

Expertos Invitados

ESTADO ACTUAL DE LA AFERESIS DE LIPOPROTEINAS DE BAJA DENSIDAD



Autor:
Claudio Stefanutti
Columnista Experto de SIIC

Institucion:
Universit  "La Sapienza", Roma, Italia

Antecedentes

Las principales indicaciones terapéuticas para el tratamiento con aféresis de lipoproteínas de baja densidad (LDL) son la hipercolesterolemia familiar (HF) homocigota, doble heterocigota (compuesta) y heterocigota. No obstante, no debe excluirse la posibilidad de tratar otras formas graves de hiperlipoproteinemias, como la debida a exceso de Lp(a), la hiperlipoproteinemia familiar combinada y otras formas asociadas con un elevado riesgo cardiovascular, especialmente las que son resistentes al tratamiento farmacológico con tipos y dosis adecuadas de drogas hipocolesterolemiantes. La aféresis de LDL es una técnica extracorpórea que permite la remoción selectiva de lipoproteínas de baja densidad. La técnica representa una variación selectiva (con mayores ventajas metabólicas y clínicas) que la plasmaféresis terapéutica convencional identificable con intercambio plasmático (IP), la cual ya se utiliza en el tratamiento de otras enfermedades. La posibilidad de una presentación temprana de un evento coronario en los individuos afectados de HF demanda una estrategia intensiva y altamente eficaz. El tratamiento farmacológico no arroja resultados adecuados en la forma homocigota de la enfermedad y en aproximadamente el 20% de las formas heterocigotas. Precisamente en estos casos la aféresis de LDL constituye la estrategia terapéutica necesaria. Otro posible campo para la aplicación de la aféresis de LDL es la prevención secundaria de recaídas de eventos coronarios isquémicos y reestenosis arterial luego de la cirugía de revascularización coronaria (bypass) y la angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP). La plasmaféresis terapéutica fue introducida para el tratamiento de la HF homocigota grave por De Gennes y colaboradores en 1965, usando un separador de células de flujo discontinuo. Posteriormente, Thompson y colaboradores utilizaron IP para tratar a pacientes afectados de HF homocigota. Estamos en deuda con Lupien y colaboradores, quienes 2 años después introdujeron una técnica para remover LDL en forma más selectiva. La metodología afer tica utilizada por estos investigadores se basaba en el principio cromatográfico y, sin ninguna duda, tenía varias ventajas respecto del IP convencional. Su mayor selectividad permitía, por ejemplo, una reducción insignificante de los niveles plasmáticos de colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (HDL), el cual correlaciona en forma inversa con el riesgo de enfermedad coronaria. En los años 80 se desarrollaron técnicas de aféresis de LDL cada vez más selectivas. Por ejemplo, Stoffel y colaboradores realizaron estudios experimentales sobre el uso de una técnica de aféresis que permitía la remoción de LDL con anticuerpos contra apoB acoplados a sepharosa.

Técnicas de aféresis de LDL

La selectividad de la aféresis de LDL se incrementó aún más con la introducción de 2 nuevas técnicas: la aféresis con sulfato de dextrán sobre celulosa y el sistema HELP (siglas de *heparin mediated extracorporeal LDL precipitation*, precipitación extracorpórea de LDL mediada por heparina). El primero se basa en la remoción selectiva de LDL del plasma mediante la adsorción con una unión no covalente entre el dextrán y la apoB100 del plasma. El otro sistema permite la remoción de LDL plasmática por la precipitación en medio ácido con heparina y sin cationes ácidos. El método más reciente de aféresis de LDL es una técnica de hemoperfusión llamada DALI (siglas de *direct adsorption of lipids*, adsorción directa de lípidos). Este sistema de aféresis es muy innovador respecto de sus predecesores en cuanto a que no es necesaria una separación preliminar del plasma, ya que la LDL puede ser removida a partir de sangre entera. En la tabla 1 se brinda un historial de la evolución de la tecnología de plasmaféresis para el tratamiento de la HF.

TABLA 1. Historia de la eliminación extracorpórea inespecífica o selectiva de LDL.

1967	De Gennes JL	intercambio plasmático
1972	Turnberg LA	intercambio plasmático
1975	Thompson GR	intercambio plasmático
1981	Stoffel W	adsorción inespecífica
1981	Hayashi R	filtración diferencial
1981	Kikkawa T	filtración diferencial
1983	v. Baeyer H	filtración diferencial
1984-5	Yokoyama S	adsorción diferencial
1986	Seidel S	precipitación diferencial (heparina)
1987	Antwiler GD; Dau P	precipitación diferencial (dextrán)
1993	Bosch T	Adsorción de LDL por hemoperfusión

Adaptado de Boberg, H. et al.

La remoción de lipoproteínas aterogénicas por medio de la plasmaféresis terapéutica puede ser no selectiva (inespecífica), semiselectiva, o selectiva (específica). El grado de remoción de la LDL puede ser considerado un parámetro excelente por el cual puede medirse el grado de eficiencia del sistema usado. El IP no es específico ni selectivo, ya que remueve lipoproteínas aterogénicas junto con otras proteínas esenciales del plasma. El grado de selectividad por la LDL varía entre una técnica extracorpórea y otra. Por ejemplo, la filtración en cascada se caracteriza por una baja selectividad, ya que remueve también inmunoglobulinas y HDL. Por el contrario, las técnicas aferéticas selectivas no remueven HDL y otras proteínas esenciales del plasma sino que se limitan a la remoción casi exclusiva de lipoproteínas que contienen apo B100: lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), LDL y Lp(a). En la tabla 2 se resumen los distintos métodos de remoción de LDL del plasma (selectivos y no selectivos). Por limitaciones de espacio no analizaremos en el texto los méritos de los mecanismos de cada técnica.

TABLA 2. **Diiferentes técnicas de aféresis de LDL.**

<ul style="list-style-type: none">• TECNICA NO SELECTIVA intercambio plasmático• TECNICAS SELECTIVAS<ul style="list-style-type: none">DOBLE ADSORCIÓN<ul style="list-style-type: none">- con heparina/agarosa- con anticuerpos anti-LDL (inmunoadsorción, inmunoaféresis de LDL)- con sulfato de dextrán sobre celulosaFILTRACIÓN EN CASCADA<ul style="list-style-type: none">- filtración en cascada- termofiltraciónDOBLE PRECIPITACIÓN<ul style="list-style-type: none">- HELP[^]<ul style="list-style-type: none">SecuraFuturaHEMOPERFUSIÓN<ul style="list-style-type: none">- DALI* (1:20)- DALI con baja dosis de citrato (1:40)
--

[^], precipitación de LDL inducida por heparina.

*, adsorción directa de lípidos.

Ventajas y desventajas de la aféresis de LDL

Las distintas técnicas extracorpóreas de remoción de LDL tienen ventajas y desventajas que pueden clasificarse como se muestra en las tablas 3 a 8. Los niveles plasmáticos de lipoproteínas, apolipoproteínas y fibrinógeno tienen distintas reducciones porcentuales según la técnica de aféresis empleada.

TABLA 3. Intercambio plasmático.

<p><u>Ventajas:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Puesta en marcha: fácil - Manejo del sistema en la sesión terapéutica: simple - Bajo costo - Reducción de fibrinógeno (\pm variable) - Experiencia: al menos 40 años <p><u>Desventajas:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - No selectivo - Reducción del colesterol ligado a HDL - Necesidad de reinfusión de albúmina o solución salina - Posible reacción anafilactoide (albúmina, citrato) - No adecuado para los niños - Centrífuga: el volumen extracorpóreo es relativamente grande

TABLA 4. Filtración en cascada.

<p><u>Ventajas:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Puesta en marcha: fácil - Manejo del sistema en la sesión terapéutica: simple - Bajo costo - Reducción de fibrinógeno (\pm variable) - Experiencia: varios años <p><u>Desventajas:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Técnica semiselectiva - Baja afinidad de adsorción de las lipoproteínas con Apo B100 - Reducción del colesterol ligado a HDL - Informes científicos: escasos

TABLA 5. Sulfato de dextrán sobre celulosa.

