contribuye a disminuir la reparación vascular y por tanto la disfunción vascular mediada por la diabetes. (Paneni y Cols. 2013)

El papel de miR plasmáticos muestra una profunda regulación negativa de miR-126 en una cohorte de pacientes diabéticos (Zampetaki y Cols. 2010). Evidencias recientes sugieren que la expresión reducida de miR-126 de los pacientes diabéticos es parcialmente responsable de la incapacidad de reparación vascular en diabéticos (Wang y Cols. 2009). La expresión de miR-126 esta reducida en EPCs aisladas de diabéticos y la transfección con anti-miR-126 evito la proliferación de EPCs así como su migración (Wang y Cols. 2009). En contraste la restauración de la expresión de este miR promueve las capacidades de reaparición de EPCs e inhibe la apoptosis. El papel de miR-126 en la función de EPCs es mediada por Spred-1 un inhibidor de la vía de señalización Ras/ERK un regulador critico de del ciclo celular. (Figura 25)

1-2. Trombosis y Coagulación

Los individuos afectados de DM sufren un incremento del riesgo de eventos y mortalidad coronaria cuando lo comparamos con sujetos no diabéticos (Haffner y Cols. 1998). Este fenómeno esta explicado por la desregulación de los factores relacionados con la coagulación y la activación plaquetaria (Vazzana y Cols. 2012). Ambos tanto la resistencia insulínica como la hiperglicemia participan en la patogénesis de este estado protrombotico (Beckman y Cols. 2002). La resistencia insulínica incrementan el PAI-1 y el fibrinógeno y reduce los niveles de activador tisular del plasminógeno.

Los mayores incrementos en PAI-1 han sido descritos en pacientes diabéticos con un mal control glucémico y con el tratamiento con agentes que disminuyen la glucosaglipzida o metformina objetivamos un descenso del PAI-1 (Lemkes y Cols. 2010). La hiperinsulinemia induce la expresión de TF en monocitos de los pacientes con DMII llevando a un incremento de la actividad pro coagulante de TF así como la generación de trombina, estos eventos son promovidos por la hiperglicemia (Boden y Cols. 2007). Niveles bajos de inflamación inducen la expresión de TF en el endotelio vascular de diabéticos contribuyendo al fenómeno de trombosis (Boden y Cols. 2007).

Las macropartículas, vesículas liberadas en la circulación desde varios tipos celulares a continuación de la activación o la apoptosis, están incrementadas en diabéticos y son predictores de eventos cardiovasculares (Sinning y Cols. 2011). Las macropartículas de DMII han mostrado un incremento de la actividad pro coagulante en las endoteliales. Además las MPs transportan eTF promoviendo la formación de trombos en los sitios dañados, representando un mecanismo novedoso de trombosis coronaria en la diabetes . (Figura 26)

Entre los factores que contribuyen a los efectos protrombóticos de la diabetes, la hiperreactividad plaquetaria es la de mayor importancia (Linden y Cols. 2012). Hay un gran numero de mecanismos que contribuyen a la disfunción plaquetaria afectando a las fases de adhesión, activación así como la agregación de la trombosis mediada por plaquetas. La hiperglucemia altera la homeostasis plaquetar del calcio produciendo anomalías del citoesqueleto e incrementando la secreción de factores proagregantes (Vinik y Cols. 2001). Además la regulación al alza de glicoproteínas Ib y IIb/IIIa en los diabéticos inicia la trombosis vía la interacción con el factor de von Willebrand y las moléculas de fibrina.

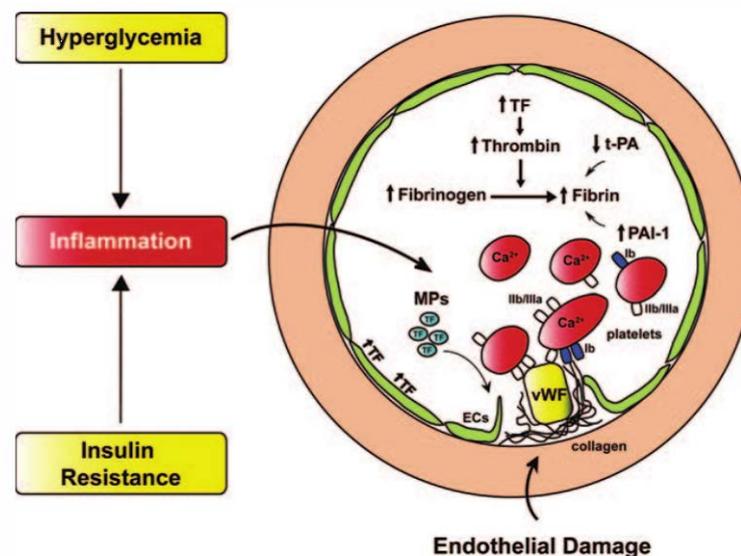


Figura 26: Coagulación y reactividad de las plaquetas en diabéticos. Estos pacientes con hiperglicemias crónicas y resistencia insulínica provocan una alteración de la coagulación así como un incremento de la agregación plaquetaria, provocando un estado protrombotico. La diabetes induce el incremento de los niveles de TF que activan la trombina convirtiendo el fibrinógeno en fibrina. La organización de la fibrina se mejora todavía mas por los niveles elevados de PAI-1 y los niveles reducidos de t-PA. Los incrementos en los niveles de Ca²⁺, la estimulación de la trombina, así como la interacción convWF a través del receptor gpIIb/IIIa conduce a un cambio conformacional de las plaquetas, liberación de gránulos y agregación plaquetaria. La liberación de MPs por el endotelio dañado, así como las plaquetas circulantes contribuyen a desarrollar el trombo. La disfunción endotelial produce la ruptura de la capa endotelial produciendo la exposición del colágeno y la

activación de las plaquetas a través del factor de vW, favoreciendo la trombosis vascular. TF: Factor tisular, t-PA: Activador tisular del plasminógeno, PAI-1: inhibidor del activador del plasminogeno, vWF: Factor de von Willebrand. (Panenei y Cols. 2013)

1-3. Memoria vascular hiperglicémica

Recientes ensayos clínicos prospectivos han mostrado que la normalización de la glucemia no produce un descenso de los riesgos CV en la población diabética. En estos ensayos una terapia intensiva en la reducción de los niveles glucémicos se inicio tras un tiempo medio desde el diagnóstico de diabetes de 8 a 11 años (Boussageon y Cols. 2011). En contraste el tratamiento precoz de la hiperglucemia si era beneficioso (Holman y Cols. 2008). Estos hallazgos aportan el concepto de que el ambiente hiperglucémico podría ser recordado por los vasos. Los ROS están probablemente relacionados con este fenómeno (Ihnat y Cols. 2007).

La persistencia del estrés hiperglucémico a pesar de la normalización de los niveles de glucosa ha sido definido recientemente como memoria hiperglucémica. Para comprender los mecanismos han sido necesarios muchos años y solo recientemente se esta empezando a comprender (Keating y Cols. 2012; Ceriello y Cols. 2009). Hace poco se ha demostrado que las hiperglucemias transitorias activan NF- κ B y este efecto persiste a pesar de la subsecuente normalización de los niveles de glucosa. Este hallazgo es explicado por los cambios epigenéticos que ocurre a nivel de DNA en el promotor de unión a la histona de genes pro-oxidantes y pro-inflamatorios. Específicamente la metilación y acetilación son marcas epigenéticas críticas moduladas por el ambiente hiperglucémico. La metilación del promotor p65/NF κ B por metiltransferasa Set 7/9 dependiente de ROS es de hecho el mecanismo por el cual la inflamación vascular no se revierte al restaurar la normoglucemia (El-Osta y Cols. 2008).

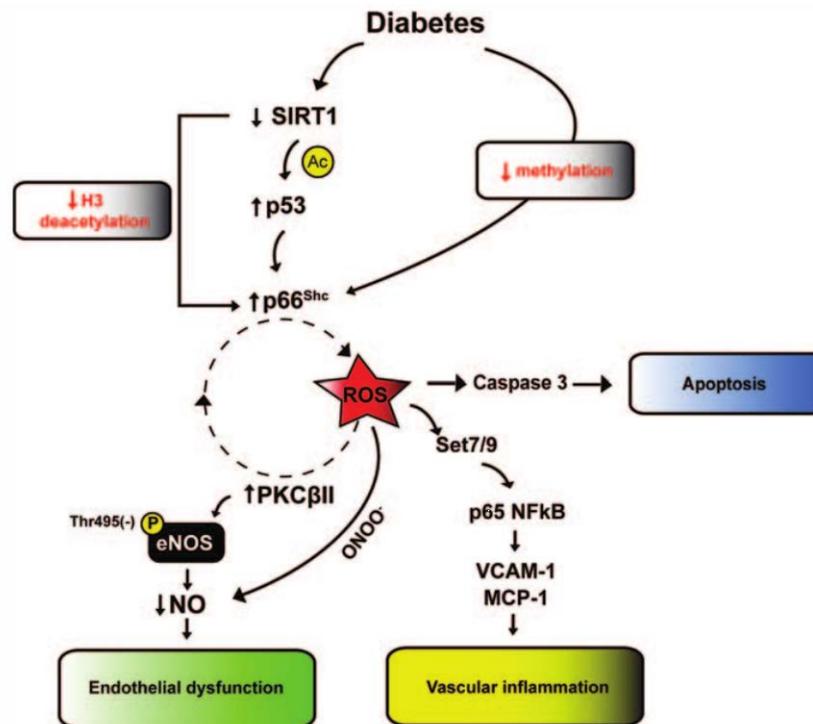


Figura 27: Señalización de la memoria hiperglucemia vascular: la Hiperglucemia causa una desregulación de SIRT1 dando lugar a un incremento de la acetilación de la histona 3 del promotor de p66Shc. Junto con estos cambios la hipometilación del promotor de p66Shc provoca una continua expresión de la proteína adaptadora a pesar de la normalización de la glucosa. La inhibición de la señalización de SIRT también causa un incremento de la actividad de p53. Aumentando las acciones de p66Shc a través de su transcripción génica. La sobreexpresión de p66Shc da lugar a la acumulación de ROS mitocondriales que producen apoptosis e inflamación a nivel vascular y disfunción endotelial a través de un círculo vicioso que implica ROS, PKCB2 y la inhibición de la fosforilación de NOSe en la THr-495. H3: histona, ROS: especies reactivas del O₂, PKCB2: protein kinasaBII, NO oxido nítrico, MCP-1 proteína quimio atrayente de monocitos 1, VCAM-1: molécula de adhesión célula vascular 1.

En las endoteliales de procedencia tanto murina como humana, la normalización de la glucosa no revierte la regulación positiva de la proteína p66 Shc, como se ha comentado antes un adaptador mitocondrial muy importante en la generación de ROS (Paneni y Cols. 2012). La expresión persistente de p66Shc se debe a cambios epigenéticos como la reducción de la metilación y acetilación de histona 3. Además la generación de ROS dependiente de p66Shc mantiene una regulación positiva de PKC BII e inhibe la actividad de NOSe, por tanto alimentando un círculo vicioso a pesar de que logremos la normoglucemia. El estrés oxidativo persistente también es responsable de la apoptosis vascular mantenida a través de la activación de la caspasa 3. El silenciamiento génico de p66Shc elimina la disfunción endotelial, así como el estrés oxidativo en los vasos de ratones diabéticos, sugiriendo que esta proteína lleva a una memoria hiperglucemia (Paneni y Cols. 2012). (Figura 27)

Además otros estudios han mostrado que tanto la deacetilasa de mamíferos SIRT-1 y el supresor de tumores p53 han mostrado datos de una memoria de activación a pesar de la normalización de la glucosa (Zheng y Cols. 2012). Mas interesante aun es que estos hallazgos están en línea con la noción de que tanto SIRT-1 como p53 controlan la transcripción de p66Shc (Zhou y Cols. 2011). Además la actividad reducida de SIRT-1 en diabéticos favorece la acetilación de histona 3 unida al promotor de p66Shc. El incremento de la actividad de p53 mantiene el efecto memoria de p66Shc (Kim y Cols. 2008). Todas estas vías en conjunto podrían estar relacionadas en los pacientes diabéticos con un daño vascular perpetuado por si mismo, a pesar de un control glucémico correcto.

2. Insuficiencia cardiaca

La insuficiencia cardiaca es una condición en que el corazón no es capaz de proporcionar la cantidad apropiada de sangre y eliminar productos nocivos en los diferentes órganos y tejidos. Por tanto la IC con una gran variedad de signos y síntomas es definida como un síndrome, dos síntomas patognomónicos son la disnea y la fatiga con una retención secundaria de agua y sodio a nivel renal lo que conlleva una elevación de la T/A todo lo cual favorece la aparición de edemas en el tercer espacio. Mas a menudo son los ancianos los que presentan IC, ya que además estos son los que presentan muchos factores de riesgo que posibilitan su aparición como HTA, DM, Enfermedad renal, obesidad y apnea del sueño (Jessup y Cols. 2003). La severidad de la clínica es variable, de todas maneras es un proceso progresivo en la que se producen exacerbaciones que requiere de forma constante intervenciones terapéuticas por lo que también se la denomina insuficiencia cardiaca crónica.

Aunque cada uno de los tipos celulares y cámara cardiaca puede estar implicada en el inicio de la IC, a menudo el origen se encuentra con una disfunción de VI que va a provocar una elevación de las presiones de llenado de este VI. Como una mal-adaptación secundaria a la perdida de miocardio viable en un infarto, o una reducción de la contractilidad por una miocardiopatía idiopática o por incrementos en la post-carga por HTA todos ellos conllevan una reducción del gasto cardiaco y/o incrementos en la tensión de la pared del VI con una subsecuente reducción de la complianza. Cuando la FEVI se reduce por debajo del 40% (disfunción sistólica) se produce una reducción de la FEVI. Cuando esta FEVI es mayor de 50-55 % pero hay alteraciones en la relajación de VI dando IC

tenemos una disfunción diastólica, sería una IC con FEVI preservada. Sujetos con IC y FEVI entre el 40-50% son considerados parte de un grupo intermediario (Yancy y Cols. 2013). La disfunción diastólica también puede estar presentes en los pacientes con disfunción sistólica (van Heerebeek y Cols. 2006).

2-1. Activación neurohormonal en IC

A pesar de las diferentes fisiopatologías la IC independiente de su origen se provoca la activación de tres sistemas neurohormonales: el sistema de los péptidos natriuréticos, el sistema nervioso simpático y el sistema renina angiotensina aldosterona. La activación neurohormonal ha sentado las bases de los biomarcadores. La fase inicial de la IC es frecuentemente asintomática. Los cardiomiocitos que funciona en situaciones de estrés comienzan a secretar péptidos natriureticos primariamente a nivel de las aurículas para intentar disminuir la disfunción hemodinámica secundaria a la vasoconstricción y la retención de sodio provocada por el sistema nerviosos simpático y SRAA (Jessup y Cols. 2003) mas específicamente el SNA aumenta la función inotrópica y la vasoconstricción periférica (Triposkiadis y Cols. 2009), mientras el SRAA mantiene y expande el volumen intravascular y la perfusión renal a través de la vasoconstricción en el riñón y activación de la reabsorción tubular de sodio.

El sistema de los péptidos natriureticos consiste en tres péptidos estructuralmente similares aunque genéticamente diferentes: PNA (péptido natriurético atrial), PNB (péptido natriurético tipo B, y PNC (péptido natriurético tipo C). PNA y PNB son sintetizados en el corazón , mientras PNC es producido principalmente en el endotelio y riñón. PNA y PNB actúan través del receptor guanilato ciclasa A (GC-A). PNC preferentemente se une al receptor guanilato ciclasa B (GC-B). Existe un tercer receptor para el aclaramiento de los PNs, el receptor de PN tipo C (NPR-C), el cual podría tener también acciones proliferativas en los cardiomiocitos y acciones anti-fibróticas en los fibroblastos cardiacos (Becker y Cols. 2014) solo GC-A y GC-B, después de la unión de un péptido específico se produce el segundo mensajero GNPc., este media diversas acciones cardiovasculares la cuales se relacionan con la supresión de la proliferación celular, inhibición de la inflamación (Komajda y Cols. 2014), reducción de la activación plaquetaria (Moro y Cols. 1996) y preservación de la función y estructura cardiaca (Greene y Cols 2013). La elevación del la PNs plasmáticas y el subsecuente elevación de GMPc podría ser una respuesta compensatoria de cara a reducir la

mala adaptación cardiovascular inicial de la IC. PNs posee varias acciones incluyendo la natriuresis (Burnett y Cols. 1986), inhibición de la síntesis de aldosterona (Richards y Cols. 1996) y la mejora de la vasodilatación (Melo y Cols. 1998). Los PNs no son los únicos responsables del incremento de los niveles de GMPc. El NO actúa a través de GC soluble, el otro receptor de GC, a través de la producción de GMPc podría modular la inflamación (Eiserich y Cols. 1998), la contractilidad miocárdica (Liu y Cols. 2008) y la disfunción endotelial (Wilkinson y Cols. 2004). Sin embargo, la biodisponibilidad de NO podría estar reducida en IC (Bhushan y Cols. 2014), contribuyendo al estado de deficiencia relativa de GMPc. Las PNs junto con NO, tiende a compensar la disfunción hemodinámica caracterizando las fases iniciales de la IC, a través de la activación de GMPc. Sin embargo el SNA el cual libera catecolaminas, induce efectos opuestos y, de forma adicional, puede directamente activar el SRAA (Jackson y Cols. 2000). La vasoconstricción periférica, incluyendo la vasoconstricción de las arterias renales, inducido por el SNS puede también llevar a hipoperfusión glomerular seguida de la liberación de renina desde el riñón y consecuentemente aumentar el SRAA. Directa o indirectamente hay una intervención renal con un incremento de la angiotensina II y eventualmente también los niveles de aldosterona, de forma importante el riñón es protagonista principal de la IC, ya que lleva a la retención de sodio y agua a través de la activación de los receptores de mineralcorticoides en la nefrona distal (Weber y Cols. 2001). Además, la angiotensina II puede estimular la liberación de norepinefrina manteniendo un círculo vicioso entre SNS y SRAA (von Lueder y Cols. 2013). Durante la progresión de la enfermedad, el incremento del volumen secundario a la retención renal de sal y agua y la vasoconstricción sistémica son deletéreos no solo para la función cardiorrenal sino también para su estructura. Las acciones cardiorrenales de SRAA y SNS son superiores a los efectos beneficiosos de las acciones de PNs-NO/GMPc llevando a una IC sintomática, ingresos hospitalarios y por último muerte.

Es importante destacar que estas complejas interacciones están presentes tanto en la IC crónica como en la aguda, aunque con diferente severidad. Además después del infarto de miocardio la aldosterona se encuentra en sus niveles plasmáticos más elevados. EPHEBUS es un ensayo clínico en el que se trató de testar la eficacia de los bloqueantes de los receptores de mineral corticoides, eplerrenona administrado tras un IAM complicado con disfunción VI e IC. Este ensayo muestra que la adición de eplerrenona reduce la morbilidad y mortalidad (Pitt y Cols. 2003). También la eplerrenona muestra un aumento de la

supervivencia. Específicamente, se reduce significativamente todas las causas de mortalidad en 30 días después de la canonización de los pacientes con IC diastólica (Pitt y Cols. 2005). Por tanto el papel que la aldosterona podría jugar un papel en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares claramente se dilucida a través de IC e HTA.

2-2. Síndrome cardiorenal

Como reporto Braunwald, los síntomas principales de la IC crónica son secundarios al riñón y su retención de sal y agua (Braunwald y Cols. 2013). Por tanto, la interacción entre el corazón y riñón es un componente crucial de la ICC. En condiciones fisiológicas en relación con la IC estos dos órganos interactúan para mantener la homeostasis hemodinámica y el equilibrio electrolítico, especialmente en el mantenimiento de las concentraciones de sodio. Eventualmente, IC llega a ser un síndrome cardiorenal tanto en condiciones agudas como en crónicas en las cuales el filtrado glomerular es inadecuado y prevalece la retención de sodio y agua con refractariedad a diuréticos y PNs endógenos. Cuando el corazón comienza a fallar, las células yuxtaglomerulares del riñón secretan renina. La renina libera angiotensinógeno, producido y liberado en la circulación por el hígado, a angiotensina I. ACE presente a lo largo de los vasos sanguíneos y en los túbulos renales, convierte la angiotensina I en angiotensina II. La angiotensina II es también un potente vasoconstrictor, activa la síntesis y liberación de aldosterona de la zona glomerular de la corteza adrenal, con un incremento secundario de aldosterona (Weber y Cols. 2001). La aldosterona se une al receptor mineral corticoide presente en las células epiteliales de los conductos colectores de la nefrona, induciendo la retención de sodio y la excreción de potasio. Esta acción es regulada por el efecto natriurético de el PNA y PNB, siendo efectivo en un inicio. Sin embargo con la evolución de la IC, las acciones protectoras de PNs/GMPc se pierden, llevando a la progresión de la enfermedad. La sobrecarga de volumen induce el estrés del cardiomiocito y la pérdida de células por apoptosis. También los procesos inflamatorios y pro-fibroticos están iniciados con la acumulación de la matriz extracelular. El remodelamiento, la hipertrofia, la fibrosis y la muerte celular con una disminución de la regeneración miocárdica (Vigliano y Cols. 2011). Esto finalmente media un daño cardiológico irreversible y la llegada a las etapas finales de la IC. En paralelo el riñón también tiene una pérdida de su homeostasis con un malfuncionamiento tisular. El flujo de sangre renal se reduce y/o se reduce el retorno venoso dando lugar a una congestión renal

(Ronco y Cols. 2008) con un incremento secundario de la presión intersticial renal (Burnett y Cols. 1980).

La disfunción sistólica y diastólica están fuertemente asociados con la disfunción renal (Gori y Cols. 2014). Como en el corazón, la pérdida de una perfusión renal correcta da lugar a una inflamación y fibrosis local, y en consecuencia una reducción en la función glomerular y tubular, así como un eventual daño a nivel del parénquima (IRC). Este daño renal y cardiaco se mantiene y se perpetua recíprocamente. Ambos órganos no responden durante mucho tiempo a la compensación y a los sistemas neurohormonales de protección, por lo que la descompensación progresa.

Esta fuerte compenetración entre corazón y riñón es bidireccional. Por tanto, el riñón puede ser el primer órgano que inicie la IC. Este concepto es apoyado por estudios clínicos previos que han mostrado que incluso una disfunción renal moderada puede incrementar el riesgo cardiovascular (Dries y Cols. 2000). En un reciente artículo Martin y Cols. (Martin y Cols. 2012) mostro en un modelo en rata que una moderada disfunción renal producida por una nefrectomía dio como resultado una fibrosis cardiaca temprana con una moderada disfunción diastólica y función sistólica conservada. Estos hallazgos fueron independientes de los niveles de sodio, retención de gua o actividad de aldosterona. Por tanto la conexión riñón-corazón en una disfunción renal moderada puede estar relacionada al menos con dos vías de señalización génica en corazón: TGF-B y la vía de la apoptosis. Estos importantes resultados dan lugar a al hipótesis que un riñón disfuncionante esta asociado con la liberación de factores renales a nivel humoral y/o celular que contribuirían a los cambios en la función y estructura miocárdica.

2-3. IC: biomarcadores o mediadores

PNB, norepinefrina/epinefrina, angiotensina II y aldosterona son potentes marcadores de IC (Anand y Cols. 2003). Arginina-vasopresina (AVP), también conocida como hormona antidiurética (ADH) es sintetizada por el hipotálamo y almacenada en la neurohipofisis. Esta hormona induce la reabsorción de agua por la nefrona, finalmente el incremento del volumen intravascular (Finley y Cols. 2008). AVP es parte de la activación neurohormonal durante la IC. Adrenomedulina es un péptido vasodilatador encontrado por primera vez en el feocromocitoma, pero que ha sido encontrado que es sintetizado por

diferentes órganos como corazón , riñón, musculo liso y endotelio (Yu y Cols. 2001). Los niveles de adrenomodulina se incrementan durante la IC al reducir la precarga y la postcarga. El cortisol producido en la zona fascicular de la corteza adrenal. Esa hormona glucocorticoide si no esta completamente inactivada a nivel local por la 11B-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2, puede inducir la retención de sodio y retención de agua durante la IC a través de su unión al MR (medula renal) en el riñón (Funder y Cols. 2010). En pacientes con IC los niveles de cortisol son mas altos que sin ella (Anand y Cols 1989).

La activación del endotelio, la matriz extracelular, las células del sistema inmune y las reacciones de estrés oxidativo contribuyen a la progresión deletérea de la IC desde la fase compensada a la descompensada y sintomática. Específicamente, endotelinas liberadas por las células endoteliales, induce la liberación de aldosterona y la vasoconstricción (Lerman y Cols. 1992). Citocinas como TNF alpha, IL-1, IL-6 y otras proteínas inflamatorias y moléculas son producidas por macrófagos, linfocitos, endotelio y otros muchos otros tejidos bajo condiciones de estrés. Este miocardio dañado también puede secretar citocinas inflamatorias, todos estos factores llevan a la progresión de la IC.

