

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS

Asociación de ferritina sérica con lipoproteína de baja densidad oxidada en sujetos con glucosa normal en ayuno y glucosa alterada en ayuno, y aislamiento de ferritina sérica mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados



TESIS

Que para obtener el grado de

Doctorado en Ciencias

(Químico Biológicas y de la Salud)

Presenta

Juan Manuel Martínez Soto

Hermsillo, Sonora

Enero 2019

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



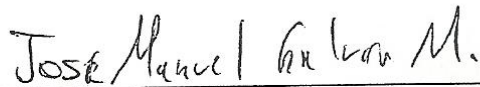
“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



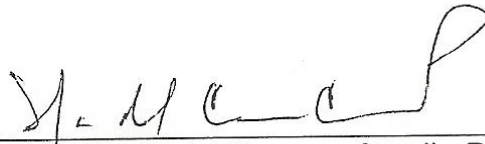
Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador designado para evaluar el trabajo de Tesis de Juan Manuel Martínez Soto, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



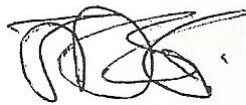
Dr. José Manuel Galván Moroyoqui
Presidente



Dra. Maria del Carmen Candia Plata
Secretario



Dra. Matilde Minéko Shibayama Salas
Sinodal



Dra. Jesús Adriana Soto Guzmán
Sinodal



Dr. Luis Fernando López Soto
Sinodal

Este trabajo se realizó en la Universidad de Sonora, en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, en el programa de Doctorado en Ciencias (Químico-Biológicas y de la Salud), bajo la dirección del Dr. José Manuel Galván Moroyoqui. Durante el desarrollo de esta investigación se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con recursos aportados con número de expediente 149110.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
OBJETIVOS.....	ix
Objetivo general.....	ix
Objetivos particulares	ix
RESUMEN.....	x
INTRODUCCIÓN	12
ANTECEDENTES	13
Diabetes tipo 2	13
Patogénesis de la diabetes tipo 2	14
Prediabetes.....	17
Resistencia a la insulina en glucosa alterada en ayuno e intolerancia a la glucosa post-prandial.....	18
Complicaciones de la diabetes tipo 2	19
Complicaciones macrovasculares.....	20
Aterosclerosis	20
Características de la aterosclerosis en la diabetes	23
Aterosclerosis y prediabetes	24
Lipoproteína de baja densidad oxidada en la aterosclerosis	31
Ferritina.....	35
Almacenamiento de hierro en la ferritina	39
Receptores de ferritina sérica	40
Funciones de ferritina sérica	41
Ferritina y cininógeno de alto peso molecular	42
Ferritina e implicación en función o secreción de insulina	47
Implicación del hierro en la generación de aterosclerosis.....	49

MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
Justificación	53
Pregunta de investigación.....	53
Hipótesis	53
Etapas metodológicas del estudio	54
Etapa 1: Determinación de ferritina sérica y oxLDL en sujetos	54
Tipo de estudio y participantes	54
Recolección de muestras y pruebas de laboratorio	55
Medición de ferritina.....	57
Análisis estadístico	57
Etapa 2: Aislamiento de ferritina sérica.....	58
Obtención de antisuero policlonal anti-ferritina	59
Materiales	59
Inmunización.....	59
Análisis de antisuero anti-ferritina por ELISA.....	60
Dot blot.....	61
Purificación de ferritina sérica.....	62
Materiales	62
Péptido rico en histidina-glicina-lisina del dominio 5 de HKa	62
ELISA para evaluar la interacción entre HGK35 y ferritina	63
Western blot para determinar especificidad del péptido HGK35.....	63
Cuantificación de proteínas séricas totales.....	64
Aislamiento de ferritina sérica mediante cromatografía de afinidad	65
Estimación de la pureza de ferritina sérica	66
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
Características de los sujetos de estudio.....	68
Correlación entre ferritina sérica y Variables de Importancia.....	70
Relación entre ferritina sérica con oxLDL y oxLDL/LDL-C.....	72
Asociación entre Ferritina Sérica y el Índice oxLDL/LDL-C	74

Interacción entre HGK35 y ferritina sérica, y cromatografía IMAC.....	81
CONCLUSIONES	97
REFERENCIAS	98

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Criterios para el diagnóstico de síndrome metabólico	30
II. Mecanismos de oxidación de lipoproteína de baja densidad	32
III. Lista de productos de oxidación de lipoproteína de baja densidad	33
IV. Características de los sujetos de estudio	69
V. Correlación entre ferritina sérica con variables seleccionadas	71
VI. Regresión múltiple para el índice oxLDL/LDL-C	75

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Mecanismos que aceleran la aterosclerosis en la diabetes	25
2. Esquema tridimensional de la apoferritina	37
3. Representación del potencial electrostático de H-ferritina y L-ferritina	45
4. Ferritina promueve la adhesión y proliferación de HUVEC	46
5. Reacciones RedOx en las que participa el hierro en estrés oxidativo	51
6. Correlación parcial entre ferritina sérica con oxLDL y oxLDL/LDL-C	73
7. Titulación de pool de suero de ratones BALB/c por ELISA	83
8. Dot Blot de antisuero policlonal.....	84
9. Interacción entre péptido HGK35 y ferritina mediante ELISA	86
10. Western Blot de péptido HGK35 con ferritina	87
11. Estandarización de IMAC.....	88
12. Cromatograma de aislamiento de ferritina sérica mediante interacción con HGK35	90
13. Aislamiento de ferritina sérica mediante interacción HGK35 por IMAC ..	91
14. Dot Blot de las fracciones del aislamiento de ferritina sérica	93

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la posible asociación entre ferritina sérica y lipoproteína de baja densidad oxidada en sujetos con glucosa normal y glucosa alterada en ayuno, y aislar ferritina sérica mediante la interacción ferritina-péptido rico en Histidina-Glicina-Lisina (HGK) del dominio 5 de la cadena ligera del producto de escisión de cininógeno de alto peso molecular (HKa).

Objetivos Particulares

1. Evaluar diferencias en la concentración de ferritina sérica en sujetos con glucosa normal en ayuno, glucosa alterada en ayuno y diabetes tipo 2.
2. Estimar la asociación entre ferritina sérica y lipoproteína de baja densidad oxidada en sujetos con glucosa normal en ayuno y glucosa alterada en ayuno.
3. Obtener antisuero policlonal anti-ferritina y evaluar la interacción ferritina-péptido HGK.
4. Purificar ferritina sérica humana mediante la interacción ferritina-péptido HGK.

RESUMEN

La oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) es crucial en el inicio y la aceleración del desarrollo aterosclerótico. La oxidación de LDL (oxLDL) puede ser inducida por radicales libres, que pueden formarse por el hierro. La alteración de la homeostasis en el metabolismo del hierro puede conducir a una sobrecarga de hierro que contribuye a la generación de especies reactivas de oxígeno, fenómenos asociados a la diabetes y aterosclerosis. Después de confirmar el aumento de ferritina sérica y oxLDL en sujetos con hiperglicemia crónica (tanto en IFG como T2D), el objetivo principal del presente estudio fue determinar si la ferritina sérica está asociada a la LDL oxidada en sujetos con glucosa en ayuno normal (NFG) y glucosa en ayunas alterada (IFG). Se reclutaron 6 sujetos con T2D, 18 con IFG y 36 con NFG hispanos no blancos, de origen no indígena, de ascendencia mestiza mexicana. Los participantes no presentaron inflamación aguda o complicaciones vasculares. La ferritina sérica y la oxLDL se evaluaron mediante ELISA. La concentración de ferritina sérica ($p < 0.05$) y de oxLDL ($p < 0.05$) fue mayor en los sujetos con IFG y T2D. Además, en los grupos IFG y NFG en su conjunto, el logaritmo natural de (ln)-ferritina sérica se correlacionó con oxLDL ($r = 0.372$, $p = 0.01$) y ln-oxLDL/LDL ($r = 0.397$, $p = 0.006$) después de ajustar sexo, edad, glucosa plasmática en ayunas (FPG), índice de masa corporal, triglicéridos (TG), colesterol total (TC) y lipoproteínas de alta densidad. Finalmente, la ferritina en suero fue un contribuyente independiente a la relación ln-oxLDL/LDL en sujetos NFG e IFG ($\beta = 0.2915$; IC del 95% = 0.1444, 0.4385; $p < 0.001$) después de la introducción de posibles factores de confusión como FPG, TC, TG e hipertensión. Según nuestro conocimiento, este es el primer estudio que comprende una asociación entre ferritina sérica y oxLDL en sujetos con NFG e IFG. Se necesita más investigación para establecer una relación causal del metabolismo de la interrupción del hierro en la generación de oxLDL en condiciones IFG. Además, se propuso un método cromatográfico para

purificar ferritina sérica. Mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC), específicamente mediante sistema níquel unido a ácido nitrolotriácético (Ni-NTA) sefarosa 6B, se logró obtener ferritina sérica de un pool de sueros de sujetos con NFG, resultado que permitirá en el futuro estudiar mejor la relación entre ferritina sérica y condiciones tanto fisiológicas como fisiopatológicas.

Palabras clave: ferritina sérica, lipoproteína de baja densidad, LDL oxidada, oxLDL, prediabetes, glucosa alterada en ayuno, aterosclerosis, diabetes tipo 2, inflamación, cininógeno de alto peso molecular.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónico-degenerativas son problema de salud pública. La T2D y sus complicaciones se han convertido en un verdadero desafío para la comunidad científica. La oxidación de las LDL juega un papel importante en el inicio y la aceleración del desarrollo aterosclerótico. La oxidación de LDL puede ser inducida por especies reactivas de oxígeno, cuya formación puede ser catalizada por el hierro. La alteración de la homeostasis en el metabolismo del hierro puede conducir a una sobrecarga de hierro que contribuye a la generación de especies reactivas de oxígeno, fenómenos asociados a la diabetes y aterosclerosis. Ferritina como indicador de reservas corporales de hierro, se ha asociado a la generación de diabetes e incluso complicaciones, específicamente oxLDL en pacientes con diferentes grados de aterosclerosis. Al mismo tiempo, ferritina sérica es una proteína reactante de fase aguda, por tanto, existen reportes que afirman, el aumento en la diabetes y aterosclerosis es, principalmente, consecuencia de inflamación y no aumento en las reservas corporales de hierro. El presente trabajo evaluó la posible asociación entre ferritina y oxLDL ajustando a clásicos marcadores de riesgo para la oxidación de LDL, así como inflamación (medido en IL-6). Además, después de obtenidos los resultados anteriores, se justificó la estandarización de un método para purificar ferritina sérica de sujetos con glucosa normal en ayuno, sin aparente inflamación ni condiciones relacionadas aumento en la concentración de ferritina sérica.

ANTECEDENTES

Diabetes Tipo 2

Las enfermedades crónico-degenerativas son problema de salud pública, debido a la dificultad de prevención, morbilidad y mortalidad (International Diabetes Federation, 2017). El incremento en la demanda de los recursos sanitarios, aunado al aumento en los costos asociados a la atención de estas patologías ha obligado a los profesionales de la salud a enfocar gran parte de su ejercicio, en investigar y proponer soluciones (Jaacks y col., 2016). La diabetes tipo 2 (T2D por sus siglas en inglés) es una enfermedad multifactorial causada por una compleja interacción entre la predisposición genética y el estilo de vida. Este último, en el presente siglo, ha provocado un gran incremento de la incidencia nacional y mundial de T2D (American Diabetes Association, 2019).

Para el año 2018, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en conjunto con la Federación Internacional de la Diabetes estimaron que en el mundo existe aproximadamente 424.9 millones de personas con T2D de los cuales alrededor del 50% no ha sido diagnosticado (International Diabetes Federation, 2017). Además, se estima que hay más personas con resistencia a la insulina, de interés, ya que estas personas tienen alto riesgo de desarrollar diabetes (American Diabetes Association, 2019). México ocupa el quinto lugar con T2D en el mundo, con una prevalencia del 9.4% en adultos entre 20 y 79 años, de los cuales son alrededor de 6.5 millones han sido diagnosticadas, y 4.5 millones no saben que presentan la enfermedad (International Diabetes Federation, 2013; ENSANUT, 2016).

Patogénesis de la Diabetes Tipo 2

La T2D es un síndrome clínico caracterizado por hiperglucemia crónica consecuencia de grados variables de resistencia a la hormona insulina por parte de tejidos blanco (hígado, músculo esquelético, tejido adiposo) y disfunción de células β del páncreas, que compromete la secreción y/o producción de insulina (International Diabetes Federation, 2017; American Diabetes Association, 2019). La enfermedad está definida por la presencia de al menos una de las siguientes condiciones, confirmando el resultado en una siguiente ocasión: glucosa plasmática en ayuno (FPG por sus siglas en inglés, ≥ 7.0 mmol/L; ≥ 126 mg/dL), glucosa post-prandial 2h (2hPG por sus siglas en inglés) después de una ingesta de 75g de glucosa estándar (OGTT por sus siglas en inglés, ≥ 11.1 mmol/L; ≥ 200 mg/dL), hemoglobina glicada (HbA1c, $\geq 6.5\%$), o una glucosa en plasma al azar debido a presencia de síntomas clásicos de hiperglucemia (≥ 11.1 mmol/L; ≥ 200 mg/dL; American Diabetes Association, 2019).

En condiciones fisiológicas, los niveles de glucosa en sangre están estrictamente regulados y en individuos que están en transición a desarrollar T2D ocurren anomalías en el metabolismo de glucosa e insulina, un proceso dinámico que ocurre continua e insidiosamente durante un lapso de muchos años (Weyer y col., 1999; Weir y Bonner-Weir. 2004; Bergman, 2013). Adicionalmente, la desregulación en los niveles de glucosa en ayuno y post-prandial así como la sensibilidad y secreción de insulina (función de células β), precede a la enfermedad manifiesta de T2D (Tabak y col., 2012). Tabák y colaboradores observaron que el aumento en los niveles de glucosa se observó tan temprano como 13 años previos al diagnóstico de la enfermedad, aunque estos parecían estar estrechamente regulados dentro del rango normal 2 a 6 años previos al diagnóstico, momento en el cual se produjo un detrimento abrupto en la regulación de los niveles. La resistencia a la insulina también se observó hasta 13 años antes de la aparición de diabetes, con una caída especialmente pronunciada 5 años antes de la diabetes. En cuanto a la función de células β ,

estimada por la secreción de insulina, durante el periodo observado se mostró un aumento sustancial en la secreción y por tanto un intento compensatorio 4 años antes del diagnóstico, y disminuyendo abruptamente justo antes de la conversión a diabetes (Tabak y col., 2012).

Estos resultados indican que la resistencia a la insulina comienza muchos años antes de la diabetes, y es un hecho que se compromete la función de las células β , situación ya presente en etapa prediabética. Weir describió un modelo por etapas para la generación de T2D. En el desarrollo, cada etapa está marcada por cambios en la función, masa y fenotipo de células β (Weir y Bonner-Weir. 2004).

La primera etapa ("compensación") se caracteriza por un largo período de resistencia a la insulina acompañada de un compensador aumento de la tasa de secreción de insulina y aumento en la masa de células en los islotes de Langerhans, donde se encuentran células β . La segunda etapa constituye una "adaptación estable", donde la resistencia a la insulina aumenta, se producen cambios metabólicos y las células β ya no compensan completamente la necesidad de insulina. Se observa también un cambio fenotípico muy marcado en las células β , evaluado por cambios en expresión de genes y proteínas, y también los niveles de FPG y 2hPG aumentan considerablemente. Aquí, los niveles de FPG se observan entre 5.0–6.5mmol/L (89–116 mg/dL). Este período suele ir acompañado de una disminución de la secreción aguda de insulina principalmente cuando las concentraciones de FPG son de 5,6 mmol/l (100 mg/dl). La secreción de insulina post-prandial estimulada por la glucosa disminuye considerablemente cuando los niveles de FPG se observan a 6.3mmol/L (114mg/dL). En esta segunda etapa, la secreción de insulina es en parte preservada. Las observaciones antes mencionadas son consecuencia en gran parte al concepto de glucotoxicidad en donde, los altos niveles de glucosa crean un ambiente desfavorable que lleva a la alteración en la función de células β . En la tercera etapa, una transitoria "inestable descompensación temprana", las

células β son incapaces de compensar la resistencia a la insulina y por tanto los niveles de glucosa aumentan hasta alrededor de 7.3mmol/L (130mg/dL) y consecuentemente los niveles empiezan a aumentar rápidamente (10). Estos periodos mencionados han sido catalogados como prediabetes y que llevan a desarrollar diabetes, donde hay una "estable descompensación" (etapa 4) con una grave disfunción en células β . Finalmente, se puede presentar una "severa descompensación" (etapa 5), que representa una profunda reducción en masa de células β (Weir y Bonner-Weir. 2004).

La T2D tiene diferente impacto en las poblaciones basado en factores genéticos (raza, etnicidad), factores ambientales y de estilo de vida (geografía, edad, tiempo de sueño, infección, microbiota, estatus socioeconómico, contaminantes medio ambientales, desarrollo intrauterino, medicación, tabaquismo, consumo de alcohol), pero debido a que la T2D está incrementando globalmente a una tasa que sobrepasa la variación genética, entre los factores de riesgo, históricamente y a la fecha se ha determinado que un estilo de vida sedentario acompañado del consumo de dietas no saludables con alto contenido de carne roja y procesada, granos refinados, bebidas azucaradas y alimentos ricos en carbohidratos densos en energía son las principales causas de la epidemia actual de T2D (Chatterjee y col., 2017), por su crucial relación con la generación de un desbalance de ingesta energética/gasto energético/calidad alimentaria causante de sobrepeso y obesidad medido en índice de masa corporal (Ng y col., 2014, Zheng y col., 2018) y aumento de la obesidad visceral (Bruno y col., 2005) y grasa ectópica (principalmente grasa en el hígado, Holman y col., 2015; Chatterjee y col., 2017)

Prediabetes

La prediabetes es una condición donde la concentración de glucosa es mayor que los valores normales, pero no alcanzan el punto de corte absoluto que define la T2D y representa un factor de riesgo alto para el desarrollo de diabetes. De acuerdo a la Asociación Americana de la Diabetes hasta enero del 2019, son individuos con prediabetes aquellos que tienen al menos una de las siguientes condiciones: glucosa alterada en ayuno (IFG por sus siglas en inglés), definido como una concentración de FPG entre ≥ 5.6 y < 7.0 mmol/L (≥ 100 , < 126 mg/dl); intolerancia a la glucosa post-prandial 2h (IGT), determinado como una concentración de 2hPG durante una OGTT entre ≥ 7.8 y < 11.1 mmol/L (≥ 140 , < 200 mg/dl); y alteración en la hemoglobina glicada: HbA1c entre ≥ 5.7 y $< 6.5\%$ (American Diabetes Association, 2019). Hasta un 10% de los sujetos con prediabetes desarrollan diabetes anualmente, y se estima que hasta un 70% de los prediabéticos eventualmente desarrollarán T2D (Tabak y col., 2012).

La desregulación de la glucosa en el estado de prediabetes se ha documentado ampliamente (Vasudevan y Garber, 2008) y la IFG e IGT se diferencian en los mecanismos fisiopatológicos que presentan (DeFronzo y Abdul-Ghani, 2011). La secreción de glucosa hepática (HGO por sus siglas en inglés) depende de la glucogenólisis (degradación de glucógeno a glucosa-6-fosfato) y gluconeogénesis (generación de glucosa a partir de precursores no glucídicos), que representan aproximadamente el 90% de la glucosa en circulación en ayuno. En el estado post-prandial, la HGO es suprimida para limitar el aumento de la glucosa plasmática posterior a la ingesta de alimentos mientras que el hígado promueve la reserva de energía al promover la generación de glucógeno. La producción de glucosa endógena en el estado post-prandial, se suprime en individuos con tolerancia normal a la glucosa por la secreción y acción de la insulina, mientras que se compromete a diferentes grados en sujetos con prediabetes y diabetes.

En el estado basal, el 30% de la glucosa que ingresa a las células es mediado por insulina, y se incrementa hasta un 90% en estado post-prandial, de la cual gran parte ingresa a músculo esquelético, y en menor medida a hígado y tejido adiposo (Courtney y Olefsky, 2007). En la T2D, la disposición total de glucosa para las células está muy disminuida, donde hasta un 90% está relacionada con resistencia a la insulina en el músculo.

Si la secreción de insulina fuera capaz de compensar perfectamente la resistencia a la insulina, no se observarían cambios en la concentración de glucosa. Esto implica que determinado grado de disfunción en células β ya está presente en el estado prediabético (Bergman, 2013).

Resistencia a la Insulina en Glucosa Alterada en Ayuno (IFG) e Intolerancia a la Glucosa Post-Prandial (IGT)

La IFG e IGT se diferencian entre sí en sus valores de FPG y 2hPG, y por el comportamiento de la curva de concentración de glucosa durante una prueba OGTT (DeFronzo y Abdul-Ghani, 2011; Tabak, 2012). Ambos grupos presentan resistencia a la insulina, pero el tejido blanco de resistencia a la insulina es hasta cierto grado diferente.

La resistencia a la insulina hepática es un hallazgo típico en IFG, con sensibilidad a la insulina casi normal en el músculo esquelético. Individuos con IFG tienen moderada resistencia a la insulina hepática y deterioro temprano (a 1–30 min) de la respuesta a la secreción de insulina de vesículas secretoras acopladas a la membrana durante la prueba de OGTT (DeFronzo y Abdul-Ghani, 2011). Debido a que la fase tardía (a 2h) a la respuesta de insulina en la prueba OGTT está intacta y la sensibilidad muscular es normal o casi normal, la 2hPG durante la OGTT puede regresar los niveles de glucosa a niveles similares al ayuno (DeFronzo y Abdul-Ghani, 2011).

Los individuos con IGT tienen de moderada a severa resistencia muscular a la insulina con pequeños cambios en la sensibilidad en hígado y deteriorada la etapa temprana y tardía (1-2h) de la curva de OGTT (la translocación de gránulos y maduración de insulina; Basu y col., 2012). Además, aunque la FPG no se encuentra elevada, hay un progresivo y sostenido aumento de glucosa en plasma durante la prueba de OGTT y los niveles de la 2hPG se mantienen por encima del estado en ayuno (DeFronzo y Abdul-Ghani, 2011; Bergman, 2013).

Complicaciones de la Diabetes Tipo 2

Las complicaciones son las causas principales de morbilidad y mortalidad en los pacientes con T2D. Además, no solo la diabetes, sino también sus complicaciones son problema de salud pública mundial. Por ejemplo, en el 2010 se reportó que la diabetes causó la muerte de 3.96 millones de personas en adultos de entre 20 y 79 años de edad, aproximadamente el 6.8% del total de muertes en el mundo (Roglic y Unwin, 2010). Esta estimación aumentó a 5 millones de muertes por diabetes y sus complicaciones durante el 2015 según reportes de la Federación Internacional de la Diabetes (International Diabetes Federation, 2017).

La disminución en la esperanza de vida a causa de diabetes debido a sus complicaciones tiene gran impacto en América latina (Lozano y col., 2012). En promedio, el 25% del gasto económico en salud en los países latinoamericanos es para el tratamiento de diabetes y sus complicaciones, de hecho, los países latinoamericanos con el mayor gasto económico evocado a estas condiciones son México y Brasil (Arredondo, 2014).

Tradicionalmente, las complicaciones de la diabetes se dividen en microvasculares (retinopatía, nefropatía y neuropatía) que afectan vasos pequeños y macrovasculares (enfermedad vascular periférica, enfermedad vascular coronaria y enfermedad vascular cerebral) afectando vías de mediano y

grande calibre. Las complicaciones son tan comunes en estos pacientes que se estima que la mitad de los sujetos con T2D cuentan con alguna complicación microvascular, y aproximadamente un cuarto presenta alguna complicación macrovascular (Nadeau y col., 2016). Adicionalmente los pacientes con diabetes tienen un riesgo relativo de presentar una complicación microvascular o macrovascular, de 10 a 20 veces mayor y 2 a 4 veces mayor, respectivamente, comparando con sujetos sin diabetes (Gregg, 2016).

Complicaciones Macrovasculares

Las complicaciones macrovasculares son la principal causa de mortalidad en la T2D (Forbes y Fotheringham, 2017). Se ha reportado que los determinantes clave para la generación de complicaciones son las anormalidades en el metabolismo de glucosa, la deficiencia en la función y producción de insulina y alteraciones lipídicas (Forbes y Cooper, 2013). Otros factores, como la hipertensión e isquemia, juegan un papel importante (Zheng y col., 2018)

La condición subyacente de la enfermedad cardiovascular es la aterosclerosis, donde convergen los factores antes mencionados. La aterosclerosis es un proceso complejo que envuelve varios tipos celulares e importantes interacciones célula-célula que en condiciones que favorecen lleva a la progresión de una placa lipídica a un fenómeno llamado placa aterogénica. Estas placas aterogénicas complejas pueden desestabilizarse y generar ruptura, que puede resultar en infarto al miocardio, angina inestable o ataque cerebrovascular. (Forbes y Cooper, 2013).

Aterosclerosis

Definida como un proceso inflamatorio donde se produce el engrosamiento de la pared arterial debido a la acumulación de lípidos (principalmente colesterol-LDL), proteínas modificadas, células, tejido conectivo y la concomitante reducción en

el diámetro de la luz vascular que en estado avanzado involucra la aparición de enfermedades macrovasculares antes descritas (D'Souza y col., 2009). La definición de aterosclerosis también ha sido descrita por Hayden y Tyagi refiriendo que "es un sistema disfuncional endotelial, que ocurre a nivel local, inflamatorio crónico, fibro-proliferativo, protrombótico, angiogénico, multifactorial de la íntima arterial causado por la retención de lipoproteínas de baja densidad (LDL), hemodinámica y estrés oxidativo" (Hayden, y Tyagi, 2004).

Se sabe que la aterosclerosis es el mecanismo patológico central en la enfermedad arterial coronaria (CAD, por sus siglas en inglés). Sin embargo, no ha sido un proceso sencillo de entender. Por ejemplo, se ha reportado que la aterosclerosis comienza como un proceso natural desde los primeros años de vida, y puede progresar y acelerarse a etapas avanzadas del fenómeno en función de determinados factores, algunos conocidos y otros aún por descubrir, donde gradualmente se presentan placas ateroscleróticas que estrechan las paredes de las arterias (Tousoulis y col., 2006).

Los eventos iniciales de la formación (aterogénesis) de estas placas han sido sujetos a discusión donde a la fecha se reportan tres principales hipótesis para su explicación y que podrían actuar en conjunto: la "respuesta a lesión", la "respuesta a retención", y la "oxidación" (Nigro y col., 2006). La hipótesis de "respuesta a lesión", propuesta en 1973, se enfoca en la disfunción endotelial que desencadena inflamación crónica asociada a aterosclerosis (Nigro y col., 2006). La hipótesis de "respuesta a retención" propone que en la aterogénesis el subendotelio vascular retiene y subsecuentemente acumula lípidos en la matriz extracelular. Esta teoría se extendió después en 1994, para describir la hipótesis de la "oxidación", que estipula que las LDL oxidadas (oxLDL) en la pared arterial originan una respuesta inmune y proinflamatoria, que exacerba la formación de la lesión (Witztum, 1994).

Seguido del daño inicial, vías de señalización inducen factores de adhesión para reclutar monocitos y plaquetas para adherirse al área de la lesión. Los monocitos se diferencian a macrófagos, quienes internalizan oxLDL y forman células espumosas. La agregación de células espumosas, macrófagos y lípido en el subendotelio es visualizada como placas lipídicas amarillentas que se elevan del área luminal de la arteria (Muir, 1992).

Después, el proceso inflamatorio se propaga por la muerte de células espumosas y la lesión continúa para permitir la migración de células de músculo liso vascular (VSMC) hacia la íntima. Durante este proceso, en la íntima se generan "cojines" en las arterias afectadas como consecuencia del engrosamiento de la íntima por edema, "parches" de reparación y un aumento de matriz extracelular, colágeno, VSMCs, etc. Al tiempo de estos eventos, se continúa la fagocitosis del exceso de oxLDL por los macrófagos que resulta en la secreción intensificada de moléculas inflamatorias como citocinas y factores de crecimiento que perpetúan el ciclo vicioso de inflamación, deposición lipídica y crecimiento, formando el ateroma que precede a la placa aterosclerótica como tal (D'Souza y col., 2009).

