MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR Y ATEROSCLEROSIS PREMATURA EN PACIENTES CON DEFICIENCIA DE HORMONA DE CRECIMIENTO DEL ADULTO

Autor: Daniel Jesús González Duarte

Director de tesis:

Alfonso Leal Cerro. Profesor del Departamento de Medicina.

Médico especialista en Endocrinología y Nutrición.

Coordinador de Investigación en la UGC de Endocrinología en el Hospital Virgen del Rocío de Sevilla.

Codirector:

Alfonso Manuel Soto Moreno. Doctor en medicina.

Médico especialista en Endocrinología y Nutrición.

Director Médico del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla.

D. Alfonso Leal Cerro, Coordinador de Investigación en la UGC de Endocrinología en el Hospital Virgen del Rocío de Sevilla, y profesor asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Sevilla, y D. Alfonso Soto Moreno, facultativo especialista del área de Endocrinología y Nutrición y Director Médico del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla,

Certifican:

Que la presente tesis doctoral, titulada **"Marcadores de riesgo cardiovascular y aterosclerosis prematura en pacientes con deficiencia de hormona de crecimiento del adulto"**, elaborada por D. Daniel J. González Duarte, ha sido realizada bajo su dirección, en la Universidad de Sevilla; estimando que se encuentra concluida y en condiciones de ser presentada para optar al grado de doctor.

Y para que conste, firman la presente autorización en Sevilla. Marzo 2010.

Fdo. Alfonso Leal Cerro

Fdo. Alfonso Soto Moreno

Fdo. Daniel J. González Duarte

AGRADECIMIENTOS

- A Alfonso Leal Cerro, mi director de tesis, por haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto.
- A Alfonso Soto Moreno, que me ha prestado su experiencia y apoyo durante estos años.
- A Ainara Madrazo, por haber estado siempre disponible para ayudarme.
- A Jesús Canueto, por sus opiniones y ayuda desinteresada en este proyecto.
- A mi esposa. Sin su dedicación e incentivo nunca hubiera alcanzado mi meta.
- A mis padres, por facilitarme siempre el camino desde que decidí iniciar mi andadura en esta larga y dura profesión.
- Al resto de mi familia y amigos, por haber estado conmigo en los momentos difíciles.

ÍNDICE

A. INTRODUCCIÓN……...8

1. HIPOPITUITARISMO……9

1.1. Definición y epidemiología……..9

1.2. Etiología…….....9

1.3. Manifestaciones clínicas……11

2. DEFICIENCIA DE GH DEL ADULTO……...12

2.1. Definición……...12

2.2. Etiología……..13

2.3. Manifestaciones clínicas……14

2.4. Diagnóstico bioquímico de la deficiencia de GH del adulto……..19

2.5. Tratamiento del déficit de GH del adulto……...22

3. MARCADORES DE ATEROSCLEROSIS PREMATURA……...25

3.1. Marcadores de estrés oxidativo……..25

3.1.1. Concepto……..25

3.1.2. Agentes oxidantes y especies de oxígeno reactivas (ROS)…….26

3.1.3. Agentes antioxidantes químicos……..28

3.1.4. Antioxidantes enzimáticos……...33

3.1.5. Peroxidación lipídica……...35

3.1.6. Oxidación y aterosclerosis……...37

3.2. Marcadores de inflamación……38

3.2.1. Proteína C-reactiva……..38

3.2.2. Factor de necrosis tumoral……...38

3.2.3. Interleukina 6……...39

3.3. Marcadores de adhesión celular…….39

3.3.1. Ligando soluble CD40…….39

3.3.2. P-Selectina……...40

3.3.3. Molécula de adhesión vascular 1…….....40

3.4. Marcadores de disfunción endotelial……..41

3.4.1. Adiponectina…….....41

3.4.2. Endotelinas……..42

3.4.3. Óxido nítrico…….....43

4. ESTUDIO DE DISFUNCIÓN VASCULAR ENDOTELIAL……45

4.1. Métodos clínicos para la evaluación de la función endotelial…….....45

4.2. Marcadores bioquímicos……46

4.3. Test de dilatación de la arteria braquial mediada por flujo……47

4.4. Estudio de arterias de resistencia subcutáneas…….....47

5. HIPOPITUITARISMO Y MORTALIDAD CARDIOVASCULAR….....49

5.1. Causas de aumento de mortalidad en el hipopituitarismo……..51

6. DEFICIENCIA DE GH Y RIESGO CARDIOVASCULAR……..53

6.1. Composición corporal de la deficiencia de GH……..53

6.2. Deficiencia de GH y alteración del metabolismo hidrocarbonado…….54

6.3. Deficiencia de GH y dislipemia……..54

6.4. Deficiencia de GH y homocisteína……56

6.5. Deficiencia de GH e hipertensión arterial……..56

6.6. Deficiencia de GH e inflamación…….....57

6.7. Deficiencia de GH y marcadores de fibrinólisis……57

6.8. Deficiencia de GH y alteraciones cardiacas…….....58

6.9. Deficiencia de GH y desarrollo de aterosclerosis……...58

B. HIPÓTESIS…….....62

C. OBJETIVOS……..65

1. OBJETIVOS PRIMARIOS……66

2. OBJETIVOS SECUNDARIOS……..66

D. METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO…….....67

1. ESTUDIO OBSERVACIONAL TRANSVERSAL CASO Y CONTROL……...68

A. Sujetos a estudio……..68

B. Determinación de marcadores bioquímicos, parámetros de control metabólico y parámetros clínicos……70

1. Marcadores bioquímicos…….....70

1.1. Marcadores de adhesión celular……70

1.2. Marcadores de estrés oxidativo……..73

1.3. Marcadores de inflamación……78

1.4. Marcadores de disfunción endotelial……..80

2. Parámetros de control metabólico (marcadores bioquímicos generales)……...82

3. Parámetros clínicos…….....89

C. Análisis estadístico……..89

2. DISEÑO DEL ESTUDIO EXPERIMENTAL……..90

A. Protocolo experimental…….....91

B. Análisis estadístico……..93

E. RESULTADOS……..94

1. MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR……....95

1.1. Parámetros clínicos…….96

1.2. Marcadores bioquímicos tradicionales……...99

1.3. Marcadores de adhesión……...102

1.4. Marcadores de inflamación……..105

1.5. Marcadores de disfunción endotelial…….....108

1.6. Marcadores de estrés oxidativo……110

2. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN VASCULAR "EX VIVO"……116

F. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES…….....120

1. MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR……122

1.1. Parámetros clínicos……...122

1.2. Marcadores bioquímicos tradicionales…….123

1.3. Marcadores de estrés oxidativo……124

1.4. Marcadores de inflamación……..129

1.5. Marcadores de adhesión vascular…….130

1.6. Marcadores de disfunción endotelial…….....131

1.7. Modelos de regresión lineal……..132

2. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN VASCULAR "EX VIVO"……134

3. CONCLUSIONES……137

G. BIBLIOGRAFÍA……138

INTRODUCCIÓN

A.INTRODUCCION

1. HIPOPITUITARISMO

1.1 Definición y epidemiología

El hipopipuitarismo se define como el síndrome clínico que se produce tras la deficiencia de producción hormonal de la glándula hipofisiaria. La causa puede ser secundaria a enfermedades que afecten a la hipófisis, hipotálamo o incluso estructuras vecinas. Cuando hablamos de panhipopitutarismo o hipopituitarismo global, nos referimos a la deficiencia completa de todas las hormonas hipofisiarias. Se define como hipopituitarismo parcial al déficit selectivo de una o varias hormonas, entre las que se incluyen la corticotropina (ACTH), hormona del crecimiento (GH), hormona estimulante del tiroides (TSH), hormona folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), prolactina (PRL) y hormona antidiurética (ADH).

Es una enfermedad rara, con una incidencia anual de aproximadamente 4.2 casos por 100.000 habitantes y prevalencia de 45.5 por 100.000, estimado por un estudio poblacional en España(1).

1.2 Etiología

El hipopituitarismo es secundario a un tumor hipofisiario o las consecuencias de su tratamiento (cirugía o radioterapia) en un 76% de los casos, a un tumor extrahipofisiario (craneofaringioma) en un 13%, de causa desconocida en un 8%, sarcoidosis un 1% o síndrome de Sheehan en aproximadamente un 0.5%. Existen causas de origen hipofisiario, hipotalámico y de origen genético (tabla 1 y 2). En los últimos años, se consideran a los traumatismos craneoencefálicos y la hemorragia subaracnoidea agentes causales de hipopituitarismo precoz y tardío, ya que existen múltiples trabajos prospectivos que demuestran su asociación(2, 3).

ENFERMEDADES HIPOFISIARIAS
Lesiones tumorales: Adenomas, Quistes, otros tumores benignos
Cirugía hipofisiaria
Radioterapia hipofisiaria
Lesiones infiltrativas. Hipofisitis linfocitaria, Hemocromatosis…
Infarto hipofisiario o síndrome de Sheehan
Apoplejía hipofisiaria
Enfermedades genéticas: mutación PIT- 1…
Síndrome de silla turca vacía

Tabla 1. Causas de hipopituitarismo de origen en la hipófisis

ENFERMEDADES HIPOTALAMICAS
Lesiones tumorales: benignas (craneofaringioma), malignas (metástasis pulmón, mama…)
Radiación del SNC y tumores nasofaríngeos
Lesiones infiltrativas: Sarcoidosis, Histiocitosis de células de Langerhans
Infecciosas: meningitis tuberculosa
Otras: Traumatismos craneoencefálicos y Hemorragia subaracnoidea

Tabla 2. Causas de hipopituitarismo de origen en el hipotálamo

1.3 Manifestaciones clínicas

La presentación clínica del hipopituitarismo se manifestará con la sintomatología y signos de la deficiencia de cada una de las hormonas hipofisiarias. Por lo tanto, la clínica será similar a la de los pacientes que presentan deficiencias primarias de las glándulas controladas por la hipófisis, aunque existen algunas excepciones. Los pacientes que presentan hipopituitarismo por tumores en la silla turca, tendrán además las manifestaciones clínicas secundarias a la compresión y daño de estructuras vecinas, como cefaleas, pérdida de visión o diplopía.

El daño de la hipófisis anterior puede ocurrir repentinamente o progresivamente, puede instaurarse de forma lenta o aguda, y puede afectar la secreción de uno, varios, o todas sus hormonas. Como consecuencia, la presentación clínica varía dependiendo de los siguientes factores:

- La rapidez con la cual la patología afecta la hipófisis: Algunas enfermedades, como la apoplejía pituitaria, se desarrollan rápidamente, causando deterioro repentino de secreción de ACTH y consecuentemente sintomatología aguda de deficiencia de hidrocortisona. Otros agentes causales, como la radioterapia en el área hipofisiaria o del hipotálamo, usualmente actúan lentamente, provocando síntomas muchos meses o incluso años más tarde.

- La severidad de la deficiencia hormonal: a modo de ejemplo, la deficiencia de ACTH severa y total puede causar sintomatología incluso en situación basal, mientras que la deficiencia parcial de ACTH sólo causa síntomas durante periodos de estrés físico.

- Afectación global de la hipófisis (panhipopituitarismo) o déficit selectivo de una o varias hormonas (hipopituitarismo parcial).

2. DEFICIENCIA DE GH DEL ADULTO

2.1 Definición

Las células somatotropas de la hipófisis anterior producen hormona de crecimiento. La secreción de hormona es estimulada por la hormona liberadora de hormona del crecimiento (GHRH) y es inhibida por la somatostatina, siendo ambas producidas por el hipotálamo. Las manifestaciones clínicas de la deficiencia de GH son variables y dependen de la edad de inicio. Los niños habitualmente presentan baja talla, mientras que los adultos habitualmente tienen un cuadro clínico complejo en el que destaca una reducción de la capacidad de ejercicio junto con un deterioro psicológico que ocasiona una pérdida de calidad de vida.

La GH facilita el crecimiento lineal regulando la secreción paracrina y autocrina del factor de crecimiento de insulina 1(IGF-1 o Somatomedina C), el cual es producido por el hígado y otros tejidos diana como el cartílago de crecimiento hipofisiario. La GH ejerce diversas acciones metabólicas, entre las que se incluyen anabólicas, lipolíticas y efectos hiperglucemiantes.

Los pacientes con DGHA tienen una salud deteriorada en relación con alteraciones de la composición corporal, por reducción en el rendimiento físico, por trastornos metabólicos acompañantes y por la disminución del bienestar psicológico y de la calidad de vida. Además, estos pacientes tienen una reducción de la esperanza de vida y un incremento de los factores de riesgo cardiovascular, como detallaremos a continuación. La experiencia acumulada en los últimos 20 años del beneficio del tratamiento hormonal sustitutivo ha influido que en la mayoría de los países de mundo esté aprobado su uso en pacientes con DGHA. Concretamente en España, está comercializado su uso y aprobado por el ministerio de sanidad desde el año 1998, previa aceptación de los comités asesores correspondientes a cada comunidad.

2.2 Etiología

Las causas de la deficiencia de GH son en general las mismas que son responsables del hipopituitarismo y que pasamos a enumerar a continuación de forma detallada en tablas 3 y 4.

CAUSAS CONGENITAS
GENETICAS
Defectos de factores de transcripción(PIT-1, PROP-1, LHX3/4, HESX-1, PITX-2)
Defectos del receptor de GHRH
Defectos del gen del receptor de secretagogos GH
Defectos del gen de GH
Defectos del receptor y postreceptor de GH
Síndrome de Prader-Willy
ASOCIADO A DEFECTOS ESTRUCTURALES CEREBRALES
Agenesia del cuerpo calloso
Displasia septo-óptica
Síndrome de silla turca vacía
Holoprosencefalia
Encefalocele
Hidrocefalia
Quistes aracnoideos
ASOCIADO A DEFECTOS FACIALES DE LA LINEA MEDIA
Incisivo central único
Labio leporino

Tabla 3. Causas congénitas de DGH

ADQUIRIDOS
TRAUMA
Perinatal
Postnatal
INFECCION DEL SNC
TUMORES DEL HIPOTALAMO O HIPOFISIS
Adenoma de hipófisis
Craneofaringioma
Quiste de la bolsa de Rathke
Glioma/Astrocitoma
Germinoma
Metastásico
Otros
ENFERMEDADES GRANULOMATOSAS/INFILTRATIVAS
Histiocitosis de células de Langerhans
Sarcoidosis
Tuberculosis
Hipofisitis
Otras
RADIOTERAPIA CRANEAL
CIRUGIA
TRAUMATISMO CRANEOENCEFALICO
HEMORRAGIA SUBARACNOIDEA
IDIOPATICA

Tabla 4. Causas adquiridas de DGH

2.3 Manifestaciones clínicas

Mientras que en los niños la deficiencia de GH produce baja talla, en el adulto hay una sintomatología variada y en ocasiones inespecífica, pero que ocurren con una frecuencia mucho mayor que en la población general. Existen anormalidades que incluyen alteraciones en la composición corporal, del perfil lipídico, mayor frecuencia de enfermedad cardiovascular, anomalías de la densidad ósea, alteraciones de la función cognitiva y mayor morbimortalidad en general (ver tabla 5).

CLINICA
ALTERACIONES DE LA COMPOSICION CORPORAL
Aumento de masa grasa y disminución de masa magra
Distribución anómala de la gras corporal(aumento índice cintura/cadera)
Disminución del agua corporal total
Disminución de masa ósea y aumento del riesgo de fracturas
ALTERACIONES DE LA CALIDAD DE VIDA
Disminución de la energía y dinamismo
Baja autoestima y aislamiento social
Disminución de la capacidad de concentración
REDUCCION DE LA CAPACIDAD DE EJERCICIO
Disminución de la duración del ejercicio físico
Reducción de masa muscular que condiciona disminución de la captación máxima O2
Trastornos de la función cardíaca
FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR
Alteraciones de la estructura y función cardíaca
Alteraciones del perfil lipídico
Aumento de la masa grasa
Obesidad abdominal y resistencia a la insulina
Aumento del grosor la íntima-media de la carótida
Aumento del fibrinógeno y el PAI-1
Aumento de PCR, IL-6 y homocisteína

Tabla 5. Manifestaciones clínicas de DGHA

En la tabla 6, podemos ver los efectos del tratamiento sobre las distintas manifestaciones clínicas.

Composición corporal

La mejora en la composición corporal es probablemente el mejor efecto documentado de la hormona del crecimiento en el tratamiento de adultos con hipopituitarismo. Los estudios que utilizan diferentes técnicas indican que la masa corporal magra se reduce y aumenta la masa grasa en adultos no tratados que son deficientes en GH en comparación con los que tiene una secreción normal de GH.

Perfil lipídico

En general, existe una dislipemia mixta consistente en hipertrigliceridemia con disminución de HDL-c y aumento moderado de LDL-c. Se describirá con más detalle en el capítulo de riesgo cardiovascular.

Función cardiovascular

Aunque existen datos algo inconsistentes, existe una cierta evidencia de que los pacientes con DGHA tienen una disminución del tamaño cardíaco en probable relación con menor masa ventricular izquierda, menor respuesta y tolerancia el ejercicio, aumento del grosor de la íntima-media carotídea, aumento de marcadores de inflamación como pueden ser la proteína C reactiva(PCR) o interleukina-6(IL-6) y homocisteína. Estos marcadores pueden influir en el mecanismo productor de la aterosclerosis. Se comentará más ampliamente en otros capítulos.

Densidad mineral ósea

La densidad mineral ósea (DMO) de la columna lumbar es suele ser menor en pacientes con DGHA que en sujetos normales. El grado de osteopenia parece ser más severo a mayor deficiencia de GH, es decir, existe una correlación lineal y directa entre ambas.

La DMO en pacientes con DGHA es aproximadamente 1DS por debajo de la media, incluso cuando los efectos del hipogonadismo o el exceso de corticoides han sido eliminados como posibles factores de confusión. Sobre un 20% de pacientes con déficit de GH(DGH) de inicio en el adulto y un 35% de los pacientes DGHA de inicio en la niñez, tiene DMO con T-scores inferior a -2.5, es decir, con diagnóstico densitométrico de osteoporosis. Parece ser que la edad de inicio del DGH es un factor determinante del grado de osteoporosis, de tal manera que los pacientes menores a 30 años tienen el grado de osteopenia más severo. Los pacientes entre 30 y 45 años tienen un grado de osteopenia intermedio. En mayores de 60 años, no hay diferencias significativas entre los deficitarios y controles(4).

EFECTOS DEMOSTRADOS DEL TRATAMIENTO
COMPOSICION CORPORAL
Disminución del índice cintura/cadera
Incremento del agua corporal
Aumento de la masa ósea
CALIDAD DE VIDA
Aumento de la energía y humor
Mejora de la autoestima y el aislamiento social
Aumento de la vitalidad y movilidad física
CAPACIDAD DE EJERCICIO
Aumento de la capacidad del ejercicio
Aumento de masa muscular y captación máxima de O2
Aumento de potencia máxima muscular
FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR
Aumento de los volúmenes sistólico y diastólico, y de la masa del VI
Mejora del perfil lipídico
Disminución de la PCR, IL-6 y homocisteína

Tabla 6. Efectos del tratamiento con GH en DGHA.

En estudios histológicos de biopsias de cresta ilíaca, los pacientes con DGH muestras un incremento en el volumen de hueso trabecular, aumento de la resorción ósea, incremento de el grosor de la sustancia osteoide, todo lo que sugiere una mineralización defectuosa. Las tasas de fracturas son entre 2 y 5 veces más elevadas que las descritas en sujetos sin DGH. Los niveles de los marcadores de formación y resorción ósea en sangre y urinarios son variables, por lo que no se utilizan en la práctica clínica rutinaria.

El tratamiento con GH tiene efectos anabólicos sobre el hueso, pero a veces los resultados son complejos y bifásicos. La GH estimula ambas formación y resorción ósea. En general, tras menos de 12 meses de tratamiento con GH, la DMO medida por DXA puede no incrementar, sino que incluso podría descender. Sin embargo, tras 18-24 meses de tratamiento, la mayoría de de estudios muestran un incremento del 4-10% de la DMO (generalmente medido por DXA), con mayores efectos beneficiosos sobre la zona vertebral. Los pacientes con Z scores inferiores a -2 obtenían la mejor respuesta al tratamiento. Es característico en la mayoría de estudios una respuesta mayor a GH en hombres que en mujeres. Existe un trabajo que sugiere que la adición de un bifosfonato al tratamiento con GH, puede resultar en una respuesta todavía mayor sobre el grado de osteopenia y además tiene beneficios sobre el riesgo de fractura(5).

Calidad de vida

Los pacientes con DGHA habitualmente perciben una sensación de malestar general que refieren como si se tratara de una pérdida en la calidad de su salud, junto con una pérdida importante de de energía para realizar actividades cotidianas. Normalmente la calidad de vida se asesora mediante cuestionarios administrados individualmente que reflejan una variedad de ítems relacionados con factores de salud, económicos y sociales. Actualmente existen unos cuestionarios específicamente diseñados para la enfermedad y que han sido ya validados, como puede ser el cuestionario de calidad de

vida de la ADGA, vigente en las comisiones asesoras de GH en nuestro país. De todas formas, existe una gran variabilidad interindividual en la respuesta, de manera que algunos pacientes que no reciben tratamiento con GH refieren una repercusión severa en su calidad de vida, mientras que otros manifiestan una calidad de vida normal. En particular, los pacientes con DGHA de inicio en la niñez raramente tiene afectada su calidad de vida de forma significativa(6). El área de la calidad de vida mayormente afectada por la deficiencia de GH es la energía la vitalidad, como hemos comentado anteriormente. Algunos estudios muestran un beneficio definitivo con el tratamiento con GH, mientras que en otros la mejoría fue más limitada o incluso nula(7, 8). En general, el grado de mejoría de la calidad de vida es proporcional al grado de desviación de la normalidad del paciente, aunque no hay correlación entre el grado de normalización de IGF-I. En la práctica clínica, si la calidad de vida del paciente es normal previamente al tratamiento, poco o ninguna mejoría debemos esperar con el tratamiento hormonal. Normalmente la mejoría de la calidad de vida se produce en los 3 primeros meses de tratamiento con GH.

Mortalidad

Los pacientes que desarrollan hipopituitarismo en la edad adulta tienen una reducción de la esperanza de vida en relación con sujetos sin déficit apareados por edad y sexo. Estas diferencias siguen manteniéndose a pesar de sustituir hormonalmente los déficits de hormonas tiroideas, adrenales y gonadales. Existe evidencia clínica y experimental que el eje hormonal somatotropo (GH e IGH-I), y concretamente su deficiencia, está implicado en la mayor morbimortalidad cardiovascular de los pacientes con hipopituitarismo. Profundizaremos sobre este apartado más adelante.

2.4 Diagnóstico Bioquímico de la Deficiencia de GH del adulto (DGHA)

Ante un paciente adulto con sospecha de hipopituitarismo por las causas citadas previamente en las tablas 3 y 4, debemos descartar la deficiencia de GH. En general, se consideran pacientes candidatos al tratamiento con GH a los siguientes:

1.- Pacientes adultos con **deficiencia grave de hormona de crecimiento (GH) causada por una enfermedad hipotálamo-hipofisaria.**

2.- Pacientes **diagnosticados en la infancia de deficiencia aislada de GH de origen hipotálamo-hipofisario.** Estos casos deberán ser **reevaluados** y su deficiencia de GH confirmada en la edad transicional ó adulta.

3.- Pacientes diagnosticados en la infancia de **déficit de GH por mutación de factor de transcripción** (Pit-1, PROP-1, HESX-1, LHX3, LHX-4), ó déficit aislado de GH por **mutación del gen** (GH-1, GHRH-R). Estos casos **no precisan reevaluación**.

4.- Pacientes diagnosticados durante la infancia de **deficiencia de GH de origen hipotálamo-hipofisario asociada a deficiencia de alguna otra hormona hipofisaria**. Estos casos **no necesitarán ser reevaluados**.

5.- Pacientes que hayan sufrido un **Traumatismo Cráneo-Encefálico ó Hemorragia Subaracnoidea**. Dado que el eje somatotropo puede recuperarse tras un TCE, en estos pacientes el test de estímulo no deberá realizarse antes de transcurridos **al menos 12 meses tras el traumatismo**.

Los pacientes en **edad de transición** (es decir, aquellos que alcanzan la edad adulta habiendo sido tratados durante la infancia con GH) deben ser reevaluados, salvo los mencionados casos de deficiencias hormonales hipofisarias múltiples, los portadores de mutaciones del gen ó del factor de transcripción. Para la reevaluación, es necesario esperar al menos 1 mes tras la retirada del tratamiento con GH exógena.

No se consideran candidatos al tratamiento con GH en la edad adulta, aquellos pacientes no deficitarios de GH con indicaciones de tratamiento exclusivamente pediátricas (es decir, Síndrome de Turner, Síndrome de Prader-Willi y Pequeños para Edad Gestacional). En estos pacientes no se han demostrado beneficios del tratamiento con GH en la edad adulta, y por tanto no deben ser evaluados mediante test bioquímicos.

El diagnóstico se realiza con la determinación de GH sérica tras pruebas de estímulo farmacológicas que citaremos a continuación (tabla 7). La determinación de la somatomedina C o IGF-1 puede ser de ayuda sobre todo cuando es sus niveles son bajos, pero un valor normal no descarta la deficiencia. La determinación de IGF-1 debería interpretarse en función de valores de referencia ajustados a la edad y el sexo, y también según el método empleado para su determinación. Tampoco es útil la determinación aislada de la proteína transportadora de factor de crecimiento tipo 3(IGFBP-3), dado que tiene un alto porcentaje de falsos negativos Para realizar una prueba de estímulo, el paciente debe estar sustituido des resto de las deficiencias hormonales.

PRUEBAS DE ESTIMULO PARA DGHA
***Hipoglucemia insulínica*: prueba gold standard, bien validada en adulto.** **CI en ancianos, cardiopatía isquémica y epilepsia**
GHRH + Arginina
GHRH + GHRP6
Test de Glucagón: si CI de hipoglucemia insulínica o no disponemos de GHRH o GHRP6
No recomendados: L-DOPA, Arginina ni clonidina (salvo adolescentes no obesos)

Tabla 7. Estímulos farmacológicos para GH

La deficiencia **parcial** de GH en adultos no es una entidad clínica claramente definida, y por tanto no se recomienda el tratamiento con GH en aquellos pacientes que no cumplen estrictamente los criterios de deficiencia grave de GH. En los pacientes que presenten resultados poco concluyentes, se debe realizar seguimiento clínico y reevaluar posteriormente. Por tanto, en la actualidad, sólo se preconiza el tratamiento con GH exógena en la deficiencia **grave** de GH, la cual se define en función de unos puntos de corte a las pruebas de estímulo que citaremos a continuación.

Como ya hemos comentado anteriormente, es necesario realizar una prueba de estímulo farmacológico de GH y se determinará IGF-1. La normalidad de IGF-1 no descarta deficiencia de GH, como tampoco un valor bajo de IGF-1 de forma aislada es adecuado para el diagnóstico de DGHA. Una excepción a esta regla serían los pacientes que presenten 3 ó más deficiencias hormonales hipofisarias junto con un valor de IGF-1 por debajo de rango de referencia. Se considera que estos presentan una altísima probabilidad de padecer un déficit asociado de GH y no precisan ser evaluados mediante test de estímulo.

El punto de corte para valorar la deficiencia de GH como grave varía según el test de estímulo empleado:

- Para hipoglucemia insulínica y test de Glucagón, se considerará que existe deficiencia grave de GH cuando el máximo valor de GH sea inferior a 3 ng/ml.
- Si se utilizase como estímulo GHRP6+GHRH, el máximo valor de GH deberá ser igual o inferior a 15 ng/ml
- En el caso de utilización de GHRH+Arginina, se deberá ajustar la respuesta al IMC del sujeto.

- IMC < 25 kg/m², pico de GH < 11 ng/ml
- IMC 25-30 kg/m², pico de GH < 8 ng/ml
- IMC > 30 kg/m², pico de GH < 4 ng/ml.

En caso de utilización del test de hipoglucemia insulínica en pacientes en edad de transición, se considerará sugerente de deficiencia grave un pico de GH inferior a 6 ng/ml. El test de Arginina puede ser de utilidad, pero dado que la respuesta es muy dependiente del IMC, se deberá reservar únicamente para adolescentes no obesos.

Dada la heterogeneidad de los métodos de determinación de GH, se preconiza la adopción de un estándar internacional, en concreto el uso de calibrador de GH recombinante de 22 kDa (IRP 98/574)(9).

2.5 Tratamiento del Déficit de GH del adulto (DGHA)

Las evidencias actuales demuestran que el tratamiento con GH en adultos debería ser contemplado como cualquier otra terapia hormonal sustitutiva, sin ninguna limitación basada en la edad del paciente. Existen **contraindicaciones al tratamiento** que se citan a continuación:

- Enfermedad tumoral hipotálamo-hipofisaria no controlada
- Enfermedad maligna activa
- Hipertensión intracraneal
- Retinopatía diabética proliferativa o preproliferativa
- Hipersensibilidad a la GH o alguno de los excipientes del preparado
- Suspender tratamiento con GH a partir del 2º trimestre de la gestación, por la producción por la propia placenta

Los **efectos secundarios** más frecuentes del tratamiento son edema periférico, artralgias, síndrome del túnel del carpo, parestesias y alteraciones leves de la tolerancia a la glucosa, sin asociarse a aumento de incidencia de diabetes mellitus (DM) tipo 1 o 2. Se ha descrito en algún caso edema macular o aparición de retinopatía proliferativa sin DM, aunque esta complicación es extremadamente rara. Por otro lado, no existe ninguna evidencia de recurrencia de tumores hipotálamo-hipofisarios tras administración de GH exógena, ni tampoco de aparición una neoplasia de "novo" o recurrencia de la misma.