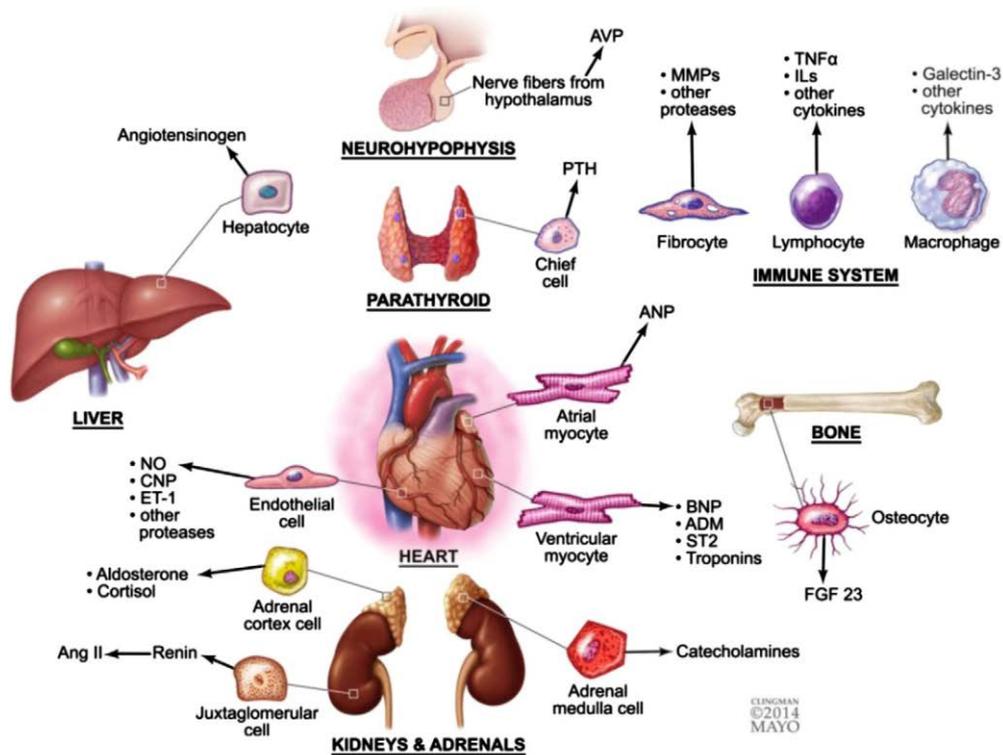
Mas recientemente, en la circulación sistémica en la IC es posible detectar proteinasas de la matriz, enzimas relacionados con el metabolismo del colágeno. Su presencia indica la remodelación de la matriz extracelular y la activación del proceso fibrotico (Braunwald y Cols. 2013). Además Iraqui mostro cambios en los biomarcadores de la síntesis y degradación de colágeno en pacientes con ICC así como disfunción sistólica de VI después de un IAM. Esta remodelación de la matriz extracelular esta atenuada por los antagonistas de la aldosterona (Iraqi y Cols. 2009). Mas allá, la ST2 soluble, la liberación de receptores de IL en respuesta al aumento de tensión miocárdica (Ky y Cols. 2011) y la galectina 3, y el inductor de la síntesis de colágeno derivado de macrófagos (Sharma y Cols. 2004), son también medidos para evaluar la respuesta cardio-protectora al estrés, mientras la galectina-3 se relaciona con los procesos de fibrosis cardiaca. Por tanto, tanto la soluble ST2 y la galectina-3 junto con las peptidasas de colágeno actualmente son ampliamente usados, extendiendo el importante concepto de la monitorización de los cambios en el colágeno extracelular durante la IC.

Importante, el daño isquémico podría caracterizar la progresión de la IC, provocando la liberación al torrente sanguíneo de péptidos específicos del corazón, como las troponinas

(Braunwald y Cols. 2008). En la IC también se ha informado de que podría existir un hiperparatiroidismo secundario. Específicamente la PTH es liberada de las glándulas paratiroideas cuando la hipocalcemia esta presente. Por tanto la homeostasis del calcio podría influir en la IC como la insuficiencia renal. Además, PTH ha sido demostrado que tiene efectos pleiotrópicos directos sobre los cardiomiocitos (Gruson y Cols. 2014). Otra conexión entre el metabolismo óseo alterado y la IC es la liberación del factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF 23) desde los osteocitos (Gruson y Cols. 2012). FGF 23, en adición a la modulación del fosfato sérico, provoca hipertrofia en el miocardio de forma directa.

Un biomarcador debería permitir el diagnóstico, tratamiento, pronóstico. Además debe ser altamente sensitivo, específico, fiable y estandarizado a pesar de la edad, sexo y parámetros antropométricos.

La IC es un cuadro que implica a multitud de participantes en los cuales hay implicado un numero considerable de procesos fisiopatológicos (Jessup y Cols. 2003). La participación de las neurohormonas en la progresión de la IC se ha establecido de forma firme dando lugar a la aparición de nuevas terapias como los inhibidores de la ECA, antagonistas del receptor de la angiotensina y beta-bloqueantes. Sin embargo a pesar de la mejora en los tratamientos es una patología con elevada mortalidad y morbilidad, dando a entender que permanecen inamovibles importantes mecanismos patogénicos a pesar de la terapéutica actual. La inflamación persistente puede representar este mecanismo (Yancy y Cols. 2013). El hecho de encontrar niveles elevados de TNF alpha en el suero de pacientes con IC abre el campo para la profundización en la implicación de la inflamación en el desarrollo de la IC (Braunwald y Cols. 2013). Desde entonces, un gran numero de evidencias han relacionado la activación de las vías inflamatorias como un evento patológico importante en el inicio y progresión de este síndrome (Lam y Cols 2011; Owan y Cols. 2006) (Figura 28) (Tabla 3)



THE ENDOCRINOPATHY OF HEART FAILURE

Figura 28: Activación neurohormonal en la IC: el papel jugado por el endotelio, riñón, medula adrenal, hipotálamo e hipófisis, paratiroides, hígado, sistema inmune y hueso en respuesta a la disfunción cardíaca. Todos estos órganos secretan mediadores para compensar la disfunción cardíaca (Buglioni y Burnett 2015)

Los biomarcadores son importantes en la estratificación del riesgo y para la evaluación de las respuestas terapéuticas en la ECV, y en IC la NT-proBNP (N-terminal prohormona del péptico natriurético cerebral) y la troponina T cardíaca de alta sensibilidad (hs-cTn) ha sido estudiada extensamente (Litle y Cols. 2012). Además al papel directo como mediadores en la patogénesis de la IC, las citocinas inflamatorias y sus mediadores podrían ser utilizados como marcadores de estratificación del riesgo y pronóstico en pacientes con IC (Owan y Cols. 2006).

Biomarcadores y mediadores en IC. Tabla 3		
Factores neurohormonales	Célula de origen	Acciones Biológicas
Péptido Natriurético	Cardiomiocito	Natriuresis/ diuresis Vasodilatación Anti-fibrosis Anti-inflamatorios
Adrenomedulina	Cardiomiocito	Vasodilatación
ST2	Cardiomiocito	Anti-hipertrófico Anti-fibrotico
Troponinas	Cardiomiocito	Contracción miocárdica
Renina	Células Yuxtaglomerulares	Paso de angiotensinógeno a angiotensina I
Angiotensina II	Endotelio pulmonar y epitelio renal	Vasoconstricción Inducción de la liberación de aldosterona
Aldosterona	Zona glomerular de la corteza suprarrenal	Retención de Sodio y agua. Pro-fibrotico Pro-inflamatorio
Cortisol	Zona fascicular de la corteza suprarrenal	Retención de Sodio y agua por MR Hipertensión vía MR
Epinefrina/norepinefrina	Medula suprarrenal/SNS	Vasoconstricción
NO	Célula endotelial	Vasodilatación Anti-fibrotico
Péptido Natriurético C	Endotelio y células tubulares renales	Vasodilatación Anti-fibrotico
Endotelina	Endotelio	Vasoconstricción
PTH	Paratiroides	Incremento de los niveles de calcio
ADH	Hipotálamo	Retención de agua Vasoconstricción
MMPs	Fibroblastos, Monocitos/Macrófagos	Remodelado de la matriz extracelular
Citocinas (IL-1, IL-6, TNF-alpha)	Linfocitos, Monocitos/Macrófagos Fibroblastos	Pro-inflamatorio Pro-fibrotico Remodelado de la matriz extracelular
Galectina-3	Macrófagos	Síntesis de colágeno Inducción de la proliferación e fibroblastos
FGF 23	Osteocito	Reducción de los niveles de fosfato Inducción de la Proliferación de

Muchos autores han sugerido que las citocinas inflamatorias podrían predecir una mala evolución del paciente. Sin embargo muchos estudios tienen tamaños muestrales pequeños y carecen de los ajustes con los mas recientes y específicos predictores como NT-proBNP, hs-cTn y PCR (Little y Cols. 2012; Solomon y Cols. 2012; Triposkiadis 2009), los cuales son frecuentes en los test hospitalarios habituales. Además un gran numero de aspectos pre-analíticos y analíticos de la medida de citocinas podría impedir su uso como biomarcador.

2-3. Citocinas inflamatorias como biomarcadores

2-3-1. Papel patogénico de la inflamación en la IC

Varios estudios han demostrado mejora en la expresión y liberación de citocinas inflamatorias como TNF-alpha, IL-1, IL-6, IL-18, cardiotrofina-1 (CT-1) y Fas ligand, así como con varias citocinas (péptido quimioattractante de monocitos (MCP-1/CCL2, IL-8/CXCL8, CXCL16 y CCL21) en pacientes con IC. Los niveles plasmáticos de estas moléculas parecen estar elevados en la proporción directa a la perdida de clase funcional (NYHA clasificación) y la parámetros cardiacos (por ejemplo FEVI) (Owan y Cols. 2006). Una serie de estudios experimentales realizados en modelos murinos con ratones transgénicos, han revelado que los efectos biológicos de las citocinas pueden explicar varios aspectos de la IC crónica y el papel patogénico de las citocinas inflamatorias en la IC. Por tanto, las citocinas inflamatorias pueden modular las funciones miocárdicas por una gran variedad de mecanismos incluyendo estimulación de la hipertrofia y la fibrosis a través de los efectos directos sobre cardiomiocitos y fibroblastos, empeorando la contracción miocárdica por interferencia en el transporte intracelular de calcio y de las señales de transducción a través de los receptores B adrenérgicos, inducción de la apoptosis, y estimulación de los genes relacionados en el remodelamiento miocárdico (Burnett y Cols. 1986). Además, los efectos indirectos de los mediadores inflamatorios podrían contribuir a la progresión de la IC a través del empeoramiento de la función de la medula ósea con la subsecuente anemia, activación de células endoteliales y catabolismo del musculo

esquelético con la inducción secundaria de la inflamación sistémica y reflejan las anomalías observadas en la IC (Becker y Cols. 2014).

Mientras la inflamación en su esencia, es un hecho beneficioso para el ser humano, una inadecuada o excesiva inflamación puede llevar a una reparación celular defectuosa, daños tisulares y disfunción. Conseguir una respuesta inflamatoria balanceada es difícil cuando se sufre IC, los ensayos que se han centrado en el estudio de citocinas como TNF alpha no han sido satisfactorios (Sangaralingham y Cols. 2011). El uso de anti-TNF-alpha, es muy habitual y beneficioso en enfermedades inflamatorias, pero a nivel de la IC crónica su uso provoca efectos deletéreos ya que ataca a los cardiomiocitos que expresan TNF. Además, mientras niveles elevados de citocinas como TNF alpha pueden ser dañinos, una dosis demasiado baja de estos mediadores también podría ser perjudicial para el miocardio. (Figura 29)

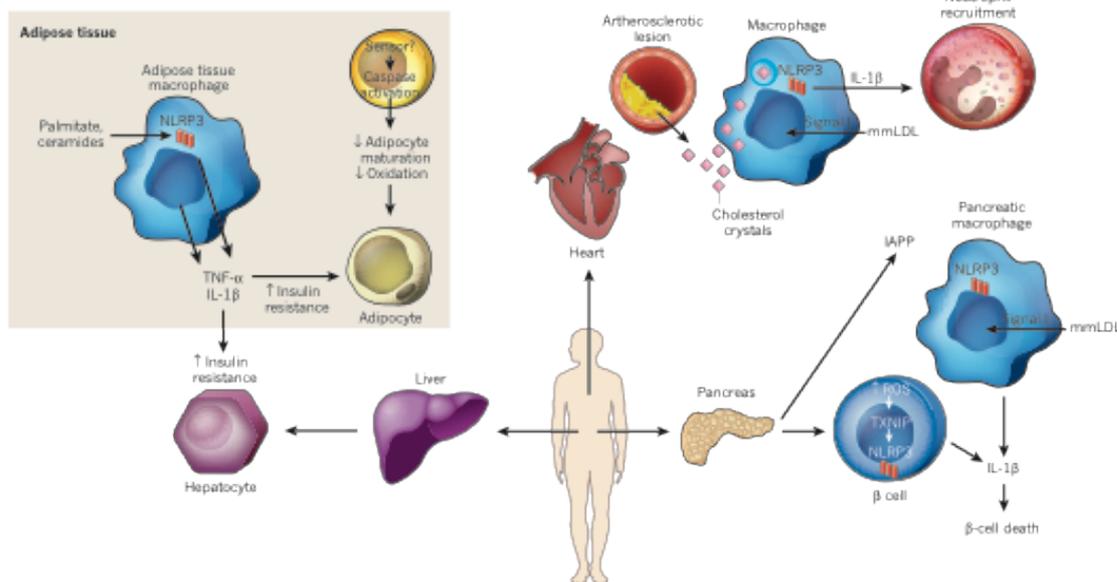


Figura 29: Papel del Inflamasoma en el Síndrome Metabólico: Durante la obesidad, el Inflamasoma NLRP3 es activado por DAMPs asociados a la obesidad en multitud de tejidos y células; el estado proinflamatorio inducido conlleva un deterioro de las funciones metabólicas. En el tejido adiposo el palmitato y las ceramidas activan el inflamasoma NLRP3 en los macrófagos infiltrantes de tejido. Además la activación de la Caspasa-1 a través de proteínas sensoras desconocidas regula la diferenciación del adipocito y la oxidación de los ácidos grasos. En el páncreas, IAPP y la producción aumentada de ROS mitocondriales activan el inflamasoma NLRP3 en macrófagos con niveles aumentados de mmLDL y en células Beta de forma respectiva. El incremento de los niveles IL-1B en los islotes pancreáticos da como resultado la muerte de la célula B y la bajada en los niveles de producción de insulina. Pequeños cristales de colesterol sobre lesiones ateroscleróticas iniciales

activan el inflamasoma NLRP3 en macrófagos con abundante mmLDL, promoviendo la infiltración de células inflamatorias y la progresión de la aterosclerosis. (Panani y Cols. 2013)

3. Acción de las citocinas inflamatorias en los mecanismos moleculares y celulares desencadenados en el tejido miocárdico en situaciones de isquemia-reperfusión

Las enfermedades cardiovasculares se sitúan como la principal causa de mortalidad en las sociedades actuales, dentro de estas tenemos los síndromes coronarios agudos dentro de los cuales, se encuentran los síndromes coronarios agudos con elevación del segmento ST mantenido o infarto agudo de miocardio (IAM), el cual es una de los principales responsables de esta elevada mortalidad. El tratamiento de tales patologías ha avanzado espectacularmente en los últimos años en especial con el desarrollo de las técnicas de angioplastia por las secciones de hemodinámica que permiten la actuación sobre los vasos coronarios enfermos durante la fase aguda del infarto limitando el daño sufrido por el tejido miocárdico por el fenómeno de isquemia y posterior reperfusión del tejido, en estos casos es fundamental el tiempo de actuación sobre la arteria responsable del IAM, ya que cada minuto que pasa, provoca que el daño sufrido por el tejido miocárdico expuesto a la isquemia avance de forma progresiva, aumentando la zona de necrosis. De tal manera que si el tiempo de isquemia supera las 6 horas se considera que el daño provocado a nivel miocárdico es máximo provocándose la necrosis de todo el tejido expuesto a la isquemia. Igualmente hay estudios que muestran que tras el periodo de isquemia cuando la arteria coronaria es reperfundida se produce un incremento del fenómeno inflamatorio, que podría incrementar los daños en el tejido.

El coste económico que supone para el sistema de salud por parte de los enfermos que ingresan en los hospitales con dicha patología, tanto en su fase aguda como los posteriores reingresos consecuencia de el proceso de fibrosis que tiene lugar en la zona infartada y que van a desencadenar un mal funcionamiento miocárdico con los subsiguientes cuadros de insuficiencia cardiaca congestiva, demuestra que es de vital importancia conocer la fisiopatología del cuadro de isquemia a nivel miocárdico para de esta manera una vez conocidos los fundamentos moleculares que ocurren en dicho proceso intentar en un futuro interaccionar en ellos para así limitar el proceso de necrosis y posterior fibrosis miocárdica, ya que ello limitara en un futuro las consecuencias clínicas de un IAM.

Hay bibliografía que demuestra que en la respuesta miocárdica a la isquemia-reperfusión, se produce una respuesta inflamatoria, estando demostrada la intervención a tal nivel de varias citocinas como TNF alpha o IL-18, junto con especies reactivas del O₂ (ROS), estos estudios comenzaron hace pocos años y se están produciendo grandes avances en el conocimiento de los cambios metabólicos y moleculares que se producen en el microambiente miocárdico durante el proceso de isquemia.

Un aspecto clave de la aterogénesis es la llegada y acumulación de leucocitos que se produce en las primeras fases de la producción de la lesión en la arteria coronaria. En general, las células endoteliales normales resisten las interacciones de adherencia con los leucocitos. Incluso en los tejidos inflamados, la mayor parte de la llegada y tráfico de leucocitos tiene lugar en las vénulas poscapilares y no en las arterias. Sin embargo en una fase muy precoz tras el inicio de la hipercolesterolemia, los leucocitos se adhieren al endotelio pasando por diapédesis entre las uniones de las células endoteliales para penetrar en la íntima, donde comienzan a acumular lípidos y a convertirse en espumosas. La adherencia de los monocitos y de los linfocitos T al endotelio está regulada por la expresión de determinadas moléculas de adherencia leucocitaria en la superficie de las células endoteliales tales como selectinas, VLA-4. Se ha comprobado que la expresión de tales moléculas de adhesión leucocitaria a nivel del endotelio vascular hepático está regulado por diferentes citocinas proinflamatorias, así como también por parte del H₂O₂ (Vidal-Vanaclocha 2008).

Por tanto no sería descabellado llegar a pensar que este mecanismo de actuación observado a nivel hepático, debería ocurrir a otros niveles del cuerpo humano como podría ser a nivel cardiovascular. Así hay múltiples grupos de investigación que han puesto de manifiesto que el infarto de miocardio está relacionado con una respuesta inflamatoria (Frangogiannis y Cols., 2004).

Se han establecido modelos animales que simulan el proceso de cardiopatía isquémica, mediante un modelo de isquemia-reperfusión (Nosuli y Cols., 2000) . Durante el proceso de isquemia parte del miocardio sufre necrosis y la parte más externa de la lesión isquémica entra en hibernación. La hibernación del miocardio es un proceso dinámico

asociado con un incremento de la síntesis de moléculas por parte de las células mononucleares que posibilitan un reclutamiento continuo de leucocitos. Los macrófagos pueden acumularse en el miocardio disfuncional induciendo daño tisular y fibrosis. Una revascularización temprana podría ser efectiva por lo menos en parte por la supresión de la inflamación mediada por la isquemia, evitándose por tanto un daño irreversible (Frangogiannis et al 2002).

Como contrapunto, la reperusión del miocardio isquémico esta asociada con una cascada de citocinas que refleja la respuesta celular a la agresión (Nossuli y Cols. 2000). Este estado de isquemia-reperusión genera un estado de estrés oxidativa el cual juega un papel crucial en el desarrollo de la repuesta inflamatoria, fibrosis y disfunción.

La generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en el miocardio reperfundida inducen rápidamente la producción de citocinas a nivel del endotelio vascular en ausencia de infarto o daño celular irreversible. Esta inducción era independiente de TNF alfa (Tareck y Cols. 2001). Las intervenciones que impiden este proceso iniciado por los ROS podría llegar a ser efectivas en revertir la fibrosis y la disfunción cardiaca (Dewald y Cols. 2003).

Las alteraciones en este estado redox median no solo en la lesión tisular, sino que también afectan a la supervivencia del miocardio hibernado (Sharma y Cols., 2006), así como en los niveles de otras citocinas como IL-6 o TNF-alpha (Dewald y Cols., 2003).

Es tan importante el papel del estrés oxidativa en los estados de isquemia-reperusión que se ha comprobado que la expresión génica de la miosina y de otros genes relacionados con el metabolismo (en modelos que imitan la de isquemia/reperusión repetitiva) esta mediada por ROS. Estudios que han profundizado en esta línea han demostrado que la activación de PPAR alfa en este modelo de isquemia-reperusión, es un mecanismo adaptativo que es capaz de prevenir la lipotoxicidad en el miocardio isquémico (Dewald y Cols. 2005).

Como consecuencia del estrés oxidativo, se produce una gran liberación de citocinas proinflamatorias. Estas citocinas proinflamatorias inducen un efecto bifásico en la función cardiaca, una primera fase que comprende efectos inotrópicos y lusotrópicos positivos durante un periodo corto de tiempo (demostrado con el TNF alfa), seguido de una fase

retardada y prolongada de disfunción sistólica y diastólica (demostrado para el TNF alfa e IL-1beta). La primera fase sugiere un efecto directo de la citocina sobre el miocardio por medio de mecanismos que no requieren la expresión génica, mientras que el segundo efecto de disfunción si que requeriría la inducción génica, síntesis proteica y posterior activación de mediadores secundarios. En general las citocinas proinflamatorias se deben de considerar como cardioinhibidoras e inotrópicos negativos en estados fisiopatológicos que impliquen un aumento crónico de la expresión de citocinas (Sumanth y Cols. 2004).

Además de en los estados de isquemia miocárdica, se ha comprobado que las concentraciones plasmáticas de IL-1 alfa, IL-1 beta y TNF alfa están incrementadas en los pacientes con miocarditis aguda. El TNF alfa también esta aumentado en la miocardiopatía dilatada e hipertrófica. Estos resultados sugieren que las citocinas juegan un importante papel en la patogénesis del daño miocárdico en las cardiomiopatías y miocarditis (Matsumori y Cols. 1994). Igualmente se ha demostrado que los miocardiocitos infectados con CVB3, expresan citocinas como CT-1, TNF-alfa e IL-1 Alfa de forma autocrina y paracrina, lo cual induce una respuesta patológica en la miocarditis aguda. La expresión temprana de CT-1 puede jugar un papel protector al inhibir la expresión de TNF-alfa e IL-1 alfa (Okuno y Cols. 2000).

En cuanto a una relación entre citocinas y proceso tumoral, se ha comprobado que la administración de GM-CSF causa un incremento transitorio del diámetro al final de la sístole del ventrículo izquierdo en los pacientes tumorales, por tanto cabe pensar en una ligera y reversible disfunción de la contractilidad del ventrículo izquierdo y podría contribuir a los efectos secundarios cardiovasculares, provocados por esta droga (Knoops y Cols. 2001).

Toda esta activación de citocinas podría pensarse que podría ser seguida de una activación de inhibidores que frenarían la inflamación pero darían lugar a un proceso de fibrosis. Se podría considerar que una mayor activación de citocinas daría lugar a una mayor fibrosis y por tanto tras un proceso isquémico a una insuficiencia cardiaca mayor en aquellos pacientes con procesos tumorales, e incluso a una cardiopatía no isquemia debido al daño que provoca el microambiente tumoral sobre el miocardio.

Dado que endotoxinas (LPS) y exotoxinas bacterianas y una amplia variedad de productos microbianos inducen la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1, TNF-alfa e IFN-gamma y muchas otras, por los macrófagos, por tanto no sería sorprendente que estos mismos activadores estimularan la producción de IL-18. Es una señal temprana en el desarrollo de la respuesta de las células T colaboradoras del tipo 1 (Th1 (Helper T cells tipo 1)). La IL-18 actúa junto con IL-12, IL-2, antígenos y posiblemente IFN-gamma induciendo la producción de IFN-gamma (Okamura y Cols., 1998). Cuando la IL-18 actúa sola, no induce la producción de IFN-gamma por los linfocitos T (Kohno y Cols., 1997; Okamura y Cols., 1995). Sin embargo, *in vitro* el LPS induce la producción de IFN-gamma por esplenocitos murinos, y dicha producción es reducida en gran medida por el uso de anticuerpos contra la IL-18 murina (Fantuzzi y Cols., 1998), sugiriéndose que la IL-18 endógena es esencial para la producción de IFN-gamma por agentes microbianos.