<p><u>Ventajas:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Alta afinidad de adsorción (selectiva) - Alta eficacia - Experiencia: varios años - Particularmente adecuado para niños <p><u>Desventajas:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Puesta en marcha: no fácil - Alto costo - Los inhibidores de la ECA están contraindicados - Reacción anafilactoide ? (infrecuente; informada con LA-40)
--

TABLA 6. HELP.

<p><u>Ventajas:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Alta afinidad de adsorción - Alta eficacia - Reducción del fibrinógeno - Experiencia: varios años <p><u>Desventajas:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Manejo del sistema durante la sesión terapéutica: no simple (con SECURA, no con la nueva versión FUTURA) - Alto costo - Necesidad de unidades de diálisis, líquidos, desinfección, etc. (para SECURA) - Necesidad de muchas bolsas de diálisis (para la nueva versión FUTURA)
--

TABLA 7. Inmunoadsorción.

<p><u>Ventajas:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Columna: reutilización (30-35 sesiones) - Alta afinidad de adsorción - Alta eficacia - Experiencia: varios años <p><u>Desventajas:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Manejo del sistema en la sesión terapéutica: no simple - Caro - Activación del Complemento ? - Es obligatorio comprobar la esterilidad en cada nueva sesión - Necesidad de conservar la columna

TABLA 8. DALI.

<p><u>Ventajas:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Puesta en marcha: fácil - Manejo del sistema durante la sesión terapéutica: simple - Acortamiento del tiempo de tratamiento - Alta afinidad de adsorción <p><u>Desventajas:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Contraindicaciones: tratamiento con inhibidores de la ECA - Contraindicaciones (?): uso pediátrico*

En la tabla 9 se resumen las variaciones porcentuales medias de lipoproteínas, apolipoproteínas aterogénicas y antiaterogénicas, y fibrinógeno. Los datos se refieren al uso de 6 técnicas diferentes de aféresis de LDL y al procesamiento de aproximadamente un volumen de plasma.

TABLA 9. Variaciones plasmáticas medias (%) de LDLc, HDLc, apolipoproteínas B y AI, Lp(a) y fibrinógeno, usando 6 diferentes técnicas de aféresis de LDL (1 volumen plasmático).

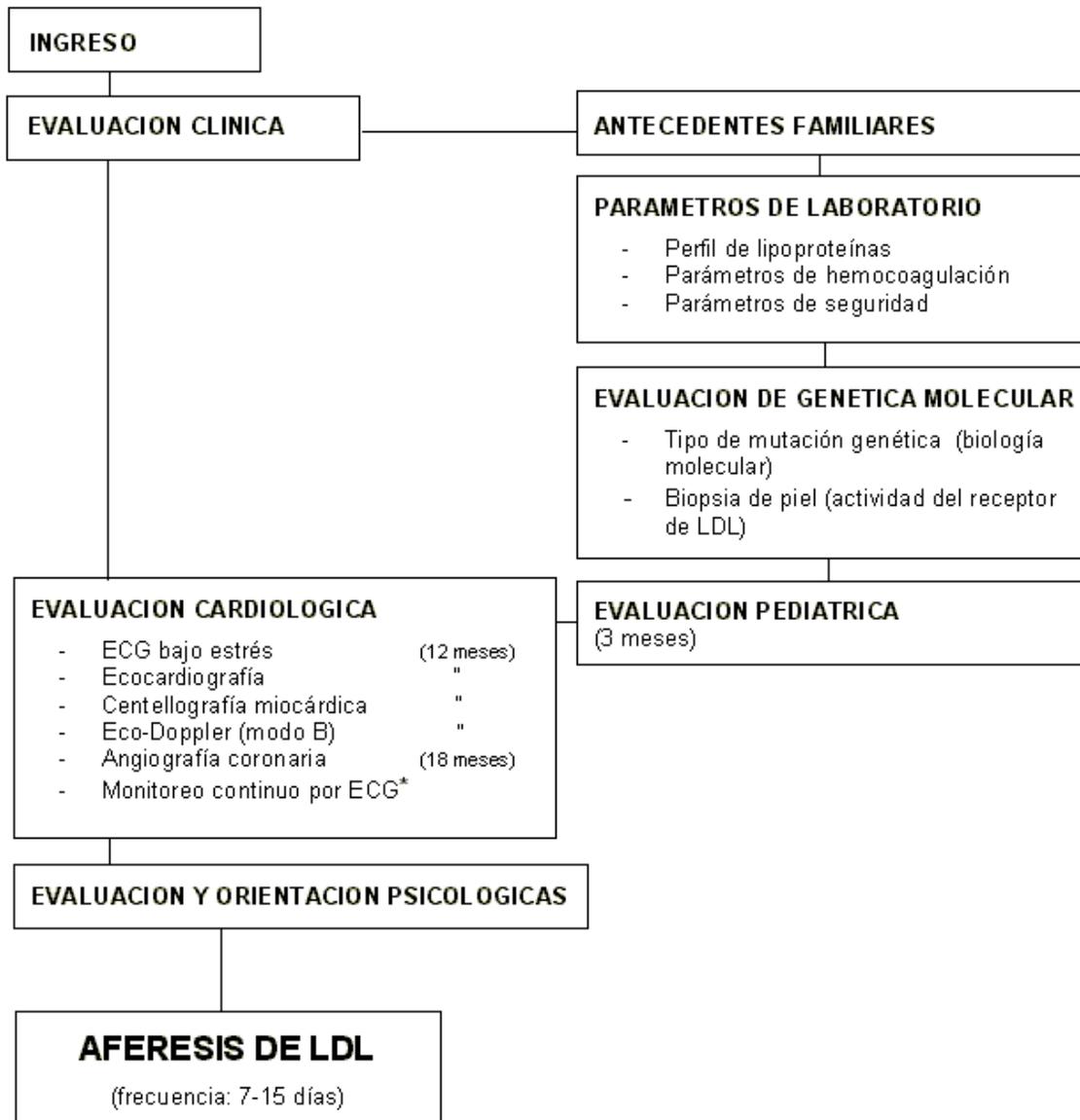
	IP	FC	DSC	HELP	IMA	DALI
LDL-C	72	65	73	69	65	50
HDL-C	65	40	10	14	22	10
APO B	69	59	62	53	56	40
APO AI	68	45	16	12	20	25
LP(a)	68	52	72	50	53	50
Fibrinógeno	58	36	16	44	23	25

IP, intercambio plasmático. **FC**, filtración en cascada. **DSC**, sulfato de dextrán sobre celulosa. **HELP**, precipitación de ldl inducida por heparina. **IMA**, Inmunoadsorción. **DALI**, hemoperfusión.

Nuestra experiencia clínica

Desde 1987 se realizaron en nuestro centro 2 827 sesiones de plasmaféresis terapéutica para la hiperlipoproteinemia grave, de las cuales 1 134 se efectuaron en pacientes pediátricos. Un total de 34 pacientes fueron sometidos a aféresis de LDL, de los cuales 11 tenían HF homocigota, 2 presentaban HF heterocigota doble, 1 tenía hiperlipoproteinemia a expensas de Lp(a), 20 presentaban HF heterocigota grave (con repuesta escasa o nula) con enfermedad coronaria establecida. Once de estos pacientes eran pediátricos, de los cuales 9 tenían HF homocigota y 2 presentaban HF heterocigota doble. Estos enfermos pediátricos constituyen el grupo más numeroso de niños afectados por HF que actualmente están recibiendo tratamiento continuo en un servicio de aféresis en Italia. Los intervalos entre tratamientos varían en promedio entre 7 y 15 días. Actualmente se encuentran en uso en nuestro servicio 8 separadores celulares diferentes. En nuestro centro, cada paciente pasa por una fase preliminar de evaluación clínica que consiste en la confección de su historia médica, el estudio de su perfil de lipoproteínas en plasma, el estudio de factores de coagulación y seguridad, una investigación de genética molecular con evaluación del tipo de mutación mediante técnicas de biología molecular, y un estudio in vitro de la actividad residual del receptor de LDL en los fibroblastos cutáneos obtenidos por biopsia de piel (figura 1).