En general si aparecen trastornos leves, como artralgias o retención hídrica, se recomienda reducir la dosis a la mitad o incluso la suspensión del tratamiento si persisten, aunque la mayoría suelen ser leves y transitorios. Si se desarrollara una DM, se trataría como cualquier paciente con la enfermedad, sin necesidad de interrumpir el tratamiento.

Las **dosis de GH** recomendadas varían con la edad, el sexo y vía de administración de tratamiento estrogénico (oral o tópico):

- Dosis de inicio en varones: 0.2mg/día
- Dosis de inicio en mujeres: 0.3mg/día
- Dosis de inicio en ancianos: 0.1mg/día
- Dosis de mantenimiento: no superior a 1mg/día

En general, se recomienda ajustar mensualmente y después espaciar, en función de clínica y niveles de IGF-1, que deberían mantenerse en el rango de normalidad para su edad.

La **eficacia del tratamiento** debe ser valorada mediante los siguientes parámetros.

- Composición corporal: talla, peso, IMC y/o impedanciometría (si disponible)

- Marcadores de riesgo vascular: presión arterial(PA), perímetro de cintura, perfiles lipídicos y glucemia
- Niveles de IGF-1
- Densidad mineral ósea(DXA) al inicio y cada 2 años
- Cuestionario de calidad de vida

3. MARCADORES DE ATEROSCLEROSIS PREMATURA

En la actualidad el estudio del riesgo cardiovascular en relación a marcadores bioquímicos se realiza utilizando el análisis de perfil lipídico, proteína C-reactiva, ácidos grasos libres, entre otros parámetros. Sin embargo, existen marcadores actuales con una alta sensibilidad que permiten evaluar el daño vascular desde distintas perspectivas, como pueden ser el estado prooxidante, la inflamación, el daño endotelial o la aterogénesis. En base a esto utilizaremos marcadores de estrés oxidativo, marcadores de inflamación, marcadores de disfunción endotelial y marcadores de adhesión vascular.

3.1 Marcadores de estrés oxidativo

3.1.1 *Concepto*

Los principales agentes oxidantes son los radicales libres, generados por la utilización del oxígeno en las células. Se define como radical libre a cualquier molécula o átomo que contenga uno o más electrones desapareados en su orbital más externo, derivados del oxígeno molecular (*reactive oxygen species* – ROS).

En condiciones fisiológicas existe un balance equilibrado entre la formación de ROS y los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. El estrés oxidativo es un conjunto de procesos deletéreos derivados del desequilibrio entre la formación aumentada de ROS y/o la capacidad antioxidante disminuida(10). Los niveles de ROS son de gran interés para valorar la agresión mediada por estrés oxidativo en gran cantidad de procesos, entre los que destacan mecanismos de señalización intracelular, inmunitarios, defensa antimicrobiana, proliferación o apoptosis.

3.1.2 *Agentes Oxidantes y Especies de Oxígeno Reactivas (ROS)*

a. Anión superóxido

Gran parte de los radicales libres proceden del anión superóxido (O2-). Este anión es producido de forma fisiológica en pequeña cantidad en la mitocondria, pero ante determinados estímulos, su producción puede verse alterada a expensas de la enzima Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Oxidasa (NADPH oxidasa), principal fuente de producción del O_2 en fagocitos y tejido vascular. En el endotelio vascular, la presencia de angiotensina II, endotelinas, hiperglucemia o niveles altos de colesterol producen un aumento de la expresión de la NADPH oxidasa no fagocítica, o constitutiva (NOXs), incrementando la producción de ROS. Las fuentes principales productoras de anión superóxido pueden ser de origen no enzimáticas (mitocondria) y no enzimáticas (procede de fagocitos del sistema inmune, endotelio vascular, oxigenasa citocromo P450 dependiente y de la conversión de xantina-deshidrogenasa a xantina-oxidasa)(11).

Las especies reactivas de oxígeno van a actuar sobre macromoléculas, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, provocando una reacción en cadena en la que especies intermedias pueden actuar a su vez como agentes oxidantes.

b. Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es otro oxidante formado por acción de la de la superóxido dismutasa (SOD), como veremos posteriormente, y puede dirigirse hacia cuatro caminos:

1) Metabolizarse a oxígeno y agua gracias a la enzima catalasa.
2) Metabolismo vía glutatión.

3) A través de la reacción de Fenton/Haber- Weiss, en presencia de hierro, da lugar a una molécula de radical hidroxilo.
4) Entrar en el campo del sistema enzimático de la mieloperoxidasa leucocitaria.

c. Proteínas carboniladas

Las proteínas carboniladas pueden generarse por 3 vías(12,13):

1) Oxidación de algunos aminoácidos de la cadena polipeptídica.
2) Formación de enlaces entre los residuos de Lys, His, y Cys y los aldehídos insaturados α, β, formando productos finales de lipoxidación
3) Glicación/glicoxidación de grupos amino de la Lys, formando productos finales de glicación.

La formación de los compuestos carbonilados es el marcador más generalizado y ampliamente utilizado de la oxidación severa de proteínas tanto in vitro como in vivo. La estabilidad química de las proteínas carboniladas las hace apropiadas para su medida en laboratorio y también para su almacenamiento. También se ha demostrado que la acumulación de proteínas carboniladas es un buen marcador de daño oxidativo en el envejecimiento, el daño isquémico, la inflamación crónica, y muchas otras enfermedades(14,15). La cuantificación de proteínas carboniladas en suero nos sugiere que estas especies oxidadas pueden ser útiles como biomarcadores diagnósticos en distintas enfermedades inflamatorias(16). Además la concentración de proteínas carboniladas en suero es significativamente mayor en pacientes con diabetes e hipercolesterolemia(17).

d. Otros oxidantes

Existen otros radicales libres de interés, los cuales se añaden a los citados anteriormente. Ver tabla 8.

OXIDANTE	DESCRIPCIÓN
O_2^-, anión superóxido	Estado de reducción de un electrón de O_2, formado en muchas reacciones de autooxidación y por la cadena de transporte de electrones. Es poco reactivo, pero puede liberar Fe^{2+} de proteínas ferrosulfuradas y de la ferritina. Sufre dismutación para formar H_2O_2 espontáneamente o por catálisis enzimática.
H_2O_2, peróxido hidrógeno	Estado de reducción de dos electrones, formado por la dismutación de O_2^- ó por reducción directa de O_2. Soluble en lípidos y capaz de difundir por membranas.
OH, radical hidroxilo	Estado de reducción de tres electrones, formado por la reacción de Fenton y la descomposición de peroxinitrito. Extremadamente reactivo, actúa sobre la mayoría de los componentes celulares.
ROOH, hidroperóxido orgánico	Formado por reacciones de radicales con componentes celulares como lípidos y nucleobases.
RO, alcoxi- y ROO, peroxi-	Radicales orgánicos centrados en oxígeno. Formas lipídicas participan en reacciones de peroxidación de lípidos. Producido en presencia de oxígeno por adición de radicales a dobles enlaces o eliminación de hidrógeno.
HOCl, ácido hipocloroso	Formado a partir de H_2O_2 por la mieloperoxidasa. Soluble en lípidos y altamente reactivo. Rápidamente oxida constituyentes de proteínas, incluyendo grupos tiol, grupos amino y metionina.
$OONO^-$, peroxinitrito	Formado en una rápida reacción entre O_2^- y NO. Liposoluble y similar en reactividad al ácido hipocloroso. Forma ácido peroxinitroso, que puede someterse a escisión para formar radicales de hidroxilo y de dióxido de nitrógeno.

Tabla 8.

3.1.3. *Agentes Antioxidantes Químicos*

Los antioxidantes se clasifican en dos amplios grupos, dependiendo de si son solubles en agua (hidrofílicos) o en lípidos (hidrofóbicos). En general los antioxidantes solubles en agua reaccionan con los oxidantes en el citoplasma celular y el plasma sanguíneo, mientras que los antioxidantes liposolubles protegen las membranas de la célula contra la peroxidación de lípidos. Estos compuestos se pueden sintetizar en el cuerpo u obtener

de la dieta. Los diferentes antioxidantes están presentes en una amplia gama de concentraciones en fluidos corporales y tejidos, estando algunos tales como el glutatión o la ubiquinona mayormente presente dentro de las células, mientras que otros tales como el ácido úrico se distribuyen más uniformemente a través del cuerpo. La cantidad de protección proporcionada por cualquier antioxidante depende de su concentración, de su reactividad hacia la especie reactiva del oxígeno y del estado de los antioxidantes con los cuales interactúa(18). Algunos compuestos contribuyen a la defensa antioxidante quelando los metales de transición y evitando que catalicen la producción de radicales libres en la célula. Es importante la capacidad de secuestrar el hierro, que es la función de proteínas de unión al hierro tales como la transferrina y la ferritina. El selenio y el zinc son comúnmente mencionados como nutrientes antioxidantes pero estos elementos químicos no tienen ninguna acción antioxidante ellos mismos sino que se requieren para la actividad de algunas enzimas antioxidantes.

Metabolito antioxidante	**Solubilidad**	**Concentración en suero humano (μM)**	**Concentración en tejido del hígado (μmol/kg)**
Ácido ascórbico	Agua	50 – 60[1]	260 (hombre)
Glutatión	Agua	325 – 650	6400 (hombre)
Ácido úrico	Agua	200 – 400	1600 (hombre)
Carotenos	Lípido	β-caroteno: 0,5 – 1 Retinol: 1 – 3	5 (hombre, total)
α-tocoferol	Lípido	10 – 40	50 (hombre)
Ubiquinol	Lípido	5	200 (hombre)

Tabla 9

Ácido ascórbico

El ácido ascórbico o vitamina C es un antioxidante monosacárido que no puede ser sintetizado por los seres humanos y debe ser obtenido de la dieta. En las células es mantenido en su forma reducida por la reacción con el glutatión. El ácido ascórbico es un agente reductor y puede reducir y de tal modo neutralizar especies reactivas del oxígeno tal como el peróxido de hidrógeno(19).

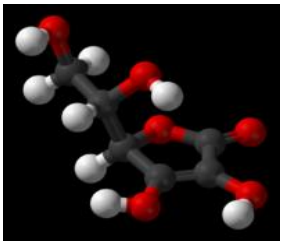


Figura1.

Glutatión

El glutatión es un péptido que contiene cisteína y es sintetizado en las células desde sus aminoácidos constitutivos. El glutatión tiene características antioxidantes ya que el grupo tiol en su porción de cisteína es un agente reductor y puede ser oxidado y ser reducido de forma reversible. En las células, el glutatión es mantenido en forma reducida por la enzima glutatión reductasa y alternadamente reduce otros metabolitos y sistemas de enzimas así como reacciona directamente con los oxidantes(20). Debido a su alta concentración y a su papel central en mantener el estado redox de la célula, el glutatión es uno de los antioxidantes celulares más importantes.

Melatonina

La melatonina es un poderoso antioxidante que puede cruzar fácilmente las membranas celulares y la barrera hematoencefálica. A diferencia de otros antioxidantes, la melatonina no experimenta un ciclo redox, que es la capacidad de una molécula de

experimentar la reducción y la oxidación repetidas veces. El completar un ciclo redox permite a otros antioxidantes (tales como la vitamina C) actuar como pro-oxidantes y promover la formación de radicales libre. La melatonina, una vez que es oxidada, no se puede reducir a su estado anterior porque forma varios productos finales estables, al reaccinar con radicales libres. Por lo tanto, se le denomina antioxidante terminal (o suicida)(21).

Tocoferoles y tocotrienoles

La vitamina E es el nombre colectivo para un sistema de ocho tocoferoles y tocotrienoles relacionados, que son vitaminas antioxidantes liposolubles. De éstos, el α-tocoferol ha sido muy estudiado ya que tiene la biodisponibilidad más alta y el cuerpo preferentemente absorbe y metaboliza esta forma. La forma del α-tocoferol es la más importante de los antioxidantes liposolubles y protege las membranas de la célula contra la oxidación reaccionando con los radicales del lípido producidos en la reacción en cadena de peroxidación de lípidos(22).

Figura 2.

Carotenoides

Los carotenoides están entre los pigmentos naturales más comunes y han sido caracterizados hasta ahora más de 600 compuestos diferentes. Los carotenoides son responsables por muchos de los colores rojos, amarillos y naranja de las hojas, frutas y flores de los vegetales, así como también por el color de algunos

insectos, aves, peces y crustáceos. Solamente pueden ser sintetizados por plantas, hongos, bacterias y algas, sin embargo, muchos animales los incorporan a través de la dieta. Dos carotenoides dietéticos importantes son el licopeno y el β-caroteno. Estos están involucrados en la eliminación de dos de las especies reactivas del oxígeno, el oxígeno singlete y el radical peroxilo(23). Los carotenoides, eliminan eficientemente los radicales peroxilos, especialmente cuando la tensión de oxígeno es baja. Los β-carotenos de la dieta se acumulan en la piel y actúan como agentes protectores contra el daño oxidativo inducido por las radiaciones UVA.

Polifenoles

Figura 4.

Los polifenoles son fitoquímicos de bajo peso molecular, esenciales para el ser humano. Los polifenoles naturales pueden ir desde moléculas simples (ácido fenólico, fenilpropanoides, flavonoides), hasta compuestos altamente polimerizados (ligninas, taninos). Los flavonoides representan el subgrupo más común y ampliamente distribuido y entre ellos los flavonoles son los más ampliamente distribuidos. Al estar ampliamente distribuidos en el reino vegetal, constituyen parte integral de la dieta. Los polifenoles poseen una estructura química ideal para la actividad como consumidores de radicales libres. Los polifenoles poseen una porción hidrofílica y una porción hidrofóbica, por lo que pueden actuar en contra de

ROS que son producidas en medios tanto hidrofóbicos como acuosos. Su capacidad antioxidante está directamente relacionada con el grado de hidroxilación del compuesto. Los flavonoides tienen una poderosa acción antioxidante in vitro, siendo capaces de neutralizar un amplio rango de especies reactivas del oxígeno, nitrógeno y cloro, tales como el superóxido, el radical hidroxilo, el radical peroxilo, el ácido hipocloroso, actuando como agentes reductores. Además pueden quelar iones de metales de transición(24).

3.1.4. *Antioxidantes Enzimáticos*

Como con los antioxidantes químicos, las células son protegidas contra el estrés oxidativo por una red de enzimas antioxidantes. El superóxido liberado por procesos tales como la fosforilación oxidativa, primero se convierte en peróxido de hidrógeno e inmediatamente se reduce para dar agua. Esta ruta de detoxificación es el resultado de múltiples enzimas con la superóxido dismutasa catalizando el primer paso y luego las catalasas y varias peroxidasas que eliminan el peróxido de hidrógeno.

Superóxido dismutasa, catalasa y peroxirredoxinas

Las superóxido dismutasas (SODs) son una clase de las enzimas cercanamente relacionadas que catalizan la conversión del anión de superóxido en peróxido de oxígeno y de hidrógeno. Las enzimas SODs están presentes en casi todas las células aerobias y en el líquido extracelular. Las enzimas superóxido dismutasa contienen iones metálicos como cofactores que, dependiendo de la isoenzima, pueden ser cobre, zinc, manganeso o hierro. En los seres humanos, las SODs de zinc/cobre están presentes en el citosol, mientras que las SODs de manganeso se encuentran en las mitocondrias.

También existe una tercera forma de SODs en líquidos extracelulares, que contiene el cobre y el zinc en sus sitios activos(25).

Las catalasas son enzimas que catalizan la conversión del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno usando hierro o manganeso como cofactor. Esta proteína se localiza en los peroxisomas de la mayoría de las células eucariotas. La catalasa es una enzima inusual ya que aunque el peróxido de hidrógeno es su único sustrato, sigue un mecanismo de ping-pong. Su cofactor es oxidado por una molécula de peróxido de hidrógeno y después regenerado transfiriendo el oxígeno enlazado a una segunda molécula de sustrato(26). A pesar de su evidente importancia en la eliminación del peróxido de hidrógeno, los seres humanos con deficiencia genética de la catalasa, sufren curiosamente pocos efectos negativos.

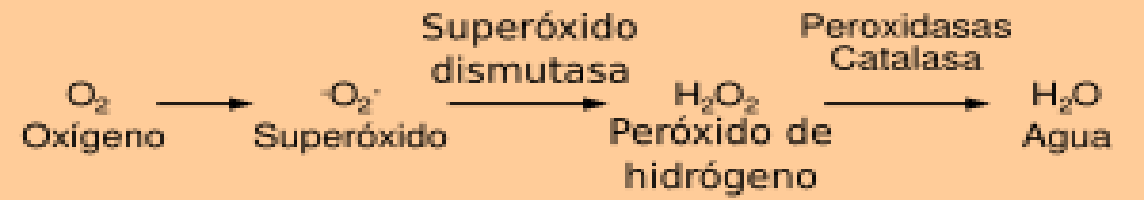


Figura 5.

Las peroxirredoxinas son peroxidasas que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno, hidroperóxido orgánico y peroxinitrito(27). Se dividen en tres clases: las típicas 2-cisteín peroxirredoxinas; las atípicas 2-cisteín peroxirredoxinas; y las 1-cisteín peroxirredoxinas. Las peroxirredoxinas parecen ser importantes en el metabolismo antioxidante, pues los ratones que carecen de peroxirredoxina 1 o 2 acortan su esperanza de vida y sufren de anemia hemolítica.

Glutatión

El sistema del glutatión incluye glutatión, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasa. La glutatión peroxidasa es una enzima que contiene cuatro cofactores de selenio que catalizan la ruptura del peróxido de hidrógeno y de hidroperóxidos orgánicos. Hay por lo menos cuatro diferentes isoenzimas de glutatión peroxidasa. La glutatión peroxidasa 1 es la más abundante y es un muy eficiente eliminando el peróxido de hidrógeno, mientras que la glutatión peroxidasa 4 es la más activa con hidroperóxidos de lípidos. Asombrosamente, la glutatión peroxidasa 1 no es indispensable, ya que ratones que carecen de esta enzima tienen esperanzas de vida normales, pero son hipersensibles al estrés oxidativo inducido(28). Además, las glutatión S-transferasas son otra clase de enzimas antioxidantes dependientes de glutatión que muestran una elevada actividad con los peróxidos de lípidos(29). Estas enzimas se encuentran en niveles particularmente elevados en el hígado y también sirven en el metabolismo de la detoxificación.

3.1.5. *Peroxidación lipídica*

Es un proceso que se inicia por la acción de un radical OH. Este radical hidroxilo extrae un átomo de hidrógeno de una cadena lateral de un ácido graso, de un carbono contiguo a un doble enlace (los ácidos grasos poliinsaturados son los más susceptibles para la actuación de los ROS), resultando un radical alquil (L.) al que se une rápidamente una molécula de oxígeno (O_2) dando lugar a un radical peroxil (LOO.). Este radical puede reaccionar en una cadena con una molécula lipídica adyacente reduciéndose a sí mismo (LOOH-hidroperóxido lipídico) y generándose a su vez otro radical alquil(30). La reacción llega a su fin creándose puentes cruzados entre los grupos alquil (L-L), o dando lugar a los productos finales de los ácidos grasos, alcanos y compuestos

aldehídos reactivos. En esta fase, denominada de descomposición, los principales productos derivados son malonildialdehido (MDA), 4-hidroxinonenal (4-HN) y hexanal, que pueden reaccionar con residuos de lisina de apoB100, conduciendo a la formación de las denominadas bases de Schiff, que presentan una alta toxicidad(31).Se puede esquematizar de la siguiente forma (figura 6):

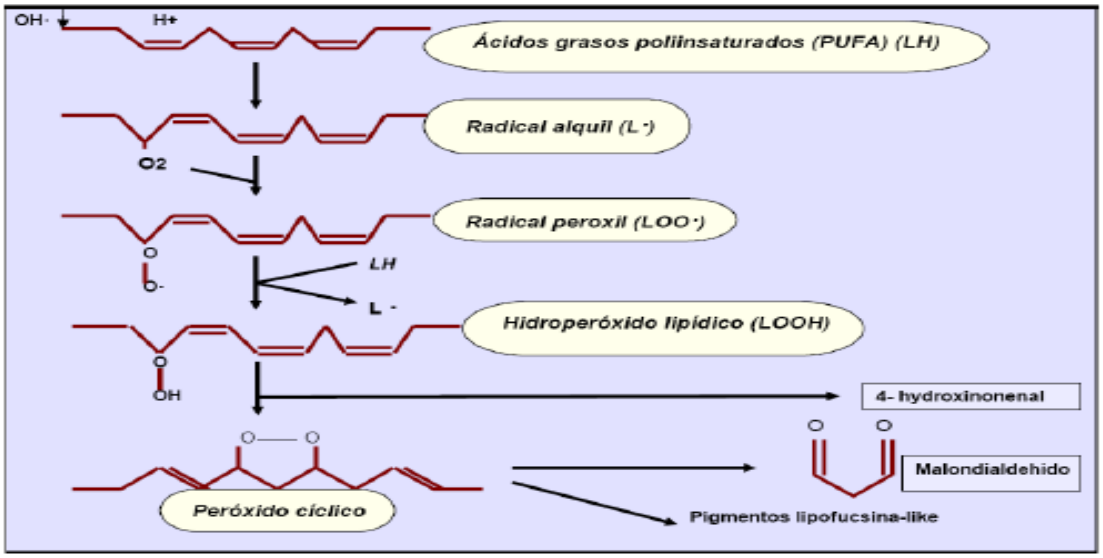


Figura 6.

El número total de ácidos grasos que existen en una partícula de de LDL es aproximadamente 2600, de ellos la mitad son ácidos grasos poliinsaturados (linoleico, araquidónico, ácidos docosahexaenoicos) que, junto con el colesterol, son susceptibles de peroxidación. Al final del proceso oxidativo, la LDL modificada (LDL-ox) posee las siguientes propiedades:

a) Quimiotácticas: atraen granulocitos y monocitos, que se convierten en macrófagos y que van a captar LDL transformándose en células espumosas.

b) Citotóxicas: efecto tóxico directo sobre los vasos e induce agregación plaquetaria y liberación de factores de crecimiento como factor estimulante de colonias

mononucleares (MCSF), y proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), factor de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF).

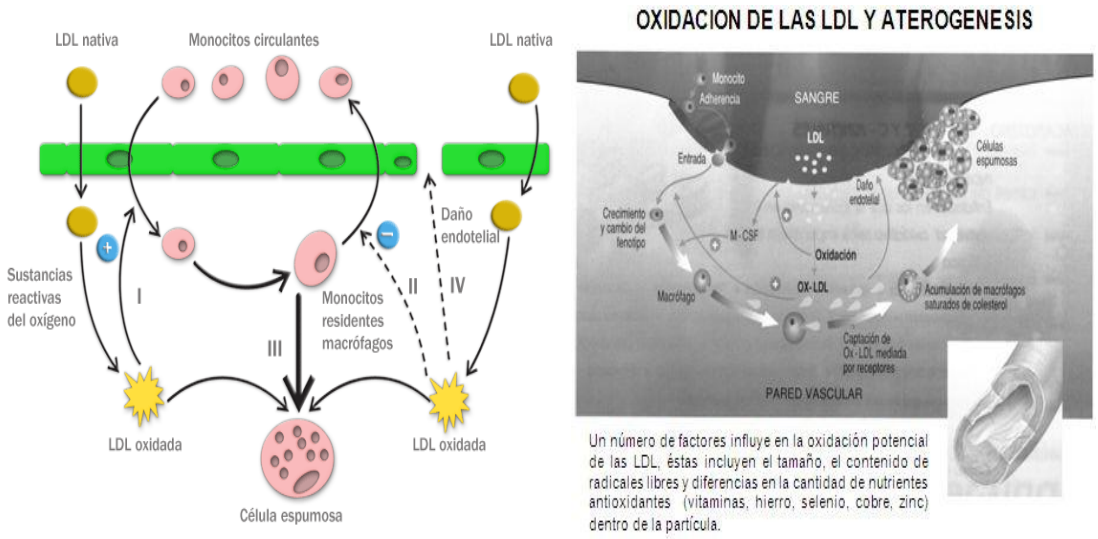
c) Inmunogénicas: Producción de anticuerpos específicos cuya función de los anticuerpos no está aún bien definida.

La fracción LDL está protegida frente a la modificación oxidativa mediante antioxidantes, uno de los más importantes es el α-tocoferol y en menos cantidad encontramos carotenoides, retinoides y ubiquinol (coenzima Q10)(32).

3.1.6 *Oxidación y aterosclerosis*

La teoría oxidativa teoría se basa en que es la LDL modificada por agentes oxidantes la que desencadena los acontecimientos de la aterosclerosis (figura 7). La LDL nativa no presenta capacidad aterogénica, sino que la modificación de la LDL mediante la actuación de agentes oxidantes en el grupo lisina de la Apo B100, produciría un aumento de carga negativa neta de lipoproteínas que facilita la entrada en macrófagos y la consecuente formación de células espumosas, base de la lesión. La LDL oxidada se une a un receptor para acetil-LDL denominado receptor "scavenger."

Figura 7.



La oxidación de LDL ocurre en su mayor parte en la pared vascular más que en el torrente circulatorio, ya que las lipoproteínas están muy protegidas gracias a los antioxidantes circulantes(33). Por otra parte , las lipoproteínas oxidadas existentes en el plasma son aclaradas por el hígado o por acumulación y degradación en la pared vascular. El mecanismo por el cual el anión superóxido actúa sobre LDL directamente no es bien conocido.

3.2. Marcadores de inflamación

3.2.1 *Proteína c-reactiva (PCR)*

Múltiples estudios prospectivos demuestran que la PCR predice eventos cardiovasculares, incluyendo infarto de miocardio y muerte súbita(34). De hecho, con el aumento de eventos cardiovasculares adversos, las concentraciones basales de PCR tienen una subida en gradual y en paralelo. La determinación de PCR unido a la tradicional de colesterol aumenta la predicción del riesgo cardiovascular, independientemente de LDL.

3.2.2 *Factor de necrosis tumoral (TNF-α)*

El TNF-α es una citoquina producida principalmente por monocitos, linfocitos, tejido adiposo y músculo. El TNF-α estimula la producción de endotelina-1 in vitro. También se ha encontrado una asociación entre la concentración circulante de TNF-α y la HTA. El TNF-α también parece tener un papel en las alteraciones lipídicas asociadas a la resistencia a la insulina. El TNF-α en situación de infección/inflamación, incrementa la concentración de triglicéridos (TG) mediante la estimulación de la producción de lipoproteínas VLDL(35).

3.2.3 *Interleuquina 6 (IL-6)*

La IL-6 es una citoquina multifuncional producida por diferentes tipos celulares, incluyendo las células del sistema inmune, células endoteliales, fibroblastos, miocitos y tejido adiposo, haciendo de intermediario en la respuesta inflamatoria y de estrés. La IL-6 juega un papel preponderante en la aparición de dislipemia en sujetos con el síndrome metabólico. De hecho, la concentración de IL-6 se asocia a la de marcadores de respuesta de fase aguda, incluyendo la PCR, en paralelo a la dislipemia(36).

3.3 Marcadores de adhesión celular

Normalmente las células endoteliales se oponen a la adhesión de leucocitos. Hay estímulos proinflamatorios (dieta rica en grasas saturadas, hipercolesterolemia, insulinoresistencia, hipertensión, y tabaquismo) que inducen la expresión de moléculas de adhesión endotelial como la P-selectina y la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1), las cuales están implicadas en la unión de linfocitos y monocitos circulantes. Curiosamente las lesiones ateroscleróticas se forman a menudo en las bifurcaciones de las arterias, las cuales presentan turbulencias en el flujo sanguíneo, lo cual reduce la actividad de moléculas ateroprotectoras endoteliales tales como el óxido nítrico(37).

3.3.1 *Ligando soluble CD40*

CD40L forma parte de la familia los factores de necrosis tumoral (TNF) de las moléculas de interacción superficie-célula. Es una glicoproteína de membrana tipo II formada por 261 aminoácidos. CD40 se expresa de manera constitutiva principalmente en células B, macrófagos y células dendríticas. La unión CD40-CD40L aumenta la respuesta de las células T ante el antígeno mediante la activación de células dendríticas

y la inducción de la producción de IL-12. En el caso de la unión de CD40 en las células endoteliales se produce el aumento en la producción de las moléculas de adhesión (VCAM-1, P-selectina), que da como resultado la migración y el reclutamiento de linfocitos. En pacientes con enfermedad coronaria estable documentada mediante angiografía, existe una asociación evidente entre la placa de ateroma, la estenosis y un incremento anormal de las concentraciones circulantes de sCD40L(38).

Los resultados de estudios realizados en mujeres sanas sugieren que las altas concentraciones de sCD40L están asociadas con el aumento del riesgo vascular en mujeres aparentemente sanas(39).

3.3.2 *P- selectina*

En la familia de las selectinas existen tres tipos (P-selectina, E-selectina y L-selectina). La P-selectina (CD62P) es la de mayor tamaño de todas las de la familia de las selectinas (140KDa).

Figura 8.