La placa aterosclerótica está caracterizada por el engrosamiento de la íntima arterial, elevados números de VSMC, macrófagos y linfocitos, depósitos de colesterol y capas densas de matriz de tejido conectivo. Adicionalmente, se puede observar calcificación en la periferia de lesiones más avanzadas. En cuanto a morfología, las placas se pueden distinguir en fibro-lípídicas y placas fibrosas (Maton y col., 1993). En ambos tipos la capa inicial consiste en una capa fibrosa que representa el núcleo ateromatoso. Son subendoteliales y resultan en la expansión compensatoria de la capa muscular de la pared arterial. En esta etapa ocurre una necrosis intensa en áreas del núcleo haciendo que se acumulen restos celulares, proteoglicanos, colágeno y células muertas que acumularon lípidos, y también se logran observar eosinófilos y precipitados de calcio (D'Souza y col., 2009).

Gradualmente las arterias se ocluyen, sin embargo, Glagov y col., demostraron que la pared arterial puede remodelarse para incrementar su diámetro externo para aliviar el espacio que estrecha en el diámetro del lumen debido a la placa (Glagov, 1987). Aun así, a pesar del compensatorio agrandamiento de la arteria, a través del tiempo, la placa aterosclerótica puede sufrir ruptura y causar estenosis de la arteria (Tedgui y Mallat, 2006).

En etapas avanzadas, la pared de la arteria aterosclerótica denota engrosamiento, reducción del diámetro de luz vascular, pérdida de elasticidad y rigidez debido a depósitos de calcificación. La ruptura de la placa es el distintivo agudo de la complicación y la exposición del núcleo trombo-génico a la cascada de coagulación que conduce a la formación de trombos (Plutzky y col., 2002). Esta complicación puede causar la oclusión parcial o total del lumen conduciendo a resultados adversos de CAD, a saber, angina inestable, infarto y accidente cerebrovascular (D'Souza y col., 2009).

Características de la Aterosclerosis en la Diabetes

La diabetes está asociada a enfermedades cardiovasculares, caracterizada por un aumento de cantidad de lípidos en los ateromas e infiltrado inflamatorio y aumento del número de rupturas que pueden conducir a la reducción del lumen vascular y un mayor riesgo de eventos isquémicos (Biondi-Zoccai y col., 2002).

En estudio en sujetos de entre 15 y 34 años que fallecieron por causas ajenas a eventos cardiovasculares y basándose en valores de HbA1c, se determinó que en aquellas arterias expuestas a hiperglucemia se observaron dos veces más el número de placas lipídicas en la superficie de la íntima y tres veces más lesiones en crecimiento en comparación con controles (McGill y col., 1995). En otra investigación similar, se observó aumento de áreas ricas en células necróticas en lesiones de personas diabéticas (Biondi-Zoccai y col., 2002). Además, en un subconjunto de pacientes con angina inestable, la angioscopia

reveló que la formación de úlceras en placa y los trombos intracoronarios son más comunes en diabéticos comparado con sujetos no diabéticos (Orchard y col., 2006).

La literatura ha documentado evidencia acerca de los mecanismos que influyen la aterosclerosis en pacientes con diabetes de recién diagnóstico y también con complicaciones (Figura 1, siguiente página). La aterogénesis en pacientes con diabetes incluye una compleja interacción entre hiperglicemia, hiperlipidemia, estrés oxidativo, y resistencia a la insulina. Las anteriores, en conjunto con alteraciones en coagulación, fibrinólisis y hemodinámica, hacen que la diabetes se asocie como un padecimiento multiplicador de la extensión y severidad de la aterosclerosis (Gerrity y col., 2001). Finalmente, la fisiopatología de la aterosclerosis en la diabetes se caracteriza por (1) disfunción de endotelio vascular, de VSMC y plaquetas, (2) estado proinflamatorio y protrombótico crónico y (3) alteración en la angiogénesis (D'Souza y col., 2009).

Aterosclerosis y Prediabetes

Hace algunos años ya se han hecho revisiones acerca de la contribución que podría tener la prediabetes en la generación de aterosclerosis (llámese IFG e IGT). Un meta-análisis de 1999 (Coutinho y col., 1999), donde se revisaron 20 estudios previos que incluían entre todos cerca de 100,000 individuos, reveló que hay un incremento de riesgo cardiovascular al incrementar la intolerancia a la glucosa. La explicación se basó en que cada componente del síndrome metabólico es un componente independiente de enfermedad cardiovascular, confirmando porque los sujetos con T2D, quienes presentan en muchos casos varios indicadores del síndrome metabólico, tienen alto riesgo del desarrollo de enfermedad cardiovascular (Douaihy, 2005).

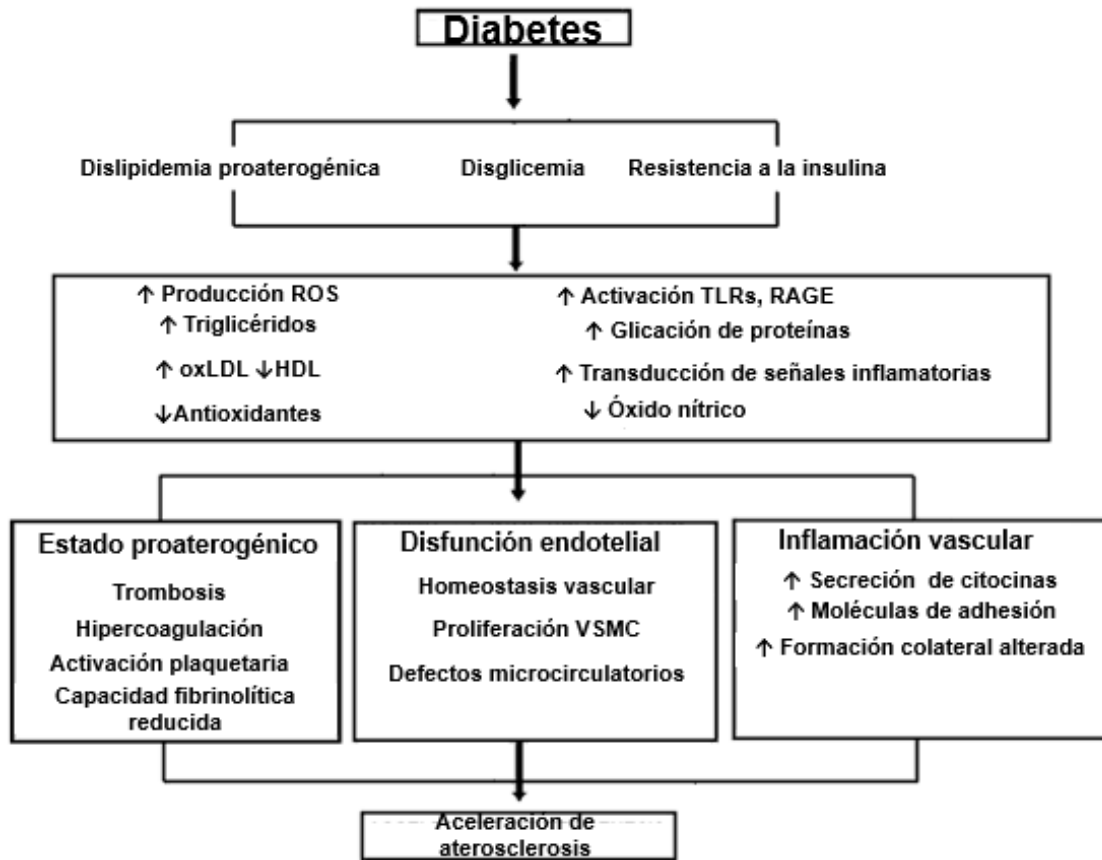


Figura 1. Mecanismos que aceleran la aterosclerosis en la diabetes. Abreviaciones: símbolos que indican alteraciones comparando con controles, ↑ aumento, ↓ disminución; ROS, especies reactivas de oxígeno; oxLDL, lipoproteína de baja densidad oxidada; HDL, lipoproteína de alta densidad; TLR, receptor tipo Toll; RAGE, receptor de productos de glicación avanzada; VSMC, células de tejido muscular vascular. Modificado de D'Souza y col., 2009.

En una revisión sistemática del 2010 acerca de la relación que puede tener la prediabetes y el riesgo cardiovascular, se informó que bajo la revisión de 8 publicaciones donde se determinaba IFG (≥ 100 mg/dL, < 126 mg/dL), el riesgo relativo (RR) de presentar enfermedad cardiovascular fue 1.18 en tales sujetos. En cuanto a la IGT (≥ 140 , < 200 mg/dl), en otras 8 publicaciones después de ajustar el efecto, se estimó que el RR fue 1.20 en los individuos estudiados. En cuanto a los 5 estudios que combinaban IFG e IGT, el RR fue de 1.10. Por tanto, la IFG e IGT tuvieron, aunque significativa apenas una asociación modesta con el riesgo de enfermedad cardiovascular. Por tanto, es difuso aún el conocimiento de la magnitud exacta del riesgo de enfermedad cardiovascular en el presente. No obstante, un incremento, aunque pequeño en el riesgo, asumiendo que existe una relación causal entre la prediabetes y la enfermedad cardiovascular, podría ser interpolada a un número sustancial de sujetos que están desarrollando o murieron de enfermedad cardiovascular. El número limitado de estudios examinando la asociación prediabetes-enfermedad cardiovascular debe estimular los esfuerzos para aclarar esta relación (Ford y col., 2010).

La patogénesis detrás de la prediabetes según explican las revisiones anteriores (Douaihy, 2005; Ford y col., 2010), mencionan el desbalance metabólico que causa la resistencia a la insulina. El daño inicial de la resistencia a la insulina influye en el metabolismo lipídico celular, causando un incremento intracelular del catabolismo de triglicéridos y aumento de la secreción de ácidos grasos libres a la circulación sanguínea (Ginsberg, 2000). Los niveles elevados de ácidos grasos libres provenientes de tejido adiposo insulino-resistente se acumulan en el hígado, causando que estimule la producción y secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). La secreción incrementada de VLDL resulta en hipertrigliceridemia. Adicionalmente, el aumento en las VLDL provoca un desbalance en las subclases de LDL y HDL. Este desbalance, promueve la disminución de HDL e incrementa las subclases de LDL pequeñas y densas (Ginsberg, 2000). La apolipoproteína A-I (ApoA-I), la segunda principal proteína

componente de la HDL, está involucrada en el correcto plegamiento de la HDL, eliminación y transporte del exceso de colesterol de tejidos periféricos hacia el hígado.

La ApoA-I puede disociarse de las HDL enriquecidas de triglicéridos y pueden degradadas por las células tubulares del riñón, reduciendo así la disponibilidad de HDL para el transporte inverso del colesterol (Ginsberg, 2000). En cuanto a las LDL densas y pequeñas (sdLDL), debido al enriquecimiento de triglicéridos se someten a lipólisis y se generan LDL más pequeñas y más densas. Los niveles bajos de HDL y aumentos de LDL pequeñas y densas son factores de riesgo independientes para la enfermedad cardiovascular.

La cantidad de sdLDL atrapada en el endotelio vascular también es internalizada a la íntima, estas sdLDL son más propensas a la oxidación que las LDL de otras subclases. Además, la resistencia a la insulina e hiperglicemia incrementa la oxidación de las LDL independiente de la subclase, llevando a un incremento anormalmente elevado de estas moléculas en sujetos con resistencia a la insulina (Grundy, 1999; Libby y col., 2002). Adicionalmente, las oxLDL (de las cuales la subclase principal son sdLDL oxidadas) se vuelven moléculas blanco para macrófagos. Los macrófagos fagocitan a las oxLDL, promoviendo un proceso de degradación de colesterol LDL y haciendo que estas células se conviertan en células espumosas, disminuyendo el traslado de colesterol hacia hígado. Estas, células espumosas son células ricas en lípidos, se acumulan y quedan en las arterias y comienzan a formar la placa lipídica antes descrita (aterogénesis). Ya en el estado prediabético se pueden presentar algunas o todas estas anormalidades, y según proponen algunos artículos el inicio de la enfermedad aterosclerótica acelerada (y no como el proceso normal que sucede en todos los individuos) puede suceder mucho antes del diagnóstico clínico de T2D. Sin embargo, en la última década se informa que aún la literatura es escasa como para aseverarlo como teoría (Douaihy, 2005).

Entre los últimos artículos acerca del tema, Kurihara y col., investigaron acerca de la posible asociación entre prediabetes con aterosclerosis coronaria en sujetos sin diabetes, con prediabetes y T2D, y evaluaron a los sujetos mediante angioscopia para identificar la vulnerabilidad de la placa observando el color amarillento de las placas. El estudio reveló que el promedio de placas amarillas y la intensidad del color en sujetos con prediabetes fue mayor que en sujetos sin diabetes y comparable a los de sujetos con diabetes. Estos resultados propusieron que la aterosclerosis progresa desde el estado prediabético. Sin embargo, este fue un estudio retrospectivo donde se tomaron datos de 67 pacientes con enfermedad arterial coronaria que se atendieron en un solo centro, quienes ya tenían síntomas, además que el diagnóstico fue solo por FPG y HbA1c, dejando fuera en gran parte el estudio de IGT en esta situación (Kurihara y col., 2013).

Después de este grupo, algunos otros han investigado el tema. En 2014, Faghihimani y col. reportaron bajo el estudio de una pequeña muestra de 135 sujetos que puede desarrollarse enfermedad arterial periférica desde el estado de prediabetes (Faghihimani y col., 2014). En 2016, Schöttker y col., propusieron que existe una asociación lineal entre HbA1c y eventos cardiovasculares (Schottker y col., 2016). Gomez-Marcos y col., reportaron que la FPG y HbA1c, pero no la 2hPG, están asociadas al grosor de la íntima-media carotídea (Gomez-Marcos y col., 2016). También en 2016, Suzuki y col. estudiando el papel de la IGT, encontraron que sujetos con enfermedad arterial coronaria, tienen placas coronarias más vulnerables cuando presentan IGT comparado con aquellos pacientes con NGT medido mediante tomografía de coherencia óptica durante una intervención coronaria percutánea (Suzuki y col., 2016). Resalta de estos estudios, el estudio de solo pacientes con síntomas, de grupos pequeños y realizados en un solo centro hospitalario.

Pensando en que hay datos limitados con respecto al impacto del estado glicémico sobre la enfermedad aterosclerótica coronaria subclínica en individuos

asintomáticos, en 2017, Park y col. también investigaron sobre la influencia del estado glicémico en el riesgo de aterosclerosis coronaria subclínica determinado mediante tomografía angiográfica coronaria computarizada en individuos asintomáticos. En el estudio el $\geq 50\%$ de estenosis fue considerado como significativo. La prediabetes, como variable independiente (después del ajuste de lípidos e hipertensión, variables socioeconómicas, edad y sexo), no se asoció con estenosis en arterias coronarias, placa, placa calcificada o placa no calcificada. Sin embargo, la diabetes sí se asoció con las mediciones anteriores comparado con controles (Park y col., 2017). Como limitante, la prediabetes y diabetes, solo se clasificaron según los niveles de FPG y % de HbA1c, dejando fuera del estudio a la prueba de OGTT, que en pasados estudios ha sido superior que la FPG para predecir la enfermedad cardiovascular y cualquier causa de muerte. Finalmente, propone que, para prevenir la aterosclerosis coronaria subclínica y futuros eventos cardiacos en individuos asintomáticos, se debe prevenir la diabetes, y es importante la reducción de los factores del síndrome metabólico (obesidad abdominal, hiperglicemia, hipertensión, dislipidemia; tabla I, siguiente página).

Tabla I. Criterios para el diagnóstico de síndrome metabólico (IDF, 2005).

Factores (3 de 5 constituye el diagnóstico)	Puntos de corte
Circunferencia de cintura (hispanos/latinos)	≥90cm en hombres
	≥80cm en mujeres
Triglicéridos	≥1.7mmol/L (150mg/dL)
	Tratamiento para triglicéridos elevados
HDL-C	<1.03mmol/L (40mg/dL) en hombres
	<1.3mmol/L (50mg/dL) en mujeres
	Tratamiento para HDL disminuido
Presión sanguínea	≥130mmHg presión sistólica
	≥85mmHg presión diastólica
	Tratamiento antihipertensivo
Glucosa en ayuno	≥5.6mmol/L(100mg/dL)
	Tratamiento antihiperglicémico

Criterios según Federación Internacional de la Diabetes. Abreviaturas: HDL-C, Colesterol-Lipo_ proteína de alta densidad; mmHg, milímetros de mercurio; cm, centímetro; mg, miligramo; dL, decilitro; mmol, milimol; L, litro.

Lipoproteína de Baja Densidad Oxidada en la Aterosclerosis

La aterosclerosis es un proceso crónico. Su desarrollo se debe al deterioro de varias actividades moleculares y celulares. Conduce a la pérdida gradual de la homeostasis estructural y funcional en la vascularización. Se asume que el LDL-C es proaterogénico pero el LDL-C modificado es el que desarrolla la aterosclerosis (Lyons y col., 1994).

Se ha propuesto que las oxLDL juegan un papel importante en la formación de la aterosclerosis, sin embargo, su contribución aún se sigue debatiendo. Varios receptores "carroñeros" (SR, por sus siglas en inglés) como SR-AI/II, CD36, receptor 1 tipo lectina de lipoproteína de baja densidad oxidada (LOX-1), receptores tipo Toll (TLRs) y otros, promueven la internalización de oxLDL. Estos receptores se expresan en la superficie de VSMC, macrófagos y células endoteliales, quienes median los efectos celulares de las oxLDL (Parthasarathy y col., 2010).

La disfunción y activación de las células endoteliales ha sido asociada con la aterogénesis. El inicio de la aterosclerosis se caracteriza por la creciente expresión de moléculas de adhesión vascular (ICAM-1, VCAM-1) y quimio-atrayentes (MCP-1) por parte de células endoteliales que promueven la adhesión de monocitos circulantes al endotelio (Quinn y col., 1987), además, las LDL *per se*, son quimio-atrayentes de monocitos (Ferretti y col., 2006), los cuales se diferencian en macrófagos e inician el desarrollo de placas lipídicas (Steinberg y col., 1989). Las oxLDL surgen de la oxidación de las LDL-C plasmáticas (Tabla II, III, siguientes páginas), favoreciendo la acumulación intracelular de esteres de colesterol y generación de células espumosas, precursoras de placas lipídicas y fibrosas (Parthasarathy y col., 2010).

Tabla II. Mecanismos de oxidación de lipoproteína de baja densidad. Modificado de Parthasarathy y col., 2010.

Mecanismo
1. Reacción de lipoxigenasa
2. Oxidación mediada por cobre y ceruloplasmina
3. Oxidación mediada por hierro
4. Oxidación mediada por mieloperoxidasa, grupo hemo, y peroxidasas
5. Oxidación dependiente de peroxinitrilos
6. Oxidación dependiente de tioles
7. Generadores de superóxidos, como NADPH oxidasa, xantina oxidasa
8. Generadores de radicales como citocromos

Tabla III. Lista de productos de oxidación derivados de lípidos y proteínas generados durante la oxidación de lipoproteína de baja densidad. Modificado de Parthasarathy y col., 2010.

A. Productos de oxidación de ácidos grasos	
1.	Peróxidos de ácidos grasos libres y esterificados, como el ácido 13-hidroxiperoxilinoico
2.	Hidróxidos de ácidos grasos libres y esterificados, como el ácido 13-hidroxilinoico
3.	Productos tipo prostaglandinas, como isoprostanos en forma libre y esterificada
4.	Aldeidos, como malondialdehído, nonanal 4-hidróxido, y hexanal
5.	Productos con núcleo aldehído que contienen lípidos esterificados, como fosfatidilcolina oxovalerilo
6.	Pentano y otros hidrocarburos
B. Productos derivados de lípidos	
1.	Lisofosfatidilcolina
2.	Productos de oxidación de colesterol, como 7-cetocolesterol
3.	Productos internos derivados de serina/fosfatidiletanolamina modificados
C. Productos de oxidación de proteínas	
1.	Productos carbonilo en proteína
2.	Fragmentos proteolizados mediante proceso no enzimático
3.	Derivados de aminoácidos modificados: cisteína, cistina, histidina, metionina, lisina, arginina, triptófano y tirosina
4.	Entrecruzamiento entre proteínas debido a puentes de tirosina
5.	Aductos lipo-proteicos
6.	Todos los cambios anteriores así como consecuentes cambios conformacionales pueden ser antigénicos
D. Otros cambios	
1.	Incremento de carga negativa
2.	Pérdida de actividad enzimática asociada a LDL

El efecto de las oxLDL en las células endoteliales está mediado por receptores CD36 y LOX-1 (Bonnetfont-Rousselot y col., 1997). Las oxLDL son retenidas en endotelio e internalizadas a espacio subendotelial y promueven la activación de más células endoteliales por medio del factor de transcripción NFκ-B (Stojanovic y col., 2006). Adicionalmente, se ha encontrado que las oxLDL pueden inhibir la expresión óxido nítrico sintasa (eNOS) y, por tanto, reducir el óxido nítrico disponible (Ghiselli y col., 1992). Recientemente se ha reportado que las oxLDL inducen la muerte de células endoteliales mediante la activación de los factores de transcripción de NFκ-B y AP-1 (Lada y Rudel, 2004), empeorando la disfunción endotelial.

Los macrófagos internalizan oxLDL mediante SR-AI/II, SRBI, CD36, LOX-1, y TLRs (Lada y Rudel, 2003). Una vez activados, se inhibe la migración de los macrófagos, se induce la secreción de citocinas proinflamatorias (IL-1β, TNF-α), ROS y metaloproteinasas que promueven la inflamación (Giessauf y col., 1996).

Así como los macrófagos, las VSMC también expresan LOX-1, y se pueden diferenciar en células espumosas al ser expuestas a oxLDL (Sparrow y col., 1988). Adicionalmente, oxLDL promueve secreción de PDGF y bFGF en macrófagos y células endoteliales que pueden inducir proliferación de VSMC (Kuhn y col., 1994).

Como describen los resultados anteriores, la clave de la influencia de la oxLDL y los SR en el proceso de formación de la aterosclerosis se ha establecido ya en varios modelos celulares y animales, donde el tratamiento con antioxidantes y el silenciamiento de SRs ha demostrado buenos resultados para reducir la aterogénesis.

En cuanto a poblaciones humanas. Se ha reportado asociación entre los niveles de oxLDL y factores de riesgo cardiovascular, incluyendo hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, obesidad, T2D, hipertensión (Salonen y col., 1992; Parthasarathy y

col., 2010), sugiriendo que la oxLDL es biológicamente relevante para el desarrollo de desórdenes metabólicos y enfermedad cardiovascular. Además, los niveles de oxLDL también se han reportado elevados en sujetos con diferentes grados de aterosclerosis y se ha asociado con su severidad (Esterbauer y col., 1989).

A pesar de estos resultados optimistas, estudios clínicos aleatorizados usando antioxidantes han demostrado beneficios solo en pacientes con alto riesgo con insuficiencia renal crónica y diabetes (Parthasarathy y col., 1988), sugiriendo que se necesitan definir factores adicionales involucrados en las diferentes subclases y modificaciones de la LDL en el desarrollo de aterosclerosis, biodisponibilidad de antioxidantes y por supuesto todos los factores involucrados en la aterosclerosis.

Como biomarcador independiente, el riesgo reportado de las oxLDL es moderado comparado con los factores clásicos del síndrome metabólico. Se necesitan realizar estudios con diferentes tipos de grupos, pacientes con diferentes condiciones y enfermedades en etapa temprana de la aterogénesis para definir mejor la implicación de cada tipo de LDL modificada en el desarrollo de aterosclerosis (Di Pietro y col., 2016).

Ferritina

El hierro es un nutriente esencial para la mayoría de los organismos vivos, es un componente principal de varias proteínas, cuya función por ejemplo es, la generación de energía, fabricación de material genético y el transporte de oxígeno. Este elemento es almacenado como iones de hierro férrico hidratado, en forma de un compuesto conocido como ferrihidrita, $5\text{Fe}^{2+}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$, un óxido férrico hidratado, en el núcleo de la proteína ferritina, proteína presente en casi todos los sistemas vivos (Chasteen, 1999; Granier y col., 2003).

La ferritina se expresa en numerosos tejidos, como una proteína intracelular en el citosol, mitocondria y núcleo. Se compone de 24 subunidades que consisten en dos tipos de subunidades formadas de 4- α hélices, designadas como la subunidad pesada y ligera (H: 21kDa y L: 19kDa respectivamente). Tiene una forma de casco hueco con un diámetro interior y exterior de 8 y 12nm respectivamente. La proporción de las cadenas H y L que forman la proteína ferritina depende del tejido de origen. La ferritina tisular generalmente entre 20%-H y 80%-L respectivamente, y ferritina sérica en condiciones normales con L-ferritina \geq 90%. La proteína ausente de hierro llamada apoferritina tiene un peso molecular entre 430 y 480kDa; la proteína con hierro puede pesar hasta 900kDa y puede contener aproximadamente 4500 iones de hierro férrico. La estructura cuaternaria forma 8 canales hidrofílicos donde convergen 3 subunidades y tienen forma de triángulo, miden de 4-5 Å y son ricos en residuos de aminoácidos ácido aspártico y ácido glutámico, son la puerta de entrada-salida de hierro, H₂O y moléculas hidrofílicas. También forma 6 canales hidrofóbicos donde convergen 4 subunidades y tienen forma cuadrada, que funcionan como puerta de entrada para el oxígeno, el cual permite las reacciones de óxido-reducción que sufre el hierro (Figura 2, siguiente página). Los genes que codifican las subunidades H y L de ferritina humana se encuentran en los cromosomas 11q y 19q, respectivamente. La secuencia de aminoácidos (aa) de H (183aa) y L (175aa) ferritina tiene una similitud en aproximadamente el 65% (Bomford y col., 1981; Boyd y col., 1985).

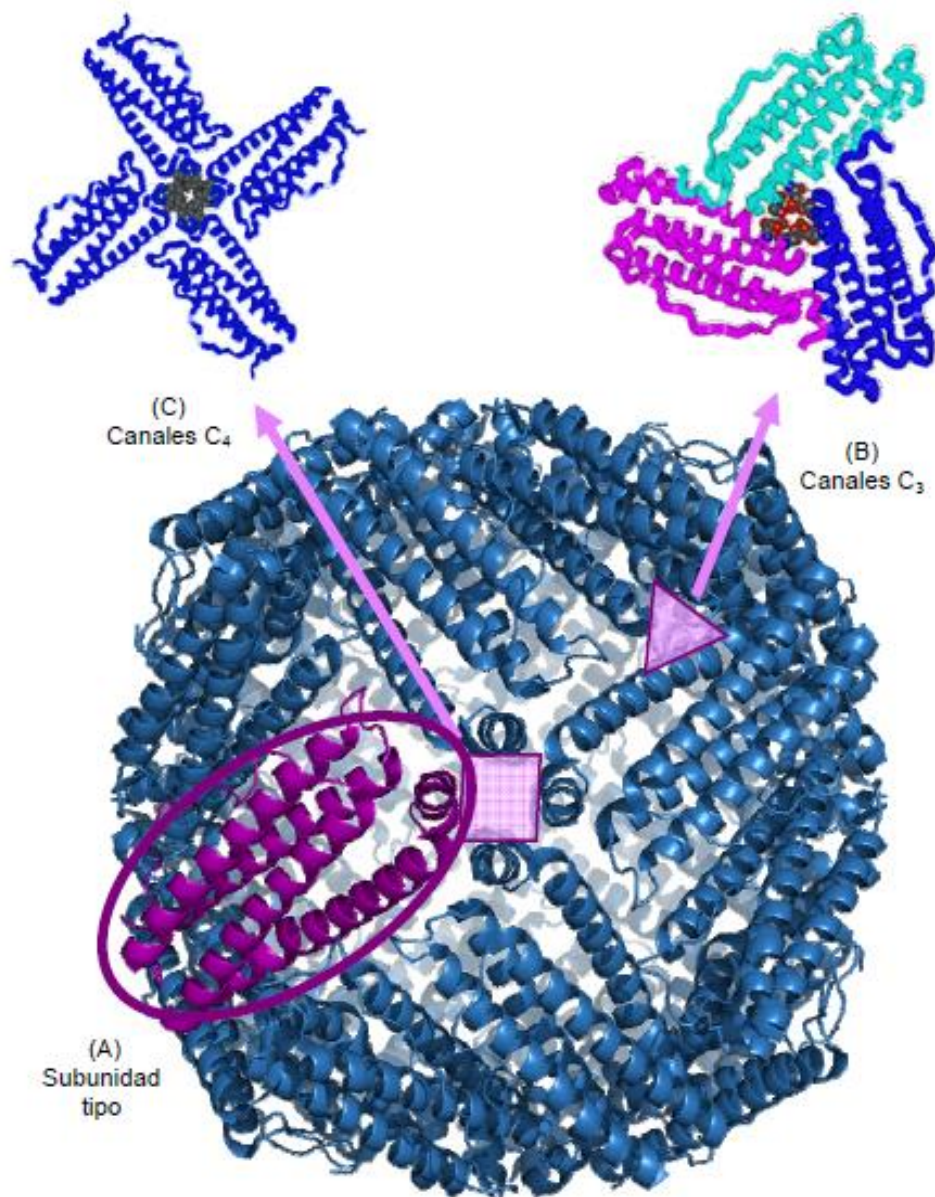


Figura 2. Esquema tridimensional de apoferritina. A) Subunidad de apoferritina. B) Canal hidrofílico, fungen como puerta de entrada del Fe²⁺. C) Canal hidrofóbico. (Granier y col., 2003).