En una larga cohorte consistente en hombres y mujeres con enfermedad arterial coronaria conocida previamente, la IL-18 es por si mismo el único predictor independiente de mortalidad cardiovascular en un subgrupo con SM, incluso tras ajuste por PCR, IL-6 y fibrinógeno (Espinola-Klein y Cols. 2008). En línea con estos resultados se demuestra que la IL-18 es un fuerte predictor independiente de eventos cardiovasculares en hombres de edad avanzada con SM, incluso después de su ajuste con PCR e IL-6 y con un efecto sinérgico de la IL-18 y la hiperglucemia en ayunas en la predicción de riesgo cardiovascular (Troseid y Cols. 2009) (Figura 30).

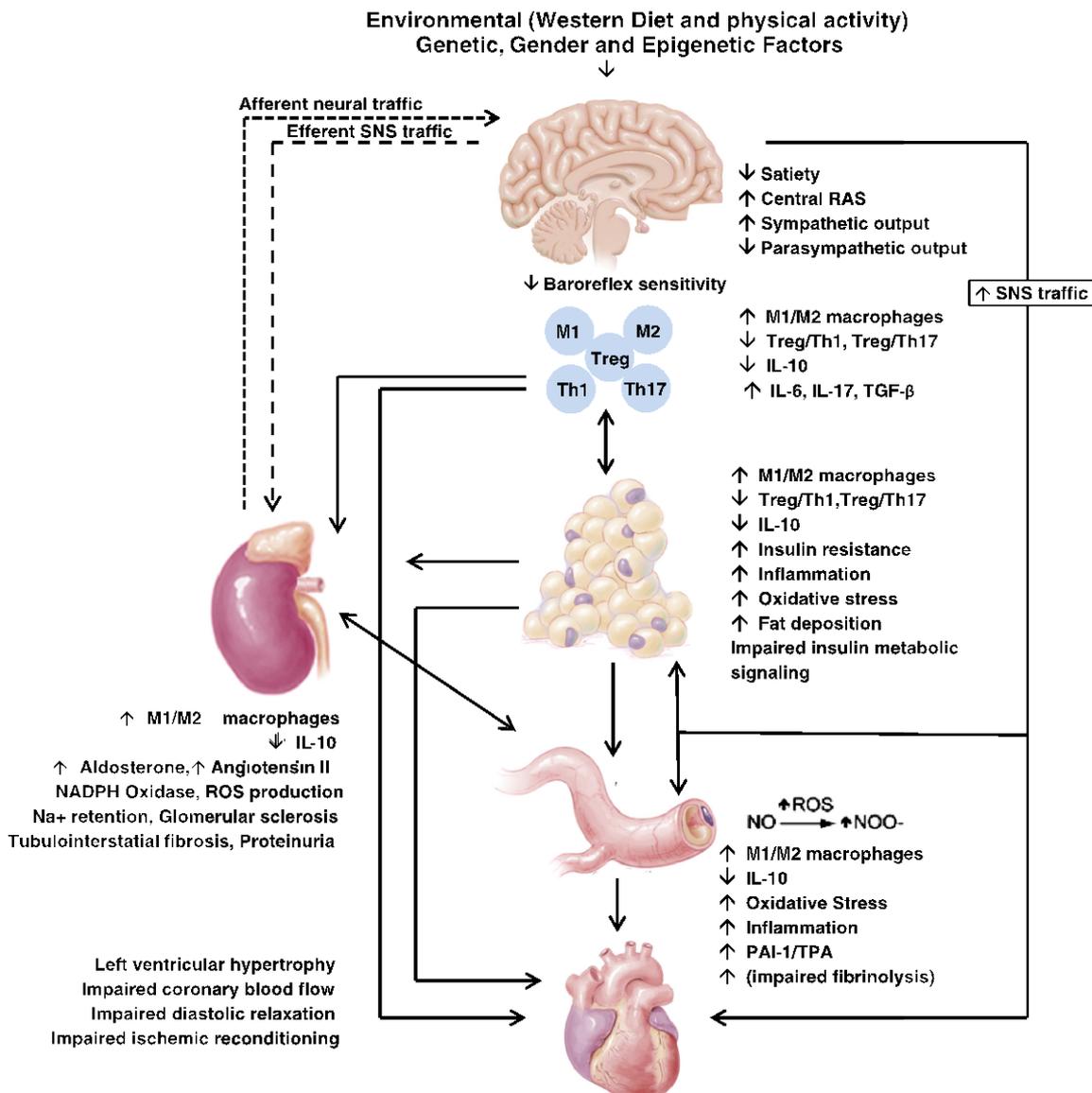


Figura 30: Modelo de la desregulación de la respuesta inmune e inflamatoria que provoca el desarrollo de un estado de insulina resistencia a nivel cardiovascular. Factores ambientales (como el estilo de vida sedentario, dieta hipercalórico), el sexo, factores genéticos y epigenéticos contribuyen a la resistencia insulínica/hiperinsulinemia, hiperuricemia, activación inapropiada de SNA y SRAA, incremento de la actividad de DPP-4 (exopeptidasa de GLP-1 y GIP) y disfunciones en la respuesta inmune y una inflamación crónica de bajo grado. Estas desregulación de las respuestas inmunes e inflamatorias conllevan la aparición de un estado de resistencia insulínica a nivel sistémico y en particular a nivel cardiovascular. (Aroor y Cols. 2013).

II. PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS

A. ANTECEDENTES E HIPOTESIS.

1. Los actuales criterios clínicos de SM permiten diagnosticar bajo un síndrome común a gran número de sujetos que presentan distintos sustratos fisiopatológicos, diferentes fenotipos y muy diverso riesgo de desarrollar complicaciones cardiovasculares.
2. Adicionalmente, las estrategias que actualmente se emplean en la práctica clínica habitual para estimar el riesgo cardiovascular son inexactas, de manera que gran parte de los eventos cardiovasculares se concentran en pacientes que son clasificados como de riesgo bajo o intermedio (Marrugat J et al, *RevEspCardiol* 2007; 60 (5): 464-7) (Knot U et al, *JAMA* 2003; 290: 898-904). Es decir, con las herramientas clínicas actuales la clasificación del riesgo cardiovascular de los pacientes es imprecisa y en demasiadas ocasiones llegamos tarde en la implantación de medidas de prevención primaria.
3. Los dos puntos citados anteriormente ponen de manifiesto la imperiosa necesidad de disponer de elementos que permitan una reclasificación más precisa del verdadero riesgo cardiovascular asociado a los pacientes diagnosticados de SM.
4. Paralelamente, existen muchos puntos por esclarecer en la etiopatogenia y la fisiopatología del SM, de manera que aunque millones de personas son diagnosticadas en el mundo de SM, algunos autores dudan de la existencia de este síndrome como entidad propia.
5. La reclasificación de los pacientes que reúnan criterios de SM, a través de los niveles de expresión de proteínas en suero podría permitir identificar nuevos parámetros moleculares cuya correlación con el daño cardio-vascular (clínico/subclínico) en los mismos pacientes podría servir para descubrir su posible utilidad como biomarcadores de interés terapéutico en esta enfermedad.

B. OBJETIVOS DE ESTUDIO.

B-1. OBJETIVO PRIMARIO

Identificar perfiles de citocinas y adiponectinas en suero, cuya relación con el nivel de afectación metabólica (subclínico/clínico) sugiera su valor como marcador precoz de lesión orgánica secundaria ya sea clínica (complicaciones cardiovasculares, afectación renal, vasculopatía...) o subclínica (demostrado por pruebas de detección precoz de enfermedad arterosclerótica) y así guiar la necesidad de intensificar las medidas terapéuticas en aquellos pacientes con marcadores de riesgo elevado.

B-2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Obtener una clasificación de los perfiles proteicos (citocinas inflamatorias y adiponectinas) de los pacientes con síndrome metabólico (SM) y determinar si existe relación con sus características clínicas (número y tipo de componentes del SM, documentación bioquímica de resistencia insulínica, desarrollo de daño orgánico subclínico y/o de eventos cardiovasculares), persiguiendo una reclasificación o redefinición más etiopatogénica y fisiopatológica del SM.
2. Reconocer elementos fisiopatológicos diferenciales para el desarrollo posterior de modelos pre-clínicos en busca de dianas terapéuticas de aplicabilidad clínica.
3. Estos perfiles nos podrían ayudar a redefinir o matizar los actuales criterios diagnósticos de SM, así como a subclasificar y estratificar a los pacientes que en la actualidad se diagnostican bajo un síndrome común (SM) y pueden presentar sustanciales diferencias etiopatogénicas, fisiopatológicas y pronósticas, requiriendo un abordaje terapéutico individualizado.
4. Así, la identificación precoz de marcadores proteicos que condicionen riesgo elevado podría anticipar las intervenciones terapéuticas precisas en pacientes que con los actuales criterios de estratificación del riesgo cardiovascular presentan riesgo intermedio o incluso bajo, sin necesidad de tener que esperar a la aparición y documentación de daño orgánico subclínico o clínico

III. MATERIALES Y METODOS

Se trata de un estudio epidemiológico, observacional, multicéntrico de una cohorte prospectiva de casos y controles en condiciones de práctica clínica habitual. Se estima que se incluirán en el estudio 80 pacientes con SM y un número de controles que corresponderá aproximadamente en torno al 20% de la muestra de pacientes con SM. El tiempo de estudio fue un total de 3 años. Un año en el periodo de inclusión de casos y controles y 24 meses de seguimiento tras la finalización del período de inclusión.

1. SUJETOS DE ESTUDIO:

Se incluyeron en el estudio todos los pacientes con síndrome metabólico (que reunían los criterios de inclusión expresados en el siguiente apartado) que acudieron a las consultas de Medicina Interna/Unidad de Riesgo Cardiovascular/Unidad de la Obesidad/Cardiología/Endocrinología de los centros participantes, en el periodo de tiempo comprendido entre enero 2012 y diciembre de 2012. Igualmente en el estudio se incluyeron un número de pacientes controles que no reunirán criterios de SM y tenían unas características similares en cuanto a sexo, edad, etnia y comorbilidades. Los sujetos con SM fueron reclutados de forma consecutiva durante 12 meses

Dentro de los pacientes con SM se incluirán los siguientes subgrupos de pacientes: SM sin lesión orgánica subclínica (LOS) y SM con LOS. (ver anexo 1)

2. DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO:

2-1. Criterios de selección de casos (pacientes con SM) y del grupo control (controles):

A. Casos (pacientes con SM)

- Criterios de inclusión: Pacientes mayores de 18 años y menores de 61 años que presenten criterios clínicos de síndrome metabólico según definición del panel ATP III (ver anexo 1) (Circulation 2002; 106: 3143)
- Criterios de exclusión: Pacientes menores de 18 años y mayores de 60 años; Pacientes con hábitos tóxicos significativos (tabaquismo > 5 cig/día; etilismo > 50g/d en hombres y >

30 g/día en mujeres; uso de drogas recreacionales); Pacientes con DM tipo1, hipertiroidismo, hipotiroidismo, hipercolesterolemia familiar o HTA secundaria; Pacientes con neoplasia activa o proceso inflamatorio agudo actual, pacientes con incapacidad para entender la hoja de información del estudio (anexo 2); Pacientes que no accedan a firmar el consentimiento informado (anexo 3)

Los casos (pacientes que reúnan criterios de SM) se sub-clasificarán de la siguiente manera según sus características clínicas:

- Pacientes con criterios de SM*, sin lesión orgánica subclínica (LOS) (demostrada al menos mediante determinación de grosor íntima media carotídeo, índice tobillo brazo o grosor parietal ventricular izquierdo) ni evento cardiovascular clínico (ECV)
- Pacientes con criterios de SM*, con lesión orgánica subclínica (LOS) (demostrada al menos mediante determinación de grosor íntima media carotídeo, índice tobillo brazo o grosor parietal ventricular izquierdo y/o evento cardiovascular clínico (ECV))

B. Controles

Pacientes que no reúnan ningún criterio de SM y accedan a participar en el estudio, firmando la hoja de consentimiento informado.

- Criterios de exclusión: los mismos que para los Casos. Los controles (pacientes que no reúnan criterios de SM) se sub-clasificarán de la siguiente manera según sus características clínicas:
 - Controles sin ningún criterio de SM, sin lesión orgánica subclínica (LOS) ni evento cardiovascular clínico (ECV). Deben tener datos de IMC, Perímetro abdominal e índice cintura/cadera en límites inferiores a los establecidos para los criterios de SM, así como índice HOMA y GBA sin datos de R.I. Igualmente deben no tener HTA ni patrón lipídico con criterios de SM.
 - Pacientes con LOS o ECV, pero sin criterios de SM (este sería un “2º grupo control” que nos permita apreciar si las posibles diferencias presentes en los pacientes con SM y ECV se deben a la presencia exclusiva de ECV o están además en relación con el padecimiento del SM en estadio evolutivo de daño orgánico clínico/subclínico)

3. PRINCIPALES VARIABLES :

3-1. Parámetros clínicos:

Presión arterial, perímetro abdominal (en centímetros), índice de masa corporal (IMC) e índice cintura/ cadera (ICC) (> 0.85 en mujeres y > 0.90 en hombres), datos clínicos que expresen presencia de daño orgánico subclínico o enfermedad cardiovascular o renal establecida. Presencia de otros FRCV y comorbilidades (SAHS, EPOC, IC...).

3-1-1. Examen Clínico Antropométrico

Los datos sobre edad y antecedentes patológicos fueron obtenidos al interrogar a cada individuo, así como de la historia médica, en el caso de los pacientes enfermos.

El procedimiento empleado para todo el protocolo de mediciones se fundamentó en las directrices de la International Society for the Advancement of Kinanthropometry (ISAK), colocando al paciente de pie, descalzo, en ropa interior o ligera se tomaron el peso (kg) y la estatura (cm) utilizando una báscula con precisión 0,1 kg y un estadiómetro con precisión de 1 mm; asimismo, la circunferencia de la cintura usando una cintra métrica con precisión de 1mm. Todas las mediciones antropométricas fueron realizadas en dos oportunidades, mostrando la masa corporal, la estatura y las circunferencias un Error Técnico de Medición (ETM) intraobservador inferior al 1%. Los indicadores antropométricos determinados fueron: índice de masa corporal (IMC), Perímetro abdominal e índice cintura/cadera (C/C). El IMC o índice de Quetelet se determinó midiendo el peso en kilogramos y la talla en metros, para dividir luego el peso entre la talla al cuadrado. Las medidas de circunferencias fueron obtenidas con una cinta métrica no extensible calibrada en centímetros. La circunferencia media de la de cintura se tomo en el punto medio entre el reborde costal y la cresta ilíaca de cada lado y la de cadera a nivel de la zona más prominente de los glúteos. El índice C/C se determinó al dividir la circunferencia de cintura entre la circunferencia de cadera, en centímetros.

3-1-2. Medida de la Tensión Arterial

La medida de la Tensión Arterial se realizo de tres formas:

A. .La presión arterial se determinó tras un período de reposo de 10 min de duración, en decúbito supino y con dos mediciones separadas 5 min entre sí. Se consideró que existía

hipertensión arterial (HTA) cuando la presión arterial sistólica (PAS) era igual o inferior a 140 mmHg o la presión arterial diastólica (PAD) era superior o igual a 90 mmHg o si tomaban fármacos hipotensores.

B. Se facilitó un AMPA a cada paciente durante 2 períodos de 15 días (de las 6 a las 8 semanas y de las 14 a las 16 semanas tras la inclusión), se le instruyó sobre su uso según un protocolo estandarizado (con 3 mediciones por la mañana antes de la medicación y 3 por la noche antes de cenar) y se le instó a recoger los valores impresos de PA, que debía mostrar al médico al devolver la AMPA.

3-2. Niveles plasmáticos de grupos de adipocitocinas y citoquinas inflamatorias:

BNP (ng/L), Adiponectina ($\mu\text{g/ml}$), Adipsina ($\mu\text{g/ml}$), IL-1 β (pg/ml), MCP-1 (pg/ml), TNF-alpha, VEGF (pg/ml), IL-6 (pg/ml), ICAM-1 (ng/ml), VCAM-1 (ng/ml), IL-18 (pg/ml), Péptido-C (pg/ml), Grelina (pg/ml), Resistina (ng/ml), Visfatina (ng/ml), Leptina (ng/ml), PAI-1 (ng/ml), GLP-1 (pg/ml), GIP (pg/ml) e Insulina. A tal efecto, se obtendrá sangre periférica de todos los pacientes y mediante ensayos Bio-PlexPro™ (Bio-Rad, Hercules, Cal) que permiten la detección simultánea de múltiples analitos en un mismo pocillo en placas de 96. Esta técnica está basada en microesferas magnéticas marcadas con distintos fluorocromos (Tecnología Xmap™). Brevemente este método consiste en la combinación de dos técnicas: primero un ELISA tipo sándwich, de manera que cada proteína se une a dos anticuerpos (uno de captura adherido a la microesfera y otro de detección que se marca con biotina), y posteriormente mediante citometría de flujo, se separa y cuantifica las proteínas unidas a las microesferas con fluorocromos específicos, de modo que al incidir diferentes láseres sobre cada microesfera se realiza la detección y cuantificación específica de cada citoquina. Cada grupo de esferas muestra tonalidades idénticas para que una vez cubiertas con el anticuerpo monoclonal de captura puedan separarse al momento de la lectura. Para ello utilizaremos un equipo Luminex 100 system (Luminex corporation, Invitrogen), el lavado de las placas se realizarán con el Bio-Plex pro WashStation (Bio-Rad, Hercules, Cal). La calibración de las microesferas se realizará mediante kits suministrados por Bio-Rad. Los datos fluorescencia se analizarán con el Bio-plexManager™ Software (Bio-Rad, Hercules, Cal).

3-3. Parámetros que pueden expresar aparición o progresión de daño o lesión

orgánica subclínica:

Estimación de filtrado glomerular, mediante fórmula MDRD-4, Cociente albúmina creatinina en orina (CAC > 30 mg/g), niveles de Ca, PTH, Vitamina D, Fosfato. Estudios para detección precoz de enfermedad arteriosclerótica subclínica, según metodología descrita por Angiología y Cirugía Vascul: Grosor íntima media carotideo (> 0.8 mm), se realiza en modo B para la determinación del GIMc. La medición se realizó en la pared posterior de ambas carótidas comunes, a 1 cm de la bifurcación carotídea con una sonda vascular de 7 mHz (Vivid 7, General Electric). Mediante un *software* informático de detección automática de bordes integrado en el aparato (EchoPAC, General Electric), se obtuvieron los valores. Siguiendo las recomendaciones, se consideró lesión de órgano diana los valores del GIMc > 0,9 mm y/o la presencia de placa. Ausencia de pulsos en extremidades superiores, Presencia de masa pulsátil abdominal, Determinación de índice tobillo-brazo (< 0.9), el ITB es el resultado de dividir la presión arterial sistólica (PAS) del tobillo (se escogerá el valor más alto entre la arteria peroneal y la tibial posterior) entre el valor de la PAS más alto de cualquiera de las arterias braquiales. Solo se precisa un esfigmomanómetro y un Doppler portátil con sonda de 8 MHz, y reproducible, con mínima variabilidad intra e interobservador. Un ITB menor de 0,9 presenta una sensibilidad y una especificidad muy altas para identificar una obstrucción superior al 50% en el territorio vascular de los miembros inferiores en relación con la arteriografía. Un ITB menor de 0,9 es diagnóstico de EAP, a pesar de que más del 80% de estos sujetos no tenga manifestaciones clínicas. Pero además, la presencia de un ITB disminuido se asocia con una mayor incidencia de complicaciones coronarias y cerebrovasculares y un mayor riesgo de mortalidad a expensas del incremento de la mortalidad cardiovascular, tanto en sujetos en prevención primaria como secundaria e incluso tras ajustar por los factores de riesgo clásicos. Por lo tanto, un ITB < 0,9 es, además de diagnóstico de EAP, sinónimo de alto riesgo cardiovascular.

Alteraciones electrocardiográficas como datos de sobrecarga, bloqueos, arritmias o datos de isquemia. Parámetros ecocardiográficos: Datos que indique fracción de eyección disminuida, dilatación de cavidades, aumento de presiones pulmonares, alteraciones valvulares, imágenes de acinesias estimación de masa ventricular izquierdo mediante ecografía cardiaca transtorácica o hipocontractibilidades. Electrocardiograma de 12

derivaciones, Estimación de grado de infiltración grasa hepática mediante ecografía hepática

3-4. Parámetros bioquímicos séricos de estimación de RCV (basal) y su control (en las visitas de seguimiento).

Incluyendo además parámetros terapéuticos y su cumplimiento. La extracción de sangre se realizó, tras un ayuno nocturno de 12 h, en el centro de salud, se depositó en tubos anticoagulados con EDTA y secos. El plasma se separó inmediatamente por centrifugación refrigerada a 2.500-3.000 rpm durante 10 min. Todas las determinaciones bioquímicas fueron realizadas en un único laboratorio y en un intervalo máximo de 36 h tras la extracción de sangre tras conservación a -20 °C. Los métodos utilizados para la determinación de parámetros lipídicos fueron los siguientes: colesterol total (CT), por un método enzimático CHOD-PAP (Boehringer-Mann-heim, Alemania); triglicéridos totales (TGL), mediante un método enzimático GPO-PAP (Boehringer-Mannheim, Alemania); colesterol de HDL (cHDL) por precipitación de VLDL y LDL mediante ácido fosfotúngstico-Mg⁺⁺ (Boehringer-Mannheim, Alemania) y determinación de la concentración de colesterol en el sobrenadante mediante el mismo método utilizado para el CT, si bien modificando la proporción muestra/reactivo (el 5% en lugar del 1% utilizado para CT) para conseguir una buena precisión fotométrica. Todos estos métodos estaban adaptados a un autoanalizador (Hitachi 704, Boehringer-Mannheim, Alemania). El cLDL fue estimado mediante la fórmula de Friedewald. La imprecisión interserie (Precinorm L, Boehringer-Mannheim) obtenida durante el período de análisis para estos tres parámetros ofreció coeficientes de variación inferiores al 3%. Simultáneamente el control de calidad externo para colesterol y TGL (Murex) ofreció sesgos medios del 2,4 y del 5,2%, respectivamente. El sesgo medio para el c-HDL, en un programa en que participaban 17 laboratorios españoles, fue inferior al 1% (respecto al valor consensuado). La glucosa por método enzimático y la insulina por RIA19.

Glucemia en sangre: La medición de los niveles de glucosa en sangre, nos ayuda a valorar su homeostasis en el organismo. El grado de control glucémico se determinó en función del valor de la HbA1c del paciente (última determinación en los últimos 6 meses). Los eritrocitos tienen una vida media aproximada de 120 días, y por tanto su hemoglobina glicosilada constituye un parámetro adecuado para el control de los pacientes diabéticos durante los últimos 2-3 meses. Nos proporciona un mejor seguimiento del paciente

diabético tipo 2, con el fin de reducir el riesgo del desarrollo de las complicaciones crónicas asociadas a la diabetes, tratando de mantener valores de HbA1c $\leq 6,5\%$. Se consideró que el paciente presentaba un control glucémico insatisfactorio si la HbA1c era $> 7\%$, según el criterio de consenso ADA-EASD (European Association for the Study of Diabetes) 2006 y ADA 2008. El diagnóstico se debe realizar mediante la determinación de glucemia basal (en ayunas de 12 h) en plasma venoso o mediante la glucemia a las 2 h de la sobrecarga oral de glucosa (SOG) con 75 g. Los criterios diagnósticos son los propuestos por la Asociación Americana de Diabetes (ADA) en 1997 y que han sido aceptados por el comité asesor de la OMS y el Consenso Europeo.

:- Glucemia basal en plasma venoso ≥ 126 mg/dl (7 mmol/l). Debe realizarse una segunda determinación en un día diferente para confirmar el diagnóstico.

- Síntomas típicos de diabetes y glucemia al azar ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l). No es necesaria una segunda determinación

- Glucemia a las 2 h de la SOG con 75 g de glucosa ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l).

Para este estudio se procedió a seguir el último consenso publicado por la IDF, NHBLI, AHA, World Heart Federation y la Asociación internacional para el estudio de la obesidad que publicaron una declaración conjunta en 2009 que proporciono una definición común de Síndrome Metabólico determinando que una glucosa en ayunas > 100 mg/dl, sería un componente de este síndrome.

La SOG se debería realizar en caso de glucemias basales entre 110-125 mg/dl, aunque actualmente no existe acuerdo respecto a su indicación. Mientras que la ADA la desaconseja para la práctica clínica, el Consenso Europeo y la OMS mantienen su vigencia. El GEDAPS propone valorar su necesidad en casos seleccionados. En caso de practicarse deben respetarse escrupulosamente las condiciones para su realización y repetirse en otra ocasión para confirmar el diagnóstico de diabetes (OMS, 1985; ADA, 1997). A pesar de que diferentes autores propugnan el valor de la HbA1c en el diagnóstico, ni la ADA ni la OMS la han aceptado, ya que se trata de una prueba poco estandarizada, más cara y no disponible en muchos países.