En distintos estudios se ha demostrado que existe un aumento de la P-selectina soluble en enfermedad arterial periférica estable, enfermedad arterial coronaria estable(40) y en hipertensión(41).

3.3.3 *Molécula de adhesión vascular 1(VCAM-1)*

Es una proteína que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. La VCAM-1 se expresa en la superficie endotelial y participa en la extravasación leucocitaria, particularmente de linfocitos, basófilos, eosinófilos y monocitos. La adhesión de

linfocitos T y monocitos al endotelio vascular activado está mediada por la acción de las integrinas β1.

Se ha demostrado también la presencia de la integrina αvβ3 en la lesión ateroesclerótica, hecho importante ya que dicha molécula se relaciona con el proceso de angiogénesis, que constituye un condicionante esencial en el crecimiento de la placa(42).

3.4 Marcadores de disfunción endotelial

3.4.1 *Adiponectina*

La adiponectina (Acrp-30) es una proteína plasmática de 244 aminoácidos (30KDa) que se encuentra formando complejos multiméricos en la circulación sanguínea.

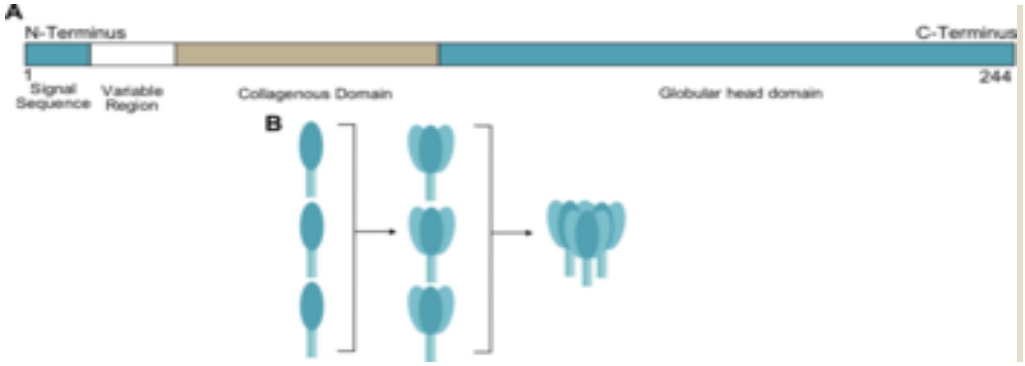


Figura 9.- *Esquema de la estructura de la adiponectina. A-dominio estructural de la adiponectina. B- monómero y trimeros de la adiponectina*

La adiponectina, sintetizada mayormente por tejido adiposo, tiene propiedades antiinflamatorias y antiaterogénicas. Es un importante factor autocrino/paracrino en el tejido adiposo que modula la diferenciación de preadipocitos hasta adipocitos maduros. Las concentraciones de adiponectina son menores en obesos en comparación con individuos delgados, Esta adipoquina también funciona como un factor endocrino,

actuando sobre el metabolismo en general y en determinados órganos. La adiponectina ejerce multiples efectos que son cruciales en la biología cardiovascular, incluyendo la sensibilidad a insulina, reducción de masa adiposa visceral, reducción de los triglicéridos en plasma y aumento de HDL(43). La adiponectina también afecta directamente a la función endotelial (reduciendo la expresión de VCAM-1), y de macrófagos, reduciendo la expresión de receptores scavengers y la producción de TNF-α(44).

3.4.2 *Endotelinas*

En la familia de las endotelinas se han identificado hasta el momento tres isoformas que están constituidas por 21 aminoácidos cada una (ET 1-3) (Figura 10). La ET-1 es producida exclusivamente por las células del endotelio vascular y es la más importante en la fisiología cardiovascular y fisiopatología. ET-2 y ET-3 se producen en otros tejidos y su papel en el sistema cardiovascular aún no se conoce.

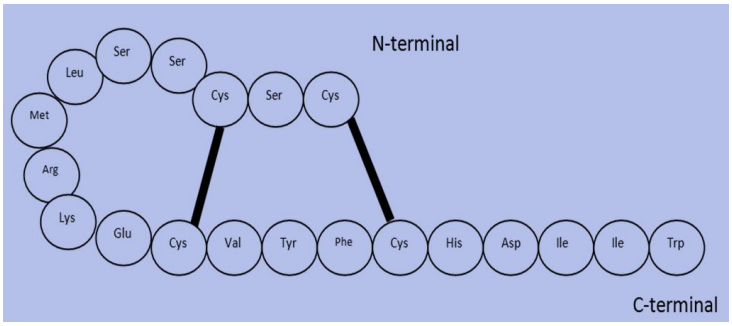


Figura 10.

La acción biológica de la ET-1 en la fisiopatología de ciertas enfermedades está bien documentada. Sin embargo la principal implicación de la ET-1 en la jerarquía de regulación fisiológica del sistema cardiovascular está aún en investigación(45). A diferencia del sistema del óxido nítrico, el papel llevado a cabo por la ET-1 es más

evidente cuando sus concentraciones están muy elevadas. La elevación en los niveles de ET-1 en plasma está asociada con la severidad de enfermedad cardiovascular.

La ET-1 ejerce su función biológica mediante la activación de receptores específicos ETA y ETB son los más importantes para el efecto de la ET-1. La estimulación de ETA, localizado sólo en la membrana de la célula muscular lisa, provoca contracción mediada por mecanismos dependientes de calcio e induce proliferación. Los receptores de ETB se encuentran también en la célula muscular lisa, donde comparte las mismas propiedades que ETA. Al contrario que ETA, los receptores ETB también se expresan en la superficie de la célula endotelial, donde median la vasodilatación, vía liberación de óxido nítrico y prostaciclinas(46).

3.4.3 *Óxido nítrico*

El óxido nítrico interviene en efectos múltiples de inflamación y función vascular. El óxido nítrico se sintetiza de forma enzimática por un grupo de enzimas denominadas NO sintasas (NOS), que catalizan el paso de L-arginina a L-citrulina mediante un proceso oxidativo de la terminal nitrógeno-guanidin de la L-arginina, para el cual utiliza oxígeno molecular y NAD(P)H, y en el que se libera NO.

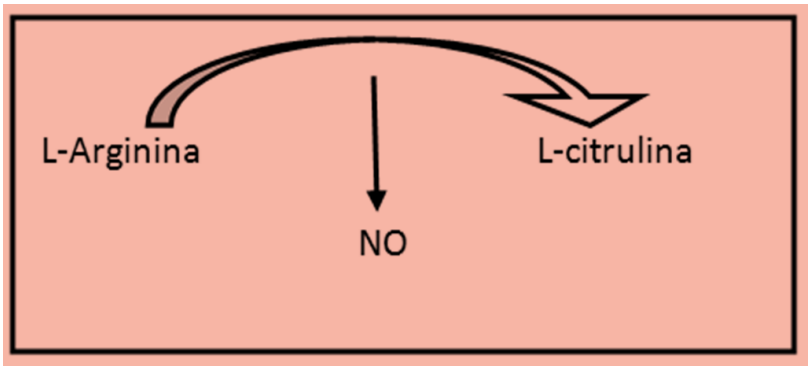


Figura 11.

Existen tres isoformas de NOS: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e inducible (iNOS). Las dos primeras isoformas son constitutivas.

El NO producido por eNOS produce relajación del tono vascular y previene que leucocitos y plaquetas se adhieran a la pared vascular(47).

La alteración de la función del endotelio hace que se produzca una disminución de la actividad de la eNOS y tiene como consecuencias el desarrollo de eventos cardiovasculares. nNOS se encarga de la producción de NO que actúa como neuromodulador o neuromediador en neuronas centrales y en terminaciones nerviosas periféricas. La isoforma iNOS da lugar a NO que participa en fenómenos de respuesta inflamatoria tanto en macrófagos como en otras células. Ante el estímulo que provoca una reacción inflamatoria, la cantidad de producción de NO aumenta a expensas de iNOS, sobrepasando los niveles fisiológicos. Por otra parte el NO derivado de las células mieloides se une al anión superóxido, generado al mismo tiempo y por las mismas células, dando lugar a peroxinitritos, que median efectos tóxicos como el daño al DNA y oxidación de LDL(48). Las reacciones nitrosativas principales quedan esquematizadas en la siguiente (figura 12).

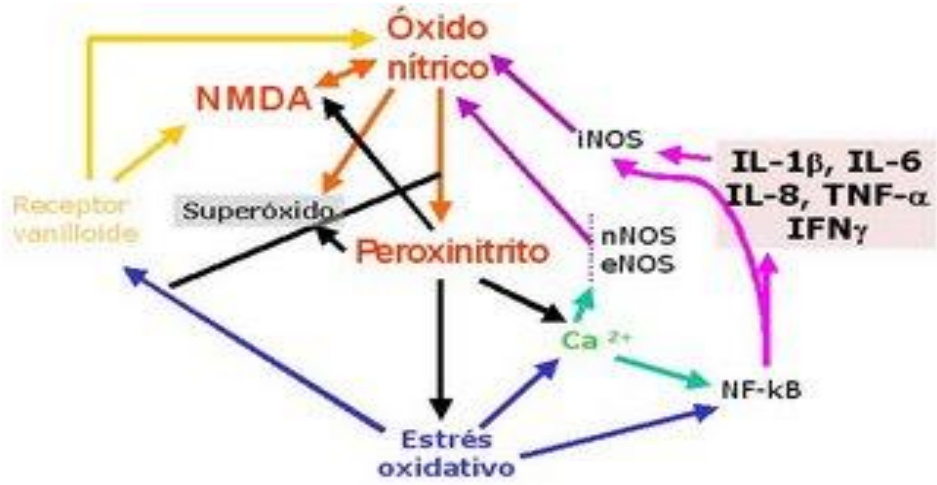


Figura 12.- *Principales reacciones nitrosativas.*

4. ESTUDIO DE LA DISFUNCION ENDOTELIAL

Durante los últimos años ha aumentado el interés por la investigación en el campo de la microcirculación en arterias de resistencia, arteriolas, capilares, y vénulas. Previamente se consideraba que en muchas de las enfermedades cardiovasculares más importantes estaban implicados principalmente los vasos de gran calibre, en particular las arterias de conducción. Sin embargo, estudios más recientes han destacado la crucial implicación de la microcirculación en muchas enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión. Los estudios de microcirculación tratan de encontrar relación entre inflamación y los cambios en la microcirculación en estadios tempranos(49).

La investigación de la estructura y función microvascular es importante para conocer la base fundamental de la fisiopatología de la enfermedad cardiovascular. En la práctica clínica podría ser de ayuda para el diagnóstico prematuro de enfermedad cardiovascular y para monitorizar la progresión de la enfermedad o los resultados de la terapéutica aplicada en determinados pacientes.

4.1 Métodos clínicos para la evaluación de la función endotelial

El endotelio vascular juega un papel esencial en la biología de la pared arterial mediante la liberación de sustancias tróficas y vasoactivas. Así, el endotelio vascular contribuye a la regulación del tono vascular, acoplamiento cardiovascular y a la adaptación del diámetro arterial a los cambios de presión, lo que caracteriza la dilatación mediada por el flujo, un fenómeno que se observa tanto en arterias de resistencia como de conducción. En humanos, se pueden apreciar estadíos iniciales de disfunción endotelial en la mayoría de las enfermedades cardiovasculares y aparece como un agente predictivo independiente de eventos cardiovasculares en enfermedad coronaria, hipertensión e insuficiencia cardíaca(50,51). En este contexto, se han desarrollado

considerablemente métodos clínicos para el estudio de la función endotelial y hoy en día, la función endotelial es considerada como un marcador de evaluación del beneficio de fármacos que afectan al sistema cardiovascular, constituyendo así una diana terapéutica. Actualmente, la evaluación de la función endotelial se lleva a cabo mediante el uso de marcadores bioquímicos que valoran biológicamente el estado global vascular y mediante el uso de test funcionales que estudian directamente las respuestas vasomotoras de un territorio vascular.

4.2 Marcadores bioquímicos

La ventaja de estos marcadores es su facilidad clínica para la cuantificación, usando técnicas inmunológicas actuales, de los factores circulantes liberados por el endotelio vascular y/o implicados en la regulación de su actividad. Ya se han comentado con anterioridad, aunque a modo resumen lo exponemos en la siguiente tabla.

VASODILATADORES	**Nitritos y nitratos (metabolitos del óxido nítrico), 6-keto $PGF_{1\alpha}$ (metabolito de la prostaciclina)**
VASOCONSTRICTORES	Endotelina-1, Angiotensina II, Tromboxano A_2, ROS, prostaglandina H_2
MARCADORES DE ACTIVACION E INFLAMACION	Proteína C-reactiva, moléculas de adhesión (P- y E- selectina, molécula de adhesión intercelular, molécula de adhesión vascular), proteína-1 quimiotáctica de monocitos, interleucinas (IL-6, IL.8), TNF-α
MARCADORES DE HOMEOSTASIS	Activador del plasminógeno en tejidos, inhibidor-1 activador del plasminógeno, Factor Von Willebrand, trombomodulina
OTROS	Dimetilarginina asimétrica, micropartículas endoteliales, factores de crecimiento endotelial vascular, células progenitoras endoteliales, células endoteliales circulantes

Tabla 10.

4.3 Test de dilatación de la arterial braquial mediada por flujo (DABMF)

Estos métodos tratan de realizar una medición por ultrasonidos de la dilatación de arterias periféricas en respuesta al aumento de flujo. Es una técnica sencilla que refleja de forma indirecta la secreción de óxido nítrico por el endotelio(52). Dado que la ateroesclerosis es una enfermedad sistémica, la disfunción endotelial medida periféricamente es representativa de afectación a otros niveles, como las arterias coronarias.

Tras 12 horas de ayuno y reposo, se coloca un manguito de presión de 15cm con barómetro de mercurio bajo la axila. Se detecta la arteria braquial derecha justo por encima del pliegue del codo por medio de un eco-doppler con sonda lineal de 10MHz y se realiza una imagen en reposo que se almacena en el equipo. Posteriormente se aplica isquemia con presión de 250mmHg durante 5 minutos. Después se almacena otra imagen a los 70 segundos tras la liberación de la isquemia. La DABMF se calcula como el diámetro tras isquemia, menos el diámetro en reposo, dividido entre el diámetro de reposo y se expresa en porcentaje.

4.4 Estudio de arterias de resistencia subcutáneas

Los test ex vivo se utilizan para estudiar el endotelio en arterias de resistencia procedentes de grasa subcutánea (diámetro del lumen: 200-500µm). Las arterias se obtienen de biopsias de la región glútea o de la región anterior abdominal mediante anestesia local (1.0 x 0.5 x 0.5 cm3) y se colocan en una miógrafo de alambre inmediatamente después de la disección. Los estudios comparativos de relajación dependiente e independiente de endotelio se realizan previa contracción con un agente vasoactivo, como pueden ser la acetilcolina, la sustancia P o la bradikinina. Estas sustancias se unen específicamente a receptores locales sobre la célula endotelial e

inducen en el lumen vascular y en la pared arterial la liberación de factores vasomotores derivados de endotelio como óxido nítrico(NO), prostaciclinas o factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDHF), que producen la relajación en células del músculo liso vascular. Esta respuesta vasomotora dependiente de endotelio se compara con el efecto de un donador exógeno de NO como el nitroprusiato sódico (NPS), el cual actúa directamente sobre células musculares lisas y permite la evaluación de la capacidad vasodilatadora no dependiente de endotelio

De modo paralelo al estudio funcional puede realizarse un análisis de las características morfológicas de las arterias obtenidas. Hay estudios sobre hipertensión basados en este método que muestran una alteración de la relajación derivado del endotelio .Sin embargo, no hay evidencias de una alteración en el cambio de la capacidad vasodilatadora en respuesta a acetilcolina en humanos hipertensos a diferencia de los estudios realizados en ratas hipertensas. Esta metodología también permite demostrar si existen cambios de la respuesta vasomotora y de la estructura microvascular tras una intervención terapéutica (53).

5. HIPOPITUITARISMO Y MORTALIDAD CARDIOVASCULAR

Hay diversas evidencias que muestran que en el hipopituitarismo existe un aumento de la mortalidad global. Estas evidencias se basan en estudios retrospectivos con diferentes grados de hipopituitarismo donde se excluyó a los pacientes afectados de enfermedad de Cushing o con acromegalia, y a aquellos con déficit de hormona de crecimiento (GH) en tratamiento sustitutivo. En general se demostró un aumento de la tasa de mortalidad, especialmente cardiovascular, y de forma más acusada en mujeres. Rosen y Bengtsson(54), publicaron una mortalidad aumentada en 1,9 veces en 333 pacientes diagnosticados de hipopituitarismo entre 1956 y 1987, especialmente debido a mortalidad cardiovascular. Este incremento de la mortalidad era más frecuente en la población femenina (riesgo relativo de 1,7 en varones y 2,7 en mujeres). Posteriormente se estudiaron a 172 pacientes, encontrándose una tasa estandarizada de mortalidad(SMR) por todas las causas de 1,73 con un intervalo de confianza (IC) del 95% de 1,28-2,28, también de forma más prevalente en mujeres que en los varones. Sin embargo, no se apreció un aumento significativo de la causa cardiovascular. Los factores que de manera independiente mejoraban el pronóstico fueron la edad en el momento del diagnóstico y la presencia de hipogonadismo(55). Es importante destacar que aproximadamente un 80% de los varones estaba en tratamiento sustitutivo con hormonas sexuales, mientras que sólo un 27% de las mujeres estaban sustituidas. Bülow investigó 344 pacientes, apareados por edad y sexo, y demostró una mortalidad global superior a la esperada, con un especial aumento de las causas cerebrovasculares(56), sobre todo por debajo de los 55 años. La mortalidad de origen cardiovascular fue asimismo superior a la esperada.

El problema de estos trabajos radica en que son retrospectivos y presentan importantes diferencias en los tratamientos, en los criterios de inclusión y en el tiempo de

seguimiento. Un metaanálisis realizado sobre estos trabajos(57), muestra una mortalidad global aumentada. En general, destaca que los estudios suecos sobreestiman la mortalidad cardiovascular y que la radioterapia craneal podría influir en la mortalidad cerebrovascular. Por el contrario, los estudios ingleses infraestiman la mortalidad cardiovascular. La conclusión final es que el riesgo global de muerte cardiovascular está aumentado en un 50% y que, por la metodología empleada y los resultados obtenidos, en su conjunto está infraestimado. Posteriormente, Bülow y su equipo de investigación, analizaron la mortalidad cardiovascular en 33 mujeres con hipopituitarismo que compararon con 33 mujeres de la población general. Se agruparon por otros factores de riesgo vasculares (edad, tabaquismo, historia de enfermedad familiar cardiovascular, nivel educativo, residencia y sexo, perfil lipídico y presión arterial) y concluyeron la existencia de un aumento de la mortalidad de causa cardiovascular(58). Este incremento de la mortalidad se relacionaba con una disminución del ejercicio, obesidad central, disminución del colesterol ligado a lipoproteínas de alta densidad (HDL) , aumento del colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL) y disminución de la masa cardíaca. El cuadro clínico citado es frecuente en pacientes portadoras de deficiencia de GH, por lo que la DGH sería responsable del aumento de riesgo cardiovascular en este estudio.

Tomlinson publicó en la revista Lancet, un estudio prospectivo de 1.014 pacientes con hipopituitarismo, excluyendo acromegalia y enfermedad de Cushing. Encontró un aumento de mortalidad especialmente en las mujeres, los jóvenes, pacientes con craneofaringioma y los tratados con radioterapia (59).

El exceso de mortalidad tuvo relación con causas cardiovasculares, respiratorias y cerebrovasculares. Con respecto a déficits hormonales, sólo se relacionó con aumento de mortalidad el déficit de gonadotrofinas, aunque de forma estadísticamente no

significativa. El déficit de GH no se relacionaba con este aumento de la mortalidad en este estudio. De todas formas, el número de pacientes estudiados para valorar el déficit de GH fue muy escaso y los propios autores lo consideraron muy insuficiente para valorar el efecto del déficit de GH.

En conclusión y valorando las limitaciones en el diseño de los estudios citados, existe suficiente evidencia para asumir un aumento de la mortalidad global y cardiovascular en los pacientes con hipopituitarismo.

5.1. Causas de aumento de mortalidad en hipopituitarismo

- Radioterapia: se ha descrito aumento de la mortalidad cerebrovascular en relación con radioterapia, sobre todo en estudios suecos y retrospectivos. Parece ser que la frecuencia de accidentes cerebrovasculares es superior a mayor dosis de radioterapia recibida (60). No existen de todas formas estudios prospectivos y es una cuestión todavía poco aclarada.

-Déficit de cortisol: se ha pensado que el exceso de corticoides exógenos en el tratamiento podría condicionar un aumento de mortalidad sobre todo cardiovascular, al igual que ocurre en el síndrome de Cushing o hipercortisolismo endógeno(61). Probablemente, la dosis sustitutiva deba ser menor que la habitual de 30mg diarios., dado que la secreción endógena diaria de cortisol de un adulto normal es de 4-8mg/m².

Sin embargo, no existen estudios que muestren diferencias en mortalidad entre pacientes con hipopituitarismo y déficit de ACTH sustituido que entre los no deficitarios.

-Déficit de hormonas tiroideas: aunque existe algún estudio que puede atribuir al tratamiento sustitutivo con tiroxina una mayor frecuencia de mortalidad cardiovascular(62), no existen evidencias reales de esta asociación. Aunque las hormonas tiroideas puedan influir en el perfil lipídico, se conoce que el tratamiento

sustitutivo del hipopituitarismo no repercute sobre éste. En un estudio se han descrito aumento de los marcadores inflamatorios de riesgo vascular en mujeres con hipopituitarismo en relación con niveles de tiroxina total y libre, sin conocer su significado clínico(63).

- Déficit de Vasopresina(ADH): aunque es cierto que en algún análisis univariante ha mostrado mayor mortalidad, se asocia a tumores con pero pronóstico como puede ser el craneofaringioma.

- Déficit de gonadotropinas: hemos citado antes una asociación entre hipogonadismo y aumento de la mortalidad en el estudio de Tomlinson(59), aunque en trabajos previos el déficit de gonadotropinas ha sido más bien un factor protector o de supervivencia, probablemente en los tratados. Por otro lado, el efecto del tratamiento sustitutivo con estrógenos sobre la mortalidad cardiovascular no está aún aclarado.

-Déficit de GH: posiblemente ha sido el déficit más estudiado con respecto a mortalidad cardiovascular. Lo abordaremos de forma concisa en el próximo apartado.

6. DEFICIENCIA DE GH Y RIESGO CARDIOVASCULAR

Posiblemente el eje GH/IGF-1 ha sido el más abordado en relación con la mortalidad cardiovascular. Son numerosos los trabajos que relacionan este déficit con diversos factores de riesgo cardiovascular y su modificación con el tratamiento hormonal sustitutivo.

Sin embargo, hasta la actualidad y aunque la evidencia científica demuestra que debe existir asociación entre la deficiencia de GH y riesgo cardiovascular, no existe hasta el momento un estudio definitivo que demuestre claramente que está aumentada la mortalidad cardiovascular. Cuando comparamos con grupos de igual edad y sexo, los adultos con hipopituitarismo y con déficit de GH presentan diferentes factores de riesgo relacionados con la enfermedad cardiovascular:

6.1. Composición corporal DGH

En los pacientes con déficit de GH destaca el aumento del índice de masa corporal (IMC), debido a un aumento de la masa grasa y especialmente la abdominal(64). A pesar de describirse un aumento del IMC, existe una disminución de la masa muscular, lo que puede condicionar una disminución del ejercicio físico(65). La disminución del ejercicio físico supone por sí sola un factor de riesgo cardiovascular. El tratamiento sustitutivo con GH produce una disminución del tejido adiposo subcutáneo e intrabdominal a medio y largo plazo, superior al 20% del compartimiento graso global y superior al 60% del troncular, con un aumento paralelo del compartimiento proteico muscular(66). El aumento del compartimiento muscular puede ser el condicionante del aumento de la capacidad de ejercicio físico observado tras la administración de GH(67).

6.2. Déficit de GH y alteración del metabolismo hidrocarbonado.

La resistencia a la insulina (RI), determinada por una disminución de la captación de glucosa por el tejido muscular y graso, es un elemento característico e importante dentro del síndrome metabólico y que asocia un incremento en la mortalidad cardiovascular.

En pacientes con DGHA se han encontrado niveles de insulina basal bajos, normales y elevados. Probablemente el grado de obesidad es un factor de confusión primordial que justifican estos hallazgos. A diferencia del síndrome metabólico, no se observan niveles significativamente elevados de insulina con frecuencia en pacientes con DGHA. Sin embargo, utilizando el método gold standard para medir resistencia a la insulina, como es el clamp euglucémico hiperinsulinémico, se ha demostrado una clara disminución de la sensibilidad a la insulina en pacientes con DGHA comparado con controles sanos, a pesar de niveles normales glucemia e insulina basales(68).

Algo más controvertido es el efecto del tratamiento con GH sobre la RI. Dicho tratamiento está asociado con niveles elevados de insulina o glucemia y pueden ocasionar persistencia o incluso el desarrollo de novo de resistencia a la insulina(69). Sucesivamente se ha visto que el efecto de la GH sobre el metabolismo hidrocarbonado depende de su dosificación. En general, los pacientes que son tratados con dosis bajas de GH(0.10mg/día), tienen habitualmente una mejoría de la sensibilidad a la insulina con una disminución de la glucemia en ayunas.

6.3. DGH y Dislipemia.

Se han descrito aumentos del colesterol total en el 20% de los sujetos, del colesterol LDL en el 40%, hipertrigliceridemia en un 26%, junto con concentraciones disminuidas de colesterol HDL hasta en un 75% de los casos(69). El mecanismo por el

cual se producen estas alteraciones no es del todo bien conocido, aunque se cree que la GH estimula el catabolismo de LDL influyendo sobre la actividad de lipoproteinlipasa, que directa o indirectamente modula la actividad de otras hormonas. La alteración de la lipasa también puede estar en relación con la resistencia a la insulina descrita en estos pacientes. Sin embargo, en los sujetos con hipopituitarismo se ha descrito paradójicamente que tanto la actividad de lipoproteinlipasa como la de lipasa hepática están aumentadas(70). Como complemento a estas explicaciones, se puede pensar que la presencia de inflamación de bajo grado descrita en estos pacientes y previamente comentada contribuya también a la existencia de la dislipemia. También se ha planteado que el déficit de GH provoca una disminución de la captación hepática de las lipoproteínas, al disminuir los receptores hepáticos de las LDL.

En general, a mayor severidad y duración de la deficiencia de GH nos encontramos con un peor perfil lipídico. Existe también una asociación inversa entre los valores de IGF-1 y niveles de LDL-c(71).

Hay bastante experiencia sobre el efecto de la GH en los lípidos. En experimentación animal se produce una disminución del colesterol de las LDL, que se corrobora en la práctica clínica con una mejoría del perfil lipídico, independientemente de la reducción de la adiposidad (72). Sin embargo, a pesar de la mejoría observada en las concentraciones plasmáticas de los lípidos, éstos pueden permanecer alterados respecto a un grupo control. Los resultados de un metanálisis de múltiples ensayos clínicos randomizados y ciegos, muestran que el tratamiento con dosis bajas de GH tiene efectos beneficiosos sobre la composición corporal, colesterol total y fracción LDL y presión arterial diastólica(73).

6.4. DGH y homocisteína.

Los niveles de homocisteína no parecen ser un factor de riesgo cardiovascular importante en pacientes con DGHA. No hay estudios comparativos de niveles de homocisteína con grupo control, pero sí se ha visto que los niveles disminuyen con tratamiento de GH(74).

6.5. DGH e hipertensión arterial.

En cuanto a la presencia de hipertensión arterial (HTA) en el hipopituitarismo con déficit de GH, los resultados también son algo conflictivos. Estudios iniciales sugerían un discreto aumento de la presión arterial (PA) en pacientes con DGHA, el cual se confirmó posteriormente en un estudio observacional de 1000 pacientes con DGHA realizado en España. En este estudio se demostró una prevalencia de PA elevada en sujetos con DGHA frente a población general, en concreto, 22% versus 15%(75). La presencia de HTA podría estar relacionada con un aumento del tono simpático descrito en sujetos con déficit de GH, independiente de la obesidad abdominal y del metabolismo de la glucosa, y que se relaciona negativamente con las concentraciones de IGF-I y TSH. Esta actividad simpática se relacionaba en los sujetos con hipopituitarismo con la presión arterial diastólica(76). Otro mecanismo implicado en la génesis de la HTA es la propia disminución de la GH. La ausencia de esta hormona podría motivar un aumento de la liberación de noradrenalina en un intento de aumentar la hormona hipotalámica liberadora de GH (GH-RH) y así aumentar la liberación de GH. Al no conseguirse, se mantiene la realimentación, lo que causa un aumento de la noradrenalina central, que produce una HTA diastólica, al igual que ocurre en la HTA secundaria especialmente ligada a enfermedad renal. Aunque el efecto del tratamiento con GH sobre la PA es algo controvertido, un metaanálisis de ensayos bien controlados

muestra un efecto beneficioso del tratamiento que alcanza significación estadística en la PA diastólica(73).