La ferritina sérica tiene una vida media sérica de 50-75h. Se almacena en hígado, bazo, médula ósea y mucosa intestinal. Los valores de referencia según la Organización Mundial de la Salud para mujeres adultas son 20-200µg/L y hombres adultos entre 30-300µg/L. La ferritina sérica es muy baja o incluso ausente en hierro (Briat y col., 2010), sin embargo, se ha observado que en sobrecarga de hierro intracelular y en ausencia de receptor de transferrina, el sistema principal para transportar hierro (mediante transferrina), células de Kupffer y macrófagos pueden secretar ferritina conteniendo hasta 50% de hierro (Andrews, 2010). Sobre la base de la capacidad de unirse a la Concanavalin A, se cree que la ferritina sérica es n-glicosilada, de hecho un método se basa en su glicosilación; El ácido siálico está presente en la ferritina sérica y podría controlar el aclaramiento de la ferritina del plasma, sin embargo, no se ha caracterizado toda la estructura de glicosilación (Santambrogio y col., 1987; Theil, 2011).

La ferritina sérica consiste casi en su totalidad de L-ferritina, medida por reactividad cruzada inmunológica con anticuerpos anti-L-ferritina tisular (Santambrogio y col., 1987). El origen y la ruta de secreción de la ferritina sérica no han descrito completamente. Se ha demostrado que principalmente, hepatocitos, células de Kupffer y los macrófagos secretan ferritina sérica (Wesselius y col., 2004). A pesar de la ausencia de una señal secretora clásica en L-ferritina, la ferritina sérica está codificada por el mismo gen que la L-ferritina tisular, ya que los hepatocitos transfectados con ADNc de L-ferritina secretan ferritina a través del gen de L-ferritina (Ghosh y col., 2004). Sin embargo, debido a la falta de una secuencia peptídica señal que medie la secreción de ferritina, los mecanismos de cómo entra en la vía secretora requieren caracterización.

En casos raros, puede aparecer hiperferritinemia con trastornos de sobrecarga de hierro a partir de mutaciones en los genes de ferroportina y ceruloplasmina, y aquellos que causan hemocromatosis hereditaria: péptido antimicrobiano hepcidina (HAMP), proteína de hemocromatosis humana (HFE),

hemojuvelina (HJV) y receptor de transferrina (TFR2) relacionados con absorción y metabolismo de hierro. En estos casos, la hiperferritinemia es causada por un aumento en el hierro sistémico, debido a la expresión anormal de los productos de los genes implicados normalmente en el metabolismo del hierro (Roy y Andrews, 2005). La hiperferritinemia también se encuentra en enfermedades genéticas que no causan sobrecarga de hierro. Esto es causado por mutaciones en el gen de la L-ferritina, que se ha utilizado como otra evidencia de que la ferritina sérica está codificada por este gen. El primer ejemplo reportado, fue en pacientes con catarata por síndrome de hiperferritinemia, que tienen una mutación que aumenta la producción de L-ferritina en tejido y suero (Cazzola y col., 1997). Recientemente fueron identificadas tres mutaciones también en el gen de la L-ferritina, sin complicaciones asociadas por hiperferritinemia ni sobrecarga de hierro (Kannengiesser y col., 2009).

Almacenamiento de Hierro en Ferritina

El proceso de mineralización de la ferrihidrita en la ferritina se lleva a cabo en pasos sucesivos (Theil, 2011). Se involucra la oxidación del Fe(II), hidrólisis, nucleación y crecimiento del compuesto cristal. Los iones de Fe(II) se transportan al interior por los canales hidrofílicos (donde convergen 3 subunidades) de H-ferritina ricos en residuos de aminoácido de ácido aspártico y ácido glutámico llamados comúnmente como dominios ferroxidasa, de los que carece L-ferritina, es donde el Fe(II) se oxida a Fe(III). Los dominios ferroxidasa y de nucleación poseen una carga total electrostática negativa mientras que las caras externas a los dominios ferroxidasa poseen carga positiva, generando un gradiente electrostático dirigido al interior. La estructura cuaternaria de ferritina es muy estable comparada con otras proteínas séricas, tanto a degradación térmica como química debido a las fuertes interacciones entre subunidades. Es termoestable hasta 85°C y un intervalo de pH de 3.5-8.5, permitiendo la manipulación química suave sin alterar su estructura.

Receptores de Ferritina Sérica

El primer receptor de superficie celular que une ferritina (H-ferritina; Chen, 2005) que fue clonado fue el dominio de inmunoglobulina de células T de ratón y el dominio de mucina-2 (TIM-2). TIM-2 es una proteína transmembranal expresada en hígado, riñón, oligodendrocitos, células T y B, inhibiendo activación de células T (Knickelbein y col., 2006), y a pesar de tener una alta homología con TIM-1, no se conoce tal receptor TIM-2 humano.

Recientemente, se identificó al receptor carroñero 5 de clase A (Scara5; Li y col., 2009) como otro receptor de superficie celular a ferritina, con mayor afinidad a L-ferritina. Scara5 es un receptor “limpiador” que puede unirse a varios ligandos y desempeña también un papel en la organogénesis renal, proceso donde se necesita hierro. Desde que humanos con hipotransferrinemia familiar también tienen un desarrollo normal de los órganos (Hayashi y col., 1993), se experimentó en ratones con el receptor de transferrina-1 ausente (TfR1-knockout), y mostraron una organogénesis normal, este resultado apoya la noción de que ferritina, a través de Scara5 puede ser una fuente de hierro en la organogénesis.

El mismo TfR1 se identificó como un receptor de ferritina (Li y col., 2010). Después de clonar la proteína, los resultados mostraron que la unión de H-ferritina a TfR1 fue parcialmente inhibida por la transferrina (fuente principal de hierro en plasma) lo que sugiere que los sitios de unión de la transferrina y el receptor de ferritina no se superponen completamente. Finalmente, la unión de H-ferritina a TfR1 induce la captación en endosomas y lisosomas.

Funciones de Ferritina Sérica

La ferritina sérica es ampliamente reconocida como un reactante de fase aguda en inflamación aguda y crónica, incluida en muchas afecciones inflamatorias, que incluyen la enfermedad renal crónica (Kalantar-Zadeh y col., 2006), artritis reumatoide, infección aguda, traumatismos mecánicos, cáncer, diabetes, etc. Se sabe que, en inflamación, citocinas como TNF- α e IL-1 β inducen la producción de ferritina sérica (Torti y Torti, 2002). Los niveles elevados de ferritina en estos estados reflejan una mayor capacidad total de almacenamiento de hierro, donde reservas de hierro en plasma y liberado en lisis celular son secuestradas por la ferritina (emulando la función de almacenamiento en tejido), hierro no disponible para la hematopoyesis, fenómeno que contribuye a la "anemia por inflamación" (Ganz T. y Nemeth, 2009). Se presume que esta deficiencia relativa de hierro en la inflamación es resultado de evolución como un mecanismo de defensa para restringir el hierro sérico para uso de patógenos y tumores (Hintze y Theil, 2006).

Desde hace algunos años se sabe que los pacientes con neoplasias malignas hematológicas, como la enfermedad de Hodgkin y la leucemia aguda, tienen alterada la inmunidad celular (Schier y col., 2006). Estos pacientes también tienen niveles elevados de ferritina sérica. En los primeros años de estudios *in vitro*, se indicó que la ferritina modula la función inmune al inhibir la función de los linfocitos (Matzner y col., 1979). Cuando los linfocitos humanos se trataron con ferritina de bazo, se inhibió la activación de linfocitos celulares por la Fito-hemaglutinina (PHA). También se encontró que la H-ferritina disminuye significativamente la proliferación de células madre de granulocitos-macrófagos y progenitoras eritroides. Curiosamente, la función mielo-supresora de la H-ferritina dependía de su actividad ferroxidasa, ya que las mutaciones en H-ferritina que inactivaron su actividad ferroxidasa, abolieron la actividad mielo-supresora. Como se requiere hierro para la proliferación y diferenciación celular, los autores atribuyeron la actividad a la captación de hierro proveniente de fuentes como transferrina. También se ha sugerido que H-ferritina a través del

receptor TIM-2 puede contribuir a la supresión inmune induciendo IL-10 en los linfocitos (Gray y col., 2001), sin embargo, las vías de señalización no se han explorado.

Más reciente, se propuso una nueva función para la ferritina extracelular como molécula proinflamatoria en células estrelladas hepáticas (Ruddell y col., 2009). Se observó que las células tratadas con ferritina activan una ruta que incluye la fosforilación de fosfo-inositol 3 cinasa (PI3K), la activación de proteína cinasa C (PCK) y MAP cinasa (MAPK), que finalmente culmina en la activación de NF-kB. La activación de NF-kB a su vez indujo la expresión de IL-1 β , TNF- α e iNOS.

Ferritina y Cininógeno de Alto Peso Molecular de dos Cadenas (HKa): Implicación en Angiogénesis, Adhesión y Proliferación

La búsqueda de moléculas relacionadas con la ferritina sérica humana condujo a que el grupo de Torti, identificara a cininógeno de alto peso molecular (HK) como una proteína que interactúa con ferritina sérica (Torti y Torti, 1998). HK es una proteína plasmática abundante de 120 kDa que inicialmente se describió como un cofactor en la cascada de coagulación. La HK es escindida por una serina proteasa, la calicreína, para producir dos cadenas de proteínas activas separadas: bradicinina (BK) y cininógeno de alto peso molecular de dos cadenas (HKa; Sainz y col., 2007). BK es un péptido de 9 aminoácidos que induce la liberación rápida de NO, dolor y vasodilatación. BK es también un péptido pro-angiogénico y en contraste, HKa es anti-angiogénico (Guo y Colman, 2005).

La angiogénesis, proceso de fabricación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, es un punto fisiológico importante también en algunos procesos patológicos (Folkman, 2003). El proceso de angiogénesis está regulado por un balance de varios factores pro y anti-angiogénicos. La ferritina, a través de la interacción directa con HK y HKa, es un regulador de la angiogénesis. Los ensayos de unión demostraron que la ferritina interactúa con

la cadena ligera de HK (Parthasarathy y col., 2002). La ferritina redujo la escisión de HK causada por calicreína, la elastasa y la triptasa (Coffman y col., 2008). Al inhibir la escisión de la HK, la ferritina disminuye la BK y la HKa, reduciendo los niveles de ambos reguladores angiogénicos.

Un hecho quizás más importante es que la ferritina también se une a la ferritina HKa, unión 10 veces más afín con HKa que HK. La ferritina se une al dominio 5, responsable de las propiedades anti-angiogénicas de HKa, específicamente a un péptido rico en histidina, glicina y lisina (HGK), con secuencia ⁴⁷⁴DHGHKHKHGHGHGKHKNGKNGKHNGWK⁵⁰². (Coffman y col., 2009; Tesfay y col., 2012). Debido a esto, la ferritina promueve la actividad angiogénica. En un modelo de ratón con tumor, en el que HKa inhibe la formación de vasos, se observó que la estimulación con ferritina reduce la acción de HKa, lo que promueve un aumento de la angiogénesis en el tumor (Coffman y col., 2009).

Los niveles de ferritina sérica se elevan significativamente durante la inflamación, fenómeno en el que se puede inducir angiogénesis. La acción pro-angiogénica de la ferritina propone una justificación para aumentar sus niveles durante la inflamación, y en patologías como desarrollo de tumores (Coffman y col., 2009).

Más reciente, estudios de unión utilizando anisotropía fluorescente han revelado más acerca de la interacción entre ferritina y el dominio 5 de HKa (HK5). La interacción entre las dos proteínas está mediada por iones metálicos como Co^{2+} , Cd^{2+} y Fe^{2+} y esta interacción funciona independientemente del núcleo de ferrihidrita cargado de iones Fe^{3+} , además de que se demostró que es una interacción en superficie (Huhn y col., 2014).

También se encontró que las constantes de disociación son similares para H y L-ferritina. Además, reportes previos revelan que hay sitios de superficie que pueden unir metal en el exterior de la ferritina (Wang y col., 2006; Lawson y col.,

1991). Aprovechando este conocimiento, se tomó L-ferritina humana que se sabe puede coordinar Cd^{2+} en 2 residuos del aminoácido aspartato 15 (Asp15, L-ferritina WT por sus siglas en inglés), se mutó el Asp15, para generar una alanina 15 en tal sitio (L-ferritina D15A). Así, se encontró diferencia de afinidad entre L-ferritina WT y la L-ferritina D15A por HK5 en presencia de Fe^{2+} , con un valor de K_d casi 2 veces mayor al unirse L-ferritina WT y HK5. (Figura 3; Huhn y col., 2014).

El mismo grupo de investigación encontró que a parte de la inhibición de la anti-angiogenesis promovida por HK5 de HKa, ferritina puede inhibir la anti-adhesión y anti-proliferación que provoca HKa en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) y bloquear la antiangiogenesis en células de aorta (Figura 4, siguiente página; Huhn y col., 2014). La H-ferritina y la L-ferritina tienen un 65% de identidad de aminoácidos en su secuencia y estructuras espaciales muy similares, tanto en monómeros (subunidades), como en la estructura cuaternaria de la proteína con las 24 subunidades (Wang y col., 2006). La fuente fisiológica de ferritina que se une a HKa no se ha establecido, aunque se hipotetiza que la ferritina circulante es una posibilidad y los niveles de ferritina sérica son aproximadamente comparables a los niveles endógenos de HKa (Parthasarathy y col., 2002). Finalmente, los macrófagos, identificados como fuente de ferritina secretada (Cohen y col., 2010), podrían servir también como fuente en sitios focalizados.

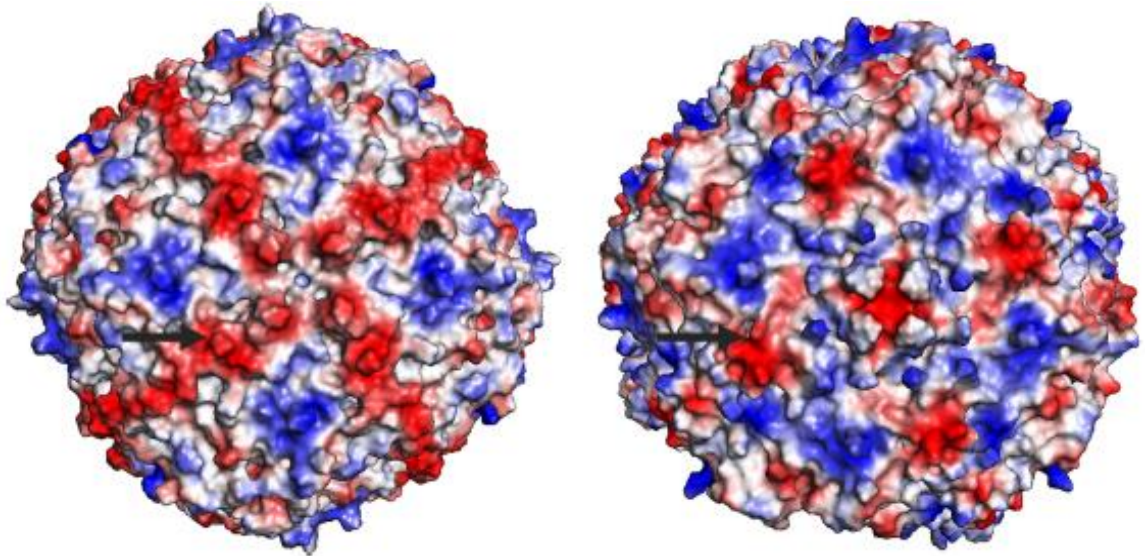


Figura 3. Representación del potencial electrostático de H-ferritina y L-ferritina. Las flechas apuntan a Asp15 de H-ferritina (izquierda) y L-ferritina (derecha). El color rojo indica las regiones electrostáticamente negativas y el color azul las regiones electrostáticamente positivas. Las regiones cargadas negativamente podrían servir como sitios de unión para el péptido HK5 (rico en His-Gly-Lys) cargado positivamente (Huhn y col., 2014).

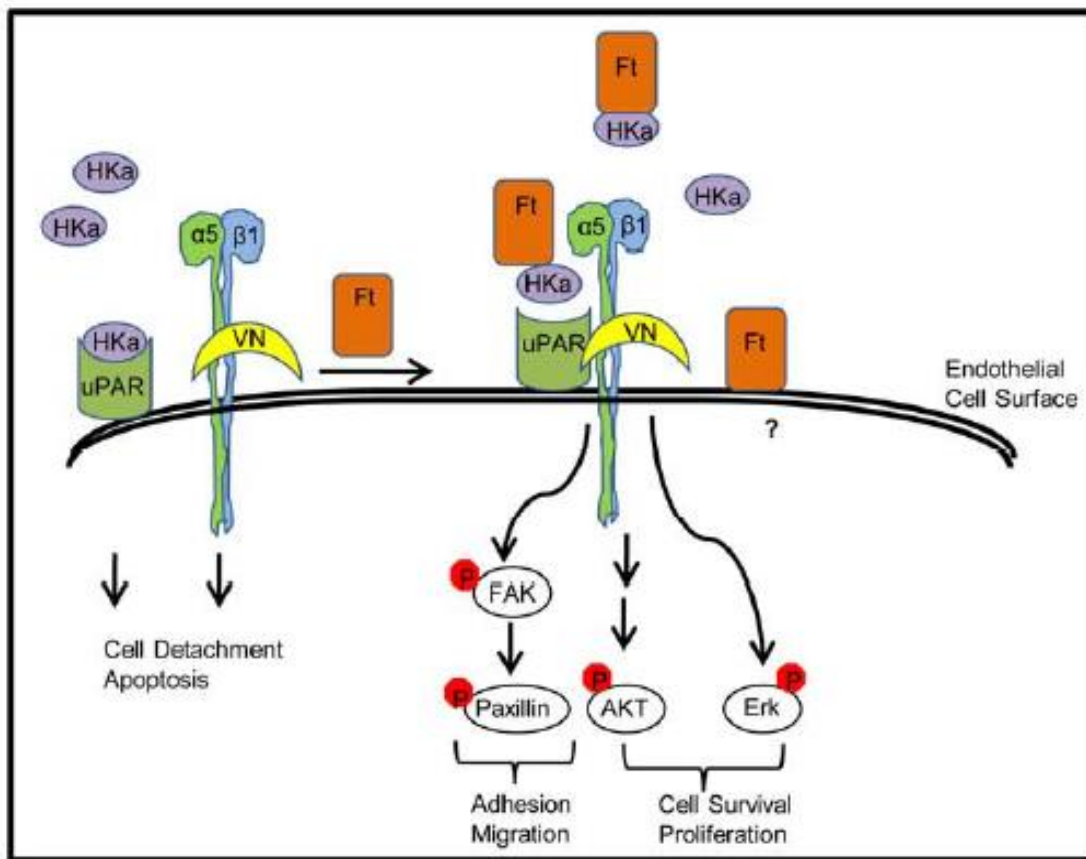


Figura 4. Ferritina promueve la adhesión y proliferación de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). 1) Ferritina promueve la adhesión y supervivencia de HUVECs tratadas con HKa mediante las vías de Erk, Akt, FAK y paxillina. 2) Ferritina inhibe la anti-proliferación y la anti-adhesión que provoca HKa al unirse a HK5, dominio 5 de HKa. 3) H y L-ferritina se pueden unir por igual a HK5 de HKa. 4) Ferritina disminuye la unión de HKa a las células endoteliales y reestablece la asociación integrina $\alpha 5\beta 1$ -uPAR. Abreviaturas por sus siglas en inglés: HKa, cininógeno de alto peso molecular de dos cadenas; HK5, dominio 5 del HKa; Ft, ferritina; HUVEC, células endoteliales de venas umbilicales humanas; Erk/MAPK proteína cinasa activada por mitógenos; Akt/PKB, proteína cinasa B; FAK/PTK2, proteína tirosin cinasa 2; uPAR/CD87, receptor de urocina. Tesfay y col., 2012.

Ferritina Sérica: Implicación en Resistencia a la Insulina y Disfunción en Células β

La concentración de ferritina sérica ayuda a estimar indirectamente las reservas de hierro, ya que, en condiciones fisiológicas, se asocia linealmente con las reservas en bazo, hígado y médula ósea (Jacobs y col., 1972), e incluso reservas aumentadas de hierro se han relacionado con la generación de diabetes (McClain y col., 2006; Ellervik y col., 2013; Zacharski y col., 2017; Kell y Pretorius, 2018). Adicionalmente, y agregando discusión al problema, la ferritina sérica es una proteína de fase aguda y se incrementa en la presencia de varias enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, como lo es diabetes e incluso se ha observado aumentada en prediabetes (Worwood y Jacobs, 1980; Chen y col., 2006; Park y col., 2015; Huang y col., 2016; Meng y col., 2017).

La hipótesis del hierro en la patogénesis de la diabetes en los seres humanos ha sido sugerida por varios hallazgos previos. En primer lugar, la sobrecarga de hierro en el trastorno genético Hemocromatosis Hereditaria se ha asociado con una mayor prevalencia de diabetes (McClain y col., 2006). De hecho, un reciente meta-análisis de estudios prospectivos concluyó que un alto nivel de ferritina sérica está asociado con un mayor riesgo de T2D incidente (Kim y col., 2015)

La ferritina sérica elevada y el aumento en el % de saturación de transferrina, indicadores de reservas elevadas de hierro, han sido fuertemente asociadas con un mayor riesgo de prediabetes y diabetes (Kim y col., 2015; Meng y col., 2017). El fundamento está en que el hierro a través de la generación de radicales libres contribuye al estrés oxidativo, el cual puede inducir resistencia a la insulina en hígado, músculo esquelético y adipocitos, y disfunción y apoptosis en células β del páncreas, propiciando por tanto hiperglucemia crónica en sangre. Por ejemplo, se ha observado que el hierro induce peroxidación de lípidos, especialmente ácidos grasos libres (Choi y col., 2008; Opara, 2004). Además, en modelos celulares y animales, la restricción dietética de hierro o la quelación

previene la pérdida de función de las células β y el desarrollo de diabetes¹⁰⁵. (Cooksey y col., 2010)

Pese a lo anterior, hasta el momento se desconoce el umbral en los niveles de ferritina sérica en humanos que se correlacionan con la resistencia a la insulina y disfunción en células β ya que pueden variar según el sexo y la edad, incluso el grupo étnico (Zacharski y col., 2000). Son necesarios estudios prospectivos aleatorizados para entender mejor la ferritina y su papel en la hiperglicemia, además de la inclusión de otros componentes del metabolismo del hierro como transferrina, receptor soluble de transferrina, % de saturación de transferrina, el mismo hierro sérico, que ayuden a comprender si realmente el aumento de hierro corporal es agente causal de la diabetes (Dorcely y col., 2017).

Por otro lado, el uso de ferritina sérica como indicador de reservas de hierro corporales se ha discutido, principalmente por el papel que tiene ferritina como proteína de fase aguda en inflamación, donde citocinas como TNF- α e IL-1 β inducen la producción de ferritina sérica (Torti y Torti, 2002). Lo que llevó a pensar que gran parte de la elevación de ferritina sérica en diabetes es explicada por la inflamación crónica que se observa en los pacientes. Es por ello que, estudios que han utilizado a ferritina sérica como manifestación de reserva elevada de hierro, han tratado de disminuir este probable atributo ajustando a inflamación, y aunque se ha encontrado en estudios que este ajuste no atenúa significativamente el efecto de interés (Jehn y col., 2007; Rajpathak y col., 2009; Zhao y col., 2012; Akter y col., 2017), otros han determinado que el aumento de ferritina sérica sería principalmente por inflamación (Hernandez y col., 2005; Jehn y col., 2007). Por tanto, es importante seguir estudiando el tema, abordando ambas partes (tanto aumento de reserva corporal de hierro como inflamación), poniendo atención especial al tipo de población (grupo étnico, estado de salud, genética, hábitos de alimentación) y muestreo aleatorio representativo de la población. (Dorcely y col., 2017)

Finalmente, en las últimas dos décadas, biomarcadores anormales en cascadas de señalización en adipocitos, inflamación, disfunción endotelial y sobrecarga de hierro han mejorado nuestra comprensión de la complejidad de la fisiopatología de T2D, más allá del clásico estudio de células β , músculo esquelético e hígado (Meigs, 2009). Sin embargo, aún se discute la capacidad de los nuevos biomarcadores para predecir el riesgo futuro de T2D ajustando a medidas antropométricas, factores de estilo de vida y marcadores clásicos como niveles de glucosa en ayuno y lípidos (Zheng y col., 2018)

Implicación del Hierro en Generación de Aterosclerosis

La importancia del hierro en el daño tisular se deriva de la facilidad con que el hierro es oxidado y reducido, aunque esencial por sus funciones metabólicas, hace al hierro potencialmente peligroso por su capacidad para participar en la generación de especies reactivas (Halliwell y Gutteridge, 1990) El hierro puede tener un papel catalítico en reacciones donde participa el oxígeno, comúnmente conocidas como reacciones de Fenton y Haber-Weiss catalizadas por metal (Halliwell y Gutteridge, 1990). En estas reacciones, las reducciones secuenciales de oxígeno a lo largo de la vía univalente conducen a la generación de anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y agua (Figura 5, siguiente página). El hierro también tiene un papel importante en la iniciación y propagación de la peroxidación lipídica (la reacción oxidativa mediante la eliminación de átomos de hidrógeno de ácidos grasos poliinsaturados en bicapas lipídicas de membranas de organelos), ya sea a través de radicales hidroxilos o directamente catalizando la peroxidación lipídica. En estudios *in vitro*, se ha demostrado la capacidad de quelantes de hierro para bloquear la generación del radical hidroxilo (Halliwell y Gutteridge, 1990; You y Wang, 2005)

Los organismos tienen cuidado en el manejo del hierro, y el secuestro de hierro en el transporte y almacenamiento en proteínas puede considerarse una contribución a las defensas antioxidantes. Ahora está bien establecido que los

oxidantes pueden causar la liberación de hierro, por ejemplo, el hierro de ferritina (Figura 5, siguiente página), iniciando así un ciclo vicioso que conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno más reactivas. Además, se ha demostrado que las proteínas glicadas tienen una afinidad sustancial por los metales de transición, y el metal unido conserva la actividad redox y participa como catalizador de la oxidación. Por lo tanto, si se formaran glicoquilatos similares *in vivo*, las reacciones mediadas por estos quelatos podrían darse en las complicaciones vasculares de la diabetes (Qian y col., 1998). Existe evidencia de que estos mecanismos pueden estar presentes *in vivo*. Fu y col. (1998), basados en la comparación de productos de oxidación en la íntima de muestras de placa carotídea humana después de exponerlos al ataque de radicales hidroxilos, concluyó que el daño del hidroxilo podría ocurrir en la placa *in vivo*. Soporte adicional para esto proviene de un modelo diabético de enfermedad vascular en la que los cambios que ocurrieron en la pared de la arteria en monos que tenían diabetes se explicaron mejor mediante el estrés oxidativo (Pennathur y col., 2001). En ambos estudios indican la participación de iones metálicos como el hierro.