Prueba de Sobrecarga Oral de Glucosa (S.O.G): S.O.G de 75 gramos: se les realizará a aquellos pacientes que se les considere pertinente atendiendo a los resultados de sus

distintas glucemias (usado para el diagnóstico de la diabetes gestacional), se les administrarán 75 gramos de glucosa anhidra diluidos en un volumen total de 250-300 mL. Transcurridos 120 minutos se procederá a realizar una segunda extracción.

Índice HOMA: Para la definición de insulinoresistencia basada en la concentración plasmática de insulina y el índice HOMA (homeostasis model assessment, fórmula matemática que mide el grado de insulinoresistencia). Para el diagnóstico preciso de la resistencia a la insulina son necesarias técnicas sofisticadas que determinan el uso de glucosa en estados inducidos experimentalmente de hiperinsulinemia. Para hacer más fácil su determinación se han diseñado sobre la base de estudios epidemiológicos modelos más sencillos que relacionan la glucemia y la insulinemia en ayunas, tal como es el caso de HOMA

$$HOMA = \frac{Insulina(McIU/mL) \cdot Glucemia(mg/dL)}{405}$$

Aun no es claro un punto de corte exacto para la definición de una resistencia insulínica, porque ésta, es variable en relación a la cultura, raza, y estilo de vida, sin embargo, esta prueba es de gran utilidad ya que muestra a grandes rasgos la sensibilidad a la insulina en un determinado individuo.

Peptido C: El péptido C es una cadena de aminoácidos que conecta las cadenas A y B de la proinsulina (precursora de la insulina), que es escindido en la transformación de proinsulina a insulina, quedando libre. Este proceso tiene lugar en las células beta de los islotes de Langerhans. Es metabólicamente inactivo, pero es un importante indicador del funcionamiento de las células beta del páncreas (capacidad para secretar insulina). Es mejor indicador que la concentración periférica de insulina, ya que las determinaciones de péptido C no miden insulina exógena, siendo útil para diferenciar la insulina producida por el cuerpo, de la insulina inyectada en el organismo.

4. TIEMPOS Y MODOS DE RECOGIDA DE DATOS:

La recogida de datos se llevará en el periodo comprendido entre 2012 y 2014. A efectos del presente estudio se prevén un total de 5 visitas, una basal (mes 0) y 4 de seguimiento (meses 6, 12, 18 y 24 desde la inclusión del paciente en el estudio). Los investigadores serán libres de concertar visitas adicionales de seguimiento o control si las consideran oportunas para el adecuado manejo clínico de cada sujeto incluido en el estudio. La información será recogida en el Cuaderno de Recogida de Datos (CRD) diseñado a tal efecto. Toda será cumplimentada por el médico investigador a partir de los datos obtenidos en la historia clínica, las visitas del estudio y los resultados de los exámenes complementarios realizados. Una vez obtenido el consentimiento informado (Anexos 3 y 3b) del individuo, o su representante legal o tutor, y después de verificar que cumple con los criterios de inclusión (ya descritos), se realizará un seguimiento cada 6 meses para obtener las variables clínicas y exámenes complementarios (datos clínicos - semestralmente-, datos analíticos -semestralmente-, medición de parámetros y marcadores de daño orgánico subclínico - semestrales o anuales- y muestras para análisis genético -anuales-) recogidos en el cuaderno de recogida de Datos (CRD).

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS:

La base de datos incluirá rangos y reglas de coherencia interna, para garantizar un control de calidad de los datos. Todos los análisis se realizaran a partir de una única muestra de pacientes valorables que incluirá todos aquellos pacientes que cumplan los criterios de selección, Para la estadística descriptiva se empleo el paquete estadístico de Wizard para Mac, se utilizaron las medidas centrales y de dispersión habituales. La correlación entre dos variables se estudió con la prueba de Pearson. Los análisis se llevaron a cabo utilizando los paquetes CCA (González y Déjean 2012) y CCP (Menzel 2012) del software estadístico R (R Core Team 2015). Para el contraste de hipótesis tomamos un valor de significación $\alpha = 0,05$.

Se comprobó la condición de normalidad multivariante (distribución normal del conjunto de todas las variables) utilizando un test específico para ello (test E como aparece en el paquete Energy de R; Rizzo y Szekely 2014).. El resultado indicaba que el banco de datos no cumplía esta condición ($E=3.3052$, $p<0.001$), por lo que para calcular los p-valores de las funciones que se construyeron se usaron métodos no paramétricos de permutación; se utilizaron 10000 permutaciones en los cálculos.

El análisis de correlación canónica se basó en estimar funciones canónicas. Una función canónica se compone de dos variables canónicas y la relación entre ellas.

Para la regresión multivariante se llevaron a cabo análisis utilizando los paquetes mvoutlier (Filzmoser y Gschwandtner 2015), vegan (Oksanen *et al.* 2015) y MASS (Venables y Ripley 2012) del software estadístico R (R Core Team 2015). Se tomó el valor de significación $\alpha = 0,05$ para todos los contrastes. Se examinaron las relaciones univariantes utilizando regresiones robustas (ya que les afectan menos los valores extremos que hay en algunos pacientes)

6. LIMITACIONES DEL ESTUDIO:

El tamaño muestral y el tiempo de seguimiento probablemente no permitan encontrar significación estadística para la aparición y desarrollo de eventos cardiovasculares. Por ello se emplearán parámetros y variables intermedias o subrogadas que estimen el desarrollo de lesión orgánica subclínica, así como el cálculo de RCV estimado según distintas tablas universalmente aceptadas y calibradas para nuestra población de estudio. Además el seguimiento a largo plazo de esta cohorte de pacientes podrá aportar datos adicionales.

7. PLAN DE TRABAJO

ETAPAS DE DESARROLLO:

- 1- Etapa de selección e inclusión de casos y controles: 1 año
- 2- Etapa de seguimiento de los sujetos incluidos en el estudio: 2 años
- 3- Etapa de análisis de los datos: 6 meses

8. ÁMBITO DEL ESTUDIO.

Centros e Investigadores participantes. Participarán en el estudio los siguientes centros:

Hospital Universitario Madrid Montepríncipe (HUMM), Hospital Universitario Madrid Norte-San Chinarro (HUMN) y Hospital Universitario Madrid Torreldones (HUMT).

ANEXO 1. Criterios de Síndrome Metabólico (SM) y niveles normales de otros parámetros clínicos

MEDIDA y PUNTO DE CORTE

Perímetro abdominal: >102 cm (hombres); >88 cm (mujeres)

Elevación de triglicéridos : >150 mg/dl

Niveles bajos de HDL colesterol : <40 mg/dl (hombres); <50 mg/dl (mujeres)

Elevación de presión arterial (o toma de fármacos hipotensores en paciente con antecedente de HTA): Presión arterial sistólica > 130 mmHG; Presión arterial diastólica > 85 mmHg

Glucemia en ayunas > 100 mg/dl elevada (o toma de fármacos hipoglucemiantes

Un paciente presenta SM si presenta al menos 3 de los 5 criterios expresados arriba

(* el uso de drogas empleadas para reducir los triglicéridos o elevar el HDL-colesterol, como son los fibratos, el ácido nicotínico o elevadas dosis de ácidos omega-3, se considera también como criterio diagnóstico en estos 2 factores)

Urea: El nivel normal en sangre es inferior 40 mg/dl.

Creatinina: El nivel normal en sangre varía según el sexo: Mujeres inferior a 0.96 mg/dl y varones inferior a 1.3 m/dl.

Acido Úrico: Valor normal en varones concentraciones séricas de hasta 7.0 mg/dl.

Ecuación MDRD-4 IDMS:

$eFG = 175 \times (creatinina/88,4)^{-1,154} \times (edad)^{-0,203} \times (0,742 \text{ si mujer}) \times (1,210 \text{ si raza negra})$

Calcio: Los valores normales oscilan de 8.5-10.8 mg/dl.

Fósforo: Los niveles óptimos están 3.5-5 mg/dl

Hormona paratiroidea (PTH): Los *valores normales* son de 10 a 55 picogramos por mililitro (pg/mL)

Vitamina D: Los niveles en sangre óptimos están por encima de 30 ng/ml, pero pueden ser suficientes por encima de 20 ng/ml; se habla de deficiencia cuando los niveles están por debajo de 10 ng/ml.

ANEXO 2. HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Invitación a participar:

Apreciado/a Sr/a.

Usted tiene síndrome metabólico (conjunto de factores de riesgo cardiovascular que condicionan mayor riesgo de padecer diabetes y enfermedades cardiovasculares), por lo que le invitamos a participar en el estudio de investigación clínica que lleva por título:

Patrones genómicos de expresión en el síndrome metabólico: utilidad clínica y pronóstica

La Unidad de Riesgo Cardio-Vascular del Servicio de Medicina Interna del Grupo Hospital Madrid (GHM), está llevando a cabo un estudio de evaluación de los factores genéticos implicados en el pronóstico del síndrome metabólico con la finalidad de encontrar posibles objetivos futuros de tratamiento en el síndrome que usted padece.

Se le invita a participar en este estudio de investigación al padecer dicho síndrome

La participación en el estudio implica realizar unas visitas médicas periódicas, así como determinaciones analíticas periódicas y realización de procedimientos complementarios no invasivos (ecografías a nivel de carótidas, corazón y extremidades inferiores).

Uno de los principales objetivos del estudio será analizar el material genético (conocido como ADN) y las proteínas en relación con el síndrome metabólico. El ADN se encuentra dividido en segmentos llamados genes, que son responsables de transmitir los rasgos de padre a hijos, controlando la fabricación de proteínas y en último término el funcionamiento del organismo y su metabolismo. Debido a la estrecha relación entre los genes y las proteínas implicadas en el síndrome metabólico, el análisis de los genes y sus

proteínas puede predecir el estadio clínico del síndrome metabólico aportando importante información pronóstica y predecir así que pacientes requieren una acción terapéutica más enérgica para evitar el desarrollo y/o progresión de eventos cardiovasculares.

Las muestras de sangre que usted aporte se almacenarán hasta que se agoten o por un máximo de 15 años tras el fin del estudio. Si queda algo de muestra tras el periodo de almacenamientos se destruirá.

Su consentimiento para la recogida de muestras genéticas, su análisis y su posterior almacenamiento es totalmente voluntario. Usted puede rechazar participar en esta prueba y esto no supone pérdida alguna en la asistencia sanitaria que usted va a recibir.

Si usted acepta participar, usted podrá tener acceso a los resultados de los análisis de su muestra.

El análisis de sus muestras puede contribuir a la creación de nuevas pruebas de laboratorio, nuevas medicinas o nuevos dispositivos con valor comercial para el promotor. Usted no recibirá ninguna compensación o derecho comercial o beneficio económico que pueda resultar de los productos, procedimientos o dispositivos que se desarrollen por el estudio de su muestra ni cualquier información o dato que derive de esa investigación.

La información personal sobre sus muestras genéticas se manejará de forma confidencial y siguiendo los requerimientos de las leyes vigentes de protección de datos.

En resumen, en el estudio se realiza el manejo estándar correspondiente a su patología, pero realizando unas mediciones adicionales y un seguimiento más detallado.

Preguntas / Información

Si desea hacer alguna pregunta o aclarar algún tema relacionado con el estudio, o si precisa ayuda por cualquier problema de salud relacionado con este estudio, por favor, no dude en ponerse en contacto con:

Dr. _____

Centro/Hospital: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Fax: _____

ANEXO 3. Modelo de Consentimiento Informado para el paciente

Estudio observacional, multicéntrico y prospectivo para evaluar las implicaciones genéticas en el síndrome metabólico

Patrones genómicos de expresión en el síndrome metabólico: utilidad clínica y pronóstica

Yo,

.....

(nombre completo del paciente)

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.

- He podido hacer preguntas sobre el estudio.

- He recibido suficiente información sobre el estudio.

- Acepto voluntariamente la recogida de muestras para su almacenamiento y proporcionar información médica necesaria.

- Autorizo a que el médico o promotor use información sobre las muestras según se ha indicado en la hoja de información.

- He hablado con:

.....

(nombre del Investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria y que los datos recogidos se incorporarán a una base de datos informatizada sin mi nombre para evaluar la investigación (en dicha base de datos los pacientes serán identificados por un número de código que será

desconocido para el investigador, con el fin de que los datos no puedan asociarse a una persona identificada o identificable)

Comprendo que puedo retirarme del estudio (y por tanto rechazar y revocar este consentimiento):

1º Cuando quiera.

2º Sin tener que dar explicaciones.

3º Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha ___/___/___

día mes año

Firma del participante

Fecha ___/___/___

día mes año

Firma del investigador

Según la Ley 15/1999 de 13 de Diciembre, el consentimiento para el tratamiento de sus datos personales y para su cesión es revocable. Vd. puede ejercer el derecho de acceso, rectificación y cancelación dirigiéndose al investigador, el cual lo pondrá en conocimiento del promotor.

El síndrome metabólico (SM) (Reaven y Cols. 1988), hace referencia al padecimiento de una serie de factores de riesgo para desarrollar arteriosclerosis, enfermedad cardiovascular (ECV) y diabetes. Se trata de una entidad con alta prevalencia (hasta 17-25% en la población española; y hasta el 40% en EEUU) a la que se asocia elevada morbi-mortalidad cardiovascular, por lo que constituye en la actualidad un problema clínico y de salud pública de primer orden (Ford y Cols. 2002; Cordero y Cols. 2005). Los principales factores que conforman el SM son la obesidad, la dislipemia aterogénica, la glucemia basal alterada y la elevación de la presión arterial. Pero existe controversia sobre si el SM es un síndrome real o una manera de agrupar diferentes fenotipos sin relación entre ellos. Tampoco se ha evidenciado claramente que la presencia de SM en un paciente le confiera riesgo cardiovascular (RCV) adicional a la suma de sus componentes individuales.

Existen bastantes definiciones operativas de SM, basadas en criterios diagnósticos, pero los criterios diagnósticos del National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (ATPIII) de 2001 (NCEP 2001), revisados en 2005 y confirmados por un documento de consenso de 2009 (Alberti y Cols. 2009)(ver anexo 1), son los más utilizados en la práctica clínica debido a su sencillez y practicidad y al hecho de que no precisan la demostración de resistencia insulínica (ya que esto resulta complejo en la práctica clínica).

La característica más significativa del SM es la obesidad abdominal, mientras que desde el punto de vista etiopatogénico y fisiopatológico, la Resistencia insulínica (RI) es el hecho principal.

Aunque la patogénesis del SM no está clara, se piensa que el sustrato patogénico fundamental del SM es la resistencia a la insulina (RI), que se ha encontrada asociada con DM tipo 2, obesidad, dislipemia aterogénica, hipertensión arterial (HTA) y enfermedad cardiovascular. La RI es aún más prevalente que el SM y sería, por tanto, la clave patogénica del SM y el nexo común entre las demás alteraciones que participan en la definición del SM (Laclaustra y Cols. 2007). La RI origina hiperinsulinismo y éste somete a los tejidos a una inadecuada acción lipogénica, favoreciendo la aparición de obesidad abdominal, dislipemiaaterogénica, anomalías del metabolismo glucémico e HTA. La RI se relaciona con arteriosclerosis mediante la puesta en marcha de procesos inflamatorios, alteraciones en la agregación plaquetaria y disfunción endotelial. Así, el

SM se ha reconocido como un estado pro-inflamatorio y protombótico, con elevación de los niveles de proteína C reactiva (PCR), interleukina-6 (IL-6) y del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1). Esta elevación de marcadores inflamatorios y adipocinas se asocia con riesgo aumentado de DM-2 y ECV. Pero estos hechos solo explican parcialmente la asociación entre SM y ECV. Hay algo más. La suma de FRCV y la disfunción inflamatoria y endotelial no lo explican todo. Si bien "in vivo" el patrón oro es la pinza euglucémica-hiperinsulinémica, en la práctica clínica actual la RI no está claramente definida y se acepta que hay RI si se documenta elevación de la insulina plasmática en ayunas y/o del índice HOMA (HOMeostasisModelAssesment)(> 3.8), el modelo más extendido de los que relacionan glucemia e hiperinsulinemia en ayunas (Matthews y Cols. 1985; Rabasa y Cols. 2003). Sin embargo, con estas sencillas herramientas clínicas no siempre se consigue documentar RI en pacientes que reúnen criterios de SM.

Parece que la obesidad abdominal es el fenómeno inicial, que por distintas vías origina alteraciones en la sensibilidad a la insulina. Es evidente que tanto la obesidad como el sedentarismo están detrás de la alta prevalencia del SM en la sociedad actual. Es clara la relación entre obesidad y RI y que ambas situaciones aumentan el riesgo de mortalidad cardiovascular (Katzmarzyk y Cols. 2006)). Por tanto, el conjunto de alteraciones metabólicas y cardiovasculares que conforman el SM están relacionadas con la obesidad abdominal y la resistencia a la insulina (RI). La secuencia patogénica más aceptada sería la siguiente: la obesidad origina crecimiento del tejido adiposo y el crecimiento de este tejido adiposo, que es fuente de numerosas citocinas (TNF, IL-1, IL-6, proteína quimiotáctica de monocitos) y adipocinas (leptina, adiponectina, resistina), conlleva una intensa captación de monocitos circulantes que en la grasa se transforman en macrófagos (ricos en citocinas pro-inflamatorias) y desarrollan un estado inflamatorio crónico y resistencia insulínica. Así el tejido adiposo (muy incrementado en la obesidad) juega un papel nuclear en la activación crónica de la inflamación y el desarrollo de alteraciones en la sensibilidad a la insulina. Estas 2 condiciones presentes en el SM constituyen la base patogénica para el desarrollo de arteriosclerosis.

En base a esto planteamos nuestra hipótesis ya que los criterios actuales de SM son imprecisos y designan bajo el mismo síndrome a un grupo muy heterogéneo de sujetos con grandes diferencias fisiopatológicas y pronósticas. El núcleo fisiopatológico fundamental del

SM es la obesidad abdominal y el estado pro-inflamatorio creado por los efectos de la disfunción adipocitaria sobre el sistema monocito/macrófago del paciente.

Partiendo de estos supuesto, el presente proyecto pretende reclasificar pacientes con SM, a través de la determinación de citocinas inflamatorias y adipocinas procedentes de monocitos y tejido adiposo con el fin de identificar nuevos parámetros cuya correlación con el daño cardio-vascular (clínico/subclínico) de los mismos pacientes indique su posible utilidad como biomarcadores de interés terapéutico en esta enfermedad.

Para estudiar la asociación de estos parámetros con la fisiopatología del SM, se confeccionará una base de datos con inclusión de datos clínicos de evaluación de daño orgánico mediante procedimientos no invasivos y variables relacionadas con la dieta, actividad física y terapéuticas del paciente.

Los actuales criterios clínicos de SM permiten diagnosticar bajo un síndrome común a gran número de sujetos que presentan distintos sustratos fisiopatológicos, diferentes fenotipos y muy diverso riesgo de desarrollar complicaciones cardiovasculares.

Adicionalmente, las estrategias que actualmente se emplean en la práctica clínica habitual para estimar el riesgo cardiovascular son inexactas, de manera que gran parte de los eventos cardiovasculares se concentran en pacientes que son clasificados como de riesgo bajo o intermedio (Marrugat J y Cols. 2007) (Knot U y Cols. 2003). Es decir, con las herramientas clínicas actuales la clasificación del riesgo cardiovascular de los pacientes es imprecisa y en demasiadas ocasiones llegamos tarde en la implantación de medidas de prevención primaria.

Los dos puntos citados anteriormente ponen de manifiesto la imperiosa necesidad de disponer de elementos que permitan una reclasificación más precisa del verdadero riesgo cardiovascular asociado a los pacientes diagnosticados de SM.

Paralelamente, existen muchos puntos por esclarecer en la etiopatogenia y la fisiopatología del SM, de manera que aunque millones de personas son diagnosticadas en el mundo de SM, algunos autores dudan de la existencia de este síndrome como entidad propia.

La reclasificación de los pacientes que reúnan criterios de SM, a través de los niveles de expresión de proteínas en suero podría permitir identificar nuevos parámetros moleculares cuya correlación con el daño cardio-vascular (clínico/subclínico) en los mismos pacientes podría servir para descubrir su posible utilidad como biomarcadores de interés terapéutico en esta enfermedad.

Los objetivos primarios son Identificar perfiles de citocinas y adiponectinas en suero, cuya relación con el nivel de afectación metabólica (subclínico/clínico) sugiera su valor como marcador precoz de lesión orgánica subclínica ya sea clínica (complicaciones cardiovasculares, afectación renal, vasculopatía...) o subclínica (demostrado por pruebas de detección precoz de enfermedad arterosclerótica) y así guiar la necesidad de intensificar las medidas terapéuticas en aquellos pacientes con marcadores de riesgo elevado.

Los objetivos secundarios fueron:

1. Obtener una clasificación de los perfiles proteicos (citocinas inflamatorias y adiponectinas) de los pacientes con síndrome metabólico (SM) y determinar si existe relación con sus características clínicas (número y tipo de componentes del SM, documentación bioquímica de resistencia insulínica, desarrollo de daño orgánico subclínico y/o de eventos cardiovasculares), persiguiendo una reclasificación o redefinición más etiopatogénica y fisiopatológica del SM.
2. Reconocer elementos fisiopatológicos diferenciales para el desarrollo posterior de modelos pre-clínicos en busca de dianas terapéuticas de aplicabilidad clínica.
3. Estos perfiles nos podrían ayudar a redefinir o matizar los actuales criterios diagnósticos de SM, así como a subclasificar y estratificar a los pacientes que en la actualidad se diagnostican bajo un síndrome común (SM) y pueden presentar sustanciales diferencias etiopatogénicas, fisiopatológicas y pronósticas, requiriendo un abordaje terapéutico individualizado.
- 4.

5. Así, la identificación precoz de marcadores proteicos que condicionen riesgo elevado podría anticipar las intervenciones terapéuticas precisas en pacientes que con los actuales criterios de estratificación del riesgo cardiovascular presentan riesgo intermedio o incluso bajo, sin necesidad de tener que esperar a la aparición y documentación de daño orgánico subclínico o clínico

Con estos datos llegamos a las siguientes conclusiones:

En conjunto, el análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio permite concluir que:

1.- Los niveles plasmáticos de los principales biomarcadores de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica permitieron distinguir por vez primera subpoblaciones de pacientes con Síndrome Metabólico de distinto perfil fisiopatológico y de lesión orgánica, que sugieren mecanismos patogénicos diferentes para la misma enfermedad, con independencia de su estadio de evolución.

2.- De un lado, la aplicación de un análisis estadístico multivariante permitió clasificar los pacientes con respecto a la existencia o no de una disociación entre sus parámetros clínicos y analíticos moleculares:

- El Subtipo I, con ausencia de correlación entre sus parámetros clínicos y sus niveles plasmáticos de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica.
- El Subtipo II, con buena correlación entre parámetros clínicos y biomarcadores plasmáticos de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica.
- Más aún, el Subtipo I englobó dos clases de pacientes según la naturaleza de la disociación entre parámetros clínicos y moleculares:
 - o El Subtipo IA, con biomarcadores plasmáticos de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica elevados pero apenas cambios clínicos.
 - o El Subtipo IB, con apenas cambios en sus biomarcadores plasmáticos de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica pero notables alteraciones clínicas en cuanto a sus niveles de resistencia a la insulina y de lesión orgánica,

3.- Del otro lado, la representación de una correlación canónica del análisis multivariante, atendiendo a la relación entre conjuntos de variables –el conjunto integrado

por presencia o no de lesión orgánica y de signos clínicos de síndrome metabólico y el conjunto integrado por biomarcadores plasmáticos de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica—, permitió de nuevo reclasificar los pacientes en un primer subtipo con alteraciones similares en los biomarcadores plasmáticos de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica, y otros dos subtipos donde biomarcadores plasmáticos de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica se muestran discordantes entre ellos. Al estudiar las correlaciones clínico-analíticas directas e inversas en estos dos últimos subtipos se evidenció que en el grupo con biomarcadores plasmáticos de inflamación elevados y de disfunción endocrino-metabólica bajos hubo casi la mitad de correlaciones estadísticamente significativas entre biomarcadores moleculares y signos clínicos de Síndrome Metabólico que en el subgrupo con biomarcadores plasmáticos de inflamación bajos y de disfunción endocrino-metabólica altos, sugiriendo que en este segundo grupo podrían haber concurrido patologías inflamatorias agudas no detectadas en este estudio.

4.- Esta subclasificación de pacientes con Síndrome Metabólico sugiere la existencia de mecanismos patogénicos diferentes en el proceso por el que las alteraciones moleculares inflamatorias y endocrinas intervienen en la disfunción del metabolismo glucídico, que conduce a la resistencia a la insulina, y a la progresiva aparición de lesiones orgánicas del sistema cardiovascular.