6.6. DGH e inflamación.

Durante los últimos años hay diversos estudios que evalúan la presencia de marcadores inflamatorios en relación con la presencia del síndrome metabólico y de riesgo cardiovascular. En pacientes con hipopituitarismo se han encontrado un aumento de los marcadores inflamatorios de riesgo cardiovascular, en conexión directa con la obesidad. Se ha visto también que la elevación de IL-6 en mujeres depende al menos parcialmente del hipopituitarismo. Por otra parte, la PCR se correlaciona negativamente con la concentración de factor de crecimiento insulínico (IGF-I)(77). En concordancia con estos resultados, la administración de GH produce una disminución de los marcadores inflamatorios cardiovasculares en varones con déficit de GH(78).

6.7. DGH y marcadores de la fibrinólisis.

Las concentraciones del fibrinógeno, del activador inhibidor del plasminógeno tipo I (PAI-I) y del complejo trombina-antitrombina (CTA) se encuentran elevadas en el déficit de GH, aunque sólo la concentración de fibrinógeno se asocia inversamente con las concentraciones de IGF-I(79). Estos hechos se corresponden con un mayor riesgo de enfermedad coronaria y complicaciones tromboembólicas. El tratamiento sustitutivo también puede mejorar las concentraciones de fibrinógeno, PAI-I y activador del plasminógeno(80).

6.8. DGH y alteraciones cardíacas.

La deficiencia de GH afecta a la función y tamaño cardíaco. Se ha visto en modelos experimentales que al extraer la glándula hipofisaria se producía una disminución de tamaño de diversos órganos, incluyendo el corazón(81). Tras el tratamiento con GH se observó que la atrofia de órganos descrita revertía o se normalizaba.

En pacientes con DGH de inicio infantil, se ha observado en estudios ecocardiográficos una disminución del grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo (VI) y del septum interventricular, dando lugar a una disminución de la masa del VI y de su diámetro interno. No suelen existir alteraciones en la función sistólica. Otros estudios en adultos con DGHA han mostrado patrones similares de morfología y función cardiaca(82,83).

Utilizando angiografía isotópica, se ha demostrado una disminución del pico máximo sistólico del VI en respuesta al ejercicio físico. Esta alteración es frecuente en la mayoría de pacientes con DGH, independientemente de la edad o de la edad de inicio(84).

6.9. DGH y desarrollo de arteriosclerosis.

El engrosamiento de la íntima-media de los vasos sanguíneos representa uno de los cambios morfológicos más precoces de la pared arterial en el procesos de aterogénesis. Los lípidos se depositan en la íntima de las arterias sistémicas y posteriormente ocurre adhesión leucocitaria, proliferación del músculo liso y trombosis con enfermedad clínica ya detectable. El grosor de la íntima-media es un factor independiente de infarto agudo de miocardio en hombres(85). Las técnicas ecográficas que se utilizan para detectar el aumento de grosor son no-invasivas, y por tanto son útiles como marcadores preclínicos de enfermedad.

Mediante técnicas de eco-Doppler se han demostrado, en sujetos con déficit de GH, alteraciones en la dinámica y morfología de las grandes arterias, relacionadas con la presencia y el desarrollo de arteriosclerosis. Concretamente, se ha demostrado una disminución de la distensibilidad de la aorta, una onda carotídea anormal y un aumento del grosor de la íntima media carotídea, con un aumento de las placas de ateroma en arterias carótidas y femorales en sujetos con déficit de GH adquirido en la edad adulta o en pacientes adultos con déficit de GH desde la infancia. Estos hechos se correlacionan inversamente con la concentración de IGF-I(86). No obstante, en otro trabajo donde se analizaba con una metodología similar a un grupo de pacientes con hipopituitarismo y déficit de GH e importante aumento de la mortalidad cardiovascular, no se pudieron reproducir estos resultados tras ajustarlos por grupos de edad y sexo(87). Es importante destacar que en ninguno de estos estudios se ha objetivado una verdadera estenosis de la carótida. Por tanto, es posible interpretar que las anomalías observadas sean una respuesta adaptativa a los cambios en el flujo y la presión intraluminal, aunque no debemos olvidar que el aumento del grosor de la íntima-media se ha descrito como un indicador de arteriosclerosis generalizada y como factor de riesgo de infarto de miocardio y de accidente vascular cerebral.

El tratamiento sustitutivo con GH durante 5 años de tratamiento en un estudio muy reciente prospectivo y abierto, consigue reducir significativamente el grosor de la íntima-media en la carotídea (IMT) en varones con DGHA severo, aunque sin llegar a normalizarse(88).

Otros estudios muestran una mejoría en la dilatación arterial mediada por flujo dependiente e independiente del endotelio, en estrecha relación con el aumento de la IGF-I e independientemente de los cambios en la concentración de las lipoproteínas(89). Este hecho concuerda con los hallazgos experimentales que demuestran un aumento del

óxido nítrico (NO) observado tras la administración de GH, que la IGF-I aumenta la generación endotelial del NO *in vitro* y que las células endoteliales poseen receptores para la IGF-I.

Con respecto a la investigación de la disfunción endotelial y estudio de pequeñas arterias tras tratamiento con GH, existen resultados más conflictivos. Aunque existe evidencia en los últimos años que los pacientes con DGHA presentan disminución de la distensibilidad aórtica, reducción de la dilatación arterial braquial mediada por flujo(DABMF) y aumento de niveles de marcadores de disfunción endotelial(90), los resultados de los pocos estudios que abordan este aspecto tras tratamiento muestran resultados algo más controvertidos. Un estudio detecta una mejoría en la DABMF tras 6 meses de tratamiento(91), otro mejora el flujo sanguíneo medido por Doppler tras 12 meses(92), mientras que un trabajo escocés no muestra mejoría en la DABMF tras tratamiento con GH. Este último postula que la población escocesa utilizada como grupo control también mostraba disfunción endotelial y por eso no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos(93).

El estudio de arterias de resistencia subcutáneas o estudio miográfico se ha utilizado previamente en endocrinología para la investigación de la función vascular en condiciones tales como el síndrome de ovario poliquístico(SOP) e hipertensión arterial(94). En el SOP se ha evidenciado de forma preliminar una alteración de la función endotelial en las arterias de resistencia y mejoría significativa tras exposición a agentes como la insulina. Sólo hay un estudio hasta ahora que aborda el estudio miográfico en arterias de resistencia en pacientes con DGHA(95). Se trata de un trabajo de investigación de la Universidad de Glasgow en donde se estudian 16 pacientes hipopituitarios con DGHA, sometidos a 6 meses de tratamiento con GH frente a controles sin tratamiento. Después se realiza la operación viceversa, realizándose por

tanto un diseño cruzado. Como resultado, concluyen que no hay diferencias significativas en la respuesta de las arterias de resistencia a agentes dependientes del endotelio, ni tampoco a los independientes. No hay ningún estudio hasta la fecha que compare el estudio de la función vascular en arterias de resistencia en pacientes con DGH sin tratamiento frente a controles sanos.

En general, hay pocos trabajos que aborden el desarrollo de aterosclerosis de forma prematura en pacientes con DGHA y, aún menos, los que conjugan estudios morfológicos de disfunción endotelial (grosor de la íntima-media carotidea) y parámetros de aterosclerosis prematura (marcadores de inflamación, de adhesión vascular, de disfunción endotelial y parámetros del metabolismo oxidativo)(96). Por otro lado, sí que existen muchos trabajos que estudian el DGHA utilizando marcadores bioquímicos tradicionales, como medición de glucemia, perfil lipídico, presión arterial…Estos estudios son útiles para entender la fisiopatología de la aterosclerosis, aunque tienen el inconveniente de proporcionarnos una visión incompleta y tardía de la misma. Con respecto al estrés oxidativo en pacientes con DGHA, existen muy escasos trabajos, con poco número de pacientes y utilizando parámetros de medida muy diferentes(97,98). A modo de resumen, parece existir una alteración del balance oxidante y antioxidante, a favor de los primeros, aunque la evidencia aún es inicial y escasa. Con respecto al estudio de función vascular en arterias de resistencia de pequeño tamaño, sólo existe un estudio en donde la información inicial es insuficiente para sacar conclusiones apropiadas al respecto.

HIPÓTESIS

B. HIPOTESIS

El déficit de GH/IGF-1 se asocia a un mayor riesgo de padecer enfermedad cardiovascular, a través de la aceleración del proceso de aterosclerosis. La disfunción endotelial interviene de forma precoz en la patogénesis de la aterosclerosis y contribuye de forma determinante al desarrollo de las enfermedades cardiovasculares (figura 1). Sin embargo, no es el único elemento que se encuentra involucrado en dicho proceso, interviniendo otros como la activación de la inflamación, la aparición de estrés oxidativo y de adhesión linfocitaria, así como de resistencia a la insulina (RI). Por otro lado, la presencia de GH/IGF-I parece tener un efecto beneficioso sobre todos estos elementos lo que provoca la disminución del riesgo de enfermedad cardiovascular. Si evaluamos marcadores precoces de aterosclerosis prematura y existe conexión con la presencia de DGHA, se haría necesario e imprescindible el tratamiento generalizado a todos los pacientes que padezcan la enfermedad, siendo esta actitud de gran trascendencia para el abordaje y manejo clínico de los pacientes con hipopituitarismo de cualquier causa.

Figura 1.

Por todo ello y, basándonos en lo expuesto anteriormente, nos planteamos la siguiente hipótesis:

Estudiar si el déficit de GH/IGF-I se asocia con alteraciones de parámetros de disfunción endotelial y marcadores prematuros de aterosclerosis, y por consecuente con riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular (figura 2).

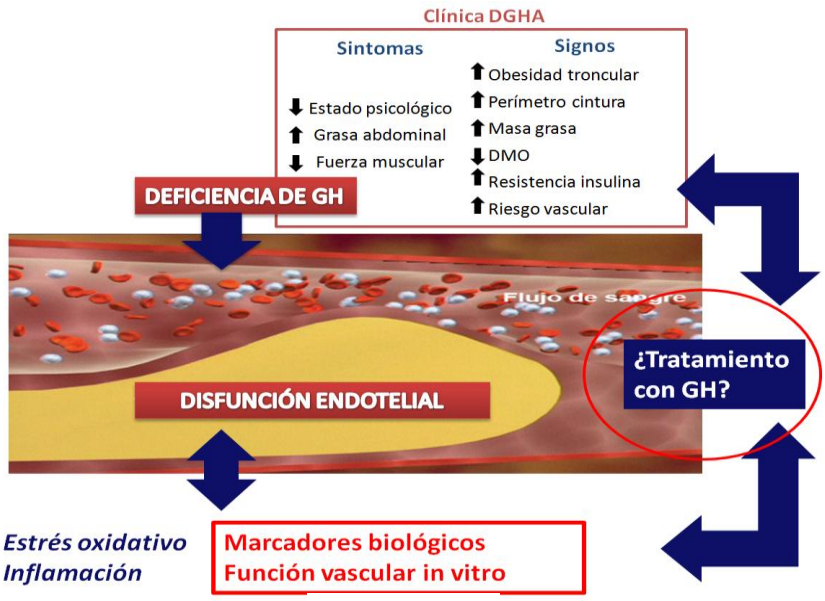


Figura 2

OBJETIVOS

C. OBJETIVOS

1. OBJETIVOS PRIMARIOS

1. Comparar el grado de disfunción endotelial, de inflamación, de estrés oxidativo, de adhesión linfocitaria y de resistencia a la insulina en un grupo de pacientes con déficit severo de GH en el adulto (DGHA) frente al de un grupo de individuos sanos.
2. Comparar la morfología y función vascular in vitro en pacientes con DGHA versus grupo control o sanos.
3. Evaluar los parámetros clínicos y bioquímicos utilizados hasta ahora para valorar el riesgo cardiovascular (marcadores tradicionales) en un grupo de pacientes con DGHA y compararlos con los de un grupo de individuos sanos o grupo control.

2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Plantear un nuevo campo de investigación para evaluar si estos nuevos marcadores de aterosclerosis prematura (estrés oxidativo, adhesión linfocitaria,…) resultan ser más eficaces y sensibles que los tradicionales empleados para estos estudios.

METODOLOGÍA Y PLAN DE TRABAJO

D. METODOLOGIA Y PLAN DE TRABAJO

Para responder a la hipótesis y conseguir los objetivos propuestos, planteamos un estudio observacional y comparativo entre dos grupos distintos (observacional transversal caso y control, apartado 1). Un grupo presentaba déficit de GH del adulto (DGHA) y un segundo grupo eran individuos sanos de similares características (grupo control), tomando como variable independiente o agrupadora fundamental la **presencia o no del déficit de GH**. Se compararon en cada grupo una serie de parámetros y marcadores, siendo éstas las variables dependientes. (Apartado 1, subapartado B de Material y Métodos).

Como segundo estudio, realizamos un estudio cuasiexperimental "ex vivo" para analizar la función vascular (apartado 2). Para ello utilizamos arterias de resistencia vascular subcutáneas que se obtuvieron de biopsias de grasa abdominal de un grupo de pacientes con DGHA y de otro grupo de pacientes sanos (grupo control) de similares características. Ambos grupos fueron sometidos a distintas intervenciones posteriormente desarrolladas.

1. ESTUDIO OBSERVACIONAL TRANSVERSAL CASO Y CONTROL

A) Sujetos de estudio

La totalidad de los individuos empleados para dar respuesta a los objetivos antes mencionados (n= 30), se repartieron en dos grupos distintos:

- un primer grupo (n= 15) de pacientes con déficit severo de GH (DGHA) en la edad adulta, diagnosticados por el Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario Virgen del Rocío desde el año 2006 al 2008.

- y un segundo grupo (n= 15) denominado grupo control, que fue constituido por individuos sin ningún tipo de déficit de hormonas hipofisarias y con similares características al primero.

Definimos como déficit severo de GH (DGHA) a aquella situación en la que la respuesta de GH a una hipoglucemia efectiva (glucemia < 40 mg/dl), inducida mediante la administración de un bolo intravenoso de insulina, en dosis de 0.05-0.1 UI/kilo de peso (H.I.I.), fuese inferior a 3 ng/ml.

Criterios de inclusión

- Edad entre 18 y 65 años
- Déficit orgánico de GH del adulto no tratado.
- En caso de enfermedad previa hipofisaria, cumplimiento de criterios de curación.
- Todos los pacientes y controles firmaron su consentimiento informado antes de su inclusión.

Criterios de exclusión

- Pacientes en tratamiento con preparaciones hormonales de GH
- Otros déficits hipofisarios (distintos al de GH) no sustituidos adecuadamente.
- Gestación
- Trastorno psiquiátrico grave o incapacidad mental que imposibilite la comprensión de los términos de la participación en el estudio.

El trabajo cumplió los requisitos legales del Comité Ético de Investigación del Hospital Virgen del Rocío.

B) Determinación de marcadores bioquímicos, parámetros de control metabólico y parámetros clínicos

Dichas determinaciones serán posibles gracias al empleo de una serie de técnicas cuya metodología se expone a continuación:

B.1. MARCADORES BIOQUÍMICOS:

B.1.1) Marcadores de adhesión celular:

a. Moléculas de adhesión vascular (sVCAM-1)

Para medir los niveles de sVCAM-1 se utilizó el kit de sVCAM-1 ELISA(IBL-Hamburg). Los resultados se expresaron en ng/ml.

Principio de la técnica El fondo de la microplaca tiene unido anticuerpos monoclonales anti-sVCAM-1. El sVCAM-1 presente en la muestra o en los estándares se une a los anticuerpos adheridos en la microplacas. Se añade una mezcla anticuerpo monoclonal anti-sVCAM-1 conjugado con biotina y se añade además estreptavidina-HRP. La anti-sVCAM-1 conjugada con Biotina se une a la VCAM-1 capturada por los anticuerpos adheridos a la microplaca. La estreptavidina-HRP se une a la anti-sVCAM-1 conjugada con Biotina. Después de la incubación se hace un lavado para quitar todo lo que no se haya unido y a continuación se añade la solución sustrato. Se forma un producto coloreado en proporción a la cantidad de sVCAM-1 presente en la muestra. La reacción termina al añadir un ácido y a continuación se mide la absorbancia a 450nm. Se prepara una curva estándar a partir de seis diluciones estándares y a partir de esta se calculan las concentraciones de sVCAM-1 de las muestras.

Preparación de la muestra

Utilizar 500µl de suero para ensayar directamente o congelar a -20ºC. Evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación.

b. sP-selectina

Para medir los niveles de sP-selectina se utilizó el kit de human sP-selectin ELISA(Bender MedSystems). Los resultados se expresaron en ng/ml.

Principio de la técnica El fondo de la microplaca tiene unido anticuerpos monoclonales anti-sP-selectina. La sP-selectina presente en la muestra o en los estándares se une a los anticuerpos adheridos en la microplacas. Se añade una mezcla anticuerpo monoclonal anti-sP-selectina conjugado con HRP. La anti-sP-selectina conjugada con HRP se une a la sP-selectina capturada por los anticuerpos adheridos a la microplaca. Después de la incubación se hace un lavado para quitar todo lo que no se haya unido y a continuación se añade la solución sustrato. Se forma un producto coloreado en proporción a la cantidad de sP-selectina presente en la muestra. La reacción termina al añadir un ácido y a continuación se mide la absorbancia a 450nm. Se prepara una curva estándar a partir de seis diluciones estándares y a partir de esta se calculan las concentraciones de sP-selectina de las muestras.

Preparación de la muestra

Utilizar 500µl de suero para ensayar directamente o congelar a -20ºC. Evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación.

c. Ligando soluble de CD40 (sCD40L)

Para medir los niveles de sCD40L se utilizó el kit de human sCD40L ELISA(Bender MedSystems). Los resultados se expresaron en ng/ml.

Principio de la técnica

El fondo de la microplaca tiene unido anticuerpos monoclonales anti-sCD40L. La sCD40L presente en la muestra o en los estándares se une a los anticuerpos adheridos en la microplacas. Se añade una mezcla anticuerpo monoclonal anti-sCD40L conjugado con HRP. La anti-sCD40L conjugada con HRP se une a la sCD40L capturada por los anticuerpos adheridos a la microplaca. Después de la incubación se hace un lavado para quitar todo lo que no se haya unido y a continuación se añade la solución sustrato. Se forma un producto coloreado en proporción a la cantidad de sCD40L presente en la muestra. La reacción termina al añadir un ácido y a continuación se mide la absorbencia a 450nm. Se prepara una curva estándar a partir de seis diluciones estándares y a partir de esta se calculan las concentraciones de sCD40L de las muestras.

Preparación de la muestra

Utilizar 500µl de suero para ensayar directamente o congelar a -20ºC. Evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación.

B.1.2) Marcadores de estrés oxidativo:

a. Glutation sulfotransferasa (GST)

Para medir los niveles de GST se utilizó el Kit de GST-π (Inmunodiagnostik). Los resultados se expresaron en ng/ml.

Principio de la técnica

El enzima inmunoensayo (EIA) permite la determinación cuantitativa de GST en humanos. El anticuerpo anti-GST se encuentra unido en la superficie de la placa microtiter. Después de un paso de bloqueo y preincubación de los calibradores y las muestras con un anticuerpo policlonal de conejo, la GST de controles y muestras compite con la GST unida a la placa por la unión del anticuerpo. Después del paso de lavado la detección de la unión del anticuerpo de conejo es efectuada mediante la actividad de la peroxidasa unida a anticuerpo de cabra anticonejo. La cantidad de sustrato convertido por la peroxidasa es inversamente proporcional a la cantidad de GST en la muestra y puede ser determinada mediante espectrofotometría a 450nm.

Preparación de la muestra

Utilizar 500µl de suero para ensayar directamente o congelar a -20ºC. Evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación.

b.Capacidad antioxidante total (TAS)

Para medir la capacidad antioxidante total utilizó el Kit de TAS (Randox Lab.) basado en el método de Miller and Rice–Evans (1993). Su determinación se llevó a cabo en un analizador Cobas Mira Plus (Dade Behring) a 37ºC y los resultados se expresaron en mol/l.

Principio de la técnica

ABTS®(2,2´-Azino-di-3-etilbenzotiazolín sulfonato) se incuba con peroxidasa (metamioglobina) y H2O2 para producir el radical catión ABTS®*+. Este radical presenta una coloración verde azulada relativamente estable, que se mide a 600nm (ver esquema). La presencia de antioxidantes en la muestra produce una supresión de esta coloración, siendo esta supresión proporcional a la concentración de antioxidantes.

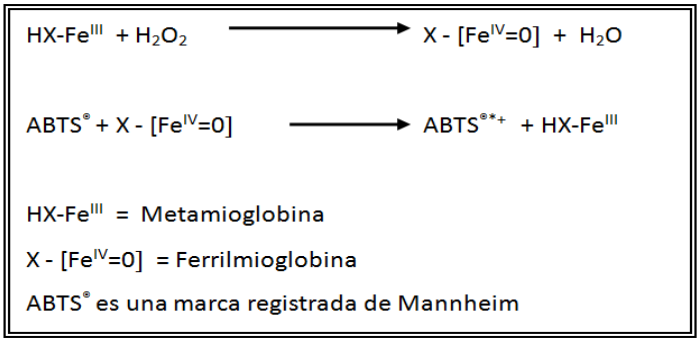


Figura 1.

Preparación de la muestra

Utilizar 500µl de suero para ensayar directamente o congelar a -20ºC. Evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación.

c. Glutation oxidado (GSSG) y reducido (GSH)

Para medir los niveles de GSSG y GSH se utilizó el Kit Bioxytech GSH/GSSH-412 (Lab. Oxis Research), basado en el método de Tietze (1969). Su determinación se llevó a cabo en un analizador Cobas Mira Plus (Dade Behring) a 37ºC y los resultados se expresaron en µmol/l.

Principio de la técnica

Es un método enzimático que permite determinar la cantidad total de Glutation (oxidado y reducido) y la cantidad aislada de GSSG. Para ello utiliza un reactivo, DNTB (ácido 5,5´-ditiobis-2-nitrobenzoico), que reacciona con GSH para formar un producto detectable mediante espectrofotometría a 412nm. GSSG puede determinarse mediante la reducción de GSSG a GSH, y éste a su vez puede ser cuantificado con el mismo procedimiento que el anteriormente citado.

Preparación de la muestra

Para preparar la muestra en la que cuantificar los niveles de GSSG se utilizan 100µl de sangre total de un tubo con EDTA, a los que se le añaden 10l de reactivo Scavenger (1-metil-2-vinilpiridinium trifluorometanosulfonato o MV2P) . GSH se oxida fácilmente, así MV2P lo capta impidiendo que se oxide y aumente la concentración de GSSG final.

Para preparar la muestra en la que cuantificarlos niveles de GSH se utilizan 50l de sangre total de un tubo con EDTA. Ambas muestras se congelan a -20ºC hasta su análisis.

d. Vitamina E

Para medir los niveles de vitamina E se utilizó el kit vitamin A/E mediante HPLC (BIO-RAD). Los resultados se expresaron en µg/dl.

Principio de la técnica

El desarrollo de la cromatografía moderna ha mejorado considerablemente la metodología analítica para las vitaminas liposolubles. Dado que ambas vitaminas son relativamente termolábiles, la cromatografía gaseosa podía utilizarse en muy pocos casos, por lo que fue reemplazada por la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El método de HPLC desarrollo por BIO-RAD permite llevar a cabo una determinación simultánea rápida y precisa de la vitaminas E, por lo que reúnen todos los requisitos de la rutina de laboratorio.

Preparación de la muestra

Utilizar 200µl de suero para ensayar directamente o congelar a -20ºC. Evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación. Se mezclan 200l de suero con 200l de una solución estándar interno de δ-tocoferol. Al añadir una solución de sulfato de amonio y centrifugarla, se desarrollan dos fases. La fase superior se utiliza para realizar el análisis HPLC en un sistema isocrático. Se separan las fases en una columna de fase reversa. A continuación se lleva a cabo la detección UV y la determinación cuantitativa con ayuda del estándar interno.

e. Lipoproteína de baja densidad oxidada (LDL ox)

Para medir los niveles de LDLox se utilizó el kit de ELISA (Inmun diagnostic Lab.) y los resultados se expresaron en ng/ml.

Principio de la técnica

Este ensayo emplea la técnica cuantitativa de enzima inmunoensayo sándwich. El fondo de la microplaca tiene unido un anticuerpo monoclonal específico para la LDLox. Los estándares y las muestras son pipeteados en los pocillos y cualquier LDLox presente se unirá al anticuerpo inmovilizado. Después de lavar el resto de moléculas no adheridas al anticuerpo, se añade a los pocillos un anticuerpo monoclonal específico del LDLox que posee un enzima unido. A continuación se lava de nuevo para quitar todos los anticuerpos secundarios no unidos y se añade una solución de sustrato a los pocillos. El color que se muestra está en proporción a la cantidad de adiponectina unida al principio. Añadimos una solución de parada de la actividad de la enzima y medimos la intensidad del color.

Preparación de la muestra

Utilizar 500µl de suero para ensayar directamente o congelar a -20ºC. Evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación.

B.1.3) Marcadores de inflamación:

a. Proteína C-reactiva ultrasensible (PCR-us)

Para medir los niveles de PCR-us se utilizó el kit de hsCRP CardioPhase®(Dade Behring). Se midieron por inmunonefelometría de manera automatizada en el sistema Dimension Vista ™ y los resultados se expresaron en µg/L.

Principio de la técnica

Se añaden partículas de poliestireno recubiertas de anticuerpos monoclonales propios de la PCR humana y se mezclan con las muestras. Estos agregados dispersan un haz de luz que atraviesa la muestra. La intensidad de luz dispersada es proporcional a la concentración de la proteína respectiva de la muestra. El resultado se evalúa mediante comparación con una concentración conocida estándar.

Preparación de la muestra

Utilizar 500µl de suero para ensayar directamente o congelar a -20oC. Evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación.

b. Interleuquina 6 (IL-6)

Para medir los niveles de IL-6 se utilizó el kit de human IL-6 ELISA(BLKdiagnostics). Los resultados se expresaron en pg/ml.

Principio de la técnica

El fondo de la microplaca tiene unido anticuerpos monoclonales anti-IL-6. La IL-6 presente en la muestra o en los estándares se une a los anticuerpos adheridos en la microplacas. Se añade una mezcla anticuerpo monoclonal anti-IL-6 conjugado con biotina y se añade además estreptavidina-HRP. La anti-IL-6 conjugada con Biotina se une a la IL-6 capturada por los anticuerpos adheridos a la microplaca. La estreptavidina-HRP se une a la anti-IL-6 conjugada con Biotina. Después de la incubación se hace un

lavado para quitar todo lo que no se haya unido y a continuación se añade la solución sustrato. Se forma un producto coloreado en proporción a la cantidad de IL-6 presente en la muestra. La reacción termina al añadir un ácido y a continuación se mide la absorbancia a 450nm. Se prepara una curva estándar a partir de seis diluciones estándares y a partir de esta se calculan las concentraciones de IL-6 de las muestras.

Preparación de la muestra

Utilizar 500µl de plasma para ensayar directamente o congelar a -20oC. Evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación.

c. Factor de necrosis tumoral (TNF-α)

Para medir los niveles de TNF-α se utilizó el kit de human TNF-α ELISA versión 3(BLKdiagnostics). Los resultados se expresaron en ρgr/ml.

Principio de la técnica

El fondo de la microplaca tiene unido anticuerpos monoclonales anti-TNF-α. La TNF-α presente en la muestra o en los estándares se une a los anticuerpos adheridos en la microplacas. Se añade una mezcla anticuerpo monoclonal anti-TNF-α conjugado con biotina y se añade además estreptavidina-HRP. La anti-TNF-α conjugada con Biotina se une a la TNF-α capturada por los anticuerpos adheridos a la microplaca. La estreptavidina-HRP se une a la anti-TNF-α conjugada con Biotina. Después de la incubación se hace un lavado para quitar todo lo que no se haya unido y a continuación se añade la solución sustrato. Se forma un producto coloreado en proporción a la cantidad de TNF-α presente en la muestra. La reacción termina al añadir un ácido y a continuación se mide la absorbencia a 450nm. Se prepara una curva estándar a partir de seis diluciones estándares y a partir de esta se calculan las concentraciones de TNF-α de las muestras.

Preparación de la muestra

Utilizar 500µl de plasma para ensayar directamente o congelar a -20oC. Evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación.

B.*1.4)* *Marcadores de disfunción endotelial:*

a. Oxido Nítrico

Para medir los niveles de óxido nítrico se utilizó el Kit de NO (Roche Lab), basado en el método de Schmidt (1992). Su determinación se llevó a cabo de manera semiautomática realizándose la cuantificación final en un lector de microplacas TECAN (Spectra Rainbow) y los resultados se expresaron en mmol/mg proteína.

Principio de la técnica

El Monóxido de nitrógeno es detectado en los fluidos biológicos vía nitrito. El nitrato presente en la muestra se reduce a nitrito mediante la enzima nitrato reductasa (NR) en presencia del cofactor NADPH. El nitrito formado reacciona con sulfanilamida y N-(1-naftil)-etilendiamida dihidroclorado dando un color rojo-violeta, que se puede cuantificar a 550nm.

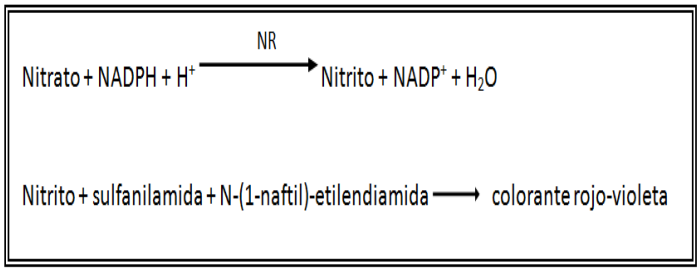


Figura 2.