AFERESIS DE LDL: PROTOCOLO CLINICO



En la segunda fase del procedimiento diagnóstico se realiza una evaluación cardíaca exhaustiva y, en el caso de los pacientes pediátricos, esto se combina con una evaluación pediátrica completa. Las técnicas diagnósticas invasivas y no invasivas que se emplean son el electrocardiograma en estrés, ecocardiograma, centellograma miocárdico, ecoDoppler (modo B) en carótida, aorta y arteria femoral, y angiografía coronaria. Los pacientes que tienen una condición cardiovascular crítica son monitoreados en forma continua durante el tratamiento. Estas pruebas se realizan antes de comenzar el ciclo de aféresis y también posteriormente a intervalos preestablecidos. Además, durante la inscripción de los pacientes al tratamiento está presente un psicólogo dispuesto a resolver las preguntas que aquellos deseen formular en ese momento. Los enfermos son asistidos por un psicólogo durante todo el ciclo de tratamiento. En el transcurso de su evolución tecnológica en los últimos 20 años, la aféresis de LDL ha adquirido características que permiten una remoción más específica de la LDL y de las lipoproteínas que contienen apo B100, y también una mayor versatilidad de uso que se ha hecho evidente con las técnicas más recientes. Esto ha permitido orientar la investigación hacia 2 direcciones precisas: el desarrollo y uso de sistemas capaces de una remoción cada vez

más selectiva, y la posibilidad de comenzar la terapia aferética en una etapa cada vez más temprana en los pacientes pediátricos. El paciente más joven que ha sido derivado jamás a aféresis de LDL (3.5 años) fue tratado en nuestro centro.

Discusión

Pacientes que inclusive tienen un elevado riesgo por problemas cardiovasculares han sido derivados para tratamiento extracorpóreo, con un impacto hematológico, bioquímico y clínico reducido en comparación con el drástico reemplazo plasmático obtenido con técnicas más antiguas (IP) que, no obstante, se utilizan actualmente y son válidas para el tratamiento de otras enfermedades. Con el aumento de selectividad, los sistemas se han vuelto cada vez más versátiles y seguros. Un avance tecnológico adicional ha sido la posibilidad reciente de remover LDL no de plasma sino de sangre entera (sistema DALI). Este sistema representará una innovación tecnológica significativa en caso de que se confirmen sus características de seguridad y remoción específica de LDL y Lp(a). Por el momento, la aféresis de LDL puede considerarse una forma mejor y más segura de tratamiento de la HF. Actualmente existen evidencias científicas y clínicas concretas de que la aféresis de LDL, si es correctamente administrada, es capaz de prevenir las complicaciones isquémicas en enfermedades del metabolismo lipídico determinadas genéticamente. La aféresis de LDL tiene también ventajas sobre otras 2 formas posibles de tratamiento: el trasplante hepático y la terapia génica. Los principales inconvenientes del trasplante hepático son la necesidad de inmunosupresión prolongada, la limitada disponibilidad de órganos, los problemas éticos respecto de la necesidad de dar prioridad a otras enfermedades (por ejemplo la atrofia hepática aguda), y la dificultad de convencer de la necesidad de la cirugía a pacientes con un estado de salud aparentemente bueno. Por su parte, la terapia génica debe ser sometida a nuevos estudios en animales antes de que pueda ser utilizada en forma segura y eficaz en el hombre, y convertirse en una realidad clínica. De hecho, los resultados de los estudios en curso no son concluyentes y se presume que serán necesarios años de experimentación antes que la aplicación clínica de la terapia génica sea una realidad. Una de las principales limitaciones de este método es la dificultad para introducir secuencias genéticas dentro de las células para obtener la expresión fenotípica correcta. El uso de retrovirus para introducir tales secuencias genera controversias, dado el temor de un posible riesgo oncogénico.

BIBLIOGRAFIA

1. Brown M.S., Goldstein J.L.: A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34-47, 1986.
2. Schaefer E.J., Levy R.I.: Pathogenesis and management of lipoprotein disorders. *N.Engl. J. Med.* 312: 1300, 1986.
3. Kostner G.M., Avogaro P., et al.: Lipoprotein Lp(a) and the risk for myocardial infarction. *Atherosclerosis* 33: 51-61, 1981.
4. Thompson G.R., Lowenthal R., Myant N.B.: Plasma-exchange in the management of familial hypercholesterolemia. *Lancet* 2: 1208-1211, 1975.
5. King M.E., Breslow J.L., Leers R.S.: Plasma-exchange therapy of homozygous familial hypercholesterolemia. *N.Engl. J. Med.* 26: 1457-1459, 1980.
6. Lupien P.J., Moorijani S., Awald S.: A new approach to the management of familial hypercholesterolemia: removal of plasma-cholesterol based on the principle of affinity chromatography. *Lancet* 2: 1261-1264, 1976.
7. Kottke B.A., Pineda A.a., et al.: Hypercholesterolemia and atherosclerosis: present and future therapy including LDL-apheresis. *J. Clin. Apher.* 4: 35-46, 1988.
8. De Gennes J.L., Touraine R., Maunand B.: Formes homozygotes uterino-tendineuses de xanthomatose hypercholesterolemiques dans une observation familiale exemplaire: essai de plasmapheresis a titre de traitement heroique. *Bull. Mem. So. Med. Hop. Paris* 118: 1377, 1965.
9. Homma Y., Mikami Y., Tamachi H., et al.: Comparison of selectivity of LDL-removal by double filtration and dextran-sulfate cellulose column plasmapheresis, and changes of subfractionate plasma lipoprotein after plasmapheresis in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Metabolism* 5: 419-425, 1987.
10. Mabuchi H., Michishita I., Takeda M.: A new low density lipoprotein apheresis system using two dextran sulfate cellulose columns in an automated column regenerating unit (LDL-continuous apheresis). *Atherosclerosis* 68: 19-25, 1987.