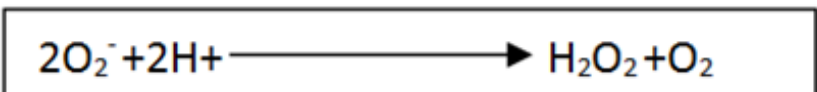
Hay evidencia de que las oxLDL participan en la generación de aterosclerosis. La oxLDL tiene efectos citotóxicos directos sobre las células endoteliales y se ha demostrado que tiene una capacidad quimiotáctica que propicia el reclutamiento de monocitos circulantes. Experimentos donde se adiciona LDL en cultivos de células endoteliales, resulta en elevaciones en productos de peroxidación lipídica y niveles intracelulares de hierro libre, sugiriendo una posible relación entre la modificación oxidativa de las LDL y el metabolismo del hierro (Van Lenten y col., 1995).

Por tanto, el hierro que cataliza reacciones de formación de radicales libres tiene un importante papel en la oxidación de LDL, que se producen en las células endoteliales, células del músculo liso, o macrófagos. Además, se ha demostrado

Reacción de Fenton



Reacción de Haber-Weiss



Desprendimiento de hierro de ferritina

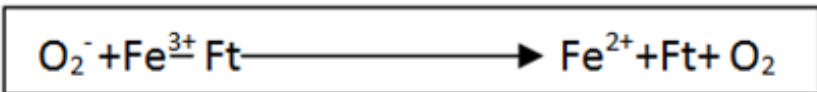


Figura 5. Reacciones óxido-reducción en las que participa comúnmente el hierro en estados de estrés oxidativo. You y Wang, 2005.

que la deferiprona puede proteger a las células endoteliales HUVEC, de la citotoxicidad de las oxLDL (Matthews y col., 1997).

En cuanto a los datos epidemiológicos que estudian la relación que tienen las oxLDL en la generación de aterosclerosis se han observado resultados conflictivos. Varios estudios reportan asociación entre las reservas de hierro y la progresión de la aterosclerosis carotídea o infarto agudo al miocardio (de Valk y Marx, 1999; Ahluwalia y col., 2010; Vinchi y col., 2014; Ilyas y Shah, 2016), mientras que otros argumentan que no hay asociación (Baer y col., 1994; Danesh y Appleby, 1999; Sun y col., 2008). Hay revisiones que mencionan que para dilucidar bien el problema se deberá incluir grupos de intervención con tratamiento de reducción de hierro en pacientes de alto y bajo riesgo, para determinar si ello es un efecto protector (Shah y Alam, 2003; Sullivan, 2010).

Finalmente, por los antecedentes antes expuestos, la presente tesis tuvo como objetivo determinar si existe asociación entre ferritina sérica y lipoproteína de baja densidad oxidada en sujetos con glucosa normal en ayuno y glucosa alterada en ayuno, lo cual permitirá aportar al conocimiento sobre la fisiopatología que antecede a la diabetes, y si por un lado las reservas corporales de hierro o bien la inflamación, medidas mediante ferritina sérica, tienen contribución a los niveles de oxLDL en una muestra de sujetos con prediabetes. Además, se propone un sistema de aislamiento de ferritina sérica, que permitirá en el futuro inmediato estudiar mejor la proteína y su relación con fisiopatologías tanto inflamatorias como aquellas relacionadas con aumentos en las reservas de hierro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Justificación

La aterogénesis comienza y podría acelerarse antes del diagnóstico de diabetes tipo 2, al menos a través, de mecanismos donde está involucrada lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL). Sin embargo, hay poca investigación sobre oxLDL en personas con glucosa alterada en ayuno (IFG), un tipo de prediabetes. Además, no hay ningún estudio que comprenda asociación entre ferritina sérica como indicador de reservas de hierro o inflamación y oxLDL en la prediabetes (tanto en IFG como en intolerancia a la glucosa post-prandial). Resultados podrían determinar una posible causa de oxidación de LDL o un estado inflamatorio que promueve oxidación de LDL en el estado IFG. Finalmente, el aislamiento de ferritina sérica permitirá en un futuro inmediato, estudiar mejor el problema expuesto, y otros problemas en los cuales está involucrada ferritina sérica.

Pregunta de Investigación

¿La ferritina sérica está asociada a lipoproteína de baja densidad oxidada en sujetos con glucosa normal en ayuno y glucosa alterada en ayuno?

Hipótesis

Hi: Ferritina sérica está asociada a lipoproteína de baja densidad oxidada en sujetos con glucosa normal en ayuno y glucosa alterada en ayuno.

Etapas Metodológicas de la Tesis: Estudio Observacional y Aislamiento de Ferritina Sérica

La presente tesis se compone de dos etapas, en la primera etapa, la realización de un estudio observacional transversal analítico para estudiar la relación ferritina sérica y lipoproteína de baja densidad oxidada en sujetos sin diabetes, con prediabetes y diabetes tipo 2. La segunda etapa para el aislamiento de ferritina sérica mediante un método cromatográfico de afinidad por metales inmovilizados.

Etapas 1: Determinación de Ferritina Sérica y Lipoproteína de Baja Densidad Oxidada en los Sujetos de Estudio

Tipo de Estudio y Participantes

El tipo de estudio fue no probabilístico, observacional, transversal, analítico con método de muestreo por conveniencia. Este tipo de estudio identifica a personas con una condición por ejemplo una enfermedad y los compara con un grupo pareado apropiado que no presenta la enfermedad. Se estudian simultáneamente una o más variables en una muestra con la enfermedad de la población de pacientes bien definida, en un momento determinado con alcance descriptivo-correlacional no permitiendo conocer la secuencia temporal y causal de los acontecimientos (Hernández, 2003). En el presente, se estudió principalmente ferritina sérica y otras variables relacionadas con enfermedades metabólicas crónico-degenerativas. El estudio fue realizado en el laboratorio de bioquímica del Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud, de la Universidad de Sonora, en Hermosillo, Sonora, México. Fueron reclutados 18 sujetos con glucosa alterada en ayuno (IFG, por sus siglas en inglés), 6 sujetos con T2D y 36 más con glucosa normal en ayuno quienes respondieron a una invitación abierta en la Universidad, durante el período de junio a agosto del 2011. El diagnóstico se basó en los criterios de la Asociación Americana de Diabetes para 2011, (IFG: ≥ 5.6 a < 7.0 mmol/L, T2D: ≥ 7.0 mmol/L). El grupo de sujetos

normoglicémicos quedó equilibrado por proporción hombre/mujer, edad e índice de masa corporal (IMC) comparándolo con el grupo prediabético. Todos los participantes fueron hispanos no blancos, de origen no indígena, descendientes de mestizos mexicanos. Al momento de toma de muestra, los sujetos no tuvieron inflamación aguda, infección, anemia por deficiencia de hierro ($<12\mu\text{g/L}$ de ferritina), ferritina sérica extremadamente alta ($>1000\mu\text{g/L}$), hemoglobinopatías, cáncer, hipotiroidismo, complicaciones vasculares, enfermedad hepática, enfermedad renal, enfermedad autoinmune, alcoholismo, embarazo o lactancia. Además, ninguno de ellos estaba en terapia con antihipertensivos, suplementos de hierro, medicamentos hipolipemiantes, antiinflamatorios no esteroides, esteroides, reemplazo hormonal, pioglitazona, tiroglobulina, fibratos o vitaminas al menos seis meses antes del estudio, los sujetos tenían entre 20 y 65 años de edad y residían por lo menos 2 años en Hermosillo, Sonora al momento del estudio. Este estudio se realizó de acuerdo con las directrices de la Declaración de Helsinki revisada en 2013, con la autorización del comité de bioética en investigación del Departamento de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Sonora. Se informó a todos los sujetos sobre la naturaleza del estudio y firmaron una carta de consentimiento.

Recolección de Muestras y Pruebas de Laboratorio

Al momento de la toma de muestra, los sujetos presentaban un ayuno de noche de 10 a 12 horas, evitando el ejercicio extenuante y cualquier ingesta de alcohol durante las 48 horas previas a la evaluación. Las muestras de sangre venosa se recolectaron en tubos con EDTA y tubos sin anticoagulantes utilizando el método estándar de vacutainer (Becton, Dickinson, NJ, EE. UU.). Las muestras de plasma y suero se introdujeron en alícuotas más pequeñas almacenadas a -80°C hasta su uso. La misma muestra de suero se utilizó para todas las medidas siguientes: colesterol total (TC), triglicéridos (TG) y colesterol HDL (HDL), que se cuantificaron espectrofotométricamente mediante pruebas de diagnóstico

estandarizadas disponibles comercialmente en un analizador Hitachi Modular P800 (Roche Diagnostics Co., Indiana, USA). La concentración de LDL-C se calculó utilizando la fórmula de Friedewald (1972). La glucosa sérica en ayuno se determinó utilizando un análisis de glucosa oxidasa (Hitachi Modular P800 Analyzer, Roche Diagnostics Co., IN, EE. UU.). Los siguientes analitos se midieron mediante ensayo inmuno-adsorbente ligado a enzimas (ELISA): adiponectina (cat. Ab99968, Abcam, Cambridge, Reino Unido), interleucina 6 (IL-6, cat. 900-K16, PreproTech, Nueva Jersey, EE. UU.), Lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL, cat. 10-1143-01, Mercodia, Uppsala, SE) y ferritina sérica (cat. ab108837, Abcam, Cambridge, Reino Unido). La altura y el peso se midieron utilizando un estadiómetro de pared precalibrado (Holtain Ltd., Dyfed, Reino Unido) y balanza electrónica (serie Defender 3000, Ohaus, Pine Brook, NJ, EE. UU.), respectivamente. El BMI se calculó como el peso en kilogramos dividido por la altura en metros cuadrados. La circunferencia de la cintura (WC) se midió en cm, directamente en la piel entre el punto medio del pico ilíaco y el borde inferior de la última costilla al nivel del ombligo mientras el sujeto estaba en una posición de pie, y al final de la espiración normal, asegurándose de que la cinta se colocara perpendicular al eje vertical (Y) del cuerpo y paralelo al suelo. La circunferencia de la cadera se midió en la parte más ancha de la región glútea a nivel del tubérculo púbico en posición de pie. La relación cintura-cadera se determinó dividiendo la WC y la circunferencia de la cadera. La presión arterial se evaluó utilizando un esfigmomanómetro manual, después de que los sujetos descansaran durante 5 minutos en posición sentada. Los valores sistólicos y diastólicos se tomaron como el promedio de dos lecturas. La presión arterial alta se definió como una presión arterial sistólica igual o superior a 140 mmHg y/o una presión arterial diastólica igual o superior a 90 mmHg.

Medición de Ferritina

La medición de ferritina sérica fue realizada con el ELISA comercial Abcam cat. ab108837, en el cual las placas de 96 pozos ya contienen el anticuerpo de captura. Para determinar la concentración de la proteína se hizo una curva de ferritina que fue de 0 a 50ng/mL como recomienda el fabricante. La dilución de sueros (muestras problema) fue de 1:10 en el diluyente que contiene el kit. Se adicionó 50µL de solución de estándar o muestra y se incubó 2h a 25°C. Pasado el tiempo, se lavó 5 veces con 200µL de solución de lavado contenida en el inserto. Luego se añadieron 50µL de solución de anticuerpos anti-ferritina diluida 1:100 y se incubó 1h a 25°C. Se realizaron lavados como anteriormente. Luego se adicionó 50µL de solución de estreptavidina peroxidasa y se guardó 30min a 25°C. Se hicieron lavados, y se adicionaron 50µL de la solución cromogénica y se incubó 12min a 25°C. Después se añadieron 50µL de la solución de paro, y se leyó inmediatamente a 450nm. Se graficó la curva estándar, se determinó la ecuación de la curva y se estimaron las concentraciones de ferritina sérica de los sujetos de estudio.

Análisis Estadístico

Se examinó el comportamiento de los datos bajo las suposiciones de homogeneidad de varianzas por la prueba de Levene y la distribución de la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos se expresaron como medias y desviaciones estándar, o medianas (percentil 25, percentil 75) según correspondió. Los datos obtenidos en la prueba de ELISA fue la concentración (ng/mL). Con el fin de encontrar diferencias, la comparación de los datos entre la media de concentraciones de las muestras entre grupos (sujetos control, prediabéticos y con DM2) se utilizó el método de análisis de varianza ANOVA con prueba post hoc de Scheffé para grupos con diferentes tamaños de muestra. Para determinar las diferencias estadísticas entre dos grupos cuando fue requerido, en el apartado que buscó relacionar a ferritina con

oxLDL, se utilizó la prueba t independiente a dos colas con la aplicación previa de transformación de logaritmo natural (ln) en el caso de datos no paramétricos. Para los porcentajes, se aplicó la prueba de ji cuadrado de Pearson. La correlación entre la ferritina y las variables seleccionadas se analizó mediante la correlación de Pearson previa transformación ln cuando fue requerido. Para analizar la relación de ln-ferritina con oxLDL y ln-oxLDL/LDL-C después del ajuste de variables de confusión, se calculó el coeficiente de correlación parcial ajustando por sexo, edad, ln-BMI, ln-glucosa, ln-TG, TC, y HDL-C. Los resultados se consideraron significativos cuando $p \leq 0.05$. La asociación de ferritina con oxLDL/LDL-C se evaluó mediante regresión múltiple con la estrategia de eliminación. Las variables introducidas en el análisis fueron las siguientes: ln-ferritina ($\mu\text{g/L}$), sexo (M=0, F=1), ln-age (años), ln-BMI (kg/m^2), ln-TG (mmol/L), HDL (mmol/L), TC (mmol/L), ln-FSG (mmol/L), ln-IL-6 (pg/L), adiponectina (IU/mL), hipertensión (0=no, 1=sí), y WHR. Se estableció un $p < 0.05$ de coeficiente β para determinar asociación de variable independientes con variable dependiente. El análisis estadístico se realizó utilizando NCSS9 (LLC, UT, EE. UU.).

Etapas 2: Aislamiento de Ferritina Sérica

Aprovechando la interacción que se genera entre ferritina y el péptido rico en histidina, glicina y lisina (HGK; Coffman y col., 2009; Tesfay y col., 2012), secuencia perteneciente al dominio 5 (HK5) de la cadena ligera del producto de escisión HKa derivado de HK, se procedió a estandarizar y realizar un proceso para purificar el complejo generado entre ferritina sérica y péptido HGK mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (Block y col., 2009). Primeramente, se realizó un antisuero policlonal anti-ferritina que se utilizó para confirmar la afinidad entre ferritina y el péptido HGK. Después se procedió al ensayo cromatográfico.

Obtención de Antisuero Policlonal Anti-Ferritina

Para el inicio de la segunda etapa de la tesis, que buscó el aislamiento de ferritina sérica se propuso la generación de antisuero policlonal anti-ferritina. Este se realizó en estancia de investigación en el ciclo 2015-1, en el laboratorio de la Dra. Matilde Mineko Shibayama Salas, del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular en CINVESTAV, Zacatenco, Ciudad de México.

Materiales

La ferritina de bazo de caballo (cat. F4503), el adyuvante completo de Freud (cat. F5881), el adyuvante incompleto de Freud (cat. F5506), fueron de Sigma Aldrich (MO, USA). Las placas de poliestireno de alta afinidad fueron Costar (cat. 3590; NY, USA).

Inmunización

Se pretendió la generación de un antisuero policlonal anti-ferritina para apoyar a la caracterización de ferritina sérica mediante ensayo inmuno-adsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), Dot Blot y Western Blot. Para la obtención de este antisuero de ratón anti-ferritina, se planteó un esquema de inmunización que consistió en la inoculación de ferritina en ratones BALB/c, por vía intraperitoneal, en 5 inmunizaciones a intervalos de 2 semanas, durante el curso de 8 semanas. Se formaron 3 grupos de ensayo: El primer grupo de ensayo (A, ferritina con adyuvante de Freud), constituido por 15 ratones, inoculados vía intraperitoneal por primera vez con una dosis de 50µg (en 200µL de solución PBS) de ferritina, en presencia de igual volumen de adyuvante completo de Freud (Bayat y col., 2013). Las subsecuentes inmunizaciones, fueron realizadas en iguales condiciones con adyuvante incompleto de Freud. El segundo grupo experimental, control con adyuvante de Freud, con 10 ratones (B); fueron inoculados sólo con adyuvante de Freud, siguiendo el mismo protocolo, intervalos

y vía de inoculación al descrito en el grupo A. El tercer grupo experimental, de 5 ratones, control con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (C), sometido al mismo esquema de inmunización, pero se inoculó sólo solución PBS. Antes de la primera inmunización y de los refuerzos se extrajo 100µL de sangre para valorar por ELISA el desarrollo de la respuesta inmune en los sueros. Finalmente, 3 días antes del término del procedimiento, se inocularon 20µg de ferritina sin adyuvante vía intravenosa al grupo (A), y PBS al grupo (B) y (C). Los animales fueron desangrados por punción cardíaca para obtener los antisueros. Se hizo un pool, el cual fue evaluado por ELISA y Dot Blot, y se guardó en alícuotas a -80°C hasta su uso (Leenaars y Hendriksen, 2005; Hanly y col., 1995).

Análisis de Antisuero Policlonal Anti-Ferritina por Inmuno Ensayo ELISA

Para realizar el ensayo ELISA se utilizó placa de 96 pocillos de alta afinidad Costar. A cada pozo se le añadió 50µL de Ferritina (10 µg/mL) disuelta en PBS pH 7.2 (Bayat y col., 2013) excepto los blancos. Se incubó 1h a 37°C en agitación, y después se incubó a 4°C durante la noche en agitación. Para eliminar el exceso de ferritina no ligada, se retiró el sobrenadante y se lavó 3 veces con 150µL de PBS pH 7.2 Tween 20 0.05% por 3min, secando sobre una toalla de papel entre cada lavado. Después se bloqueó con 150µL de suero de albúmina bovino (BSA) 1% y se incubó durante 1h a 37°C en agitación. Para eliminar el exceso de tampón de bloqueo, se realizaron 3 lavados con PBS Tween 20 0.05%. Se prepararon diluciones seriadas de suero de los ratones con PBS pH 7.2 Tween 20 0.05%. Las preparaciones fueron las siguientes: A.- 1:100 (10 µl Suero + 990 µl PBS). B.- 1:1000 (100µL A + 900µL PBS). C.- 1:2000 (500µL A + 500µL PBS). D. 1:4000 (500µL B + 500µL PBS). E.- 1:8000 (500µL C + 500µL PBS). F.- 1:16000 (500µL D + 500µL PBS). G.- 1:32000 (500µL E + 500µL PBS). H.- 1:64000 (500µL E + 500µL PBS). Se añadieron 100µL de muestra de las diluciones de suero por triplicado en la placa y se incubó 2h a 37°C en agitación (como controles se utilizó la omisión de ferritina; el uso de suero pre-inmune,

suero con adyuvante de Freud y solución PBS). Se hicieron 3 lavados con PBS pH 7.2 Tween 20 0.05%. Se diluyó el anticuerpo secundario (anti-gamma globulina) de conejo anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP por sus siglas en inglés) a una dilución 1:1000 en PBS-Tween 20 0.05% pH 7.2. Se añadió anticuerpo secundario, 100µL por pocillo y se incubó 2h a 37°C en agitación. Se desechó la solución y se hicieron 3 lavados con PBS pH 7.2 Tween 20 0.05%. Después de los lavados, se adicionaron 50µL de 3,3'-diaminobenzidina a cada uno de los pocillos y se incubó 15min en oscuridad a 25°C. Después se detuvo la reacción con la adición de 15µL de solución H₂SO₄ 20% a cada pocillo. La densidad óptica de la reacción se midió a 450nm con un lector de placas de ELISA (BioTek, Winooski, VT, USA). Finalmente se hizo una precipitación con sulfatos a 50% de saturación, para obtener un suero rico en inmunoglobulinas, el cual se dializó a 4°C con PBS 20mM durante tres días haciendo cambio de PBS cada 24h.

Dot Blot

Para realizar el Dot Blot, en membrana de nitrocelulosa se marcó con lápiz las regiones donde se harían los tratamientos del ensayo. Se aplicó 2µL de muestra (ya sea ferritina, BSA, o suero humano diluido) en el centro de cada región. Se dejó secar la membrana. Se bloqueó los sitios con PBS leche descremada al 5% Tween 20 0.02% durante 12-14h en agitación a 4°C. Se lavó con PBS Tween 20 0.02%, 5 lavados durante 5min cada uno en agitación a 25°C. Se incubó con antisuero policlonal anti-ferritina (dil. 1:2000 en PBS Tween 20 0.02%) 2h en agitación a 25°C. Luego se lavó 5 veces como se describió anteriormente. Se incubó con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP durante 2h a 25°C en agitación. Se lavó nuevamente como se describió antes. Se procedió a incubar 1min con solución de diaminobenzidina-urea como recomienda el fabricante.

Purificación de Ferritina Sérica

Materiales

Las placas de poliestireno de alta afinidad fueron Costar (cat. 3590; NY, USA). El Tween 20 (cat. P-9416), imidazol (cat. I5513), ferritina de bazo de caballo (cat. F4503), suero de albúmina bovino (Cat. A7906), y la avidina-peroxidasa (cat. A3151), fueron de Sigma Aldrich (MO, USA). El acetato de sodio (cat. 11902), cloruro de sodio (cat. 24902) y sulfato de amonio (cat. 63052) se obtuvieron de Fermont (NL, MEX). El hidróxido de sodio (cat. 3722-01) y fosfato de sodio (cat. 3828), se obtuvieron de J.T. Baker (EM, MEX). El control de peso para electroforesis fue de BioRad (cat. 1610317; CA, USA). La solución de tetrametilbenzidina y peróxido de hidrógeno (cat. DY999 RyD Systems), y la solución de paro (cat. DY994) fueron de RyD Systems (MN, USA).

Péptido Rico en Histidina-Glicina-Lisina del Dominio 5 de Cininógeno de Alto Peso Molecular de Dos Cadenas (HKa)

Aprovechando la interacción que se genera entre ferritina y el péptido HGK, secuencia perteneciente al dominio 5 de la cadena ligera del producto de escisión HKa derivado de HK, se procedió a adquirir un producto con la secuencia peptídica $^1\text{DHGHKHKHGHGHGKHKNKGKNGKHNGWKHHHHHH}^{35}$ (HGK35), con un peso molecular de 4.13448kDa, cual contiene la secuencia que puede interaccionar y unirse tanto a H como L-ferritina (Coffman y col., 2009; Tesfay y col., 2012), y una etiqueta de poli-histidina con seis residuos de aminoácido histidina, de interés para purificar el complejo generado entre ferritina sérica y péptido HGK35 mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (Block y col., 2009).

ELISA para Evaluar Interacción entre Péptido HGK35 y Ferritina

Placas de 96 pozos de poliestireno de alta afinidad fueron preparadas con 100µL de una solución de HGK35 (de 2.1542µg/mL. 10 veces la molaridad que se colocó de ferritina; con base en ensayo de unión en fase sólida propuesto por Coffman y col., 2009) en PBS 20mM BSA 1% y se incubó 12-14h en oscuridad a 4°C en agitación. Después, se retiró el sobrenadante de los pozos y se hicieron 5 lavados de 5min cada uno con 150µL de PBS Tween 20 0.05% a 37°C en agitación y oscuridad. Posteriormente se bloqueó durante 1h con 150µL de PBS 20mM BSA 1% a 37°C en agitación y oscuridad. A continuación, se lavó como antes se describe. Se precedió a adicionar ferritina a 2.5µg/100µL por pozo en PBS Tween 20 0.05%, BSA 1%, durante 1h a 37°C en agitación y oscuridad. Luego se hicieron lavados. Después se añadió 100µL de antisuero policlonal anti-ferritina diluido 1:1000 en PBS Tween 20 0.05% BSA 1% durante 1h a 37°C en agitación y oscuridad. Después se hicieron lavados como antes se describe. Se adicionó 100µL de solución de anticuerpo secundario (inserto) biotinilado anti-IgG de ratón diluido 1:1000 en PBS Tween 20 0.05% BSA 1%, durante 1h a 37°C en agitación y oscuridad. Después se lavó como se describió antes. Después se adicionó 100µL de avidina peroxidasa 1mg/mL diluida 1:50000 en PBS Tween 20 0.05% BSA 1% durante 1h a 37°C en agitación y oscuridad. Después se hicieron lavados. Se añadió 100µL de una dilución 1:1 de tetrametilbenzidina y peróxido de hidrógeno y se incubó 10min a 25°C. Pasado el tiempo se añadió 50µL solución de paro, y se leyó inmediatamente a 415nm. Se obtuvieron las absorbancias por triplicado en tres días diferentes y se obtuvo el gráfico para cada tratamiento y controles.

Western Blot para Determinar la Especificidad del Péptido HGK35 hacia Ferritina

La pureza del péptido HGK35 (1µg por carril) fue probada por SDS-PAGE (Laemmli, 1970) con geles de poliacrilamida al 18%, en una cámara vertical a 80

volts por 15min y después 100 volts hasta su término (Bio-Rad, USA), seguida de la electrotransferencia en una membrana de nitrocelulosa a 103mA constantes y 12 volts (Bio-Rad, Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell), por 60min. La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con solución de PBS 20mM, leche descremada 5% y Tween 20 0.02%, durante 1h a 37°C en oscuridad y agitación. Posteriormente la membrana se lavó 3 veces con PBS 20mM Tween 20 0.05% por 5min a 25°C en oscuridad y agitación. Luego se añadió 20mL de una solución de ferritina (12.5µg/mL) en PBS 20mM Tween 20 0.05% por 12-14h a 4°C en oscuridad y agitación. Después se hicieron lavados como se describe anteriormente. Para la detección se utilizó el antisuero policlonal anti-ferritina, 10mL de una solución con dilución 1:1000 en PBS 20mM Tween 20 0.05% leche descremada 0.05%, durante 1.5h a 37°C en oscuridad y agitación. Como antisuero secundario, anti-IgG de ratón biotinilado, 10mL de una solución con dilución 1:1000 en PBS 20mM Tween 20 0.05% leche descremada 0.05%, durante 1.5h a 37°C en oscuridad y agitación. Se hicieron lavados y se añadió solución de avidina peroxidasa, 10mL de una dilución 1:4000 en PBS 20mM Tween 20 0.05% leche descremada 0.05% durante 1.5h a 37°C en oscuridad y agitación. Se hicieron lavados y como revelador de la reacción se utilizó a la Diaminobenzidina (DAB-Urea H₂O₂ /HCl, de Sigma-Aldrich., USA).

Cuantificación de Proteínas Séricas Totales

Se obtuvo un pool de sueros de 6 sujetos (3 hombres, 3 mujeres de entre 20 y 30 años de edad) sin aparente infección e inflamación, sin diagnóstico previo de enfermedad hepática, cáncer, enfermedad renal o hiperglicemia crónica. El pool de sueros (75mL total) fue filtrado a 0.2µm para eliminar gran parte de lípidos, luego fue estimada la concentración proteica por el método de UV a 280nm (Espectrofotometro AquaMate, Thermo Corp., USA; Stoscheck, 1990). Las muestras (lavado y eluciones) obtenidas de la purificación también fueron evaluadas bajo el mismo método. Cuando fue necesario, las muestras fueron

concentradas mediante el método de centrifugación con microfiltros a 3kDa de peso molecular de punto de corte (Amicon Ultra-15, Merck Millipore, MA, USA).

Aislamiento de Ferritina Sérica Mediante la Interacción Ferritina-Péptido HGK35 por Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados (IMAC)

Antes de realizar la cromatografía, para concentrar la muestra y eliminar gran parte de biomoléculas no pertinentes, se hizo un tratamiento térmico y una precipitación de proteínas con sulfato de amonio. Tratamiento térmico (Worwood, 1976; Cragg y col., 1981): se diluyeron 75mL de suero con un volumen igual de acetato de sodio 0.05M y se ajustó a pH 4.8 agitando la solución y añadiendo gota por gota ácido acético 1M. La muestra de 150mL se calentó rápidamente a 70°C en un baño maría y se mantuvo a 70-75°C durante 10min. Después de enfriar en agua a 4°C, la muestra se centrifugó a 2500g durante 30min a 4°C. Después de la centrifugación, el sobrenadante se ajustó cuidadosamente a pH 5.2 gota por gota con NaOH 1M a 4°C. La ferritina sérica se precipitó del sobrenadante mediante la adición gota por gota de sulfato de amonio hasta una saturación del 50% bajo un control cuidadoso de pH 5.2 y 4°C, y luego se centrifugó a 2500g durante 15min (Linder y col., 1996). El sedimento se resuspendió en 5mL de tampón salino a pH 7.0 (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 600mM) y se dializó también contra este tampón 48h a 4°C, cambiando el tampón en las primeras 24h (Gasser, 2009). La muestra de 5mL se puso en interacción con 2µg/mL de péptido HGK35 en 5mL de solución salina (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 600mM) pH 7.0 Tween 20 0.05%, 12-14h a 4°C en agitación. Luego, se realizó otra diálisis, ahora con tampón de unión (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 600mM, imidazol 10mM, pH 7.6) durante 48h a 4°C (Tesfay y col., 2012).