Preparación de la muestra

Utilizar 500µl de suero para ensayar directamente o congelar a -20ºC. Evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación. Para esta determinación es necesario eliminar previamente todas las proteínas de la muestra y para ello se utilizan filtros de membrana Microcon centrifugal filter 0.5ml (lab. Millipore) y se centrifuga la muestra durante 45 minutos a 10000 rpm.

b. Adiponectina

Para medir los niveles de adiponectina se utilizó el kit de human adiponectin(R&D systems-DRP300). Los resultados se expresaron en ng/ml.

Principio de la técnica

Este ensayo emplea la técnica cuantitativa de enzima inmunoensayo sándwich. El fondo de la microplaca tiene unido un anticuerpo monoclonal específico para el dominio globular de la adiponectina. Los estándares y las muestras son pipeteados en los pocillos y cualquier adiponectina presente se unirá al anticuerpo inmovilizado. Después de lavar el resto de moléculas no adheridas al anticuerpo, se añade a los pocillos un anticuerpo monoclonal específico de la región globular de la adiponectina que posee un enzima unido. A continuación se lava de nuevo para quitar todos los anticuerpos secundarios no unidos y se añade una solución de sustrato a los pocillos. El color que se muestra está en proporción a la cantidad de adiponectina unida al principio. Añadimos una solución de parada de la actividad de la enzima y medimos la intensidad del color.

Preparación de la muestra

Utilizar 500l de suero para ensayar directamente o congelar a -20ºC. Evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación.

B.2. PARÁMETROS DE CONTROL METABÓLICO (MARCADORES BIOQUÍMICOS GENERALES):

Mediante la extracción de sangre en la vena antecubital, y tras 10 horas de ayuno, se procedió a la determinación de la cantidad de *glucosa (mg/dl), hemoglobina (gr/L), triglicéridos (mg/dl), ácidos grasos libres (µmol/L), colesterol total (mg/dl), LDL-colesterol (mg/dl) y HDL-colesterol (mg/dl)* en suero, mediante técnica de espectrofotometría y por métodos comerciales estandarizados.

a. Ácidos grasos libres (FFA)

Para medir los niveles de ácidos grasos libres se utilizó un kit NEFA C (Wako Chemicals GmbH). Su determinación se llevó a cabo en un analizador Cobas Mira Plus (Dade Behring) a 37ºC y los resultados se expresaron en µmol/l.

Principio de la técnica

Este ensayo utiliza un método enzimático colorimétrico para la detección de ácidos grasos no esterificados en suero. Las reacciones que se llevan a cabo están en la figura 3.

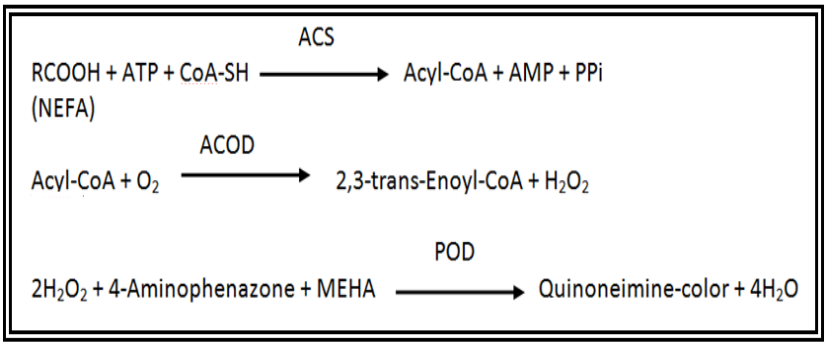


Figura 3.

La intensidad del pigmento rojo es proporcional a la concentración de ácidos grasos libres en la muestra. El ácido ascórbico de la muestra es eliminado por la ascorbato oxidasa. La absorbencia se mide a 550nm.

Preparación de la muestra

Utilizar 300µl de la muestra de suero para ensayar directamente o congelar a -20ºC. Evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación.

b. Glucemia

Para medir los niveles de glucosa se utilizó el kit Gluco-quant (Roche). Su determinación se llevó a cabo en un analizador modular de Roche y los resultados se expresaron en mg/dl.

Principio de la técnica Es un test por radiación ultravioleta. La hexoquinasa (HK) cataliza la fosforilación de la glucosa a glucosa-6-fosfato. La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) oxida la glucosa-6-fosfato en presencia de NADP a gluconato-6-fosfato. No se oxidan otros hidratos de carbono. La velocidad de formación de NADPH durante la reacción es directamente proporcional a la concentración de glucosa y puede medirse fotométricamente (ver figura 4).

$$\text{Glucosa} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{HK}} \text{G-6-P} + \text{ADP}$$

$$\text{G-6-P} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{G-6-PDH}} \text{gluconato-6-P} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

Figura 4.

Preparación de la muestra

Utilizar 300µl de la muestra de suero para ensayar directamente o congelar a -20ºC. Evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación.

c. Triglicéridos(TG)

Para medir los niveles de triglicéridos se utilizó el kit triglicéridos GPO-PAP (Roche). Su determinación se llevó a cabo en un analizador modular de Roche y los resultados se expresaron en mg/dl.

Principio de la técnica

Es un test enzimático colorimétrico. Este método se basa en el trabajo de Wahlefeld empleando una lipasa lipoproteica (LPL) obtenida de microorganismos para hidrolizar completa y rápidamente triglicéridos a glicerol, con la oxidación subsiguiente a dihidroxiacetonafosfato y peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno formado reacciona bajo la acción catalítica de la peroxidasa con la 4-aminofenazona y 4-clorofenol para formar un colorante rojo en una reacción de punto final según Trinder. La intensidad del colorante es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos y puede medirse fotométricamente.

Preparación de la muestra

Utilizar 300µl de la muestra de suero para ensayar directamente o congelar a -20ºC. Evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación.

d. Colesterol total (CT)

Para medir los niveles de colesterol total (CT) se utilizó el kit Colesterol (Roche). Su determinación se llevó a cabo en un analizador modular de Roche y los resultados se expresaron en mg/dl.

Principio de la técnica

Es un test enzimático colorimétrico. Los ésteres de colesterol se desdoblan por la acción de la colesterol-esterasa a colesterol libre y ácidos grasos. La colesteroloxidasa cataliza entonces la oxidación del colesterol a colest-4-en-3-one y peróxido de hidrógreno. Bajo la acción catalítica de la peroxidasa, el peróxido de hidrógeno formado reacciona con 4-aminofenazona y fenol para formar un colorante rojo. La intensidad cromática es directamente proporcional a la concentración de colesterol y puede medirse fotométricamente.

Preparación de la muestra

Utilizar 300µl de la muestra de suero para ensayar directamente o congelar a -20ºC. Evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación.

e. Colesterol HDL (HDL-c)

Para medir los niveles de colesterol HDL se utilizó el kit Colesterol HDL cobas (Roche). Su determinación se llevó a cabo en un analizador modular de Roche y los resultados se expresaron en mg/dl.

Principio de la técnica Es un test colorimétrico enzimático homogéneo. En presencia de iones de magnesio, el sulfato de dextrano forma complejos solubles en agua, selectivamente con LDL, VLDL y quilomicrones resistentes contra las enzimas modificadas por polietilenglicol (PEG). La concentración de colesterol HDL se

determina enzimáticamente por la colesterolesterasa acopladas con PEG a los grupos amínicos (aprox. 40%). La colesterolesterasa provoca el desdoblamiento de los ésteres de colesterol a colesterol libre y ácidos grasos. En presencia de oxígeno, el colesterol se oxida por la colesteroloxidasa a Δ4-colestenona y peróxido de hidrógeno. Bajo la acción catalítica de la peroxidasa, el peróxido de hidrógeno formado reacciona con 4-aminoantipirina y N-(2-hidroxi-3-sulfopropilo)-3,5-dimetoxianilina sódica (HSDA) para formar un colorante purpúreo azul. La intensidad del colorante es directamente proporcional a la concentración de colesterol que se mide fotométricamente.

Preparación de la muestra

Utilizar 300µl de la muestra de suero para ensayar directamente o congelar a -20ºC. Evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación.

f. Colesterol LDL

Para determinar los niveles de colesterol LDL en sangre se utilizó un kit colesterol LDL cobas (Roche). Su determinación se llevó a cabo en un analizador modular de Roche y los resultados se expresaron en mg/dl.

Principio de la técnica

Es un test colorimétrico enzimático homogéneo. La colesterolesterasa provoca el desdoblamiento de los ésteres de colesterol a colesterol libre y ácidos grasos. En presencia de oxígeno, el colesterol se oxida por lo colesteroloxidasa a Δ4-colestenona y peróxido de hidrógeno. Bajo la acción catalítica de la peroxidasa, el peróxido de hidrógeno formado reacciona con 4-aminoantipirina y N-(2-hidroxi-3-sulfopropilo)-3,5-dimetoxianilina sódica (HSDA) para formar un colorante purpúreo azul. La intensidad del colorante es directamente proporcional a la concentración de colesterol que se mide fotométricamente.

Preparación de la muestra

Utilizar 300µl de la muestra de suero para ensayar directamente o congelar a -20ºC. Evitar ciclos repetidos de congelación-descongelación.

g. Somatomedina C o IGF-1

Principio de la técnica

Los niveles de IGF-1 se midieron mediante un kit comercial IRMA (IMMUNOTECH SA, Marseille, France) con una sensibilidad de 6 mU/l. Los resultados se expresaron en ng/ml.

El ensayo immunoradiométrico de Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) es un análisis de tipo sandwich. El equipo utiliza anticuerpos monoclonales de ratón dirigidoscontra dos epítopos diferentes de la IGF-I y reaccionan sin competición. Con el fin de liberar IGF-I de sus proteínas enlazadas, es necesaria una primera reacción para disociarlas es necesaria. Las muestras y los calibratores se incuban en tubos recubiertos con el primer anticuerpo monoclonal en presencia del segundo anticuerpo monoclonal el cual está marcado con Iodo 125. Después de la incubación se aspira el contenido en los tubos y se mide la radiactividad enlazada. Los valores desconocidos son determinados por interpolación con la ayuda de la curva estándar. La cantidad de radioactividad es directamente proporcional a la concentración de IGF-I en la muestra.

Preparación de las muestras

Adicionar 400 µL de agentes precipitantes (vendidos aparte cat. No. A09775)

a 400 µL del control o muestras desconocidas en tubos de polipropileno o vidrio.

h. Insulina basal

La determinación de insulina se practicará por electroquimioluminiscencia mediante técnica comercial (Roche diagnostic), expresándose los resultados en µU/ml.

Principio de la técnica

Técnica sándwich con una duración total de 18 minutos.

- 1° incubación: La insulina de 20 µl de muestra, un anticuerpo monoclonal específico anti-insulina biotinilado y un anticuerpo monoclonal específico anti-insulina marcado con quelato de rutenio forman un complejo sándwich.
- 2° incubación: Después de la incorporación de micropartículas recubiertas de estreptavidina, el complejo formado se fija a la fase sólida por la interacción entre biotina y estreptavidina.

La mezcla de reacción es trasladada a la célula de lectura donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan temporalmente a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente con el reactivo ProCell. Al aplicar una corriente eléctrica definida se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide directamente con un fotomultiplicador. Los resultados se obtienen mediante una curva de calibración. Los resultados se obtienen a partir de una curva de calibración realizada en el sistema mediante una calibración a dos puntos y una curva máster incluida en el código de barras del reactivo.

Preparación de la muestra

Los reactivos incluidos en el estuche están listos para el uso y forman una unidad inseparable. Toda la información necesaria para el correcto funcionamiento se introduce automáticamente en el analizador a través del código de barras del reactivo.

Resistencia a la insulina

La RI será valorada mediante el índice HOMA calculado como **glucosa** (mmol/l) **x insulina** (μU/ml) **/22,5**. Valores mayores o iguales a 3 son considerados como indicadores de RI.

B.3.PARÁMETROS CLÍNICOS:

Se midió la presión arterial en un mínimo de 2 ocasiones en cada paciente, tras 5 minutos de reposo y utilizando un esfigmomanómetro de mercurio validado y calibrado en el último año.

Se realizó el *Indice de masa corporal (IMC)*, medido como relación entre el peso del paciente en kilogramos y su talla al cuadrado expresada en metros, por lo que sus unidades son kg/m^2; y el *perímetro de la cintura*, medido en el punto de máxima circunferencia y expresado en cm. Ambas variables antropométricas se tomaron con el paciente en ropa ligera y sin zapatos. También se expresó la edad en años y el peso en kilogramos.

C) Análisis estadístico.

El tratamiento estadístico de los datos se hizo mediante el programa SPSS 15.0, o superior, para Windows.

Se empleará el test no paramétrico U de Mann-Whitney para estudiar las posibles diferencias significativas entre los dos grupos de nuestro estudio, debido al escaso tamaño muestral que utilizaremos (n = 15) y a que ninguna de las variables probablemente siga una distribución normal. El umbral de significación que se utilizará será $p < 0.05$. Los datos estarán representados por el percentil 50 o p50 seguido de p25 y p75.

2. DISEÑO DEL ESTUDIO EXPERIMENTAL

La función vascular será analizada mediante miografía de alambre en arterias intactas de resistencia subcutánea que se obtendrán de 5 pacientes con DGHA no tratados y 5 controles sanos y voluntarios.

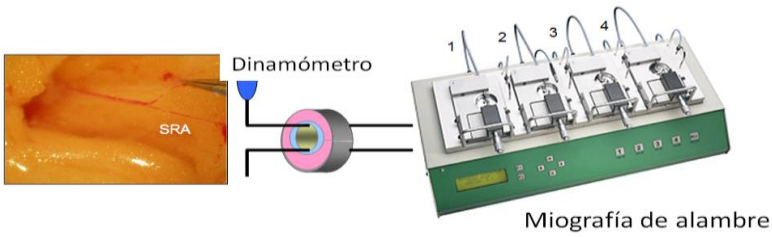


Figura 5

De esta muestra de pacientes se obtienen cuatro segmentos arteriales y se realizará el protocolo utilizando baños de órganos aislados para registro de tensión isométrica (Danish Myotechnology, Aarhus, Denmark), (figura 5). Se recoge en primer lugar biopsias de grasa (3x3x3 cm) subcutánea procedentes de la región abdominal anterior y se colocan en un recipiente con una solución de suero salino frío, siendo inmediatamente son transportadas del quirófano al laboratorio. Desde que se extraen hasta que llegan al laboratorio transcurren de 10-20 minutos. Una vez en el laboratorio se lava la muestra sustituyendo de la solución de suero salino varias veces. Para su disección, la grasa se deposita en un recipiente con el fondo cubierto por una silicona inerte (Silex) donde se ancla la muestra mediante agujas entomológicas y se cubre con salino frío. La disección se lleva a cabo con la ayuda de una lente inocular –Olympus SZ61- Con la ayuda de dos pinzas y unas tijeras las arterias se dejan libres de la mayoría del tejido conectivo. Las arterias disecadas se depositan en una placa de petri que también tiene el fondo de sílex, donde se terminan de limpiar y se cortan en segmentos

de 2 mm de longitud. En este proceso transcurren dos horas y media aproximadamente. El diámetro de los vasos es de 200-500µm. Posteriormente estos segmentos se montan en baños de órganos aislados para el registro de la tensión isométrica. La preparación experimental consiste en introducir a través de la luz del cilindro vascular dos alambres finos y rígidos de acero inoxidable de 100µm de diámetro cada uno. Cada extremo del alambre se ancla a una mandíbula metálica a través de dos tornillos. Una de las mandíbulas está conectada a un transductor de fuerza mientras que la otra está unida a un tornillo micrométrico (figura 6). La normalización se llevará a cabo después del montaje de las arterias de resistencia y consiste en aplicar a las arterias tensiones crecientes hasta alcanzar una presión de 100mmHg (estado fisiológico). Para conseguirlo utilizaremos el software Myonorm. Después de normalizarlas, las arterias se mantienen en situación de reposo hasta que adquieran su tono basal.

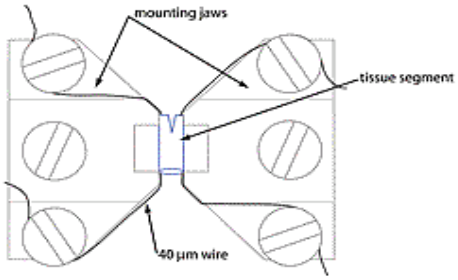


Figura 6.

A. Protocolo experimental

En primer lugar se probó la capacidad funcional del músculo liso arterial valorando el efecto contráctil del cloruro potásico (75mM). Tras esta prueba se realizaron varios lavados hasta que se recuperara la tensión pasiva. Posteriormente se registró la respuesta

contráctil a concentraciones crecientes de noradrenalina(NA), seguido de valoración de respuesta vasodilatadora a concentraciones acumulativas de acetilcolina(ACh).

1. Concentraciones acumulativas de NA: 10^{-8}, 3 x, 10^{-8}, 10^{-7}, 3 x 10^{-7}, 10^{-6}, 3 x 10^{-6}, 10^{-5}.

2. Concentraciones acumulativas de Ach: 10^{-8}, 3 x, 10^{-8}, 10^{-7}, 3 x 10^{-7}, 10^{-6}, 3 x 10^{-6}, 10^{-5}.

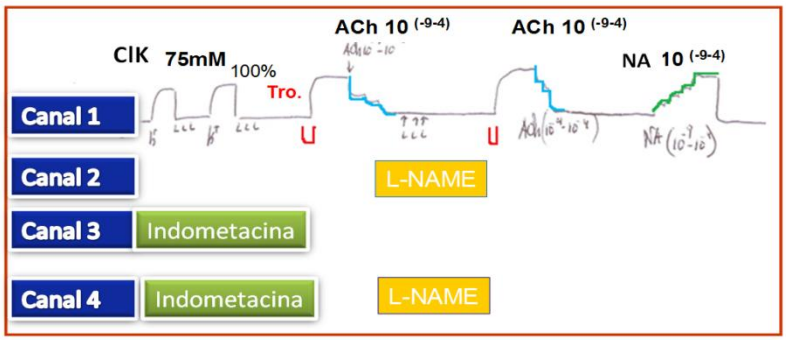


Figura 7

3. El protocolo de ACh se repitió tras 30 minutos de incubación con un inhibidor de la óxido nítrico sintetasa (L-NAME), previa vasocontricción con NA 10^{-5}.

4. El protocolo de ACh se repitió tras 30 minutos de incubación con un inhibidor de ciclooxigenasa (Indometacina), previa vasocontricción con NA 10^{-5}(figura 7).

La recogida de las muestras de grasa y los estudios realizados fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital "Virgen del Rocío" de Sevilla.

B. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado mediante SPSS versión 15.0 para Windows.

Los resultados se expresan como la media ± el error estándar de la media. La relajación a la ACh se expresó como el porcentaje del tono alcanzado basal y tras incubación con L-NAME. La vasoconstricción NA se expresó como el porcentaje de KCl (75mM). Con estos datos se realizaron las gráficas que muestran las curvas concentración-respuesta. La pD2 (sensibilidad vascular) para cada curva concentración-respuesta fue calculada como el logaritmo negativo de la concentración que produce el 50% del efecto máximo mediante interpolación geométrica. En cada caso, $p<0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. El test de Bonferroni se utilizó para reducir el riesgo de error tipo I cuando se analizaron múltiples tests de significación estadística. Se utilizó el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney para el análisis de los resultados correspondientes a la tensión que presentan las arterias de resistencia tras 1 hora de relajación después de normalizar.

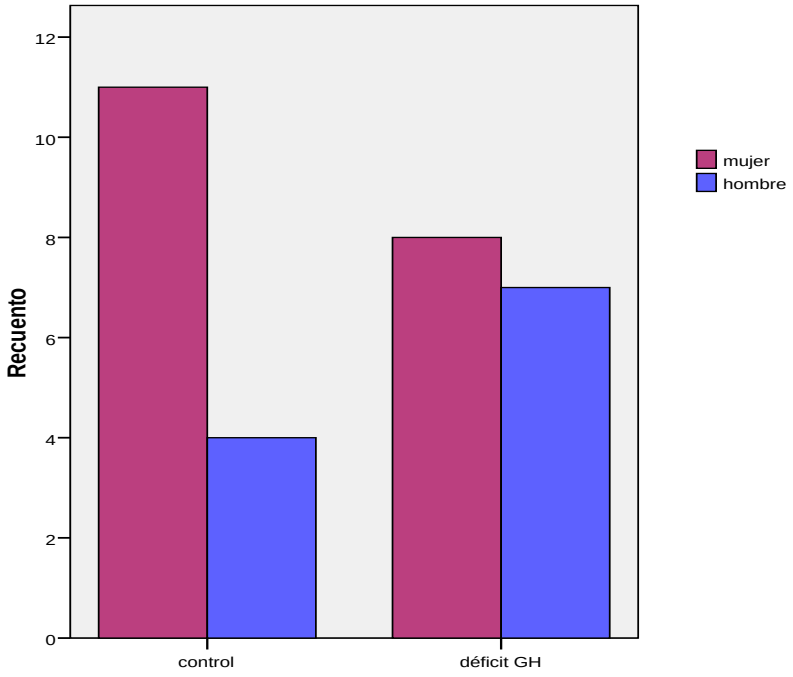
E. RESULTADOS

1. MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

La muestra a analizar estaba constituida por 30 individuos, 15 de ellos estaban diagnosticados de DGHA durante el periodo comprendido entre 2006 y 2008. Los 15 restantes se trataban de controles sanos de similares características.

El grupo con DGHA lo formaban 8 mujeres (53.3%) y 7 hombres (46.7%). En el grupo control estudiamos 11 mujeres (73.3%) y 4 hombres (26.7%). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución por sexos entre ambos grupos (figura 1).

Figura 1.



Dentro del grupo con DGHA se registraron diferentes etiologías (ver figura 2): 6 casos (40%) de traumatismo craneoencefálico diagnosticados al menos 12 meses antes del déficit de GH; 5 casos (33.33%) de Síndrome de Cushing tratados quirúrgicamente

con criterios actuales de curación; 1 caso (6.67%) de cáncer de cavum tratado con radioterapia; 1 caso (6.67%) de hipoplasia adenohipofisaria; 1 caso (6.67%) de acromegalia y 1 caso (6.67%) de displasia septóptica.

ETIOLOGÍAS

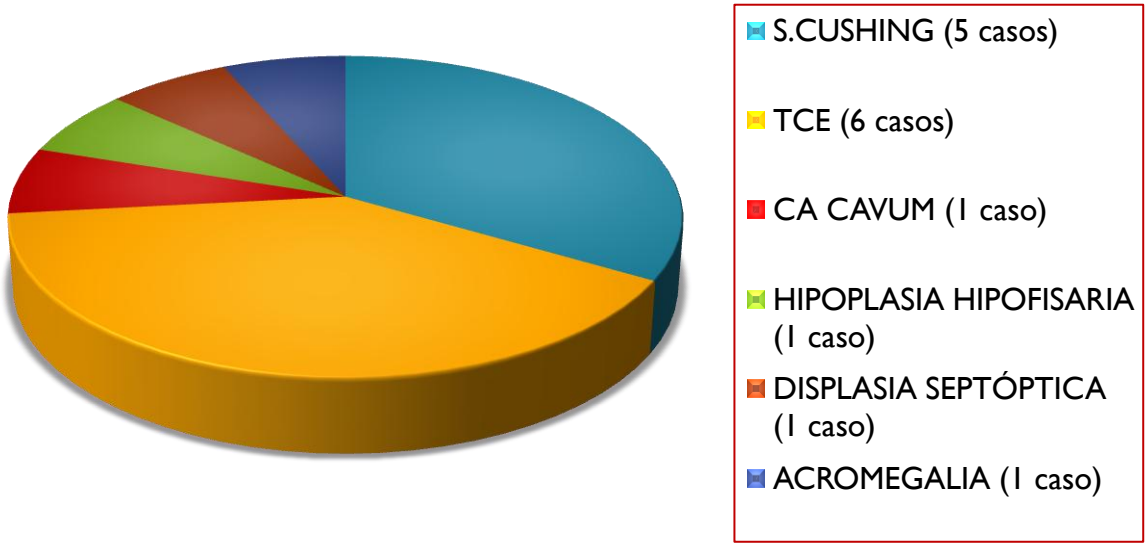


Figura 2.

1.1. Parámetros clínicos

En la tabla 1 describimos las características basales clínicas de ambos grupos. Expresamos los resultados utilizando la mediana o p50, con el rango intercuartílico (p25-p75) dada la no normalidad en la distribución de algunas de las variables. Se utilizó un test no paramétrico (U de Mann-Whitney) para la comparación entre ambos grupos ya que contábamos con menos de 30 individuos en cada muestra.

Tabla 1.

PARÁMETROS CLÍNICOS	DGHA (n=15)	CONTROL (n=15)	p
EDAD (años)	47 (37-57)	33 (31-47)	0.16
PAS *(mmHg)	125 (110-130)	115 (110-125)	0.11
PAD* (mmHg)	70 (60-80)	60 (60-70)	***0.03***
FC *(lpm)	67 (62-73)	63 (60-71)	0.19
PESO (Kg)	69.9 (62.5-82.5)	70 (64-80)	0.9
IMC* (Kg/m²)	25.4 (22.9-27.7)	24.1 (22.2-28)	0.54
CINTURA (cm)	86 (82-85)	83 (68-89)	0.09
ICC*	0.86 (0.81-0.91)	0.77 (0.67-0.82	***0.007***

* PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica; FC: frecuencia cardiaca; IMC: índice de masa corporal.

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, excepto en los valores de presión arterial diastólica (PAD) y el índice de cintura-cadera (ICC), siendo éstos significativamente mayores en el grupo con DGHA (figuras 3 y 4).

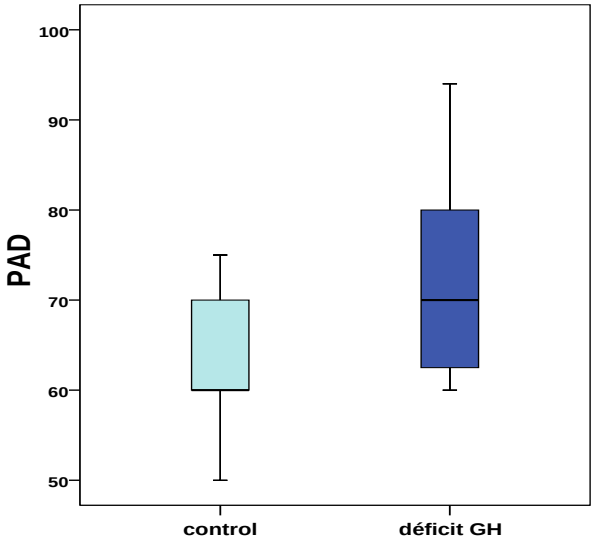


Figura 3.

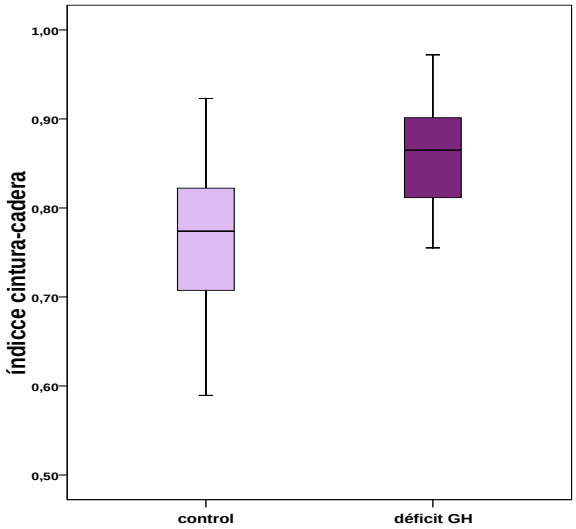


Figura 4.

Podemos observar que, aunque no existían diferencias estadísticamente significativas en el perímetro de cintura, había una tendencia a valores mayores en el grupo con DGHA (figura 5).

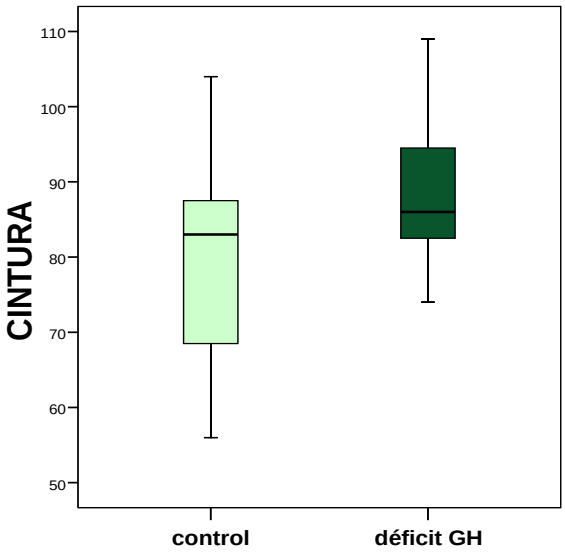


Figura 5.

1.2. Marcadores bioquímicos tradicionales

En la tabla 2, comparamos los parámetros bioquímicos convencionales en ambos grupos, utilizando el test no paramétrico de U de Mann-Whitney y representando los datos por su mediana (p50) y rango intercuartílico (p25-p75).