11. Seidel D., Schuff-Werner P., Armstrong V.W., et al.: Treatment of severe hypercholesterolemia by heparin induced extracorporeal LDL precipitation (HELP). *Contrib Infus. Ther.* 23: 118-126, 1988.
12. Valbonesi M., Bigi L., et al.: Cascade filtration for familial hypercholesterolemia. *Int. Artif. Organs* 14: 751-753, 1991.
13. Franceschini G., Busnach G., et al.: Apheretic treatment of severe familial hypercholesterolemia: comparison of dextran sulfate cellulose and double membrane filtration methods for low density lipoprotein removal. *Atherosclerosis* 73: 197-202, 1988.
14. Demant T., Seidel D.: Recent development in low density lipoprotein apheresis. *Curr. opin. Lipid* 3: 43-48, 1992.
15. Kroon A.A. et al.: The LDL-apheresis Atherosclerosis regression study (LAARS). Effect of aggressive versus conventional lipid lowering treatment on coronary atherosclerosis. *Circulation* 93: 1826-1835, 1996.
16. Leitinger N. et al.: Decreased susceptibility of low density lipoproteins to in vitro oxidation after dextran-sulphate LDL-apheresis treatment. *Atherosclerosis* 126: 305-312, 1996.
17. Henry P.D. et al.: Hypercholesterolemia and endothelial dysfunction. *Current Opinion in Lipidology* 6: 190-195, 1995.
18. Tamai O. et al.: Single LDL-apheresis improves endothelium-dependent vasodilatation in hypercholesterolemic humans. *Circulation* 95 (1): 76-82, 1997.
19. Bosch T., Schmidt B., et al.: Lipid apheresis by hemoperfusion: in vitro efficacy and ex vivo biocompatibility of a new low density lipoprotein adsorber compatible with human whole blood. *Artificial Organs* 17(7): 640-652, 1993.
20. Richter W.O., Jacob B.G., Ritter M.M., et al.: Three-years treatment of familial heterozygous hypercholesterolemia by extracorporeal low density lipoprotein immunoadsorption with polyclonal apolipoprotein B antibodies. *Metabolism* 42(7): 888-894, 1993.
21. Knisel W., Pfohl M., Muller M., et al.: Comparative long term experience with immunoadsorption and dextran sulfate cellulose adsorption for extracorporeal elimination of low density lipoproteins. *Clin. Invest.* 72: 660-668, 1994.
22. Wallukat G., Reinke P., Dorffel W.V., et al.: Removal of antibodies in dilated cardiomyopathy by immunoadsorption. *Intern J Cardiol.* 54: 191-195, 1996.
23. Knobl P., Derfler K., et al.: Elimination of acquired factor VII antibodies by extracorporeal antibody based immunoadsorption (Ig Therasorb). *Thrombosis and Haemostasis* 74(4): 1035-8, 1995.
24. Gruber C., Swoboda K., et al.: Reduction of Lp(a) by immunospecific LDL-apheresis. In: *Treatment of severe dyslipoproteinemia in the prevention of coronary heart disease.* 4. Gotto A.M., Mancini M., Richter W.O., Schwandt P. (Eds.). 4th Int Symp. Munich 1992, Karger, 1993, pp 219-222.
25. Bambauer R., Schiel R., et al.: Apheresis technology for prevention and regression of atherosclerosis. Clinical results with the kaneka system in Europe. XI st ISAO, U.S.A., June 29-July 1, 1997.
26. Daida H., Yamaguchi H., et al.: Clinical application and effectiveness of low density lipoprotein apheresis in the treatment of coronary artery disease. *Artif. Organs* 21(6), 1997.
27. Sato Y., Agishi T.: Low density lipoprotein adsorption for atherosclerosis patients. *Artificial Organs* 20(4): 324-327, 1996.
28. Stefanutti C., Vivencio A., et al.: Treatment of homozygous and double heterozygous familial hypercholesterolemic children with LDL-apheresis. *Int. J Art. Org.* 18(2): 103-110, 1995.
29. Stefanutti C., Vivencio A., et al.: LDL-apheresis in pediatric patients with severe hyperlipoproteinemia. *J. Clin. Apheresis*, 10: 101-102, 1995.
30. Stefanutti C., Di Giacomo S., et al.: Pediatric LDL-apheresis: clinical experience in Italy's largest sample. 1st Intern. Congress of the Group for the prevention of atherosclerosis in childhood. Budapest (H), October 13-16, Abs p.25.
31. Stefanutti C., Vivencio A., et al.: Plasmapheresis in the treatment of primary hyperlipoproteinemia with hyperchilomicronemia. *World Apheresis Association.* 6th Intern. Congress Florence (I), November 11-14. Abs. p.22.
32. Knisel W. et al.: *Proc 2nd Int. Symp. Munich 1989.* Karger, Basel, 1990, pp. 227-233.
33. Bosch T., Gurland H.J.: Biomarter *Artif. Cells Immobilization Biotechnol.* 19(1):1-18, 1991
34. Olbricht C.J.: *Nephrol. Dial. Transplant.* 8: 814-820, 1993.

35. Matsuda Y., Malchesky P.S., Nos Y.: *Artif Organs* 18(1): 93-99, 1994.
 36. Knisel W., et al.: in *Treatment of severe dyslipoproteinemia in the prevention of coronary heart disease*. 4. Gotto A.M. jr et al. (Eds): 154-157, 1993.
 37. Bosch P., et al.: *Artif Organs* 17(7): 640-652, 1993.
 38. Boberg H., Kadar J., Oette K.: *The current status of LDL-apheresis in U.E.* Nydapper (Ed.) *Therapeutic Apheresis in 1990s*. Karger, Basel, 1990: 239-248.
 39. Motulsky AG. *Current concepts in genetics. The genetic hyperlipidemias*. *N Engl J Med* 1976; 294 (15): 823-827
 40. Holme I. *Effects of lipid- lowering therapy on total and coronary mortality*. *Curr Opin Lipidol* 1995; 6: 374-378.
 41. Nash DT, Gensinis G, Esente P. *Effect of lipid-lowering therapy on the progression of coronary atherosclerosis assessed by scheduled repetitive coronary arteriography*. *Int J Cardiol* 1982; 2: 43-55.
 42. Thompson GR, Miller JP, Breslow JL. *Improved survival with homozygous familial hypercholesterolemia treated with plasma-exchange*. *Br Med J* 1985; 291: 1671-1673.
 43. Mabuchi H, Koizumi J, Shimizu M, Kajinami K, Miyamoto S, Ueda K, Takegoshi T. *Long term efficacy of LDL apheresis on coronary heart disease in familial hypercholesterolemia*. Hokuriku-FH-LDL-Apheresis Study Group. *Am J Cardiol* 1998; 82(12): 1489-1495.
 44. Kroon AA Aengevaeren WRM, van der Werf T, Uijen GJH, Reiber JHC, Brusckhe AVG, et al. *LDL- apheresis atherosclerosis regression study (LAARS). Effect of aggressive versus conventional lipid lowering treatment on coronary atherosclerosis*. *Circulation* 1998; 93: 1826-1835.
 45. Stefanutti C, Vivencio A, Colombo C, Di Giacomo S, Mazzarella B, Berni A, et al. *Treatment of homozygous and double heterozygous familial hypercholesterolemic children with LDL apheresis*. *Int J Art Organs* 1995; 18(2): 103-110.
 46. Thompson GR, Maher VMG, Matthews S, Kitano Y, Neuwirth C, Shortt MB et al. *Familial hypercholesterolemia regression study: a randomised trial of low density lipoprotein apheresis*. *The Lancet* 1995; 345: 811.
 47. *International Conference for Apheresis 1996*. April 7-10, 1996 Kyoto, Japan. *Japanese Journal of Apheresis*. Vol 15 suppl. 1996.
 48. Zwiener RJ, Uauy R, Petruska ML, Huet BA. *Low density lipoprotein apheresis as long-term treatment for children with homozygous familial hypercholesterolemia*. *J Pediatr* 1995; 126:728-735.
 49. *World Health Organization. Human genetics programme. Division of noncommunicable diseases. World Health Organization/HGN/FH/CONS/98.7. 1998. Paris, France, October 3, 1997. P. 14.*
 50. Ross G, Erickson R, Knorr D, Motulsky AG, Parkman R, Samulski J. *Gene therapy in the United States: a five-year status report*. *Hum Gene Ther* 1996; 7(14): 1781- 1790.
 51. Bilheimer DW, Goldstein JL, Grundy SM, Starzl TE, Brown MS, *Liver transplantation to provide low-density-lipoprotein receptors and lower plasma cholesterol in a child with homozygous familial hypercholesterolemia*. *N Engl J Med* 1984; 311: 1496-1500
 52. Forman MB, Baker SG, Mieny CJ, Joffe BI, Sandler MP, Mendelsohn DU et al.. *Treatment of homozygous hypercholesterolemia with portocaval shunt*. *Atherosclerosis* 1982; 41: 349-361.
 53. Keller C. *LDL-apheresis: results of longterm treatment and vascular outcome*. *Atherosclerosis* 1991; 86: 1-8
 54. Bertolini S, Lelli N., Coviello DA, Ghisellini M, Masturzo P, Tiozzo R, Elicio N, Calandra S. *A large deletion in the LDL receptor gene - the cause of familial hypercholesterolemia in three Italian families: a study that dates back to the 17th century (FH-Pavia)*. *Am J Hum Genet* 1992;51: 123-134.
 55. Stefanutti C, Notarbartolo A, Colloridi V., Nigri A, Vivencio A, Bertolini S, et al. *LDL apheresis in homozygous familial hypercholesterolemic child aged 4.5*. *Artif Organs* 1997; 21(10): 1126-1127
-

RESISTENCIA A LA INSULINA, DIABETES MELLITUS E INFLAMACIÓN: SU ASOCIACIÓN CON ENFERMEDAD VASCULAR



Autor:
Joshua Barzilay
Columnista Experto de SIIC

Institucion:
Kaiser Permanente of Georgia and Emory University School of Medicine,
Tucker, Georgia, EE.UU.