Finalmente, para el aislamiento de ferritina sérica, la muestra pretratada térmicamente y precipitada con sales, fue fraccionada por un esquema cromatográfico de una etapa, utilizando afinidad por metales inmovilizados, a 25°C. La muestra (12.3mL después de ser dializada, 4.6mg/mL) se aplicó a una

columna de Ni²⁺-ácido nitrotriacético(NTA)-Sefarosa CL-6B (QIAGEN cat. 30210) con un volumen de cama de 2.85mL previamente equilibrada con 10 volúmenes de tampón de equilibrio (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 600mM, imidazol 10mM, pH 7.6; a una velocidad de aplicación de 0.2mL/min y capacidad de columna: 10-50mg/mL). La muestra fue aplicada a la fase estacionaria a una velocidad de flujo de 0.2mL/min. Luego, la columna se lavó con 10 volúmenes de la solución de equilibrio antes mencionada para eliminar las proteínas no afines a la matriz. Posteriormente, la elución de las proteínas adsorbidas se promovió por el aumento progresivo de concentración de imidazol en la fase móvil (4 fracciones de elución: 25, 50, 125 y 225mM, todas con NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 600mM pH 7.6; Zou, 2016). Las proteínas remanentes se liberaron de la matriz con una solución de NaOH 0.5M. De cada fracción eluida se obtuvo concentración a 280nm, se dializó con PBS 20mM pH 7.2 para eliminar imidazol y se concentró con microfiltros (3kDa de punto de corte).

Estimación de la Pureza de la Ferritina Sérica por Electroforesis e Inmunodetección por Dot Blot

La pureza de la ferritina sérica fue probada por SDS-PAGE (Laemmli, 1970) con geles de poliacrilamida al 12 y 13%, en una cámara vertical a 80 volts durante 15min, seguido de 100 volts constantes (Bio-Rad, USA). Se cargó 12µg de proteína por carril correspondiente ya sea de la muestra, del lavado, las cuatro fracciones, la fracción de proteínas remanentes y la ferritina comercial. El Dot Blot se realizó en una membrana de nitrocelulosa, donde se colocó 2µg de cada fracción, y como control positivo, 1µg de ferritina de bazo de caballo comercial. La membrana de nitrocelulosa fue bloqueada con PBS 20mM pH 7.2 con leche al 5% y Tween 20 al 0.05% durante 1h a 37°C en oscuridad y agitación constante. Posteriormente, se dejó interaccionar con ferritina de bazo de caballo (12µg/mL, 15mL de solución) durante 12-14h a 4°C en oscuridad y agitación constante. Posteriormente la membrana se lavó 3 veces con PBS 20mM pH 7.2, Tween 20

al 0.05% por 5min en oscuridad y agitación constante. Para la inmunodetección se utilizó el antisuero policlonal anti-ferrina, a una dilución 1:1000; y antisuero secundario Anti-IgG de ratón biotinilado (The binding Site), en dilución 1:1000. Luego se incubó con streptavidina-peroxidasa (Sigma Aldrich) diluida 1:4000. Todas las diluciones fueron en PBS 20mM pH 7.2, Tween 20 al 0.05%, leche descremada al 0.05%, e incubaciones por 1.5h a 37°C en oscuridad y agitación constante. Después de cada incubación, la membrana se lavó 3 veces con PBS 20mM pH 7.2, Tween 20 al 0.05% por 5min en oscuridad y agitación constante. Finalmente, como revelador de la reacción se utilizó Diaminobenzidina bajo instrucciones del fabricante (DAB-Urea-H₂O₂/HCl, de Sigma-Aldrich., USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características de los Sujetos de Estudio

La tabla IV (página siguiente) muestra las características, resultados antropométricos y biomarcadores de los grupos de estudio. Los tres grupos fueron comparables en cuanto a distribución de género (proporción ligeramente mayor de mujeres), y en el análisis de varianza (ANOVA) para grupos independientes, se observaron diferencias en edad e índice de masa corporal (BMI); consecuencia del grupo de sujetos con diabetes tipo 2 (T2D), ya que los sujetos con glucosa normal en ayuno (NFG) y glucosa alterada en ayuno (IFG) fueron comparables entre sí en cuanto a edad y BMI.

En indicadores de obesidad abdominal, el índice de circunferencia de cintura/circunferencia de cadera (WHR) no fueron diferentes, sin embargo, en circunferencia de cintura (WC) y confirmando el resultado de BMI, sujetos con T2D marcaron la diferencia, la cual no se mantuvo al comparar NFG e IFG, ni en la adipocina adiponectina, y por tanto, aparentemente no se mostró diferencias en la adiposidad central entre NFG e IFG, aunque de notar que según estándares para la OMS, tanto sujetos con NFG e IFG presentan sobrepeso y sujetos con T2D, obesidad.

El grupo con IFG tuvo 3 veces más hipertensión (33.33%) que el grupo con NFG (11.11%) con significación estadística ($p=0.048$), y la tendencia se mantuvo a como avanzó la enfermedad (T2D, hipertensión: 50%, de notar que solo son $n=6$ en este grupo), confiriéndole la importancia que referencia la literatura como un posible contribuyente en la fisiopatología de la diabetes.

En indicadores del metabolismo de glucosa y lípidos, los niveles de FPG como se espera debido a la clasificación de grupos, fueron elevados en los individuos con IFG y T2D ($p<0.001$, Tabla IV). Los niveles de lípidos mostraron

Tabla IV. Características de los sujetos de estudio.

Variable	Todos	Control	IFG	T2D	valor p	
					ANOVA	t-student NFG/IFG
n	60	36	18	6		
Sexo (M/F)	27/33	16/20	8/10	3/3		
Edad (años)	35 (28, 50)	31.5 (27, 48)	43.5 (30.5, 54.25)	54 (35.25, 65.25)	0.038	0.118
BMI (kg/m ²)	27.15 (24.95, 31.3)	26.2 (23.6, 29.07)	27.65 (25.4, 31.57)	39.75 (26.75, 56.25)	<0.001	0.204
FPG (mmol/L)	5.35 (4.82, 5.81)	4.88 (4.71, 5.25)	5.74 (5.55, 6.04)	7.46 (5.56, 10.23)	<0.001	<0.001
TG (mmol/L)	1.49 (1.04, 1.92)	1.37 (0.99, 1.89)	1.62 (1.24, 2.12)	1.64 (1.37, 2.39)	0.253	0.142
TC (mmol/L)	5.64±1.34	5.24±1.02	6.35±1.35	5.92±2.15	0.012	0.002
LDL-C (mmol/L)	3.6±1.3	3.29±0.94	4.13±1.58	3.83±1.83	0.074	0.019
HDL-C (mmol/L)	1.22±0.32	1.23±0.35	1.22±0.28	1.14±0.3	0.813	0.906
Índice TG/HDL-C	1.19 (0.74, 1.96)	1.17 (0.61, 1.88)	1.27 (0.88, 2.21)	1.34 (1, 2.9)	0.356	0.238
Índice LDL-C/HDL-C	3.17±1.49	2.91±1.28	3.65±1.89	3.3±1.07	0.226	0.096
Insulina (uIU/mL)	1.64 (1.21, 2.64)	1.82 (1.24, 2.72)	1.39 (1.11, 2.17)	1.67 (1.17, 2.74)	0.516	0.262
HOMA-IR	0.4 (0.28, 0.59)	0.41 (0.26, 0.59)	0.36 (0.29, 0.54)	0.45 (0.34, 0.74)	0.605	0.982
Adiponectina (IU/mL)	31.81±15.47	31.54±13.55	32.58±15.03	31.1±27.69	0.968	0.799
Hipertensión (%)	21.66	11.11	33.33	50	0.035	0.048
WC (cm)	92.75 (88, 104.17)	90.9 (83.5, 99)	92.55 (87.35, 109.85)	118.35 (97.37, 150)	0.002	0.214
WHR	0.87±1.45	0.87±0.08	0.9±0.09	0.95±0.054	0.223	0.241
oxLDL (U/L)	88.04±32.42	78.15±28.91	98.44±35.19	116.17±17.3	0.006	0.028
IL-6 (pg/L)	35 (11.87, 130)	38.75 (14.37, 126.87)	30 (2.5, 231.56)	15.62 (11.25, 185.93)	0.752	0.962
Ferritina sérica (ug/L)	87.39 (43.01, 206.63)	69.78 (37.49, 120.97)	140.21 (70.65, 239.46)	500.6 (274.89, 570.46)	<0.001	0.02

Los datos se presentan como media±desviación estándar o medianas (percentil 25, percentil 75). Los valores de p se determinaron mediante ANOVA y prueba de t. Cuando fue necesario, se normalizó con transformación de Log-natural. Nivel de significancia estadística a dos colas: p<0.05. Abreviaturas: IMC, índice de masa corporal; FPG, glucosa sérica en ayuno; TG, triglicéridos; TC, colesterol total; LDL-C: lipoproteína de baja densidad; HDL-C, lipoproteína de alta densidad; FPI, insulina sérica en ayuno; HOMA-IR, índice de resistencia a la insulina; WC, circunferencia de la cintura; WHR, índice cintura-cadera; oxLDL, lipoproteína de baja densidad oxidada; IL-6, interleucina 6; NFG, glucosa normal en ayuno; IFG, glucosa alterada en ayuno.

diferencias entre los tres grupos, donde se observó una tendencia al aumento en el grupo de IFG con colesterol total (TC) significativamente mayor ($p=0.002$) y lipoproteína de baja densidad (LDL-C; $p=0.019$), así como la concentración de lipoproteína de baja densidad oxidada (oxLDL; $p=0.028$), y se confirmó en sujetos con T2D (TC, $p=0.012$; oxLDL=0.006; LDL-C=0.074), lo que indica la presencia de dislipidemia en los grupos problema; mientras que no se encontraron diferencias en triglicéridos (TG), lipoproteína de alta densidad (HDL-C), índice de TG/HDL-C e índice LDL-C/HDL-C.

El grupo con IFG tuvo diferencias significativas en los niveles de ferritina sérica ($p=0.02$, Tabla IV), y esto se mantuvo en sujetos con T2D ($p<0.001$). Finalmente, en los resultados de ferritina sérica existe la probabilidad de que no se haya relacionado con inflamación, ya que los niveles de IL-6 no se diferenciaron en los tres grupos, inferencia a debatir debido a que no se examinaron otros marcadores de inflamación.

Correlación Entre los Niveles de Ferritina Sérica y Variables de Importancia en Sujetos con Glucosa Normal en Ayuno y Glucosa Alterada en Ayuno

Con el objetivo de determinar si ferritina sérica podría estar relacionada con anomalías metabólicas en sujetos con NFG e IFG, se estimaron los coeficientes de correlación de Pearson entre la ferritina sérica y los marcadores séricos enfocando la atención en oxLDL y el índice oxLDL/LDL-C.

Debido a que en algunas variables como ferritina sérica se encontró asimetría en la distribución de datos en la curva de normalidad, se decidió hacer transformación de datos a logaritmo natural (ln). La ln-ferritina sérica se correlacionó con ln-FPG, TC, LDL-C, HDL-C, WHR, oxLDL y ln-oxLDL/LDL-C (Tabla V, página siguiente).

Tabla V. Correlación de Pearson entre In-Ferritina sérica con variables seleccionadas en sujetos con NFG e IFG

Variable	r de Pearson	Valor p
In-FPG(mmol/L)	0.411	0.002
In-TG (mmol/L)	0.109	0.433
TC (mmol/L)	0.307	0.024
LDL-C (mmol/L)	0.335	0.013
HDL-C (mmol/L)	-0.282	0.039
Índice In-TG/HDL-C	0.168	0.225
Índice LDL-C/HDL-C	0.255	0.063
IL-6 (pg/L)	-0.02	0.889
Adiponectina	-0.207	0.133
WHR	0.51	<0.001
Hipertensión (%)	0.122	0.379
oxLDL (U/L)	0.497	<0.001
Índice In-oxLDL/LDL-C	0.319	0.019

Los datos se presentan como coeficiente de correlación de Pearson (r). Se consideró un valor de $p < 0.05$ como indicador de significancia estadística. Siempre que se encontró distribución anormal, se realizó transformación de logaritmo natural (ln). Abreviaturas: FPG, glucosa en ayuno; TG, triglicéridos; TC, colesterol total. LDL-C, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad; oxLDL, lipoproteína de baja densidad oxidada; IL-6, interleucina 6; WHR, relación cintura-cadera; NFG, glucosa normal en ayuno; IFG, glucosa alterada en ayuno.

Relación entre Ferritina Sérica con oxLDL y oxLDL/LDL-C Mediante Correlación Ajustada a Variables de Confusión en Sujetos con Glucosa Normal en Ayuno y Glucosa Alterada en Ayuno

Con base en varios estudios que han reportado un aumento de ferritina sérica con alteración en el metabolismo de los lípidos (Meng y col., 2017), estrés oxidativo y oxLDL (Kraml, 2017), se realizaron correlaciones parciales entre la ferritina sérica y oxLDL ajustándose a posibles factores de confusión (sexo, edad, ln-FPG, ln-BMI, ln-TG, TC y HDL-C). A lo largo de las muestras entre sujetos con NFG e IFG como un total, se encontró correlación parcial significativa entre la ferritina sérica y oxLDL ($r=0,372$, $p=0,01$), después del ajuste (Figura VI).

No obstante, se ha mencionado que existe corrección lineal entre el número de moléculas de oxLDL y LDL-C, ya que el LDL-C al ser la molécula de origen es la variable que contribuye principalmente a la cantidad de oxLDL, por tanto, parece más útil determinar la correlación con el índice oxLDL/LDL-C para apreciar mejor el proceso de oxidación de LDL (Aranda y col., 2016). En el estudio, hubo una correlación parcial estadística significativa entre la ferritina sérica y ln-oxLDL/LDL-C ($r=0,397$, $p=0,006$) después de ajustar por sexo, en edad, ln-FPG, ln-BMI, ln-TG, TC y HDL-C.

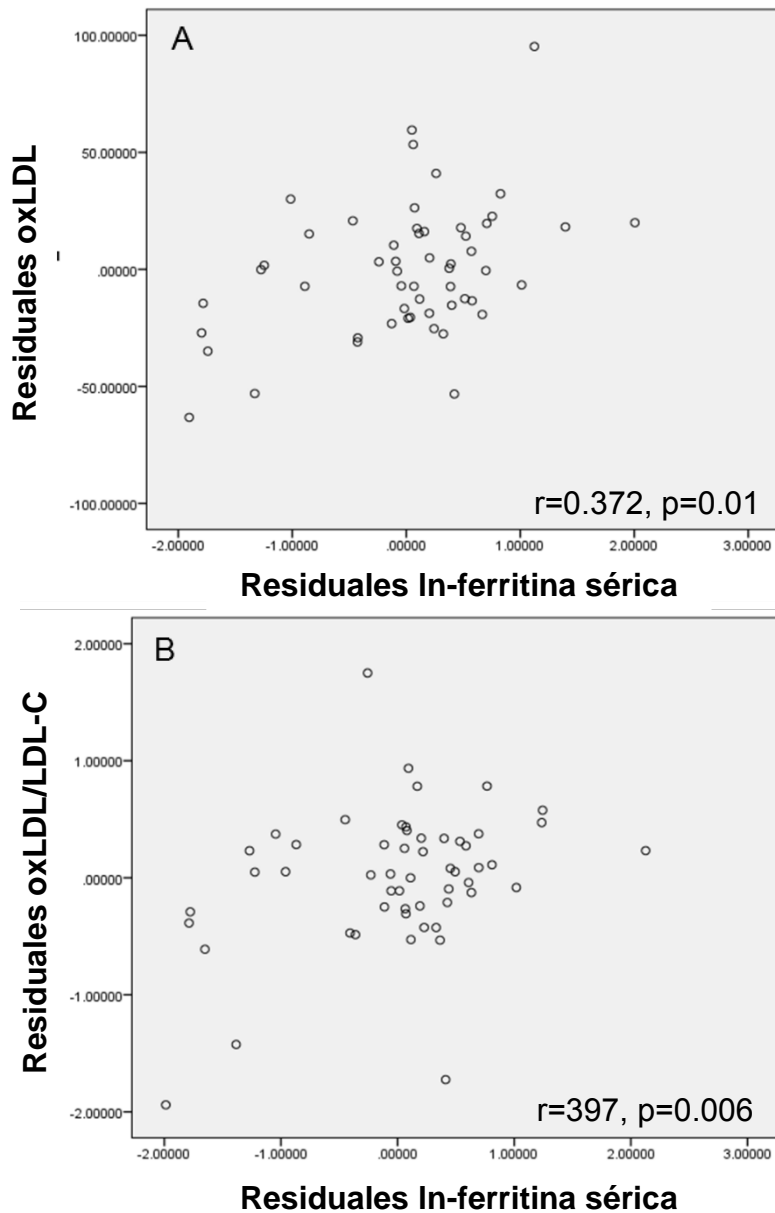


Figura 6. Correlación parcial entre ferritina sérica con oxLDL y oxLDL/LDL-C en sujetos con NFG e IFG. A: Se estimó la correlación parcial entre la ferritina sérica y oxLDL ajustando a varios factores de confusión (sexo, en edad, In-FPG, In-BMI, In-TG, TC y HDL-C). Se obtuvieron y graficaron los residuos después del ajuste de la correlación entre In-ferritina y oxLDL. B: Se estimó la correlación parcial entre ferritina sérica y oxLDL/LDL-C ajustando para múltiples factores de confusión (sexo, edad, In-FPG, In-BMI, In-TG, TC y HDL-C). Se obtuvieron y graficaron los residuos después del ajuste de la correlación entre In-ferritina y el índice oxLDL/LDL-C. El coeficiente de correlación parcial se representa como: (r). $p \leq 0.05$ fue considerado indicador de significancia estadística.

Asociación entre Ferritina Sérica y el Índice oxLDL/LDL-C en Sujetos con Glucosa Normal en Ayuno y Glucosa Alterada en Ayuno

En el análisis de regresión múltiple de determinantes independientes para el índice oxLDL/LDL-C, y después de utilizar la estrategia de eliminación introduciendo posibles predictores de la siguiente manera: Ln-ferritina (ug/L), sexo (M=0, F=1), Ln-edad (años), ln-BMI (kg/m²), ln-TG (mmol/L), HDL (mmol/L), TC (mmol/L), ln-FPG (mmol/L), ln-IL-6 (pg/L), adiponectina (IU/mL), hipertensión (0=no, 1=sí) y WHR; se reveló que los niveles de ferritina sérica con transformación (ln) fue una variable independiente positiva de oxLDL/LDL-C (tabla VI, siguiente página; $\beta=0.2915$; 95%CI=0.1444, 0.4385; $p<0.001$), un hecho observado por primera vez en sujetos con NFG e IFG, que agrega información a la relación del metabolismo del hierro y/o la inflamación (como reactante de fase aguda) en la oxidación de LDL en condiciones de disglucemia, antes del padecimiento de diabetes.

Además, el TC (mmol/L; $\beta=0.2548$; 95% IC=0.1296, 0.3800; $p<0.001$) e ln-TG (mmol/L, $\beta=0.5229$; 95% IC=0.2601, 0.7856; $p<0.001$) también fueron variables predictivas en el modelo, eventos observados en sujetos sanos y prediabéticos (Kopprasch y col., 2002). Finalmente, la hipertensión fue otro indicador del índice oxLDL/LDL-C en la muestra estudiada (NFG e IFG; tabla VI, $\beta=0.4188$; 95%IC=0.0560, 0.7816; $p=0.02$), lo que contribuye al conocimiento reportado sobre este factor de riesgo conocido para las complicaciones vasculares y un componente del síndrome metabólico (Ikeda y col., 2006).

Tabla VI. Regresión múltiple para el índice In-oxLDL/LDL-C en sujetos con NFG e IFGe IFG

Variable	β	95%CI	p-value	r ajustada
In-oxLDL/LDL-C				
TC (mmol/L)	0.2548	(0.1296, 0.3800)	<0.001	
Hipertensión (0=no, 1=sí)	0.4188	(0.0560, 0.7816)	0.0246	0.3988
In-ferritina sérica (ug/L)	0.2915	(0.1444, 0.4385)	<0.001	
In-TG (mmol/L)	0.5229	(0.2601, 0.7856)	<0.001	

Se realizó análisis de regresión múltiple por el método de eliminación. Se procesaron las variables probables para el modelo. Las variables independientes fueron las siguientes: In-ferritina (ug/L), sexo (M=0, F=1), In-edad (años), In-BMI (kg/m²; índice de masa corporal), In-TG (mmol/L; triglicéridos), HDL (mmol/L; lipoproteínas de alta densidad), TC (mmol/L; colesterol total), In-FPG (mmol/L; glucosa en ayuno), In-IL-6 (pg/L; interleucina 6), adiponectina (IU/mL), hipertensión (presencia, 0=no, 1=sí), WHR (índice de cintura/cadera en cm) y In-HOMAIR (modelo de índice de resistencia a la insulina). Los datos se presentan como β y 95%CI de los indicadores para la predicción del índice In-oxLDL/LDL-C. Un valor de p<0.05 fue considerado significativo. La contribución del modelo para el índice In-oxLDL/LDL-C se presenta como r ajustada. Abreviaturas: NFG, glucosa normal en ayuno; IFG, glucosa alterada en ayuno.

Numerosos informes han reportado asociación entre el estrés oxidativo y el desarrollo de complicaciones vasculares (Kattoor y col., 2017). Se ha demostrado que la medición de especies reactivas de oxígeno (ROS) es valiosa en la búsqueda de probables orígenes de complicaciones, y se ha propuesto el estrés oxidativo como objetivo de tratamientos (Kraml, 2017). En el presente trabajo, observamos primero que además de la hiperglucemia, el estado de glucosa en ayuno alterada, una forma de prediabetes y la T2D tienen un mayor grado de dislipidemia, y además hubo un aumento de los niveles de oxLDL en circulación en sujetos con IFG y T2D en comparación con NFG. Estas diferencias observadas entre los sujetos con NFG y los dos grupos con hiperglucemia confirman resultados publicados (Meng y col., 2017), adicionalmente las moléculas de oxLDL han tomado pertinencia como un parámetro para identificar la enfermedad arterial coronaria (CAD; Huang y col., 2008).

La diabetes está asociada con aceleración de la aterosclerosis (Freitas y col., 2015), además se sugiere que la oxLDL desempeña un papel clave en la aterogénesis en estos pacientes (2017). La modificación oxidativa de lípidos y proteínas está involucrada en enfermedades inflamatorias, incluida la diabetes y si bien se ha encontrado un aumento de los productos de oxidación en la diabetes franca (Ullah y col., 2016), no se ha entendido completamente, especialmente en la glucosa alterada en ayuno incidente, donde generalmente no hay una aplicación de tratamiento riguroso para la glucemia y control lipídico (Huang y col., 2016; Eldin y col., 2014).

La peroxidación lipídica puede ser producida por radicales libres altamente tóxicos, por ejemplo, aniones de hidróxido y superóxido formados por hierro. La interrupción de la homeostasis del hierro puede guiar una sobrecarga de hierro en tejidos, que se ha demostrado que contribuye a la generación de especies reactivas de oxígeno y al estrés oxidativo (Kraml, 2017). Se ha propuesto que las reservas corporales de hierro, expresadas como ferritina sérica, contribuyen a la aterosclerosis (Ikeda y col., 2015), aunque la asociación epidemiológica aún es

inconsistente (Altin y col., 2016; Egbuche y co., 2017; Xu y col., 2017). La confirmación de esta hipótesis es que los niveles elevados de ferritina en suero están asociados con el estrés oxidativo, evento implicado en la oxidación de las lipoproteínas (Kraml, 2017) como oxLDL (Ikeda y col., 2015).

En el presente trabajo, observamos niveles elevados de ferritina sérica en sujetos con IFG y T2D en comparación con NFG. De hecho, en la población del estudio entre NFG e IFG como una totalidad, hubo una correlación positiva entre la ferritina sérica y el oxLDL, así como el oxLDL/LDL después del ajuste por edad, sexo, BMI y FPG. Este hallazgo sugirió que el desequilibrio en el metabolismo del hierro medido en niveles de ferritina sérica podría estar implicado en la modificación de las LDL.

Tuomainen y col. (2003) informaron una asociación entre ferritina sérica y oxisteroles, productos de oxidación del colesterol que en su mayoría llevan las partículas de lipoproteínas y se sugiere que desempeñan un papel activo en el desarrollo de la aterosclerosis. Este estudio se realizó en hombres de mediana edad con complicaciones cardiovasculares de Finlandia, y llegaron a la conclusión de que la sobrecarga de hierro podría estar implicada en el aumento de oxisteroles. En otro estudio, Brouwers y col. (2004) observaron que los niveles séricos de ferritina se asociaron significativamente con la proporción oxLDL/LDL en caucásicos sanos, después del ajuste para lípidos, proteína C reactiva de alta sensibilidad (hsCRP), tabaquismo, BMI y hemocromatosis, esta última bajo detección del gen C282Y, pero no informaron sobre el estado glicémico de los sujetos de estudio. Se encontraron resultados similares en el estudio de Aranda y col. (2016). Su grupo trabajó con adultos caucásicos de la región mediterránea nor-oriental de España, y encontraron que no solo la ferritina sérica sino también la saturación de transferrina se asoció con la peroxidación lipídica evaluada como índice de oxLDL/LDL. En la presente tesis, en la regresión múltiple por estrategia de eliminación para la relación oxLDL/LDL-C en ambos grupos en su conjunto (tanto NFG e IFG), los niveles de ferritina sérica fueron predictores

independientes, después de que se introdujeran posibles variables independientes, incluida la IL-6, un marcador de inflamación, que respalda la idea de que la asociación de ferritina sérica y oxLDL/LDL no solo estuvo relacionada con la expresión en fase aguda de ferritina (Kell y Pretorius, 2014).

El colesterol total, los triglicéridos y la hipertensión también fueron indicadores del índice oxLDL/LDL, que son factores de riesgo bien reconocidos para la aterosclerosis (Kopprasch y col., 2002; Huang y col., 2008).

Ikeda y col. (2006) encontraron en la regresión múltiple por estrategia de pasos sucesivos, que los niveles de ferritina sérica están asociados con oxLDL en sujetos con T2D después del ajuste para los principales predictores como el BMI, triglicéridos y la hsCRP. Además, Khalili y col. (2012) declararon que la ferritina sérica y la oxLDL podrían ser buenos parámetros para la identificación de la enfermedad coronaria prematura, donde se encontró una correlación positiva entre ferritina sérica y oxLDL con las diferentes etapas de la enfermedad arterial coronaria en pacientes sin antecedentes de enfermedad renal, hepática o diabetes. A saber, el presente estudio es el primero en exhibir una asociación positiva entre la ferritina sérica y el índice oxLDL/LDL-C en sujetos con glucosa normal en ayuno y glucosa alterada en ayuno.

Se acepta ampliamente que el hierro puede ser un promotor del estrés oxidativo en ciertos sitios donde se genera aterosclerosis (Kraml, 2017). La explicación de la hipótesis del hierro es que el ion ferroso (Fe^{2+}), cuando proporciona un electrón, conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno, como el radical hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno, por la reacción de Fenton (Kraml, 2017).

Algunos autores afirman que, en situaciones de inflamación y estrés oxidativo, donde aumentan los niveles séricos de ferritina, la proporción de H-ferritina aumenta en la proteína, la subunidad con actividad ferroxidasa, cuya función es la internalización del hierro libre; y, en consecuencia, en situaciones

de estrés, el secuestro de hierro se mejoraría como un proceso de protección celular (Gammella y col., 2015). Aunque, cuando el desequilibrio de antioxidantes y el ambiente pro-oxidante se mantienen crónicamente, la ferritina puede ser una fuente de hierro, ya que el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y los productos de glicación, como el metilglioxal, pueden conducir a la liberación de hierro de la ferritina por reacción de reducción (Fe^{3+} a Fe^{2+}), y acelerar el proceso de oxidación de lípidos (Gammella y col., 2015).