La resistencia a la insulina es la principal característica de la DMII y se desarrolla en múltiples órganos, incluyendo músculo esquelético, hígado, tejido adiposo y corazón (Saltiel y Cols. 2001). El comienzo de la hiperglicemia y la DM es a menudo precedida durante muchos años de resistencia insulínica. La obesidad interviene de manera muy importante en este fenómeno proporcionando una importante conexión entre DMII y la acumulación de grasa (Bhatia y Cols. 2007). De hecho, una gran proporción de pacientes diabéticos son obesos (Hossain y Cols. 2007). La obesidad es un complejo desorden que lleva a la alteración del metabolismo lipídico, desregulación de las ejes hormonales, estrés oxidativo, inflamación sistémica y una distribución ectópica de la grasa. El tejido adiposo es una fuente activa de mediadores inflamatorios y ácidos grasos libres (Shulman y Cols 2000). De acuerdo a esto, lo obesos con DMII desarrollan un incremento de los niveles plasmáticos de marcadores inflamatorios (Cavelti-Weder y Cols. 2012). Los ácidos grasos libres se unen al TLR activando NF- κ B a través de la degradación del complejo inhibitorio I κ B α por la kinasa IKK β (Kim

y Cols. 2006). Como resultado, el NF-kB dispara la inflamación tisular a la vez que la regulación positiva de los genes inflamatorios IL-6 y TNF-alpha.

La activación de TLR por los ácidos grasos libres lleva a la fosforilación de IRS-1 por JNK y PKC, por tanto alterando su habilidad para activar posteriormente la kinasa PI3 y Akt. Estos eventos moleculares producen la regulación negativa de del transportador de glucosa GLUT-4 y por tanto resistencia insulínica (Kim y Cols. 2012). La resistencia insulínica es crucial en la disfunción vascular en sujetos con DMII (Kim y Cols. 2006). Además, la regulación negativa de la vía kinasa PI3/Akt lleva a la inhibición de NOS endotelial y la disminución en la producción de NO (Du y Cols. 2006). Junto con la síntesis reducida de NO, la oxidación intracelular de los ácidos grasos libres almacenados generan ROS produciendo inflamación vascular, síntesis de AGE, actividad de la PGI2 sintasa reducida y activación de PKC (Giacco y Cols. 2010).

Los incrementos en los niveles de ROS asociados con la resistencia insulínica eliminan la producción de NO y produce peroxinitrito con una mayor disminución de la biodisponibilidad de NO. Los bajos niveles celulares de NO facilitan las vías proinflamatorias que llevan al incremento en la producción de citocinas. De hecho TNF-alpha e IL-1 incrementan la actividad de NF-kB y la expresión de moléculas de adhesión. El TNF-alpha también estimula la expresión de PCR la cual regula negativamente la NOSe e incrementa la producción de moléculas de adhesión y endotelina-1 (Cardillo y Cols. 2004). Un estudio reciente demostró que la perdida de la señalización insulínica en el endotelio vascular produce una disfunción endotelial, expresión de moléculas de adhesión y lesiones ateroscleróticas en ratones (Rask-Madsen y Cols 2010).

Aunque el desarrollo de la resistencia insulínica ha sido atribuida a la inflamación derivada del adipocito, recientes evidencias están poniendo en duda esta teoría. De hecho, la inflamación y la activación macrofágica parece que ocurre en los tejidos no adiposos del obeso (Gray y Cols. 2011).

Este concepto se sostiene por el hecho de que la supresión de la inflamación en los vasos previene la insulín-resistencia en otros órganos y prolonga la esperanza de vida (Hasegawa y Cols. 2012). Consistentemente, los ratones transgénicos con sobreexpresión de IkBalpha específica del endotelio fue protectora para el desarrollo de resistencia insulínica. En estos ratones, la infiltración macrofágica del tejido adiposo así como lo marcadores de

estrés oxidativo plasmáticos inducidos por la obesidad estaban reducidos mientras que en sangre, mitocondrias musculares y el músculo esquelético estaban incrementados, confirmando el papel principal del factor de transcripción NF- κ B en el estrés oxidativo, disfunción vascular e inflamación (Hasegawa y Cols. 2012). Otros estudios confirmaron estos hallazgos, mostrando que la alteración genética de IRS-2 en las células endoteliales reducía la entrada de glucosa en el musculo esquelético. (Kubota y Cols. 2011). Estos hallazgos están fuertemente ligados al papel central del endotelio en la resistencia insulínica inducida por la obesidad, sugiriendo que el bloqueo de la inflamación vascular y ele estrés oxidativo pueden ser una prometedora esperanza de cara a prevenir los desordenes metabólicos. A destacar los fármacos para mejorar la sensibilidad de la insulina en pacientes con DMII y SM esta asociada con una restauración de la vasodilatación mediada por flujo (Vitale y Cols. 2005).

Los efectos aterogénicos de la resistencia insulínica son también parejos a cambios en el perfil lipídico como TG altos, baja HDL, incremento de lipoproteínas remanentes, ApoB y LDL elevadas (Zhang y Cols. 2012). Una vez que los ácidos grasos libres alcanzan el hígado, se ensamblan las VLDL y se vuelven solubles por un incremento en la síntesis de ApoB. VLDL es procesado por la proteína transferidora de esterios de colesterol permitiendo la transferencia de TG a las LDL, el cual se vuelve mas denso y mas pequeño y por tanto mas aterogénico. La DLP aterogénica es de hecho un predictor de riesgo CV y su modulación farmacológica reduce los eventos vasculares en sujetos con DMII y SM (Lee y Cols. 2011).

5.- Por último, el presente estudio confirma estudios anteriores sobre la importancia de la inflamación en la patogenia del Síndrome Metabólico y demuestra que los biomarcadores plasmáticos de inflamación más relacionados con los signos clínicos de Síndrome Metabólico fueron las molecular solubles de adhesión vascular ICAM-1 y VCAM-1, sugiriendo que la disfunción endotelial producida durante el desarrollo del Síndrome Metabólico pudo ser determinante en la evolución de la enfermedad, y que la inhibición de tales moléculas podría representar una nueva vía de abordaje terapéutico para los pacientes con síndrome metabólico.

El endotelio es, gracias a sus propiedades, un órgano determinante para el buen funcionamiento cardiovascular. Cuando su fisiología se altera por daño estructural o funcional, se inicia un largo proceso que puede desembocar en patologías tan graves como el infarto de miocardio, el ictus y la patología vascular periférica. De hecho, como ya se ha

indicado, la principal causa de muerte, en las sociedades occidentales avanzadas, son las enfermedades cardiovasculares (ECV).

Los vasos sanguíneos están formados por una capa adventicia y una capa media formada por células musculares lisas (CMLV) de potencia variable. Además, en la parte más interna se localiza la capa íntima formada por el endotelio de estructura variable según el tipo de vaso (arterial o venoso, grandes vasos, medianos o microvasculatura) y el territorio (cerrado, continuo, discontinuo o fenestrado).

Las células endoteliales forman una monocapa continua que tapiza la cara luminal interna de las arterias, las venas, los capilares y los vasos linfáticos, con una estructura muy organizada que asegura el acoplamiento funcional entre ellas. En el endotelio podemos encontrar dos zonas especializadas, la apical o luminal y la basal que interacciona con las proteínas de la matriz extracelular (MEC) de la lámina basal a la que está firmemente adherida, anclando las células al subendotelio. La MEC está compuesta fundamentalmente por glucoproteínas (laminina, fibronectina, vitronectina, trombospondina, entactina, heparan sulfato y factor Von Willebrand, entre otros).

El endotelio no expresa sus funciones de manera homogénea ya que existe una heterogeneidad que depende del tipo de vaso y del territorio en el que se encuentre. Así, por ejemplo, la permeabilidad es especialmente importante en los endotelios capilares y su intensidad está restringida por el tipo de endotelio. Así desde el endotelio cerrado de los capilares cerebrales, hasta el endotelio fenestrado del hígado encontramos una gradación ascendente en la facilidad de paso de sustancias. Pero el endotelio vascular no es simplemente una barrera que separa la sangre de la pared vascular, sino también un importante órgano que está implicado en numerosas actividades por su capacidad de modificar su funcionalidad y regular la síntesis de diversos factores, en respuesta a cambios humorales, químicos o mecánicos en la sangre o en las células sanguíneas.

Así participa en diversas funciones de las que destacan, por su importancia para mantener la fisiología cardiovascular, las siguientes:

- El mantenimiento del tono vascular y, por tanto, de la presión arterial, mediante la liberación de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras.

- La capacidad de expresar moléculas de adhesión que a su vez controlan el reclutamiento de leucocitos al subendotelio, donde serán activados participando en el proceso inflamatorio.
- La creación de una superficie no trombogénica por la presencia de cargas eléctricas negativas y por la síntesis de inhibidores de la agregación plaquetaria.
- La síntesis y liberación de sustancias reguladoras del crecimiento del fenotipo de la migración de las células musculares lisas.

En estas funciones tienen un papel especialmente importante los factores sintetizados por el endotelio vascular

Así en el tono vascular participan vasodilatadores como la PGI₂, el NO o el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (FHDE) especialmente importante en vasos pequeños, y también sustancias vasoconstrictoras como el tromboxano A₂ (TXA₂), la endotelina (ET1) o radicales libres de oxígeno (RLO). No hay que olvidar tampoco que una buena parte de la actividad de la enzima de conversión (ECA) y la producción de angiotensina II está asociada a las membranas plasmáticas de las células endoteliales.

En la actividad antiagregante y antitrombogénica participan el NO y la PGI₂, así como moléculas como el heparán sulfato, la proteína C y el factor activador del plasminógeno (t-PA). Con actividad opuesta se pueden citar al TXA₂, factor Von Willebrand (FvW), factor tisular (FT) y el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI). La proliferación de las células de la pared, especialmente las CMLV, está especialmente regulada de manera inhibidora por el NO y la PGI₂ y activadora por la endotelina 1 y la angiotensina II

Por tanto, la fisiología vascular es dependiente de la integridad del endotelio porque mantiene un equilibrio entre la actividad biológica de sus factores y la de aquellos otros del mismo o distinto origen que la alteran. Entre las situaciones que más afectan a la estructura y actividad del endotelio, la aterosclerosis es, sin duda, la más importante.

De forma general, se puede definir la disfunción endotelial como la serie de alteraciones que afectan la síntesis, liberación, difusión o degradación de los factores que se generan en el endotelio. Los mecanismos responsables de dichas alteraciones pueden originarse tanto por cambios en los receptores como de las señales intracelulares de transducción, o incluso por modificaciones en la respuesta de las células diana de dichos

factores. La disfunción endotelial no es homogénea en sus características y su distribución, varía en función de la patología asociada, así como con el lecho vascular que se considere.

En la mayor parte de las lesiones ateroscleróticas, la función vascular del endotelio está atenuada, o incluso ha desaparecido. Las diversas formas de disfunción endotelial incluyen:

- a) Menos liberación de NO, prostaciclina o EDHF.
- b) Aumento de liberación de endoperóxidos.
- c) Aumento de producción de radicales libres de oxígeno.
- d) Aumento de liberación de endotelina.
- e) Disminución de la sensibilidad del músculo liso vascular a los vasodilatadores de origen endotelial.

Los descubrimientos según los cuales el tejido adiposo secreta adipoquinas han revelado que el exceso de grasa, en particular a nivel visceral, es capaz de crear un "ambiente inflamatorio", con incremento en especial en las concentraciones de TNF- α , IL-6, PAI-1, leptina, fibrinógeno y componentes del SRAA.

Los datos expuestos acercan dos tipos de tejidos aparentemente diferentes: el tejido adiposo y el sistema inmune. Además de la homología estructural entre las adipoquinas y algunos componentes del sistema inmune, estudios realizados en adipocitos, en células T y en macrófagos han revelado vías proinflamatorias similares en procesos tales como la activación del complemento y la producción de citoquinas. De hecho las células precursoras de adipocitos pueden exhibir en condiciones experimentales una actividad fagocítica similar a la de los macrófagos (Charrière y Cols. 2003).

Otras investigaciones han demostrado una infiltración del tejido adiposo, particularmente visceral, por parte de macrófagos en obesidad (56). Los mediadores inflamatorios no sólo son producidos por los adipocitos, sino por células del sistema reticuloendotelial y por preadipocitos. La expresión de genes que codifican la síntesis de mediadores inflamatorios se encuentra aumentada en el tejido estromal adipocitario, en el

que se encuentran los macrófagos y los preadipocitos. Éstos últimos también sintetizan citoquinas al ser estimulados por TNF-a (Weisberg y Cols. 2003).

Podría postularse en este contexto cómo los cambios en el tamaño del tejido adiposo inducidos por la ganancia de peso generarían secreción adipocitaria de citoquinas (TNF-a), la cual, a su vez induciría síntesis y liberación de factores quimioatrayentes de células del sistema retículo endotelial por parte del tejido estromal adipocitario. El resultado final sería infiltración del tejido graso por parte de macrófagos, y perpetuación de la inflamación, disfunción endotelial y aterogénesis (Wellen y Cols 2003).

El tejido adiposo realizaría entonces un papel tanto de causa como de objetivo de un estado inflamatorio crónico de bajo grado y provee una relación directa con otros componentes del síndrome metabólico. La vía final común es la aterosclerosis, causante de enfermedad vascular generalizada, conduciendo a hipertensión arterial, enfermedad coronaria y enfermedad vascular periférica.

Desde un punto de vista evolutivo, también son evidentes las relaciones entre el sistema inmune y el tejido adiposo, como representante del estado nutricional de los individuos. En insectos como la *Drosophila* se ha demostrado que las estructuras encargadas de regular el sistema inmune y algunas funciones metabólicas tienen un origen común. En esta especie, en el equivalente del hígado para los mamíferos, se encuentran incluidos el tejido adiposo, el sistema hematopoyético y otros componentes del sistema inmunológico (Tong y Cols. 2000).

La confrontación permanente entre las diferentes especies y las enfermedades infecciosas podría generar, luego de exposición repetida, genotipos "inflamatorios", capaces de inducir la producción de citoquinas proinflamatorias. Se produciría así en algunos individuos un fenotipo "proinflamatorio" crónico de bajo grado que predispondría a la insulinoresistencia (Wellen y Cols. 2003, Wilson y Cols. 1997). Un estudio en tal sentido, realizado por Holgman *et al* apoya esta teoría, al mostrar que la exposición prenatal a citoquinas puede generar un estado de obesidad e insulinoresistencia después del nacimiento (Dahlgren y Cols. 2001).

Evolutivamente uno de los sistemas que más se ha conservado en humanos es el de conservación de energía. De acuerdo con la teoría del Gen Oportunista (Thirfty Gene), en

etapas iniciales de nuestra evolución se desarrollaron sistemas altamente efectivos para acumular la escasa energía disponible, dando lugar a la aparición del tejido adiposo. La falta de desarrollo industrial implicaba largas jornadas de ejercicio físico exhaustivo para conseguir cantidades escasas de alimentos. Esta energía debía acumularse de manera eficiente, para ser utilizada posteriormente entre otros, con el fin de defender el organismo frente a innumerables infecciones. El precio, sin embargo, ha sido la susceptibilidad genética, en algunos individuos y grupos poblacionales, a desarrollar un estado inflamatorio crónico en un tejido adiposo cada vez más abundante y disfuncionante. En efecto, la sociedad industrializada ha cambiado las condiciones: ha aumentado dramáticamente el consumo de alimentos ricos en calorías, y se ha reducido de igual manera la actividad física. En Estados Unidos se estima que más del 60% de las personas no participan en programas de actividad física regular, y un 25% sería absolutamente sedentaria

Los sistemas de acumulación energética y de respuesta inmune, por su lado, no parecen haberse adaptado correctamente en todos los casos. Los mecanismos que inicialmente nos permitían sobrevivir podrían haberse vuelto contraproducentes y causantes de inflamación crónica, resistencia a la insulina, disfunción endotelial y aterogénesis. En forma alternativa, algunos investigadores postulan que la obesidad podría deberse al desarrollo de resistencia, a nivel del sistema nervioso central, frente a los mecanismos, regulados por insulina y leptina, que controlan la adipogénesis (Schwartz y Cols. 2004).

Nuestro estudio aporta luz a este campo al sugerir la existencia de subpoblaciones dentro del contexto del Síndrome Metabólico que sugieren una respuesta individual dependiente muy posiblemente de la expresividad génica individual de la maquinaria celular en particular de aquella parcela referente a los sistemas de acumulación energética y de respuesta inmune y que nos obligarían a adaptar nuestra terapéutica diaria al perfil de riesgo individual de padecimiento de síndrome metabólico.

En conjunto, el análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio ~~nos~~ permite concluir que:

1.- ~~El~~ Los niveles plasmáticos de los principales ~~grado de relación del~~ Síndrome Metabólico ~~con los biomarcadores de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica permitieron~~ es compleja, ~~observándose varias~~ distinguir por vez primera subpoblaciones de pacientes con Síndrome Metabólico de distinto perfil fisiopatológico y de lesión orgánica, que sugieren mecanismos patogénicos diferentes para la misma enfermedad, con independencia de su estadio de evolución.

~~en sus relaciones~~

2.- ~~Existen~~ De un lado, la aplicación de un análisis estadístico multivariante permitió clasificar ~~dos los subgrupos~~ pacientes con respecto a la existencia o no de una ~~d~~Disociación entre sus parámetros clínicos y analíticos moleculares:

~~- El Subtipo grupo I1, mostrando disociación clínica analítica y por tanto con una nula~~ ausencia de ~~correlación significativa~~ entre sus parámetros clínicos y sus ~~los~~ niveles de plasmáticos de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica.

~~y los parámetros clínicos, - El Subtipo grupo II2, con~~ una buena correlación ~~clínico-analítica y por tanto una relación significativa~~ entre parámetros clínicos y biomarcadores plasmáticos de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica.

~~- M~~ y los parámetros clínicos. Los ~~que mas se relacionan con los componentes del~~ Síndrome Metabólico son las sCAM (ICAM 1 y VCAM 1), posiblemente procedentes de la ~~disfunción endotelial producida en el desarrollo progresivo del~~ Síndrome Metabólico.

~~- 3.~~ El ~~ás aún, el~~ Subtipo grupo I con disociación clínica analítica (Grupo 1) ~~esta a su vez conformado por~~ englobó dos subpoblaciones ~~clases de pacientes según la~~ relación de ~~est~~ naturaleza de la disociación entre parámetros clínicos y moleculares:

o El Subtipo IA, ~~con~~ ~~bien presenten~~ biomarcadores plasmáticos de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica ~~altos~~ elevados pero ~~con~~ apenas cambios clínicos ~~a nula o mínima~~

o El Subtipo IB, ~~con~~ apenas cambios en sus biomarcadores plasmáticos de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica ~~bajos~~ con pero notables

Con formato: Izquierda: 2,6 cm, Derecha: 2,25 cm, Arriba: 2,5 cm, Abajo: 2,5 cm, Encuadernación: 0,25 cm, Ancho: 21 cm, Alto: 29,7 cm, Distancia del pie de página desde el borde: 1,3 cm

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Con formato: Sangría: Primera línea: 0 cm

Con formato: Sangría: Izquierda: 0,5 cm, Sangría francesa: 0,63 cm

Con formato: Sangría: Izquierda: 1,77 cm, Sangría francesa: 0,63 cm

Con formato: Posición: Horizontal: Exterior, Con relación a: Margen

Conclusiones

~~alteraciones –parámetros– clínicos en cuanto a sus niveles de resistencia a la insulina y de lesión orgánica importantes),~~

3.- ~~Del otro lado, la representación de una correlación canónica del análisis multivariante, atendiendo a la relación entre conjuntos de variables –el conjunto integrado por presencia o no de lesión orgánica y de signos clínicos de síndrome metabólico y el conjunto integrado por biomarcadores plasmáticos de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica–, permitió de nuevo reclasificar los pacientes en un primer subtipo con alteraciones similares en los biomarcadores plasmáticos de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica, y otros dos subtipos donde biomarcadores plasmáticos de inflamación y de disfunción endocrino-metabólica se muestran discordantes entre ellos. Al estudiar las correlaciones clínico-analíticas directas e inversas en estos dos últimos subtipos se evidenció que en el grupo con biomarcadores plasmáticos de inflamación elevados y de disfunción endocrino-metabólica bajos hubo casi la mitad de correlaciones estadísticamente significativas entre biomarcadores moleculares y signos clínicos de Síndrome Metabólico que en el subgrupo con biomarcadores plasmáticos de inflamación bajos y de disfunción endocrino-metabólica altos, sugiriendo que en este segundo grupo podrían haber concurrido patologías inflamatorias agudas no detectadas en este estudio.~~

4.- ~~Esta subclasificación de pacientes con Síndrome Metabólico sugiere la existencia de el estudio de correlaciones clínicas analíticas de ambos mecanismos patogénicos diferentes en el proceso por el que las alteraciones moleculares inflamatorias y endocrinas intervienen en la disfunción una diferente participación del metabolismo glucídico, que conduce a la resistencia a la insulina, y a la progresiva aparición de lesiones orgánicas del sistema cardiovascular. en ambas subpoblaciones, ya que los pacientes con una gran presencia de componentes de Síndrome Metabólico muestran una gran relación de las variables proteicas con los parámetros clínicos relativos al metabolismo glucídico a diferencia de los pacientes con elevados con clínica mínima.~~

54.- ~~Por último, el presente estudio confirma estudios anteriores sobre la importancia de la inflamación en la patogenia del Síndrome Metabólico y demuestra que los biomarcadores plasmáticos de inflamación más relacionados con los signos clínicos de Síndrome~~

Con formato: Izquierda

Con formato: Sangría: Izquierda: 1,77 cm, Primera línea: 0 cm

Con formato: Sangría: Izquierda: 0 cm, Primera línea: 0 cm

Con formato: Fuente: Sin Negrita

Con formato: Posición: Horizontal: Exterior, Con relación a: Margen

Metabólico fueron las molecular solubles de adhesión vascular ICAM-1 y VCAM-1, sugiriendo que la disfunción endotelial producida durante el desarrollo del Síndrome Metabólico pudo ser determinante en la evolución de la enfermedad, y que la inhibición de tales moléculas podría representar una nueva vía de abordaje terapéutico para los pacientes con síndrome metabólico.

~~Independientemente de la anterior clasificación en el total de la población nos podemos encontrar 3 subpoblaciones. El primero que muestran alteraciones similares en los , y los otros dos donde se objetiva que se muestran discordantes entre ellos. Al estudiar las correlaciones clínico analíticas en estos subgrupos nos encontramos que en aquel grupo con elevados bajos muestran una menor correlación significativa de los parámetros clínico con los componentes propios del Síndrome Metabólico que la observada en el subgrupo con bajos altos, sugiriendo que en este segundo grupo concurrirían patologías o alteraciones adyacentes a las valoradas en este estudio como un cuadro infeccioso o inflamatorio mas agudo que crónico, ya que si fuera crónico podría llegar a producir las mismas alteraciones observadas en el Síndrome Metabólico.~~

1. Abate N, Sallam HS, Rizzo M, Nikolic D, Obradovic M, Bjelogrljic P, Isenovic ER. Resistin: an inflammatory cytokine. Role in cardiovascular diseases, diabetes and the metabolic syndrome. *Curr Pharm Des* 2014; 20:4961-4969.
2. Abdilla N, Tormo MC, Fabia MJ, Chaves FJ, Saez G, Redon J. Impact of the components of metabolic syndrome on oxidative stress and enzymatic antioxidant activity in essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2007;21:68-75.
3. Aida K, Nishida Y, Tanaka S, Maruyama T, Shimada A, Awata T, Suzuki M, Shimura H, Takizawa S, Ichijo M, Akiyama D, Furuya F, Kawaguchi A, Kaneshige M, Itakura J, Fujii H, Endo T, Kobayashi T. RIG-I- and MDA5-initiated innate immunity linked with adaptive immunity accelerates beta-cell death in fulminant type 1 diabetes. *Diabetes*. 2011 Mar;60(3):884-9.
4. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JL, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC, Jr. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* 2009; 120:1640-1645.
5. Alessia Buglioni and John C. Burnett Jr. Pathophysiology and the cardiorenal connection in heart failure. Circulating hormones: biomarkers or mediators. *Clinica Chimica Acta* 443 (2015) 3-8.
6. Alp NJ, Channon KM. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydro- biopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:413 - 420.
7. Altinova AE, Yetkin I, Akbay E, Bukan N, Arslan M. Serum IL-18 levels in patients with type 1 diabetes: relations to metabolic control and microvascular complications. *Cytokine*. 2008 May;42(2):217-21.
8. Anand IS, Ferrari R, Kalra GS, Wahi PL, Poole-Wilson PA, Harris PC. Edema of cardiac origin. Studies of body water and sodium, renal function, hemodynamic indexes, and plasma hormones in untreated congestive cardiac failure. *Circulation* 1989;80: 299-305.
9. Anand IS. Changes in brain natriuretic peptide and norepinephrine over time and mortality and morbidity in the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). *Circulation* 2003;107:1278-83.
10. Andreeva-Gateva P, Popova D, Orbetsova V. Antioxidant parameters in metabolic syndrome e a dynamic evaluation during oral glucose tolerance test. *Vutr Boles* 2001;33:48e53.
11. Armoni M, Harel C, Karnieli E. Transcriptional regulation of the GLUT4 gene: from PPAR-gamma and FOXO1 to FFA and inflammation. *Trends Endocrinol Metab* 2007; 18:100-107.
12. Armoni M, Harel C, Karni S, Chen H, Bar-Yoseph F, Ver MR, Quon MJ, Karnieli E. FOXO1 represses peroxisome proliferator-activated receptor-gamma1 and -gamma2 gene promoters in primary adipocytes. A novel paradigm to increase insulin sensitivity. *J Biol Chem* 2006; 281:19881-19891.
13. Aroora AR, McKarnsc S, DeMarcoa VG, Jiaa G, Sowersa JR. *Metabolism Clinical and Experimental* 62 (2013) 1543-1552. Maladaptive immune and inflammatory pathways lead to cardiovascular insulin resistance.
14. Ashwell M, Gunn P, Gibson S. Waist-to-height ratio is a better screening tool than waist circumference and BMI for adult cardiometabolic risk factors: systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 2012; 13:275-286.
15. Asrih M, Jornayvaz FR. Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease: Is insulin resistance the link? *Mol Cell Endocrinol* 2015
16. Barter P. HDL-C: role as a risk modifier. *Atheroscler Suppl* 2011; 12:267-270.
17. Barton, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J. Clin. Invest.* 118, 413-420 (2008).