Tabla 2.

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	DGHA (n=15)	CONTROL (n=15)	p
GLUCEMIA (mg/dl)	78 (56.5-89.5)	78 (76-87)	0.35
HOMA*	2.2 (0.6-2.6)	1.4 (0.7-2.3)	0.33
COLESTEROL (mg/dl)	236 (153-286.5)	173 (159-198)	***0.029***
HDL-C*(mg/dl)	60 (44.5-74.5)	54 (48-68)	0.59
LDL-C* (mg/dl)	130 (87-177)	95 (85-122)	0.08
TG*(mg/dl)	157 (45.5-271.5)	61 (53-74)	***0.006***
INSULINA (µU/ml)	10.6 (4.4-11.9)	7.3 (4.2-11.9)	0.41
IGF-1*(ng/ml)	102 (58.9-177.5)	162 (131-207)	0.31
FFA* (µmol/l)	308.8 (211.6-527.1)	316.8 (291.3-402.3)	0.75

***** HOMA: índice de resistencia a insulina; HDL-C: HDL colesterol; LDL: LDL colesterol; TG: triglicéridos; IGF-1: somatomedina 1; FFA: ácidos grasos libres.

Encontramos diferencias estadísticamente significativas en los valores de colesterol total y triglicéridos, siendo ambos más elevados en el grupo de pacientes con DGHA (figura 6).

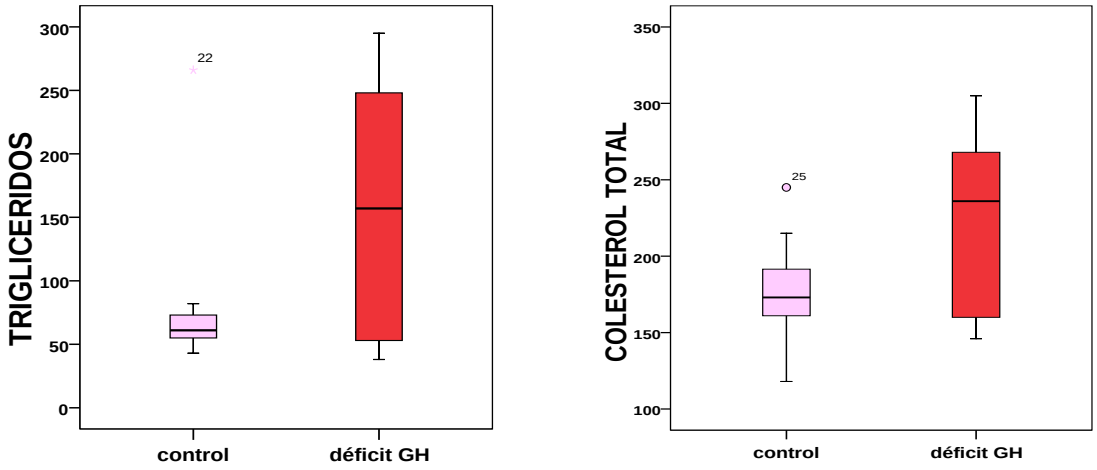


Figura 6.

Como podemos comprobar, existía también un aumento del colesterol LDL (LDL-c) en el grupo de pacientes con DGHA comparado con los controles sanos, aunque la diferencia no llega a ser estadísticamente significativa (figura 7).

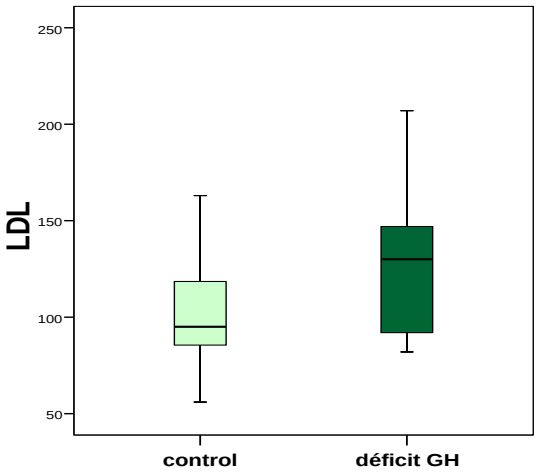


Figura 7.

1.3.Marcadores de adhesión

En la tabla 3, describimos la comparación de los marcadores de adhesión celular entre el grupo DGHA y el control.

Tabla 3.

MARCADORES ADHESIÓN	DGHA (n=15)	CONTROL (n=15)	p
VCAM-1* (ng/ml)	714 (639-792)	460(339.7-479.3)	***0.002***
SP-SELECT*(ng/ml)	5.5 (2.5-18.2)	3.7(3.1-4.6)	0.24
SCD-40L*(ng/ml)	0.8(0.4-1.5)	0.6(0.4-0.7)	0.42

***** VCAM-1: molécula de adhesión vascular-1; SP-SELECT: P-selectina soluble; SCD-40L: ligando soluble de CD40

VCAM-1 se encontraba claramente elevado en pacientes con DGHA con respecto a los controles sanos, siendo los resultados estadísticamente significativos (figura 8).

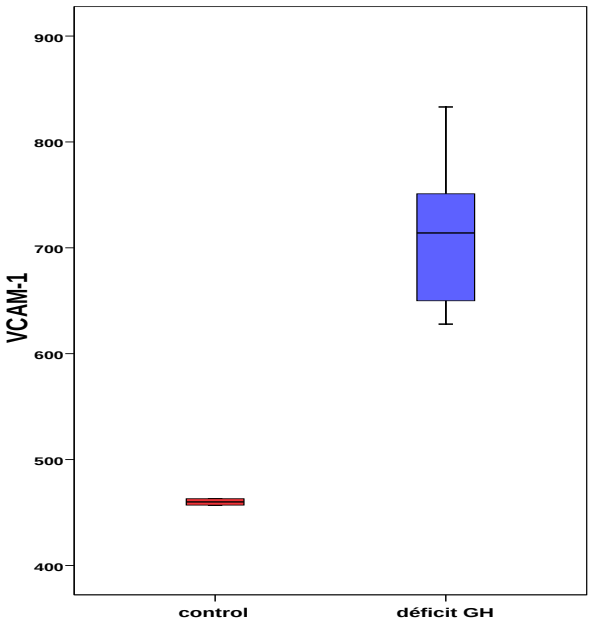


Figura 8.

Por otro lado, existe correlación de tipo lineal entre los niveles de VCAM-1 y el déficit de GH, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.719. En este contexto, podemos deducir que el 72% del valor del VCAM-1 se puede explicar solamente por la presencia del déficit de GH del adulto de forma estadísticamente significativa (tabla 4). El hecho de padecer la enfermedad (DGHA), aumenta por sí misma 259.5ng/ml el valor del VCAM-1 con respecto al basal (en casos de no DGHA).Ver ecuación de regresión (tabla 5).

Tabla 4.

Resumen del modelo									
Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio				
	Cambio en R cuadrado	Cambio en F	gl1	gl2	Cambio en R cuadrado	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. del cambio en F
1	,848(a)	,719	,691	88,792	,719	25,624	1	10	,000
a Variables predictoras: (Constante), 0:control; 1: déficit GH									
b Variable dependiente: VCAM-1									

Tabla 5.

Coeficientes								
Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.	Intervalo de confianza para B al 95%	
		B	Error típ.	Beta			Límite inferior	Límite superior
1	(Constante)	429,000	36,249		11,835	,000	348,232	509,768
	0:control; 1: déficit GH	259,500	51,264	,848	5,062	,000	145,277	373,723
a Variable dependiente: VCAM-1								

La SP- Selectina y el SCD 40L fueron ambos más elevados en el grupo DGHA, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas (figura 9).

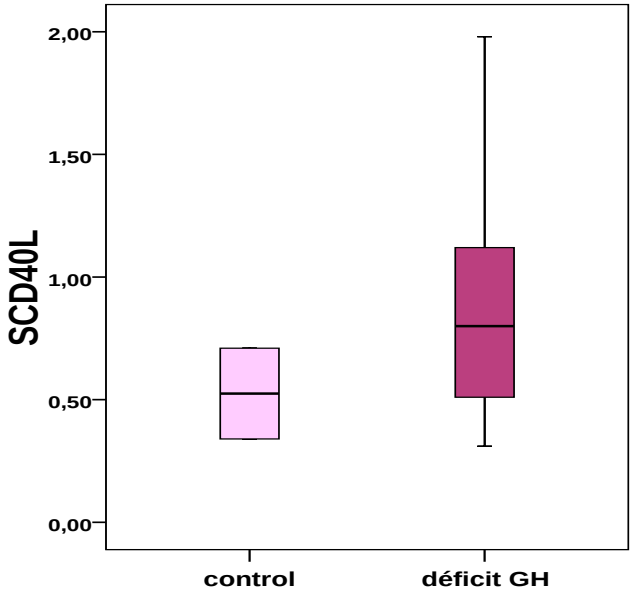


Figura 9.

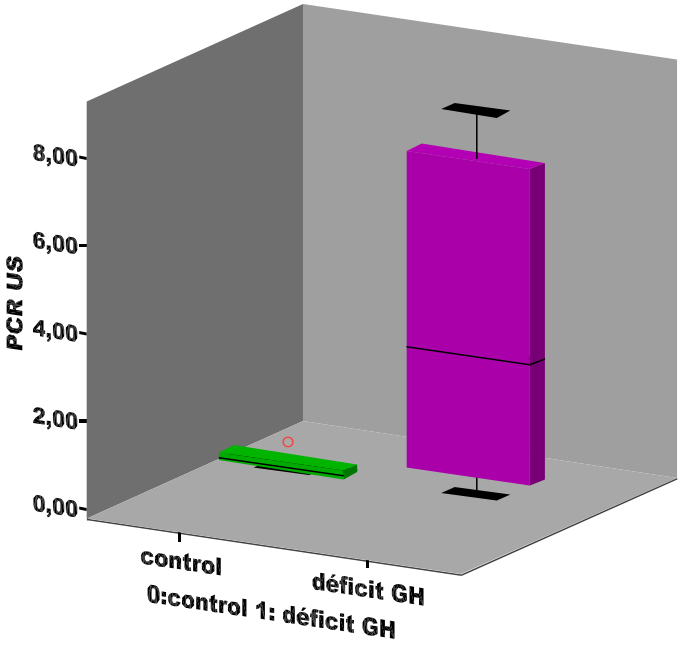
1.4. Marcadores de inflamación

Observamos un aumento estadísticamente significativo de los 3 marcadores de inflamación (PCR, IL-6 y TNF-α), en el grupo de pacientes con DGHA con respecto al grupo control, tal y como se muestra en la tabla 6 y figura 10.

Tabla 6.

MARCADORES INFLAMATORIOS	DGHA (n=15)	CONTROL (n=15)	p
PCR (µg/L)	3.4 (0.5-8.2)	0.3 (0.2-0.5)	***0.04***
IL-6*(pg/ml)	1.3 (1.1-10.3)	0.7 (0.5-0.7)	***0.002***
TNF-α*(pg/ml)	4.6 (1.2-18-2)	1.0 (1.0-2.1)	***0.026***

***** IL-6: interleukina 6; TNF-α: factor de necrosis tumoral α.


8,00
6,00
4,00
2,00
0,00
PCR US
control
déficit GH
0:control 1: déficit GH

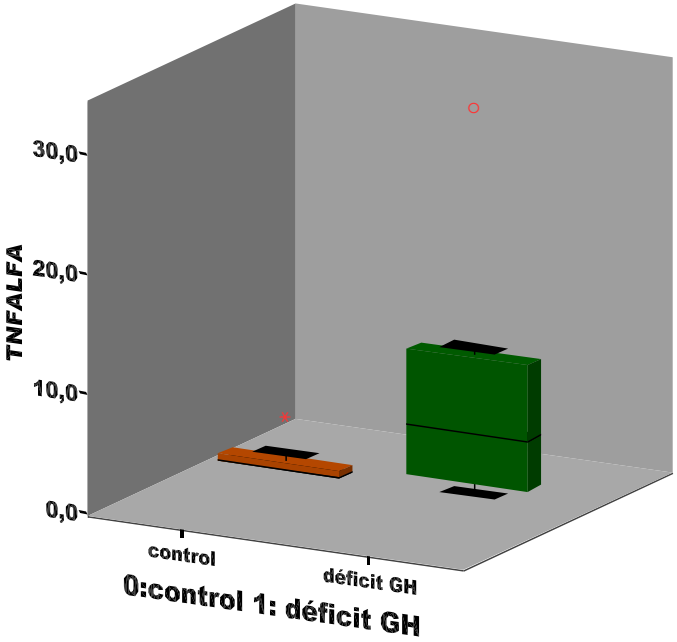

30,0
20,0
10,0
0,0
TNFALFA
control
déficit GH
0:control 1: déficit GH

Figura 10.

Existe correlación de tipo lineal entre los niveles de PCR y el déficit de GH, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.382. En este contexto, podemos deducir que un 38% del valor total de la PCR se puede explicar solamente por la presencia del déficit de GH del adulto de forma estadísticamente significativa (tabla 7). El hecho de padecer la enfermedad (DGHA), aumenta por sí misma 3.76 µg/L el valor de la PCR con respecto al basal (en casos de no DGHA).Ver ecuación de regresión (tabla 8).

Tabla 7.

Resumen del modelo									
Modelo	**R**	**R cuadrado**	**R cuadrado corregida**	**Error típ. de la estimación**	**Estadísticos de cambio**				
	Cambio en R cuadrado	**Cambio en F**	**gl1**	**gl2**	**Cambio en R cuadrado**	**Cambio en F**	**gl1**	**gl2**	**Sig. del cambio en F**
1	,618(a)	,382	,320	2,62	,382	6,367	1	10	,032
a Variables predictoras: (Constante), 0:control; 1: déficit GH									
b Variable dependiente: PCR									

Tabla 8.

Coeficientes								
Modelo		**Coeficientes no estandarizados**		**Coeficientes estandarizados**	**t**	**Sig.**	**Intervalo de confianza para B al 95%**	
		B	**Error típ.**	**Beta**			**Límite inferior**	**Límite superior**
1	**(Constante)**	0,333	1,072		0,311	,0762	-2,054	2,721
	0:control; 1: déficit GH	3,7767	1,516	,618	2,485	,032	0,390	7,144
a Variable dependiente: PCR								

1.5. Marcadores de disfunción endotelial

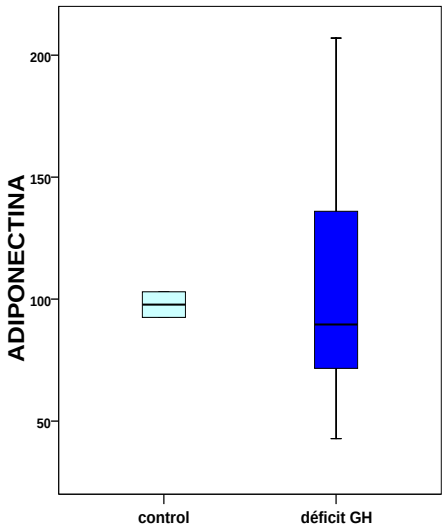
Con respecto a los marcadores de disfunción endotelial, cabe destacar una disminución importante, aunque no estadísticamente significativa, de la Adiponectina en pacientes con DGHA con respecto a los controles.

Los valores de óxido nítrico (NO) fueron claramente inferiores en el grupo con DGHA frente a individuos control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Estos valores se muestran en la tabla 9 y figura 11.

Tabla 9.

MARCADORES DISFUNCIÓN ENDOTELIAL	DGHA (n=15)	CONTROL (n=15)	p
ADIPONECTINA (ng/ml)	89.6 (57.2-171.5)	129.5 (100.4-248.5)	0.093
NO*(mmol/mg proteína)	25.6 (16.3-29.3)	36.4 (29.6-43.6)	***0.032***

***** NO: óxido nítrico.



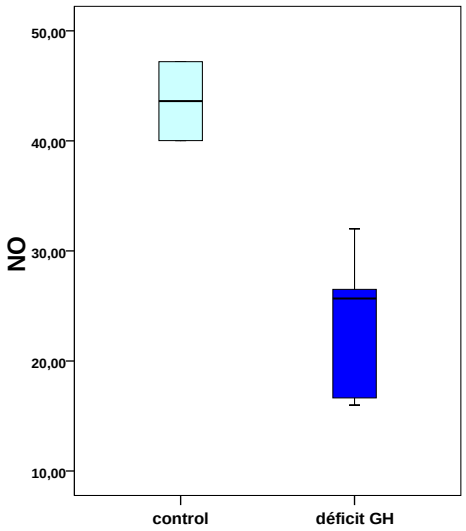


Figura 11.

Existe correlación de tipo lineal negativa entre los niveles de NO y el déficit de GH, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.511. En este contexto, podemos deducir que un 51% del valor total del NO se puede explicar solamente por la presencia del déficit de GH del adulto de forma estadísticamente significativa (tabla 10). El hecho de padecer la enfermedad (DGHA), disminuye por sí misma 13.18 mmol/mg proteína el valor de la NO con respecto al basal (en casos de no DGHA).Ver ecuación de regresión (tabla 11).

Tabla 10.

Resumen del modelo									
Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación	Estadísticos de cambio				
	Cambio en R cuadrado	Cambio en F	gl1	gl2	Cambio en R cuadrado	Cambio en F	gl1	gl2	Sig. del cambio en F
1	,715a)	,511	,450	7,205	,511	8,365	1	8	,02
a Variables predictoras: (Constante), 0:control; 1: déficit GH									
b Variable dependiente: NO									

Tabla 11.

Coeficientes								
Modelo		**Coeficientes no estandarizados**		**Coeficientes estandarizados**	**t**	**Sig.**	**Intervalo de confianza para B al 95%**	
		B	**Error típ.**	**Beta**			**Límite inferior**	**Límite superior**
1	**(Constante)**	36,546	3,222		11,342	,000	29,115	43,97
	0:control; 1: déficit GH	-13,180	4,557	-,715	-2,892	,020	-23,68	-2,67
a Variable dependiente: NO								

1.6. Marcadores de estrés oxidativo

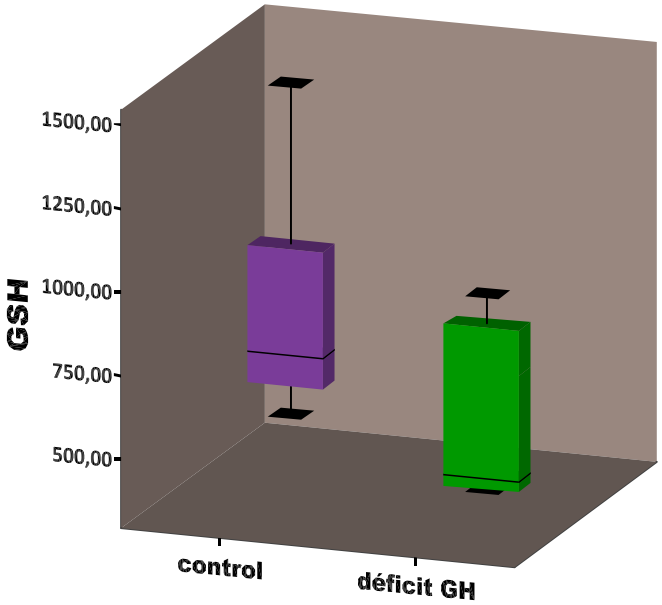
Encontramos un aumento estadísticamente significativo del estado antioxidante total (TAS), de la LDL oxidada (LDL-ox) y de la glutatión-sulfotransferasa (GST), en pacientes con DGHA con respecto al grupo control.

Destacó también un descenso llamativo de los niveles de glutatión reducido (GSH) y glutatión reducido total (GSHt) en los individuos con DGHA, aunque sin tratarse de un hallazgo estadísticamente significativo. Se describen los resultados en tabla 12 y figuras 12, 13 y 14.

MARCADORES ESTRÉS OXIDATIVO	DGHA (n=15)	CONTROL (n=15)	p
GSH*(µmol/l)	385.5 (349.8-857.1)	697.5 (579.9-1135.4)	0.13
GSSG*(µmol/l)	19.7 (14.7-26.3)	25.8 (18.4-42.1)	0.69
GSHt *(µmol/l)	409.4 (364.4-881.3)	751.9(624.4-1213.1)	0.13
GSH/GSSG*	22.6 (17.9-34.6)	21.4(17.2-44.2)	0.94
TAS*(µmol/l)	1199.7 (1145.7-1340.1)	1013.6(959.5-1082.4)	***0.015***
GPX-1*(U/grHb)	53.3 (33.5-72.6)	49.7(37.8-54.5)	0.69
GRX*(mU/grHb)	6900.3 (5353.1-7577.5)	6962.6(6137.2-8334.2)	0.94
GST*(ng/ml)	62.1 (48.9-95.5)	5.9(2.0-26.3)	***0.008***
VITAMINA-E (µg/dl)	451.8 (84.1-1468.5)	1786.1(1293.9-2300.9)	0.39
LDL-ox* (ng/ml)	163.5 (59.3-566)	33.2(20.8-70.6)	***0.026***

Tabla 12.

* GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; GSHt: glutatión reducido total; GSH/GSSG: cociente glutatión reducido/oxidado; TAS: capacidad antioxidante total; GPX-1: glutatión peroxidasa-1; GRX: glutatión reductasa; GST: glutatión sulfotransferasa; LDL-ox: LDL oxidado.


GSH
1500,00
1250,00
1000,00
750,00
500,00
control
déficit GH

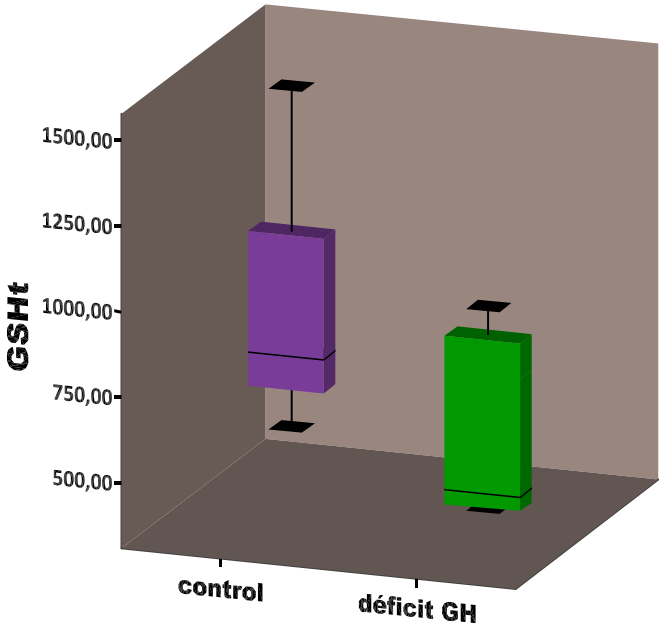
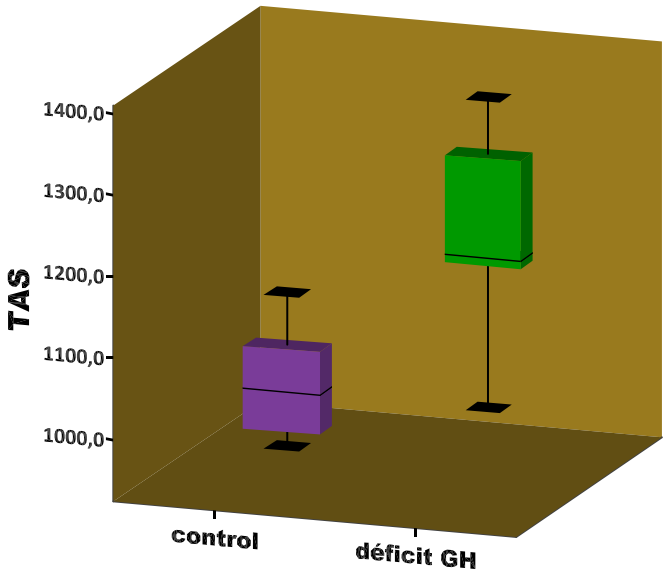

GSHt
1500,00
1250,00
1000,00
750,00
500,00
control
déficit GH

Figura 12.


TAS
1400,0
1300,0
1200,0
1100,0
1000,0
control
déficit GH

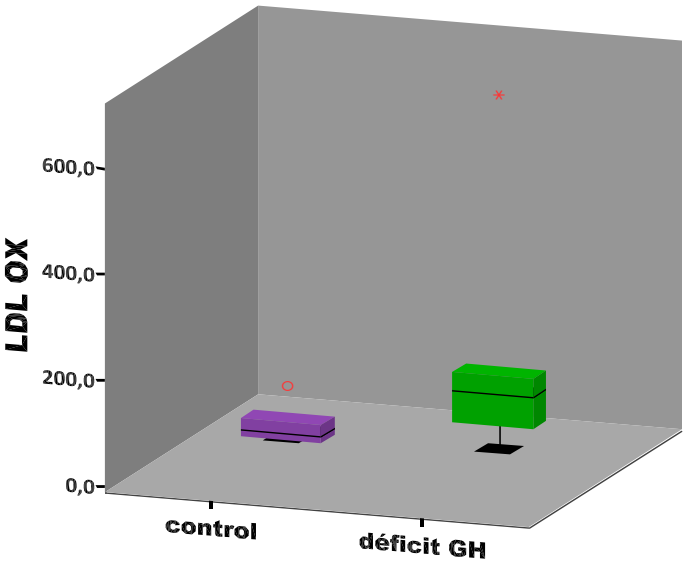

LDL OX
600,0
400,0
200,0
0,0
control
déficit GH

Figura 13.

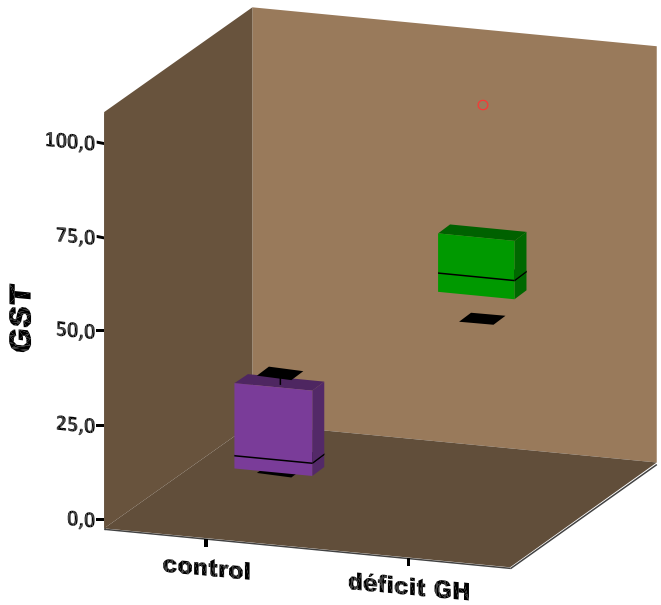


Figura 14.

Existe correlación de tipo lineal entre los niveles de TAS y el déficit de GH, con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.513. En este contexto, podemos deducir que un 52% del valor total del TAS se puede explicar solamente por la presencia del déficit de GH del adulto de forma estadísticamente significativa (tabla 13). El hecho de padecer la enfermedad (DGHA), aumenta por sí misma 197.41 µmol/l el valor del TAS con respecto al basal (en casos de no DGHA).Ver ecuación de regresión (tabla 14).

Tabla 13.

Resumen del modelo									
Modelo	**R**	**R cuadrado**	**R cuadrado corregida**	**Error típ. de la estimación**	**Estadísticos de cambio**				
	Cambio en R cuadrado	**Cambio en F**	**gl1**	**gl2**	**Cambio en R cuadrado**	**Cambio en F**	**gl1**	**gl2**	**Sig. del cambio en F**
1	,716(a)	,513	,465	105,295	,513	10,546	1	10	,009
a Variables predictoras: (Constante), 0:control; 1: déficit GH									
b Variable dependiente: TAS									

Tabla 14.

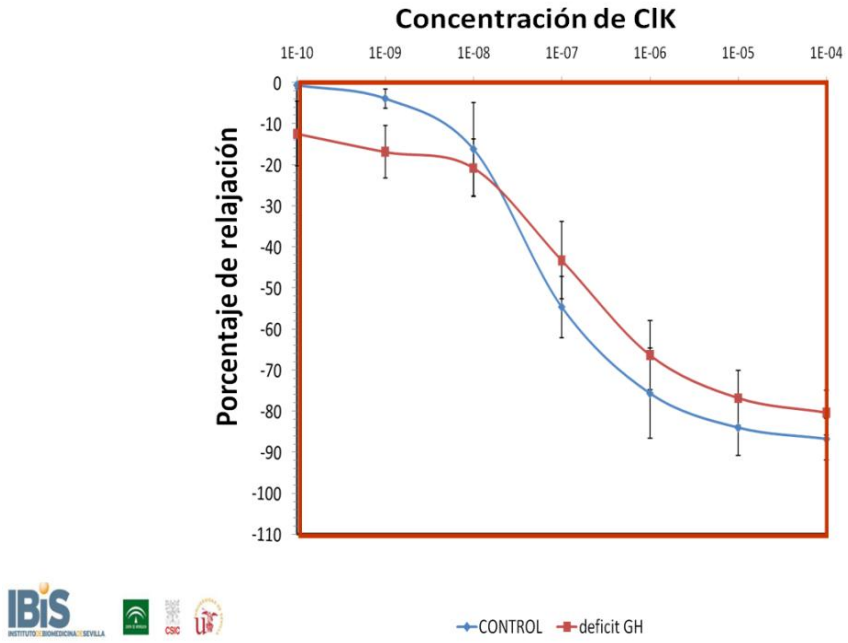
Coeficientes								
Modelo		**Coeficientes no estandarizados**		**Coeficientes estandarizados**	**t**	**Sig.**	**Intervalo de confianza para B al 95%**	
		B	**Error típ.**	**Beta**			**Límite inferior**	**Límite superior**
1	**(Constante)**	1021,95	42,98		23,77	,000	926,170	1117,730
	0:control; 1: déficit GH	197,417	60,79	,716	3,247	,009	61,964	332,870
a Variable dependiente: TAS								

2. ESTUDIO DE FUNCIÓN VASCULAR "EX VIVO"

Se analizó la función vascular en arterias de resistencia de pequeños vasos obtenidas de grasa subcutánea en 5 pacientes con DGHA y 5 controles sanos.