Hacia fines de la década del noventa surgió un nuevo paradigma para la comprensión de la diabetes mellitus (DM) y de la resistencia a la insulina (RI). Este modelo considera ambos estados como situaciones inflamatorias. Además, ofrece un nuevo marco para explicar la fuerte asociación de la DM y la RI con la enfermedad vascular, con lo cual se abre la posibilidad de generar nuevas opciones de tratamiento.

Esta revisión se divide en tres partes. Primero, describiré los estudios que llevan a la idea de que la DM y la RI son patologías inflamatorias. En segundo lugar analizaré como la inflamación relaciona la DM, la RI, la arteriosclerosis y la enfermedad microvascular.

Comento además, el papel de la dieta occidental como posible causa de inflamación. Por último, discuto las consecuencias de este nuevo modelo en el tratamiento de la enfermedad.

Diabetes como una enfermedad inflamatoria

En la década del ochenta se reconoció que la arteriosclerosis es un proceso inflamatorio y que el endotelio interviene en forma crucial en este estado.^{1,2} En general, el endotelio participa en forma central en la homeostasis vascular³ a través de varios mecanismos. Primero, libera factores vasodilatadores y vasoconstrictores con la finalidad de mantener el tono vascular y la fluidez de la sangre. El óxido nítrico (NO) es uno de los vasodilatadores más importantes, liberado por el endotelio. El endotelio también regula la homeostasis mediante su participación en la trombosis y fibrinólisis. Finalmente, el endotelio interviene activamente en la inflamación. Recluta glóbulos blancos en los sitios de lesión mediante la producción de moléculas de adhesión que permiten que dichas células se adhieran a su superficie y por la secreción de citoquinas. La disfunción del endotelio (DE) surge como consecuencia de un estado de desequilibrio entre estas múltiples funciones. La DE se asocia con vasoconstricción, adherencia de leucocitos, activación de plaquetas, trombosis, alteración de la coagulación e inflamación vascular. La infiltración de monocitos y macrófagos en la íntima y media origina las primeras lesiones en el proceso de la aterosclerosis. La liberación sostenida de factores de crecimiento y de marcadores de inflamación juega un papel muy importante en el desarrollo y ruptura de las placas de ateroma en coronarias.

Coincidentemente con la idea de que la aterosclerosis es un proceso inflamatorio, en la década del noventa se descubrieron otros hechos importantes. En primer lugar, se comprendió que la obesidad, especialmente la adiposidad central abdominal, se asocia con la secreción de citoquinas inflamatorias y proteínas,^{4,6} entre ellas el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la leptina, la adiponectina y la interleuquina (IL) 6.

En respuesta a niveles altos de IL-6 se estimula la expresión del gen de la proteína C reactiva (PCR). La PCR es miembro de una familia de proteínas denominadas reactantes de fase aguda, cuyos niveles aumentan en respuesta a la inflamación. En segundo lugar, se hizo evidente que los factores de la coagulación tienen participación importante en la respuesta inflamatoria^{7,8} y que dichos factores también son reactantes de fase aguda. Finalmente, la investigación experimental demostró que las citoquinas afectan la sensibilidad a la insulina. Por ejemplo, el TNF- α genera un estado de RI al reducir la autofosforilación del receptor de insulina y los transportadores GLUT-4 en las células musculares, con lo cual se compromete la captación de glucosa por estas células.⁹⁻¹³ En virtud de toda esta nueva información, fue lógico preguntarse por ese entonces si la DM también se asociaría con inflamación. La mayoría de los pacientes adultos con DM tiene sobrepeso, muchos tienen elevación de los factores de coagulación y muchos presentarán

o tienen aterosclerosis. Además, la mayor parte de los adultos con diabetes tiene, por definición, RI. John Pickup (en Londres, Reino Unido) fue el primero en evaluar la asociación entre la DM y la inflamación. Demostró que los individuos con RI tienen niveles altos de proteínas inflamatorias respecto de los sujetos sin RI. La diferencia es aún más notoria en pacientes con enfermedad cardiovascular.^{14,15} Luego de las observaciones del doctor Pickup, varios grupos de investigación expandieron los hallazgos iniciales. No tardó en demostrarse que los enfermos con IR/DM tenían alta concentración de PCR,^{16,17} del inhibidor-1 del activador de plasminógeno,^{18,19} de factor VII¹⁸ así como también mayor recuento de leucocitos^{20,21} y nivel elevado de TNF- α ^{22,23} en comparación con los enfermos sin RI/DM. Los estudios en parientes de pacientes diabéticos sin diabetes también revelaron mayor nivel de factores inflamatorios respecto de los sujetos sin parientes diabéticos.^{18,23} En forma global, estos resultados sugieren que los individuos con diabetes y con RI tienen niveles de proteínas inflamatorias en sangre por encima de lo normal.

La prueba más firme de la asociación entre DM, RI e inflamación surgió, sin embargo, a partir de estudios prospectivos. El primero de ellos, *Atherosclerosis Risk in Community Study*, en 1999,²⁴ mostró que el riesgo de DM al cabo de 7 años de seguimiento era el doble en pacientes con mayor número de leucocitos respecto de individuos con bajo recuento de glóbulos blancos. Un estudio en mujeres reveló que la incidencia de DM podía anticiparse por los niveles de PCR y de IL-6.²⁵ Por su parte, un estudio de mi autoría, en adultos de 65 años o más, demostró que la PCR predecía la incidencia de DM.²⁶ Desde entonces se publicaron otros estudios adicionales que mostraron que los niveles de marcadores inflamatorios, tales como el recuento de glóbulos blancos, PAI-1, PCR y gammaglobulinas, predicen DM.²⁷⁻³⁶ Esta relación se observa en personas jóvenes y de mayor edad, en sujetos no blancos, en americanos, europeos y mejicanos. Los hallazgos sugieren firmemente que la inflamación interviene en forma crucial en la patogénesis de la DM.

Resistencia a la insulina, diabetes mellitus, inflamación y enfermedad vascular

Una vez establecido que la RI/DM tiene un componente inflamatorio surgió el interrogante acerca del papel de la inflamación en las complicaciones de la DM y, en particular, acerca de su participación en la aparición de DE y la posibilidad de que la inflamación sea el factor de conexión entre estos estados. El primero en sugerir que esto realmente era así fue John Yudkin (Londres, Reino Unido), quien encontró niveles altos de PAI-1, un marcador de DE, en personas con DM respecto de aquellas sin DM.^{37,38} Un trabajo posterior reveló que otros marcadores de DE, como la fibronectina y el factor von Willebrand, se relacionan con mediciones de RI.³⁹ En otras palabras, la RI y los indicadores de DE aparecen agrupados.

Varios estudios posteriores evaluaron la relación entre la RI y la DE. En una investigación en adultos sanos sin DM o hipertensión, Gerald Reaven (de la Universidad de Stanford) demostró que el nivel de moléculas de adhesión solubles -un marcador de DE- está aumentado en relación directa con la RI.⁴⁰ Luego mostró que la concentración de dimetilarginina asimétrica (ADMA) -un inhibidor de la sintetasa de NO (NOS)- se correlaciona con la RI.⁴¹ La ADMA disminuye la actividad de la NOS endotelial y, en definitiva, es causa de alteración de la vasodilatación. En un trabajo con individuos de edad avanzada sin DM conocida, la mayor concentración de insulina (marcador de RI) se asoció con el nivel de la forma soluble de la molécula de adhesión intercelular.⁴²

Un mecanismo por el cual la RI puede iniciar o aumentar la DE es mediante la PCR. Cuando las partículas de colesterol asociado con lipoproteínas de baja densidad (LDLc) son opsonizadas por la PCR, son mejor captadas por los macrófagos, que se transforman en células espumosas en el espacio subendotelial.⁴³ Las partículas de LDLc aumentan las proteínas que inducen mayor producción de ADMA.⁴⁴ La PCR también estimula a los macrófagos para producir factor tisular y activar el complemento en las placas de ateroma.⁴⁵ Finalmente, la PCR aumenta la producción de moléculas de adhesión por parte de las células endoteliales, fenómeno que contribuye con la mayor adhesión de los leucocitos a las paredes de los vasos.⁴⁶

Un segundo mecanismo por el cual la RI puede ocasionar DE es a través de la liberación de ácidos grasos proinflamatorios a partir del tejido adiposo. Los individuos con RI tienen elevación sanguínea de ácidos grasos libres.⁴⁷ Estos activan la proteínquinasa C, que

inhibe la producción de la fosfatidilinositol-3-quinasa.⁴⁸ La última está involucrada en la producción de NOS.