18. Baldwin, A.S. The NF-kappa B and I kappa B proteins: New discoveries and insights. (1996). *Annual Review of Immunology*.14: 649-683.
19. Basili S, Pacini G, Guagnano MT, Manigrasso MR, Santilli F, Pettinella C, Ciabattini G, Patrono C, Davi G. Insulin resistance as a determinant of platelet activation in obese women. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:2531 - 2538.
20. Basu R, Pajvani UB, Rizza RA, Scherer PE. Selective downregulation of the high molecular weight form of adiponectin in hyperinsulinemia and in type 2 diabetes: differential regulation from nondiabetic subjects. *Diabetes* 2007; 56:2174-2177.
21. Baeuerle, P.A. y Henkel, T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. (1994) *Annu. Rev. Immunol.* 12: 141-79.
22. Becker JR, Chatterjee S, Robinson TY, Bennett JS, Panakova D, Galindo CL, et al. Differential activation of natriuretic peptide receptors modulates cardiomyocyte proliferation during development. *Development* 2014;141:335-45.
23. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA* 2002;287:2570-2581.
24. Belia S, Santilli F, Beccafico S, De Feudis L, Morabito C, Davi G, et al. Oxidative-induced membrane damage in diabetes lymphocytes: effects on intracellular Ca(2f) homeostasis. *Free Radic Res* 2009 Feb;43(2):138-48.
25. Bhatia LS, Curzen NP, Calder PC, Byrne CD. Non-alcoholic fatty liver disease: a new and important cardiovascular risk factor? *Eur Heart J* 2012;33:1190 - 1200.
26. Bhargava P, Lee CH. Role and function of macrophages in the metabolic syndrome. *Biochem J* 2012; 442:253-262.
27. Bhushan S, Kondo K, Polhemus DJ, Otsuka H, Nicholson CK, Tao YX, et al. Nitrite therapy improves left ventricular function during heart failure via restoration of nitric oxide-mediated cytoprotective signaling. *Circ Res* 2014;114:1281-91.
28. Bianchi, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* (2007).81, 1-5
29. Blankenberg S, Tiret L, Bickel C, Peetz D, Cambien F, Meyer J, Rupprecht HJ; AtheroGene Investigators. Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular death in stable and unstable angina. *Circulation*. 2002 Jul 2;106(1):24-30.
30. Blankenberg S, Luc G, Ducimetiere P, Arveiler D, Ferrieres J, Amouyel P, et al: Interleukin-18 and the risk of coronary heart disease in European men: the Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction (PRIME). *Circulation* 2003, 108:2453-2459.
31. Bloch-Damti A, Bashan N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7:1553-1567.
32. Boden G, Jadali F, White J, Liang Y, Mozzoli M, Chen X, Coleman E, Smith C. Effects of fat on insulin-stimulated carbohydrate metabolism in normal men. *J Clin Invest* 1991; 88:960-966.
33. Boden G, Rao AK. Effects of hyperglycemia and hyperinsulinemia on the tissue factor pathway of blood coagulation. *Curr Diab Rep* 2007;7:223 - 227.
34. Boden G. Obesity and free fatty acids. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008; 37:635-646, viii-ix.
35. Boussageon R, Bejan-Angoulvant T, Saadatian-Elahi M, Lafont S, Bergeonneau C, Kassai B, Erpeldinger S, Wright JM, Gueyffier F, Cornu C. Effect of intensive glucose lowering treatment on all cause mortality, cardiovascular death, and micro-vascular events in type 2 diabetes: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2011;343:d4169.
36. Braun S, Bitton-Worms K, LeRoith D. The link between the metabolic syndrome and cancer. *Int J Biol*

- Sci 2011; 7:1003-1015.
37. Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med* 2008;358:2148-59. [48] F in ley JJ
MA, Udelson JE. Arginine vasopressin antagonists for the treatment of heart failure and hyponatremia. *Circulation* 2008;118:410-21.
 38. Braunwald E. Heart failure. *JACC Heart Fail* 2013;1:1-20.
 39. Brochu M, Tchernof A, Dionne IJ, Sites CK, Eltabbakh GH, Sims EA, Poehlman ET. What are the physical characteristics associated with a normal metabolic profile despite a high level of obesity in postmenopausal women? *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:1020-1025.
 40. Brown, K., Gerstberger, S., Carlson, L., Franzoso, G. y Siebenlist, U. Control of I κ B- α proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. (1995). *Science*. 267: 1485-1488.
 41. Brownlee, M., Cerami, A. & Vlassara, H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N. Engl. J. Med.* 318, 1315-1321 (1988).
 42. Bruun JM, Stallknecht B, Helge JW, Richelsen B: Interleukin-18 in plasma and adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and weight loss. *Eur J Endocrinol* 2007, 157:465-471.
 43. Brunetti ND, Munno I, Pellegrino PL, Ruggero V, Correale M, De Gennaro L, Cuculo A, Campanale EG, Di Biase M. Inflammatory cytokines imbalance in the very early phase of acute coronary syndrome: correlations with angiographic findings and in-hospital events. *Inflammation*. 2011 Feb;34(1):58-66.
 44. Bufler P, Azam T, Gamboni-Robertson F, Reznikov LL, Kumar S, Dinarello CA, Kim SH. A complex of the IL-1 homologue IL-1F7b and IL-18-binding protein reduces IL-18 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Oct 15;99(21):13723-8.
 45. Burnett Jr JC, Knox FG. Renal interstitial pressure and sodium excretion during renal vein constriction. *Am J Physiol* 1980;238:F279-82.
 46. Burnett JR JC, Kao PC, Hu DC, Hesser DW, Heublein D, Granger JP, et al. Atrial natriuretic peptide elevation in congestive heart failure in the human. *Science* 1986;231:1145-7.
 47. Burnett Jr JC, Opgenorth TJ, Granger JP. The renal action of atrial natriuretic peptide during control of glomerular filtration. *Kidney Int* 1986;30:16-9.
 48. Buse MG. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;290:E1 - E8.
 49. Cannon, W. Organization for physiological homeostasis. *Physiol. Rev.* 9, 399-431 (1929).
 50. Cao R, Farnebo J, Kurimoto M, et al. Interleukin-18 acts as an angiogenesis and tumor suppressor. *FASEB J* 1999;13:2195-202.
 51. Cardillo C, Campia U, Bryant MB, Panza JA. Increased activity of endogenous endothelin in
with type II diabetes mellitus. *Circulation* 2002;106: ~~11783~~
 52. Carrascal T, Mendoza L, Valcárcel M, Salado C, Egilegor E, Tellería N, Vidal-Vanaclocha F. Interleukin-18 binding protein reduces B16 melanoma hepatic metastasis by neutralizing the adhesiveness and growth factor of sinusoidal endothelial cells. *Cancer Res* 63: 491-497
 53. Ceradini, D. J. & Gurtner, G. C. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue. *Trends Cardiovasc. Med.* 15, 57-63 (2005).
 54. Ceriello A. Hypothesis: The 'metabolic memory', the new challenge of diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2009;86(Suppl 1):S2 - S6.
 55. Chander PN, Gealekman O, Brodsky SV, Elitok S, Tojo A, Crabtree M, et al. Nephropathy in Zucker diabetic fat rat is associated with oxidative and nitrosative stress: prevention by chronic therapy with a peroxynitrite scavenger Ebselen. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:2391-403.
 56. Charrière G, Cousin B, Arnaud E, et al: Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J.*

Biol. Chem, 2003; 278. 9850-9855

57. Chappell J, Leitner JW, Solomon S, Golovchenko I, Goalstone ML, Draznin B. Effect of insulin on cell cycle progression in MCF-7 breast cancer cells. Direct and potentiating influence. *J Biol Chem* 2001; 276:38023-38028.
58. Chen, Z., Hagler, J., Palomares, V.J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D. y Maniatis, T. (1995) Signal-induced site-specific phosphorylation targets I κ B- α to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.*, 9: 1586-1597.
59. Chen, G. et al. Bacterial endotoxin stimulates macrophages to release HMGB1 partly through CD14- and TNF-dependent mechanisms. *J. Leukoc. Biol.* 76, 994-1001 (2004).
60. Cheng Z, White MF. Targeting Forkhead box O1 from the concept to metabolic diseases: lessons from mouse models. *Antioxid Redox Signal* 2011; 14:649-661.
61. Condeelis, J. & Pollard, J. W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 124, 263-236 (2006).
62. Coggins M and Rosenzweig A, "The fire within: cardiac inflammatory signaling in health and disease," *Circulation Research*, vol. 110, no. 1, pp. 116-125, 2012.
63. Coll RC and O'Neill LAJ, "New insights into the regulation of signalling by toll-like receptors and nod-like receptors," *Journal of Innate Immunity*, vol. 2, no. 5, pp. 406-421, 2010.
64. Colston JT, Boylston WH, Feldman MD, Jenkinson CP, de la Rosa SD, Barton A, Trevino RJ, Freeman GL, Chandrasekar B. Interleukin-18 knockout mice display maladaptive cardiac hypertrophy in response to pressure overload. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Mar 9;354(2):552-8.
65. Cordero A et al. Prevalencia de síndrome metabólico. *RevEspCardiol.* 2005;5:11-5.
66. Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, Luscher TF. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation* 1997;96:25 - 28.
67. Cosentino F, Eto M, De Paolis P, van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, Kouroedov A, Delli Gatti C, Joch H, Volpe M, Luscher TF. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation* 2003;107: 1017 - 1023.
68. Cosentino F, Francia P, Camici GG, Pelicci PG, Luscher TF, Volpe M. Final common molecular pathways of aging and cardiovascular disease: role of the p66shc protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:622 - 628.
69. Cselenyak A, Ross K, Shakir S, Piconi L, Kaltreider RC, Ceriello A. Reactive oxygen species mediate a cellular 'memory' of high glucose stress signalling. *Diabetologia* 2007;50:1523-1531.
70. Dahlgren J, Nilsson C, Jennische E, et al: Prenatal cytokine exposure results in obesity and gender-specific programming. *Am J Physiol, Endocrinol Metab*, 2001; 281: E326- E334
71. Davi G, Ciabattoni G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, et al. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f2 α and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 1999 Jan 19;99(2):224-9.
72. Dehwah MA, Xu A, Huang Q. MicroRNAs and type2 diabetes/obesity. *J Genet Genomics* 2012;39:11-18.
73. Deng Y, Scherer PE. Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1212:E1-E19.
74. De Nooijer R, Thusen von der JH, Verkleij CJ, Kuiper J, Jukema JW, Wall van der EE, et al: Overexpression of IL-18 decreases intimal collagen content and promotes a vulnerable plaque phenotype in apolipoprotein-E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004, 24:2313-2319.

75. Despres JP, Lemieux I, Bergeron J, Pibarot P, Mathieu P, Larose E, et al: Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008, 28:1039-1049.
76. Dewald O, Ren G, Duerr GD, Zoerlein M, Klemm C, Gersch C, Tincey S, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG. Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol.* 2004 Feb;164(2):665-77.
77. Dewald O, Frangogiannis NG, Zoerlein M, Duerr GD, Klemm C, Knuefermann P, Taffet G, Michael LH, Crapo JD, Welz A, Entman ML. Development of murine ischemic cardiomyopathy is associated with a transient inflammatory reaction and depends on reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Mar 4;100(5):2700-5.
78. Di Angelantonio E, Sarwar N, Perry P, Kaptoge S, Ray KK, Thompson A, Wood AM, Lewington S, Sattar N, Packard CJ, Collins R, Thompson SG, Danesh J. Major lipids, apolipoproteins, and risk of vascular disease. *JAMA* 2009; 302:1993-2000.
79. Didonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwart, D.M., Zandi, E. y Karin, M. A (1997) citokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B. *Nature*, 388: 853-862.
80. Dinarello CA, Bufler P. Interleukin-37. *Semin Immunol.* 2013 Dec 15;25(6):466-8
81. Ding Y, Li S, Ma RL, Guo H, Zhang J, Zhang M, Liu J, Guo S. Association of homeostasis model assessment of insulin resistance, adiponectin, and low-grade inflammation with the course of the metabolic syndrome. *Clin Biochem* 2015
82. Dong GP, Yu ZS, Liang L, Zou CC, Fu JF, Wang CL. IL-18 gene promoter -137C/G and -607C/A polymorphisms in Chinese Han children with type 1 diabetes mellitus. *Int J Immunogenet.* 2007 Apr;34(2):75-9.
83. Dong B, Qi D, Yang L., et al., "TLR4 regulates cardiac lipid accumulation and diabetic heart disease in the nonobese diabetic mouse model of type 1 diabetes," *American Journal of Physiology—Heart and Circulatory Physiology*, vol. 303, no. 6, pp. H732-H742, 2012.
84. Dostert, C. et al. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320, 674–677 (2008).
85. Drager LF, Queiroz EL, Lopes HF, Genta PR, Krieger EM, Lorenzi-Filho G. Obstructive sleep apnea is highly prevalent and correlates with impaired glycemic control in consecutive patients with the metabolic syndrome. *J Cardiometab Syndr* 2009; 4:89-95.
86. Drayton, D. L., Liao, S., Mounzer, R. H. & Ruddle, N. H. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nature Immunol.* 7, 344–353 (2006).
87. Dries DL, Exner DV, Domanski MJ, Greenberg B, Stevenson LW. The prognostic implications of renal insufficiency in asymptomatic and symptomatic patients with left ventricular systolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:681–9.
88. Du X, Edelstein D, Obici S, Higham N, Zou MH, Brownlee M. Insulin resistance reduces arterial prostacyclin synthase and eNOs activities by increasing endothelial fatty acid oxidation. *J Clin Invest* 2006;116:1071 – 1080.
89. Ehses JA, Meier DT, Wueest S, Rytka J, Boller S, Wielinga PY, Schraenen A, Lemaire K, Debray S, Van Lommel L, Pospisilik JA, Tschopp O, Schultze SM, Malipiero U, Esterbauer H, Ellingsgaard H, Rutti S, Schuit FC, Lutz TA, Boni-Schnetzler M, Konrad D, Donath MY. Toll-like receptor 2-deficient mice are protected from insulin resistance and beta cell dysfunction induced by a high-fat diet. *Diabetologia* 2010; 53:1795-1806.
90. Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, et al. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 1998;391:393–7.
91. El-Osta A, Brasacchio D, Yao D, Poci A, Jones PL, Roeder RG, Cooper ME, Brownlee M. Transient high

- glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *J Exp Med* 2008;205: 2409 – 2417.
92. Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Bickel C, Lackner K, Genth-Zotz S, Post F, et al: Impact of inflammatory markers on cardiovascular mortality in patients with metabolic syndrome. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2008, 15:278-284.
 93. Esposito K, Nappo F, Giugliano F, Di PC, Ciotola M, Barbieri M, et al: Cytokine milieu tends toward inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003, 26:1647.
 94. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice* 105 (2014) 141–150.
 95. Evans J, Collins M, Jennings C, Merwe van der L, Soderstrom I, Olsson T, et al: The association of interleukin-18 genotype and serum levels with metabolic risk factors for cardiovascular disease. *Eur J Endocrinol* 2007, 157:633-640.
 96. Everett BM, Bansal S, Rifai N, Buring JE, Ridker PM: Interleukin-18 and the risk of future cardiovascular disease among initially healthy women. *Atherosclerosis* 2009, 202:282-288.
 97. Executive Summary of The 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). *JAMA*. 2001 May 16;285(19):2486-97.
 98. Fain JN, Tichansky DS, Madan AK: Most of the interleukin 1 receptor antagonist, cathepsin S, macrophage migration inhibitory factor, nerve growth factor, and interleukin 18 release by explants of human adipose tissue is by the non-fat cells, not by the adipocytes. *Metabolism* 2006, 55:1113-1121.
 99. Ferreira IA, Mocking AI, Feijge MA, Gorter G, van Haefen TW, Heemskerk JW, Akkerman JW. Platelet inhibition by insulin is absent in type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:417 – 422.
 100. Ferri C, Desideri G, Baldoncini R, Bellini C, De Angelis C, Mazzocchi C, Santucci A. Early activation of vascular endothelium in nonobese nondiabetic essential hypertensive patients with multiple metabolic abnormalities. *Diabetes*. 1998;47:660–667. doi: 10.2337/diabetes.47.4.660.
 101. Filzmoser, P. y Gschwandtner, M. (2015). mvoutlier: Multivariate outlier detection based on robust methods. R package version 2.0.6. URL= <http://CRAN.R-project.org/package=mvoutlier>
 102. Fink, S. L. & Cookson, B. T. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect. Immun.* 73, 1907–1916 (2005).
 103. Fischer CP, Perstrup LB, Berntsen A, Eskildsen P, Pedersen BK: Elevated plasma interleukin-18 is a marker of insulin-resistance in type 2 diabetic and non-diabetic humans. *Clin Immunol* 2005, 117:152-160.
 104. Ford ES et al. Prevalence of the metabolic syndrome among U.S. adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 2002; 287: 356-64.
 105. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2002 Jan;53(1):31-47.
 106. Frigerio S, Holländer GA, Zumsteg U. Functional IL-18 is produced by primary pancreatic mouse islets and NIT-1 beta cells and participates in the progression towards destructive insulinitis. *Horm Res.* 2002;57(3-4):94-104.
 107. Fuentes-Antrás J, Ioan AM, Tuñón J, Egido J and Lorenzo O. Activation of Toll-Like Receptors and Inflammasome Complexes in the Diabetic Cardiomyopathy-Associated Inflammation. *International Journal of Endocrinology*. 2014;2014:847827
 108. Fujita T, Ogihara N, Kamura Y, Satomura A, Fuke Y, Shimizu C, Wada Y, Matsumoto K. Interleukin-18 contributes more closely to the progression of diabetic nephropathy than other diabetic complications. *Acta Diabetol.* 2012 Apr;49(2):111-7.

109. Funder JW. Minireview: aldosterone and mineralocorticoid receptors: past, present, and future. *Endocrinology* 2010;151:5098-102.
110. Gallagher EJ, Leroith D, Karnieli E. Insulin resistance in obesity as the underlying cause for the metabolic syndrome. *Mt Sinai J Med* 2010; 77:511-523.
111. Gallagher EJ, Leroith D, Karnieli E. The metabolic syndrome--from insulin resistance to obesity and diabetes. *Med Clin North Am* 2011; 95:855-873.
112. Gao CL, Zhao DY, Qiu J, Zhang CM, Ji CB, Chen XH, Liu F, Guo XR. Resistin induces rat insulinoma cell RINm5F apoptosis. *Mol Biol Rep* 2009; 36:1703-1708.
113. Gerald P, King GL. Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res* 2010;106:1319 - 1331.
114. Ghosh, S., May, M.J. y Kopp, E.B. (1998) NF-kappa B and Rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 16: 225-260.
115. Ghosh, S. & Karin, M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* 109, S81-S96 (2002).
116. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 2010; 107:1058 - 1070.
117. Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2000; 106:453-458.
118. González, I. y Déjean, S. (2012): CCA: Canonical correlation analysis. R package version 1.2. URL <http://CRAN.R-project.org/package=CCA>.
119. Gopalakrishnan P, Tak T. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease. *Cardiol Rev* 2011; 19:279-290.
120. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nature Rev. Immunol.* 3, 23-35 (2003).
121. Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Rev. Immunol.* 5, 953-964 (2005).
122. Gori M, Senni M, Gupta DK, Charytan DM, Kraigher-Krainer E, Pieske B, Claggett B, Shah AM, Santos AB, Zile MR, Voors AA, McMurray JJ, Packer M, Bransford T, Lefkowitz M, Solomon SD; PARAMOUNT Investigators. Association between renal function and cardiovascular structure and function in heart failure with preserved ejection fraction. *Eur Heart J.* 2014 Dec 21;35(48):3442-51
123. Gould, S. J. & Lewontin, R. C. The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme. *Proc. R Soc. Lond. B* 21, 581-598 (1979).
124. Gray S, Kim JK. New insights into insulin resistance in the diabetic heart. *Trends Endocrinol Metab* 2011;22:394 - 403.
125. Greene SJ, Gheorghide M, Borlaug BA, Pieske B, Vaduganathan M, Burnett Jr JC, et al. The cGMP signaling pathway as a therapeutic target in heart failure with preserved ejection fraction. *J Am Heart Assoc* 2013;2:e000536.
126. Grilli, M., Chiu, J.J. y Lenardo, M.J. (1993b) NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int-Rev-Cytol.*, 143: 1-62.
127. Grisoni ML, Proust C, Alanne M, Desuremain M, Salomaa V, Kuulasmaa K, et al: Lack of association between polymorphisms of the IL18R1 and IL18RAP genes and cardiovascular risk: the MORGAM Project. *BMC Med Genet* 2009, 10:44.
128. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA, Costa F. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Curr Opin Cardiol.* 2006 Jan;21(1):1-6. Review
129. Grundy SM: Metabo Kowalska I, Straczkowski M, Nikolajuk A, Adamska A, Karczewska-Kupczewska

- M, Otziomek E, et al: Insulin resistance, serum adiponectin, and proinflammatory markers in young subjects with the metabolic syndrome. *Metabolism* 2008, 57:1539-1544.
130. Grundy SM: Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008, 28:629-636.
131. Grundy SM. Pre-diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol* 2012; 59:635-643.
132. Gruson D, Buglioni A, Burnett Jr JC. PTH: potential role in management of heart fail-ure. *Clin Chim Acta* 2014;433:290-6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4031063/>
133. Haffner SM, Stern MP, Hazuda HP, Mitchell BD, Patterson JK: Cardiovascular risk factors in confirmed prediabetic individuals. Does the clock for coronary heart disease start ticking before the onset of clinical diabetes?. *JAMA* 1990, 263:2893-2898.
134. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998;339:229 - 234.
135. Hair, J.F. Jr.; Black, W.C.; Babin, B.J. y Anderson, R.E. (2014). Canonical Correlation. *Suplemento de Multivariate Data Analysis, 7th Edition.* Pearson. URL http://www.mvstats.com/Downloads/Supplements/Canonical_Correlation_7e.pdf.
136. Hancock CR, Han DH, Chen M, Terada S, Yasuda T, Wright DC, Holloszy JO. High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:7815-7820.
137. Hanifi-Moghaddam P, Schloot NC, Kappler S, Seissler J, Kolb H. An association of autoantibody status and serum cytokine levels in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2003 May;52(5):1137-42.
138. Harford KA, Reynolds CM, McGillicuddy FC, Roche HM. Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. *Proc Nutr Soc* 2011; 70:408-417.
139. Harms RZ, Yarde DN, Guinn Z, Lorenzo-Arteaga KM, Corley KP, Cabrera MS, Sarvetnick NS. Increased expression of IL-18 in the serum and islets of type 1 diabetics. *Molecular Immunology.* Volume 64, Issue 2, April 2015, Pages 306-312
140. Hasegawa Y, Saito T, Ogihara T, Ishigaki Y, Yamada T, Imai J, Uno K, Gao J, Kaneko K, Shimosawa T, Asano T, Fujita T, Oka Y, Katagiri H. Blockade of the nuclear factor- κ B pathway in the endothelium prevents insulin resistance and prolongs life spans. *Circulation* 2012;125:1122 - 1133.
141. Hashimoto W, Osaki T, Okamura H, et al. Differential antitumor effects of administration of recombinant IL-18 or recombinant IL-12 are mediated primarily by Fas-Fas ligand- and perforin-induced tumor apoptosis, respectively. *J Immunol* 1999;163:583-9.
142. He M, Cornelis MC, Kraft P, van Dam RM, Sun Q, Laurie CC, et al: Genome-Wide Association Study Identifies Variants at the IL18-BCO2 Locus Associated With Interleukin-18 Levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010, 30(4):885-90.
143. Henson, P. M. & Hume, D. A. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends Immunol.* 27, 244-250 (2006).
144. Higgs, G. A., Moncada, S. & Vane, J. R. Eicosanoids in inflammation. *Ann. Clin. Res.* 16, 287-299 (1984).
145. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 2001;88:E14 - E22. Stahl RA,
146. Hivert MF, Sun Q, Shrader P, Mantzoros CS, Meigs JB, Hu FB: Circulating IL-18 and the risk of type 2 diabetes in women. *Diabetologia* 2009, 52:2101-2108.