Leiva et al. (2013) trabajaron con síndrome metabólico (MetS) en sujetos chilenos. La población estudiada fue principalmente prediabética del tipo glucosa alterada en ayuno, determinado por FPG y observaron que los sujetos con MetS tenían niveles elevados de oxLDL y reservas de hierro (medido como hierro, ferritina sérica y receptor soluble de transferrina) comparado con sujetos sin MetS, pero el propósito de su estudio no fue la asociación entre la ferritina sérica y oxLDL, por tanto, no se determinó.

Juanola-Falgarona y col. estudiando MetS en España (2013), no encontraron diferencias en oxLDL ni en los niveles de ferritina sérica en IFG en comparación con los sujetos con NFG, aunque informaron que los factores relacionados con la alteración del metabolismo del hierro podrían contribuir al desarrollo de T2D. Una respuesta a la discrepancia en la comparación de los informes anteriores es que las reservas de hierro corporal varían según la etnia y estudios multiétnicos han demostrado cómo la etnicidad podría afectar la prevalencia de T2D y las reservas de hierro corporal (Aregbesola y col., 2017). Además, la mayoría de los estudios previos se realizaron en poblaciones de Estados Unidos de América y Europa (Tuomainen y col., 2003; Brouwers y col., 2004; Khalili y col., 2012; Juanola-Falgarona y col., 2013; Kunutsor y col., 2013; Aranda y col., 2016), y con escasa evidencia en poblaciones asiáticas (Ikeda y col., 2006; Meng y col., 2017; Xu y col., 2017), pero hay muy poca información sobre el metabolismo del hierro en poblaciones mexicanas y sudamericanas (Leiva y col., 2013).

Se ha demostrado que los caucásicos y los asiáticos mantienen diferentes niveles de ferritina en suero, lo que sugiere una posible diferencia en la homeostasis de la ferritina entre las poblaciones (Aregbesola y col., 2017, Wang y col., 2017). Por lo tanto, es de interés científico examinar si los niveles de ferritina en suero podrían estar implicados en trastornos metabólicos en la población hispana-mestiza mexicana.

Hay algunas consideraciones con las que hay que contar. En este estudio observacional de corte transversal, estudiamos la asociación entre los niveles de ferritina y oxLDL/LDL en una muestra, aunque con suficiente poder estadístico, de tamaño pequeño. Además, ajustamos a factores de riesgo bien establecidos para trastornos metabólicos como la diabetes (incluido el BMI, lípidos, adiponectina e hipertensión). Debido a que la asociación ferritina-oxLDL no se modificó por sexo, los análisis se informaron combinados para ambos sexos. Ya que la ferritina sérica es un reactante de fase aguda, excluimos a los participantes que tenían un historial conocido de inflamación aguda de siete días, y ajustamos nuestro análisis a la concentración de IL-6, pero no se determinó ningún otro marcador de inflamación de importancia clínica, por ejemplo hsPCR. La ausencia de más marcadores de inflamación hace que los resultados de ferritina sérica sean debatibles y por tanto, se recomienda introducir más pruebas de inflamación en el futuro.

Se estudiaron solo sujetos con glucosa alterada en ayuno, según los niveles de FPG, pero no se consideró la prueba de tolerancia a la glucosa post-prandial a 2h y ni la hemoglobina glicada. Además, medimos la ferritina sérica, pero no otros marcadores del estado del hierro, como transferrina, saturación de transferrina, receptor soluble de transferrina, hierro sérico, hierro catalítico, etc.

La ferritina sérica se midió solo al inicio del estudio, por lo que se recomiendan estudios prospectivos que midan la ferritina sérica varias veces y a pesar del ajuste para varios factores de confusión potenciales, no podemos

descartar la posibilidad de sesgo debido a factores de confusión no medidos o de confusión residual. La dieta podría ser una posibilidad, ya que el alto consumo de carne roja y procesada aumenta el riesgo de T2D (Pan y col., 2013; Wittenbecher y col., 2015), y también se asocia con un aumento de ferritina sérica (Felipe y col., 2015; Wittenbecher y col., 2015); por lo tanto, la ingesta de carne roja podría ser importante en la asociación ferritina-oxLDL.

Finalmente, se debe tener precaución al generalizar los hallazgos del estudio a poblaciones con antecedentes diferentes, y debido a la naturaleza del estudio, no se permiten conclusiones sobre la causalidad. Sin embargo, esto puede sugerir una mayor investigación de la relación del estado del hierro corporal y la oxidación de lípidos en etapas que preceden a la diabetes y las complicaciones. Adicionalmente, como segunda etapa del trabajo, y bajo antecedentes y resultados obtenidos en el presente nos llevaron a proponer un método para aislar ferritina sérica.

Interacción entre HGK35 y Ferritina Sérica, y Cromatografía IMAC

La búsqueda de moléculas relacionadas con la ferritina sérica humana condujo a que el grupo de Torti, identificara a cininógeno de alto peso molecular (HK) como una proteína que interactúa con ferritina sérica (Torti y Torti, 1998). HK es una proteína plasmática abundante de 120 kDa que inicialmente se describió como un cofactor en la cascada de coagulación. La HK es escindida por una serina proteasa, la calicreína, para producir dos cadenas de proteínas activas separadas: bradicinina (BK) y cininógeno de alto peso molecular de dos cadenas (HKa; Sainz y col., 2007). BK es un péptido de 9 aminoácidos que induce la liberación rápida de óxido nítrico, dolor y vasodilatación. BK es también un péptido pro-angiogénico y en contraste, HKa es anti-angiogénico (Guo y Colman, 2005).

La parte de la estructura de HKa encargada de la función anti-angiogénica es el dominio 5 de la cadena ligera y se encontró que ferritina se une a este dominio (al dominio 5 de HKa), unión 10 veces más afín comparado con la proteína HK. Ferritina sérica se une específicamente a un péptido rico en histidina, glicina y lisina (HGK) del dominio 5 de HKa, con secuencia ⁴⁷⁴DHGHKHKHGHGHGKHKNGKNGKHNGWK⁵⁰² (Coffman y col., 2009; Tesfay y col., 2012). Debido a esto, la ferritina promueve la actividad angiogénica (Coffman y col., 2009) adhesión y proliferación en células endoteliales (Huhn y col., 2014).

Tomando este conocimiento, se adquirió un producto peptídico correspondiente a la secuencia aminoacídica antes descrita con etiqueta de polihistidina (6-his) para estandarizar un método de purificación mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados.

Antes de hacer la estandarización se procedió a generar un antisuero anti-ferritina para poder realizar ensayos de interacción entre el péptido HGK35 y ferritina sérica y confirmar los hallazgos del grupo de Coffman y Torti (Coffman y col., 2009; Tesfay y col., 2012). Para obtener el antisuero policlonal anti-ferritina se propuso un procedimiento reportado (Bayat y col., 2013) con algunas modificaciones. Al finalizar el proceso se encontró un elevado título de anticuerpos anti-ferritina, en el antisuero de ratones BALB/c (Figura 7, siguiente página), hasta dil. 1:64000 con reconocimiento positivo para ferritina.

El antisuero obtenido también se hizo interaccionar contra antígeno (ferritina) mediante Dot Blot y se confirmó la presencia de anticuerpos policlonales IgG, anti-ferritina a una concentración de proteína aproximada de 2mg/mL (Gran parte de la proteína son inmunoglobulinas específicas; Figura 8).

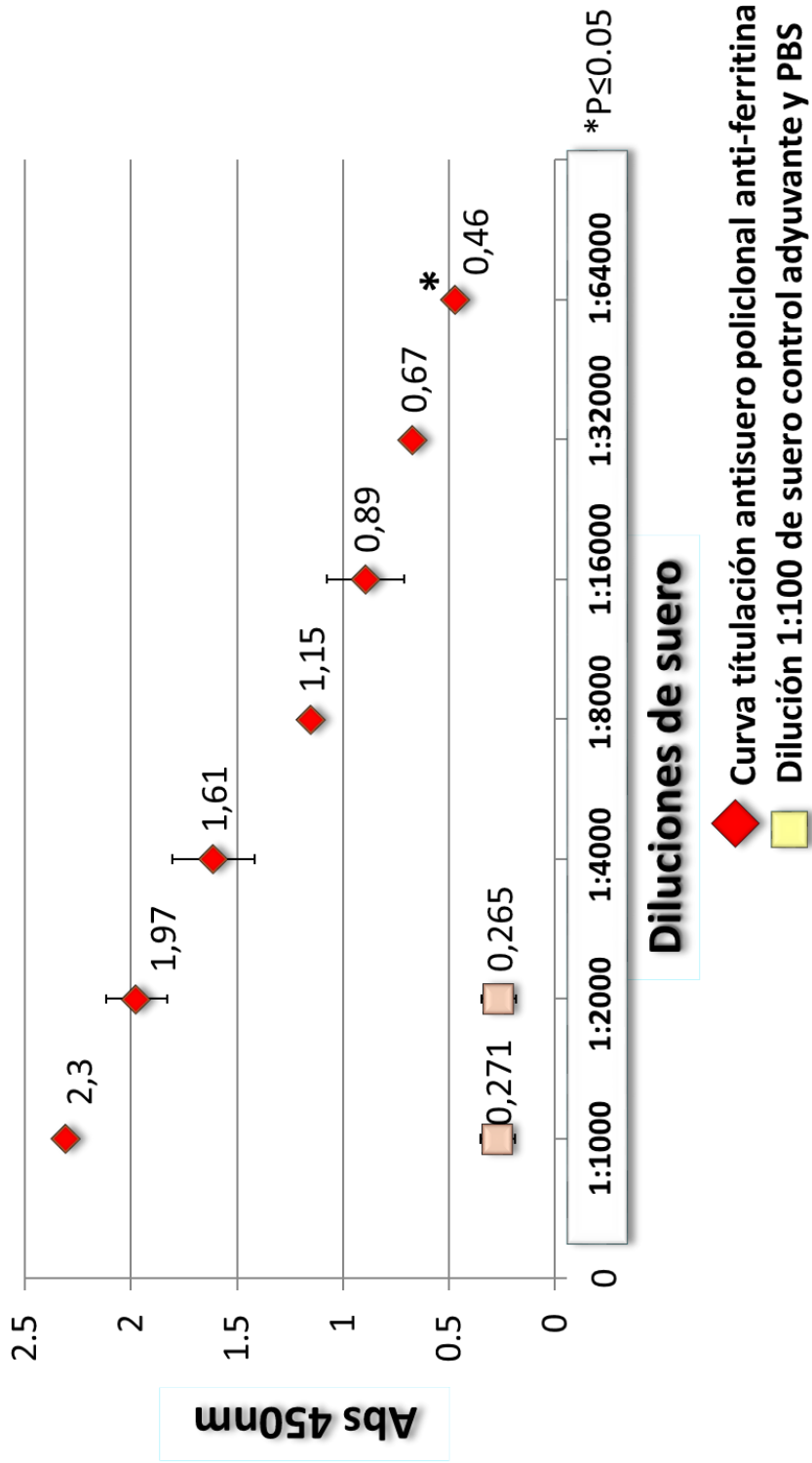


Figura 7. Titulación de pool de suero de ratones BALB/c por ELISA. Los ratones fueron inmunizados 4 veces, vía intraperitoneal con 50ug de ferritina. Al finalizar la inmunización se hizo ELISA para determinar la especificidad del antisuero hacia ferritina.

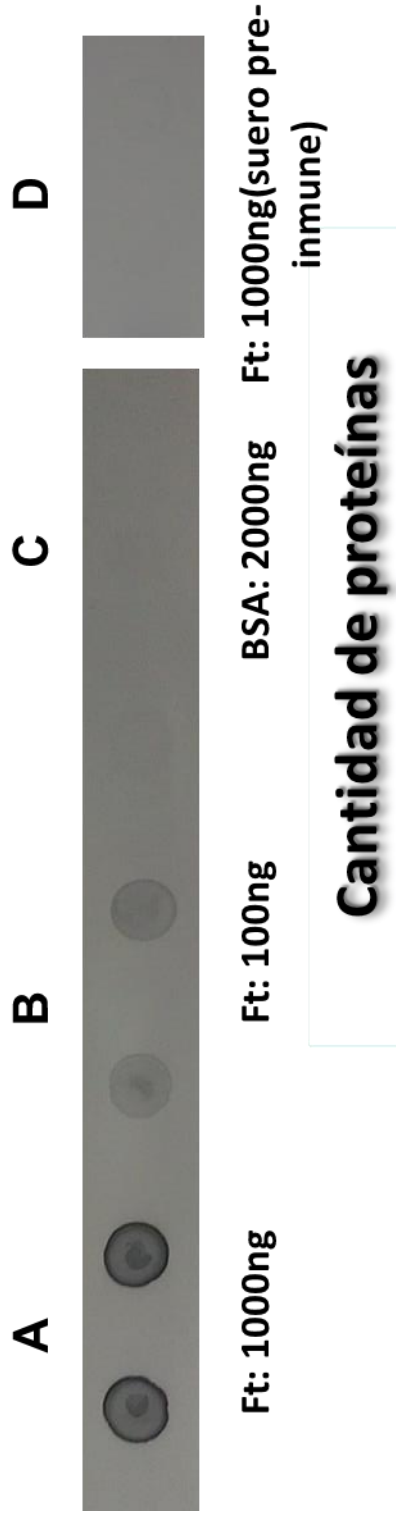


Figura 8. Dot Blot de antisuero policlonal. Se determinó la especificidad del antisuero policlonal contra ferritina. A) y B) se colocó ferritina (Ft; 1000ng y 100ng); C) se colocó albúmina de suero bovino (BSA) y D) se colocó ferritina (1000ng). En A), B) y C), después de colocar la proteína se reveló con antisuero policlonal, y en D) Se interaccionó con suero pre-inmune.

Posterior a ello se realizó una reacción entre el péptido HGK35 con ferritina comercial mediante inmuno-ensayos ELISA y Western Blot (Figura 9 y 10, siguientes páginas). Confirmando lo que reporta la literatura, los ensayos de ELISA y Western Blot generaron señal positiva para la interacción entre el péptido y ferritina sérica, no así para la ausencia de cualquier componente de la interacción (péptido HGK35, ferritina, antisuero policlonal anti-ferritina, anticuerpo secundario anti-IgG de ratón biotinilado), u otros controles (proteínas como albúmina y el control de peso molecular BioRad, cat. 1610317).

Por otro lado, para estandarizar el método de purificación mediante cromatografía de afinidad con metales inmovilizados, se adquirió una matriz de Ni^{2+} unido a ácido nitrilotriacético-sefarosa 6B, un sistema que tiene gran afinidad por residuos de aminoácido histidina (Block y col., 2009), ya que el grupo imidazol presente en histidina, puede realizar enlaces de coordinación muy afines con el níquel (Figura 11, C); quien se dispone a reaccionar con dos grupos imidazol presente en la columna. Esta interacción puede ser revertida por la protonación del imidazol (bajar el pH) o bien por competición con elevadas concentraciones de imidazol (Block y col., 2009). La columna que se adquirió tiene capacidad de 50mg/mL bajo condiciones saturantes de proteína (determinado por el fabricante), una capacidad muy grande para lo que se esperó recuperar de ferritina sérica del pool de suero humano (aproximadamente 5-30 μ g), pensando en que el pool entró en el intervalo de niveles normales de ferritina sérica (15-300 μ g/L, valores que no fueron determinados) y asumiendo que se purifica todas las moléculas de ferritina posible.

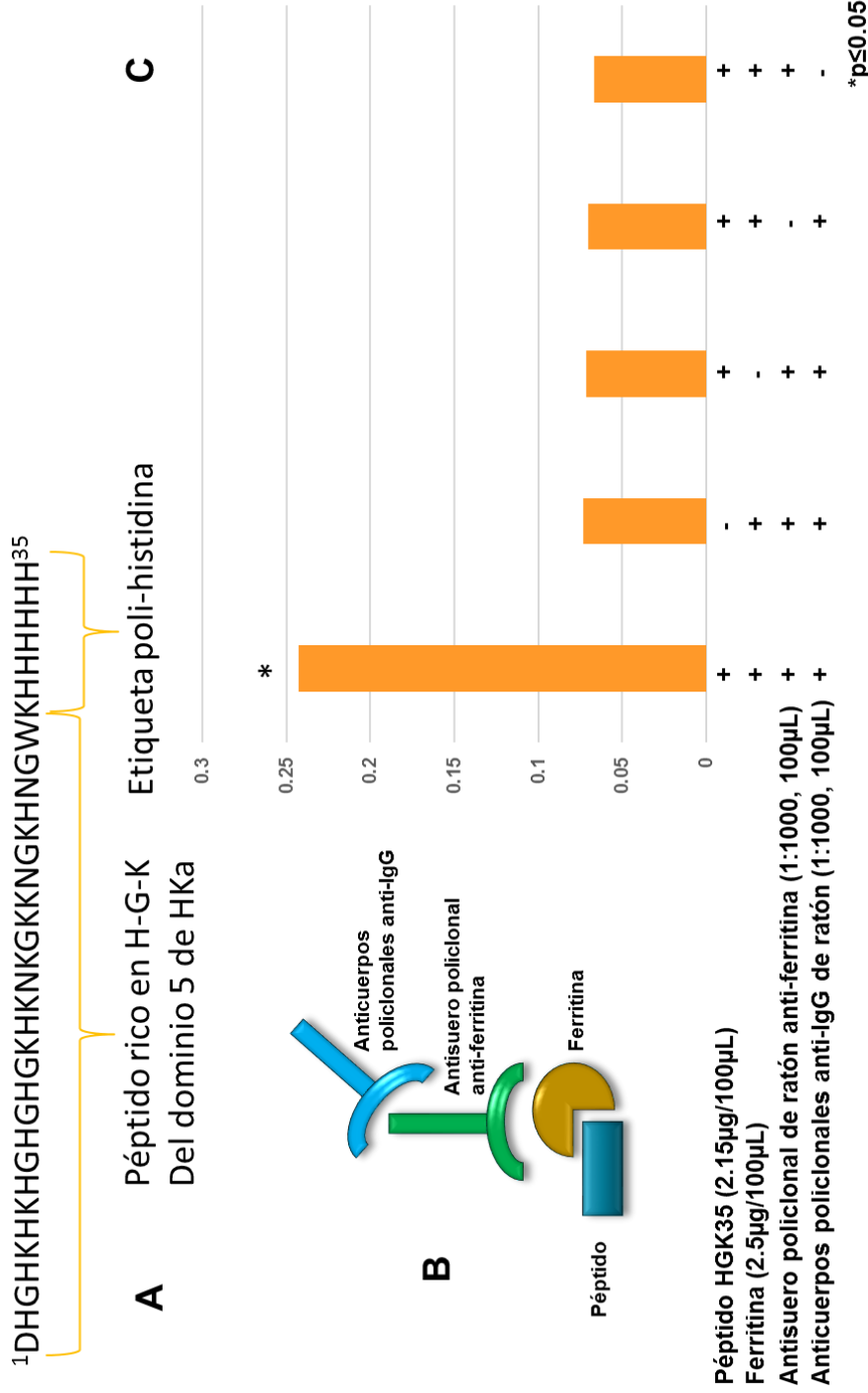


Figura 9. Interacción entre Péptido Rico en Histidina, Glicina y Lisina con Etiqueta de Poli-Histidina (HGK35) y Ferritina Mediante ELISA. A) secuencia de aminoácidos del péptido HGK35 específico a ferritina. B) Diagrama de la interacción que acontece entre el péptido HGK35 y ferritina. C) Gráfica del ensayo ELISA para determinar especificidad entre péptido HGK35 y ferritina, con sus controles. Abreviatura: HGK35, péptido rico en histidina, glicina y lisina perteneciente al dominio 5 de cininógeno de alto peso molecular de doble cadena, de 35 aminoácidos con etiqueta de 6 histidinas.

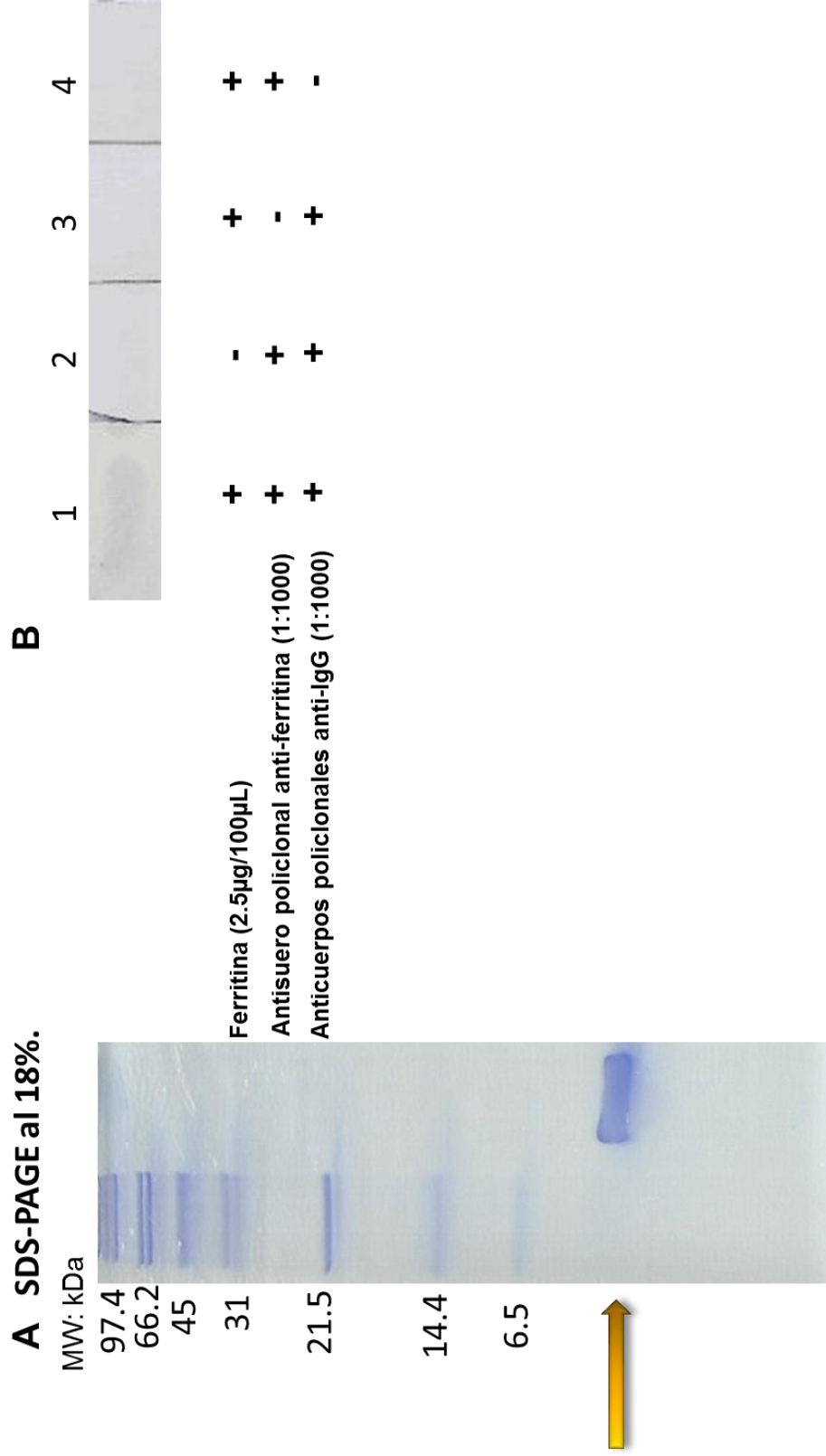


Figura 10. Western Blot para Determinar la Especificidad del Péptido HGK35 hacia Ferritina. A) Electroforesis SDS-PAGE al 18%. En el primer carril se observa el patrón de bandas del control de peso molecular. En el segundo carril, se muestra el corrimiento del péptido HGK35 (3ug), con un peso molecular de 4.15kDa. C) En el mismo experimento, se hizo transferencia de péptido a membrana de nitrocelulosa para mediante Western Blot, interaccionar con ferritina. Abreviatura: HGK35, péptido rico en histidina, glicina y lisina perteneciente al dominio 5 de cininógeno de alto peso molecular de doble cadena, de 35 aminoácidos con etiqueta de 6 histidinas.

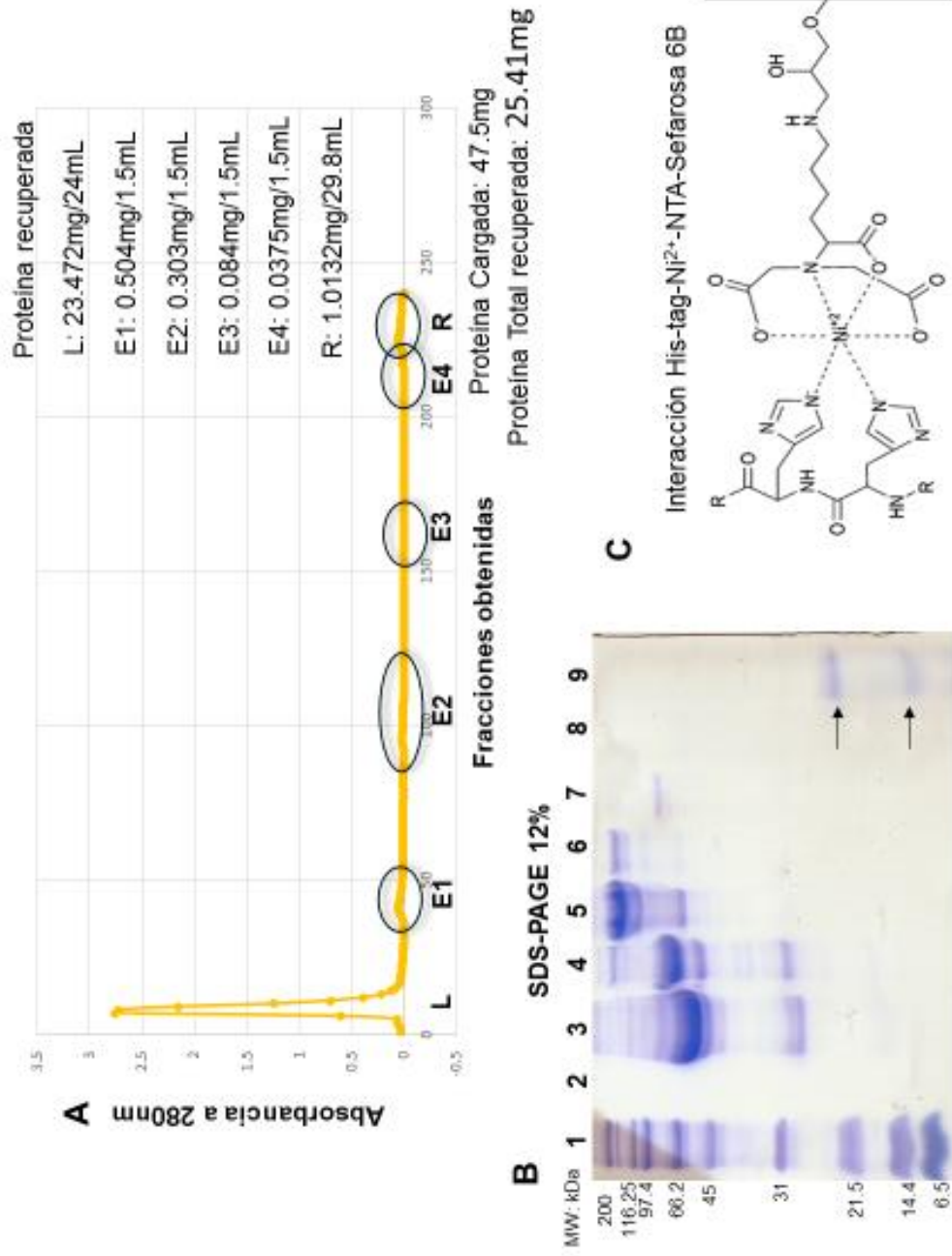


Figura 11. Estandarización de la cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), sistema níquel-ácido nitrilotriacético-sefaraosa 6B. A) Cromatograma de corrida realizada a pH 7.6, relación absorbancia a 280nm-fracciones obtenidas, muestra proteica cargada y proteína recuperada según fracciones obtenidas. B) Las fracciones obtenidas fueron aplicadas en una SDS-PAGE al 12% y se obtuvo el patrón de corrimiento de bandas para cada fracción; 1) Control de peso molecular; 2) control buffer de carga Laemmli 6X; 3) Fracción de lavado (10mM imidazol), 9.78ug; 4) Fracción de elución 1 (25mM imidazol), 25.2ug; 5) Fracción de elución 2 (50mM imidazol), 15.15ug; 6) Fracción de elución 3 (125mM imidazol), 4.2ug; 7) Fracción de elución 4 (225mM imidazol), 1.875ug. 8) Fracción de regeneración (NaOH 0.5M), 25.33ug. 9) Ferritina comercial, H-ferritina y L-ferritina, 4ug. C) Diagrama de la interacción entre el grupo imidazol de histidina con níquel-ácido nitrilotriacético-sefaraosa 6B.