En un tercer mecanismo intervendría la mayor producción de radicales libres. Los radicales libres, moléculas con electrones no apareados, son útiles en muchos procesos celulares que generan energía y nos protegen al atacar virus y bacterias. Cuando se producen en exceso, estos radicales libres secuestran electrones (u oxidan) y dañan las proteínas, grasas y ADN, con lo cual ocasionan lesión celular. Los radicales libres oxidan las partículas de LDLc y las tornan tóxicas para el endotelio. El endotelio es especialmente vulnerable, ya que está en contacto con la sangre y los tejidos y porque tiene contacto directo con los radicales libres circulantes. Diversos estudios muestran que las personas con RI y DM tienen radicales libres en exceso y deficiencia de antioxidantes. El grupo de Gerald Reaven estableció que los individuos no diabéticos con RI tienen mayor oxidación y que este fenómeno se relaciona con el riesgo de adquirir DM.⁴⁹

Hasta aquí he analizado la asociación de inflamación y enfermedad de grandes vasos en pacientes con RI/DM. ¿Qué pasa a nivel de la microvasculatura? Un análisis preliminar del *Cardiovascular Health Study* (aún no publicado) muestra que la microalbuminuria (MAL) -pasaje de pequeñas cantidades de proteínas en orina- se relaciona con marcadores de inflamación. En participantes con DM, un nivel alto de leucocitos se asocia con MAL. Por su parte, en pacientes sin diabetes y sin hipertensión, la MAL se asocia con la concentración de PCR. Estos hallazgos sugieren que la MAL (un estado que se asocia con mayor riesgo de enfermedad coronaria) es una situación inflamatoria, por un mecanismo incierto. Una posibilidad es que la inflamación induzca la producción de IL-6 por el endotelio que, en definitiva, conduce a cambios en la organización de la matriz extracelular del subendotelio e hiperpermeabilidad.⁵⁰

Estilo de vida: dieta y ejercicio

Hasta ahora se ha discutido la interacción entre inflamación, RI/DM y enfermedad vascular.

Sin embargo, no se analizó el origen de la inflamación. ¿Es la inflamación consecuencia de la obesidad que se asocia con RI/DM o se produce por la aterosclerosis que luego exacerba la RI? Una tercera posibilidad es que exista otro factor común a la RI/DM y la aterosclerosis.

No hay por el momento respuestas categóricas para estos interrogantes. En cualquier modelo existe una asociación bidireccional entre la RI/DM y la aterosclerosis. Sin embargo, cada vez hay más evidencia de que otro factor, común a ambos estados, también interviene de manera importante. Este factor es el estilo de vida occidental, caracterizado por escasa actividad física y una dieta con elevada cantidad de grasas y calorías.

Este estilo de vida es responsable del incremento de la circunferencia de la cintura en países en desarrollo y desarrollados y, en consecuencia, del aumento de la prevalencia de RI/DM.

Asimismo, explican el incremento en la frecuencia de enfermedad cardiovascular. Este es un tema amplio; comentaré aquellos aspectos más importantes que tienen participación decisiva en inflamación, RI y DM.

En relación con la alimentación, los individuos que consumen la dieta occidental, que incluye carnes rojas y procesadas, productos lácteos con gran cantidad de grasa, frituras y granos refinados, dulces, postres, bebidas con un elevado contenido en azúcar y otros carbohidratos que se absorben rápidamente y que tienen un elevado índice glucémico (rápidamente absorbidos y digeridos), tienen mucho más riesgo de presentar RI/DM en comparación con quienes ingieren vegetales, pescado y ave, más fibra, más proteína y carbohidratos de absorción más lenta, menos refinados y con bajo índice glucémico.

⁵¹ Una explicación para esta diferencia es que la dieta occidental se asocia con inflamación. Por ejemplo, Jarvi y colaboradores, en un estudio aleatorizado transversal en pacientes con diabetes tipo 2, compararon dietas con diferente índice glucémico (IG) durante dos períodos consecutivos de 24 días.⁵² La composición de los macronutrientes y el tipo y cantidad de fibra de la dieta fueron idénticos. Durante el estudio los

participantes llevaron libremente su estilo de vida. Las dietas sólo diferían en el IG, el cual era moderado. Luego de 24 días, la actividad del inhibidor 1 del activador del plasminógeno (PAI-1) se normalizó en los individuos que ingirieron una dieta con bajo IG pero se mantuvo sin cambios en los sujetos con un IG elevado. La concentración plasmática de glucosa e insulina descendió en 30% en los sujetos que ingirieron la dieta con un bajo IG. Otra investigación en adultos de mediana edad mostró que la alimentación con elevado IG se asocia con elevación del nivel sérico de PCR.⁵³

La prevalencia aumentada de RI/DM es paralela a los cambios en el tipo de ácidos grasos consumidos.^{54,55} El mayor consumo de ácidos grasos n-6 (como grasa de pescado, carne de caza y hojas) fue reemplazado por el consumo de aceites de semillas ricas en ácido linoleico. Las modificaciones en la ganadería y en la crianza de aves también alteró el contenido de n-6 de las proteínas animales consumidas.⁵⁶ Este desequilibrio se asocia con elevado contenido de eicosanoides derivados del ácido araquidónico (AA), como tromboxano A2 y leucotrienos, y con la producción de mediadores inflamatorios como citoquinas e interleuquinas.^{57,58}

La falta de ejercicio se asocia con mayor depósito de grasa visceral,⁵⁹ la cual se asocia con mayor producción de IL-6 y TNF- α , reguladores claves de la respuesta inflamatoria. Los luchadores japoneses son un buen ejemplo de cómo el ejercicio puede compensar los efectos dañinos de la obesidad. Los luchadores competitivos tienen la mayor parte de la grasa abdominal en forma subcutánea con relativamente poca cantidad de grasa en vísceras. Son capaces de mantener la sensibilidad a la insulina hasta que se retiran del deporte, momento en el cual comienzan a tener grandes cantidades de grasa visceral con mayor riesgo de RI/DM y de enfermedad cardiovascular.⁶⁰

Inflamación y tratamiento de la DM

Hemos visto que la inflamación se asocia con RI/DM y que interviene de manera importante en las complicaciones vasculares de la DM. ¿Cuál es la aplicación práctica de estos hechos? Aunque aún en forma precoz, la evidencia preliminar sugiere que la inhibición de la inflamación puede ser eficaz en el tratamiento de la DM y de sus complicaciones.

En modelos murinos de obesidad y de DM, se vio que la aspirina interfiere con la enzima IKK-B que fosforila la IK-B, una proteína cuya intervención es esencial en la inducción de factores proinflamatorios.⁶¹ En estos estudios se comprobó reducción en la concentración plasmática de glucosa y en la resistencia a la insulina inducida por las grasas.

En el hombre, dosis altas de aspirina (aproximadamente 7 g por día) mejoran la hiperglucemia en ayunas y posprandial en sujetos con DM.⁶² La reducción de la glucosa se acompaña de descenso del nivel de PCR.

Las tiazolidinonas (TZD), usadas para aumentar la sensibilidad a la insulina, reducen los niveles de citoquinas y la concentración intracelular del factor nuclear KB.⁶³ Se ha postulado que parte de la acción de las TZD que aumenta la sensibilidad a la insulina es a través de su acción antiinflamatoria.