147. Hofmann, M. A. et al. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97, 889–901 (1999).
148. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008;359:1577 – 1589. 94.
149. Hossain P, Kavar B, El Nahas M. Obesity and diabetes in the developing world – a growing challenge. *N Engl J Med* 2007;356:213 – 215.
150. Hotamisligil, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444, 860–867 (2006).
151. Huang, H. & Tindall, D. J. Dynamic FoxO transcription factors. *J. Cell Sci.* 120, 2479–2487 (2007).
152. Hung J, McQuillan BM, Chapman CM, Thompson PL, Beilby JP: Elevated interleukin-18 levels are associated with the metabolic syndrome independent of obesity and insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol* 2005, 25:1268-1273.
153. Hume, D. A. The mononuclear phagocyte system. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 49–53 (2006).
154. Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000;49:1939 – 1945.
155. Iraqi W, Rossignol P, Angioi M, Fay R, Nuee J, Ketelslegers JM, et al. Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with acute myocardial infarction complicated by left ventricular dysfunction and heart failure: insights from the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS) study. *Circulation* 2009;119:2471–9.
156. Jackson G, Gibbs CR, Davies MK, Lip GY. ABC of heart failure. *Pathophysiology.* *BMJ* 2000;320:167–70.
157. Jackson B, Vangilder R, Hileman SM, Vona-Davis LC. Prostate cancer cell proliferation is influenced by leptin. *J Surg Res* 2004; 118:71-82.
158. Jagers JR, Sui X, Hooker SP, LaMonte MJ, Matthews CE, Hand GA, Blair SN. Metabolic syndrome and risk of cancer mortality in men. *Eur J Cancer* 2009; 45:1831-1838.
159. Jagla A, Schrezenmeir J. Postprandial triglycerides and endothelial function. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2001;109:533–547. doi: 10.1055/s-2001-15116.
160. Janke J, Engeli S, Boschmann M, Adams F, Bohnke J, Luft FC, Sharma AM, Jordan J. Retinol-binding protein 4 in human obesity. *Diabetes* 2006; 55:2805-2810.
161. Jeremias I, Kupatt C, Martin-Villalba A, et al. Involvement of CD95/Apo1/Fas in cell death after myocardial ischemia. *Circulation* 2000;102:915–20.
162. Jessup M, Brozena S. Heart failure. *N Engl J Med* 2003;348:2007–18.
163. Jialal I, Huet BA, Kaur H, Chien A, Devaraj S. Increased toll-like receptor activity in patients with metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2012; 35:900-904.
164. Jiang, D. et al. Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nature Med.* 11, 1173–1179 (2005).
165. Jiang, D., Liang, J. & Noble, P. W. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 435–461 (2007).
166. Julius, D. & Basbaum, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203–210 (2001).
167. Kadoglou NP1, Daskalopoulou SS, Perrea D, Liapis CD. Matrix metalloproteinases and diabetic vascular complications. *Angiology.* 2005 Mar-Apr;56(2):173-89.
168. Kagota S, Tada Y, Kubota Y, Nejime N, Yamaguchi Y, Nakamura K, et al. Peroxynitrite is involved in

- the dysfunction of vasorelaxation in SHR/NDmcr-cp rats, spontaneously hypertensive obese rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;50: 677-85.
169. Kahn R. Metabolic syndrome--what is the clinical usefulness? *Lancet* 2008; 371:1892-1893.
170. Kalra SP. Central leptin insufficiency syndrome: an interactive etiology for obesity, metabolic and neural diseases and for designing new therapeutic interventions. *Peptides* 2008; 29:127-138.
171. Kanda, H. et al. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest.* 116, 1494-1505 (2006).
172. Karin, M., Lawrence, T. & Nizet, V. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell* 124, 823-835 (2006).
173. Karnieli E, Zarnowski MJ, Hissin PJ, Simpson IA, Salans LB, Cushman SW. Insulin-stimulated translocation of glucose transport systems in the isolated rat adipose cell. Time course, reversal, insulin concentration dependency, and relationship to glucose transport activity. *J Biol Chem* 1981; 256:4772-4777.
174. Karnieli E, Armoni M. Transcriptional regulation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 gene: from physiology to pathology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 295:E38-45.
175. Karpe F, Dickmann JR, Frayn KN. Fatty acids, obesity, and insulin resistance: time for a reevaluation. *Diabetes* 2011; 60:2441-2449.
176. Katakami NI, Kaneto H, Matsuhisa M, Yoshiuchi K, Kato K, Yamamoto K, Umayahara Y, Kosugi K, Hori M, Yamasaki Y. Serum interleukin-18 levels are increased and closely associated with various soluble adhesion molecule levels in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2007 Jan;30(1):159-61.
177. Katzmarzyk et al. The importance of waist circumference in the definition of MS. Prospective analysis of mortality in men. *Diabetes Care* 2006; 29: 404
178. Keating ST, El-Osta A. Chromatin modifications associated with diabetes. *J Cardiovasc Transl Res* 2012;5:399 - 412.
179. Keller, M., Ruegg, A., Werner, S. & Beer, H. D. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 132, 818-831 (2008).
180. Kelly RA, Smith TW. Cytokines and cardiac contractile function. *Circulation* 1997;95:778-81.
181. Kielstein JT, Tsao PS. From Zanius to ADMA: ADMA a new "adipocytokine" and its potential role in metabolic syndrome. *J Nephrol* 2007;20:515
182. Khot UN, Khot MB, Bajzer CT, Sapp SK, Ohman EM, Brener SJ, Ellis SG, Lincoff AM, Topol EJ. *JAMA.* Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease. 2003 Aug 20;290(7):898-904.
183. Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation* 2006;113:1888 - 1904.
184. Kim JA, Wei Y, Sowers JR. Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance. *Circ Res* 2008; 102:401-414.
185. Kim CS, Jung SB, Naqvi A, Hoffman TA, DeRicco J, Yamamori T, Cole MP, Jeon BH, Irani K. P53 impairs endothelium-dependent vasomotor function through transcriptional upregulation of p66shc. *Circ Res* 2008;103:1441 - 1450.
186. Kim JK. Endothelial nuclear factor kappaB in obesity and aging: is endothelial nuclear factor kappaB a master regulator of inflammation and insulin resistance? *Circulation* 2012;125:1081 - 1083.
187. Knoops S, Groeneveld AB, Kamp O, Lagrand WK, Hoekman K. Granulocyte-macrophage colony-

- stimulating factor (GM-CSF) decreases left ventricular function. An echocardiographic study in cancer patients. *Cytokine*. 2001 May 7;14(3):184-7.
188. Koenig W, Khuseyinova N, Baumert J, Thorand B, Loewel H, Chambless L, et al: Increased concentrations of C-reactive protein and IL-6 but not IL-18 are independently associated with incident coronary events in middle-aged men and women: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006, 26:2745-2751.
189. Koglin J, Granville DJ, Glysing-Jensen T, et al. Attenuated acute cardiac rejection in NOS2 -/- recipients correlates with reduced apoptosis. *Circulation* 1999;99:836-42.
190. Kondo H, Shimomura I, Matsukawa Y, Kumada M, Takahashi M, Matsuda M, Ouchi N, Kihara S, Kawamoto T, Sumitsuji S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Association of adiponectin mutation with type 2 diabetes: a candidate gene for the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 2002; 51:2325-2328.
191. Komajda M, Lam CS. Heart failure with preserved ejection fraction: a clinical dilemma. *Eur Heart J* 2014;35:1022-32.
192. Kopp, E. y Ghosh, S. (1995) NF-kB and Rel proteins in innate immunity. *Adv. Immunol.*, 58: 1-27.
193. Kousteni S. FoxO1, the transcriptional chief of staff of energy metabolism. *Bone* 2012; 50:437-443.
194. Kouroedov A, Eto M, Joch H, Volpe M, Luscher TF, Cosentino F. Selective inhibition of p38 β prevents acute effects of high glucose on vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells. *Circulation* 2004;110: 91-96.
195. Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, Bain J, Stevens R, Dyck JR, Newgard CB, Lopaschuk GD, Muoio DM. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab* 2008; 7:45-56.
196. Kowalska I, Straczkowski M, Nikolajuk A, Adamska A, Karczewska-Kupczewska M, Otziomek E, et al: Insulin resistance, serum adiponectin, and proinflammatory markers in young subjects with the metabolic syndrome. *Metabolism* 2008, 57:1539-1544.
197. Krogh-Madsen R, Plomgaard P, Moller K, Mittendorfer B, Pedersen BK: Influence of TNF-alpha and IL-6 infusions on insulin sensitivity and expression of IL-18 in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006, 291: E108-E114.
198. Krown KA, Page MT, Nguyen C, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes: involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death. *J Clin Invest* 1996;98:2854-65.
199. Kubota N, Yano W, Kubota T, Yamauchi T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Okamoto S, Shiuchi T, Suzuki R, Satoh H, Tsuchida A, Moroi M, Sugi K, Noda T, Ebinuma H, Ueta Y, Kondo T, Araki E, Ezaki O, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Minokoshi Y, Kadowaki T. Adiponectin stimulates AMP-activated protein kinase in the hypothalamus and increases food intake. *Cell Metab* 2007; 6:55-68.
200. Kubota T, Kubota N, Kumagai H, Yamaguchi S, Kozono H, Takahashi T, Inoue M, Itoh S, Takamoto I, Sasako T, Kumagai K, Kawai T, Hashimoto S, Kobayashi T, Sato M, Tokuyama K, Nishimura S, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Yamazaki T, Ezaki O, Kawamura K, Masuda H, Moroi M, Sugi K, Oike Y, Shimokawa H, Yanagihara N, Tsutsui M, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R, Kamata K, Inoue K, Kodama T, Ueki K, Kadowaki T. Impaired insulin signaling in endothelial cells reduces insulin-induced glucose uptake by skeletal muscle. *Cell Metab* 2011;13:294 - 307.
201. Kuk JL, Ardern CI. Are metabolically normal but obese individuals at lower risk for all-cause mortality? *Diabetes Care* 2009; 32:2297-2299.
202. Kunitomo M, Yamaguchi Y, Kagota S, Otsubo K. Beneficial effect of Coenzyme Q10 on increased oxidative and nitrate stress and inflammation and individual metabolic components developing in a rat model of metabolic syndrome. *J Pharmacol Sci* 2007;107:128-37.
203. Kumar RA, Dong JF, Thaggard JA, Cruz MA, López JA, McIntire LV. Kinetics of GPIIb/IIIa-vWF-A1

- tether bond under flow: effect of GPIIb/IIIa mutations on the association and dissociation rates. *Biophys J*. 2003 Dec;85(6):4099-109.
204. Kwon YM, Oh SW, Hwang SS, Lee C, Kwon H, Chung GE. Association of nonalcoholic fatty liver disease with components of metabolic syndrome according to body mass index in Korean adults. *Am J Gastroenterol* 2012; 107:1852-1858.
 205. Ky B, French B, McCloskey K, Rame JE, McIntosh E, Shahi P, et al. High-sensitivity ST2 for prediction of adverse outcomes in chronic heart failure. *Circ Heart Fail* 2011;4: 180-7.
 206. Laclaustra M et al. Metabolic syndrome pathophysiology: the role of adipose tissue. *NutrMetabCardiovasc Dis*. 2007;17:129-39.
 207. Lago F, Gomez R, Gomez-Reino JJ, Dieguez C, Gualillo O. Adipokines as novel modulators of lipid metabolism. *Trends Biochem Sci* 2009; 34:500-510.
 208. Lam CS, Donal E, Kraigher-Krainer E, Vasan RS. Epidemiology and clinical course of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur J Heart Fail* 2011;13:18-28.
 209. Lam JC, Mak JC, Ip MS. Obesity, obstructive sleep apnoea and metabolic syndrome. *Respirology* 2012; 17:223-236.
 210. Lau DC, Dhillon B, Yan H, Szmitko PE, Verma S: Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005, 288:H2031-H2041.
 211. LeRoith D, Roberts CT, Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* 2003; 195:127-137.
 212. Lebrun P, Van Obberghen E. SOCS proteins causing trouble in insulin action. *Acta Physiol (Oxf)* 2008; 192:29-36.
 213. Lee BC, Lee J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. *Biochimica et Biophysica Acta* 1842 (2014) 446-462.
 214. Lemkes BA, Hermanides J, Devries JH, Holleman F, Meijers JC, Hoekstra JB. Hyperglycemia: a prothrombotic factor? *J Thromb Haemost* 2010;8:1663-1669.
 215. Leon ML, Zuckerman SH: Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis. *Inflamm Res* 2005, 54:395-411.
 216. León-Pedroza JI, González-Tapia LA, Del Olmo-Gila E, Castellanos-Rodríguez D, Escobedo G y González-Chávez A. Inflamación sistémica de grado bajo y su relación con el desarrollo de enfermedades metabólicas: de la evidencia molecular a la aplicación clínica. *Cirugía y Cirujanos*. 2015.
 217. Lerman A, Sandok EK, Hildebrand Jr FL, Burnett Jr JC. Inhibition of endothelium-derived relaxing factor enhances endothelin-mediated vasoconstriction. *Circulation* 1992;85:1894-8.
 218. LeRoith D. Pathophysiology of the metabolic syndrome: implications for the cardiometabolic risks associated with type 2 diabetes. *Am J Med Sci* 2012; 343:13-16.
 219. Lewis EC, Dinarello CA. Responses of IL-18- and IL-18 receptor-deficient pancreatic islets with convergence of positive and negative signals for the IL-18 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Nov 7;103(45):16852-7.
 220. Li, N. y Karin, M. (1999) Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *FASEB J.*, 13(10): 1137-1143.
 221. Li YP, Reid MB: Effect of tumor necrosis factor-alpha on skeletal muscle metabolism. *Curr Rheumatol* 2001, 13:483-487.
 222. Li Y, Song YH, Li F, Yang T, Lu YW, Geng YJ. MicroRNA-221 regulates high glucose-induced endothelial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;381: 81-83.
 223. Li ZY, Wang P, Miao CY. Adipokines in inflammation, insulin resistance and cardiovascular disease.

- Clin Exp Pharmacol Physiol 2011;38:888-896.
224. Linden MD, Tran H, Woods R, Tonkin A. High platelet reactivity and antiplatelet therapy resistance. *Semin Thromb Hemost* 2012;38:200-212.
225. Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, Knowler WC, Krakoff J. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 2002; 360:57-58.
226. Little WC, Zile MR. HFpEF: cardiovascular abnormalities not just comorbidities. *Circ Heart Fail* 2012;5:669-71.
227. Liu VW, Huang PL. Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc Res* 2008;77:19-29.
228. Navab, M. et al. Mechanisms of disease: proatherogenic HDL – an evolving field. *Nature Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 2, 504-511 (2006).
229. Najjar SM, Yang Y, Fernstrom MA, Lee SJ, Deangelis AM, Rjaily GA, Al-Share QY, Dai T, Miller TA, Ratnam S, Ruch RJ, Smith S, Lin SH, Beauchemin N, Oyarce AM. Insulin acutely decreases hepatic fatty acid synthase activity. *Cell Metab* 2005; 2:43-53.
230. Nakamura A, Shikata K, Hiramatsu M, Nakatou T, Kitamura T, Wada J, et al: Serum interleukin-18 levels are associated with nephropathy and atherosclerosis in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2005, 28:2890-2895.
231. Nathan, C. Points of control in inflammation. *Nature* 420, 846-852 (2002).
232. Nathan, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Rev. Immunol.* 6, 173-182 (2006).
233. Neish, A.S., Read, M.A., Thanos D., Pine R., Maniatis T. y Collins T. (1995) Endothelial interferon regulatory factor 1 cooperates with NF-kappa B as a transcriptional activator of vascular cell adhesion molecule 1. *Molecular and Cellular Biology*, 15: 2558-2569.
234. Netea MG, Kullberg BJ, Verschueren I, Van Der Meer JW. Interleukin-18 induces production of proinflammatory cytokines in mice: no intermediate role for the cytokines of the tumor necrosis factor family and interleukin-1beta. *Eur J Immunol.* 2000 Oct;30(10):3057-60.
235. Nicoletti F, Conget I, Di Marco R, Speciale AM, Morinigo R, Bendtzen K, Gomis R. Serum levels of the interferon-gamma-inducing cytokine interleukin-18 are increased in individuals at high risk of developing type I diabetes. *Diabetologia.* 2001 Mar;44(3):309-11.
236. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404:787 - 790.
237. Nogueira JP, Maraninchi M, Beliard S, Padilla N, Duvillard L, Mancini J, Nicolay A, Xiao C, Vialettes B, Lewis GF, Valero R. Absence of acute inhibitory effect of insulin on chylomicron production in type 2 diabetes. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2012; 32:1039-1044.
238. Nossuli TO, Lakshminarayanan V, Baumgarten G, Taffet GE, Ballantyne CM, Michael LH, Entman ML. A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000 Apr;278(4):H1049-55.
239. Nossuli TO, Frangogiannis NG, Knuefermann P, Lakshminarayanan V, Dewald O, Evans AJ, Peschon J, Mann DL, Michael LH, Entman ML. Brief murine myocardial I/R induces chemokines in a TNF-alpha-independent manner: role of oxygen radicals. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001 Dec;281(6):H2549-58.
240. Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, Liu-Bryan R, Glass CK, Neels JG, Olefsky JM. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem* 2007; 282:35279-35292.

241. Norata GD, Ongari M, Garlaschelli K, Raselli S, Grigore L, Catapano AL. Plasma resistin levels correlate with determinants of the metabolic syndrome. *Eur J Endocrinol* 2007; 156:279-284.
242. Majno, G. & Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 146, 3-15 (1995).
243. Majno, G. & Joris, I. *Cells, Tissues and Disease* (Oxford Univ. Press, 2004).
244. Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, Besnard S, Leseche G, Chvatchko Y, et al: Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability. *Circulation* 2001, 104:1598-1603.
245. Mallat Z, Henry P, Fressonnet R, Alouani S, Scoazec A, Beaufils P, Chvatchko Y, ~~et al~~. ~~Interleukin-18~~ plasma concentrations of interleukin-18 in acute coronary síndromes. *Heart* 2002;88:467-469.
246. Mantovani, A. et al. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677-686 (2004).
247. Mantovani A., Allavena P., Sica A. And Balkwil F. Cancer-related inflammation. *Nature*, 2008, Vol 454, pags. 436-444.
248. Marianne Hartford, Olov Wiklund, Lillemor Mattsson Hultén, Anita Persson, Thomas Karlsson, Johan Herlitz, Johannes Hulthe, Kenneth Caidahl. Interleukin-18 as a Predictor of Future Events in Patients With Acute Coronary Syndromes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2010; 30: 2039-2046.
249. Marrugat J y Sala J. Nuevos instrumentos y los riesgos de siempre. *RevEspCardiol* 2007; 60 (5): 464-7
250. Marsh AJ, Fontes MA, Killinger S, Pawlak DB, Polson JW, Dampney RA. Cardiovascular responses evoked by leptin acting on neurons in the ventromedial and dorsomedial hypothalamus. *Hypertension* 2003; 42:488-493.
251. Mariathasan, S. et al. Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* 440, 228-232 (2006).
252. Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A. & Tschopp, J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440, 237-241 (2006).
253. Martins AR, Nachbar RT, Gorjao R, Vinolo MA, Festuccia WT, Lambertucci RH, Cury-Boaventura MF, Silveira LR, Curi R, Hirabara SM. Mechanisms underlying skeletal muscle insulin resistance induced by fatty acids: importance of the mitochondrial function. *Lipids Health Dis* 2012; 11:30.
254. Massiera F, Bloch-Faure M, Ceiler D, Murakami K, Fukamizu A, Gasc JM, Quignard-Boulangue A, Negrel R, Ailhaud G, Seydoux J, Meneton P, Teboul M. Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB J* 2001; 15:2727-2729.
255. Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, Matoba Y, Sasayama S. Br Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy *Heart J.* 1994 Dec;72(6):561-6.
256. Medzhitov, R. & Janeway, C. A. Jr Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91, 295-298 (1997).
257. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *NATURE | Vol 454.* July 2008. Pags: 428-435.
258. Meisinger C, Ruckert IM, Rathmann W, Doring A, Thorand B, Huth C, Kowall B, Koenig W. Retinol-binding protein 4 is associated with prediabetes in adults from the general population: the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg (KORA) F4 Study. *Diabetes Care* 2011; 34:1648-1650.
259. Melo LG, Veress AT, Ackermann U, Sonnenberg H. Chronic regulation of arterial blood pressure by ANP: role of endogenous vasoactive endothelial factors. *Am J Physiol* 1998;275:H1826-33.

260. Menzel, U. (2012). CCP: Significance Tests for Canonical Correlation Analysis (CCA). R package version 1.1. URL <http://CRAN.R-project.org/package=CCP>.
261. Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B.W., Shevchenko, A., Bennett, V.L. y Li, J., Young, D., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A.M. y Rao, A. (1997) IKK-1 and IKK-2: Cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Cell*, 91: 243-262.
262. Meyers, L.S.; Gamst, G. y Guarino, A.J. (2013).). *Applied Multivariate Research. Design and Interpretation*. SAGE.
263. Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN, Goldberg AC, Howard WJ, Jacobson MS, Kris-Etherton PM, Lennie TA, Levi M, Mazzone T, Pennathur S. Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2011; 123:2292-2333.
264. Minako Yamaoka-Tojo, MD, Taiki Tojo, MD, Takayuki Inomata, MD, Yoji Machida, MD, Kazuyuki Osada, MD, Tohru Izumi, MD. Circulating levels of interleukin 18 reflect etiologies of heart failure: Th1/Th2 cytokine imbalance exaggerates the pathophysiology of advanced heart failure. *J Card Fail*. 2002 Feb;8(1):21-7.
265. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Información y estadísticas sanitarias 2014. Tendencia de los principales factores de riesgo de enfermedades crónicas. España 2001-2011/2012.
266. Moro MA, Russel RJ, Celtek S, Lizasoain I, Su Y, Darley-Usmar VM, et al. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:1480-5.
267. Morton GJ, Gelling RW, Niswender KD, Morrison CD, Rhodes CJ, Schwartz MW. Leptin regulates insulin sensitivity via phosphatidylinositol-3-OH kinase signaling in mediobasal hypothalamic neurons. *Cell Metab* 2005; 2:411-420.
268. Moynagh, P.N., Williams, D.C. y O'Neill, L.A. (1994) Activation of NF-kappa B and induction of vascular cell adhesion molecule-1 and intracellular adhesion molecule-1 expression in human glial cells by IL-1. Modulation by antioxidants. *J-Immunol.*, 153(6): 2681-90.
269. Muniyappa R, Iantorno M, Quon MJ. An integrated view of insulin resistance and endothelial dysfunction. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008; 37:685-711, ix-x.
270. Munzberg H, Myers MG, Jr. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci* 2005; 8:566-570.
271. Muoio DM, Newgard CB. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9:193-205.
272. Musso G, Gambino R, Durazzo M, Biroli G, Carello M, Faga E, Pacini G, De Michieli F, Rabbione L, Premoli A, Cassader M, Pagano G. Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease. *Hepatology* 2005; 42:1175-1183.
273. Okamoto M, Ohara-Imaizumi M, Kubota N, Hashimoto S, Eto K, Kanno T, Kubota T, Wakui M, Nagai R, Noda M, Nagamatsu S, Kadowaki T. Adiponectin induces insulin secretion in vitro and in vivo at a low glucose concentration. *Diabetologia* 2008; 51:827-835.
274. Okamura H, Tsutsui H, Kashiwamura S, et al. Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Adv Immunol* 1998;70:281-312.
275. Oksanen, J.; Blanchet, F.B.; Kindt, R.; Legendre, P.; Minchin, P.R.; O'Hara, R.B.; Simpson, G.L.; Solymos, P.; Henry, m.; Stevens, H. y Wagner H. (2015). *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.3-1. URL=<http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
276. Otani H. Oxidative stress as pathogenesis of cardiovascular risk associated with metabolic syndrome. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15:1911-1926.
277. Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. Trends in prevalence and

- outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med* -2006;355:251
278. Paneni F, Mocharla P, Akhmedov A, Costantino S, Osto E, Volpe M, Luscher TF, Cosentino F. Gene silencing of the mitochondrial adaptor p66shc suppresses vascular hyperglycemic memory in diabetes. *Circ Res* 2012;111:278 – 89.
279. Paneni F, Beckman JA, Creager MA and Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J*. 2013 Aug 14; 34(31): 2436–2443.
280. Pagnin E, Fadini G, de Toni R, Tiengo A, Calo L, Avogaro A. Diabetes induces p66shc gene expression in human peripheral blood mononuclear cells: relationship to oxidative stress. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1130 – 1136.
281. Park, J. S. et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290, C917–C924 (2006).
282. Patti ME, Butte AJ, Crunkhorn S, Cusi K, Berria R, Kashyap S, Miyazaki Y, Kohane I, Costello M, Saccone R, Landaker EJ, Goldfine AB, Mun E, DeFronzo R, Finlayson J, Kahn CR, Mandarino LJ. Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:8466-8471.
283. Paz K, Hemi R, LeRoith D, Karasik A, Elhanany E, Kanety H, Zick Y. A molecular basis for insulin resistance. Elevated serine/threonine phosphorylation of IRS-1 and IRS-2 inhibits their binding to the juxtamembrane region of the insulin receptor and impairs their ability to undergo insulin-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1997; 272:29911-29918.
284. Peppard PE, Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J. Longitudinal study of moderate weight change and sleep-disordered breathing. *JAMA* 2000; 284:3015-3021.
285. Pitt B, Remme W, Zannad F, Neaton J, Martinez F, Roniker B, et al. Eplerenone, a selective aldosterone blocker, in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2003;348:1309-21.
286. Pitt B, White H, Nicolau J, Martinez F, Gheorghide M, Aschermann M, et al. Eplerenone reduces mortality 30 days after randomization following acute myocardial infarction in patients with left ventricular systolic dysfunction and heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2005;46:425–31.
287. Pober, J. S. & Sessa, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature*
288. *Rev. Immunol.* 7, 803–815 (2007).
289. Pomerantz BJ, Reznikov LL, Harken AH, et al. Inhibition of caspase 1 reduces human myocardial ischemic dysfunction via inhibition of IL-18 and IL-1beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:2871–6.
290. Prabhu SD. Cytokine-induced modulation of cardiac function. *Circ Res.* 2004 Dec 10;95(12):1140-53.
291. Pradhan AD, Ridker PM: Do atherosclerosis and type 2 diabetes share a common inflammatory basis? *Eur Heart J* 2002, 23:831-834.
292. Presta I, Andreozzi F, Succurro E, Marini MA, Laratta E, Lauro R, et al: IL-18 gene polymorphism and metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009, 19:e5-e6.
293. Prodi E, Obici S. Minireview: the brain as a molecular target for diabetic therapy. *Endocrinology* 2006; 147:2664-2669.
294. Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, Kitamura Y, Altomonte J, Dong H, Accili D, Spiegelman BM. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature* 2003; 423:550-555.
295. Pull, S. L., Doherty, J. M., Mills, J. C., Gordon, J. I. & Stappenbeck, T. S. Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche necessary for regenerative responses to injury. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 99-104 (2005).