Las arterias de resistencia subcutáneas (ARS) mostraron la misma reactividad y vasoconstricción al cloruro potásico (ClK) y a la Noradrenalina (NA), tanto en pacientes con DGHA como en controles.

Figura 1.



En la figura 2 podemos observar cómo en la primera exposición a dosis crecientes de acetilcolina (ACh), el porcentaje de relajación vascular fue similar en ARS de pacientes DGHA y de controles sanos.

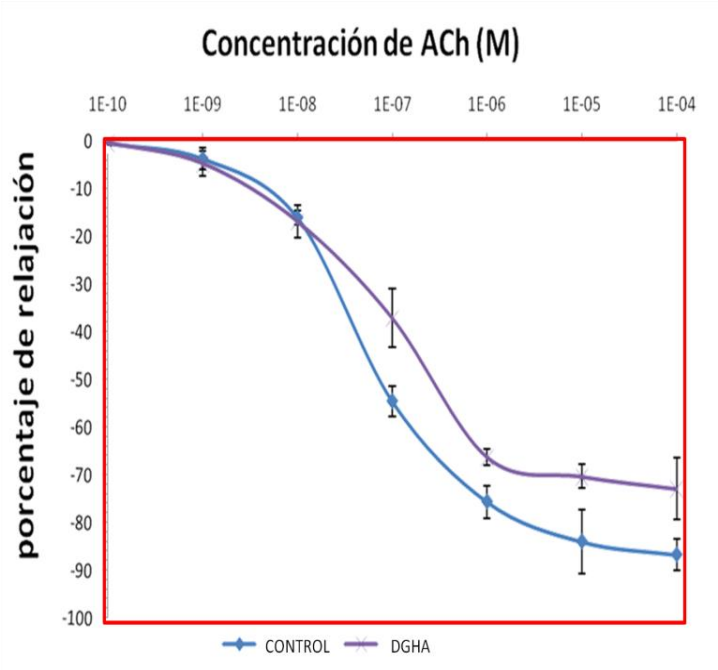


Figura 2.

En una segunda exposición a ACh, el grado de relajación vascular fue claramente inferior en pacientes con DGHA frente a controles, tal y como podemos ver en la figura 3.

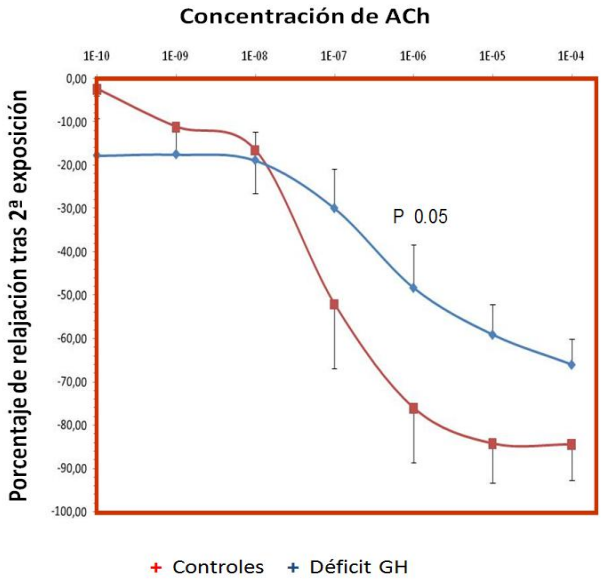


Figura 3.

Por último, la relajación vascular a ACh no pudo ser abolida tras preincubación con L-NAME (inhibidor de la óxido nítrico sintetasa) o Indometacina (inhibidor de la ciclooxigenasa), tanto en pacientes con DGHA como en controles sanos. Estos resultados los podemos apreciar en las figuras 4 y 5.

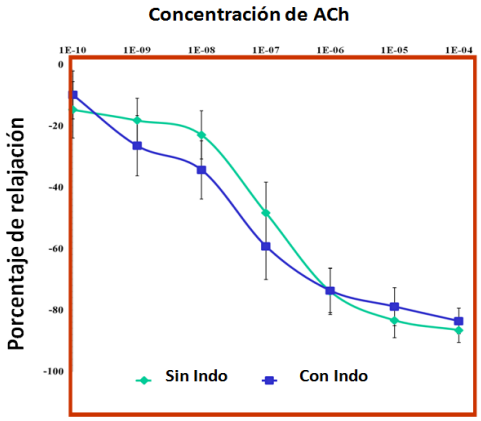


Figura 4. Efecto de la Indometacina en DGHA

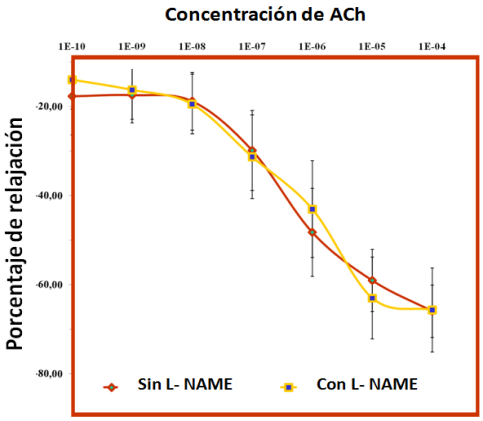


Figura 5. Efecto del L-NAME en DGHA

Figuras 4 y 5.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

F. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los adultos con hipopituitarismo sin adecuado tratamiento hormonal sustitutivo presentan una expectativa de vida reducida, en relación con un exceso de eventos cardiovasculares. Los pacientes con DGHA poseen un fenotipo similar al bien conocido síndrome metabólico, lo cual conlleva asociado un perfil de alto riesgo vascular. En general, el DGHA está ligado a un conjunto de alteraciones lipídicas, adiposidad visceral, resistencia a la insulina, hipertensión arterial, anormalidades de la estructura y función cardiaca, e incluso engrosamiento de la íntima-media de las principales arterias. Por todos estos motivos, el DGHA sin tratamiento hormonal sustitutivo es considerado hoy en día como el principal determinante del exceso de mortalidad del paciente con hipopituitarismo.

Aunque existen multitud de estudios que abordan el estudio de factores de riesgo del DGHA, utilizando parámetros clínicos y marcadores bioquímicos tradicionales (medición de perfil lipídico, glucemia…), pocos han contemplado la posibilidad de usar marcadores más novedosos y precoces en la arteriosclerosis, como son los parámetros de estrés oxidativo o disfunción endotelial. Aún menos son los trabajos que abordan el estudio de la función y estructura de la pared vascular como método de screening de aterosclerosis prematura.

Los estudios que estudian estrés oxidativo, función vascular y disfunción endotelial se caracterizan por ser muy escasos, utilizan muestras de pacientes muy pequeñas y poco comparables entre sí. Además los métodos y técnicas utilizadas para la medición del estrés oxidativo son muy variables entre los diferentes estudios. Los métodos para calcular y medir el grado de disfunción endotelial también difieren mucho en los diferentes estudios, oscilando entre medición de marcadores sanguíneos hasta los

que abordan el estudio de la función vascular utilizando técnicas de ecografía-doppler y más raramente técnicas de estudio “ex vivo” como la miografía de alambre.

1. MARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

1.1.Parámetros clínicos

Los estudios basados exclusivamente en parámetros clínicos y medición de marcadores bioquímicos tradicionales ofrecen únicamente una visión parcial del problema de la aterosclerosis. Es muy probable que las alteraciones en los parámetros tradicionales aparezcan más frecuentemente asociadas a una evolución larga de la enfermedad, en concreto, de la DGHA. Es posible que estos parámetros puedan ser normales al inicio de la enfermedad y por este motivo no se detecten en todos los pacientes.

En un estudio de Cataluña publicado en al año 2007, se estudiaron 20 pacientes con DGHA frente a controles sanos, encontrando una aumento significativo de triglicéridos y nivel de péptido C en los pacientes con respecto a sanos. Además los enfermos con DGHA presentaron un aumento del índice cintura-cadera (ICC) también estadísticamente significativo con respecto a controles(99).

Otros estudios han evidenciado una mayor tendencia a obesidad central y aumento del porcentaje de masa grasa en los pacientes con DGHA(100).

Con respecto a la tensión arterial, un estudio observacional español de aproximadamente 1000 pacientes con DGHA, encontró un aumento de la prevalencia de HTA de 22% frente a 15% en la población general(75). Más concretamente, se ha evidenciado un aumento de la actividad del sistema nervioso autónomo simpático en adultos con hipopituitarismo, lo que da lugar a un aumento aproximado de 10mmH en la presión arterial diastólica (PAD) en pacientes con DGHA con respecto a controles(101).

En nuestro grupo de pacientes con DGHA, apreciamos un aumento significativo en la medida de la PAD y del ICC con respecto a controles. Aunque no estadísticamente significativo, objetivamos también un mayor perímetro de cintura en los pacientes con DGHA. Estos hallazgos concuerdan con los encontrados por los autores previamente citados.

1.2.Marcadores bioquímicos tradicionales

En distintas publicaciones, se han objetivado alteraciones lipídicas en pacientes con DGHA. En concreto, se ha detectado un aumento del nivel de triglicéridos, junto con niveles elevados de LDL-c y normalidad o descenso de los niveles de HDL-c. En general, la severidad y tiempo de evolución del DGHA se correlaciona inversamente con el grado de alteración lipídica, de tal forma que a menores niveles de IGF-1, mayor es el aumento del LDL-c(71).

Con respecto al metabolismo glucídico, también se han descrito alteraciones. La resistencia a la insulina está íntimamente ligada al bien conocido síndrome metabólico, que a su vez está claramente asociado con un aumento de mortalidad cardiovascular. Pues bien, en adultos con DGHA se han objetivado niveles de insulina basal elevados, normales o disminuidos. Con certeza, el grado de obesidad puede ser un factor de confusión en la medición de estos niveles. A diferencia del síndrome metabólico, los pacientes con DGHA no se caracterizan por tener unos niveles muy elevados de insulina. Sin embargo, utilizando los métodos más sensibles para la detección de resistencia a la insulina, como es el clamp euglucémico hiperinsulinémico, se ha evidenciado una disminución de entre 2-3 veces de la sensibilidad a la insulina en pacientes con DGHA con respecto a controles sanos. Este hallazgo es evidente en los pacientes, a pesar de presentar niveles normales de glucemia venosa e insulina(102).

En nuestro grupo de pacientes, encontramos un aumento significativo de los niveles de colesterol total y de triglicéridos con respecto a controles. Aunque de manera no significativa, objetivamos un incremento de los niveles de LDL-c en los pacientes con DGHA con respecto a sanos. Por lo tanto, nuestros hallazgos son similares a los descritos hasta ahora en la literatura médica. Aunque no existan diferencias significativas en los niveles de LDL-c, creemos que existe una tendencia clara hacia niveles elevados en nuestro grupo de pacientes. Es posible que el poco tamaño muestral utilizados justifique la no significación estadística.

Con respecto a las diferencias en el metabolismo glucídico, no encontramos en nuestro estudio diferencias significativas entre los valores de glucemia basal y la resistencia insulínica que medimos utilizando el índice de HOMA. Este resultado es también concordante con los diversos estudios publicados hasta la fecha. Es bastante probable que usando técnicas más sofisticadas y con mayor sensibilidad para la detección de sensibilidad a la insulina, como puede tratarse del clamp euglucémico hiperinsulinémico, se hubieran encontrado diferencias en los dos grupos.

1.3. Marcadores de estrés oxidativo

La existencia de un desequilibrio entre factores prooxidantes y antioxidantes, a favor de los primeros, es lo que se conoce como estrés oxidativo (EO). Su medición está siendo objeto de investigaciones cada vez más crecientes en relación con enfermedades que condicionan un aumento del riesgo cardiovascular(103).

En un número cada vez mayor de estas enfermedades, se ha demostrado un incremento en los parámetros determinantes de EO en el que existe un desbalance de los mecanismos que regulan la oxidación, estando la balanza inclinada hacia el lado de los factores prooxidantes, o lo que es lo mismo hacia la producción de radicales libres.

El EO está ya presente en fases iniciales del proceso arteriosclerótico y por lo tanto, su estudio permitiría actuar de forma precoz y prevenir incluso la progresión de la arteriosclerosis ya instaurada.

En nuestro grupo de pacientes con DGHA, diagnosticados entre 2006 y 2008, estudiamos marcadores de estrés oxidativo, inflamatorios, de disfunción endotelial y de adhesión vascular, comparándolos con un grupo de controles sanos.

Debido a que la vida media de los radicales libres es de una fracción de segundos, su cuantificación es sumamente difícil y requiere una tecnología muy compleja, decidimos realizar la medición de la capacidad o estado antioxidante total (TAS). La estimación del TAS involucra la suma de todos os antioxidantes presentes en el organismo, capaces de inactivar y depurar los radicales libres de O_2 de diferentes orígenes. La medición del TAS nos da una idea del equilibrio dinámico entre los sistemas antioxidantes y la producción de especies reactivas de O_2 (ROS). Aunque este marcador no es altamente específico para valorar el riesgo de estrés oxidativo, su medida es beneficiosa y por ello se utiliza frecuentemente en patologías de alto riesgo cardiovascular. Además, tiene la ventaja de ser una ensayo práctico y económico(104).

En nuestro estudio, objetivamos un aumento significativo del TAS en pacientes con respecto a controles. Podemos especular que en estadios iniciales del proceso de arteriosclerosis en pacientes con DGHA, el TAS está elevado como mecanismo de defensa y primer estímulo reactivo ante una situación de estrés oxidativo. Con el fin de evitar los efectos deletéreos de los ROS como la oxidación de biomoléculas, daño tisular y muerte tisular, las células desarrollan mecanismos antioxidantes importantes como defensa para evitar la producción de radicales libres, e incluso para limitar su capacidad de lesión.

Nuestros pacientes presentan un diagnóstico de déficit de GH de corta evolución, siendo probable que en estos estadios tan iniciales, exista un aumento de todos los mecanismos y sistemas de defensa antioxidantes, elevando de esta manera el TAS. Es posible que en estadios tardíos del DGHA o en enfermedades cardiovasculares de larga evolución, el efecto sobre el TAS sea el contrario, es decir, una disminución de sus niveles. Este descenso en los niveles del TAS en estos casos se explica por un agotamiento progresivo de los sistemas de defensa antioxidantes y enzimáticos del organismo, con una disminución secundaria del aclaramiento de radicales libres. Siguiendo esta teoría, se ha publicado un estudio muy reciente realizado en la República Checa en 2008. Se demuestra en este trabajo que existe un aumento de los radicales libres y una disminución del TAS en obesidad de larga evolución. Este efecto es incluso más llamativo cuando además el paciente obeso tiene asociado el síndrome metabólico(105).

Hasta la fecha actual, nuestro estudio es el primero en realizar la medición del TAS en pacientes con DGHA. Por tanto, podemos concluir que existe un aumento del TAS en estadios iniciales del diagnóstico del DGHA, tal y como hemos citado anteriormente. Probablemente exista un descenso marcado del TAS en el DGHA no tratado de larga evolución, por lo que si esto se demuestra sería necesario generalizar el tratamiento con GH de forma precoz a todos los pacientes, independientemente de la sintomatología que presenten al inicio.

Entre las enzimas antioxidantes más importantes destacan la Glutation peroxidasa (GPx), la Glutation reductasa (GRx) y la Glutation Sulfotransferasa (GSH).

La GPx está considerada como una enzima de defensa contra ROS y sus niveles son inversamente proporcionales al riesgo vascular en enfermedades de varios años de evolución, tales como la cardiopatía isquémica o la diabetes mellitus(106). En nuestro

estudio no encontramos diferencias significativas en la determinación de GPx, probablemente en relación con un número reducido de pacientes estudiados y además por encontrarse en estadios tempranos del DGHA. Tampoco la determinación de GRx es relevante en cuanto a diferencia entre los dos grupos, por los mismos motivos anteriormente citados.

La GST es una enzima de detoxificación intracelular con la misión de protección frente a estrés oxidativo. Neutraliza compuestos electrofílicos e hidrofóbicos y también reducen hidroperóxidos orgánicos. Hasta la fecha no existen publicaciones que relacionen GST con enfermedades de riesgo cardiovascular. En nuestro trabajo, se objetiva un aumento de GST significativo en pacientes con DGHA con respecto a controles sanos. Interpretamos este aumento de GSH de la misma forma que justificamos previamente el aumento del TAS. Nuestro grupo de pacientes con DGHA se encuentra en estadios iniciales del la enfermedad cuando se realiza el estudio. En estos momentos puede que una aumento en la cantidad de sustrato (peróxidos) disponible para esta enzima, potencie su actividad para contrarrestar el estado oxidante(107).

Puede que el tiempo de evolución de la enfermedad y por tanto del estado oxidante, influya en la actividad de las enzimas como la GST, llegando a disminuir considerablemente en enfermedades cardiovasculares de larga evolución, como la diabetes.

El glutatión reducido (GSH) es el antioxidante primordial en el balance oxidativo. Estudios recientes han establecido que los niveles disminuidos de GSH y GSHt (Glutation reducido total), están asociados con la edad y patogénesis de muchas enfermedades incluyendo las enfermedades cardiovasculares(108).A fecha de hoy, puede

considerarse que la GSH es un buen marcador de severidad y progresión de las enfermedades cardiovasculares.

En nuestro estudio, observamos una disminución llamativa de los niveles de GSH y GSHt en los pacientes con DGHA respecto a controles, aunque los resultados no son estadísticamente significativos. De todas formas, creemos que sí tiene gran trascendencia clínica, ya que nos equiparan el DGHA a una enfermedad cardiovascular en cuanto a su severidad y progresión. En este contexto, sería conveniente iniciar el tratamiento con GH de forma precoz y generalizada en todos los pacientes con DGHA. Probablemente si el tamaño de la muestra en nuestro estudio hubiese sido mayor, los resultados podrían ser significativos.

La LDL-oxidada (LDL-ox) constituye una forma del LDL pequeña y densa con gran potencial aterogénico. Es sin duda un marcador bien conocido de riesgo vascular y es la partícula clave en la formación de la placa de ateroma, que está ligada a enfermedades cardiovasculares. Es fundamental y forma parte del perfil lipídico de la diabetes mellitus tipo 2 y su acompañante síndrome metabólico. Aunque en un estudio inicial anglosajón publicado en 2002, se sugirió que el estrés oxidativo no formaba parte del estado pro-aterogénico del hipopituitarismo con DGHA(109), diversos artículos publicados posteriormente no han corroborado estos hallazgos. Así, Ozbey en el año 2003, demostró que la concentración de LDL–ox era significativamente mayor en 18 pacientes con hipopituitarismo y DGHA que en controles sanos(110). Un estudio milanés de Scacchi en 2006, objetivó un aumento de LDL-ox y peroxidación lipídica en pacientes con DGHA con respecto a sanos, y además demostró una disminución significativa del nivel de peróxidos lipídicos tras administración de rhGH a corto plazo(97). Muy recientemente en al año 2009, se ha descrito asociación de niveles

elevados de LDL-ox en pacientes con Acromegalia activa, la cual confiere como bien es conocido un exceso de riesgo vascular y mortalidad(111).

En nuestro estudio, objetivamos una aumento significativo de LDL-ox en pacientes con DGHA con respecto a controles sanos, lo cual es concordante y con las últimas publicaciones citadas. En este apartado, podemos concluir que el paciente con DGHA presenta un perfil lipídico aterogénico similar al del paciente con diabetes mellitus tipo 2 con síndrome metabólico asociado, lo cual confiere a esta patología un perfil de alto riesgo vascular e incluso podría hablarse en un futuro de equivalente coronario, siendo este punto de gran trascendencia en el campo de la medicina.

1.4.Marcadores de inflamación

En múltiples estudios citados con anterioridad, se han asociado niveles elevados de marcadores inflamatorios, como PCR y IL-6, a enfermedades de alto riesgo vascular tipo enfermedades coronarias, cerebrovasculares y arteriopatía periférica. Se ha evidenciado también una relación directa entre los niveles de IL-6 y el aumento de reactantes de fase aguda, como la PCR. La PCR puede influir directamente sobre la formación de la placa aterogénica a través de la activación leucocitaria y la disfunción endotelial. En general, los marcadores inflamatorios elevados están relacionados con la presencia de síndrome metabólico y riesgo cardiovascular. En pacientes con hipopituitarismo, se ha evidenciado un aumento de marcadores de inflamación en relación directa con el grado de obesidad. Además, los valores de PCR presentan en general una relación inversa con la concentración de IGF-1(112).

En un estudio brasileño reciente, se analizaron 22 pacientes con DGHA aislado por mutación del receptor GHRH y los compararon con controles sanos. Se objetivó aumento de grasa abdominal, junto con elevación del colesterol total, fracción LDL-c y

niveles aumentados de PCR en los pacientes con respecto a controles. En este estudio no se demostró, sin embargo, aumento del grosor de la pared carotídea ni alteraciones de la ecocardiografía de estrés en los pacientes con DGHA frente a controles(113).

En un ensayo clínico cruzado realizado en Noruega en el 2006, se ha evidenciado además una reducción de los niveles de PCR y APO-B tras tratamiento con rhGH durante 9 meses seguidos, indicando un efecto positivo de GH sobre los factores de riesgo cardiovasculares(114).

En nuestro trabajo, existe un aumento significativo de PCR, IL-6 y TNF-alfa en pacientes con DGHA con respecto a controles sanos. Estos hallazgos concuerdan con los encontrados en otros estudios similares y nos indica que el proceso de aterosclerosis está ya presente desde fases iniciales del diagnóstico de DGHA, lo que nos da una idea de la importancia de instaurar un tratamiento hormonal sustitutivo precoz e independiente de la sintomatología clínica del paciente.

1.5.Marcadores de adhesión vascular

Los niveles elevados de VCAM-1, SP-Selectina y SCD40L, implican un aumento de la migración y reclutamiento de los linfocitos y por tanto están asociados a las fases iniciales de aterogénesis. Existen escasos estudios que valoren estos marcadores en pacientes con hipopituitarismo y DGHA. En nuestro estudio, encontramos unos niveles elevados de forma significativa de VCAM-1 en los pacientes con DGHA. Los niveles de SP-Selectina y SCD40L se encuentran más elevados en los pacientes, aunque no existen diferencias significativas entre los dos grupos.

En un estudio noruego del 2006 citado anteriomente(114), no se encontraron diferencias significativas en pacientes con DGHA frente a controles sanos en los parámetros VCAM-1, factor Von Willebrand ni tampoco en SCD40L.

En otro trabajo catalán de Gómez, publicado en 2006, tampoco se objetivaron diferencias en los parámetros VCAM-1, P-Selectina, PCR ni IL-6 entre pacientes con DGHA frente a controles(99).

El aumento de VCAM-1 nos puede indicar un comienzo precoz del proceso aterosclerótico en nuestro grupo de pacientes. Es posible que en nuestro trabajo y en el resto de los estudios citados, exista poco tamaño muestral para detectar diferencias estadísticamente significativas en todos los parámetros de adhesión vascular.

1.6.Marcadores de disfunción endotelial

Se cree que los niveles circulantes de IGF-1 influyen a nivel endotelial, dado que las células endoteliales presentan receptores de alta afinidad para IGF-1. Además, IGF-1 estimula la producción de óxido nítrico (NO). NO disminuye la adhesión plaquetaria, inhibe la proliferación vascular de músculo liso y reduce la actividad de la lipooxigenasa, disminuyendo así la oxidación de las LDL. Además el NO contribuye en la regulación del tono vascular, relajando el músculo liso e induciendo vasodilatación(102).

Existen muy escasos estudios en humanos que calculan la producción de NO en sangre y orina en pacientes con DGHA. En general evidencian un descenso en las concentraciones de NO en pacientes con respecto a controles. Aunque en un estudio inicial en el 2000 demostró una recuperación parcial de los niveles de NO tras tratamiento con rhGH(115), recientemente en el 2008 otros autores no han encontrado diferencias significativas en los cambios de NO tras tratamiento con rhGH(116).

En nuestro trabajo, los niveles de NO son claramente inferiores en el grupo con DGHA y de forma significativa, por lo que podemos decir que nuestros pacientes con diagnóstico reciente de DGHA, muestran ya indicios claros de disfunción endotelial.

Con respecto a la adiponectina, nosotros encontramos unos niveles inferiores en pacientes con DGHA comparados con controles sanos, aunque el resultado es no estadísticamente significativo. La adiponectina suele estar disminuida en pacientes con índice de masa corporal (IMC) elevado, y también en pacientes de alto riesgo vascular, por lo que es un buen indicador de daño vascular. En 2 estudios recientemente publicados en 2004 en Japón y en 2008 en Barcelona, no se han detectado diferencias significativas entre pacientes con DGHA y controles sanos(117,118).

Nuestros resultados concuerdan con los datos publicados hasta el momento. Cabe destacar que aunque no existen diferencias significativas, nosotros sí observamos un descenso de los niveles con respecto a sanos. Posiblemente no encontramos diferencias estadísticamente significativas por el hecho de que en nuestro estudio, el grupo de pacientes y el grupo control estaban apareados por IMC, edad y sexo. Hoy sabemos que los niveles de adiponectina se correlacionan negativamente con el grado de IMC. También puede influir que el tamaño de nuestra muestra sea pequeño para detectar diferencias significativas.

1.7.Modelos de regresión lineal

En los estudios realizados de regresión lineal simple, podemos intuir que existe una correlación lineal positiva entre padecer DGHA y los distintos marcadores de estrés oxidativo, como son VCAM-1, PCR, y TAS. Como podemos observar en los resultados, el hecho de estar diagnosticado de DGHA aumenta por sí sólo los valores de los tres marcadores en rango variable según el marcador. Con respecto al óxido nítrico (NO),

parece existir una correlación lineal negativa, de tal forma que la presencia del déficit de GH es responsable de la disminución de los valores de NO. Por otro lado, el 72% del valor total del VCAM-1 se puede explicar únicamente por la presencia del déficit de GH del adulto. De la misma manera, el 52% del estado antioxidante total (TAS) viene explicado exclusivamente por la presencia de DGHA, explicándose el 48% restante por otros factores asociados. Lo mismo ocurre con el NO, explicando el DGHA un 52% del valor total. Con estos datos podemos deducir que el déficit de GH es capaz por sí solo de modificar de forma considerable los marcadores asociados a riesgo cardiovascular, y por tanto puede ser un claro contribuyente del estrés oxidativo en nuestros pacientes. Por supuesto, hay que destacar las limitaciones de nuestro estudio. Por una parte, el escaso número de la muestra hace menos significativos los resultados. Por otro lado, el aplicar una técnica de regresión a una variable cualitativa podría ser controvertido, sin embargo, desde el punto de vista teórico es perfectamente factible, y teniendo en cuenta la relevancia de los resultados, hemos creído conveniente presentar estos hallazgos. También hay que tener en cuenta la inexistencia de estudios publicados al respecto, pudiéndose considerar nuestros resultados como un punto de partida para nuevos estudios futuros.

2. ESTUDIO DE FUNCION VASCULAR EX VIVO

Algunos investigadores han abordado el tema del estudio vascular en pacientes con hipopituitarismo y DGHA mediante técnicas radiológicas no invasivas. Entre ellas, la medición del grado de dilatación de la arteria braquial mediada por flujo y el estudio de del grosor de la íntima-media de la arteria carótida mediante ecografía-doppler, se han convertido en las técnicas más utilizadas en los estudios hasta ahora publicados. Se ha evidenciado hasta el momento una disminución del grado de dilatación de la arteria braquial mediada por flujo(119), y también un aumento del grosor de la íntima-media carotideo en pacientes con DGHA sin tratamiento coadyuvante. En este último contexto, se ha realizado un estudio abierto y prospectivo publicado en 2008 en Nápoles. Se estudiaron 35 pacientes varones con DGHA severo sin tratamiento, evidenciándose un aumento del grosor de la íntima-media de la carótida (IMT) en ellos. Además, después de cinco años de tratamiento con rhGH, el IMT disminuyó de forma significativa(88).

Pocos estudios han basado sus investigaciones en el estudio directo de la función endotelial en arterias de resistencia mediante técnicas mínimamente invasivas, como la miografía de presión. En los últimos años, el estudio miográfico se ha utilizado para la investigación de la función vascular en patologías como hipertensión arterial, síndrome de ovario poliquístico e insuficiencia cardiaca congestiva. En estas enfermedades se ha evidenciado disfunción endotelial mediante estas técnicas, documentándose mejoría tras exposición a agentes cono insulina y óxido nítrico (NO).