Previo el ensayo con la muestra problema (pool de 75mL de suero), se realizó una estandarización con suero total solamente filtrado a 0.2µm para eliminar lípidos y mezclado con igual volumen de buffer de equilibrio (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 600mM, imidazol 10mM), donde se ensayaron 3 diferentes condiciones de pH tanto de soluciones de equilibrio como lavado y elución: pH 7.0, pH 7.6 y pH 8. La cromatografía de afinidad Ni-NTA, como se describió anteriormente, tiene gran afinidad por los grupos imidazoles de histidina presentes en proteínas, siendo por ejemplo un pH 8, óptima para la interacción entre la columna e histidina (punto isoeléctrico de histidina), sin embargo, considerando la poca cantidad de ferritina sérica en comparación con proteínas abundantes, fue factible pensar que a un pH 8, otras proteínas (naturalmente ricas en histidina) indeseables adquirieran mayor notoriedad en la purificación de ferritina. Al hacerse los ensayos a diferente pH, se determinó que a pH 7.6 y pH 8, se genera un buen corrimiento cromatográfico de suero total que concuerda con el corrimiento para proteínas séricas afines a Ni-NTA (Figura 11, página anterior; Block y col., 2009). Finalmente se decidió utilizar un corrimiento cromatográfico a pH 7.6, para evitar el supuesto de que a pH 8 hay mayor afinidad de proteínas no pertinentes para el presente trabajo, principal problema a enfrentar por la baja concentración de ferritina sérica en la muestra problema (pool de suero de 75mL).

El pool de suero antes del pretratamiento para cromatografía tuvo concentración de 7.2g/dL. Después del pretratamiento y de desechar proteína no pertinente se obtuvieron 56.58mg de proteína total los cuales se aplicaron en la columna, en total 12.3mL de solución(4.6mg/mL). El cromatograma (Figura 12 y 13, páginas siguientes) muestra las fracciones, la primera, correspondiente a fracción de lavado (proteínas no adsorbidas), las siguientes corresponden a fracciones de elución donde aparecen proteínas con diferentes afinidades, entre ellas inmunoglobulinas y diferentes isoformas de transferrina.

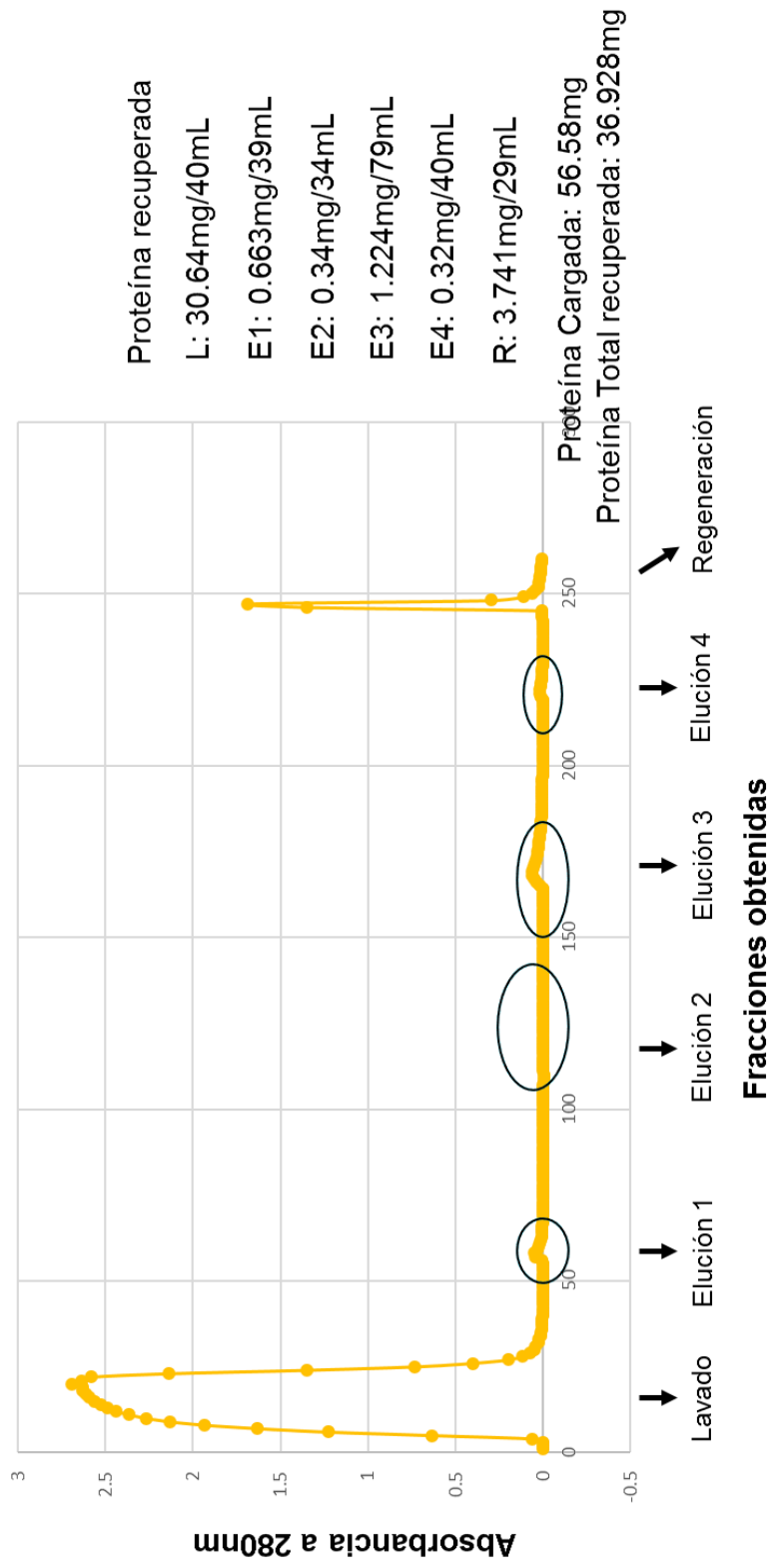


Figura 12. Cromatograma de Aislamiento de Ferritina Sérica Mediante la Interacción Ferritina-Péptido HGK35 por Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados (IMAC), sistema níquel-ácido nitrotriacético-sefarosa 6B. A) Cromatograma, relación absorbancia a 280nm-fracciones obtenidas, muestra proteína cargada y proteína recuperada según fracciones obtenidas. Abreviatura: HGK35, péptido rico en histidina, glicina y lisina de 35 aminoácidos obtenido del dominio 5 de cininógeno de elevado peso molecular de doble cadena, con etiqueta de 6 histidinas.

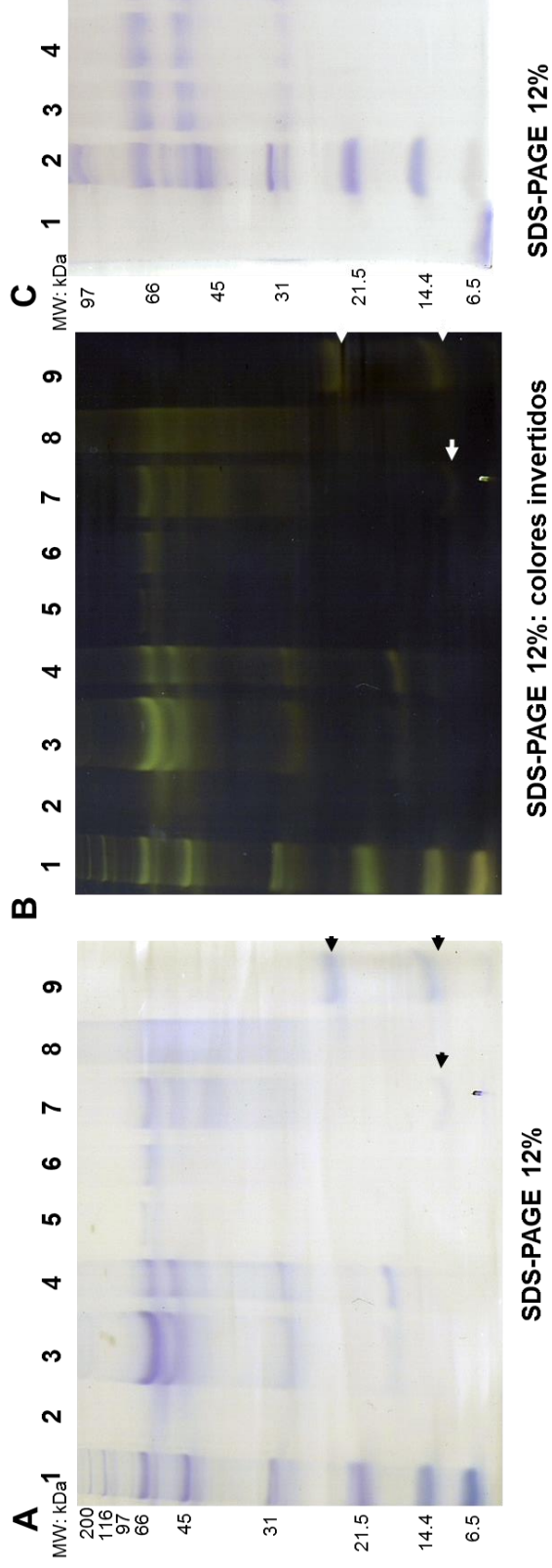


Figura 13. Aislamiento de Ferritina Sérica Mediante la Interacción Ferritina-Péptido HGK35 por Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados (IMAC), sistema níquel-ácido nitrilotriacético-sefarosa 6B. A) Las fracciones obtenidas fueron aplicadas en una SDS-PAGE al 12% y se obtuvo el patrón de corrimiento de bandas para cada fracción; 1) Control de peso molecular; 2) control buffer de carga Laemmli 6X; 3) Fracción de lavado (10mM imidazol), 12ug; 4) Fracción de elución 1 (25mM imidazol), 12ug; 5) Fracción de elución 2 (50mM imidazol), 12ug; 6) Fracción de elución 3 (125mM imidazol), 12ug; 7) Fracción de elución 4 (225mM imidazol), 12ug. 8) Fracción de regeneración (NaOH 0.5M), 12ug. 9) Ferritina comercial, 4ug. B) A la SDS-PAGE de A), se le invirtió el color para obtener una mejor observación. C) SDS-PAGE al 12%: 1) Péptido HGK35, 4ug; 2) control de peso molecular; 3) Muestra problema pretratada, y la cual se aplicó en la cromatografía de afinidad; 12ug; 4) Fracción de lavado (10mM imidazol), 12ug. Abreviatura: HGK35, péptido rico en histidina, glicina y lisina de 35 aminoácidos obtenido del dominio 5 de cininógeno de elevado peso molecular de doble cadena, con etiqueta de 6 histidinas.

Se obtuvieron 36.928mg de proteína total después de la corrida cromatográfica, medido por UV 280nm; de lo cual resalta la ausencia de cerca de 20mg de proteína, una explicación es el hecho de que imidazol absorbe a 280nm haciendo difícil la estimación de proteína bajo este método, se propone en el futuro realizar otros métodos donde no interviene imidazol, por ejemplo, ensayo de Bradford (Block y col., 2009). En la fracción 4 (con 225mM de imidazol para elución) o en el buffer de regeneración (NaOH 0.5M) se presumía estuviera la ferritina sérica, ya que la literatura reportada para la purificación de ferritina recombinante (Zou y col., 2016) reporta que la fracción de ferritina se eluye a 500mM de imidazol en solución de elución, lo cual, contrasta con la basta literatura que reporta concentraciones mucho más bajas (50-200mM imidazol; Block y col., 2009) necesarias para elución proteínas recombinantes con etiqueta de poli-histidina (6His), es por ello que en nuestro caso, pensando que 500mM está sobre utilizado, se evaluó la posibilidad de que ferritina sérica fuera separada de la interacción a 225mM.

Esta suposición se confirmó cuando se evaluaron las fracciones obtenidas mediante SDS-PAGE a 12%, y Dot Blot con antisuero policlonal anti-ferritina antes descrito. Se presume que ferritina sérica contenida en fracción de elución 4 (320ug de proteína recuperada, de los cuales se estima 10-30ug sean de ferritina sérica) aparece como una banda de aproximadamente 15-18kDa a la altura de L-ferritina (16-19kDa) comercial (Figura 13: A y B), fracción que arroja un resultado positivo en el Dot Blot (Figura 14). Se propone en estudios futuros, confirmar estos resultados con una metodología tan específica como secuenciación del fragmento recuperado de la fracción 4 para comparar la secuencia aminoacídica con bibliotecas de secuencias peptídicas reportadas en bases de datos.



Figura 14. Dot Blot de las Fracciones del Aislamiento de Ferritina Sérica Mediante la Interacción Ferritina-Péptido HGK35 por Cromatografía de Afinidad por Metales Inmovilizados (IMAC), sistema níquel-ácido nitrilotriacético-sefarosa 6B. A) De las fracciones obtenidas anteriormente y controles se colocó 1ug en membrana de nitrocelulosa. Mediante interacción con antisuero policlonal anti-ferritina y anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, se reveló la presencia de ferritina en las fracciones. 1. Péptido HGK35; 2. Control de peso molecular; 3. Pool de suero (Muestra problema pretratada); 4. Lavado; 5. Elución 1; 6. Elución 2; 7. Elución 3; 8. Elución 4; 9. Regeneración; 10. Ferritina comercial. La línea 8 y 10 resultaron positivas para el método.

Existen varias razones para proponer la purificación de ferritina sérica; primero, históricamente ha sido un verdadero desafío el aislamiento de la proteína de suero, debido a que se mantiene en concentraciones bajas comparado con la mayoría de proteínas séricas (Worwood, 1976), lo cual se condiciona el utilizar una considerable cantidad de muestra (500mL-5000mL; Worwood, 1976; Cragg y col., 1981; Zou y col., 2016) para obtener apenas dos o tres miligramos de proteína, con muestras procedentes de sujetos con enfermedades donde ferritina sérica es extraordinariamente elevada (mayor a 1000µg/L para aumentar la posibilidad de recuperar buena cantidad de ferritina), generando además un sesgo, por ejemplo, cuando se estudia la estructura y esto se extrapola a la población en general.

Segundo, en la literatura aún quedan preguntas por resolver en cuanto a su estructura, función y metabolismo, por ejemplo, se sabe que ferritina tiene una glicosilación en el residuo de aminoácido asparagina 8 en la subunidad L-ferritina (Cragg y col., 1980; Cragg y col., 1981), sin embargo, se desconoce la totalidad de carbohidratos presentes y el acomodo espacial de esta estructura. Clásicamente se sabe que la ferritina sérica es rica en la subunidad L-ferritina (Bomford y col., 1981; Boyd y col., 1985), información que concuerda con lo obtenido en la presente tesis (Figura 13) y los autores descartan que tenga actividad de ferroxidasa (para la nucleación de hierro dentro de la proteína; Bomford y col., 1981; Boyd y col., 1985; Cohen y col., 2015).

Adicional a esto, hay reportes que mencionan que, en algunos sujetos con inflamación, podría suceder un recambio de subunidades, aumentando la H-ferritina en ferritina sérica (Gammella y col., 2015), lo cual sería un hallazgo importante, que agregaría al conocimiento de la fisiopatología en enfermedades inflamatorias como la prediabetes, diabetes y aterosclerosis. Aunque se conocen algunas funciones para la proteína, no se ha dilucidado totalmente que funciones cumple la ferritina sérica in vivo y esto se relaciona con su metabolismo (Torti y Torti, 2002; Kalantar-Zadeh y col., 2006), ya que es apenas escaso el

conocimiento sobre los receptores y otras proteínas séricas con que interactúa la ferritina circulante humana.

Tercero; está bien establecido que algunas especies reactivas de oxígeno pueden causar la liberación de hierro, por ejemplo, el hierro de ferritina (Figura 5; Gammella y col., 2015), e iniciar ciclo vicioso que conduce a la formación de especies reactivas de oxígeno más reactivas. De aislarse ferritina sérica en sujetos de estudio, se podría determinar si la proteína cuenta con hierro (y compararlo con aquellos estudio que lo han investigado; Cohen y col., 2015), y si ésta cantidad se diferencia entre sujetos de estudio con diferentes condiciones tal que, pueda ser un contribuyente importante en determinadas patologías donde la inflamación y el estrés oxidativo juegan un papel importante, por ejemplo la aterosclerosis.

Cuarto, en enfermedades como la diabetes y aterosclerosis, se acelera la generación de los productos de glicación como productos de Amadori y productos finales de glicación avanzada, los cuales tienen importancia en la fisiopatología de complicaciones (De Prieto y col., 2016). Específicamente se ha propuesto que ferritina sérica puede sufrir modificación por glicación *in vitro* (López-Soto y col., 2017), y aunque los niveles bajos de concentración y el corto tiempo de vida media en condiciones fisiológicas de ferritina sérica comparados con muchas otras proteínas podrían no contribuir directamente a la generación de complicaciones debido a esta modificación, el aislamiento de ferritina de sujetos con diferentes condiciones y la determinación de probables modificaciones por glicación, podrían proponer otro mecanismo por el cual ferritina podría liberar hierro o bien convertirse en un patrón molecular asociado a patógenos o daño.

En el presente trabajo se logró aislar ferritina sérica de un pool de sueros de 6 sujetos (3 hombres, 3 mujeres) sin aparente infección e inflamación, sin diagnóstico previo de enfermedad hepática, cáncer, enfermedad renal o hiperglicemia crónica, por tanto, es probable que el pool tuviera concentraciones

normales de ferritina sérica (15-300ug/L). Se obtuvieron de 10 a 30 μ g de ferritina sérica, cantidad importante por la cantidad de muestra de suero utilizada (75mL).

Como perspectiva se propone mejorar el método, poniendo atención en que la cantidad de suero a purificar sea mayor para comparar rendimientos con los reportados en literatura y estandarizar un corrimiento cromatográfico donde sean utilizado un gradiente de elución con varias concentraciones de imidazol (por ejemplo 150mM, 200mM, 225mM de imidazol) cercanos al pico de elución de ferritina sérica determinado en el presente trabajo, para lograr mayor pureza en la fracción de elución de ferritina o bien, crear un sistema en conjunto con otras cromatografías que permita recuperar ferritina sérica con mayor pureza.

CONCLUSIONES

En conclusión, hubo un aumento significativo en los niveles de ferritina sérica en el grupo de sujetos con glucosa alterada en ayuno. Se proponen tres causas: Primero, los niveles elevados de ferritina sérica pueden, en conjunto con otros factores de riesgo, desempeñar un papel en la formación de oxLDL. El hierro interviene en el estrés oxidativo, y el estrés oxidativo tiene efectos perjudiciales sobre la LDL. Segundo, los hallazgos pueden representar la causalidad inversa; es decir, el estrés oxidativo y la inflamación podrían llevar a que se eleven los niveles de ferritina en contraposición a la primera hipótesis, ya que la ferritina es un reactivo de fase aguda. Y tercero, una combinación de una ligera sobrecarga de hierro e inflamación crónica de bajo grado podría explicar el fenómeno de la asociación entre ferritina sérica y oxLDL. Lo que está claro es que, este resultado demuestra una asociación entre ferritina sérica y oxLDL, ya en el estado de prediabetes, lo que agrega información al estudio de la fisiopatología antes de la diabetes manifiesta.

Además, el protocolo propuesto para la purificación de ferritina sérica, mediante IMAC, sistema Ni-NTA, supone una mejora a los protocolos ya reportados. Este conocimiento permitirá en el futuro abordar diferentes aspectos que no se han logrado aclarar totalmente sobre ferritina sérica humana, como su estructura, receptores, contenido, comportamiento en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas.

REFERENCIAS

- Ahluwalia, N., Genoux, A., Ferrieres, J., Perret, B., Carayol, M. 2010. Iron status is associated with carotid atherosclerotic plaques in middle-aged adults. *J Nutr.* 140(4): 812-816.
- Akter, S., Nanri, A., Kuwahara, K., Matsushita, Y., Nakagawa, T. 2017. Circulating ferritin concentrations and risk of type 2 diabetes in Japanese individuals. *J Diabetes Investig.* 8(4): 462-470.
- Altin, C., Sade, L.E., Gezmis, E., Ozen, N., Duzceker, O., Bozbas, H. 2016. Assessment of Subclinical Atherosclerosis by Carotid Intima-Media Thickness and Epicardial Adipose Tissue Thickness in Prediabetes. *Angiology.* 67(10):961-9.
- Andrews, S. C. 2010. The Ferritin-like superfamily: Evolution of the biological iron storeman from a rubrerythrin-like ancestor. *Biochim Biophys Acta.* 1800(8): 691-705.
- American Diabetes Association. 2019. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. *Diabetes Care* 42(1): S13-S28.
- Aranda, N., Candido Fernandez-Cao, J., Tous, M., Arijia, V. 2016. Increased iron levels and lipid peroxidation in a Mediterranean population of Spain. *European Journal of Clinical Investigation.* 46(6):520-6.
- Aregbesola, A., Voutilainen, S., Virtanen, J.K., Mursu, J., Tuomainen, T-P. 2017. Gender difference in type 2 diabetes and the role of body iron stores. *An C Bio.* 54(1):113-20.
- Arredondo, A. 2014. Type 2 diabetes and health care costs in Latin America: exploring the need for greater preventive medicine. *BMC Med.* 12: 136.

- Baer, D. M., Tekawa, I. S., Hurley, L. B. 1994. Iron stores are not associated with acute myocardial infarction. *Circulation*. 89:2915-2918.
- Basu, A., Pedersen, M. G., Cobelli, C. 2012. Prediabetes: evaluation of beta-cell function. *Diabetes*. 61(2): 270-271.
- Bayat, A. A., Yeganeh, O., Ghods, R., Zarnani, A. H., Jeddi-Tehrani, M. 2013. Production and characterization of a murine monoclonal antibody against human ferritin. *Avicenna J Med Biotechnol*. 5(4):212-219.
- Bergman, M. 2013. Pathophysiology of prediabetes and treatment implications for the prevention of type 2 diabetes mellitus. *Endocrine*. 43(3): 504-513.
- Biondi-Zoccai, G. G., Abbate, A., Liuzzo, G., Biasucci, L. M. 2003. Atherothrombosis, inflammation, and diabetes. *J Am Coll Cardiol*. 41(7): 1071-1077.
- Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J. 2009. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods Enzymol*. 463: 439-473.
- Bomford A., Conlon-Hollingshead C., Munro H. N. 1981. Adaptive responses of rat tissue isoferritins to iron administration. Changes in subunit synthesis, isoferritin abundance, and capacity for iron storage. *J Biol Chem*. 256:948-955.
- Bonnefont-Rousselot, D., Khalil, A., Delattre, J., Jore, D., Gardes-Albert, M. 1997. Oxidation of human high-density lipoproteins by .OH and .OH/O(-)2 free radicals. *Radiat Res*. 147(6): 721-728.
- Boyd D., Vecoli C., Belcher D. M., Jain S. K., Drysdale J. W. 1985. Structural and functional relationships of human ferritin H and L chains deduced from cDNA clones. *J Biol Chem*. 260:11755-11761.
- Briat, J. F., Duc, C., Ravet, K., Gaymard, F. 2010. Ferritins and iron storage in plants. *Biochim Biophys Acta*. 1800(8): 806-814.

- Brouwers, A., Langlois, M., Delanghe, J., Billiet, J., De Buyzere, M., Vercaemst, R. 2004. Oxidized low-density lipoprotein, iron stores, and haptoglobin polymorphism. *Atherosclerosis*. 176(1):189-95.
- Bruno, G., Runzo, C., Cavallo-Perin, P., Merletti, F., Rivetti, M. 2005. Incidence of type 1 and type 2 diabetes in adults aged 30-49 years: the population-based registry in the province of Turin, Italy. *Diabetes Care*. 28(11): 2613-2619.
- Cazzola M., Bergamaschi G., Tonon L., Arbustini E., Grasso M., Vercesi E., Barosi G., Bianchi P. E., Cairo G., Arosio P. Hereditary hyperferritinemia-cataract syndrome: relationship between phenotypes and specific mutations in the iron-responsive element of ferritin light-chain mRNA. *Blood*. 90. 1997; 814–821.
- Chasteen N. D., Harrison P. M. 1999. Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *J Struct Biol*. 126:182-194.
- Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. 2017. Type 2 diabetes. *Lancet*. 389(10085): 2239-2251.
- Chen T. T., Li L., Chung D. H., Allen C. D., Torti S. V., Torti F. T., Cyster J. G., Chen C. Y., Brodsky F. M., Niemi E. C., Nakamura M. C., Seaman W. E., Daws M. R. 2005. TIM-2 is expressed on B cells and in liver and kidney and is a receptor for H-ferritin endocytosis. *J Exp Med*. 202. 955–965.
- Chen, X., Scholl, T. O., Stein, T. P. 2006. Association of elevated serum ferritin levels and the risk of gestational diabetes mellitus in pregnant women: The Camden study. *Diabetes Care*. 29(5): 1077-1082.
- Choi, S. W., Benzie, I. F., Ma, S. W., Strain, J. J., Hannigan, B. M. 2008. Acute hyperglycemia and oxidative stress: direct cause and effect? *Free Radic Biol Med*. 44(7): 1217-1231.

- Coffman L. G., Brown J. C., Johnson D. A., Parthasarathy N., D'Agostino Jr R. B. Lively M. O., Hua X., Tilley S. L., Muller-Esterl W., Willingham M. C., Torti F. M., Torti S. V. 2008. Cleavage of high-molecular-weight kininogen by elastase and trypsin is inhibited by ferritin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 294: L505–L515.
- Coffman, L. G., Parsonage, D., D'Agostino, R., Jr., Torti, F. M., Torti, S. V. 2009. Regulatory effects of ferritin on angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(2): 570-575.
- Cohen, L. A., Gutierrez, L., Weiss, A., Leichtmann-Bardoogo, Y., Zhang, D. L. 2010. Serum ferritin is derived primarily from macrophages through a nonclassical secretory pathway. *Blood.* 116(9): 1574-1584.
- Cooksey, R. C., Jones, D., Gabrielsen, S. 2010. Dietary iron restriction or iron chelation protects from diabetes and loss of beta-cell function in the obese (ob/ob lep^{-/-}) mouse. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 298(6):E1236–E1243.
- Courtney, C. H., Olefsky, J.M. 2007. Insulin Resistance, in *Mechanisms of Insulin Action*. Landes Bioscience and Springer Science-Business Media. New York.
- Coutinho, M., Gerstein, H. C., Wang, Y., Yusuf, S. 1999. The relationship between glucose and incident cardiovascular events. A metaregression analysis of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 years. *Diabetes Care.* 22(2): 233-240.
- Cragg, S.J., Wagstaff, M., Worwood, M. 1980. Sialic acid and the microheterogeneity of human serum ferritin. *Clin Sci Lond.* 58:259-62.
- Cragg, S. J., Wagstaff, M., Worwood, M. 1981. Detection of a glycosylated subunit in human serum ferritin. *Biochem J.* 199(3): 565-571.