Las estatinas reducen la inflamación y mejoran la función del endotelio.⁶⁴ Además, evitan la activación de monocitos a macrófagos e inhiben la producción de citoquinas, PCR y moléculas de adhesión celular. En el *West of Scotland Coronary Prevention Study* el único factor asociado con disminución en el riesgo de DM fue la asignación a tratamiento con estatinas.⁶⁵

En caso de que la dieta occidental sea responsable de parte de la inflamación que se asocia con RI/DM, su modificación conduciría a menor incidencia de RI/DM. De hecho, los estudios con grasas poliinsaturadas (PUFA) mostraron que el PUFA omega 3, especialmente presente en aceites de pescado, aumenta la producción de NO por parte del endotelio, mejora la relajación endotelial, inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias, desciende la concentración de colesterol, evita la aterosclerosis y contribuye a evitar el accidente cerebrovascular.⁶⁶ Los suplementos de omega 3 se acompañan de descenso de los marcadores de disfunción endotelial, por ejemplo vWF y antígeno tisular activador del plasminógeno.⁶⁷⁻⁶⁹ Los omega 3 también tienen propiedades antiarrítmicas y la evidencia disponible les otorga cierto papel en la

prevención secundaria de la enfermedad cardiovascular. Los aceites de pescado se asocian con mejoría significativa de la función del endotelio en pequeñas arterias periféricas en pacientes con hipercolesterolemia y DM.^{70,71} Estudios recientes mostraron que la ingesta de aceite de pescado aumenta la estabilidad de las placas de ateroma⁷² y reduce el riesgo de accidente cerebrovascular.⁷³ En virtud de estas observaciones es que las guías dietéticas de la *American Heart Association*⁷⁴ y de otras instituciones⁷⁵ recomiendan el consumo de aceite de pescado.

De manera similar, si la falta de ejercicio se acompaña de mayor inflamación, la recuperación de la actividad física se asociaría con menor nivel de marcadores inflamatorios, tal como lo demuestra la evidencia global. Las investigaciones muestran que el ejercicio (entrenamiento aeróbico y de resistencia) mejora la función endotelial^{76,77} y la sensibilidad a la insulina,⁷⁸ aumenta la lipoproteína lipasa que degrada los triglicéridos,^{79,80} reduce la tendencia a la coagulación⁸⁰ y la secreción de TNF- α y PCR,^{81,82} y disminuye la actividad aterogénica de las células mononucleares de sangre.⁸³

Si bien la evidencia es por ahora preliminar, los estudios apuntan a que las modificaciones saludables en el estilo de vida y ciertas terapias que influyen en el proceso inflamatorio pueden atenuar la RI y evitar o retrasar la aparición de DM. Es probable que, en un futuro cercano, la determinación de marcadores de inflamación se utilice como guía para el tratamiento de enfermos con RI y DM.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340: 115-26.
2. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002 ; 105:1135-43.
3. Verma S, Anderson T. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002; 105: 546 - 49.
4. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* 1999; 282:2131-35.
5. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Low-grade systemic inflammation in overweight children. *Pediatrics* 2001; 107: E13.
6. Ford ES. Body mass index, diabetes, and C-reactive protein among U.S. adults. *Diabetes Care* 1999; 22: 1971 - 77.
7. Sakkinen PA, Wahl P, Cushman M, Lewis MR, Tracy RP. Clustering of procoagulation, inflammation, and fibrinolysis variables with metabolic factors in insulin resistance syndrome. *Am J Epidemiol.* 2000; 152: 897-907.
8. van der Poll T, de Jonge E, Levi M. Regulatory role of cytokines in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost* 2001; 27: 639- 51.
9. Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 1994; 43: 1271 - 78.
10. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha and obesity induced insulin resistance. *Science* 1996; 271: 665 - 68.
11. Skolnik EY, Marcusohn J. Inhibition of insulin receptor signaling by TNF: potential role in obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7: 162 - 73.
12. Hotamisligil GS. Mechanisms of TNF-alpha-induced insulin resistance. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999; 107: 119 - 25.
13. Greenberg AS, McDaniel ML. Identifying the links between obesity, insulin resistance and beta-cell function: potential role of adipocyte-derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest* 2002; 32, Suppl 3: 24-34.
14. Pickup JC, Mattock MB, Crook MA, Chusney GD, Burt D, Fitzgerald AP. Serum sialic acid concentration and coronary heart disease in NIDDM. *Diabetes Care* 1995; 18: 1100-3.
15. Pickup JC, Mattock MB, Chusney GD, Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia.* 1997 ; 40:1286 - 92.

16. Festa A, D'Agostino R Jr, Howard G, Mykkanen L, Tracy RP, Haffner SM. Chronic subclinical inflammation as part of the insulin resistance syndrome: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Circulation*. 2000; 102: 42- 47.
17. Kelly CC, Lyall H, Petrie JR, Gould GW, Connell JM, Satter N. Low grade inflammation in women with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2453 - 55.
18. Mansfield MW, Heywood DM, Grant PJ. Circulating levels of factor VII, fibrinogen, and von Willebrand factor and features of insulin resistance in first-degree relatives of patients with NIDDM. *Circulation*. 1996; 94: 2171-76.
19. Herlihy OM, Barrow BA, Grant PJ, Levy JC. Hyperglycaemic siblings of type II (non-insulin-dependent) diabetic patients have increased PAI-1, central obesity and insulin resistance compared with their paired normoglycaemic siblings. *Diabetologia* 2002 ; 45: 635 - 41.
20. Nakanishi N, Suzuki K, Tatara K. White blood cell count and clustered features of metabolic syndrome in Japanese male office workers. *Occup Med (Lond)* 2002; 52: 213- 18.
21. Nakanishi N, Sato M, Shirai K, et al. Associations between white blood cell count and features of the metabolic syndrome in Japanese male office workers. *Ind Health* 2002; 40: 273 - 77.
22. Gonzalez F, Thusu K, Abdel-Rahman E, Prabhala A, Tomani M, Dandona P. Elevated serum levels of tumor necrosis factor alpha in normal-weight women with polycystic ovary syndrome. *Metabolism* 1999; 48: 437 - 41.
23. Nilsson J, Jovinge S, Niemann A, Reneland R, Lithell H. Relation between plasma tumor necrosis factor -alpha and insulin sensitivity in elderly men with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18: 1199 - 202.
24. Schmidt MI, Duncan BB, Sharrett AR, Lindberg G, Savage PJ, Offenbacher S, Azambuja MI, Tracy RP, Heiss G. Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities study): a cohort study. *Lancet*. 1999; 353: 1649-52.
25. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*. 2001; 286: 327-34.
26. Barzilay JI, Abraham L, Heckbert SR, Cushman M, Kuller LH, Resnick HE, Tracy RP. The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: The Cardiovascular Health Study. *Diabetes*. 2001; 50: 2384 - 89.
27. Vozarova B, Weyer C, Lindsay RS, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA. High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002; 51: 455-61.
- 28.
- 29.
30. Lindsay RS, Krakoff J, Hanson RL, Bennett PH, Knowler WC. Gamma globulin levels predict type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Diabetes* 2001; 50: 1598 - 1603.
31. Festa A, D'Agostino R Jr, Tracy RP, Haffner SM. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes*. 2002; 51: 1131 - 37.
32. Duncan BB, Schmidt MI, Offenbacher S, Wu KK, Savage PJ, Heiss G. Factor VIII and other hemostasis variables are related to incident diabetes in adults. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Diabetes Care*. 1999; 22: 767-72.
33. Ford ES. Leukocyte count, erythrocyte sedimentation rate, and diabetes incidence in a national sample of US adults. *Am J Epidemiol* 2002; 155: 57-64.
34. Han TS, Sattar N, Williams K, Gonzalez-Villalpando C, Lean MEJ, Haffner SM. Prospective study of c-reactive protein in relation to the development of diabetes and metabolic syndrome in the Mexico City Diabetes Study. *Diabetes Care* 2002; 25: 2016 - 21.
35. Nakanishi N, Yoshida H, Matsuo Y, Suzuki K, Tatara K. White blood-cell count and the risk of impaired fasting glucose or type II diabetes in middle-aged Japanese men. *Diabetologia* 2002; 45: 42 - 48.
36. Freeman DJ, Norrie J, Caslake MJ, Gaw A, Ford I, Lowe GD, O'Reilly DS, Packard CJ, Sattar N. C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Diabetes*. 2002; 51 : 1596 - 600.
37. Gray RP, Yudkin JS, Patterson DL. Plasminogen activator inhibitor: a risk factor for myocardial infarction in diabetic patients. *Br Heart J* 1993; 69: 228 - 32.