Sólo 1 publicación ha abordado su estudio en pacientes hipopituitarios con DGHA(95). Se trata de un estudio con diseño cruzado de 16 pacientes con hipopituitarismo y DGHA randomizados a 6 meses de tratamiento con GH o 6 meses sin tratamiento. Los resultados no mostraron diferencias significativas de la función endotelial de las arterias

de resistencia tras tratamiento con GH. Explican estos hallazgos por las diferencias que existen en la respuesta al efecto de la GH en los diferentes territorios vasculares. Según esta teoría, la IGF-1 tendría un diferente efecto vascular en función de los receptores endoteliales en los diferentes tejidos.

En nuestro estudio, estudiamos a 5 pacientes con hipopitutarismo y diagnóstico reciente de DGHA versus 5 controles sanos. No encontramos diferencias significativas en la contractilidad ni tampoco reactividad de las arterias de resistencia de pequeño tamaño, siendo la respuesta a estímulos vasoconstrictores similar en ambos grupos.

Sin embargo, aunque el porcentaje de relajación vascular con acetil colina (ACh) es similar en ambos grupos al principio del experimento y tras vasoconstricción previa, durante la segunda exposición a ACh se evidencia un claro descenso en el grado de relajación vascular en el grupo de pacientes con DGHA. En este sentido, podemos hablar de un fenómeno de desensibilización al estímulo vasodilatador que ocurre en los pacientes y no está presente en sanos. En definitiva, la respuesta al primer estímulo vasodilatador es normal y similar en pacientes y controles, existiendo una respuesta escasa y muy disminuida al estímulo repetitivo en los pacientes con DGHA.

Probablemente este hallazgo constituya una de las primeras manifestaciones de la disfunción endotelial presente en estadios iniciales del diagnóstico del DGHA. Aún quedaría por determinar si esta alteración en la sensibilidad vascular a agentes vasodilatadores podría ser subsidiaria a mejoría o incluso normalización tras un periodo de tratamiento con rhGH a medio o largo plazo.

En un estudio muy reciente publicado en Manchester en 2009, se valoraron arterias de resistencia mediante miógrafo de presión en pacientes con Acromegalia activa frente a Acromegalia en remisión clínica. La respuesta al estímulo de relajación vascular tras ACh fue menor en pacientes con Acromegalia activa y de forma significativa(120).

Por último, cabe destacar que la relajación vascular a ACh no puede ser abolida tras preincubación con un inhibidor de la óxido nítrico sintetasa(L-NAME), ni tampoco con un inhibidor de la ciclooxigenasa (Indometacina). Este efecto lo observamos tanto en pacientes con DGHA como en controles sanos.

En estudios humanos de arterias de de pequeños vasos, la relajación vascular secundaria a ACh sólo se atenúa muy ligeramente tras L-NAME e Indometacina. Nuestra hipótesis conjuntamente con otros autores es que la relajación tras ACh es dependiente fundamentalmente del factor hiperpolarizante derivado del endotelio, siendo mucho menos relevantes el óxido nítrico y los metabolitos del ácido araquidónico(121).

Como limitaciones a esta parte del estudio, citar el pequeño número de pacientes que han podido ser estudiados, al ser difícil obtener controles sanos para la realización de una técnica mínimamente invasiva.

3. CONCLUSIONES

Los pacientes con DGHA presentan un aumento del grado de estrés oxidativo y disfunción endotelial con respecto a controles sanos que no padecen la enfermedad. Los marcadores de estrés oxidativo están alterados desde fases iniciales del diagnóstico del DGHA, y por lo tanto, podrían ser considerados marcadores de aterosclerosis prematura en futuras investigaciones. Además existe la posibilidad de que sean más sensibles que los marcadores bioquímicos tradicionales para el diagnóstico de aterosclerosis en fases iniciales.

En los pacientes con DGHA y no así en controles, existe desensibilización de los receptores endoteliales al estímulo continuado de sustancias vasodilatadoras como la acetilcolina, siendo éste un signo incipiente e inequívoco de disfunción endotelial.

Parece evidente que el DGHA es responsable por sí solo e independientemente de otros mecanismos, de activar la cascada de procesos y acontecimientos que intervienen en el desarrollo de arteriosclerosis. Ello supone que los pacientes con DGHA tienen un elevado riesgo cardiovascular, y probablemente sea necesario tratar sistemáticamente a todos los pacientes desde etapas muy iniciales.

Se necesitan estudios con mayores casuísticas para confirmar nuestros hallazgos. Se propone además un estudio prospectivo de 12 meses de tratamiento con rhGH para valorar si las alteraciones en los parámetros de estrés oxidativo y disfunción endotelial podrían ser reversibles.

BIBLIOGRAFÍA

G. BIBLIOGRAFIA

1. Regal M, Paramo C, Sierra SM. Prevalence and incidence of hypopituitarism in an adult Caucasian population in northwestern Spain. Clin Endocrinol(Oxf) 2001; 55(6): 735-740.
2. Leal-Cerro A, Flores JM, Rincón M, Murillo F, Puyol M, García-Pesquera F, et al. Prevalence of hypopituitarism and growth hormone deficiency in adults long term after severe traumatic brain injury. Clin Endocrinol 2006; 62: 525-532.
3. Agha A, Thompson CJ. Anterior pituitary dysfunction following traumatic brain injury (TBI). Clin Endocrinol(Oxf) 2006; 64(5): 481-488.
4. Molitch ME, Clemmons DR, Malozowski S, Merriam GR, Shalet SM, Vance ML. Evaluation and treatment of adult growth hormone deficiency: An endocrine Society Clinical Practice Guideline. J Clin Endocrinol Metab 2006, 91(5): 1621-1634.
5. Biermasz NR, Hamdy NA, Pereira Am, Romijn JA, Roelfsema F. Long-term skeletal effects of recombinant human growth hormone(rhGH) alone and rhGH combined with alendronate in GH-deficient adults: a seven year old follow-up study. Clin Endocrinol(Oxf) 60: 175-184.
6. Attanasio AF, Lamberts SW, Matranga AM, Birkett MA, Bates PC, Valk NK, et al. Adult growth hormone(GH) deficient patients demonstrate heterogeneity between childhood onset and adult onset before and during human GH treatment. Adult Growth hormone Deficiency Study Group. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82:82-87.
7. Hoffman AR, Kuntze JE, Baptista J, Baum HB, Baumann GP, Biller BM, et al. Growth hormone(GH) replacement therapy in adult onset GH deficiency: effects

on body composition in men and women in a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 2048-2056.

8. Mauras N, Pescovitz OH, Allada V, Messig M, Wajnrajch MP, Lippe B. Limited efficacy of growth hormone(GH) during transition of GH-deficient patients form adolescence to adulthood: a phase III multicenter, doble-blind, randomized two-year trial. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90:3946-3955.
9. Ho KY on behalf of the 2007 GH Deficiency Consensus Worshop Participants. Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of adults with GH deficiency II: a statement of the research Society in association with the European Society of endocrinology, Japan endocrine Society, and Endocrine Society of Australia. European J Endocrinol 2007; 157:695-700.
10. Turrens JF. Mitocondrial formation of reactive oxygen species. *J Physio* 2003; 552 (2):335-344.
11. Babior BM: The NADPH oxidase of endothelial cells. IUBMB life 2000; 50:267-269.
12. Davies MJ. The oxidative environment and protein damage [Review]. Biochim Biophys Acta 2005;1703:93–109.
13. Aldini G, Dalle-Donne I, Vistoli G, Maffei Facino R, Carini M. Covalent modification of actin by 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE): LC-ESI-MS/MS evidence for Cys374 Michael adduction. J Mass Spectrom 2005; 40:946–954.
14. Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G, et al. Proteins as biomarkers of oxidative stress in diseases: the contribution of redox proteomics [Review]. Mass Spectrom Rev 2005;24:55–99.
15. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases [Review]. Trends Mol Med 2003;9: 169–176.

16. Renke J, Popadiuk S, Korzon M, Bugajczyk B, Wozniak M. Protein carbonyl groups' content as a useful clinical marker of antioxidant barrier impairment in plasma of children with juvenile chronic arthritis. Free Radic Biol Med 2000; 29:101–104.
17. Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, et al. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. Kidney Int 2004;65:1009–1016.
18. Vertuani S, Angusti A, Manfredini S .The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. Curr Pharm Des. 2004; 10: 1677–1694.
19. Linster CL, Van Schaftingen E . Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. FEBS J 2007; 274: 1-22.
20. Meister A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. J Biol Chem 1994; 269: 9397 – 9400.
21. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbownik M, Calvo JR .Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. Biological signals and receptors 2000; 9: 137-59.
22. Herrera E, Barbas C . Vitamin E: action, metabolism and perspectives. J Physiol Biochem 2001; 57: 43 – 56.
23. Cantrell A, McGarvey DJ, Truscott, TG, Rancan F, Bohmb F. Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment Archives of Biochemistry and Biophysics 2003; 412: 47–54.
24. Halliwell B, Rafter J, Jenner A. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?. Am J Clin Nutr 2005; 81(suppl): 268–276.

25. Nozik-Grayck E, Suliman H, Piantadosi C . Extracellular superoxide dismutase. Int J Biochem Cell Biol 2005; 37:2466–2471.
26. Chelikani P, Fita I, Loewen P . Diversity of structures and properties among catalases. Cell Mol Life Sci 2004; 61: 192–208.
27. Dietz K, Jacob S, Oelze M, Laxa M, Tognetti V, de Miranda S, Baier M, Finkemeier I . The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. J Exp Bot 2006; 57: 1697-709.
28. Brigelius-Flohé R . Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. Free Radic Biol Med 1999; 27: 951-65.
29. Sharma R, Yang Y, Sharma A, Awasthi S, Awasthi Y . Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. Antioxid Redox Signal 2004; 6: 289–300.
30. Stocker R and Keany JF: Role of oxidative modifications in atherosclerosis. Phisiol Rev 2004; 84: 1381-1478.
31. Steinerova A, Racek J, Stozicky F, Zima T, Fialova L, Lapin A. Antibodies against oxidized LDL-Theory and Clinical use. Physiol Res 2001; 50: 131-141.
32. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, and Jürgens G: The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. Free Radic Biol Med 1992; 13: 341-390.
33. Stocker R and Frei B: Endogenous antioxidant defenses in human blood plasma. Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants, edited by Sies H. London: Academic, 1991; p 213-243.
34. Koenig W, Lowel H, Baumert J, Meisinger C. C-reactive protein modulates risk prediction based on the Framingham Score: implications for future risk

assessment: results from a large cohort study in southern Germany. Circulation 2004; 109:1349 –1353.

35. Grunfeld C, Feingold KR. Role of cytokines in inducing hyperlipidemia. Diabetes 1992; 41:97-101.
36. Fernández-Real JM, Broch M, Vendrell J, Richart C, Ricart W. Interleukin 6 gene polymorphism and lipid abnormalities in healthy subjects. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85:1334-1339.
37. Jongstra-Bilen J, Haidari M, Zhu SN, Chen M, Guha D, Cybulsky MI. Low-grade chronic inflammation in regions of the normal mouse arterial intima predisposed to atherosclerosis. J Exp Med 2006; 203:2073– 2083.
38. Tayebjee MH, Lip GY, Tan KT, Patel JV, Hughes EA, MacFadyen RJ. Plasma matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-2, and CD40 ligand levels in patients with stable coronary artery disease. Am J Cardiol 2005; 96:339–345.
39. Schonbeck U, Varo N, Libby P, Buring J, Ridker PM. Soluble CD40L and cardiovascular risk in women. Circulation 2001; 104:2266–2268.
40. Blann AD, Dobrotova M, Kubisz P et al. von Willebrand factor, soluble P-selectin, tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor in atherosclerosis. Thromb Haemost 1995; 74(2):626–630.
41. Lip GY, Blann AD, Zarifis J et al. Soluble adhesion molecule P-selectin and endothelial dysfunction in essential hypertension: implications for atherogenesis? A preliminary report. J Hypertens 1995; 13(12 Pt 2):1674–1678.
42. Hoshiga M, Alpers CE, Smith LL, et al. αvβ3 integrin expression in normal and atherosclerotic artery. Circ Res 1995; 77: 1129-35.

43. Matsuzawa Y. Therapy insight: adipocytokines in metabolic syndrome and related cardiovascular disease. Nat Clin Pract Cardiovasc Med 2006; 3:35– 42.

44. Fantuzzi G, Mazzone T. Adipose tissue and atherosclerosis: exploring the connection. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007; 27:996 –1003.

45. Haynes WG, Ferro CJ, O´Kane KPJ, Somerville D. Systemic endothelin receptor blockade decreases peripheral vascular resistance and blood pressure in humans. Circulation 1996; 93:1860-1870.

46. Takase H, Moreau P, Lüscher TF. Endothelin receptor subtypes in small arteries. Hypertension 1995; 25(2):739-743.

47. Ignarro LJ: Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. J Physiol Pharmacol 2002; 53: 503-514.

48. Channon KM, Guzik TJ: Mechanism of superoxide production in human blood vessel: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors. J Physiol Pharmacol. 2002; 53(4 Pt 1): 515-524.

49. Suematsu M, Suzuki H, Delano FA, Schmid-Schonbein GW. The inflammatory aspect of the microcirculation in hypertension: oxidative stress, leukocytes/ endothelial interaction, apoptosis. Microcirculation 2002; 9: 259–276.

50. Perticone F, Ceravolo R, Pujia A. Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive patients. Circulation 2001; 104:191–196.

51. Katz SD, Hryniewicz K, Hriljac I. Vascular endothelial dysfunction and mortality risk in patients with chronic heart failure. Circulation 2005; 111:310–314.

52. Medina FJ, De Haro J, Martinez-Aguilar E, Flórez A, March JR, Acín F. Relación de la dilatación de la arteria braquial mediada por flujo y el índice

tobillo-brazo en pacientes con enfermedad arterial periférica Angiolología 2007; 59(1): 55-61.

53. McCallum RW, Sainsbury CA, Spiers A, Dominiczak AF, Petrie JR, Sattar N, et al. Growth hormone replacement reduces C-reactive protein and large-artery stiffness but does not alter endothelial function in patients with adult growth hormone deficiency. Clin Endocrinol 2005; 62:473-479.
54. Rosen T, Bengtsson BA. Premature mortality due to cardiovascular disease in hypopituitarism. Lancet 1990; 336:285-8.
55. Bates AS, Van't Hoff W, Jones PJ, Clayton RN. The effect of hypopituitarism on life expectancy. J Clin Endocrinol Metab 1996; 8:1169-72.
56. Bülow B, Hagmar L, Mikoczy Z, Nordstrom CH, Erfurth EM. Increased cerebrovascular mortality in patients with hypopituitarism. Clin Endocrinol (Oxf) 1997;46:75-81.
57. Erfurth EM, Bulow B, Hagmar LE. Is vascular mortality increased in hypopituitarism? Pituitary 2000; 3:77-81.
58. Bülow B, Hagmar L, Eskilsson J, Erfurth EM. Hypopituitary females have a high incidence of cardiovascular morbidity and an increased prevalence of cardiovascular risk factors. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85:574-84.
59. Tomlinson JW, Holden N, Hills RK, Wheatley K, Clayton RN, Bates AS, et al. Association between premature mortality and hypopituitarism. West Midlands Prospective Hypopituitary Study Group. Lancet 2001; 357:425-31.
60. Murros KE, Toole JF. The effect of radiation on carotid arteries. A review article. Arch Neurol 1989; 46: 925-929.
61. Ross EJ, Linch DC. Cushing´s syndrome-killing disease: discriminatory value of signs and symptoms aiding early diagnosis. Lance 1982; 2: 646-649.

62. Sawin CT, Geller A, Wolf PA, Belanger AJ, Baker E, Bacharac P, et al. Low serum thyrotrpopin concentrations as a risk factor for atrial fibrillation in older persons. N Engl J Med 1994;331:1249-1252.

63. Sesmilo G, Miller KK, Hayden D, Klibanski A. Inflammatory cardiovascular risk markers in women with hypopituitarism. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86:5774-5781.

64. Snel YE, Brummer RJ, Doerga ME, Zelissen PM, Bakker CJ, HendrikMJ, et al. Adipose tissue assessed by magnetic resonance imaging in growth hormone-deficient adults: the effect of growth hormone replacementand a comparison with control subjects. Am J Clin Nutr 1995; 61:1290-1294.

65. Nass R, Huber RM, Klauss V, Muller OA, Schopohl J, Strasburger CJ.Effect of growth hormone (hGH) replacement therapy on physical work capacity and cardiac and pulmonary function in patients with hGH deficiency acquired in adulthood. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80:552-557.

66. Hansen TB, Vahl N, Jorgensen JO, Christiansen JS, Hagen C. Whole body and regional soft tissue changes in growth hormone deficient adults after one year of growth hormone treatment: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. Clin Endocrinol (Oxf) 1995; 43:689-96.

67. Colao A, Di Somma C, Cuocolo A, Spinelli L, Tedesco N, Pivonello R, et al. Improved cardiovascular risk factors and cardiac performance after 12 months of growth hormone (GH) replacement in young adult patients with GH deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86:1874-81.

68. Johansson JO, Fowelin J, Landbin K, Lager I, Bengtsson BA. Growth hormone-deficient adults are insulin-resistant, Metab Clin Exp 1995; 44: 1126–1129.

69. Abdu TA, Neary R, Elhadd TA, Akber M, Clayton RN. Coronary risk in growth hormone deficient hypopituitary adults: increased predicted risk is due largely to lipid profile abnormalities. Clin Endocrinol (Oxf) 2001; 55: 209–216.

70. Beshyah SA, Henderson A, Baynes C, Copping D, Richmond W,Johnston DG. Post-heparin plasma lipase activity in hypopituitary adults. Horm Res 1995; 44:69-74.

71. Colao A, Cerbone G, Pivonello R. The growth hormone response to the arginine plus GH-releasing hormone test is correlated to the severity of lipid profile abnormalities in adult patients with GH deficiency, J Clin Endocrinol Metab 84 1999; 84: 1277–1282.

72. Garry P, Collins P, Devlin JG. An open 36-month study of lipid changeswith growth hormone in adults: lipid changes following replacement of growth hormone in adult acquired growth hormone deficiency. Eur J Endocrinol 1996; 134:61-66.

73. Maison P, Griffin S, Nicoue-Beglah M, Haddad N, Balkau B, Chanson P. Impact of growth hormone (GH) treatment on cardiovascular risk factors in GH-deficient adults: a metaanalysis of blinded, randomized, placebo-controlled trials, J Clin Endocrinol Metab 2004; 84: 2192–2199.

74. Sesmilo G, Biller B, Llevadot J. Effects of growth hormone (GH) administration on homocysteine levels in man with GH deficiency: a randomized controlled trial. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 1518–1524.

75. Sanmarti A, Lucas A, Hawkins F, Webb SM, Ulied A. Observational study in adult hypopituitary patients with untreated growth hormone deficiency (ODA study): socioeconomic impact and health status. Eur J Endocrinol 1999;141: 481–489.

76. Sverrisdottir YB, Elam M, Herlitz H, Bengtsson BA, Johannsson G. Intense sympathetic nerve activity in adults with hypopituitarism and untreated growth hormone deficiency. J Clin Endocrinol Metab 1998; 83:1881-5.
77. Sesmilo G, Miller KK, Hayden D, Klibanski A. Inflammatory cardiovascular risk markers in women with hypopituitarism. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86:5774-81.
78. Sesmilo G, Biller BM, Llevadot J, Hayden D, Hanson G, Rifai N, et al. Effects of growth hormone administration on inflammatory and other cardiovascular risk markers in men with growth hormone deficiency. A randomized, controlled clinical trial. Ann Intern Med 2000; 133:111-22.
79. Colao A, Di Somma C, Cuocolo A, Spinelli L, Tedesco N, Pivonello R, et al. Improved cardiovascular risk factors and cardiac performance after 12 months of growth hormone (GH) replacement in young adult patients with GH deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86:1874-81.
80. Johansson JO, Landin K, Johannsson G, Tengborn L, Bengtsson BA. Long-term treatment with growth hormone decreases plasminogen activator inhibitor-1 and tissue plasminogen activator in growth hormonedeficient adults. Thromb Haemost 1996; 76:422-428.
81. Hjalmarson A, Isaksson O, Martin FI. Effects of growth hormone and insulin on amino acid transport in perfused rat heart. Am J Physiol 1969: 1795–1802.
82. Valcavi R, Gaddi O, Zini M, Iavicoli M, Mellino U, Portioli I. Cardiac performance and mass in adults with hypopituitarism: effects of 1 year of growth hormone treatment. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80: 659–666.
83. Nass R, Huber RM, Klauss V, Muller OA, Schopohl J, Strasburger CJ. Effect of growth hormone replacement therapy on physical work capacity and cardiac and

pulmonary function in patients with hGH deficiency acquired in adulthood. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80:552–557.

84. Colao A, Cuocolo A, Di Somma C. Does the age of onset of growth hormone deficiency affect cardiac performance? A radionuclide angiography study. Clin. Endocrinol (Oxf) 2000; 52: 447–455.

85. Salonen JT, Salonen R. Ultrasound B-mode imaging in observational studies os aterosclerosis progression Circulation 1993; 87(Suppl 2): 56-65.

86. Pfeifer M, Verhovec R, Zizek B, Prezelj J, Poredos P, Clayton RN. Growth hormone (GH) treatment reverses early atherosclerotic changes in GH-deficient adults. J Clin Endocrinol Metab 1999;84:453-457.

87. Bülow B, Hagmar L, Eskilsson J, Erfurth EM. Hypopituitary females have a high incidence of cardiovascular morbidity and an increased prevalence of cardiovascular risk factors. J Clin Endocrinol Metab 2000; 85:574-84.

88. Colao A, Di Somma C, Spieza S, Savastano S, Rota F, Savanelli MC, et al. Growth hormone treatment on atherosclerosis: results of a 5-year open, prospective, controlled study in male patients with severe growth hormone deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2008; 93(9): 3416-3424.

89. Christ ER, Chowienczyk PJ, Sonksen PH, Russel-Jones DL. Growth hormone replacement therapy in adults with growth hormone deficiency improves vascular reactivity. Clin Endocrinol (Oxf) 1999; 51:21-25.

90. Elhadd TA, Abdu TA, Oxtoby J, Kennedy G, McLaren M, Neary R, Belch JJ, Clayton RN. Biochemical and biophysicalmarkers of endothelial dysfunction in adults with hypopituitarismand severe GH deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86: 4223–4232.

91. Smith JC, Evans LM, Goodfellow J, Cockcroft J, Scanlon MF, Davies JS. Effects on growth hormone on endothelial function and large artery stiffness in GH deficient adults: a randomized, double blind, placebo-controlled study. Clin Endocrinol 2002; 56: 493–501.

92. Hána V, Prázny M, Marek J, Skrha J, Justová V. Reduced microvascular perfusion and reactivity in adult GH deficient patients is restored by GH replacement. Euro J Endocrinol 2002; 147: 333–337.

93. Irving RJ, Carson MN, Webb DJ, Walker BR .Peripheral vascular structure and function in men with contrasting GH levels. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:3309–3314.

94. Kelly CJ, Spiers A, Gould GW, Petrie JR, Lyall H, Connell, JM. Altered vascular function in young women with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:742–746.

95. McCallum R, Sainsbury C, Spiers A, Dominiczak AF, Petrie JR, Sattar N, et al. Growth hormone replacement reduces C-reactive protein and large-artery stiffness but does not alter endothelial function in patients with adult growth hormone deficiency. Clin Endocrinol 2005; 62:473-479.

96. Evans LM, Davies JS, Anderson RA, Ellis GR, Jackson SK, Lewis MJ, et al. The effect of GH replacement therapy on endothelial function and oxidative stress in adult growth hormone deficiency. Euro J Endocrinol 2000; 142(3):254-262.

97. Scacchi M, Valassi E, Pincelli AI, Fatthy LM, Giraldi FP, Ascoli P, et al. Increased lipid peroxidation in adult GH-deficient patients: effects of short-term GH administration. J Endocrinol Invest 2006; 29(10): 899-904.

98. Kokoszko A, Karbownik M and Lewinski A. Increased lipid peroxidation in growth hormone-deficient adult patients. Neuro Endocrinol Letters 2006; 27(1-2): 225-230.

99. Gómez JM, Sahún M, Vila R, Domenech P, Catalina P, Soler J, et al. Elevation of E-selectin concentrations may correlate with potential endotelial dysfunction in individuals with hypopituitarism during therapy with growth hormone. Curr Neurovasc Res 2007; 4(1): 55-62.

100. McCallum RW, Petrie JR, Dominiczak AF, Connell JM. Growth hormone deficiency and vascular risk. Clin Endocrinol(Oxf) 2002; 57: 11-24.

101. Colao A, Di Somma A, CUocolo A. The severity of growth hormone deficiency correlates with the severity of cardiac impairment in 100 adult patients with hypopituitarism: and observational, case-control study. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 5908-6004.

102. Colao A, Di Somma C, Savanelli MC, De Leo M, Lombardi G. Beginning to end: Cardiovascular implications of growth hormone deficiency and GH therapy. Growth hormone and IGF Research 2006; 16: 41-48.

103. Takimoto E and Kass DA. Role of Oxidative Stress in Cardiac Hypertrophy and Remodeling. Hypertension 2007; 49: 241 – 248.

104. Haffner SM. Clinical relevance of the oxidative stress concept. Metabolism 2000 49:30-34.

105. Skalicky J, Muzakova V, Kandar R, Meloun M, Rousar T, Palicka V. Evaluation of oxidative stress and inflammation in obese adults with metabolic syndrome. Clin Chem Lab Med 2008; 46(4):499-505.

106. Blankenberg S. Glutathione Peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. N Engl J Med 2003; 349:1605-13.

107. Arthur JR. The glutathione peroxidases. Cell Mol Life Sci 2000; 57:1825-1835.

108. Ranieri R, Dalle-Donne, et al Oxidized Forms of Glutathione in Peripheral Blood as Biomarkers of Oxidative Stress Clin Chem 2006 52:7 1406–1414.

109. Smith JC, Lang D, McEneny J, Evans LM, Scanlon MF, Young I. Effects of GH on lipid peroxidation and neutrophil superoxide anion-generating capacity in hypopituitary adults with GH deficiency. Clin Endocrinol 2002; 56: 449-455.

110. Ozbey N, telci A, Cakatay U, Yurci A, Molvalilar S. Determination of oxidative protein and lipid damage in adult hypopituitary patients with GH deficiency. J Endocrinol Invest 2003; 26(10): 1001-1007.

111. Boerol L, Cuniberti L, Magnani N, Manvela M, Yapur V, Bustos M, et al. In creased oxidized LDL associated with high ceruloplasmin activity in patients with active acromegaly. Clin endocrinol(Oxf) 2009; Epub ahead of print.

112. Ricart W, Fernández JM. Impacto del deficit hormonal y de los factores de riesgo cardiovascular sobre la expectativa de vida en el hipopituitarismo. Med Clin 2003; 120(16):630-637.

113. Menezes JL, Marques C, Barreto JA, Ximenes R, Valadao A, Herminia A, et al. Lack of evidence of premature aterosclerosis in untreated severe isolated growth hormone deficiency due to a GH-releasing hormone receptor mutation. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91(6): 2093-2099.

114. Bollerslev J, Ueland T, Jorgesen AP, Fougner KJ, Wergeland R, Schreiner T, et al. Positive effects of a physiological dose of Gh on markers of atherogenesis: a placebo-controlles study in patients with adult-onset GH deficiency. Eur J Endocrinol 2006; 154: 537-543.

115.Osterziel KJ, Bode-Boger SM, Strohm O, Ellmer AE, Bit-Avragim N, Hanlein D, et al. Role of nitric oxide in the vasodilator effect of recombinant human growth hormone in patients with dilated cardiomyopathy. Cardiovascular Research 2000; 45(2): 447-453.

116.Setola E, Monti LD, Lanzi R, Lucotti P, Losa M, Gatti E, et al. Effects of growth hormone treatment on arginine to asymmetric dimetithylarginine ratio and endothelial function in patients with growth hormone deficiency. Metabolism 2008; 57(12): 1685-1690.

117.Fukuda I, Hizuda N, Ishikawa Y, Itoch E, Yasumoto K, Murakami Y, et al. Serum adiponectin levels in adult growth hormone deficiency and acromegaly. Growth Hormone and Research 2004; 14:449-454.

118.Joaquin C, Aguilera E, Granada ML, Pastor MC, Salinas I, Alonso N, et al. Effects of GH treatment in GH-deficient adults on adiponectin, leptin and pregancy-associated plasma protein-A. Eur J Endocrinol 2008; 158:483-490.

119.Benedini S, Carbonare D, Albinger N, Scanarini M, Bilora F, Petrobelli R, et al. Effects of short-term therapy with recombinant human growth hormone on metabolic parameters and preclinical atherosclerotic markers in hypopituitary patients with growth hormone deficiency. Horm Metab Res 2006; 38(1):16-21.

120.Paisley AN, Izzard AS, Gemmell I, Cruickshank K, Trainer PJ, Heagarty AM. Small vessels remodeling and impaired endothelial-dependent dilatation in subcutaneous resistance arteries form patients with acromegaly. J Clin Endocrinol Metab 2009; 94(4): 1111-1117.

121.Buus NH, Simonsen U, Pilegard HK, Mulvany MJ. Nitric oxide, prostanoid and non-NO, non-prostanoid involvement in acetylcholine relaxation of isolated human small arteries. Br J Pharmacol 2000; 129: 184-192.