- Danesh, J., Appleby, P. 1999. Coronary heart disease and iron status meta-analyses of prospective studies. *Circulation*. 99: 852-854.
- DeFronzo, R. A. y Abdul-Ghani, M. A. 2011. Preservation of beta-cell function: the key to diabetes prevention. *J Clin Endocrinol Metab*. 96(8): 2354-2366.
- de Valk, B., Marx, J. J. M. 1999. Iron, atherosclerosis, and ischemic heart disease. *Arch Intern Med* 159:1542-1548.
- Di Pietro, N., Formoso, G., Pandolfi, A. 2016. Physiology and pathophysiology of oxLDL uptake by vascular wall cells in atherosclerosis. *Vascul Pharmacol*. 84: 1-7.
- Dorcely, B., Katz, K., Jagannathan, R., Chiang, S. S., Oluwadare, B. 2017. Novel biomarkers for prediabetes, diabetes, and associated complications. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 10: 345-361.
- Douaihy, K. 2005. Prediabetes & atherosclerosis: what's the connection? *Nurse Pract*. 30(6): 24-35 quiz 36-27.
- D'Souza, A., Hussain, M., Howarth, F. C., Woods, N. M., Bidasee, K. 2009. Pathogenesis and pathophysiology of accelerated atherosclerosis in the diabetic heart. *Mol Cell Biochem*. 331(1-2): 89-116.
- Egbuche, O., Millard, H.R., Renelus, B., Maihemuti, A., Musani, S.K., Fox, E.R. 2017. Serum Ferritin Levels in Blacks Without Known Cardiovascular Disease (from the Jackson Heart Study). *Am J Cardiol*.
- Eldin, E.E.M.N., Almarzouki, A., Assiri, A.M., Elsheikh, O.M., Mohamed, B.E.A., Babakr, A.T. 2014. Oxidized low density lipoprotein and total antioxidant capacity in type-2 diabetic and impaired glucose tolerance Saudi men. *Diab & Met Syn*. 6.
- Ellervik, C., Andersen, H. U., Tybjaerg-Hansen, A., Frandsen, M., Birgens, H. 2013. Total mortality by elevated transferrin saturation in patients with diabetes. *Diabetes Care*. 36(9): 2646-2654.

- Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H., Rotheneder, M. 1989. Continuous monitoring of in vitro oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic Res Commun.* 6(1): 67-75.
- Faghihimani, E., Darakhshandeh, A., Feizi, A., Amini, M. 2014. Evaluation of peripheral arterial disease in prediabetes. *Int J Prev Med.* 5(9): 1099-1105.
- Felipe, A., Guadalupe, E., Druso, P., Carlos, M., Pablo, S., Oscar, C. 2015. Serum Ferritin Is Associated with Metabolic Syndrome and Red Meat Consumption. *Oxid Med Cell Longev.* 2015:769739.
- Ferretti, G., Bacchetti, T., Negre-Salvayre, A., Salvayre, R., Dousset, N. 2006. Structural modifications of HDL and functional consequences. *Atherosclerosis.* 184(1): 1-7.
- Folkman J. 2003. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med.* 3:643–651.
- Forbes, J. M. y Cooper M. E. 2013. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev.* 93(1): 137-188.
- Forbes, J. M. y Fotheringham, A. K. 2017. Vascular complications in diabetes: old messages, new thoughts. *Diabetologia.* 60(11): 2129-2138.
- Ford, E. S., Zhao, G., Li, C. 2010. Pre-diabetes and the risk for cardiovascular disease: a systematic review of the evidence. *J Am Coll Cardiol.* 55(13): 1310-1317.
- Freitas, Lima, L. C., Braga, VdA., de Franca, Silva MdS., Cruz, JdC., Sousa Santos, S. H., de Oliveira Monteiro MM. 2015. Adipokines, diabetes and atherosclerosis: an inflammatory association. *Frontiers in Physiology.* 6.
- Friedewald, W. T., Levy, R. I., Fredrickson, D. S. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 18 (6): 499–502.

- Fu, S., Davies, M. J., Stocker, R., Dean, R. T. 1998. Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. *Biochem J.* 333:519-525.
- Gammella, E., Recalcati, S., Rybinska, I., Buratti, P., Cairo, G. 2015. Iron-Induced Damage in Cardiomyopathy: Oxidative-Dependent and Independent Mechanisms. *Ox Med Cel L.*
- Ganz T. y Nemeth E. 2009. Iron sequestration and anemia of inflammation. *Semin Hematol.* 46:387–393.
- Gasser, B. I. 2009. Determination of Serum Ferritin Glycosylation in Hyperferritinemia Associated to Iron Overload and Inflammation. *EJIFCC.* 20(2): 136-140.
- Gerrity, R. G., Natarajan, R., Nadler, J. L., Kimsey, T. 2001. Diabetes-induced accelerated atherosclerosis in swine. *Diabetes.* 50(7): 1654-1665.
- Ghiselli, G., Giorgini, L., Gelati, M., Musanti, R. 1992. Oxidatively modified HDLs are potent inhibitors of cholesterol biosynthesis in human skin fibroblasts. *Arterioscler Thromb.* 12(8): 929-935.
- Ghosh S., Hevi S., Chuck S. L. Regulated secretion of glycosylated human ferritin from hepatocytes. *Blood.* 103. 2004; 2369–2376.
- Giessauf, A., van Wickern, B., Simat, T., Steinhart, H., Esterbauer, H.1996. Formation of N-formylkynurenine suggests the involvement of apolipoprotein B-100 centered tryptophan radicals in the initiation of LDL lipid peroxidation. *FEBS Lett.* 389(2): 136-140.
- Ginsberg, H. N. 2000. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest.* 106(4): 453-458.
- Glagov, S. 1987. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 316(22): 1371-1375.

- Gomez-Marcos, M. A., Gomez-Sanchez, L., Patino-Alonso, M. C., Recio-Rodriguez, J. I., Regalado, N. G. 2016. Association between markers of glycemia and carotid intima-media thickness: the MARK study. *BMC Cardiovasc Disord.* 16(1): 203.
- Granier T., Langlois d'Estaintot B., Gallois B., Chevalier J. M., Precigoux G., Santambrogio P., Arosio P. 2003. Structural description of the active sites of mouse L-chain ferritin at 1.2 Å resolution. *J Biol Inorg Chem.* 8:105-111.
- Gray C. P., Franco A. V., Arosio P., Hersey P. 2001. Immunosuppressive effects of melanoma-derived heavy-chain ferritin are dependent on stimulation of IL-10 production. *Int J Cancer.* 92:843–850.
- Gregg, E. W., Sattar, N., Ali, M. K. 2016. The changing face of diabetes complications. *Lancet. Diabetes Endocrinol.* 4(6): 537-547.
- Grundy, S. M. 1999. Hypertriglyceridemia, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol.* 83(9B): 25F-29F.
- Guo Y L, Colman R W. 2005. Two faces of high-molecular-weight kininogen (HK) in angiogenesis: bradykinin turns it on and cleaved HK (HKa) turns it off. *J Thromb Haemost.* 3:670–676.
- Hanly WC, Artwohl JE, Bennett BT. 1995. Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry. *ILAR J.* 37:93-118.
- Hayashi A., Wada Y., Suzuki T., Shimizu T. 1993. Studies on familial hypotransferrinemia: unique clinical course and molecular pathology. *Am J Hum Genet.* 53:201–213.
- Hayden, M. R. y Tyagi S. C. 2004. Vasa vasorum in plaque angiogenesis, metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy: a malignant transformation. *Cardiovasc Diabetol.* 3: 1.
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C: 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol.* 186:1-85.

- Hernández, S. R., Fernández, C. C., Baptista L. P. 2003. Metodología de la investigación. Mc Graw Hill. México.
- Hernandez, C., Lecube, A., Carrera, A., Simo, R. 2005. Soluble transferrin receptors and ferritin in Type 2 diabetic patients. *Diabet Med.* 22(1): 97-101.
- Hintze K. J. y Theil E. C. 2006. Cellular regulation and molecular interactions of the ferritins. *Cell Mol Life Sci.* 63:591–600.
- Holman, N., Young, B., Gadsby, R. 2015. Current prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes in adults and children in the UK. *Diabet Med.* 32(9): 1119-1120.
- Huang, H., Mai, W., Liu, D., Hao, Y., Tao, J., Dong, Y. 2008. The oxidation ratio of LDL: A predictor for coronary artery disease. *Disease Markers.* 24(6):341-9.
- Huang, Y., Guo, W., Zeng, J. 2016. Prediabetes Enhances Periodontal Inflammation Consistent With Activation of Toll-Like Receptor-Mediated Nuclear Factor-kappa B Pathway in Rats. *Journal of Periodontology*; 87: E64-E74.
- Huang, Y., Cai, X., Mai, W., Li, M., Hu, Y. 2016. Association between prediabetes and risk of cardiovascular disease and all cause mortality: systematic review and meta-analysis. *Bmj-Brit Med J.* 355.
- Huhn, A. J., Parsonage, D., Horita, D. A., Torti, F. M., Torti, S. V., Hollis, T. 2014. The high-molecular-weight kininogen domain 5 is an intrinsically unstructured protein and its interaction with ferritin is metal mediated. *Protein Sci.* 23(8): 1013-1022.
- Ikeda, Y., Suehiro, T., Yamanaka, S., Kumon, Y., Takata, H., Inada, S. 2006. Association between serum ferritin and circulating oxidized low-density lipoprotein levels in patients with type 2 diabetes. *Endocrine Journal.* 53(5):665-70.

- Ilyas, A. y Shah, M. H. 2016. Multivariate statistical evaluation of trace metal levels in the blood of atherosclerosis patients in comparison with healthy subjects. *Heliyon*. 2(1): e00054.
- International Diabetes Federation. 2017. Diabetes Atlas, 8. International Diabetes Federation. Brussels, Belgium.
- Jaacks, L. M., Siegel, K. R., Gujral, U. P., Narayan, K. M. 2016. Type 2 diabetes: A 21st century epidemic. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 30(3): 331-343.
- Jacobs, A., Miller, F., Worwood, M., Beamish, M. R., Wardrop, C. A. 1972. Ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *Br Med J*. 4:206–208.
- Jehn, M. L., Guallar, E., Clark, J. M., Couper, D., Duncan, B. B. 2007. A prospective study of plasma ferritin level and incident diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Am J Epidemiol*. 165(9): 1047-1054.
- Juanola-Falgarona, M., Candido-Fernandez, J., Salas-Salvado, J., Martinez-Gonzalez, M.A., Estruch, R., Fiol, M. 2013 Association between Serum Ferritin and Osteocalcin as a Potential Mechanism Explaining the Iron-Induced Insulin Resistance. *Plos One*. 8(10).
- Kalantar-Zadeh K., Lee G. H. 2006. The fascinating but deceptive ferritin: to measure it or not to measure it in chronic kidney disease? *Clin J Am Soc Nephrol*. 1: S9–S18.
- Kannengiesser C., Jouanolle A. M., Hetet G., Mosser A., Muzeau F., Henry D., Bardou-Jacquet E., Mornet M., Brissot P., Deugnier Y., Grandchamp B., Beaumont C. 2009. A new missense mutation in the L ferritin coding sequence associated with elevated levels of glycosylated ferritin in serum and absence of iron overload, *Haematologica*. 94:335–339.

- Kattoor, A. J., Pothineni, N. V. K., Palagiri, D., Mehta, J. L. 2017. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 19(11):42.
- Kell, D.B. y Pretorius, E. 2014. Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells. *Metallomics.* 6(4):748-73.
- Kell, D. B. y Pretorius, E. 2018. No effects without causes: The Iron Dysregulation and Dormant Microbes hypothesis for chronic, inflammatory diseases. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 93(3): 1518-1557.
- Khalili, A., Ghorbanihaghjo, A., Rashtchizadeh, N., Gaffari, S. 2012. Association between Serum Ferritin and Circulating Oxidized Low-density Lipoprotein Levels in Patients with Coronary Artery Disease. *J Cardiovasc Thorac Res.* 4(1):1-4.
- Kim, S., Park, S. K., Ryoo, J. H., Choi, J. M., Hong, H. P., Park, J. H. 2015. Incidental risk for diabetes according to serum ferritin concentration in Korean men. *Clin Chim Acta.* 451:165-9
- Knickelbein J. E., De Souza A. J., Tosti R., Narayan P., Kane L. P. 2006. Cutting edge: inhibition of T cell activation by TIM-2, *J. Immunol.* 177:4966–4970.
- Kopprasch, S., Pietzsch, J., Kuhlisch, E., Fuecker, K., Temelkova-Kurktschiev, T., Hanefeld, M. 2002. In vivo evidence for increased oxidation of circulating LDL in impaired glucose tolerance. *Diabetes.* 51(10):3102-6.
- Kraml, P. 2017. The Role of Iron in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Physiological Research.* 66: S55-S67.
- Kuhn, H., Belkner, J., Suzuki, H., Yamamoto, S. 1994. Oxidative modification of human lipoproteins by lipoxygenases of different positional specificities. *J Lipid Res.* 35(10): 1749-1759.

- Kunutsor, S.K., Apekey, T.A., Walley, J., Kain, K. 2013. Ferritin levels and risk of type 2 diabetes mellitus: an updated systematic review and meta-analysis of prospective evidence. *Dia-Met Res Rev.* 29(4):308-18.
- Kurihara, O., Takano, M., Yamamoto, M., Shirakabe, A., Kimata, N. 2013. Impact of prediabetic status on coronary atherosclerosis: a multivessel angioscopic study. *Diabetes Care.* 36(3): 729-733.
- Lada, A. T. y Rudel L. L. 2004. Associations of low density lipoprotein particle composition with atherogenicity. *Curr Opin Lipidol.* 15(1): 19-24.
- Lada, A. T. y Rudel L. L. 2003. Dietary monounsaturated versus polyunsaturated fatty acids: which is really better for protection from coronary heart disease? *Curr Opin Lipidol.* 14(1): 41-46.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259): 680-685.
- Lawson, D.M., Artymiuk, P.J., Yewdall, S.J., Smith, J.M., Livingstone, J.C., Treffry, A. 1991. Solving the structure of human H ferritin by genetically engineering intermolecular crystal contacts. *Nature.* 349:541–544.
- Leenaars M. y Hendriksen C. F. 2005. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. *ILAR J.* 46:269-279.
- Leiva, E., Mujica, V., Sepulveda, P., Guzman, L., Nunez, S., Orrego, R. 2013. High Levels of Iron Status and Oxidative Stress in Patients with Metabolic Syndrome. *BioT E Res.* 151(1):1-8.
- Li J. Y., Paragas N., Ned R. M., Qiu A., Viltard M., Leete T., Drexler I. R., Chen X., Sanna-Cherchi S., Mohammed F., Williams D., Lin C. S., Schmidt-Ott K. M., Andrews N. C., Barasch J. 2009. Scara5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery. *Dev Cell.* 16. 35–46.

- Li L, Fang C. J., Ryan J. C., Niemi E. C., Lebron J. A., Bjorkman P. J., Arase H., Torti F. M., Torti S. V., Nakamura M. C., Seaman W. E. 2010. Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(8): 3505-10.
- Libby, P., Ridker, P. M., Maseri, A. 2002. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 105(9): 1135-1143.
- Linder, M. C., Schaffer, K. J., Hazegh-Azam, M., Zhou, C. Y., Tran, T. N., Nagel, G. M. 1996. Serum ferritin: does it differ from tissue ferritin? *J Gastroenterol Hepatol*. 11(11): 1033-1036.
- López-Soto, L. F., Galván-Moroyoqui, J.M., Martínez-Soto, J.M., Almada-Balderrama, M., Rosales-Ruiz, A.P., Álvarez-Hernández, G., Camacho, A.Y., Bolado, E., Soto-Guzmán, A., Candia-Plata, M.C. 2017. Glycooxidated ferritin induces the release of microparticles positive for Toll-like receptors derived from peripheral blood CD14+ cells. *Arc Bio Sc*. 69(3).
- Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K. 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 380(9859): 2095.
- Lyons, T. J., Li, W., Wells-Knecht, M. C., Jokl, R. 1994. Toxicity of mildly modified low-density lipoproteins to cultured retinal capillary endothelial cells and pericytes. *Diabetes*. 43(9): 1090-1095.
- Maton A, Hopkins J, McLaughlin CW y col. 1993. Human biology and health. Prentice Hall, Englewood Cliffs. NJ, USA.
- Matthews, A. J., Vercellotti, G. M., Menchaca, H. J. 1997. Iron and atherosclerosis: Inhibition by the iron chelator deferiprone (L1). *J Surg Res* 73:35-40.

- Matzner Y., Hershko C., Polliack A., Konijn A. M., Izak G. 1979. Suppressive effect of ferritin on in vitro lymphocyte function. *Br. J. Haematol.* 49:345–353.
- McClain, D. A., Abraham, D., Rogers, J., Brady, R., Gault, P., Ajioka, R. 2006. High prevalence of abnormal glucose homeostasis secondary to decreased insulin secretion in individuals with hereditary haemochromatosis. *Diabetologia.* 49:1661-9.
- McGill, H. C., Jr., McMahan, C. A., Malcom, G. T., Oalmann, M. C., Strong, J. P. 1995. Relation of glycohemoglobin and adiposity to atherosclerosis in youth. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15(4): 431-440.
- Meigs, J. B. 2009. Multiple biomarker prediction of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 32(7): 1346-1348.
- Meng, G., Yang, H., Bao, X. 2017. Increased serum ferritin levels are independently related to incidence of prediabetes in adult populations. *Diabetes & Metabolism.* 43: 146-153.
- Muir, R. 1992. Cardiovascular system. In: MacSween RNM Whaley K (eds) Muir's textbook of pathology. 13. Hodder and Stoughton. London
- Nadeau, K. J., Anderson, B. J., Berg, E. G., Chiang, J. L., Chou, H. 2016. Youth-Onset Type 2 Diabetes Consensus Report: Current Status, Challenges, and Priorities. *Diabetes Care.* 39(9): 1635-1642.
- Nigro, J., Osman, N., Dart, A. M., Little, P. J. 2006. Insulin resistance and atherosclerosis. *Endocr Rev.* 27(3): 242-259.
- Opara, E. C. 2004. Role of oxidative stress in the etiology of type 2 diabetes and the effect of antioxidant supplementation on glycemic control. *J Investig Med.* 52(1): 19-23.

- Orchard, T. J., Costacou, T., Kretowski, A., Nesto, R. W. 2006. Type 1 diabetes and coronary artery disease. *Diabetes Care*. 29(11): 2528-2538.
- Pan, A., Sun, Q., Bernstein, A.M., Manson, J.E., Willett, W.C., Hu, F.B. 2013. Changes in Red Meat Consumption and Subsequent Risk of Type 2 Diabetes Mellitus Three Cohorts of US Men and Women. *J Int Med*. 173(14):1328-35.
- Park, G. M., Cho, Y. R., Lee, S. W., Yun, S. C., Won, K. B. 2017. Prediabetes is not a risk factor for subclinical coronary atherosclerosis. *Int J Cardiol*. 243: 479-484.
- Park, S. K., Choi, W. J., Oh, C. M., Kim, M. G., Ham, W. T. 2015. Clinical significance of serum ferritin level as an independent predictor of insulin resistance in Korean men. *Diabetes Res Clin Pract*. 107(1): 187-193.
- Parthasarathy N., Torti S. V., Torti F. M. 2002. Ferritin binds to light chain of human Hkininogen and inhibits kallikrein-mediated bradykinin release. *Biochem J*. 365:279–286.
- Parthasarathy, S., Quinn, M. T., Steinberg, D. 1988. Is oxidized low density lipoprotein involved in the recruitment and retention of monocyte/macrophages in the artery wall during the initiation of atherosclerosis? *Basic Life Sci*. 49: 375-380.
- Parthasarathy, S., Raghavamenon, A., Garelnabi, M. O., Santanam, N. 2010. Oxidized low-density lipoprotein. *Methods Mol Biol*. 610: 403-417.
- Pennathur, S., Wagner, J. D., Leeuwenburgh, C., Litwak, K. N., Heinecke, J. W. 2001. A hydroxyl radical-like species oxidizes cynomolgus monkey artery wall proteins in early diabetic vascular disease. *J Clin Invest*. 107:853-860.
- Plutzky, J., Viberti, G., Haffner, S. 2002. Atherosclerosis in type 2 diabetes mellitus and insulin resistance: mechanistic links and therapeutic targets. *J Diabetes Complications*. 16(6): 401-415.

- Qian, M., Liu, M., Eaton, J. W: Transition metals bind to glycosylated proteins forming redox active “glycochelates”: Implications for the pathogenesis of certain diabetic complications. *Biochem Biophys Res Commun.* 250:385-389, 1998.
- Quinn, M. T., Parthasarathy, S., Fong, L. G., Steinberg, D. 1987. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(9): 2995-2998.
- Rajpathak, S. N., Wylie-Rosett, J., Gunter, M. J., Negassa, A., Kabat, G. C. 2009. Biomarkers of body iron stores and risk of developing type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 11(5): 472-479.
- Roglic, G. y Unwin, N. 2010. Mortality attributable to diabetes: estimates for the year 2010. *Diabetes Res Clin Pract.* 87(1): 15-19.
- Roy C. N., Andrews N. C., Anemia of inflammation: the hepcidin link. *Curr. Opin. Hematol.* 2005; 12:107–111.
- Ruddell R. G., Hoang-Le D., Barwood J. M., Rutherford P. S., Piva T. J., Watters D. J., Santambrogio P., Arosio P., Ramm G. A. 2009. Ferritin functions as a proinflammatory cytokine via iron-independent protein kinase C zeta/nuclear factor kappaB-regulated signaling in rat hepatic stellate cells. *Hepatology.* 49:887–900.
- Salonen, J. T., Yla-Herttuala, S., Yamamoto, R., Butler, S., Korpela, H. 1992. Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet.* 339(8798): 883-887.
- Santambrogio P., Cozzi A., Levi S., Arosio P. Human serum ferritin G-peptide is recognized by anti-L ferritin subunit antibodies and concanavalin-A. *Br. J. Haematol.* 1987; 65:235–237.

- Sainz I. M., Pixley R. A., Colman R. W. 2007. Fifty years of research on the plasma kallikrein–kinin system: from protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology. *Thromb Haemost.* 98:77–83.
- Schier Z., Roth A., Ostroff G., Schrift M. H. Hodgkin's disease and immunity. *Am J Med.* 20:94–99.
- Schottker, B., Rathmann, W., Herder, C., Thorand, B., Wilsgaard, T. 2016. HbA1c levels in non-diabetic older adults - No J-shaped associations with primary cardiovascular events, cardiovascular and all-cause mortality after adjustment for confounders in a meta-analysis of individual participant data from six cohort studies. *BMC Med.* 14: 26.
- Shah, S. V. y Alam, M. G. 2003. Role of iron in atherosclerosis. *Am J Kidney Dis.* 41(3 Suppl 1): S80-83.
- Sparrow, C. P., Parthasarathy, S., Steinberg, D. 1988. Enzymatic modification of low density lipoprotein by purified lipoxygenase plus phospholipase A2 mimics cell-mediated oxidative modification. *J Lipid Res.* 29(6): 745-753.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C., Witztum, J. L. 1989. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.* 320(14): 915-924.
- Stojanovic, N., Krilov, D., Herak, J. N. 2006. Slow oxidation of high density lipoproteins as studied by EPR spectroscopy. *Free Radic Res.* 40(2): 135-140.
- Stoscheck, C. M. 1990. Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* 182: 50-68.
- Sullivan, J.L. 2002. Stored iron and myocardial perfusion deficits. *Am Heart J.* 143:193-195.
- Sun, Q., Ma, J., Rifai, N., Franco, O. H., Rexrode, K. M. 2008. Excessive body iron stores are not associated with risk of coronary heart disease in women. *J Nutr.* 138(12): 2436-2441.

- Suzuki, K., Takano, H., Kubota, Y., Inui, K., Nakamura, S. 2016. Plaque Characteristics in Coronary Artery Disease Patients with Impaired Glucose Tolerance. *PLoS One*. 11(12): e0167645.
- Tabak, A. G., Herder, C., Rathmann, W., Brunner, E. J., Kivimaki, M. 2012. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *Lancet*. 379(9833): 2279-2290.
- Tedgui, A. y Mallat Z. 2006. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev*. 86(2): 515-581.
- Tesfay, L., Huhn, A. J., Hatcher, H., Torti, F. M., Torti, S. V. 2012. Ferritin blocks inhibitory effects of two-chain high molecular weight kininogen (HKa) on adhesion and survival signaling in endothelial cells. *PLoS One*. 7(7): e40030.
- Theil, E. C. 2011. Ferritin protein nanocages use ion channels, catalytic sites, and nucleation channels to manage iron/oxygen chemistry. *Curr Opin Chem Biol*. 15(2): 304-311.
- Torti, F. M. y Torti S. V. 2002. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood*. 99(10): 3505-3516.
- Torti S. V., Torti F. M., Human H-kininogen is a ferritin-binding protein. 1998. *J Biol Chem*. 273:13630–13635.
- Tousoulis, D., Charakida, M., Stefanadis, C. 2006. Endothelial function and inflammation in coronary artery disease. *Heart*. 92(4): 441-444.
- Tuomainen, T.P., Diczfalusy, U., Kaikkonen, J., Nyssonen, K., Salonen, J.T. 2003. Serum ferritin concentration is associated with plasma levels of cholesterol oxidation products in man. *F Rad Bio Med*. 35(8):922-8.
- Ullah, A., Khan, A., Khan, I. 2016. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. *Saudi Pharmaceutical J*. 24(5):547-53.

- Van Lenten, B. J., Prieve, J., Navab, M., Hama, S., Lusis, A. J., Fogelman, A. M. 1995. Lipid-induced changes in intracellular iron homeostasis in vitro and in vivo. *J Clin Invest.* 95:2104-2110.
- Vasudevan, A. y Garber, A.J. 2008. Postprandial Hyperglycemia, in Contemporary Endocrinology: Type 2 Diabetes Mellitus: An Evidence-Based Approach to practical Management. Humana Press, Totowa.
- Vinchi, F., Muckenthaler, M. U., Da Silva, M. C., Balla, G., Balla, J. 2014. Atherogenesis and iron: from epidemiology to cellular level. *Front Pharmacol.* 5: 94.
- Wang, Z., Li, C., Ellenburg, M., Soistman, E., Ruble, J. 2006. Structure of human ferritin L chain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 62(Pt 7): 800-806.
- Wang, Y-L., Koh, W-P., Yuan, J-M., Pan, A. 2017. Plasma ferritin, C-reactive protein, and risk of incident type 2 diabetes in Singapore Chinese men and women. *D Res C Pra.* 128:109-18.
- Weir, G. C. y S. Bonner-Weir. 2004. Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes.* 53 (3): S16-21.
- Wesselius L. J., Nelson M. E., Skikne B. S. Increased release of ferritin and iron by iron-loaded alveolar macrophages in cigarette smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150. 1994; 690–695.
- Weyer, C., Bogardus, C., Mott, D. M., Pratley, R. E.1999. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 104(6): 787-794.
- Wittenbecher, C., Mühlenbruch, K., Kröger, J., Jacobs, S., Kuxhaus, O. 2015. Amino acids, lipid metabolites, and ferritin as potential mediators linking red meat consumption to type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr.* 101(6):1241-50.
- Witztum, J. L. 1994. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet.* 344(8925): 793-795.

- Worwood, M., Dawkins, S., Wagstaff, M., Jacobs, A. 1976. The purification and properties of ferritin from human serum. *Biochem J.* 157(1): 97-103.
- Worwood, M. y Jacobs, M. 1980. Iron in Biochemistry and Medicine. 2. Academic Press. London.
- Xu H, Song Y, Xu J, Gu Y, Zhang Q, Liu L. 2017. Increased serum ferritin levels are independently associated with carotid atherosclerosis in women. *Bri J Nut.* 117(11):1623-30.
- You S. A. y Wang Q. 2005. Ferritin in atherosclerosis. *Clin Chim Acta.* 357:1-16.
- Zacharski, L. R., Ornstein, D. L., Woloshin, S., Schwartz, L. M. 2000. Association of age, sex, and race with body iron stores in adults: analysis of NHANES III data. *Am Heart J.* 140(1):98–104
- Zacharski, L. R., Shamayeva, G., Chow, B. K., DePalma, R. G. 2017. Ferritin and Percent Transferrin Saturation Levels Predict Type 2 Diabetes Risk and Cardiovascular Disease Outcomes. *Curr Diabetes Rev.* 13(4): 428-436.
- Zhao, Z., Li, S., Liu, G., Yan, F., Ma, X. 2012. Body iron stores and heme-iron intake in relation to risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 7(7): e41641.
- Zheng, Y., Ley, S. H., Hu, F. B. 2018. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol.* 14(2): 88-98.
- Zou, W., Liu, X., Zhao, X., Wang, J., Chen, D. 2016. Expression, purification, and characterization of recombinant human L-chain ferritin. *Protein Expr Purif.* 119: 63-68.