38. Nagi DK, Mohamed Ali V, Jain SK, Walji S, Yudkin JS. Plasminogen activator inhibitor (PAI-1) activity is elevated in Asian and Caucasian subjects with non-insulin-dependent (type 2) diabetes but not in those with impaired glucose tolerance (IGT) or non-diabetic Asians. *Diabet Med* 1996; 13: 59 - 64.
39. Yudkin JS, Stehouwer CDA, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction. A potential role for cytokines originating from adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 972 - 78.
40. Chen N-G, Holmes M, Reaven GM. Relationship between insulin resistance, soluble adhesion molecules, and mononuclear cell binding in healthy volunteers. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3485 - 89.
41. Stuhlinger MC, Abbasi F, Chu JW, et al. Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA* 2002; 287: 1420 - 26.
42. Hak AE, Pds HA, Stehouwer CD, et al. Markers of inflammation and cellular adhesion molecules in relation to insulin resistance in nondiabetic elderly: the Rotterdam study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4398 - 4405.
43. Zwaka TP, Hambach V, Torzewski J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation* 2001; 103: 1194 - 97.
44. Ito A, Tsao PS, Adimoolan S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999; 99: 3092 - 95.
45. Penn MS, Topol EJ. Tissue factor, the emerging link between inflammation, thrombosis, and vascular remodeling. *Circ Res* 2001; 89: 1-2.
46. Pasceri V, Chang J, Willerson JT, et al. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation* 2001; 103: 2531 - 34.
47. Hennes MM, O'Shaughnessy IM, Kelly TM, et al. Insulin-resistant lipolysis in abdominally obese hypertensive individuals. *Hypertension*. 1996; 28: 120 - 26.
48. Inoguchi T, Li P, Umeda F, et al. 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 - 45.
49. Facchini FS, Humphreys MH, DoNascimento CA, Abbasi F, Reaven GM. Relation between insulin resistance and plasma concentrations of lipid hydroperoxides, carotenoids, and tocopherols. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 776 - 9.
50. Pillarsetti S. Lipoprotein modulation of subendothelial heparan sulfate proteoglycans (perlecan) and atherogenicity. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10: 60 - 65.
51. van Dam RM, Rimm EB, Willett WC, Stampfer MJ, Hu FB. Dietary patterns and risk for type 2 diabetes mellitus in U.S. men. *Ann Intern Med* 2002; 136: 201 - 9.
52. Jarvi A, Karlstrom B, Granfeldt Y, Bjorck I, Asp N-G, Vessby B. Improved glycemic control and lipid profile and normalized fibrinolytic activity on a low-glycemic index diet in Type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 1999; 22: 10-18.
53. Liu S, Manson JE, Buring JE, Stampfer MJ, Willett WC, Ridker PM. Relation between a diet with a high glycemic load and plasma concentrations of high-sensitivity C-reactive protein in middle-aged women. *Am J Clin Nutr* 2002; 75: 492-8.
54. Ascherio A, Willett W. Health effects of trans fatty acids. *Am J Clin Nutr* 1997; 66 (suppl): S1006 - 10.
55. Mensink RPK, Martijn. Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *N Engl J Med* 1990; 323: 439 - 45.
56. Crawford M. Fatty-acid ratios in free-living and domestic animals: possible implications for atheroma. *Lancet* 1968; 1329 - 33.
57. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids* 2001; 36: 1007 - 24.
58. Das UN. Beneficial effect(s) of n-3 fatty acids in cardiovascular diseases: but, why and how? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000; 63: 351 - 62.
59. Pouliot MC, Despres JP, Nadeau A, et al. Visceral obesity in men. A associations with glucose tolerance, plasma insulin, and lipoprotein levels. *Diabetes* 1992; 41: 826-34.
60. Ruderman N, Chisholm D, Pi-Sunyer X, Schneider S. The metabolically obese, normal-weight individual revisited. *Diabetes* 1998; 47: 699-713. Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996; 87: 13 - 20.

61. RS, Petersen KF, Mayerson AB, Randhawa PS, Inzucchi S, Shoelson SE, Shulman GI. Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. *J Clin Invest.* 2002; 109: 1321 - 6.
62. H, Garg R, Aljada A, et al. Suppression of nuclear factor-kappaB and stimulation of inhibitor kappaB by troglitazone: evidence for an anti-inflammatory effect and a potential antiatherosclerotic effect in the obese. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1306 - 12.
63. SI, Muniyappa R, Francisco R, Sowers JR. Pleiotropic effects of statins: lipid reduction and beyond. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1451 - 58.
64. Freeman DJ, Norrie J, Sattar N, et al. Pravastatin and the development of diabetes mellitus: evidence for a protective treatment effect in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Circulation* 2001; 103: 357 - 62.
65. Harper CR, Jacobson TA. The fats of life: the role of omega-3 fatty acids in the prevention of coronary heart disease. *Arch Intern Med* 2001; 161:2185-92. Johansen O, Seljeflot I, Hostmark AT, Arnesen H. The effect of supplementation with omega-3 fatty acids on soluble markers of endothelial function in patients with coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1681-6.
66. Seljeflot I, Arnesen H, Brude IR, Nenseter MS, Drevon CA, Hjerermann I. Effects of omega-3 fatty acids and/or antioxidants on endothelial cell markers. *Eur J Clin Invest* 1998; 28:629-35.
67. De Caterina R, Liao JK, Libby P. Fatty acid modulation of endothelial activation. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 213S-23S.
68. Goode GK, Garcia S, Heagerty AM. Dietary supplementation with marine fish oil improves in vitro small artery endothelial function in hypercholesterolemic patients: a double-blind placebo-controlled study. *Circulation* 1997; 96:2802-7.
69. Abe Y, El-Masri B, Kimball KT, et al. Soluble cell adhesion molecules in hypertriglyceridemia and potential significance on monocyte adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:723-31.
70. Thies F, Garry JM, Yaqoob P, et al. Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised clinical trial. *Lancet* 2003; 361: 477 - 85.
71. He K, Merchant A, Rosner BA, Stampfer MJ, Willett WC, Ascherio A. Fish consumption and risk of stroke in men. *JAMA* 2002; 288: 3130 - 36.
72. Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation* 2002; 106: 2747 - 57.
73. Hu FB, Willett WC. Optimal diets for prevention of heart disease. *JAMA* 2002; 288: 2569 - 78.
74. Maiorana A, O'Driscoll G, Cheetham C, et al. The effect of combined aerobic and resistance exercise training on vascular function in type 2 diabetes. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38:860-6.
75. Ziccardi P, Nappo F, Giugliano G, et al. Reduction of inflammatory cytokine concentrations and improvement of endothelial functions in obese women after weight loss over one year. *Circulation* 2002; 105:804-9.
76. Perseghin G, Price TB, Petersen KF, et al. Increased glucose transport-phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulin-resistant subjects. *N Engl J Med* 1996; 335:1357-62.
77. Stefanick ML, Mackey S, Sheehan M, Ellsworth N, Haskell WL, Wood PD. Effects of diet and exercise in men and postmenopausal women with low levels of HDL cholesterol and high levels of LDL cholesterol [see comments]. *N Engl J Med* 1998; 339: 12-20.
78. Buemann B, Tremblay A. Effects of exercise training on abdominal obesity and related metabolic complications. *Sports Med* 1996; 21:191-212.
79. Watts NB. Therapies to improve bone mineral density and reduce the risk of fracture: clinical trial results. *J Reprod Med* 2002; 47:82-92.
80. Adamopoulos S, Parisis J, Karatzas D, et al. Physical training modulates proinflammatory cytokines and the soluble Fas/soluble Fas ligand system in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39:653-63.
81. Smith JK, Dykes R, Douglas JE, Krishnaswamy G, Berk S. Long-term exercise and atherogenic activity of blood mononuclear cells in persons at risk of developing ischemic heart disease. *JAMA* 1999; 281: 1722-7.