296. Puren AJ, Fantuzzi G, Gu Y, et al. Interleukin-18 (IFN γ -inducing factor) induces IL-8 and IL-1 β via TNF α production from non-CD14⁺ human blood mononuclear cells. *J Clin Invest* 1998;101:711-21.
297. Quagliari L, Piconi L, Assaloni R, Martinelli L, Motz E, Ceriello A. Intermittent high glucose enhances apoptosis related to oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells: the role of protein kinase c and NAD(P)H-oxidase activation. *Diabetes* 2003;52:2795 – 2804.
298. Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC. Adipokines and insulin resistance. *Mol Med* 2008; 14:741-751.
299. Rabkin SW: The role of interleukin 18 in the pathogenesis of hypertension-induced vascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2009, 6:192-199.
300. Rahmouni K, Correia ML, Haynes WG, Mark AL. Obesity-associated hypertension: new insights into mechanisms. *Hypertension* 2005; 45:9-14.
301. Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S. & Medzhitov, R. Recognition of commensal microflora by Toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118, 229-241 (2004).
302. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963; 1:785-789.
303. Randle PJ. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev* 1998; 14:263-283.
304. Rask-Madsen C, Li Q, Freund B, Feather D, Abramov R, Wu IH, Chen K, Yamamoto-Hiraoka J, Goldenbogen J, Sotiropoulos KB, Clermont A, Gerald P, Dall'Osso C, Wagers AJ, Huang PL, Reikter M, Scalia R, Kahn CR, King GL. Loss of insulin signaling in vascular endothelial cells accelerates atherosclerosis in apolipoprotein e null mice. *Cell Metab* 2010;11:379 – 389.
305. Rasouli N, Kern PA. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:S64-73.
306. Ravichandran, K. S. & Lorenz, U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nature Rev. Immunol.* 7, 964-974 (2007).
307. R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
308. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Annu Rev Med* 1993; 44:121-131.
309. Reaven GM. Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. 1988. *Diabetes*. 1988; 37(12): 1595-1607.
310. Renehan AG, Zwahlen M, Minder C, O'Dwyer ST, Shalet SM, Egger M. Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and cancer risk: systematic review and meta-regression analysis. *Lancet* 2004; 363:1346-1353.
311. Richards AM. The renin-angiotensin-aldosterone system and the cardiac natriuretic peptides. *Heart* 1996;76:36-44.
312. Rizki, T. M. & Rizki, R. M. Lamellocyte differentiation in *Drosophila* larvae parasitized by *Leptopilina*. *Dev. Comp. Immunol.* 16, 103-110 (1992).
313. Robbins GR, Wen H and Ting JPY Inflammasomes and Metabolic Disorders: Old Genes in Modern Diseases. *Mol Cell.* 2014 Apr 24;54(2):297-308.
314. Robertson AK, Hansson GK: T cells in atherogenesis: for better or for worse? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006, 26:2421-2432.

315. Rocca B, Santilli F, Pitocco D, Mucci L, Petrucci G, Vitacolonna E, Lattanzio S, Mattoscio D, Zaccardi F, Liani R, Vazzana N, Del Ponte A, Ferrante E, Martini F, Cardillo C, Morosetti R, Mirabella M, Ghirlanda G, Davi G, Patrono C. The recovery of platelet cyclooxygenase activity explains interindividual variability in responsiveness to low-dose aspirin in patients with and without diabetes. *J Thromb Haemost* 2012;10:1220 – 1230.
316. Rock, K. L. & Kono, H. The inflammatory response to cell death. *Annu. Rev. Pathol.* 3, 99–126 (2008).
317. Ronco C, Haapio M, House AA, Anavekar N, Bellomo R. Cardiorenal syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2008;52:1527–39.
318. Rothe H, Hausmann A, Casteels K, Okamura H, Kurimoto M, Burkart V, Mathieu C, Kolb H. IL-18 inhibits diabetes development in nonobese diabetic mice by counterregulation of Th1-dependent destructive insulinitis. *J Immunol.* 1999 Aug 1;163(3):1230–6.
319. Rothlin, C. V., Ghosh, S., Zuniga, E. I., Oldstone, M. B. & Lemke, G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* 131, 1124–1136 (2007).
320. Rubin D., Claas S., Pfeuffer M., Nothnagel M., Foelsch U.S., and Schrezenmeir J. s-ICAM-1 and s-VCAM-1 in healthy men are strongly associated with traits of the metabolic syndrome, becoming evident in the postprandial response to a lipid-rich meal. *Lipids Health Dis.* 2008; 7: 32.
321. Ryba-Stanisławowska M1, Rybarczyk-Kapturska K, Myśliwiec M, Myśliwska J. Elevated levels of serum IL-12 and IL-18 are associated with lower frequencies of CD4(+)CD25 (high)FOXP3 (+) regulatory t cells in young patients with type 1 diabetes. *Inflammation.* 2014 Oct;37(5):1513–20.
322. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 2001; 414:799–806.
323. Sangaralingham SJ, Huntley BK, Martin FL, McKie PM, Bellavia D, Ichiki T, et al. The aging heart, myocardial fibrosis, and its relationship to circulating C-type natriuretic peptide. *Hypertension* 2011;57:201–7.
324. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, Boekholdt SM, Khaw KT, Gudnason V. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation* 2007; 115:450–458.
325. Sattar N, Wannamethee SG, Forouhi NG. Novel biochemical risk factors for type 2 diabetes: pathogenic insights or prediction possibilities? *Diabetologia* 2008;51: 926 – 940.
326. Serhan, C. N. & Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunol.* 6, 1191–1197 (2005).
327. Serhan, C. N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 101–137 (2007).
328. Schreck, R., Rieber, P. y Baeuerle, P.A. (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappaB transcription factor and HIV-1. *EMBO*, 10: 2247–2258.
329. Scherer T, O'Hare J, Diggs-Andrews K, Schweiger M, Cheng B, Lindtner C, Zielinski E, Vempati P, Su K, Dighe S, Milsom T, Puchowicz M, Scheja L, Zechner R, Fisher SJ, Previs SF, Buettner C. Brain insulin controls adipose tissue lipolysis and lipogenesis. *Cell Metab* 2011; 13:183–194.
330. Schroder K, Zhou R, and Tschopp J, "The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger?" *Science*, vol. 327, no. 5963, pp. 296–300, 2010.
331. Schwartz MW, Niswender KD. Adiposity Signaling and Biological Defense Against Weight Gain: Absence of Protection or Central Hormone Resistance? *J Clin Endocrinol Metab*, 2004; 89:5889–5897
332. Scorletti E, Calder PC, Byrne CD. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: metabolic aspects and novel treatments. *Endocrine* 2011; 40:332–343.

333. Sen, R. y Baltimore, D. (1986) Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*, 47: 921-8.
334. Sena CM, Matafome P, Crisostomo J, Rodrigues L, Fernandes R, Pereira P, Seica RM. Methylglyoxal promotes oxidative stress and endothelial dysfunction. *Pharmacol Res* 2012;65:497 – 506.
335. Seta Y, Kanda T, Tanaka T, Arai M, Sekiguchi K, Yokoyama T, Kurimoto M, Tamura J, Kurabayashi M. Interleukin 18 in acute myocardial infarction. *Heart*. 2000 Dec;84(6):668.
336. Shantikumar S, Caporali A, Emanuelli C. Role of microRNAs in diabetes and its cardiovascular complications. *Cardiovasc Res* 2012;93:583-593.
337. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, et al. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation* 2004;110:3121-8.
338. Sharma AC. Sepsis-induced myocardial dysfunction. *Shock*. 2007 Sep;28(3):265-9. Review.
339. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106: 171 – 176.
340. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol*. 1994;10:405-55.
341. Sinning JM, Losch J, Walenta K, Bohm M, Nickenig G, Werner N. Circulating cd31+/annexin v+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *Eur Heart J* 2011;32:2034 – 2041.
342. Skurk T, Kolb H, Muller-Scholze S, Rohrig K, Hauner H, Herder C: The proatherogenic cytokine interleukin-18 is secreted by human adipocytes. *Eur J Endocrinol* 2005, 152:863-868.
343. Smith DO, LeRoith D. Insulin resistance syndrome, pre-diabetes, and the prevention of type 2 diabetes mellitus. *Clin Cornerstone* 2004; 6:7-6.
344. Soares AF, Guichardant M, Cozzone D, Bernoud-Hubac N, Bouzaidi-Tiali N, Lagarde M, Geloën A. Effects of oxidative stress on adiponectin secretion and lactate production in 3T3-L1 adipocytes. *Free Radic Biol Med* 2005; 38:882-889.
345. Solomon SD, Zile M, Pieske B, Voors A, Shah A, Kraigher-Krainer E, et al. The angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 in heart failure with preserved ejection fraction: a phase 2 double-blind randomised controlled trial. *Lancet* 2012;380: 1387-95.
346. Somasundar P, Frankenberry KA, Skinner H, Vedula G, McFadden DW, Riggs D, Cleary MP, Grossmann ME. Minireview: Obesity and breast cancer: the estrogen connection. *Endocrinology* 2009; 150:2537-2542
347. Sokol, C. L., Barton, G. M., Farr, A. G. & Medzhitov, R. A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nature Immunol.* 9, 310-318 (2008).
348. Stearns, S. & Koella, J. *Evolution in Health and Disease* (Oxford Univ. Press, 2008).
349. Stefan N, Kantartzis K, Machann J, Schick F, Thamer C, Rittig K, Balletshofer B, Machicao F, Fritsche A, Haring HU. Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans. *Arch Intern Med* 2008; 168:1609-1616.
350. Stefan N, Kantartzis K, Haring HU. Causes and metabolic consequences of Fatty liver. *Endocr Rev* 2008; 29:939-960.
351. Stepan CM, Wang J, Whiteman EL, Birnbaum MJ, Lazar MA. Activation of SOCS-3 by resistin. *Mol Cell Biol* 2005; 25:1569-1575.
352. Summers SA. Sphingolipids and insulin resistance: the five Ws. *Curr Opin Lipidol* 2010; 21:128-135.

353. Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, Hobbs HH, Dobbins RL. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288:E462-468.
354. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7:85-96.
355. Takamoto I, Froguel P, Hara K, Tobe K, Nagai R, Ueki K, Kadowaki T. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med* 2007; 13:332-339.
356. Targher G, Arcaro G. Non-alcoholic fatty liver disease and increased risk of cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2007; 191:235-240.
357. Taube A, Schlich R, Sell H, Eckardt K, Eckel J. Inflammation and metabolic dysfunction: links to cardiovascular diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; 302: H2148 - H2165.
358. Tedgui, A. & Mallat, Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol. Rev.* 86, 515-581 (2006).
359. Thanos, D. y Maniatis, T. (1995) NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell*, 80(4): 529-32
360. Tiret L, Godefroy T, Lubos E, Nicaud V, Tregouet DA, Barbaux S, et al: Genetic analysis of the interleukin-18 system highlights the role of the interleukin-18 gene in cardiovascular disease. *Circulation* 2005, 112:643-650.
361. Tirosh A, Rudich A, Shochat T, Tekes-Manova D, Israeli E, Henkin Y, Kochba I, Shai I. Changes in triglyceride levels and risk for coronary heart disease in young men. *Ann Intern Med* 2007; 147:377-385.
362. Togliatto G, Trombetta A, Dentelli P, Rosso A, Brizzi MF. Mir221/mir222-driven post-transcriptional regulation of p27kip1 and p57kip2 is crucial for high-glucose- and age-mediated vascular cell damage. *Diabetologia* 2011;54:1930 - 1940.
363. Toledano, M.B. y Leonard, W.J. (1991) Modulation of transcription factor NF-kappaB binding activity by oxidation-reduction in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88(10): 4328-4332.
364. Tong Q, Dalgin G, Xu H et al: Function of GATA transcription factors in preadipocyte- adipocyte transition. *Science*, 2000; 290: 134-138
365. Trakada G, Chrousos G, Pejovic S, Vgontzas A. Sleep Apnea and its association with the Stress System, Inflammation, Insulin Resistance and Visceral Obesity. *Sleep Med Clin* 2007; 2:251-261.
366. Triposkiadis F, Karayannis G, Giamouzis G, Skoularigis J, Louridas G, Butler J. The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:1747-62.
367. Troseid M, Seljeflot I, Hjerkin EM, Arnesen H: Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular events in elderly men with the metabolic syndrome: synergistic effect of inflammation and hyperglycemia. *Diabetes Care* 2009, 32:486-492.
368. Troseid M, Lappegard KT, Mollnes TE, Arnesen H, Seljeflot I: The effect of interleukin-18 and components of the metabolic syndrome on insulin sensitivity and glucose tolerance. *Diabetes Care* 2009, 32:1041-1046.
369. Troseid M, Seljeflot I, Arnesen H. The role of interleukin-18 in the metabolic syndrome. *Cardiovasc Diabetol.* 2010 Mar 23;9:11
370. Tsan M-F and Gao B, "Endogenous ligands of Toll-like receptors," *Journal of Leukocyte Biology* 2004., vol. 76, no. 3, pp. 514- 519.
371. Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araujo EP, Vassallo J, Curi R, Velloso LA, Saad MJ. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56:1986-1998.
372. Tsutsui H, Kayagaki N, Kuida K, et al. Caspase-1-independent, Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion

- from macrophages causes acute liver injury in mice. *Immunity* 1999;11:359–67.
373. Turer, E. E. et al. Homeostatic MyD88-dependent signals cause lethal inflammation in the absence of A20. *J. Exp. Med.* 205, 451–464 (2008).
374. Turnbull, A. V. & Rivier, C. L. Regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol. Rev.* 79, 1–71 (1999).
375. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, et al., “The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance,” *Nature Medicine*, vol. 17, no. 2, pp. 179–189, 2011.
376. Van Heerebeek L, Borbely A, Niessen HW, Bronzwaer JG, van der Velden J, Stienen GJ, et al. Myocardial structure and function differ in systolic and diastolic heart failure. *Circulation* 2006;113:1966–73.
377. Van Guilder GP, Hoetzer GL, Greiner JJ, Stauffer BL, Desouza CA. Influence of metabolic syndrome on biomarkers of oxidative stress and inflammation in obese adults. *Obesity (Silver Spring)*. 2006 Dec;14(12):2127–31.
378. Van Guilder GP, Hoetzer GL, Greiner JJ, Stauffer BL, Desouza CA: Influence of metabolic syndrome on biomarkers of oxidative stress and inflammation in obese adults. *Obesity (Silver Spring)* 2006, 14:2127–2131.
379. Vaz M, Jennings G, Turner A, Cox H, Lambert G, Esler M. Regional sympathetic nervous activity and oxygen consumption in obese normotensive human subjects. *Circulation* 1997; 96:3423–3429.
380. Vazzana N, Ranalli P, Cucurullo C, Davi G. Diabetes mellitus and thrombosis. *Thromb Res* 2012;129:371 – 377.
381. Venables, W. N. & Ripley, B. D. (2002) *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York
382. Vermeer, P. D. et al. Segregation of receptor and ligand regulates activation of epithelial growth factor receptor. *Nature* 422, 322–326 (2003).
383. Verges B. Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? *Diabetologia* 2015; 58:886–899.
384. Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Hopper K, Lotsikas A, Lin HM, Kales A, Chrousos GP. Sleep apnea and daytime sleepiness and fatigue: relation to visceral obesity, insulin resistance, and hypercytokinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:1151–1158.
385. Vidal-Vanaclocha F, Fantuzzi G, Mendoza L, et al. IL-18 regulates IL-1beta-dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:734–9.
386. Vigliano CA, Cabeza Meckert PM, Diez M, Favalaro LE, Cortes C, Fazzi L, et al. Cardio- myocyte hypertrophy, oncosis, and autophagic vacuolization predict mortality in id- iopathic dilated cardiomyopathy with advanced heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:1523–31.
387. VinikAI, ErbasT, ParkTS, NolanR, PittengerGL. Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001;24:1476 – 1485.
388. Vitale C, Mercurio G, Cornoldi A, Fini M, Volterrani M, Rosano GM. Metformin improves endothelial function in patients with metabolic syndrome. *J Intern Med* 2005;258:250 – 256.
389. Vogl, T. et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nature Med.* 13, 1042–1049 (2007).
390. Von Lueder TG, Sangaralingham SJ, Wang BH, Kompa AR, Atar D, Burnett Jr JC, et al. Renin-angiotensin blockade combined with natriuretic peptide system augmentation: novel therapeutic concepts to combat heart failure. *Circ Heart Fail* 2013;6: –508.
391. Wang DE. MicroRNA regulation and its biological significance in personalized medicine and aging.

- Curr Genomics 2009;10:143.
392. Weber KT. Aldosterone in congestive heart failure. *N Engl J Med* 2001;345:1689-97.
393. Weisberg SP, McCann Ddesai M, et al: Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, 2003; 112: 1796-1808
394. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1785-8.
395. Werner, S. & Grose, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* 83, 835-870 (2003).
396. Wilkinson IB, Franklin SS, Cockcroft JR. Nitric oxide and the regulation of large artery stiffness: from physiology to pharmacology. *Hypertension* 2004;44:112-6.
397. Wilson AG, Symmons JA, Mc Dowell TL, et al: Effects of a polymorphism in the human Tumor Necrosis Factor- γ promoter on transcriptional activation. *Proc Nat Acad Sc USA*, 1997; 94: 3195-3199
398. Woldbaek PR, Tonnessen T, Henriksen UL, Florholmen G, Lunde PK, Lyberg T, et al: Increased cardiac IL-18 mRNA, pro-IL-18 and plasma IL-18 after myocardial infarction in the mouse; a potential role in cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res* 2003, 59:122-131.
399. Woldbaek PR, Sande JB, Strømme TA, Lunde PK, Djurovic S, Lyberg T, Christensen G, Tønnessen T. Daily administration of interleukin-18 causes myocardial dysfunction in healthy mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Aug;289(2):H708-14.
400. Wood IS, Wang B, Jenkins JR, Trayhurn P: The pro-inflammatory cytokine IL-18 is expressed in human adipose tissue and strongly upregulated by TNF α in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 337:422-429.
401. Woods SC, D'Alessio DA. Central control of body weight and appetite. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:S37-50.
402. Wyman TH, Dinarello CA, Banerjee A, Gamboni-Robertson F, Hiester AA, England KM, Kelher M, Silliman CC. Physiological levels of interleukin-18 stimulate multiple neutrophil functions through p38 MAP kinase activation. *J Leukoc Biol.* 2002 Aug;72(2):401-9.
403. Yang Q, Graham TE, Mody N, Preitner F, Peroni OD, Zabolotny JM, Kotani K, Quadro L, Kahn BB. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 2005; 436:356-362.
404. Yan, S. F. et al. The biology of RAGE and its ligands: uncovering mechanisms at the heart of diabetes and its complications. *Curr. Diab. Rep.* 7, 146-153 (2007).
405. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. The rage axis: a fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature. *Circ Res* 2010;106:842 - 853.
406. Yang Y, Xiao M, Mao Y, Li H, Zhao S, Gu Y, Wang R, Yu J, Zhang X, Irwin DM, Niu G, Tan H. Resistin and insulin resistance in hepatocytes: resistin disturbs glycogen metabolism at the protein level. *Biomed Pharmacother* 2009; 63:366-374
407. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 2001; 7:941-946.
408. Yamagami H, Kitagawa K, Hoshi T, Furukado S, Hougaku H, Nagai Y, et al: Associations of serum IL-18 levels with carotid intima-media thickness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005, 25:1458-1462.
409. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozaawa N, Hioki K, Uchida S, Ito Y, Takakuwa K, Matsui J,

- Takata M, Eto K, Terauchi Y, Komeda K, Tsunoda M, Murakami K, Ohnishi Y, Naitoh T, Yamamura K, Ueyama Y, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T. Globular adiponectin protected ob/ob mice from diabetes and ApoE-deficient mice from atherosclerosis. *J Biol Chem* 2003; 278:2461-2468.
410. Yamauchi T, Nio Y, Maki T, Kobayashi M, Takazawa T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kawamoto S, Kubota N, Kubota T, Ito Y, Kamon J, Tsuchida A, Kumagai K, Kozono H, Hada Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Awazawa M, Takamoto I, Froguel P, Hara K, Tobe K, Nagai R, Ueki K, Kadowaki T. Targeted disruption of AdipoR1 and AdipoR2 causes abrogation of adiponectin binding and metabolic actions. *Nat Med*. 2007 Mar;13(3):332-9.
411. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey Jr DE, Drazner MH, et al. 2013 ACCF/ AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation* 2013;128:e240-327.
412. Yki-Jarvinen H. Ectopic fat accumulation: an important cause of insulin resistance in humans. *J R Soc Med* 2002; 95 Suppl 42:39-45.
413. Yu CM, Cheung BM, Leung R, Wang Q, Lai WH, Lau CP. Increase in plasma adrenomedullin in patients with heart failure characterised by diastolic dysfunction. *Heart* 2001;86:155-60.
414. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Bonora E, Shah A, Willeit J, Mayr M. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial mir-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res* 2010;107:810 - 817.
415. Zhang H, Dellsperger KC, Zhang C. The link between metabolic abnormalities and endothelial dysfunction in type 2 diabetes: an update. *Basic Res Cardiol* 2012;107: 237.
416. Zheng Z, Chen H, Li J, Li T, Zheng B, Zheng Y, Jin H, He Y, Gu Q, Xu X. Sirtuin 1- mediated cellular metabolic memory of high glucose via the Ikb1/ampk/ros pathway and therapeutic effects of metformin. *Diabetes* 2012;61:217 - 228.
417. Zhou S, Chen HZ, Wan YZ, Zhang QJ, Wei YS, Huang S, Liu JJ, Lu YB, Zhang ZQ, Yang RF, Zhang R, Cai H, Liu DP, Liang CC. Repression of p66shc expression by SIRT1 contributes to the prevention of hyperglycemia-induced endothelial dysfunction. *Circ Res* 2011;109:639 - 648.
418. Zirlik A, Abdullah SM, Gerdes N, MacFarlane L, Schonbeck U, Khera A, et al: Interleukin-18, the metabolic syndrome, and subclinical atherosclerosis: results from the Dallas Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007, 27:2043-2049.
419. Zong, W. X., Ditsworth, D., Bauer, D. E., Wang, Z. Q. & Thompson, C. B. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. *Genes Dev*. 18, 1272-1282(2004).
420. Zong, W. X. & Thompson, C. B. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev*. 20, 1-15 (2006).